

**ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS DA
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA NA
DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS EM
MATRIZES DE INTERESSE SANITÁRIO**

Lisia Maria Gobbo dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

**Orientadores: Dr^a Silvana do Couto Jacob
Dr. Bernhard Welz**

Rio de Janeiro

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Estudos de diferentes técnicas da espectrometria de absorção atômica na determinação de elementos inorgânicos em matrizes de interesse sanitário

Nome do Autor: **Lisia Maria Gobbo dos Santos**

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutora.

Aprovado:

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dr^a Shirley de Mello Pereira Abrantes

Prof. _____ (UFRGS)
Dr^a Maria Goreti R. Vale

Prof. _____ (UFF)
Dr. Ricardo E. Santelli

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dr. Josino Costa Moreira

Prof. _____ (UFF)
Dr^a. Bianca da Cunha Machado

Orientadores

Dr^a Silvana do Couto Jacob

Dr. Bernhard Welz (UFSC)

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Lisia Maria Gobbo

Estudos de diferentes técnicas da espectrometria de absorção atômica na determinação de elementos inorgânicos em matrizes de interesse sanitário/Lisia Maria Gobbo dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

Xiii, 126 p., 44 il., 16 tab.

Tese – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientadores: Dr^a Silvana do Couto Jacob e Dr. Bernhard Welz

1. Elementos Inorgânicos, 2. Espectrometria de Absorção Atômica, 3. Validação de metodologia, 4. Amostragem sólida, 5. Fonte Contínua.

I – Título.

Studies of different techniques of atomic absorption spectrometry for determination of inorganic elements in matrices of health interest.

*À minha família, mãe, pai e dinda,
pelas orações e força nos momentos
mais difíceis e pelo carinho,
confiança e amor. Obrigada por
tudo – Amo vocês*

*Ao meu noivo, Diego Panno, pelo estímulo, paciência, confiança, sacrifício, compreensão, amor e dedicação. Obrigada por fazer parte da minha vida **Te amo***

“A capacidade de converter idéias
em coisas concretas
é o segredo do sucesso.”

Henry Ward Beecher

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela realização e conclusão deste trabalho.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Silvana do Couto Jacob, pelo incentivo, pelo carinho, pela força, pela amizade pelo apoio para comigo durante esses quatro anos de estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bernhard Welz, pela oportunidade, pelo incentivo, pela confiança e por acreditar em mim.

A minha mestra Prof^a Dr^a Maria Goreti R. Vale, por não desistir de mim, e sempre acreditar no meu potencial, OBRIGADA.

Ao meu amigo Rennan G.O. Araújo pela força, dedicação, confiança, apoio, amizade, para que eu pudesse realizar este trabalho.

A todos do Laboratório de Contaminantes Inorgânicos do Departamento de Química INCQS/FIOCRUZ.

A todos do Laboratório de Espectrometria atômica da Universidade Federal de Santa Catarina que me acolheram e me ajudar num dos momentos mais difíceis deste percurso. OBRIGADA.

Ao Prof. Dr Armi Nóbrega, pela força, confiança e oportunidades.

A todos os funcionários e chefes do Departamento de Informática do INCQS /FIOCRUZ.

A minha irmã, Carolina, que sempre acreditou e acredita em mim e me dá força, coragem e estímulo para nunca desistir.

A minha irmã, Clarissa, pelo exemplo de dedicação, perseverança e força de vontade e por me mostrar que quando a gente acredita tudo é possível.

A minha sogra, Sonia Padrão, pelo amor, carinho, compreensão e preocupação.

A minha amiga, Bianca, e toda sua família por torcerem por mim pela conclusão deste trabalho e pelo companheirismo.

A toda a minha família pela força e torcida pela conclusão deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro, para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Resumo:

Os elementos inorgânicos são de interesse sanitário por serem essenciais para o bom funcionamento dos organismos vivos. Por outro lado, aqueles elementos considerados tóxicos, presentes em quantidades indesejadas nos alimentos como resultado da contaminação ambiental e/ou decorrente de fontes antropogênicas, devem ser monitorados a fim de garantir a saúde da população. Este estudo teve por finalidade avaliar a aplicabilidade de diferentes técnicas da espectrometria de absorção atômica na determinação de elementos inorgânicos e suas espécies químicas em matrizes de interesse sanitário. A aplicabilidade do planejamento experimental para otimização multivariada da metodologia de GF AAS para a determinação simultânea de cádmio, chumbo e arsênio em amostras de água foi avaliada. O uso desta ferramenta permitiu a implantação e validação de uma metodologia de Controle de Qualidade da água purificada utilizada nos hemocentros, proporcionando maior rapidez e eficácia para as ações de Vigilância Sanitária. A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite e o uso de amostra direta de sólida (SS-HR-CS GF AAS) foi avaliada e otimizada para determinação simultânea de Cd e Fe em diferentes amostras. O método se mostrou sensível e preciso, com uma RSD de 3-13%, satisfatório quando se trabalha com amostragem direta de sólido. Para avaliar a exatidão do método, análises de materiais de referência certificados foram realizadas, e os resultados foram concordantes com os valores certificados em um intervalo de confiança de 95%.

Palavras-chave: Elementos Inorgânicos, Espectrometria de absorção atômica, Validação de metodologia, Amostragem direta de sólido, Fonte Contínua

Abstract

The chemical contaminants are called undesirable substance, not intentionally added, but in the food with the result of environmental contamination or from anthropogenic sources. These should be monitored to ensure health of the population. For this is necessary to develop new methodologies that can help minimizing the risk to health and control and monitor the Brazilian law. This study was to evaluate the applicability of different techniques of atomic absorption spectrometry for the determination of inorganic elements in matrices of health interest. The applicability of experimental design for multivariate optimization of the methodology of GF AAS for the simultaneous determination of cadmium, lead and arsenic in water samples was study. The direct solid sampling high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry method is proposed for simultaneous detection and quantification of cadmium and iron in different foods. The method SS-HR-CS AAS was sensitive, precise, the relative standard deviation ranged from 3–13%, which is satisfactory when working with direct solid sampling. The accuracy of the method was confirmed by the analysis of certified reference materials; the results were in agreement with the certified values at a 95% confidence interval.

Keywords: *elements* inorganic, food, High-resolution continuum source AAS; Direct solid sample.

Lista de Abreviações

AAS	<i>Absorption Atomic Spectrometry</i>
A_{int}	<i>Absorbância Integrada</i>
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
ATSDR	<i>Agência de substâncias tóxicas e doenças registradas</i>
CCD	<i>Dispositivo de Carga Acoplado</i>
CRM	<i>Material de referência certificado</i>
CS	<i>Fonte Contínua</i>
DQ	<i>Departamento de Química</i>
EDL	<i>Lâmpada de descarga sem eletrodo</i>
EPA	<i>Agência de Proteção ambiental</i>
ESM	<i>Erro sobre a média</i>
EU	<i>União Européia</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	<i>Fundação Oswaldo Cruz</i>
FT	<i>Faixa de Trabalho</i>
GF AAS	<i>Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite</i>
HR	<i>Alta Resolução</i>
IARC	<i>Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer</i>
IBGE	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
I.C	<i>Intervalo de Confiança</i>
ICP- OES	<i>Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado</i>
ICP-MS	<i>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado</i>
IDA	<i>Ingestão diária aceitável</i>
IDTM	<i>Ingestão Diária Máxima Tolerável</i>
INCQS	<i>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde</i>
INMETRO	<i>Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial</i>
ISO/CD	<i>International Standardization Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>

<i>LS</i>	<i>Fonte de Linha</i>
<i>LCO</i>	<i>Lâmpada de catodo oco</i>
<i>LOD</i>	<i>Limite de Detecção</i>
<i>LOQ</i>	<i>Limite de Quantificação</i>
<i>LM</i>	<i>Limite Máximo</i>
<i>LOS</i>	<i>Lei Orgânica da Saúde</i>
<i>MS</i>	<i>Ministério da Saúde</i>
<i>mo</i>	<i>Massa Característica</i>
<i>NIST</i>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
<i>OMS/WHO</i>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
<i>POF</i>	<i>Pesquisa de Orçamento Familiar</i>
<i>PTWI</i>	<i>Ingesta Semanal Tolerável Provisória</i>
<i>QFCA</i>	<i>Questionário de Frequência de Consumo Alimentar</i>
<i>R²</i>	<i>Coefficiente de Correlação da Curva</i>
<i>RSD</i>	<i>Desvio Padrão Relativo</i>
<i>RSM</i>	<i>Metodologia de Superfície de Resposta</i>
<i>STPF</i>	<i>Stabilized Temperature Platform Furnace</i>
<i>UFSC</i>	<i>Universidade Federal de Santa Catarina</i>
<i>UK</i>	<i>Reino Unido</i>
<i>VMP</i>	<i>Valor Máximo permitido</i>

SUMÁRIO

	Página
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Abreviações	xii
CAPITULO 1- INTRODUÇÃO	1
1.2 –Elementos Inorgânicos	6
1.3 - Legislação de Alimentos	10
1.4 - Legislação de Água	13
1.5 – Vigilância Sanitária	15
CAPITULO 2 - OBJETIVO DO PRESENTE TRABALHO	17
CAPITULO 3 - MÉTODOS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS	18
3.1 - Espectrometria Atômica	18
3.2 - Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	20
3.2.1- Modificador Químico	23
3.2. 2– Modificador Químico Permanente	24
3.3 - Espectrometrias de Absorção Atômica com Fonte de Linha	26
3.4 - Espectrometria de Absorção Atômica com Fonte Contínua	30
3.4.1- Fonte Contínua	30
3.4.2 – Monocromador	31
3.4.3 – Detector	32
3.5 – Análise direta de sólidos	39
CAPITULO 4 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	44
4.1 – Conceitos	44
CAPITULO 5 - ANALISE EXPERIMENTAL	47
5.1 - Amostragem	47
5.2 - Tratamento das amostras	47
5.3 - Limpeza e Vidraria	48
5.4 - Materiais e Reagentes	48
5.5 - Preparo das Soluções	51
CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	52

6.1 - Otimização da metodologia para determinação de As, Cd e Pb por GF AAS	52
6.2 - Otimização da metodologia para determinação de Cd e Fe por SS-HR-CS GF AAS	65
6.3 - Otimização da metodologia para determinação de ferro e cádmio por SS-HR-CS GF AAS em amostras de feijão e solo de diferentes regiões do Brasil.	79
CAPITULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
CAPITULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO 1 – Planilhas Linearidade	101
ANEXO 2 – Artigo 1	105
ANEXO 3 –Artigo 2	111
ANEXO 4 –Artigo 3	119

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1- Limites máximos de tolerância (mg kg^{-1}) estipulados para Cd e Pb na legislação brasileira vigente e pela EU e pelo Codex	12
Tabela 2 – Limite máximo permitido para elementos tóxicos em água tratada para diálise.	14
Tabela 3 - Planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central	54
Tabela 4- Planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (planejamento composto central).	57
Tabela 5 - Valores ótimos obtidos para temperatura de pirólise e concentração do $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, utilizando o planejamento 1.	58
Tabela 6 - Planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (planejamento composto central).	60
Tabela 7 - Programa de temperaturas que levou a melhor sensibilidade para os três elementos estudados As, Cd e Pb.	60
Tabela 8- Figuras de mérito para análise simultânea de Arsênio, Cádmio e Chumbo por GF AAS – modelo SIMAA 6000.	62
Tabela 9 – Comparação entre os valores de As, Cd e Pb certificados pelo material de referência Nist N° 1640 e os resultados encontrados	64
Tabela 10 – Programa de temperatura para recobrimento da plataforma de grafite com modificador permanente (Ir, W).	66
Tabela 11- Programa de temperaturas para determinação de cádmio e ferro utilizando amostragem sólida e determinação HR-CS GF AAS, usando uma mistura de Ir + W como modificador permanente e calibração com solução de padrões aquosos.	68
Tabela 12 - Figuras de mérito para a determinação de Cd e Fe em farináceos e alimentos processados à base de grão utilizando SS-HR-CS GF AAS.	76
Tabela 13- Resultados obtidos para determinação de cádmio em CRM por SS-HR-CS GF AAS, usando calibração aquosa e NIST CRM 1567 ^a para calibração sólida, e Ir+ W como modificador permanente.	78
Tabela 14- Resultados obtidos para determinação de ferro em CRM por SS-HR-CS GF AAS, usando calibração aquosa e NIST CRM 1567 ^a para calibração sólida, e Ir+ W como modificador permanente.	78

Tabela 15- Figuras de mérito para a determinação de Cd e Fe em amostras de solo utilizando SS-HR-CS GF AAS. 83

Tabela 16- Resultados obtidos para determinação de Fe em CRM por SS-HR-CS GF AAS usando Ir+ W como modificador permanente. 84

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Etapas que contribuem para caracterização do risco químico através de alimentos ou da dieta.	3
Figura 2- Principais componentes de um sistema de Espectrometria de Absorção Atômica.	20
Figura 3 – Plataforma de L'vov.	22
Figura 4- Exemplo de sinais obtidos a partir de: 1) aquecimento no tubo de grafite; 2) Sinal do analito quando é depositado sobre a parede do tubo, sem plataforma; 3) O sinal do analito é retardado quando este é depositada sobre a plataforma de L'vov.	23
Figura 5- Perspectiva que projetava a utilização da AAS até o ano 2000 (Hieftje 1989).	27
Figura 6 - Suporte para colocar mais de uma lâmpada, o que permite análise multi-elementar –Perkin Elmer – SIMAA 6000.	28
Figura 7- Esquema ótico do equipamento SIMAA 6000 da P.E.	29
Figura 8 - Lâmpada de arco curto de Xe, utilizada em HR-CS AAS	30
Figura 9: Representação do monocromador do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).	32
Figura 10 - Detecção com arranjo CCD nas vizinhanças da linha analítica 228,802 nm do cádmio – resolução de pm/pixel.	33
Figura 11- Modo de visualização dos dados obtidos por HR-CS AAS.	34
Figura 12- Espectro tridimensional, que mostra a absorbância como função do tempo e do comprimento, para Cd e Fe, em um material de referência (BCR 191 – Brow Bread).	35
Figura 13 - Absorbância em função do tempo no pixel central (228,802 nm) para Cd em material de referência BCR 191 e Ir-W como modificador permanente.	36
Figura 14 – Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).	38
Figura 15 – Número de artigo publicado por ano referente a publicações usando amostragem sólida.	40

- Figura 16** - Acessório para inserção manual da plataforma de grafite contendo amostra no espectrômetro 42
- Figura 17**- Foto do equipamento protótipo do tipo HR-CS AAS, utilizado neste trabalho 49
- Figura 18**-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o arsênio. 55
- Figura 19**-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para cádmio 55
- Figura 20**-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o chumbo 55
- Figura 21**-Curva de pirólise para elementos em estudo com $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e temperatura de atomização 2000°C . (♦) arsênio, (■) cádmio e (▲) chumbo. 59
- Figura 22**-Curva de atomização para elementos em estudo com $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e temperatura de pirólise 800°C . (♦) arsênio, (■) cádmio e (▲) chumbo. 59
- Figura 23** -Curva de calibração, com padrões aquosos, para arsênio, faixa linear de $4\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$ - $A_{\text{int}} = 0,0026_{\text{As}} - 0,0025$ – $R^2 = 0,9993$; $T_p = 800^\circ\text{C}$; $T_a = 2200^\circ\text{C}$. 63
- Figura 24** -Curva de calibração, com padrões aquosos, para cádmio, faixa linear de $1\text{-}5 \mu\text{g L}^{-1}$ - $A_{\text{int}} = 0,0238_{\text{Cd}} + 0,0082$ – $R^2 = 0,9982$; $T_p = 800^\circ\text{C}$; $T_a = 2200^\circ\text{C}$. 63
- Figura 25**-Curva de calibração, com padrões aquosos, para chumbo, faixa linear de $20\text{-}100 \mu\text{g L}^{-1}$ - $A_{\text{int}} = 0,0015_{\text{Pb}} + 0,0037$ – $R^2 = 0,9997$; $T_p = 800^\circ\text{C}$; $T_a = 2200^\circ\text{C}$. 64
- Figura 26** - Curvas de pirólise para o Cd em material de referência Nist N° 1573. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W ; Temperatura de atomização 1600°C . 68
- Figura 27**- Curvas de pirólise para o Cd em material de referência BCR N° 191.- - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W Temperatura de atomização 1600°C . 69

Figura 28 - Curvas de pirólise para o Cd em meio aquoso com 10 pg de cádmio. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W
Temperatura de atomização 1600°C. 69

Figura 29 - Curvas de atomização para o Fe em material de referência Nist CRM Nº 1573. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W;
Temperatura de pirólise de 500°C. 70

Figura 30- Curvas de atomização para o Fe em material de referência BCR-CRM nº191.- - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W
Temperatura de pirólise de 500°C. 70

Figura 31- Curvas de atomização para o Fe em meio aquoso com 20ng de Ferro - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -o- com modificador permanente Ir + W
Temperatura de pirólise de 500°C. 71

Figura 32 -Curva de calibração do cádmio, com padrões aquosos, faixa linear de 10-70 pg. 72

Figura 33 -Curva de calibração do Cd obtida através da adição de massas diferente do material de referência BCR 191, faixa linear de 12-40 pg. 73

Figura 34 -Curva de calibração do ferro, com padrões aquosos, faixa linear de 10-40 ng. 73

Figura 35 -Curva de calibração do Fe obtida através da adição de massas diferente do material de referência BCR Nº 191, faixa linear de 17-65 pg. 74

Figura 36 - Sobreposição de sinais transientes para os analitos Cd e Fe em amostra BCR 191 nas temperaturas de pirólise 700°C e de atomização 1700 °C, para Cd e 2600 °C, para Fe . 74

Figura 37 - Sobreposição de sinais transientes para os analitos Cd e Fe em solução padrão nas temperaturas de pirólise 700°C, atomização 1700°C, para Cd e 2600 °C, para Fe. 75

Figura 38 -Curva de calibração do cádmio, com padrões aquosos, faixa linear de 0,3-7 µg L⁻¹ o que equivale a 3-70 pg de Cd. 77

- Figura 39** -Curva de calibração do ferro, com padrões aquosos, faixa linear de 0,25-4 $\mu\text{g L}^{-1}$ o que equivale a 2,5-40 ng de Cd. 77
- Figura 40** - Sinais transientes para ferro com correção para eventos contínuos. a) material de referência BCR N° 142, massa da amostra na plataforma 0,043 mg; b) Padrão em meio aquoso 100 mg L^{-1} (1000 ng). Temperatura de pirólise 700°C e atomização de 2600 °C. 80
- Figura 41** - Sinais medidos para matéria de referência BCR n°142, no pixel 209 (linha preta) e 213 (linha vermelha), usando Ir-W como modificador permanente. 81
- Figura 42** – Curva de calibração para o Fe -20 ng a 4000 ng. 82
- Figura 43** -Curva de calibração, com padrões aquosos, para ferro, faixa linear de 20-200 ng (2-20 mg L^{-1}). 83
- Figura 44** – Curva de calibração, com padrões aquosos, para ferro, faixa linear de 200-4000 ng (20-400 mg L^{-1}). 84

1. INTRODUÇÃO

No mundo globalizado em que vivemos, somos cada vez mais incentivados a consumir produtos e serviços sobre os quais pouco sabemos. Na busca incessante do lucro, empresas e profissionais acabam expondo os indivíduos e a sociedade a riscos desnecessários.

Os alimentos são constituídos de elementos essenciais como vitaminas, sais minerais, fibras e outros mais específicos, como Ômega 3 e Ômega 6. No entanto, se houver algum tipo de microorganismos e/ou substâncias químicas tóxicas, podem causar danos à saúde.

O ser humano está exposto a muitas substâncias químicas, contendo elementos inorgânicos. Muitos destes elementos, essenciais às funções dos organismos vivos, têm as quantidades de ingestão diária recomendadas (IDR) pela Organização Mundial de Saúde. No Brasil, os valores de IDR para elementos essenciais estão estabelecidos através da Portaria SVS nº 33 de 13 de janeiro de 1998 que recomenda a ingestão de 14 mg ferro, 3 mg cobre, 0,70 mg selênio e 15 mg zinco e são essenciais ao bom funcionamento do organismo. Através da Política Nacional de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde outras medidas vem sendo tomadas de modo a prevenir ou minimizar problemas relacionados a má nutrição da população brasileira. Neste sentido pode-se citar a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, da ANVISA / MS que trata da obrigatoriedade do enriquecimento das farinhas de trigo e milho com Ferro (mínimo 4,2 mg/100g do produto) e a Resolução RDC nº 130, de 26 de maio de 2003 sobre a iodação no sal de consumo humano.

Outro grupo de compostos inorgânicos de grande relevância a saúde pública, são aqueles elementos ditos tóxicos uma vez que mesmo em quantidades pequenas podem trazer malefícios aos organismos vivos. Pertencem a este grupo o cádmio, chumbo, arsênio e mercúrio. Segundo a classificação do Programa de Respostas, Indenizações e Responsabilidades Ambientais – Cercla - da ATSDR-EPA, estes elementos correspondem a 20% das substâncias químicas mais agressivas à saúde humana. Reforçando tais premissas, a Agência Internacional para pesquisa sobre o câncer (IARC)

classifica os elementos cádmio, arsênio e mercúrio como carcinogênicos e o chumbo provavelmente carcinogênico.

Através da legislação que visa proteger e assegurar o consumo de alimentos saudáveis, estes elementos devem ser controlados e fiscalizados baseados em valores estipulados pela legislação como seguros.

Uma das principais fontes de exposição do homem a contaminantes é através dos alimentos e das águas contaminadas. Informações sobre a concentração, toxicocinética (absorção, distribuição, biotransformação e excreção), forma química destes contaminantes, bem como sobre a dieta alimentar completa dos indivíduos são muito importantes para avaliar o risco real os quais a população está exposta.

As legislações, que regulamentam os parâmetros de controle dos alimentos ao longo dos anos têm por objetivo garantir a qualidade e a segurança alimentar proporcionando a saúde e o bem estar da população (FRANCESCONI, 2007). Uma das maneiras de assegurar a saúde da população é através de estudos de avaliação de risco. Esta avaliação que é o processo pelo qual se estima a probabilidade de um composto químico produzir efeitos adversos numa dada população em determinadas condições específica de exposição.

A avaliação de risco (Figura 1) resume-se em: a) identificação e caracterização do perigo pela identificação dos efeitos adversos à saúde através do estudo do caso; b) avaliação da exposição através da identificação e quantificação dos contaminantes nos alimentos e na dieta em relação à quantidade de alimento consumido; c) caracterização do risco que integra e resume as informações anteriores, estimando o risco para a saúde pública e apresentando suposições, incertezas e julgamentos científicos (RENWICK, *et al.*, 2003).

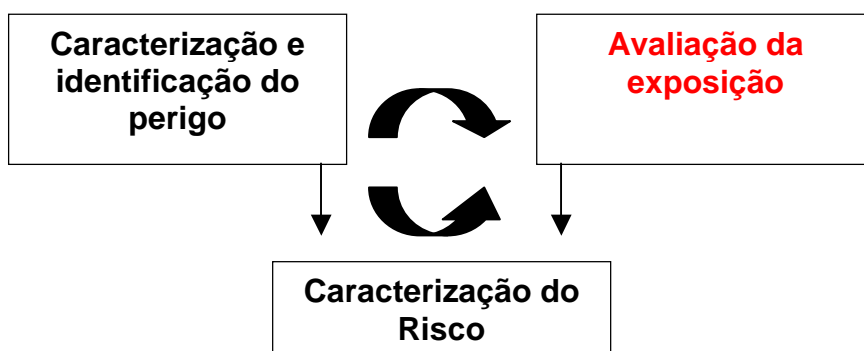


Figura 1 – Etapas que contribuem para caracterização do risco químico através de alimentos ou da dieta.

Dentre as etapas da avaliação de risco a que nos interessa é a avaliação da exposição, que combina a concentração de um determinado contaminante no alimento com o consumo deste alimento pelo indivíduo, e este valor encontrado é comparado com um parâmetro considerado toxicologicamente seguro (CALDAS, 2004). No Brasil, a inexistência de dados reais sobre contaminação e consumo de alimentos e a falta de metodologias analíticas disponíveis apropriadas dificultam a avaliação de possíveis riscos, pois impede verificar se os limites máximos (LM) estabelecidos para água e diversas categorias de alimentos nas legislações brasileiras em vigor (decreto de lei nº 55.871 de 26 de março de 1965 e a portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998) estão sendo observados.

Através de um levantamento bibliográfico realizado verificou-se que o interesse por estudos que tratam da avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos se intensificou nos últimos 20 anos. Os primeiros trabalhos dedicavam-se apenas a avaliação nutricional, não levando em conta a ingestão de elementos tóxicos. Um dos primeiros estudos, que levou em conta a ingestão e a concentração de contaminantes nos alimentos, foi realizado na década de noventa por Mohri, *et al.* (1990) que estudou a ingestão e excreção de arsênio em adultos japoneses, usando a dieta em duplicata. As concentrações encontradas de arsênio inorgânico variaram de $0,18 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $0,23 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores não excederam a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de $2 \mu\text{g de arsênio inorgânico/kg de peso corpóreo}$ segundo FAO/WHO/JECFA. Além deste estudo, podemos citar: Biego, *et al.* (1998) que estudou a ingestão de minerais essenciais como Co, Cr, Cu, Mn, Zn, e micropoluentes, como Cd, B,

Al, Ni, através de alimentos, na França; e Ysart, *et al* (1999) que estudou a estimativa da exposição através da dieta total de 30 elementos na população do Reino Unido. Este último estudo durou três anos, tendo sido avaliadas 20 categorias de alimentos, coletados em 20 localidades diferentes do Reino Unido, o que representou mais ou menos 400 amostras. Estas amostras foram cozidas, homogeneizadas, digeridas e congeladas para posterior análise por ICP-MS e HG-ICP-MS. Os resultados encontrados foram utilizados pra avaliar os valores de ingestão semanal tolerável provisória (PTWI), estipulados pela FAO/WHO/JECFA. Outros estudos, do mesmo gênero foram realizados na Europa (Holanda, Alemanha, Itália), na África (Egito) e na América do Norte (Estados Unidos, Canadá): (DABEKA *et al.* 1995; PENNINGTON *et al.* 1995; BOLGER *et al.* 1996; BRUSSARD *et al.* 1996; GRAMICCIONI *et al.* 1996; MULLER *et al.*, 1998 e SALEH *et al.*, 1998). Neste período não foram encontrados estudos relevantes realizado com a população da América do Sul.

A partir do século XXI o número de publicações levando em conta a ingesta e as concentrações de contaminantes químicos, pesticidas, aditivos, macronutrientes e/ou micronutrientes, aumentou muito. Em 2000 os trabalhos de Hubal, *et al* (2000), Favaro *et al* (2000), sendo que este último determinou a concentração de minerais e alguns elementos-traço na dieta de funcionários do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). O trabalho realizado por Caldas & Souza (2000), foi um dos primeiros estudos que avaliou a ingesta de substâncias químicas através de alimentos, realizado com dados da população brasileira. O trabalho de Caldas avaliou o risco crônico dos agrotóxicos no Brasil, utilizando limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira, dados de consumo alimentar fornecidos pelo IBGE, e doses diárias aceitáveis de vários países e do *Codex Alimentarius*. Os resultados demonstraram que em torno de 94% dos alimentos analisados apresentaram valores para a porcentagem de IDA (ingestão diária aceitável) inferior aquela recomendada. Em 2004 através da dieta brasileira Caldas *et al.* demonstraram o risco da ingestão de ditiocarbamato e em 2006 foram mais dois artigos sobre avaliação probabilística da exposição a agrotóxicos, como ditiocarbamato, organofosforados e carbamato, todos produtos que tiveram uma %IDA superior no primeiro estudo realizado em 2000.

Pode-se citar também o trabalho Popolim *et al*, 2005, realizado com estudantes brasileiros, que estudou a exposição ao sulfito (SO_3^{-2}), através da dieta, revelando uma exposição 50% acima da ingestão diária aceitável (POPOLIM *et al.*, 2005).

Podemos destacar o trabalho de Wilhelm *et al* (2002) sobre a ingestão de cádmio em crianças e adultos, na Alemanha, através da dieta em duplicata; Llobet *et al* (2003) que estudou a concentração de Cd, As, Hg, e Pb em alimentos da dieta de crianças, adolescentes e idosos, na Espanha.

Entre os trabalhos apresentados, um dos mais completos, nesta área, foi publicado em 2004 pela Food Standards Agency, onde foram estudados, através da dieta total, 12 elementos químicos. Este estudo faz parte do programa de Vigilância Sanitária do Reino Unido, cujo objetivo é avaliar a exposição da população a contaminantes através da dieta total (BARBER,2004).

Na América do Sul, podemos destacar os já referidos trabalhos realizados por Caldas *et al.* (2004), no Brasil, e os trabalhos de Muñoz *et al.* (2002 e 2005), sobre a exposição da população de Santiago do Chile aos contaminantes As, Cd e Pb.

No Brasil, a maioria dos estudos realizados refere-se a ingestão de agrotóxicos através da dieta, sendo que um dos únicos estudos sobre o risco da ingestão de contaminantes inorgânicos, arsênio total, através de alimentos que compõem a cesta básica dos brasileiros, demonstrou que a utilização do limite máximo permitido para cada alimento, no cálculo da ingestão semanal, numa avaliação global, pode chegar a valores superiores aos valores toxicologicamente seguros (SANTOS & JACOB, 2005). A estimativa da ingestão de arsênio, a partir dos dados obtidos experimentalmente, não excedeu ao valor da ingestão semanal tolerável provisória estabelecido pela FAO/WHO, que é 0,015 mg As total/kg e equivale a 0,9 mg/semana para um adulto com peso corpóreo médio de 60 kg (WHO, 2002), conseqüentemente não demonstrou risco. No entanto, deve-se observar que o número de amostras alimentícias analisadas, no referido estudo, foi pequeno, se considerarmos a diversidade de alimentos consumidos pela população brasileira (SANTOS & JACOB, 2005).

No ano de 2008 foram publicados seis trabalhos falando da ingestão de contaminantes, principalmente Cd, Pb e Hg, em diferentes países: (CHEUNG

CHUNG *et al.* 2008; YUSA *et al.* 2008; MANSOUR *et al.* 2009; RUBIO *et al.* 2008; CARRERAS *et al.* 2009). No entanto, no Brasil, ainda há uma grande carência de informações nessa área.

Por esta razão, cada vez mais se encontram, na literatura, trabalhos científicos com a preocupação de disponibilizar novas tecnologias e métodos capazes de detectar e monitorar, de maneira eficiente, o conteúdo das substâncias tóxicas nos alimentos e no meio ambiente, a fim de garantir a saúde da população.

Acrescido a isto, a necessidade da colaboração de profissionais de áreas distintas, como saúde, ciência dos alimentos, toxicologia, química analítica entre outras, transforma a realização da avaliação de risco para a população brasileira num grande obstáculo a ser transposto.

1.2 ELEMENTOS INORGÂNICOS

Os elementos inorgânicos podem ser elementos essenciais como o ferro ou tóxicos como As, Cd e Pb.

Os elementos tóxicos são indesejáveis e presentes nos alimentos como resultado da contaminação ambiental ou decorrente dos processos de manipulação, produção, manufatura, processamento, preparação, empacotamento, embalagem, transporte, expedição e de descarte (AZEVEDO & CHASIN, 2003). Esses elementos, quando presentes na dieta alimentar acima dos limites permitidos pelas legislações vigentes (decreto lei nº 55871 de 1965, portaria nº 685 de 1998 e a portaria nº 344 d e 2002) podem constituir riscos à saúde humana.

Os elementos inorgânicos que serão abordados neste trabalho são:

Arsênio

O arsênio pode estar presente nos alimentos, resultado do uso de detergentes à base de fosfatos, produtos sanitários, pigmentos e corantes. O potencial carcinogênico do arsênio foi observado, pela primeira vez, há 100 anos na pele de pacientes tratados cronicamente com arseniais. Em 1988, a Agência Americana de Proteção Ambiental (USA-EPA) concluiu que o arsênio é um elemento carcinogênico do grupo A, conhecido por causar câncer de pele, bexiga e pulmão (EPA/WHO, 1960). Além disso, ele pode atravessar a barreira

placentária produzindo morte fetal e má formação em muitas espécies animais, incluindo no homem (APOSTOLI, 2001; LIANG *et al.*, 1998). O arsênio, uma vez absorvido, é distribuído para, praticamente, todos os órgãos e tecidos do corpo. A principal via de excreção é a urina, sendo que uma quantidade mínima pode ser excretada via bile. Outras vias de excreção incluem o leite materno e os tecidos ricos em queratina, como cabelo, unhas e pele (AZEVEDO& CHASIN, 2003).

Cádmio

O cádmio, produto de revestimentos metálicos, pinturas e materiais plásticos é um elemento extremamente tóxico, tem efeito carcinogênico, lesa túbulos renais, provoca doença óssea (osteomalácia) e hipertensão arterial, intoxicação crônica está relacionado a casos de encefalopatia.

Em média, 5% do total de Cd ingerido por via oral é absorvido e distribuído pelo organismo, concentrando-se principalmente no fígado e nos rins, onde pode ocasionar a formação de cálculos. Quando inalado a absorção aumenta de 30 a 50% e o hábito de fumar, que constitui uma importante fonte de exposição ao Cd, normalmente duplica a absorção diária do metal, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (WHO, 1993). A excreção do cádmio é muito lenta e, conseqüentemente, sua meia vida é muito longa (17-38 anos) (AZEVEDO& CHASIN, 2003). Em função disso, existe a necessidade de novas pesquisas, devido à margem de segurança relativamente estreita entre o que é consumido através da dieta normal e as concentrações relacionadas aos efeitos tóxicos.

Vários trabalhos têm mostrado, também, preocupação quanto à contaminação ambiental causada por cádmio. A capacidade do solo de reter o Cd está positivamente correlacionada com a capacidade de troca de cátion, com a quantidade de matéria orgânica e com o pH, e negativamente correlacionada com a quantidade de óxido de ferro livre. Quanto menor a concentração de ferro maior a probabilidade de encontrar-se no solo Cd e outros metais, como Cu, Zn e Pb (MATOS *et al.* 2001).

Alguns estudos mostram que alimentos contaminados com cádmio afetam a absorção de elementos importantes, como o zinco, cálcio e ferro, essenciais no combate à anemia, e que a depleção de ferro resulta em um aumento da absorção intestinal de Cd e sua posterior transferência para

circulação e para os tecidos do corpo, preferencialmente fígado e rins (REEVES & CHANEY, 2008; MIN *et al.* 2008).

Chumbo

Para o chumbo, a absorção gastrointestinal é influenciada por fatores relacionados à dieta. Se for ingerido com uma refeição, a absorção é cerca de 2% a 16% do total ingerido e, se for ingerido durante um período de jejum, a absorção é cerca 60% a 80%. Em relação ao estado nutricional, sabe-se que um baixo teor de Ca ou Fe na dieta aumenta a absorção do Pb. Em crianças, a absorção é de aproximadamente 50%, enquanto que em adultos é em torno de 15%. O Pb absorvido é distribuído, nos tecidos moles, principalmente no sangue, fígado e rins, e, nos tecidos rígidos, nos ossos e dentes. As principais fontes de eliminação do Pb são através da urina e fezes (AZEVEDO& CHASIN, 2003).

Quanto aos efeitos causados por intoxicação por chumbo, sabe-se que, no sistema periférico, ocorrem desmielinização e degeneração axonal, prejudicando as funções psicomotoras e neuromusculares. No sistema nervoso central (SNC), o chumbo causa encefalopatia, por isto crianças abaixo de três ou quatro anos são mais vulneráveis por estarem na fase de crescimento e desenvolvimento. Estudos sobre a mortalidade ocasionada por câncer tentam correlacionar a exposição crônica ao chumbo e a ocorrência de câncer. A Agência Internacional para pesquisa sobre o câncer (IARC) e a Agência de proteção ambiental (EPA) classificam o chumbo elementar e seus compostos inorgânicos no grupo 2A (prováveis carcinogênicos para humanos) (WHO, 1980).

Outro cuidado é quanto a água contaminada por chumbo destinada para hemodiálise, se a água potável for rica em chumbo, o metal pode persistir mesmo após o tratamento de diálise e os sintomas são anemia hipocrônica, síndrome abdominal (dor abdominal, anorexia: cólica do chumbo), síndrome neuro-muscular (astenia, dores musculares e articulares "gota saturnina".) até a encefalopatia saturnina que se constitui por sintomas de agitação e tremores, podendo evoluir para convulsões, coma e morte (da Silva *et al.* 1996).

Ferro

O ferro é um elemento essencial que atua principalmente na síntese das células vermelhas do sangue e no transporte do oxigênio para todas as células do corpo. Dentre as principais fontes de ferro pode-se destacar a carne e o feijão. Mas seria necessário comer uma quantidade grande desses dois alimentos para se alcançar a Ingestão Diária Recomendada (IRD), que é de 10 a 15 mg do elemento por 100g ou 100mL de alimento.

A deficiência de ferro é o problema nutricional de maior prevalência mundial, ocorrendo tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (FELIX *et al.*; 2008). O principal indicador da insuficiência de ferro é a anemia. Estima-se que 30% a 60% das mulheres e crianças dos países em desenvolvimento sejam carentes desse mineral (WHO; MANGUEIRA *et al.*, 2002).

No Brasil, os programas governamentais de combate à carência de ferro incluem o enriquecimento de alguns alimentos, principalmente as farinhas de trigo e milho e os cereais matinais. Isto se dá, através da Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, da ANVISA/MS que trata da obrigatoriedade do enriquecimento das farinhas de trigo e milho com Ferro (mínimo 4,2 mg/100g do produto) para ajudar a combater a anemia.

1.3 LEGISLAÇÃO DE ALIMENTOS

A criação do MERCOSUL, em 1991, motivou a assinatura do *Tratado de Assunção*, que objetivou a constituição de um Mercado Comum com livre circulação de bens, serviços e fatores de produção entre os países Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, denominados Estados Partes. Estes, por sua vez, assumiram um compromisso de harmonizar suas legislações em áreas pertinentes, visando a inserção de seus produtos no mercado mundial (MACHADO *et al.* 2007). Desde então, os Estados Partes deram passos decisivos nessa direção. Em 1994, eles concordaram na harmonização do regulamento técnico nº 102 e 103 que estabelece níveis máximos de substâncias químicas prejudiciais à saúde pública para alimentos de maior importância comercial entre os membros do MERCOSUL, e mais tarde para alimentos de interesse dos países partes da Organização Mundial do Comércio (OMC). 0

Coube ao Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições legais e considerando os pontos já acordados no MERCOSUL sobre o tema, aprovar a portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, que regulamenta os "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu anexo que contém os "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos".

Os princípios considerados, no estabelecimento dos limites máximos para os contaminantes químicos em alimentos, são fundamentados em estudos toxicológicos, em dados analíticos, em dados de ingestão de contaminantes através de alimentos, na avaliação do impacto dos contaminantes à saúde do consumidor e, também, em dados existentes na literatura científica. Os valores limites seguem normas, diretrizes ou recomendações da Comissão do Codex Alimentarius, da União Européia e de outros organismos reconhecidos internacionalmente.

O Codex Alimentarius, criado em 1963 com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, gera investigações científicas sobre alimentos e contribui para conscientização da comunidade internacional acerca de temas fundamentais, como a qualidade e inocuidade dos alimentos e a saúde pública (BERG & LICHT, 2002). As diretrizes do Codex referem-se aos aspectos de

higiene e propriedades nutricionais dos alimentos, abrangendo códigos de prática e normas para os seguintes itens: aditivos alimentares, pesticidas e resíduos de medicamentos veterinários, substâncias contaminantes, rotulagem, classificação, métodos de amostragem e análise de riscos, que corresponde à identificação e quantificação dos contaminantes nos alimentos em relação à quantidade de alimento consumido (RENEWICK *et al.* 2003)

Em 2001, o Codex Alimentarius revalidou os valores para chumbo e cádmio assim como para mercúrio, e determinou que os valores para arsênio sejam revistos quando metodologias de especiação estiverem disponíveis para análises de rotina. Isto por que o grau de toxicidade depende da espécie química que o arsênio se encontra. O JECFA manteve os valores de PTWI para Cd, Pb, Hg e As.

No Brasil, os limites máximos estabelecidos para diferentes categorias de alimentos não são revisto desde 1998, quando entrou em vigor a Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. A **Tabela 1** mostra os valores para os limites máximos para cádmio e chumbo que foram reavaliados em 2001 pelo Codex Alimentarius e aqueles estabelecidos pelas legislações vigentes no Brasil e União Européia para diferentes categorias de alimentos. Através desta tabela observamos uma diferença significativa entre os novos valores estabelecidos pelo Codex e os valores que estão em vigor, hoje, no Brasil.

Tabela 1- Limites máximos de tolerância (mg kg^{-1}) estipulados para Cd e Pb na legislação brasileira vigente e pela EU e os valores recomendados pelo Codex.

Produtos	Cádmio			Chumbo		
	LM ^a	Codex	EU	LM ^b	Codex	EU
Carne	1	0,05	0,05	0,5-1	0,1	0,1
Miudezas derivadas de suíno e aves	XXX	XXX	XXX	0,2-1	0,5	0,5
Peixe	1	X	0,05	2	0,2	0,2/ 0,4 ^{XX}
Crustáceos	1	0,5	0,5	2	0,5	0,5
Molusco	1	1,0	1,0	2	1,0	1,0
Leite	1	0,1	XXX	0,05	0,02	0,02
Legumes (Feijão)	1	0,1	XXX	0,8	0,2	0,2
Soja		0,2	0,2	XXX	XXX	XXX
Cereal	1	0,1	0,1	0,5	0,2	0,2
Amendoim	XXX	XXX	0,2	XXX	XXX	XXX
Farinha e arroz		0,2	0,2	XXX	XXX	XXX
Farelo e germes de trigo		0,2	0,2	XXX	XXX	XXX
Vegetais	1	0,05	0,05	0,5	0,1	0,1
Vegetais folhosos e Hortaliças Brássicas	1	0,1-0,2	0,1-0,2	0,5	0,3	0,3
Batata sem casca	1	0,1		0,5	0,1	0,1
Frutas	1	0,05	0,05	0,5	0,1	0,1
Frutas vermelhas	XXX	XXX	XXX	0,5	0,2	0,2
Açúcar	1	0,1		2	0,8	XXX
Óleo e gorduras	1	0,1	XXX	0,1	0,1	0,1
Suco de frutas pronto	0,5	XXX	XXX	0,4	0,05	0,05
Vinho	XXX	XXX	XXX	XXX	0,2	0,2
Bebidas alcoólicas	0,2-0,5	XXX	XXX	0,5	XXX	XXX
Refrigerantes	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
Produtos infantis	XXX	XXX	XXX	0,2	0,02	0,02

^a LM – limite máximo preconizado pela legislação brasileira vigente; XXX - valores não estipulados

1.4 LEGISLAÇÃO DE ÁGUA

A contaminação da água é a alteração da sua qualidade natural provocada pela ação do homem e que faz com que ela seja, parcial ou totalmente, imprópria para o uso a que se destina e é uma ameaça à qualidade da vida humana e, de modo especial, para aquelas pessoas que sofrem de insuficiência renal e necessitam de hemodiálise. Os contaminantes mais freqüentemente encontrados nas águas de superfície são materiais orgânicos, minerais e bactérias.

A hemodiálise é um processo de filtração e depuração das substâncias indesejáveis do sangue, como a creatinina e a uréia, realizada em pacientes portadores de insuficiência renal crônica ou aguda. No processo de hemodiálise, o sangue do paciente é retirado e impulsionado, por uma bomba, até o filtro de diálise, conhecido como dialisador. No dialisador, o sangue é então exposto à solução de diálise (Na, K, bicarbonato, Ca, Mg, Cl e acetato) através de uma membrana semipermeável, é permitido as trocas entre as substâncias do sangue e do dialisato. Posteriormente, o sangue “filtrado” é devolvido ao paciente pelo acesso vascular.

Até a década de 70, acreditava-se que a água potável servisse para a hemodiálise. Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitiam correlacionar os contaminantes da água com efeitos adversos do procedimento. Pacientes urêmicos, em tratamento por hemodiálise, são expostos a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 litros por ano. Portanto, se a água não for corretamente tratada vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos, poderão ser transferidos para os pacientes, levando ao aparecimento de efeitos adversos, às vezes letais (IHLE *et al.*, 1982).

Um dos primeiros eventos mórbidos relacionados à qualidade da água foi a chamada síndrome da água dura, que se caracterizava pelo aparecimento - durante as sessões de diálise - de náuseas, vômitos, letargia, fraqueza muscular intensa e hipertensão arterial. Tal quadro estava diretamente associado à presença de grandes quantidades de cálcio e magnésio na água não tratada (da Silva *et al.* 1996).

O reconhecimento do risco potencial que representava a ausência de um tratamento específico levou à criação, em todo o mundo, de vários órgãos e comissões que acabaram estabelecendo critérios para a composição adequada da água a ser utilizada para a preparação dos banhos de diálise.

Em função disso, e por ser fundamental para a vida, a água deve receber cuidados especiais. Portanto, um conjunto de atos de caráter normativo e organizacional fixam padrões de identidade e qualidade para águas minerais, águas naturais de fontes e águas tratadas para diversos usos. Estes padrões visam, fundamentalmente, o controle de substâncias potencialmente prejudiciais à saúde humana como microorganismos patogênicos, substâncias tóxicas e radioativas. Segundo a Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, as águas são classificadas em nove grupos, segundo as suas características físicas, químicas e biológicas. Em função da identificação destes parâmetros e do uso a que se destinam, são estabelecidos os limites para a presença de substâncias tóxicas na água.

A **Tabela 2** contém os limites máximos para os contaminantes arsênio, cádmio e chumbo em água para uso em hemodiálise estabelecido pelo Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde determinado pela ANVISA através da Portaria nº 82, de 03 de janeiro de 2000 - Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde.

Tabela 2 – Limite máximo permitido para elementos tóxicos em água tratada para diálise.

	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Água para diálise	0,005 mg L ⁻¹	0,001 mg L ⁻¹	0,005 mg L ⁻¹

Estes contaminantes, por serem extremamente tóxicos, fazem parte do programa de controle da qualidade da água para diálise, realizado pelo

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), a fim de monitorar e garantir a segurança deste tratamento.

1.5 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Vigilância Sanitária é a área da Saúde Pública que trata das diversas formas de ameaças à saúde oriundas, principalmente, do uso de materiais, produtos e tecnologias presentes na vida contemporânea.

Dentre as atribuições da Vigilância Sanitária está o controle da qualidade dos alimentos consumidos pela população. No Brasil, não são gerados dados sistemáticos sobre contaminação dos alimentos por elementos tóxicos de forma a auxiliar as ações de vigilância sanitária.

O trabalho, ora apresentado, tenta avançar em relação aos estudos de avaliação da ingestão de contaminantes. A determinação da concentração dos contaminantes nos alimentos é uma das etapas mais difíceis do processo de avaliação de risco, uma vez que a concentração de algumas espécies está abaixo dos limites de detecção das técnicas analíticas disponíveis. Assim, se fez necessário buscar uma metodologia capaz de fornecer resultados expressivos para a avaliação da qualidade dos alimentos, caracterizando possíveis e/ou eventuais fontes de contaminação e fornecendo subsídios para uma avaliação crítica dos valores máximos permitidos preconizados na legislação brasileira vigente.

Em função das dificuldades e das limitações das metodologias disponíveis, muitas vezes o cálculo da ingestão utiliza o limite máximo estabelecido na legislação vigente, impossibilitando avaliar o real impacto à saúde. Isto justifica o esforço dispensado para o desenvolvimento de novas técnicas analíticas que eliminem suposições e avaliem, de forma mais precisa, os valores que podem efetivamente causar riscos à saúde pública.

A promoção da saúde e do bem-estar da população é um dever do Estado e cabe a ele a tarefa de impedir ou regular as atividades privadas que possam significar quaisquer tipos de riscos. A Vigilância Sanitária, como uma função típica do Estado, pode punir quem desrespeita as normas estabelecidas em nome da proteção da saúde da população. Porém, mais que punir, a

Vigilância Sanitária deve regular, vigiar, educar, orientar e advertir os segmentos envolvidos em oferecer alimento seguro a população.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a aplicabilidade de diferentes técnicas da espectrometria de absorção atômica na determinação de elementos inorgânicos, em matrizes de interesse para a vigilância sanitária.

Para tanto foram estabelecidos três objetivos específicos:

1. Otimizar e validar a metodologia analítica para determinação simultânea, na rotina, de elementos tóxicos como As, Cd e Pb, em água tratada para diálise utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite;
2. Estudar a viabilidade do uso da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) na detecção e quantificação simultânea dos elementos cádmio e ferro, em diferentes matrizes de interesse nutricional, toxicológico e químico, visto a diversidade existente entre estes elementos.
3. Aplicação do método para determinação simultânea de ferro e cádmio por SS-HR-CS GF AAS em amostras de feijão e solo de diferentes regiões do Brasil.

3. MÉTODOS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS

3.1 – ESPECTROMETRIA ATÔMICA

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica muito difundida para determinação de elementos-traço. Essa técnica envolve radiação eletromagnética que pode ser absorvida pelos átomos dos constituintes químicos das amostras. Ela é baseada na quantificação de espectros de linhas finas que surgem da transição eletrônica, envolvendo a camada mais externa do átomo. A amostra a ser analisada é decomposta por intenso calor, produzindo átomos livres capazes de absorver radiação eletromagnética, em comprimentos de ondas característicos, produzindo espectros atômicos.

Cada elemento químico tem seu conjunto de níveis de energia característico e, portanto, o seu conjunto único de espectros de absorção e emissão. A região ultravioleta/visível do espectro eletromagnético é a região usada na espectrometria atômica (SKOOG, 1998).

O primeiro espectrofotômetro foi desenvolvido por Bunsen and Kirchoff, na segunda metade do século XIX. Este usava uma fonte contínua (CS), pois era a única fonte confiável de radiação disponível naquela época. Esta foi uma das principais razões pela qual a espectrometria de emissão ótica foi preferida à absorção atômica para determinação de metais, durante a primeira metade do século XX (BORGES *et al.* 2005; WELZ *et al.* 2003; WELZ 2005). A espectrometria de emissão ótica determina pequena radiação em um fundo preto e a espectrometria absorção atômica detecta pequena redução de radiação sobre um fundo luminoso.

Em 1952 Alan Walsh chegou à conclusão que fontes de emissão de linhas (LS), com linhas estreitas, seriam necessárias para medidas em AAS, uma vez que, para garantir a relação entre absorção e concentração, precisava-se de uma resolução de aproximadamente de 2 picômetro (pm) ou 0,002 nm. Esta resolução, entretanto, estava muito além da capacidade dos melhores espectrômetros disponíveis na época (BORGES *et al.* 2005; WELZ *et al.* 2003; WELZ 2005). Walsh propôs o uso de lâmpadas de emissão que emitem linhas espectrais atômicas, cuja largura é mais estreita que a das linhas de absorção.

Foram empregadas, então, lâmpadas de cátodo oco (LCO) como fontes de linhas. Essas lâmpadas foram empregadas, pela primeira vez, por Paschem em 1916, porém, naquela ocasião, algumas dificuldades de operação foram apresentadas. As LCO, desenvolvidas por Walsh e colaboradores, eram constituídas de tubos de vidro selados com janela de quartzo, capazes de emitirem linhas estreitas e estáveis, oferecendo alta especificidade, excelentes limites de detecção e curvas de calibração lineares, peças fundamentais para o desenvolvimento da absorção atômica (AMORIN *et al.* 2008).

Atualmente, a fonte de radiação utilizada para excitar os átomos pode ser uma lâmpada de cátodo oco (LCO) ou uma lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL). Quando as lâmpadas EDLs são colocadas em um campo de rádio frequência, ocorre a excitação do metal. A energia produzida vaporiza e excita o átomo dentro do bulbo e causa a emissão do espectro característico do elemento. As lâmpadas EDLs são tipicamente muito mais intensas que as respectivas lâmpadas de LCOs. Essa característica não ocasiona um aumento correspondente na sensibilidade, mas pode melhorar a razão sinal/ruído, resultando maior precisão e melhor limite de detecção.

No processo de absorção atômica, a fonte de luz emite um comprimento de onda específico que é absorvido pelos átomos da amostra no estado fundamental. Essa absorção é proporcional à concentração dos átomos livres, presentes no caminho ótico, obedecendo à lei de Lambert-Beer. O comprimento de onda é então isolado pelo monocromador que não precisa ser de alta resolução, pois a largura da linha que vai ser absorvida é definida pela fonte que impede que outras linhas, que não a de interesse, alcancem o detector. Do monocromador, a linha isolada vai direto para o detector que serve de “olhos” do instrumento. Este é, normalmente, um tubo fotomultiplicador que produz uma corrente elétrica dependente da intensidade da luz. A corrente elétrica, no fotomultiplicador, é amplificada e processada pelo instrumento eletrônico. Este produz um sinal que é a medida da luz que ocorre na célula onde se encontra a amostra. Este sinal é, então, processado, produzindo uma medida que vai ser convertida, pelo instrumento, em unidades de concentração a serem estudadas (BEATY, 1993).

Os principais componentes envolvidos no processo de Absorção atômica estão representados na Figura 2.

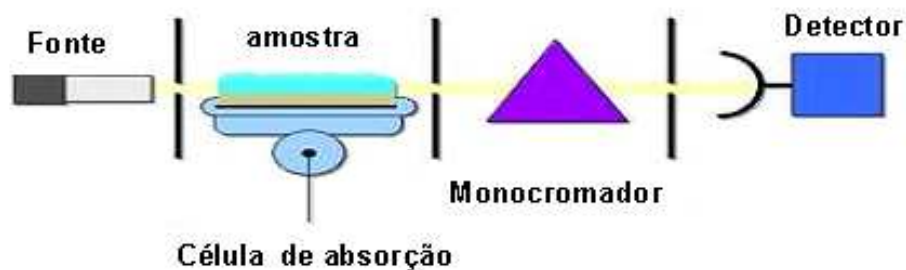


Figura 2- Principais componentes de um sistema de Espectrometria de Absorção Atômica: fonte, sistema de atomização (célula de absorção que pode ser chama, forno de grafite ou geração de hidreto), monocromador, e detector.

Resumindo, a espectrometria de absorção atômica utiliza, basicamente, o princípio que átomos livres, gerados em um atomizador, são capazes de absorver radiação de frequência específica, emitida por uma fonte espectral; a quantificação obedece aos princípios da lei de Lambert -Beer (BORGES *et al.*, 2005; WELZ *et al.* 1999).

3.2-ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GF AAS)

Na determinação de um elemento por GF AAS, a célula de absorção, um tubo de grafite, tem como função converter a amostra em átomos livres, capazes de absorver radiação de frequência específica emitida pela fonte espectral, sendo a absorção proporcional à concentração dos átomos livres, presentes no caminho ótico.

Uma quantidade definida da solução amostra, geralmente 5-50 μL , é introduzida diretamente no forno de grafite, onde a temperatura vai sendo aumentada gradualmente para remoção do solvente e da maioria dos concomitantes antes da atomização. A alíquota introduzida dentro do tubo de grafite é atomizada em um tempo muito curto (tipicamente 1 s) e um sinal transiente é estabelecido, cuja área (absorbância integrada) é proporcional à massa do analito na solução medida.

O aquecimento da amostra dentro do tubo de grafite é realizado através de um programa de temperaturas com as seguintes etapas: secagem, em torno do ponto de ebulição do solvente; pirólise, usada para destruir, pelo menos parcialmente, a matriz (componentes orgânicos e inorgânicos) sem causar perda do elemento a ser determinado; atomização, que produz o vapor atômico do analito; e a limpeza, para remoção dos resíduos (WELZ 1999).

Para se obter uma boa análise usando o forno de grafite deve-se obedecer às condições STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) que foram introduzidas por Slavin em 1981 e consistem na observação dos seguintes tópicos (WELZ, 1999; SLAVIN 1982):

- usar uma plataforma de L'vov onde se consegue um ambiente isotérmico, diminuindo as chances de recombinação do analito;
- aquecimento transversal;
- alta velocidade de aquecimento na etapa de atomização;
- interrupção do gás interno durante a atomização;
- tubos de grafite piroliticamente recobertos;
- absorvância integrada onde a medida é realizada por área, sendo esta proporcional ao número de átomos no campo ótico;
- uso de modificadores químicos cujo objetivo é atingir temperaturas mais elevadas, na etapa de pirólise, sem que ocorra perda do analito, diminuindo as chances de interferências na fase de atomização;
- correção do fundo

Embora, essa técnica seja bastante confiável, ela sofre interferências que são classificadas em:

Interferências Espectrais - ocorrem quando a linha analítica, emitida pela fonte, é absorvida por outra espécie que não o analito; ou quando uma radiação, que não aquela emitida pela fonte primária, alcança o monocromador e não pode ser compensada. Exemplos de interferências são: a ocorrência da sobreposição de linhas atômicas, o espalhamento por partículas e a absorção molecular. Para minimizar esses problemas, utiliza-se um programa adequado de temperaturas e um corretor de fundo, que pode ser corretor contínuo (D_2) ou

corretor de fundo baseado no efeito Zeeman. Em todos os sistemas convencionais de correção de fundo são realizadas duas medidas: a absorvância total (atômica e fundo) e a absorvância de fundo. Dessa forma, alternando-se, rapidamente, a medida da absorvância total e a do fundo, por diferença, é possível determinar a absorvância correspondente aos átomos do analito (WELZ, 1999).

Interferências Não Espectrais – ocorrem quando há alteração no número de átomos capazes de absorver. Suas causas são: composição, muitas vezes, desconhecida da amostra; recombinação de átomos; e interação da amostra com a superfície do grafite, formando carbetos. Essas interferências podem ser contornadas, desde que se use grafite recoberto piroliticamente, plataforma de L'vov (Figura 3) juntamente com modificadores químicos, de preferência em tubo aquecido transversalmente (Figura 4), e adição padrão, isto é, se deixe padrões e amostras com a mesma matriz. Vale ressaltar, no entanto, que as recomendações STPF, normalmente, são suficientes para evitar esse tipo de interferência (WELZ, 1999; SLAVIN 1982).

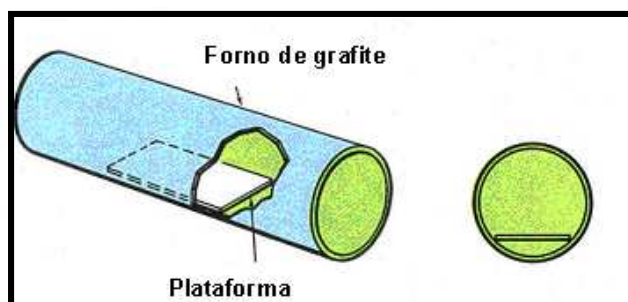


Figura 3 – Plataforma de L'vov, figura retirada do trabalho de Slavin, 1982.

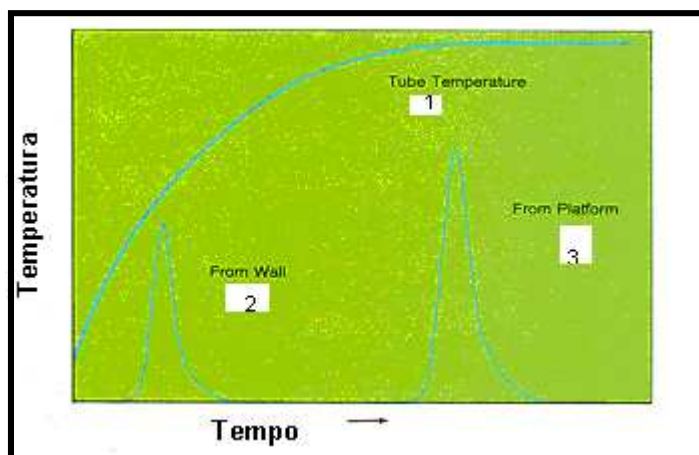


Figura 4- Exemplo de sinais obtidos a partir de: 1) aquecimento no tubo de grafite; 2) Sinal do analito quando é depositado sobre a parede do tubo, sem plataforma; 3) O sinal do analito é retardado quando este é depositado sobre a plataforma de L'vov; figura retirada do trabalho de Slavin, 1982.

Pelo exposto, pode-se concluir que, no final da década de 80, o método GF AAS já era bem estabelecido e apresentava vantagens, em relação a outros métodos disponíveis, como: pouca interferência, fácil operação, medidas rápidas e baixo custo de operação.

3.2.1 - Modificadores Químicos

Os modificadores químicos são definidos de acordo com as recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) da seguinte forma: “Com a finalidade de influenciar os processos que ocorrem no atomizador, reagentes chamados modificadores químicos podem ser adicionados, ajudando a reter o analito a temperaturas mais altas durante a pirólise, com a finalidade de remover concomitantes indesejáveis ou melhorar a atomização”.

O uso do modificador químico, requisito das condições STPF, foi introduzido, na rotina, com objetivo de aumentar a volatilidade da matriz e retardar a volatilização do analito na etapa de pirólise (ACAR, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

Schlemmer e Welz fizeram uma lista de critérios para a seleção de um modificador químico ideal: (WELZ, 1999)

4. O modificador deve elevar a temperatura de volatilização do analito ($T > 1000^{\circ}\text{C}$);
5. O modificador deve estabilizar uma grande variedade de elementos, de modo a facilitar o estabelecimento de métodos que permitam a determinação simultânea de vários elementos na amostra.
6. O reagente deve estar disponível em alta pureza;
7. O modificador, o qual é adicionado em excesso, não pode conter nenhum elemento que possa vir a ser determinado em nível de traço.
8. O modificador não pode diminuir o tempo de vida do tubo de grafite e da plataforma.
9. O modificador pode apenas dar uma contribuição mínima para o sinal de fundo.

Um modificador químico utilizado para a maioria dos elementos e amplamente aplicável a uma grande variedade de matrizes é a combinação de Pd + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ conhecida, desde o começo dos anos 90, como o "modificador universal" (WELZ *et al.* 1992, ACAR, 2005).

Apesar das vantagens do uso dos modificadores químicos, deve-se observar que eles podem ser fonte de contaminação, podem aumentar o tempo e o custo da análise, pois utilizam reagentes de alta pureza, além de apresentarem fundo elevado (PO) (WELZ *et al.* 2005)

3.2.2 - Modificadores químicos permanentes

Os modificadores permanentes consistem na introdução de uma larga quantidade de uma solução de reagente químico no tubo de grafite ou na plataforma, seguido pela aplicação de um programa de temperaturas, formando sobre estes um revestimento artificial. Esses modificadores começaram a ter sucesso para análise de amostras reais, nos últimos anos, por terem apresentados benefícios em relação aos modificadores convencionais (ACAR, 2005; VASSILEVA *et al.*, 2001).

As vantagens atribuídas ao uso de modificadores permanentes são: simplicidade; menor custo, pois não há necessidade de soluções ultrapuras já que as impurezas são eliminadas durante a etapa de fixação do modificador na plataforma; menor tempo para a determinação por GF AAS, o que possibilita

que seja realizado um número maior de análises durante o dia; menores riscos de contaminação; melhor limite de detecção; redução do branco; aumento do tempo de meia vida da plataforma de grafite pirolítico (50-100%) quando comparado com a plataforma sem estar revestida (ACAR, 2000; VASSILEVA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 1998).

O número de modificadores permanentes em uso, ainda hoje, está confinado a aproximadamente 15 a 16 elementos. Entre eles estão os metais nobres de alto ponto de fusão (Ir, Pd, Pt, Rh, Ru) e os elementos que formam carbetos (Mo, Nb, Re, Ta, Ti, V, W, Zr, Hf, B, Si). Os compostos de metais do grupo da platina (PGMs) Pd, Rh, Ru, Pt e Ir, que pertencem ao grupo VIII da tabela periódica, parecem ser os modificadores químicos permanentes mais eficazes, podendo ser usado sozinhos ou combinados. A principal característica dos PGMs é serem inertes em relação às soluções oxidantes, ácidas e alcalinas, e possuírem alto ponto de fusão. Quando os PGMs são transformados em óxidos, haletos e outros sais, esses elementos são geralmente estáveis sob condições normais (SILVA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Porém, para uma melhor estabilização térmica de analitos voláteis, a preferência é dada aos metais nobres menos voláteis (Ir, Rh e Ru), sozinhos ou sobre superfícies tratadas com metais que formam carbetos (W, Zr), levando a pares tais como W-Ir, W-Ru e Zr-Ir. Trabalhos com aplicações diretas de modificadores permanentes em amostras reais de águas (água de rio e água de chuva), sedimentos, sangue, extratos orgânicos e amostras biológicas para determinação de As, Cd, Hg, Pb, Se, Tl, Te, Bi, Sb, Sn podem ser vistos em Tsalev *et al.*, 1995 Borges *et al.*, 2006.

3.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE DE LINHA (LS AAS)

A técnica LS AAS utiliza fontes de emissão de linhas que consistem em lâmpadas especialmente desenvolvidas para emitir apenas radiações, com pequena largura (alguns picômetros), específicas para cada elemento, o que torna essa técnica altamente seletiva.

Entre as vantagens da absorção atômica com fontes de linha pode-se destacar (AMORIN *et al.* 2008; BORGES *et al.*, 2005):

- Menor custo de equipamento, não há necessidade de monocromadores de alta resolução, e menor custo operacional;
- Facilidade de operação;
- Alta seletividade e especificidade;
- Interferências espectrais são reduzidas, pois não há sobreposição de linhas de outros elementos, quando comparadas à técnica de emissão óptica;

Entre as limitações inerentes à LS AAS, pode-se destacar (BORGES *et al.*, 2005; AMORIN *et al.* 2008):

- Faixa de trabalho estreita;
- Frequência analítica baixa, principalmente com atomização eletrotérmica;
- Dificuldades para determinação de elementos não metálicos, como enxofre e fósforo;
- A técnica é limitada à determinação de um único elemento por vez, o que torna o procedimento, relativamente, tedioso se um grande número de elementos tiver que ser determinado em um conjunto de amostras.
- A absorção é medida apenas sobre intervalos espectrais, consideravelmente estreitos, correspondentes à largura da linha atômica emitida pela fonte de radiação, o que restringe a informação disponível sobre o ambiente espectral.

Com o desenvolvimento da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e da espectrometria de massa com

plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), surgiram questionamentos quanto ao futuro da absorção atômica. Em 1989, Hieftje publicou um artigo intitulado “Espectrometria de Absorção Atômica – Se foi ou para onde está indo”, no qual ele apresentou o seguinte posicionamento:

“para que a AAS permaneça viável, em face à forte competição de técnicas alternativas (ICP OES; ICP-MS), claramente torna-se necessário uma renovação na instrumentação ou nos conceitos...”

“Se esta tendência continuar, eu não me surpreenderia ao ver a remoção dos instrumentos comerciais de AAS do mercado em 2000.”

Neste trabalho, Hieftje projetou um provável desuso da técnica AAS e dos instrumentos comerciais correspondentes até o ano 2000 (Figura 5).

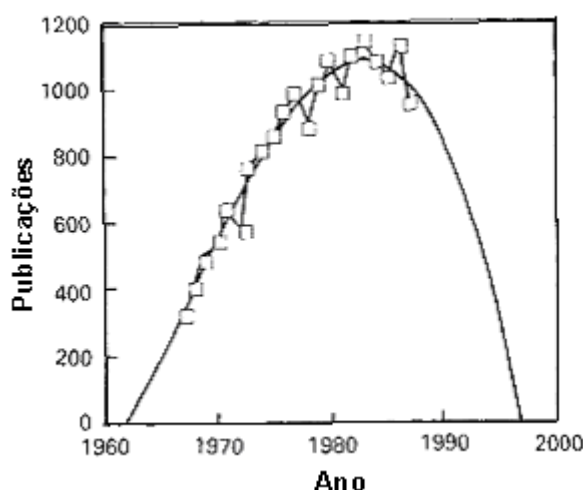


Figura 5- Perspectiva que projetava a utilização da AAS até o ano 2000 (Hieftje 1989).

Ainda no século XX, foram desenvolvidos equipamentos para AAS que permitiam a análise simultânea de mais de um elemento. Nesses equipamentos, um espelho montado em um galvanômetro fazia a seleção da lâmpada (Figura 6) e uma rede Echelle de alta resolução era usada para separação das linhas espectrais. Mas a dificuldade de se montar um equipamento, contendo todos os dispositivos necessários para processar os resultados, tornava esta técnica cara (Figura 7).

O equipamento da Perkin Elmer SIMAA 6000 foi desenvolvido com essa característica multi-elementar, porém poucos artigos foram publicados explorando essa capacidade do aparelho. Entre eles podemos citar os

trabalhos: “Determinação simultânea de Arsênio, cádmio e chumbo em amostras de Água Purificada para hemodiálise por GF AAS, após otimização multivariada baseada no uso de Planejamento Experimental” e o “Evaluation of different rhodium modifiers and coatings on the simultaneous determination of As, Bi, Pb, Sb, Se and of Co, Cr, Cu, Fe, Mn in milk by electrothermal atomic absorption spectrometry” (SANTOS *et al.* 2008; FRESCHI *et al.* 2008).

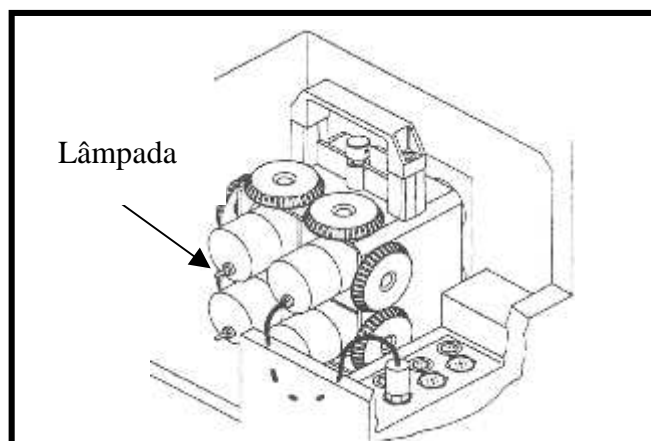


Figura 6 - Suporte para colocar mais de uma lâmpada, o que permite análise multi-elementar – esquema do equipamento da Perkin Elmer – SIMAA 6000.

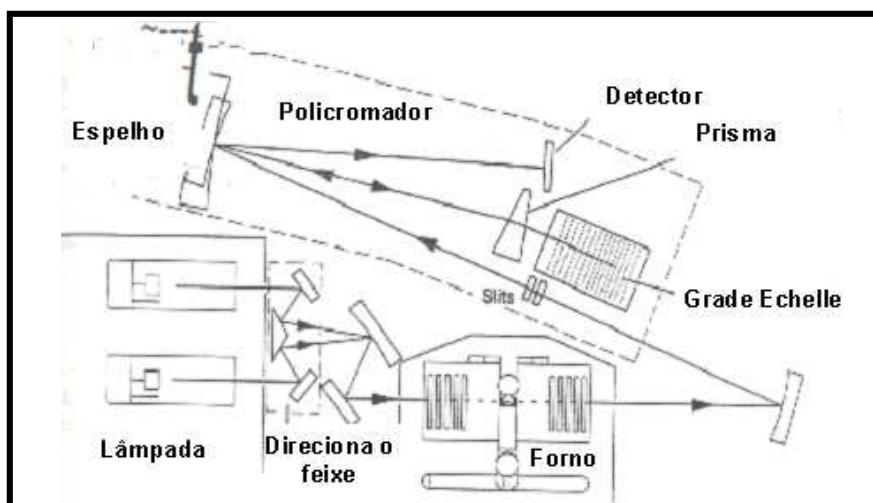


Figura 7- Esquema óptico do equipamento SIMAA 6000 da Perkin Elmer.

A idéia de utilizar-se uma fonte contínua (CS) para AAS passou a ser considerada como uma solução para a sobrevivência da técnica. No entanto, a substituição das lâmpadas por fonte contínua, sem alterações nas outras partes do instrumento, não foi suficiente. Isto porque os monocromadores de média resolução, que são ideais para isolar linhas de emissão das LCOs, separam bandas espectrais excessivamente largas, no caso de fonte contínua. Esta largura de banda resulta numa diminuição da sensibilidade e da especificidade, ocasionando curvas de calibração não-lineares e maior susceptibilidade a interferências de fundo (HEITMANN *et al.* 1996, AMORIN *et al.* 2008). Outro problema a ser superado era a instabilidade produzida por lâmpadas de xenônio que fornecem um fundo com ruído e limites de detecção pobres. Além disso, a intensidade de muitas fontes contínuas diminui drasticamente, abaixo de 280 nm. Por isso, não se pode apenas substituir a fonte, é necessária uma adaptação do restante do instrumento (HEITMANN *et al.* 1996).

Apesar dos muitos obstáculos, a busca pelo uso de fonte contínua não parou e os resultados foram se tornando cada vez mais promissores, especialmente para o grupo de Harnly, na década de 90, após a publicação do trabalho pioneiro de Becker-Ross, realizado no Instituto de Espectroquímica e Espectroscopia Aplicada (ISAS) em Berlim, Alemanha (HEITMANN *et al.* 1996, WELZ *et al.* 2003, BECKER-ROSS *et al.* 2006).

3.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS)

3.4.1 - FONTE CONTÍNUA:

O um dos primeiro instrumento comercial de alta resolução usando fonte contínua foi descrito em 1996 por Heitmann *et al.* O equipamento contava com uma lâmpada de arco de xenônio, como as usadas, por exemplo, em estádios de futebol, possuindo, portanto uma emissão fraca próxima à região UV e abaixo de 250 nm (WELZ *et al.* 2005). Este problema foi solucionado usando uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, 15 bar quando fria, (Figura 8), que opera em modo *hot spot*. Essa lâmpada aumenta a intensidade da radiação, sendo constituída por dois eletrodos de tungstênio distantes menos de 1 mm.

A lâmpada opera em uma potência de 300 W, uma pressão de 50 bar e uma temperatura de 18 °C, a emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. Logo, a intensidade de emissão excede a de uma lâmpada de cátodo oco em, pelo menos, 3 ordens de magnitude e 2 ordens de magnitude a de uma lâmpada de xenônio convencional (WELZ, 2005). Embora os arcos sejam instáveis, seu posicionamento é ativamente corrigido por um sistema controlado por computador que move um espelho, garantindo que o feixe de radiação esteja, constantemente, incidindo no centro do atomizador e, portanto, na fenda de entrada do monocromador (HEITMANN *et al.* 1996, WELZ *et al.* 2003, WELZ *et al.* 2005, BORGES *et al.* 2005)

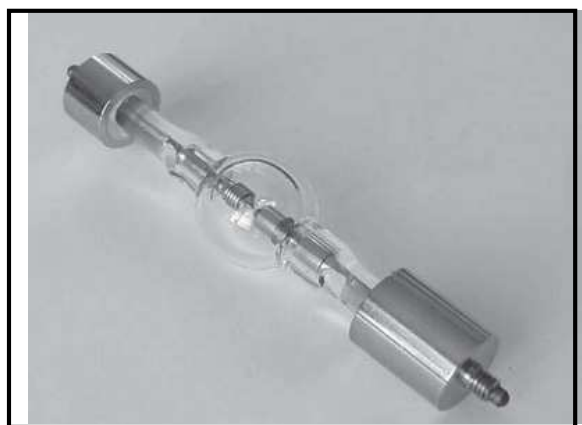


Figura 8 - Lâmpada de arco curto de Xe, utilizada em HR-CS AAS.

3.4.2 - MONOCROMADOR

A radiação incidente, após a passagem pela fenda de entrada que é variável, é dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (Double-Echelle Monochromator). O DEMON consiste de um prisma, que funciona como um pré-dispersor selecionando a parte do espectro de interesse, e um monocromador *echelle*, que fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado (WELZ et al. 2005). A Figura 9 mostra, esquematicamente, com se comporta este monocromador de alta resolução cujos componentes são:

- Fenda de entrada, responsável por limitar a radiação que entra;
- Prisma com comprimento focal de 300mm, responsável pela dispersão espectral da radiação;
- Fenda intermediária, que seleciona um pedaço de ~0,4-5 mm do espectro de interesse e, após, entra no segundo monocromador;
- Rede *echelle*, com comprimento focal de 400 nm, responsável pela alta dispersão da estreita parte do espectro.

Ambas as unidades estão em arranjo *Litrow*, resultando em uma resolução espectral total de $\lambda/\Delta\lambda \approx 140.000$, combinadas em um módulo estável e compacto. Além disso, o sistema inclui a possibilidade de ativar a estabilização do comprimento de onda via linhas espectrais de uma lâmpada interna de neônio posicionada em frente à fenda intermediária (entre o prisma e a rede), emitindo várias linhas relativamente estreitas. A faixa espectral coberta é de 190-900 nm, e a largura da banda espectral do equipamento (com uma fenda geométrica de 24 μm) é de 1,6 pm a 200 nm, e 8,8 pm a 900 nm aumentando a fenda.

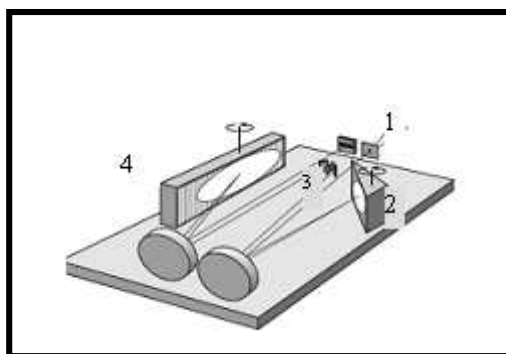


Figura 9: Representação do monocromador do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS). No esquema, têm-se (1) fendas de entrada; (2) prisma; (3) fenda intermediária ajustável; (4) rede *echelle*.

3.4.3 - DETECTOR

Por último, a radiação emitida e transmitida atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivo de carga acoplada (CCD), similar aos dispositivos utilizados em câmeras fotográficas digitais, sensível na região do UV. Cada pixel é equipado com um amplificador individual, de maneira que o instrumento opere de fato com 512 detectores, completamente independentes, cada conjunto com 58 pixels, de tamanho de $24 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$, e cada conjunto de medidas completas e simultâneas cobre um espaço espectral $\pm 1,8 \text{ pm}$ a 200 nm (WELZ *et al.* 2005, WELZ *et al.* 2005, BORGES *et al.* 2003).

Dos 512 detectores, 200 são iluminados e avaliados simultaneamente. Isto significa que o ambiente espectral de $\pm 0,2 - 0,3 \text{ nm}$, próximo à linha analítica do espectro, se torna “visível”, fornecendo uma série de informações indisponíveis em instrumentos convencionais, mas com isto as interferências espectrais tornam-se, também, muito indesejáveis (WELZ *et al.* 2005) (Figura 10).

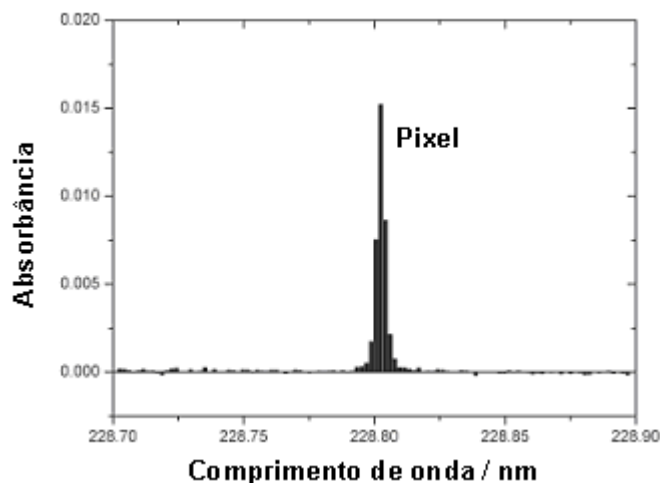


Figura 10- Detecção com arranjo CCD nas vizinhanças da linha analítica 228,802 nm do cádmio – resolução de pm/pixel.

Isto possibilita três maneiras diferentes de visualizar os dados analíticos fornecidos pelo HR-CS AAS: 1) o convencional, sinal transiente (absorbância *versus* tempo), tipicamente usado no forno de grafite com fonte de linha (Figura 11-a); 2) absorbância integrada *versus* comprimento de onda, que permite visualizar qualquer absorção de radiação que tenha ocorrido no intervalo espectral em análise (Figura 11-b); 3) imagem tridimensional que mostra a absorbância como função do tempo e do comprimento de onda, e é, certamente, o modo mais interessante de representação do potencial do HR-CS AAS no que diz respeito à visualização do ambiente espectral (Figura 12) (WELZ *et al.*, 2005).

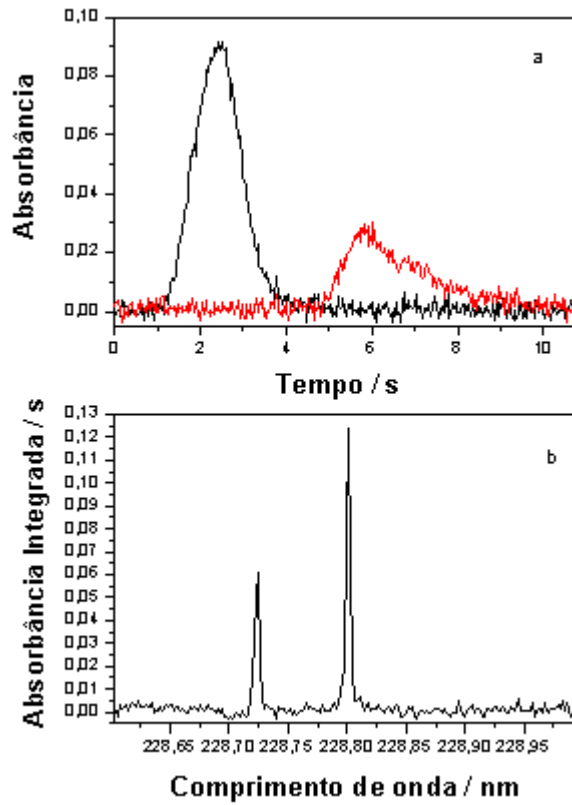


Figura 11- Modo de visualização dos dados obtidos por HR-CS AAS: **a)** sinal transiente para o cádmio, utilizando o pixel central (228,802 nm) e o pixel 211 para o ferro (228,726 nm); **b)** absorvância integrada em função do comprimento de onda para o Cd e para o Fe. Figuras obtidas para o cádmio e para ferro a partir de uma solução em meio aquoso de 50 pg de Cd e 30 ng de ferro.

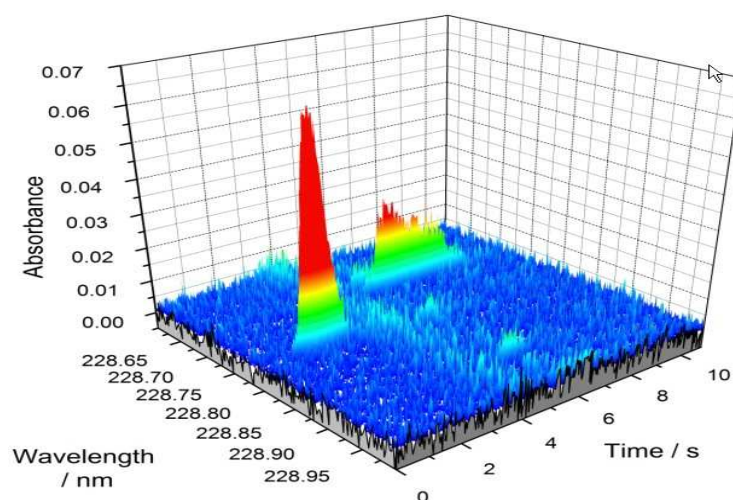


Figura 12- Espectro tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento, para Cd e Fe, em um material de referência (BCR 191 – Brow Bread).

O equipamento é controlado por um software que permite o processamento total dos dados após a medida, o que é importante devido à grande quantidade de informações obtidas com HR-CS AAS. Uma das características mais relevantes do software é a capacidade de corrigir, automaticamente, eventos simultâneos e contínuos. Esses eventos influenciam todos os pixels do detector CCD da mesma maneira, tais como ruído da lâmpada ou absorção de fundo contínuo (Figura13) (VALE *et al.* 2004; WELZ *et al.* 2005).

Porém, esse procedimento não pode corrigir a absorção proveniente de outros átomos ou moléculas gasosas que exibem uma estrutura fina na posição da linha analítica, mas a sobreposição direta de duas linhas atômicas dentro de uma pequena faixa espectral de poucos picômetros é extremamente rara na absorção atômica. Isto porque, dos 200 pixels usados para o propósito analítico, apenas três pixels são tipicamente usados para medir a absorção atômica, sendo assim, outros pixels ou conjuntos de pixels são usados para corrigir efeitos como flutuação de intensidade da lâmpada, uma vez que tais flutuações afetam todos os pixels da mesma maneira e não sequencialmente como acontece nos instrumentos de LS AAS (WELZ *et al.* 2005, WELZ *et al.* 2003, BORGES *et al.* 2005).

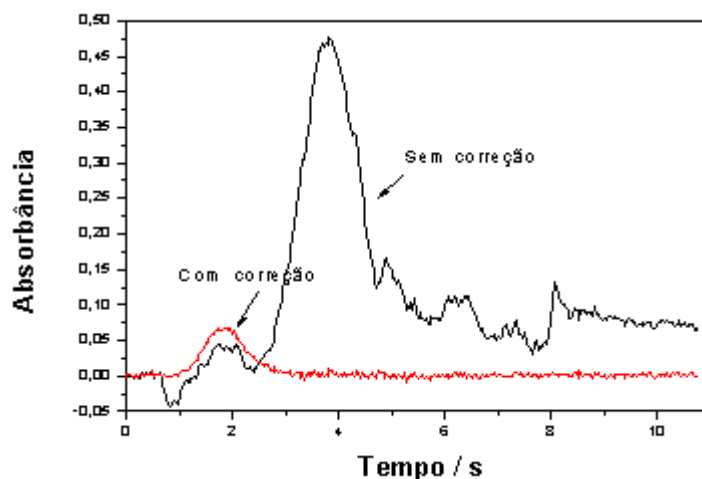


Figura 13 - Absorbância em função do tempo no pixel central (228,802 nm) para Cd em material de referência BCR 191 e Ir-W como modificador permanente; temperatura de atomização 1700°C e temperatura de pirólise 700°C, com e sem correção para eventos contínuos.

Existem, basicamente, quatro maneiras de corrigir o sinal de fundo em instrumentos de HR-CS AAS: 1) via software, que para eventos contínuos ocorre automaticamente; 2) separando, temporalmente, o sinal atômico do sinal de fundo, através do ajuste do intervalo de integração do sinal; 3) separando o sinal atômico do sinal de fundo; 4) subtraindo o espectro de fundo do espectro de determinada amostra, através de um algoritmo de mínimos quadrados. Essa última é usada quando houver sobreposição espectral e temporal do sinal do analito e de fundo, e quando ocorrer fundo estruturado. Este tipo de interferência não pode ser corrigido com nenhum sistema de correção de fundo, em LS AAS (WELZ *et al.* 2005, WELZ *et al.* 2003, BORGES *et al.* 2005).

A correção de fundo, utilizando mínimos quadrados, é feita através da geração de um espectro de referência, onde o fundo estruturado é artificialmente produzido, usualmente por um sal. Este espectro é armazenado e pode ser subtraído, pelo software, de cada espectro individual medido para a amostra, resultando num espectro que contenha apenas o sinal analítico (WELZ *et al.* 2005, WELZ *et al.* 2005, BORGES *et al.* 2005).

Entre as principais vantagens deste novo conceito instrumental (Figura 14) estão:

- Uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos;
- Capacidade de realizar determinações multi-elementares, com emprego de um detector adequado;
- Melhora na razão sinal/ruído devido à elevada intensidade da fonte de radiação, resultando em melhores precisão e limites de detecção;
- Não há raias “fracas”, portanto raias secundárias têm a mesma intensidade e podem ser usadas sem comprometimentos;
- Toda a região espectral nas vizinhanças da raia analítica torna-se visível, possibilitando muito mais informações do que as obtidas por instrumentos convencionais de AAS;
- A detecção com arranjo de carga acoplada permite uma correção simultânea real da radiação de fundo nas proximidades da raia analítica;
- O *software* possibilita o armazenamento de espectros de referência, por exemplo, de espectro de absorção molecular com estruturas rotacionais finas, e a subsequente subtração deste do espectro de uma amostra, usando-se o algoritmo dos mínimos quadrados, sendo assim possível a correção de fundo estruturado mesmo sob a raia analítica;
- Correção para todos os eventos contínuos, tais como ruído da lâmpada ou absorção de fundo contínuo.
- Faixa de calibração com variação de até cinco ordens de grandeza;
- Melhor desempenho analítico na determinação de elementos traços em matrizes complexas.

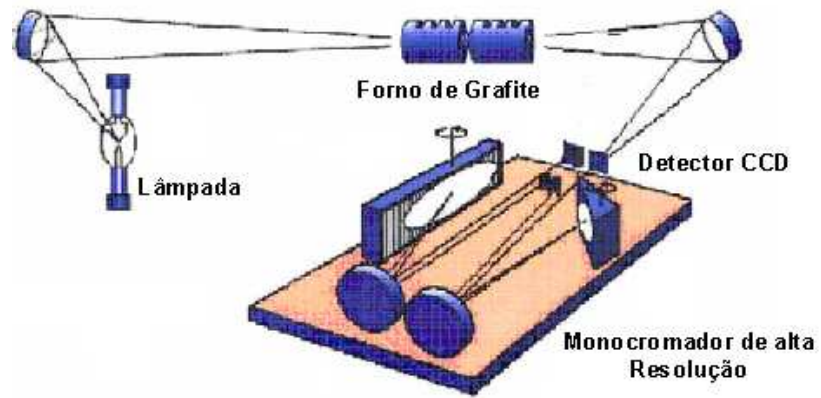


Figura 14 – Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).

3.5 - ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS

A análise direta de amostras sólidas é quase tão antiga quanto a própria técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, e vem sendo perseguida e otimizada com o objetivo de simplificar o procedimento analítico. Um dos primeiros relatos quanto à aplicação da amostragem direta surgiram em 1957 quando Boris L'vov testou o seu modelo de forno de grafite com cloreto de sódio (NaCl) para análise elementar (WELZ *et al.*, 2007; NOMURA *et al.*, 2008). Quando a técnica começou a se tornar popular durante a primeira metade do século XX para determinação de metais usando como fonte arco (corrente elétrica contínua) e spark (faísca-descarga elétrica) para excitar o analito, e fluorescência de raio-X as análises eram tipicamente realizadas em laboratório de metalúrgica, onde ainda são usados. (WELZ *et al.*, 2007)

Porém este método de introdução de amostra sólida não foi muito bem aceito nas de mais áreas, em função, principalmente, da configuração do forno proposto por Massmann em 1967 e que foi adotado pela maioria dos fabricantes, este dificultava a introdução da amostra, se voltando esta técnica para amostragem de soluções cuja introdução da amostra era facilitada e obviamente proporcionava maior eficiência na homogeneização da mesma resultando em excelente precisão (NOMURA *et al.*, 2008; VALE *et al.*, 2006). Entretanto, a digestão da amostra consome tempo e material no laboratório e resulta numa maior probabilidade de erros por perda ou contaminação, além do uso de substâncias tóxicas, porém a maior desvantagem para análise de elementos traço é a dissolução que resulta em níveis de concentração que as técnicas analíticas disponíveis muitas vezes não conseguem detectar (VALE *et al.*, 2006; SILVA *et al.* 2004).

Somente na década de 80 as pesquisas se voltaram para desenvolver um modelo de forno para amostragem sólida e assim surgiram diversas publicações onde se utilizava a técnica da análise direta de sólidos para diferentes matrizes. Na Figura 15 estão apresentados os números de artigos publicados, desde 1980, relacionados à análise de sólidos por AAS. O perfil do

gráfico apresentado na figura indica que a técnica teve um aumento no número de trabalhos publicados a partir dos anos 90 (CAL-PRIETO *et al.*, 2002; NOMURA *et al.*, 2008; VALE *et al.*, 2006)

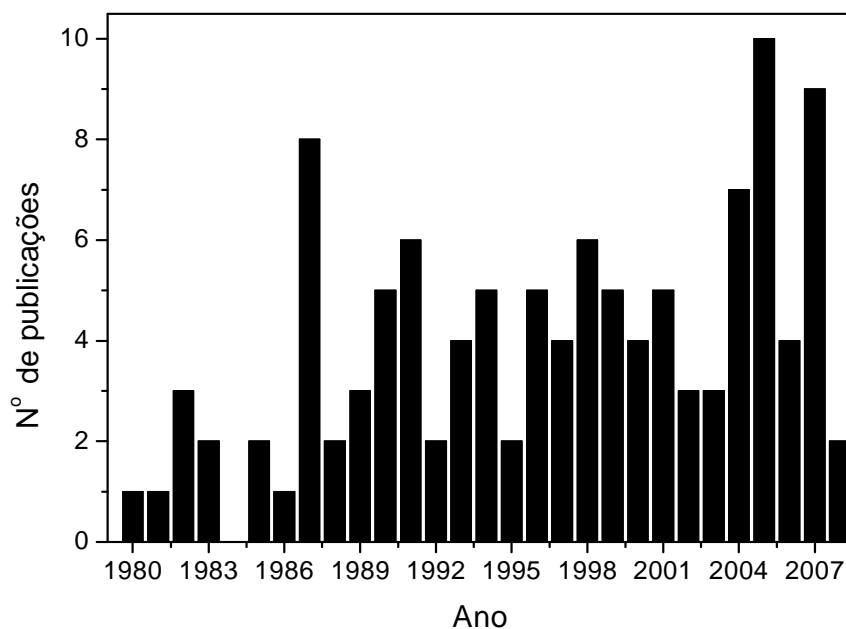


Figura 15 – Número de artigo publicado por ano referente a publicações usando amostragem sólida.

As vantagens de se usar a análise direta de sólidos, quando comparado a outras metodologias de preparo de amostras, podem ser resumidas assim (WELZ *et al.*, 2007; KORN *et al.*, 2008):

- Aumenta a sensibilidade (o que é necessário para análises de traço), pois a amostra é introduzida direto sem diluição;
- Melhora do limite de detecção da técnica, melhor da razão sinal ruído;
- Análise mais rápida, o processo de preparação da amostra leva alguns minutos;
- Diminui consideravelmente o risco de contaminação bem como a perda do analito;
- Quantidade pequena de amostra é necessária;
- O uso de substâncias tóxicas e/ou corrosivas é evitado, resultando em benefícios econômicos e ambientais.
- Melhora exatidão.

Apesar das grandes vantagens desta técnica, muitos pesquisadores têm relatado os seguintes problemas com a análise direta de sólidos, porém estes já estão sendo corrigidos

- A dificuldade de manipulação da amostra, especialmente para introduzir pequenas quantidades de massa dentro do forno de grafite;
- A grande incerteza que pode caracterizar os resultados obtidos, em função da pequena massa de amostra e principalmente da falta de homogeneidade natural das amostras sólidas o que resulta na necessidade de um número maior de repetições;
- As dificuldades de se conseguir uma calibração correta;

O problema de introdução de amostra foi minimizado na última década, quando as publicações falando de amostragem sólida se multiplicaram e foram analisados diferentes analitos em diferentes matrizes, em função do desenvolvimento de diferentes sistemas que estão disponíveis comercialmente, nos dias de hoje.

A *Analytik Jena* (Jena, Alemanha) desenvolveu um acessório especificamente desenhado para esta proposta. Este acessório inclui um par de tesouras que permite a introdução com reprodutibilidade da plataforma de grafite contendo a amostra sólida para dentro do forno. O sistema pode ser manual (figura 16) ou automático. O sistema automático, SSA 62 desenvolvido, também, pela *Analytik Jena* (Jena, Alemanha) consiste de uma micro balança e uma pinça que transfere a plataforma de grafite para o interior do forno. (WELZ *et al.*, 2007; VALE *et al.*, 2006).



Acessório

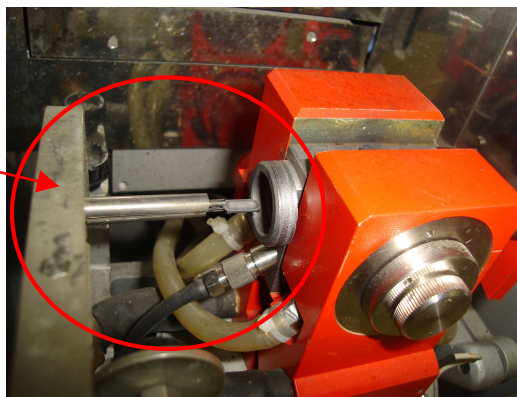


Figura 16 - Acessório para inserção manual da plataforma de grafite contendo amostra no espectrômetro.

Com a melhora da introdução da amostra alcançada, o que preocupava os pesquisadores era a incerteza dos resultados ou imprecisão em função da falta de homogeneidade natural das amostras e da pequena quantidade de amostra introduzida entorno de 1 mg. Porém os trabalhos realizados mostravam que os valores de desvio padrão relativo (RSD) raramente excedem os 10% chegando ao máximo a 20% (para $n \approx 5$) valores estes aceitáveis quando se trata de análise de traços, pois é preferível um resultado correto com RSD de 10% do que um resultado errado com um RSD de 1%. (WELZ *et al.*, 2007)

O terceiro argumento apresentado diz respeito à calibração. Na análise direta de sólidos existem três possibilidades de calibração através do uso de material de referência certificado (CRM) sólido; técnica de adição padrão e calibração utilizando padrões aquosos (VALE *et al.*, 2006).

A calibração usando material certificado é ideal para compensar o efeito da matriz, porém é mais caro e mais complicado para ser aplicado na rotina além de contribuir significativamente para imprecisão e incertezas associada à

técnica. Quanto à técnica de adição padrão é praticamente impossível de ser reproduzida em amostragem sólida (VALE *et al.*, 2006; WELZ *et al.*, 2007).

Quanto ao uso de padrões aquoso, existem vantagens como: os materiais para preparar a solução de padrão são disponíveis e baratos e o procedimento de calibração é rápido e fácil de ser realizado.

Embora a matriz de materiais sólidos apresente uma forte influência sobre o processo de atomização, resultados satisfatórios são obtidos freqüentemente, sob as condições STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace), isto porque a aplicação deste conceito pode remover grande parte das interferências não espectrais, causadas pela matriz (VALE *et al.*, 2006). Diferentes estudos mostraram que, pela integração do sinal e um controle adequado do processo de atomização do analito, é possível obter resultados corretos usando a calibração com padrões aquosos para métodos baseados em SS-GF AAS (WELZ *et al.*, 2007). Através da comparação do perfil temporal de absorção do analito na amostra e o sinal do analito em meio aquoso for similar isto é indicativo da possibilidade de calibração com padrões aquosos. Além da semelhança temporal do sinal analítico, que está relacionada à cinética de liberação para a fase gasosa, a boa concordância estatística com os valores certificados, demonstra a similar eficiência de atomização para os elementos estudados nas amostras e nas soluções aquosas, assegurando a utilização de padrões em meio aquoso para calibração (SILVA *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2006).

4- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1 CONCEITOS

Milhões de medidas analíticas são realizadas, diariamente, em vários laboratórios no mundo, dando suporte a decisões nos mais diversos segmentos da sociedade (EURACHEN, 1998). Neste contexto, os laboratórios devem tomar medidas apropriadas para assegurar que os resultados produzidos tenham qualidade assegurada (THOMPSON et al. 2002).

Na área de alimentos, a validação de métodos está estritamente relacionada à segurança alimentar e ao comércio internacional. Os resultados provenientes dos métodos de ensaios, muitas vezes, subsidiam a formulação de políticas de saúde pública para melhoramento da qualidade dos alimentos disponibilizados à população e adequação do país às regras do comércio internacional.

O processo analítico pode ser dividido em etapas de desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação, e a passagem de uma etapa para outra acontece suavemente. O Guia EURACHEM considera a validação de métodos tipicamente vinculada ao desenvolvimento, de forma que, muito frequentemente, não é possível determinar o ponto no qual o desenvolvimento de um método termina para dar início a validação. Isto porque, muitos dos parâmetros de desempenho, associados à validação, são normalmente avaliados como parte do desenvolvimento.

Algumas definições de validação, que são encontradas na literatura, estão listadas abaixo:

- Validação é a comprovação, através do fornecimento de evidências objetivas, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos (INMETRO, 2007, ISO/IEC 17025:2001, POP n ° 65.1120.065).
- Validação é o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método, sob condições, possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos da aplicação. Constitui o processo de determinação dos parâmetros de desempenho e das limitações de um método, com identificação dos fatores que podem mudar estes parâmetros e em qual extensão (EURACHEN, 1998).

- Validação é o componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar para garantir que produz dados confiáveis (THOMPASON *et al.* 2002)

Segunda a ISO/IEC 17025, os métodos normalizados modificados e métodos não normalizados, que são desenvolvidos pelo laboratório, devem ser validados.

No planejamento e execução da validação, as características de desempenho do método, ou seja, os parâmetros da validação devem estar bem definidos (SOUZA, 2001).

A seguir são apresentados os parâmetros de validação utilizados, com as respectivas definições segundo INMETRO, 2007, EURACHEN, 1998 e o POP n°65.1120.065.

- **Especificidade e Seletividade do método** – estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado de específico e um método que produz resposta para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.
- **Faixa de trabalho do método** - A faixa de trabalho de um método é o intervalo, entre os níveis inferiores e superiores de concentração do analito, no qual é demonstrado ser possível a determinação com: precisão, exatidão e linearidade exigidas.
- **Estudo da linearidade do método** – o método se diz linear quando produz resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante, e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. A equação da reta que deve relacionar as duas variáveis (concentração e resposta analítica) está indicada na equação 1.1:

$$Y = bx + a \quad \text{equação 1.1}$$

Onde:

Y = valor da variável dependente, no caso, absorvância;

x = valor da variável independente, no caso, concentração;

b = declividade da reta ou coeficiente angular;

a = representa o intercepto da reta ou coeficiente linear.

- **Estudo da sensibilidade** – é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Depende da natureza do analito e da técnica de quantificação utilizada.
- **Estudo dos limites de detecção e de quantificação** – limite de detecção é considerado a menor concentração do analito que pode ser detectado, enquanto que o limite de quantificação corresponde a mais baixa concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis.
- **Estudo da Exatidão do método** – é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como, convencionalmente, verdadeiro.
- **Estudo da precisão do método** – é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de padrões, em condições definidas. É, normalmente, determinada para circunstâncias específicas de medições, e a forma mais comum de expressá-la é por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo, usualmente, expressa pelo desvio padrão relativo, equação 1.2.

$$\% RSD = \frac{\sigma}{X} \cdot 100 \quad \text{equação 1.2}$$

Onde:

%RSD = Desvio Padrão Relativo %;

σ = Desvio Padrão dos resultados;

X = Média dos resultados.

5. ANÁLISE EXPERIMENTAL

5.1 AMOSTRAGEM

Neste trabalho, foram analisados os seguintes produtos:

1. Água;
2. Alimentos do tipo farinha de trigo, farinha de milho pão, biscoito e feijão;
3. Solo.

As amostras de água usadas no tratamento de terapia renal substitutiva (hemodiálise) foram coletadas em hemocentros da cidade do Rio de Janeiro, pela secretaria Estadual de Saúde. As coletas foram efetuadas em diferentes pontos do processo de tratamento da água: entrada da rede, osmose e pós-osmose.

As amostras de farináceos, do tipo farinha de trigo, farinha de milho pão e biscoito, foram adquiridas em supermercados de Florianópolis. Quanto as amostras de feijão e de solo foram cedidas pelo professor Doutor Irland Barroncas Gonzaga da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo.

5.2- TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de hemodiálise foram coletadas em frasco de polietileno, contendo ácido nítrico 0,2% e não sofreram nenhum tipo de tratamento antes da análise.

As amostras de farináceos foram secas em estufa, por um período de 48 horas, a uma temperatura não superior a 80°C, posteriormente, foram moídas (MM 200 Odontobras EL -1-1) e armazenadas para análise subsequente.

As amostras de feijões foram coletadas em campo, em sacos de polietileno fechadas e armazenadas imediatamente em caixas refrigeradas. Na etapa seguinte as amostras de feijão eram deixadas à temperatura ambiente até descongelar, em seguida uma parte de cada amostra foi tratada diretamente em um misturador de laboratório com lâmina de aço inoxidável e xícara. Estas foram então doadas para o Prof. Dr. B. Welz da Universidade Federal de Santa Catarina, para estudos. No laboratório, estas amostras foram

novamente moídas (MM 200 Odontobras EL -1-1) e armazenadas para análise subsequente (IRLAND 2002)

As amostras de solo eram coletadas em frasco de polietileno fechados e armazenadas imediatamente em caixas refrigeradas. Após as amostras foram secas a uma temperatura de 50 °C por 24 horas e em seguida eram colocadas para resfriar por ~ 2h sobre sílica gel e armazenadas em frascos de polietileno a temperatura ambiente para posterior análise. No laboratório da UFSC as amostras foram analisadas sem nenhum novo tratamento.

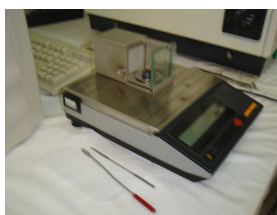
5.3- LIMPEZA DA VIDRARIA

Toda vidraria e todo material utilizado foram limpos por imersão durante 24 horas em ácido nítrico a 10%; posteriormente, o material foi enxaguado, exaustivamente, com água desionizada. Após o processo de lavagem, o material foi deixado secar a temperatura ambiente.

5.4 MATERIAIS E REAGENTES

Equipamentos e acessórios:

- 10.**Espectrômetro de absorção Atômica com Forno de Grafite e fonte de linha – SIMAA 6000 – Perkin Elmer com amostrador automático AS-72, aquecimento transversal e corretor de fundo tipo efeito Zeeman;
- 11.**Lâmpadas de descarga, sem eletrodos (EDL), de arsênio, cádmio e chumbo;
- 12.**Forno de grafite com plataforma integrada recoberta com grafite pirolítico (Perkin Elmer Part. No. BO 504033);



- 1.** Microbalança modelo M2P (Sartorius. Gottingem. Germany);

- 13.**Acessório manual SSA 5 (Analytik Jena);
- 14.**Estufa;

15. Sistema de ultra purificação de água (Millipore, Bedford, MA, USA);

16. Moedor de bola (Model MM 200)- Retsch, Düsseldorf, Germany,



2. Forno de grafite (Analytik Jena Part No. 407-A81.303)

3. Plataforma de grafite pirolítico (Analytik Jena, Part No.407-152.023);

17. Protótipo do tipo HR-CS AAS (Figura 15), construído no ISAS (Berlim, Alemanha), com base no modelo comercial Vario 6 AAS (Analytik Jena AG, Alemanha).

18. Lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, operando em modo *hot-spot*,

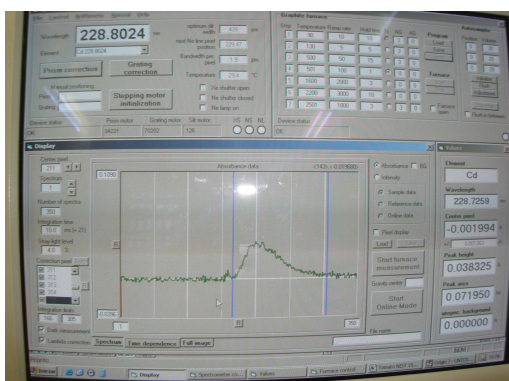
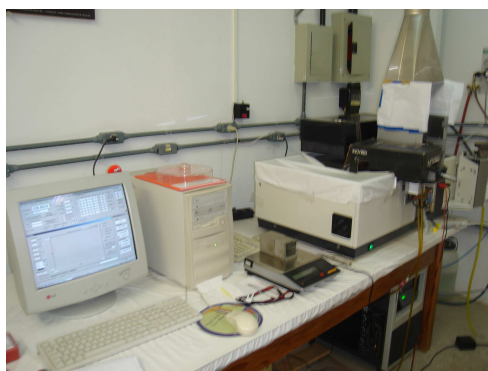


Figura 17- Foto do equipamento protótipo do tipo HR-CS AAS, utilizado neste trabalho.

Reagentes

Foi usada água ultrapura, desionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore), para preparar todas as amostras, soluções padrões e soluções dos reagentes.

Todos os gases, reagentes e materiais de referência certificados foram utilizados dentro dos respectivos prazos de validade e estão abaixo especificados:

- Argônio (99.996% de pureza) - White Martins, São Paulo, Brasil;
- Ácido Nítrico 65% Suprapur[®] Merck - ref. 1004410250;
- Modificador Permanente Irídio-Fluka, Buchs, Switzerland;
- Modificador Permanente Tungstênio-Fluka, Buchs, Switzerland;
- Modificador contendo $10 \text{ g L}^{-1} \text{ Pd(NO}_3)_2$ - Suprapur, Merck;
- Modificador contendo $10 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg(NO}_3)_2$ -Suprapur, Merck;
- Padrão Tritisol Merck de As (H_3AsO_4);
- Padrão Tritisol Merck de Cd (CdCl_2);
- Padrão Tritisol Merck de Pb ($\text{Pb(NO}_3)_2$);
- Padrão Cd – Spex, Eddison, NJ, USA;
- Padrão Pb – Spex, Eddison, NJ, USA
- Padrão Fe - FeCl_3 – Titrisol – Merck;
- Material de referência - NISTS SRM1568^a - Rice flour (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA);
- Material de referência - NIST SRM 1567a Wheat flour (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA);
- Material de referência - NIST SRM 1573a Tomato Leaves (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA);
- Material de referência - NIST SRM 8433 Corn Bran (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA);
- Material de referência -BCR No. 191 Brown Bread (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium);
- Material de referência - BCR No. 142 Light Sandy Soil (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

- Material de referência – NISTS SRM 1640 Trace element in water (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA);

5.5- PREPARO DE SOLUÇÕES

Reagentes

- Solução de ácido nítrico 10%, obtida retirando-se 11 mL de uma solução de HNO₃ concentrado, transferindo-a para um balão volumétrico de 100 mL; o volume foi completado com água desionizada.

Padrões:

- **Soluções Estoque:**

As soluções estoque de cádmio, chumbo, ferro e arsênio foram obtidas através da compra de padrões Titrisol da Merck e da Spex, Eddison, NJ, USA contendo cada um 1000 mg L⁻¹ do respectivo elemento de interesse

- **Solução Intermediária:**

A partir da solução estoque, preparou-se por diluição, a solução intermediária cujas concentrações variavam entre 1 mg L⁻¹ – 100 mg L⁻¹.

- **Soluções para Confecção da Curva Analítica**

Com a solução intermediária foram preparados, através de diluições, os padrões dos respectivos elementos para o estudo da linearidade do equipamento. Foram selecionadas cinco concentrações de padrões de calibração para o equipamento, sendo estes, utilizados para a confecção da curva analítica durante todo o procedimento.

6- RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO POR GF AAS.

A Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) foi a técnica escolhida para determinar arsênio, cádmio e chumbo simultaneamente em amostras de água purificada para hemodiálise. O equipamento utilizado foi o modelo SIMAA 6000 da Perkin Elmer que permite a determinação de até quatro elementos simultâneos.

Para a otimização da metodologia foi aplicado o planejamento fatorial experimental. Essa ferramenta estatística, por sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizada, pelos químicos analíticos, pois permite avaliar as condições ideais de trabalho e a otimização da metodologia (COSTA *et al.*, 2006).

Para executar um planejamento fatorial experimental é preciso determinar quais os fatores (variáveis independentes) e qual a resposta de interesse (variável dependente) para o sistema que se deseja estudar. Também é preciso definir qual objetivo se quer alcançar com os experimentos, porque isto definirá que tipo de planejamento deverá ser utilizado. Devido a sua simplicidade e baixo custo, o planejamento fatorial de dois níveis, completo ou fracionário (COSTA *et al.*, 2006), é muito utilizado em estudos preliminares ou como passo inicial para uma otimização. Neste tipo de planejamento, cada fator é estudado em dois níveis (máximo e mínimo) e, portanto, supõe-se uma linearidade nos efeitos dos fatores. Para a obtenção de uma superfície de resposta não linear e obtenção de um ponto ótimo, é necessário a avaliação de um certo número de pontos (NETO, *et al.*, 1996; CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Neste trabalho, foi feito, inicialmente, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{4-1}), com um ponto central, para avaliar os fatores que apresentavam maiores efeitos na resposta analítica do método. Posteriormente, com os resultados obtidos, procurou-se um ponto ótimo para as temperaturas de pirólise e atomização que satisfizesse as condições ideais

para determinar, simultaneamente, As, Cd e Pb, através da metodologia de superfície de resposta (RSM).

Estudo das variáveis independentes: temperatura de pirólise, temperatura de atomização e modificadores químicos.

Para desenvolver o processo de análise simultânea de As, Cd e Pb, por GF AAS, primeiramente, foi proposto um planejamento fatorial fracionário de dois níveis, com ponto central, a fim de verificar quais variáveis, dentre as previamente selecionadas (temperatura de atomização, temperatura de pirólise e concentração dos modificadores químicos), poderiam causar maior variação na resposta analítica.

Os níveis adotados para as variáveis de temperatura basearam-se no comportamento eletro térmico dos elementos e nas temperaturas utilizadas nas determinações mono elementares de As, Cd e Pb. Em geral, a temperatura de pirólise é selecionada pelo elemento mais volátil e a temperatura de atomização pelo elemento menos volátil. A escolha dos modificadores químicos baseou-se na literatura disponível, onde se verificou que, apesar de haver diversas substâncias sendo usadas como modificadores químicos, a mistura Pd + Mg(NO₃)₂ apresenta bom desempenho para a grande maioria dos elementos determinados por GF AAS (WELZ & SPERLING, 1999; ACAR, 2001). Em função disso, optou-se por trabalhar com esses dois modificadores, sendo as concentrações adotadas baseadas nas determinações mono elementares dos três elementos (As, Cd, Pb).

Um planejamento fatorial completo, no estudo proposto, requereria 16 experimentos (2^4 - quatro fatores), mas, como o objetivo era selecionar os fatores que mais influenciariam na resposta analítica, optou-se por um planejamento fracionário 2^{4-1} , onde apenas oito experimentos são necessários. Este tipo de planejamento despreza os termos de ordem superior que, geralmente, são os menos significativos (NETO et al., 1996). Todos os fatores foram analisados em dois níveis (máximo e mínimo) e num ponto central, realizado em quadruplicata, totalizando 12 experimentos. Na **Tabela 3** os níveis das temperaturas e dos modificadores estudados estão apresentados.

Tabela 3 - Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central

Fatores	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)
Temperatura de Pirólise (°C)	600	800	1000
Temperatura de Atomização (°C)	1400	1800	2200
Concentração de modificador Mg(NO ₃) ₂ – (mg L ⁻¹)	0,6	1,2	1,8
Concentração de modificador Pd(NO ₃) ₂ – (mg L ⁻¹)	0,5	1	2

A execução do planejamento consistiu em realizar os ensaios e registrar as respostas analíticas observadas (absorbâncias), para todas as combinações de níveis.

As respostas analíticas obtidas, através dos resultados experimentais, foram inseridas no programa *Statistica 6.0*, que permitiu avaliar as interações entre as variáveis estudadas e a sua influência sobre a resposta analítica de interesse.

Este planejamento fracionário foi utilizado para detectar a magnitude dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes. Isto foi verificado pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e pela estimativa do erro experimental (erro puro), que permite verificar de maneira quantitativa se o modelo representado era satisfatório, o que só é possível através das replicatas do ponto central, uma vez que não se fez replicatas dos demais pontos. Conforme se pode observar nas Figuras 18, 19 e 20 os fatores que tiveram um *p-level* menor que 0,05 são, estatisticamente, significativos e podem influenciar de maneira positiva ou negativa no resultado esperado.

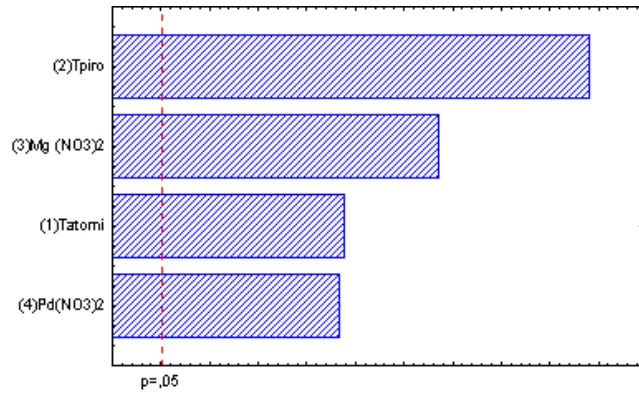


Figura 18-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o arsênio.

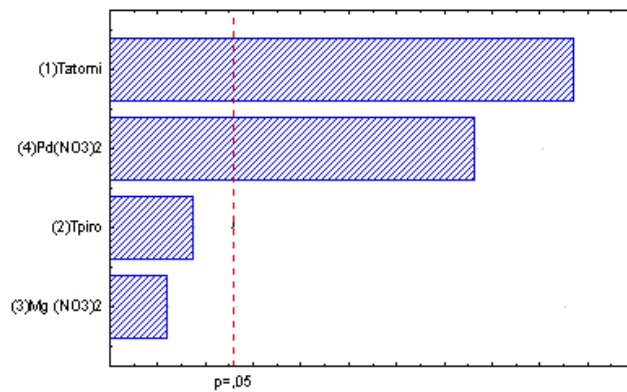


Figura 19-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o cádmio.

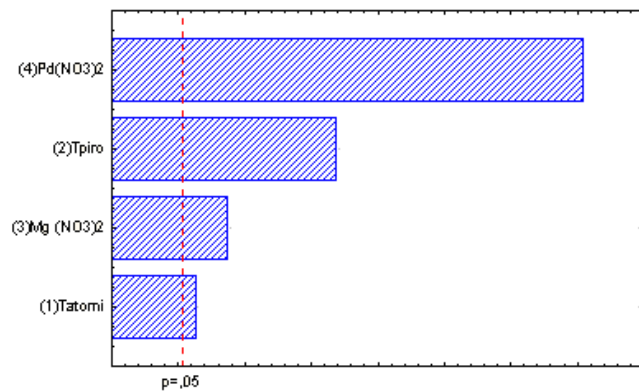


Figura 20-Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o chumbo.

Otimização Multivariada:

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos foram selecionados e a metodologia de análise de superfície de resposta foi executada para obtenção do ponto ótimo. Esta metodologia baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais, quadráticas ou de ordem superior, para descreverem o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até atingir uma região ótima (máximo e mínimo) da superfície de resposta investigada (NETO *et al.*, 1996; CALADO & MONTGOMERY, 2003).

O processo de otimização para determinação simultânea de arsênio, cádmio e chumbo por GF AAS foi dividido em duas etapas: primeiro foi realizado a otimização da temperatura de pirólise e do uso Pd (NO₃)₂ como modificador e, posteriormente, a otimização das temperaturas de pirólise e de atomização. Este método permitiu chegar ao valor ótimo da resposta através de um pequeno número de experimentos.

Planejamento 1:

Nessa etapa, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta em torno das condições previamente estabelecidas: temperatura de pirólise, de 600 °C a 1000°C, e concentração do modificador químico, de 0,5 a 2 mg L⁻¹.

Para atingir a região ótima foi feito um planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (**Tabela 4**).

Tabela 4- Planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (planejamento composto central) – **PLANEJAMENTO 1:** Avaliação da temperatura de pirólise e concentração de Pd(NO₃)₂ usado como modificador químico; temperatura de atomização = 2000°C; concentração do Mg(NO₃)₂ usado modificador = 0,6 mg L⁻¹ foram mantidas constantes.

	T pirolise (°C)	Pd(NO ₃) ₂ mg L ⁻¹	A _{IntAs}	A _{IntCd}	A _{IntPb}
1	600	0,500	0,0026	0,0126	0,0122
2	600	2,000	0,0051	0,0107	0,0122
3	1000	0,500	0,0032	0,0026	0,0142
4	1000	2,000	0,0020	0,0059	0,0096
5	517	1,000	0,0025	0,0130	0,0118
6	1083	1,000	0,0044	0,0110	0,0890
7	800	Zero	0,0050	0,0052	0,0137
8	800	2,414	0,0042	0,0086	0,0112
9 (C)	800	1,000	0,0055	0,0081	0,0107
10 (C)	800	1,000	0,0043	0,0097	0,0120
11 (C)	800	1,000	0,0059	0,0085	0,0110
12 (C)	800	1,000	0,0045	0,0086	0,0117
13 (C)	800	1,000	0,00540	0,00950	0,01210

Com dados da **Tabela 4** e através da opção *Central composite, non-factorial, surface design* do programa *Statistica 6.0*, construiu-se uma superfície de resposta, representando a interação entre a temperatura de pirólise e a concentração do modificar Pd(NO₃)₂. Este planejamento permitiu verificar a presença de um ponto crítico, através da aplicação do critério de Lagrange, levando a obtenção das coordenadas do ponto máximo da superfície. Este ponto representa a situação onde se obtém a maior sensibilidade para o método. A **Tabela 5** apresenta estes valores para os elementos em estudo.

Tabela 5 - Valores ótimos obtidos para temperatura de pirólise e concentração do Pd(NO₃)₂, utilizando o planejamento 1.

	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Temperatura de pirólise	800 °C	900 °C	700 °C
Concentração Pd(NO ₃) ₂	1,0 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	0,9 mg L ⁻¹

No entanto, neste estudo, buscou-se encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfizesse, simultaneamente, todas as variáveis dependentes e que levassem a maior sensibilidade. Para tal usou-se a otimização com restrições, que recebeu o nome de método de programação não linear (NETO *et al.*, 1996). O *Statistica* 6.0 usa a abordagem usada por Derringer e Suich (1980), que utiliza as funções *desirability*. Com esta abordagem foi possível encontrar os valores operacionais ótimos, das variáveis independentes, que satisfizessem, simultaneamente, as variáveis dependentes.

Os valores encontrados para estas variáveis foram: temperatura de pirólise = 1000°C e concentração do modificador Pd(NO₃)₂ = 1 mg L⁻¹. Estes valores corresponderam ao ponto de maior absorvância e, portanto, ao ponto de maior sensibilidade para os três elementos, arsênio, cádmio e chumbo.

Analisando estes resultados, percebeu-se que a temperatura de pirólise, para o elemento cádmio, foi muito alta quando comparada com a temperatura utilizada na análise mono elementar, em função disso estudo-se as temperaturas de pirólise e atomização separadamente, através do estudo univariado (Figura 21 e 22).

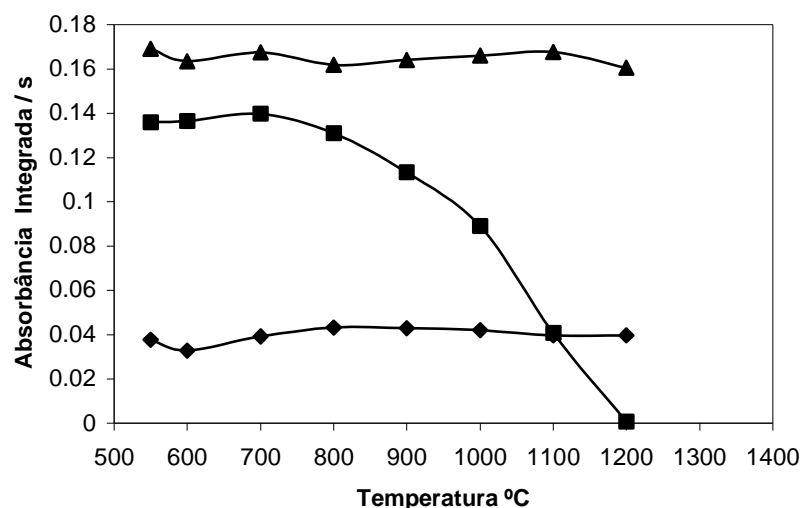


Figura 21-Curva de pirólise para elementos em estudo com $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e temperatura de atomização 2000°C . (◆) arsênio, (■) cádmio e (▲) chumbo.

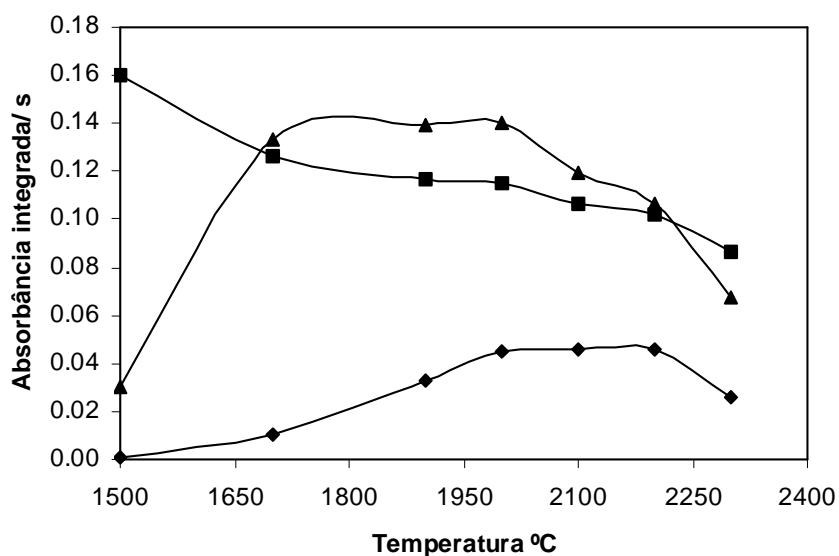


Figura 22-Curva de atomização para elementos em estudo com $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e temperatura de pirólise 800°C . (◆) arsênio, (■) cádmio e (▲) chumbo.

Posteriormente, realizou-se um segundo planejamento, avaliando a temperatura de atomização, por ser a variável de maior influência na análise do cádmio, conforme mostrado no estudo preliminar, junto com a temperatura de pirólise, que representa o ponto crítico para análise desse elemento.

Planejamento 2:

Neste planejamento, a concentração do modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ foi mantida igual a 1 mg L^{-1} , segundo a otimização anterior, e a concentração do modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ igual a $0,6 \text{ mg L}^{-1}$, porque esta variável não tem um efeito significativo na sensibilidade do método para cádmio e chumbo. Optou-se por adotar a concentração usada para a análise mono elementar do elemento arsênio, visto que este elemento sofreu maior influência, desta variável, nos resultados.

Os experimentos realizados estão indicados na Tabela 6. Estes resultados foram avaliados seguindo o mesmo caminho do planejamento 1.

Tabela 6 - Planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (planejamento composto central)– **PLANEJAMENTO 2:** Avaliação da temperatura de atomização e temperatura de pirólise; as concentrações de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 = 1 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 = 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ usados como modificadores químicos foram mantidas constantes.

	T atomização °C	T pirólise °C	A_{IntAs}	A_{IntCd}	A_{IntPb}
1	1400	600	0,0037	0,0316	0,0024
2	1400	1000	0,0002	0,0204	0,0052
3	2200	600	0,0755	0,0260	0,1549
4	2200	1000	0,0784	0,0176	0,1535
5	1234	800	0,0015	0,0160	0,0002
6	2366	800	0,0739	0,0627	0,1381
7	1800	517	0,0169	0,0261	0,1807
8	1800	1083	0,0243	0,0035	0,1738
9 (C)	1800	800	0,0175	0,0237	0,1819
10 (C)	1800	800	0,0228	0,0250	0,1842
11 (C)	1800	800	0,0232	0,0251	0,1837
12 (C)	1800	800	0,0220	0,0245	0,1839
13 (C)	1800	800	0,0225	0,0253	0,1840

Os valores encontrados para as variáveis foram: temperatura de pirólise = 800°C e temperatura de atomização = 2200°C, que corresponderam ao ponto de maior sensibilidade para os três elementos, arsênio, cádmio e chumbo. A **Tabela 7** apresenta o programa de temperaturas que apresentou as melhores condições para atingir o objetivo deste trabalho.

Tabela 7 - Programa de temperaturas que levou a melhor sensibilidade para os três elementos estudados As,Cd e Pb.

Fases	Temperatura °C	Rampa °C s ⁻¹	Permanência s	Fluxo Interno mL min ⁻¹	Gás	Leitura
1	110	1	30	250	N	
2	130	15	30	250	N	
3	800	10	20	250	N	
4	2200	0	3	250	-	*
5	2450	1	3	250	N	

Figuras de mérito

Com a definição das condições ideais para a metodologia proposta, realizou-se o estudo dos parâmetros de validação da mesma.

A **Tabela 8** apresenta as figuras de mérito da metodologia estudada para analisar os elementos de interesse. Tendo em vista que o sinal observado na espectrometria de absorção atômica com forno de grafite depende da massa do analito, a expressão massa característica (*mo*) foi o parâmetro para avaliar a sensibilidade de um analito que é definida como a massa do analito necessária para produzir um sinal de absorbância versus tempo, com área integrada de 0,0044 s, isto equivale a 1% de absorção.

Os resultados obtidos para as massas característica mostraram que não houve perda de sensibilidade para os elementos arsênio e chumbo, quando se comparados com a análise monoelementar, cuja massa característica é de 40,0 pg /0,0044 A-s e 30,0 pg /0,0044 A-s, respectivamente. Com relação ao cádmio houve uma perda de sensibilidade, mas esta não foi significativa para o propósito do método.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir do desvio padrão de dez leituras do branco dividido pela inclinação da curva de

calibração, sendo utilizado os critérios de três vezes o desvio padrão, para o LOD e dez vezes o desvio padrão, para LOQ.

Tabela 8- Figuras de mérito para análise simultânea de Arsênio, Cádmio e Chumbo por GF AAS – modelo SIMAA 6000.

Parâmetros	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Faixa de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4 - 20	1-5	20-100
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0	0,1	1,0
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,0	0,4	3,5
<i>mo</i> (pg)	34,6	2,1	25,1

A linearidade foi avaliada conforme procedimento descrito por SOUZA JUNQUEIRA. Três curvas de calibração foram preparadas, em diferentes dias, com níveis de concentrações de 4,8,12,16 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o As; 1,2,3,4 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Cd ; 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Pb. Através da avaliação visual da Figuras 23-25 e do coeficiente de correlação (R^2) foi possível verificar a linearidade das curvas.

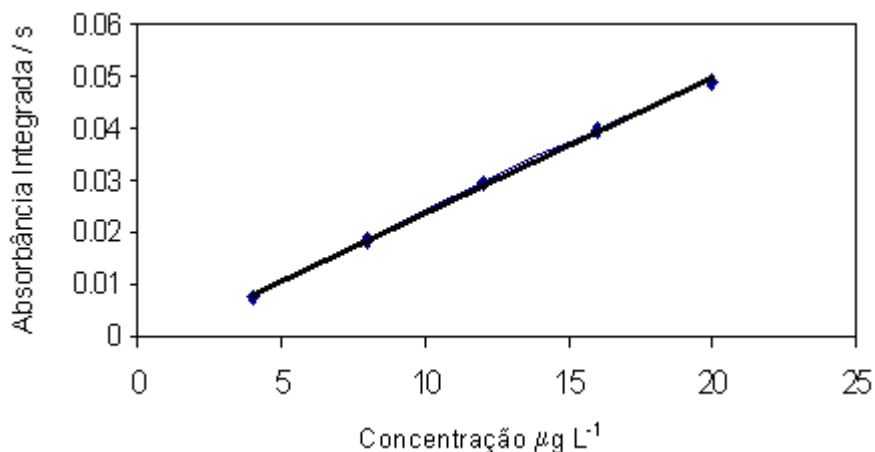


Figura 23 -Curva de calibração, com padrões aquosos, para arsênio, faixa linear de 4-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ - $A_{\text{int}} = 0,0026A_{\text{As}} - 0,0025$ - $R^2 = 0,9993$; $T_p = 800^\circ\text{C}$; $T_a = 2200^\circ\text{C}$.

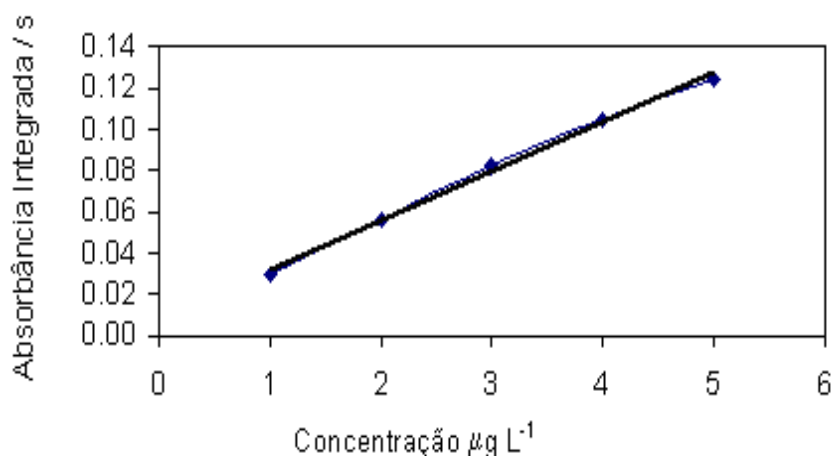


Figura 24 -Curva de calibração, com padrões aquosos, para cádmio, faixa linear de 1-5 $\mu\text{g L}^{-1}$ - $A_{\text{int}} = 0,0238A_{\text{Cd}} + 0,0082$ - $R^2 = 0,9982$; $T_p = 800^\circ\text{C}$; $T_a = 2200^\circ\text{C}$.

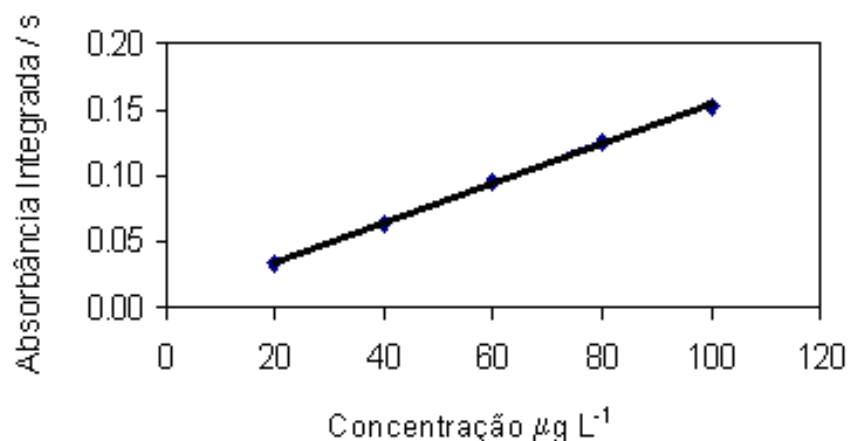


Figura 25-Curva de calibração, com padrões aquosos, para chumbo, faixa linear de 20-100 µg L⁻¹ - $A_{int} = 0,0015_{Pb} + 0,0037$ - $R^2 = 0,9997$; $T_p = 800^\circ C$; $T_a = 2200^\circ C$.

A validação da metodologia, segundo os parâmetros do INMETRO, mostrou que o método estudado apresenta boa precisão e exatidão. A exatidão foi avaliada por meio da análise de material de referência NIST CRM N° 1640. Os valores encontrados estão em concordância com o valor certificado conforme *teste-t de students* para um nível de confiança de 95% (**Tabela 9**). A precisão do método estudada através da repetitividade e expressa através do desvio padrão relativo (%RSD), para cinco medidas do material de referência (NIST CRM N° 1640) e para as amostras estudadas, variaram de 0,9 – 5 %, tanto para o material de referência como para as amostras.

Tabela 9 – Comparação entre os valores de As, Cd e Pb certificados pelo material de referência Nist N° 1640 e os resultados encontrados.

CRM	Analito	Certificado µg L ⁻¹	Encontrado µg L ⁻¹
NIST CRM N° 1640	As	26,67	26,11
	Cd	22,79	23,31
	Pb	27,89	32,96

No artigo DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE As, Cd E Pb EM AMOSTRAS DE ÁGUA PURIFICADA PARA HEMODIÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE,

APÓS OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA BASEADA NO USO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, **anexo 2**, são encontrados informações deste estudo.

6.2 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E FERRO POR SS-HR-CS GF AAS

O desenvolvimento do método e as determinações foram realizados em um protótipo do tipo HR-CS AAS, construído no ISAS (Berlim, Alemanha), com base no modelo comercial Vario 6 AAS (Analytik Jena AG, Alemanha). O HR-CS AAS utiliza como fonte de radiação uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, operando em modo *hot-spot*, um monocromador denominado DEMON (*double-echelle*), constituído de um prisma e uma rede de difração *echelle*, em arranjo Littrow, que permitiu uma alta resolução (de ~ 2 pm por pixel) e um detector CCD com sensibilidade UV, modelo S7031-0906 (Hamamtsu Photonics, Japão), com 512 detectores completamente independentes. Todo o sistema é controlado por um computador Pentium III, 100MHz, adaptado e por um programa desenvolvido pelo ISAS, em Berlin.

Para determinação simultânea por HR-CS GF AAS foi utilizada a linha principal do cádmio (228,802 nm) e uma linha secundária do ferro (228,726 nm), já que ambas estão presentes na mesma região espectral observada (Figura 11, pág. 26). A medida de absorção atômica, por área, pode ser feita utilizando o *central pixel* (CP) ou *central pixel* ± 1 (CP ± 1). Os resultados das análises em amostras de alimentos foram baseados no CP ± 1 , que corresponde a um intervalo espectral de ~ 6,0 pm, o que melhora a sensibilidade e diminui a razão sinal/ruído.

Todas as análises foram realizadas utilizando tubos de grafite pirolítico (Analytik jena, Part No. 407-A 81.303) e plataforma de grafite pirolítico para amostragem sólida (Analytik jena, Part No 407-152.023). As amostras foram pesadas numa micro-balança modelo M2P (Sartorius, Gottingem), sobre a plataforma de grafite, e inseridas diretamente no forno e grafite, usando o acessório manual SSA 5. Para as medidas por PVSA, a massa das amostras sólidas foi normalizada em 1 mg, isto porque é impossível pesar e introduzir a

mesma massa no forno de grafite. As soluções padrão e as soluções de modificador foram injetadas manualmente sobre a plataforma utilizando micropipetas.

Foram testados como modificadores permanentes o Ir, o W sozinho e a combinação de ambos (Ir+W). A massa do modificador aplicada foi de 400 µg, através de 10 injeções de 40 µL de uma solução de 1000 mg L⁻¹ do modificador. Para a mistura de Ir + W a massa do modificador foi de 200 µg de cada um, através de 5 injeções de 40 µL de cada modificador. Após cada injeção, foi aplicado o programa de temperaturas. Esse programa, usado para recobrir a plataforma de grafite, é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Programa de temperatura para recobrimento da plataforma de grafite com modificador permanente (Ir, W).

Fase	Temperatura °C	Rampa °C s⁻¹	Permanência (s)	Fluxo de gás (L min⁻¹)
1	130	30	20	2.0
2	400	30	20	2.0
3	1000	100	10	0.0
4	2000	100	5	2.0

Estudo da Temperatura de pirólise e atomização

O desenvolvimento do método e sua otimização foram realizados utilizando solução de padrão aquoso contendo 1 µg L⁻¹ (10 pg) de Cd e 2 mg L⁻¹ (20 ng) de Fe, além de amostras BCR No. 191 e Nist CRM 1573a. Em função da diferença de volatilidade dos elementos estudados, a etapa de otimização do programa de temperaturas do forno de grafite foi fundamental para se obter um compromisso entre os dois elementos. Em razão disto, foram realizadas 12 curvas de pirólise e 24 curvas de atomização para as amostras mencionadas, com e sem modificador permanente.

Na otimização das curvas de pirólise e de atomização foi considerado um estudo univariado dos elementos. As curvas de pirólise foram obtidas utilizando

uma temperatura de atomização fixa de 2300°C, para o Fe e de 1600 °C, para o Cd; as curvas de atomização foram obtidas utilizando uma temperatura de pirólise constante, entorno de 500°C.

A temperatura de pirólise otimizada foi de 700 °C e as duas temperaturas de atomização estabelecidas, para Cd e Fe, foram 1700 °C e 2600°C, respectivamente (Tabela 11). Essas condições foram obtidas usando uma mistura de W e Ir como modificador permanente. Em função da diferença de volatilidade entre os analitos, optamos por trabalhar com duas temperaturas de atomização.

O uso de Ir + W, como modificador permanente, permitiu uma estabilização térmica significativa do Cd, particularmente nas soluções aquosas, passando de 400°C para 700 °C. Nas amostras, a temperatura passou de 600 °C para 700 °C, uma vez que a matriz da amostra sólida mostrou ser capaz de estabilizar termicamente o Cd.

As Figuras 26-28 mostram as curvas de pirólise obtidas para o cádmio nos diferentes materiais de referência e na solução padrão. Como o Cd era o elemento mais problemático por ser volátil, a otimização da temperatura de pirólise máxima foi fundamental e o uso do modificador químico essencial.

As Figuras 29 -31 mostram as curvas de atomização para o ferro. Embora desnecessário o uso de modificador químico para o Fe, por ser um elemento refratário, para determinação do Cd foi fundamental.

Tabela 11-Programa de temperaturas para determinação de cádmio e ferro utilizando amostragem sólida e determinação HR-CS GF AAS, usando uma mistura de Ir + W como modificador permanente e calibração com solução de padrões aquosos.

Fase	Temperatura °C	Rampa °C s-1	Permanência (s)	Fluxo de gás (L min ⁻¹)
Secagem	90	10	10	2.0
Secagem	130	5	5	2.0
Pirólise	700	50	15	2.0
Auto Zero *	701	100	1	0
Atomização	1700	2000	3	0
Atomização	2600	3000	12	0
Limpeza	2601	1000	3	2.0

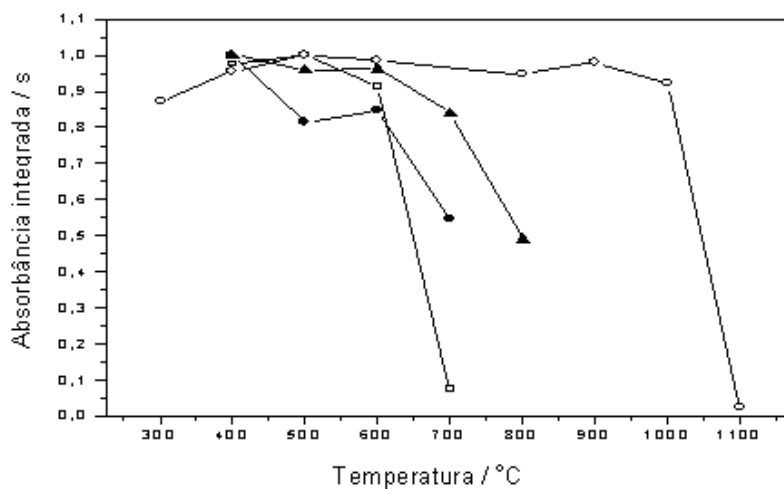


Figura 26 - Curvas de pirólise para o Cd em material de referência Nist N° 1573. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W ; Temperatura de atomização 1600°C.

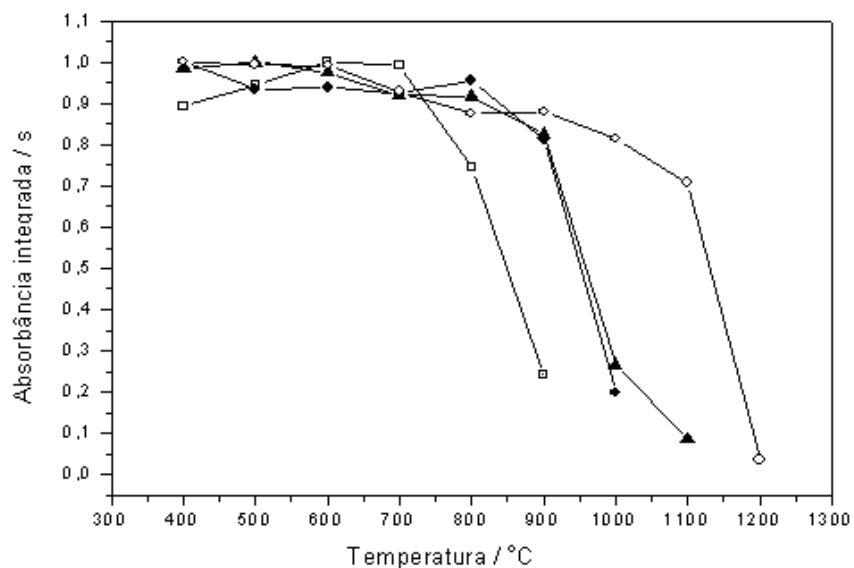


Figura 27- Curvas de pirólise para o Cd em material de referência BCR N° 191.- - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W Temperatura de atomização 1600°C.

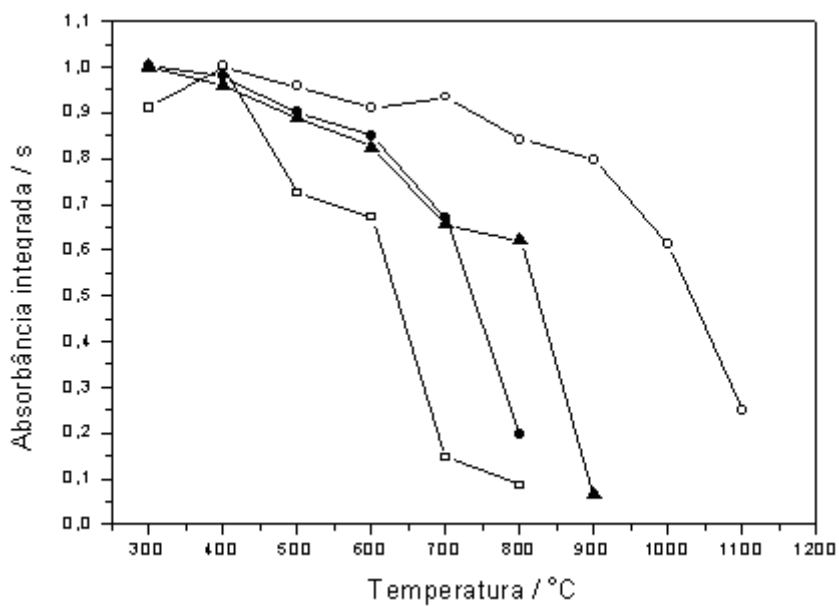


Figura 28 - Curvas de pirólise para o Cd em meio aquoso com 10 pg de cádmio. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W Temperatura de atomização 1600°C.

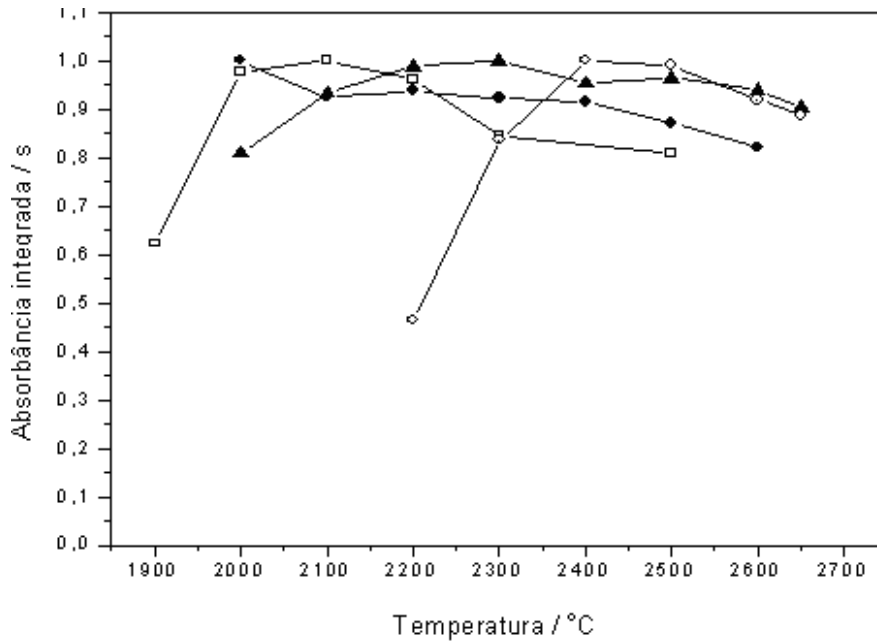


Figura 29 - Curvas de atomização para o Fe em material de referência Nist CRM N° 1573. - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W; Temperatura de pirólise de 500°C.

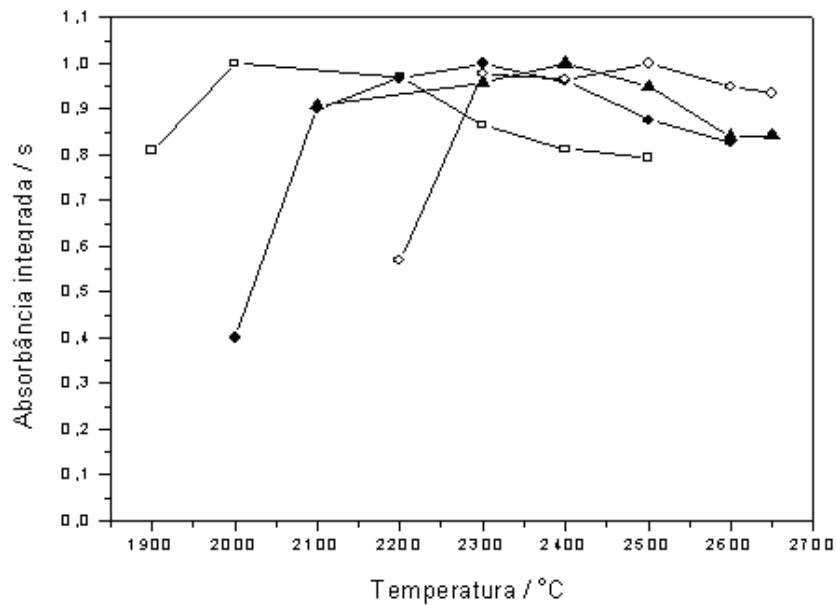


Figura 30- Curvas de atomização para o Fe em material de referência BCR-CRM n°191.- - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W Temperatura de pirólise de 500°C.

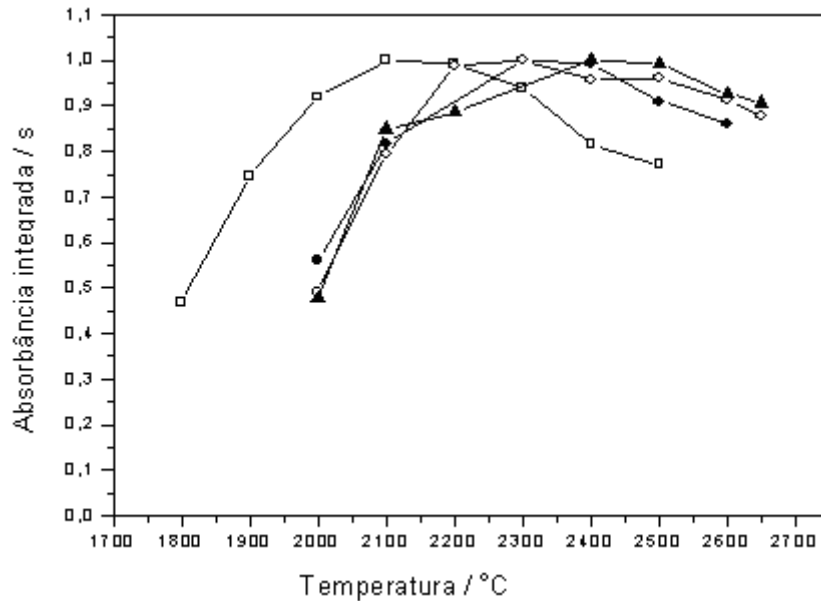


Figura 31- Curvas de atomização para o Fe em meio aquoso com 20ng de Ferro - - sem modificador; - ● - com modificador permanente W; - ▲ - com modificador permanente Ir e -○- com modificador permanente Ir + W Temperatura de pirólise de 500°C.

Validação da metodologia

Os parâmetros de validação: linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, em meio aquoso, e amostras certificadas.

A calibração, na análise direta de sólidos, pode ser realizada de três formas diferentes: através do uso de CRM sólido; pela técnica de adição padrão; e utilizando padrões aquosos (VALE, *et al.*; 2006), ver capítulo 3.5 página 42.

Neste trabalho, as curvas de calibração utilizando material de referência certificado Nist CRM nº1567 produziram uma equação de reta estatisticamente igual à curva de calibração obtida usando solução de padrões aquosos (Figuras 32-35). Isto mostra que não há necessidade de usar CRM'S, pois são mais demorados caros e mais complicados para serem aplicados na rotina. Quanto à técnica de adição padrão, ela é praticamente impossível de ser reproduzida em amostragem sólida. Percebe-se, nas Figuras 36 e 37, que os sinais dos analitos, na amostra, seguem o mesmo perfil temporal de absorção

que os sinais na solução aquosa, indicando a possibilidade de calibração com padrões aquosos.

Além da semelhança temporal do sinal analítico, que está relacionada à cinética de liberação para a fase gasosa, a boa concordância estatística com os valores certificados, demonstra a similar eficiência de atomização para os elementos estudados nas amostras e nas soluções aquosas, assegurando a utilização de padrões em meio aquoso para calibração.

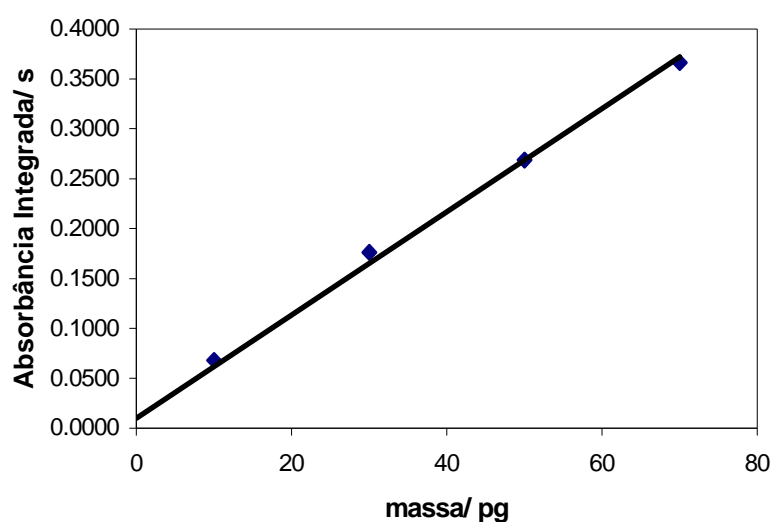


Figura 32 -Curva de calibração do cádmio, com padrões aquosos, faixa linear de 10-70 pg - $A_{\Sigma 3int} = 0,0051 + 0,0098 \cdot m$ - $R^2 = 0,9959$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 1700^\circ\text{C}$.

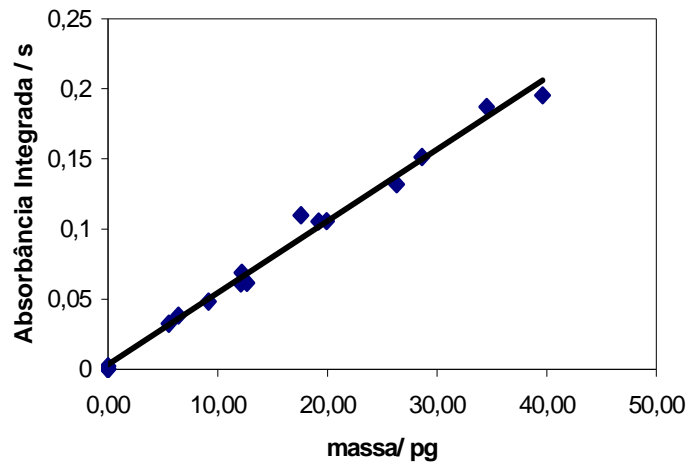


Figura 33 -Curva de calibração do cádmio obtida através da adição de uma massa diferente do material de referência BCR 191, faixa linear de 12-40 pg - $A_{\Sigma 3int} = 0,0051 + 0,0033x$ - $R^2 = 0,9949$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 1700^\circ\text{C}$.

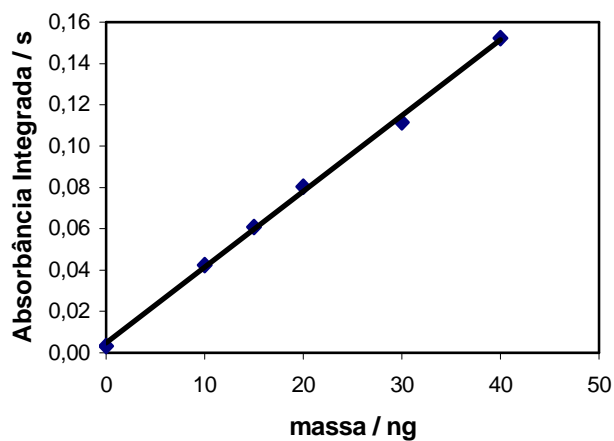


Figura 34 -Curva de calibração do ferro, com padrões aquosos, faixa linear de 10-40 ng - $A_{\Sigma 3int} = 0,0037 + 0,0091x$ - $R^2 = 0,9991$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 2600^\circ\text{C}$.

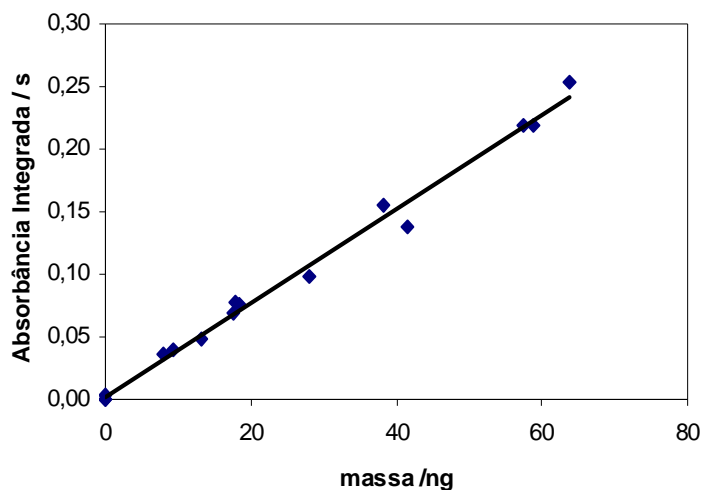


Figura 35 -Curva de calibração do ferro obtida através da adição de uma massa diferente do material de referência BCR N° 191, faixa linear de 17-65 pg - $A_{\Sigma 3int} = 0,0037 + 0,0022 \cdot m$ - $R^2 = 0,9954$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 2600^\circ\text{C}$.

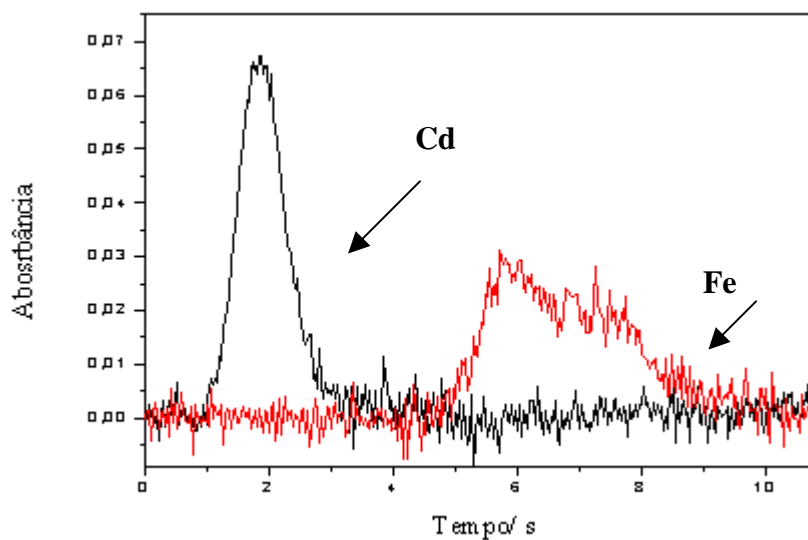


Figura 36 - Sobreposição de sinais transientes para os analitos Cd e Fe em amostra BCR 191 nas temperaturas de pirólise 700°C e de atomização 1700°C , para Cd e 2600°C , para Fe .

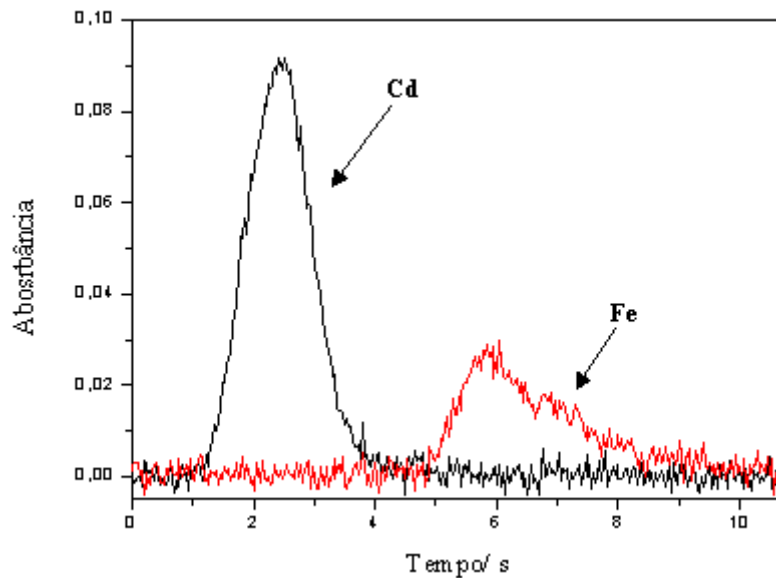


Figura 37 - Sobreposição de sinais transientes para os analitos Cd e Fe em solução padrão nas temperaturas de pirólise 700°C, atomização 1700°C, para Cd e 2600 °C, para Fe.

Figuras de mérito

As figuras de mérito para a determinação de cádmio e ferro utilizando SS-HR-CS GF AAS estão resumidas na **Tabela 12**.

O limite de detecção é definido como a menor concentração nas amostras, mas não necessariamente quantificada, distinguida de zero (sinal/ruído ≥ 3). Os limites de detecção (3σ , $n = 10$) foram $0,6 \text{ ng g}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e Fe, respectivamente. O limite de quantificação é estabelecido como a concentração abaixo da qual o método não pode operar com exatidão e precisão aceitáveis. Estes limites foram estabelecidos com base no resultado do branco médio e desvio padrão.

A massa característica de $0,9 \text{ pg}$, para o Cd, está de acordo com os valores informados na literatura para determinação por LS AAS, em amostras digeridas ($0,8 \text{ ng}$). Para o Fe, a massa característica foi de $1,2 \text{ ng}$, porém não há na literatura valores de massa característica para a linha estudada. A alta sensibilidade obtida para o método pode ser atribuída aos excelentes valores dos limites de detecção e de quantificação (LOD e LOQ), que refletem a

melhora da razão sinal/ruído devido à elevada intensidade da lâmpada e a não necessidade de diluição, na análise direta de sólidos.

Tabela12: Figuras de mérito para a determinação de Cd e Fe em farináceos e alimentos processados à base de grão utilizando SS-HR-CS GF AAS.

Parâmetros	Elemento	
	Cd	Fe
Faixa linear	3-70 pg /0,3- 7 µg L ⁻¹	2,5 – 40 ng/ 0,25- 4 mg L ⁻¹
Faixa de trabalho	10-70 pg / 1-7 µg L ⁻¹	10 – 40 ng/ 1- 4 mg L ⁻¹
Inclinação	$A_{\Sigma 3Int} = 0,005116m_{Cd} + 0,00336$	$A_{\Sigma 3Int} = 0,003757m_{Fe} + 0,00221$
R ²	0,9981	0,9992
LOD ^a (3σ)	0,6 ng g ⁻¹	0,4 µg g ⁻¹
LOQ ^a (10 σ)	2,0 ng g ⁻¹	1,3 µg g ⁻¹
m ₀	0,9 pg	1,1 ng

a Baseado na introdução de 1,5 mg da amostra na plataforma de grafite

A linearidade foi avaliada conforme procedimento descrito por SOUZA e JUNQUEIRA, 2005. Três curvas de calibração foram preparadas, em diferentes dias, com níveis de concentrações de: 0,3, 1, 3, 5, 7 µg.L⁻¹ (correspondentes a 10; 30, 50, 70 ng de Cd) e 0,25, 1, 2, 3, 4 mg L⁻¹ (correspondentes a 10; 20, 30,40 mg de Fe) (Figuras 38,39)

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo MMQO e as premissas relativas à análise de regressão foram verificadas e confirmadas através de testes estatísticos “Planilha para curva Analítica” (Anexo1). Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$), a variância dos erros, ao longo dos níveis de concentração, estimada pelo teste de Levene modificado, também, não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homoscedasticidade. A autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. Os resultados linearidade.

Os outliers foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife e aplicado sucessivamente até que novos outliers não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

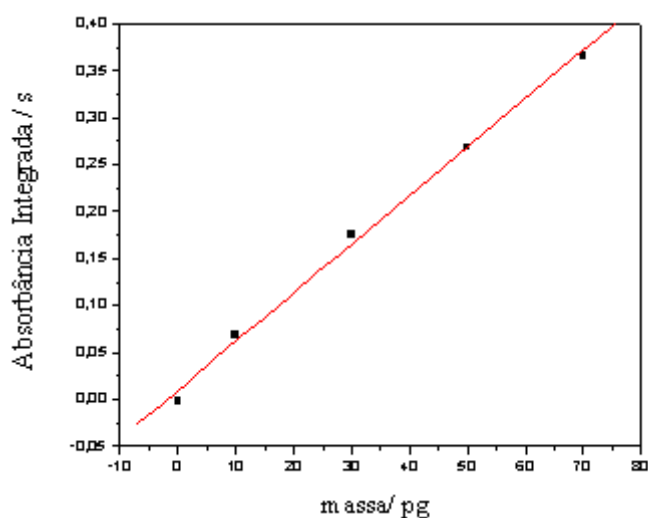


Figura 38 -Curva de calibração do cádmio, com padrões aquosos, faixa linear de 0,3-7 $\mu\text{g L}^{-1}$ o que equivale a 3-70 pg de Cd - $A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0051 + 0,0033 \cdot m_{\text{Cd}} - R^2 = 0,9981$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 1700^\circ\text{C}$.

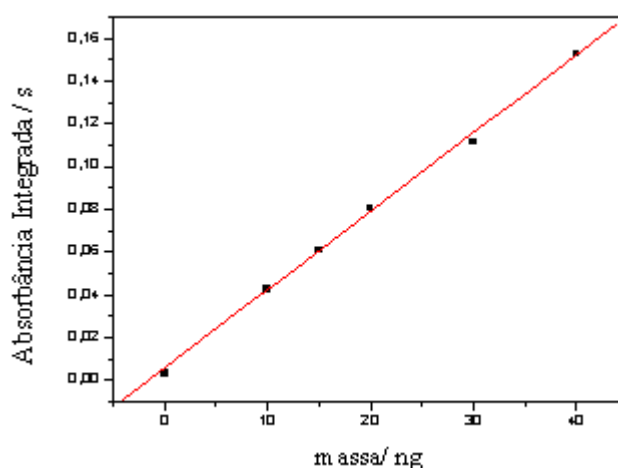


Figura 39 -Curva de calibração do ferro, com padrões aquosos, faixa linear de 0,25-4 $\mu\text{g L}^{-1}$ o que equivale a 2,5-40 ng de Cd - $A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0037 m_{\text{Fe}} + 0,0022 - R^2 = 0,9990$; $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 2600^\circ\text{C}$.

A precisão, sob condições de repetitividade, foi expressa em termos de desvios padrões relativos obtidos para 5 medidas das amostras de referências estudadas. A precisão do método proposto, que variou entre 2 a 8% para cádmio e de 8 a 15% para ferro, mostrou que o método é preciso e satisfatório para ambos elementos. A exatidão foi investigada e confirmada através da boa

concordância entre os resultados obtidos para as 5 replicatas das amostras CRM's (NIST 1567a e BCR 191), em nível estatístico de 95% (**Tabela 13-14**).

Tabela 13- Resultados obtidos para determinação de cádmio em CRM por SS-HR-CS GF AAS, usando calibração aquosa e NIST CRM 1567^a para calibração sólida, e Ir+ W como modificador permanente.

CRM	Certificado mg kg ⁻¹	Encontrado µg L ⁻¹	
		Curva Aquosa	Curva sólida
BCR 191	0,028 ± 0,002	0,025 ± 0,002	0,026 ± 0,002
Nist 1573a	1,52 ± 0,04	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Nist 1567a	0,026 ± 0,002	0,023 ± 0,002	Usado para calibração

Tabela 14- Resultados obtidos para determinação de ferro em CRM por SS-HR-CS GF AAS, usando calibração aquosa e NIST CRM 1567^a para calibração sólida, e Ir+ W como modificador permanente.

CRM	Certificado mg kg ⁻¹	Encontrado µg L ⁻¹	
		Curva Aquosa	Curva sólida
BCR 191	40,7 ± 2,4	37,8 ± 26,3	43,4 ± 7,4
Nist 1573a	367 ± 7	342 ± 19	400 ± 21
Nist 1567a	14,1 ± 0,5	15,2 ± 1,5	Usado para calibração

Este estudo deu origem ao artigo, SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CD AND FE IN GRAIN PRODUCTS USING DIRECT SOLID SAMPLING AND HIGH-RESOLUTION CONTINUUM SOURCE ELECTROTHERMAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY (**anexo 3**), publicado na revista Talanta, 2009.

6.3 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO E CÁDMIO POR SS-HR-CS GF AAS EM AMOSTRAS DE FEIJÃO E SOLO DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.

A técnica HR-CS AAS permite que, através da escolha do pixel, se aumente ou se diminua a sensibilidade e a faixa de trabalho. Para realizar a análise de ferro em amostras de solo, onde a concentração do analito é da ordem de g kg^{-1} , foi necessário utilizar as asas e assim aumentar a faixa de trabalho, apesar de perder-se em sensibilidade. A linha 228,726 nm encontra-se no pixel 211, mas, como a concentração de ferro é alta, não foi possível fazer análise usando este pixel, buscando-se, então, os pixels que se encontravam no entorno deste. A Figura 40 mostra o gráfico da absorbância em função do tempo dos pixels 208 a 213, para o padrão e para um material de referência. A Figura 41 mostra os pixels escolhidos (209 + 213) para fazer as medidas. Aumentou-se a linearidade, apesar de perder-se em sensibilidade, utilizando as medidas de área no CP 209 + CP 213.

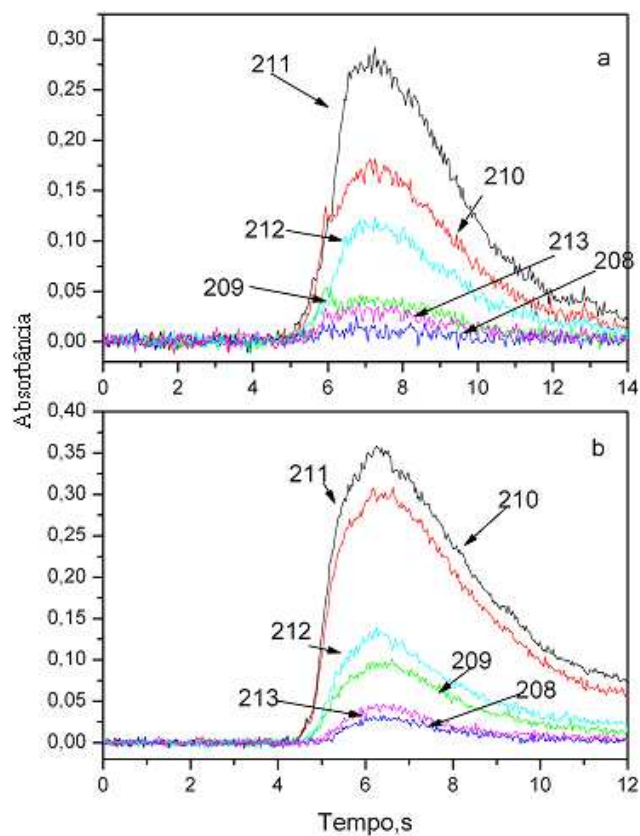


Figura 40 - Sinais transientes para ferro com correção para eventos contínuos. a) material de referência BCR N° 142, massa da amostra na plataforma 0,043 mg; b) Padrão em meio aquoso 100 mg L⁻¹ (1000 ng). Temperatura de pirólise 700°C e atomização de 2600 °C

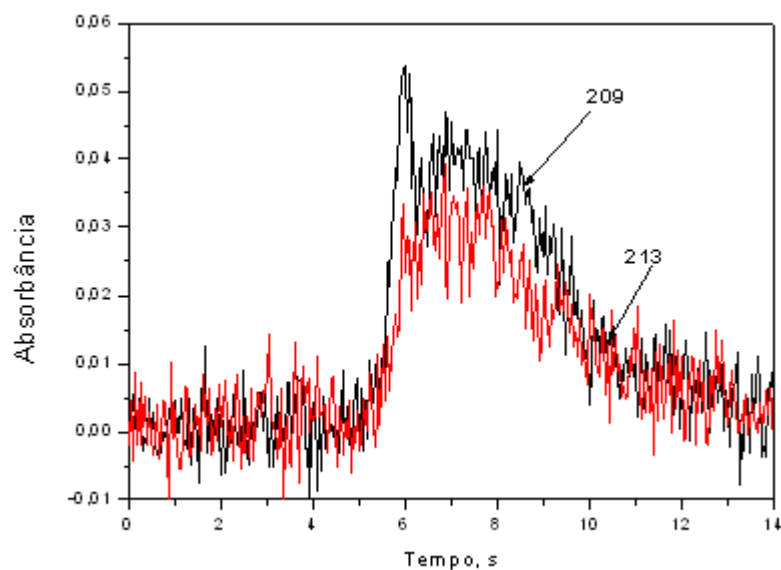


Figura 41 - Sinais medidos para matéria de referência BCR nº142, no pixel 209 (linha preta) e 213 (linha vermelha), usando Ir-W como modificador permanente, temperatura de pirólise de 700 °C e temperatura de atomização 2600°C; quantidade de amostra depositada sobre a plataforma 0,043 mg.

Validação da metodologia

A validação da metodologia para determinação de Cd e Fe em amostras de feijão foi a mesma utilizada para avaliar a concentração destes elementos em amostras de farináceo e produtos à base de farinha. Foi necessário somente validar a metodologia para determinação do ferro no solo.

As figuras de mérito para a determinação de cádmio e ferro, utilizando SS-HR-CS GF AAS, estão resumidas na **Tabela 15**.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir do desvio padrão de dez leituras do branco dividido pela inclinação da curva de calibração, sendo utilizados os critérios de 3 vezes o desvio padrão para o LOD e 10 vezes o desvio padrão para LOQ. A massa característica de 0,7 pg para o Cd está de acordo com os valores informados na literatura, para determinação por LS AAS em amostras digeridas (0,8 ng). Para o Fe a massa característica variou de $2n - 6$ ng, dependendo da faixa de trabalho.

Para avaliar a linearidade da curva de calibração foi feito um estudo preliminar, onde se trabalhou com uma faixa de concentração que variou de 2-400 mg L⁻¹ (corresponde 20 – 4000 ng de Fe). A partir deste estudo, pode-se trabalhar com duas curvas: uma que variou de 2-20 mg L⁻¹ (correspondente 20 –200 ng) e outra que variou de 20-400 mg L⁻¹ (correspondente 20 –4000 ng) (Figura 42).

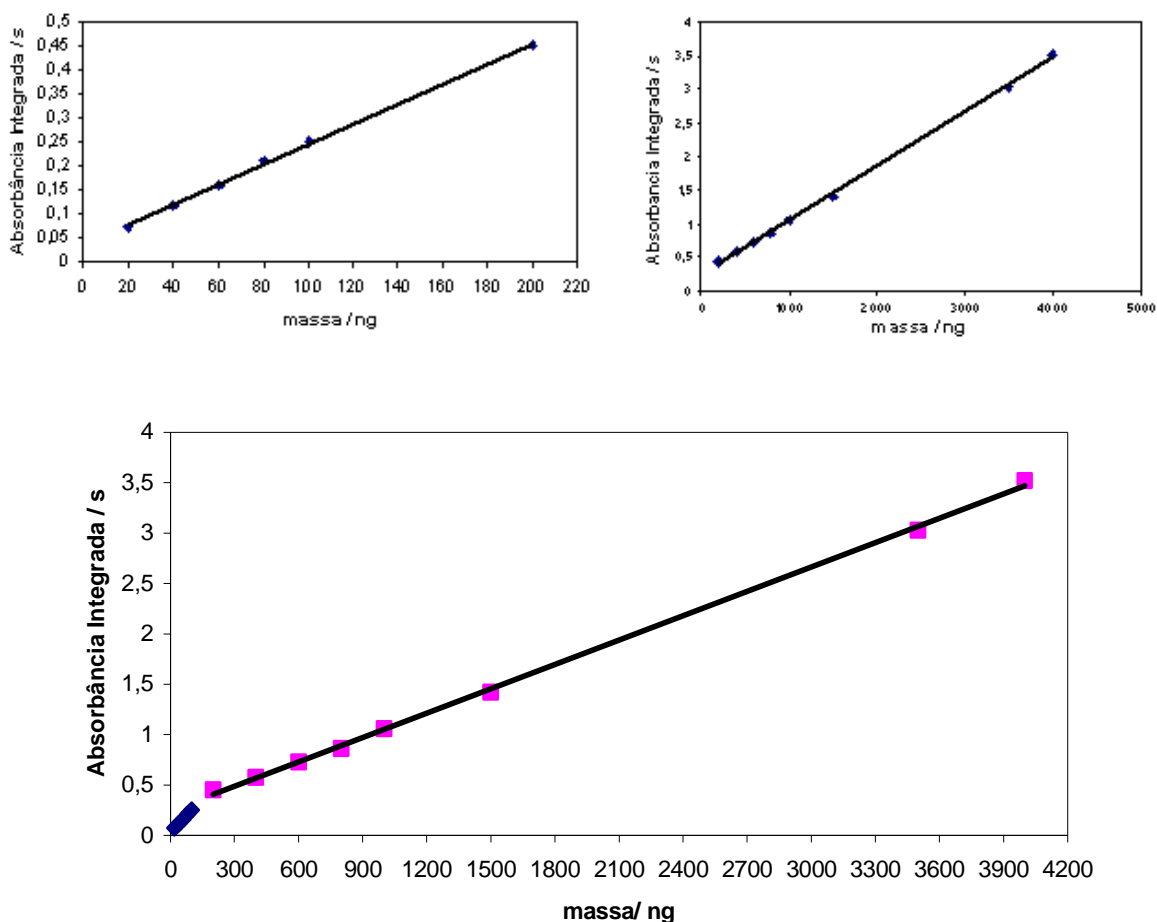


Figura 42 – Curva de calibração para o ferro que variam de 20 ng a 4000 ng.

A linearidade foi avaliada e confirmada através de testes estatísticos utilizando a “Planilha para curva Analítica” (Anexo1) conforme procedimento descrito por SOUZA e JUNQUEIRA, 2005. Três curvas de calibração foram preparadas, em diferentes dias, com níveis de concentrações 2,4,6,8,10,20 mg L⁻¹ (correspondentes a 20, 40, 60, 80, 100, 200 ng de Fe); e

20,60,80,100,250,350,400 mg L⁻¹ (correspondentes a 200,600, 800, 1000, 2500, 3500,4000 ng de Fe) (Figuras 43-44).

Tabela 15: Figuras de mérito para a determinação de Cd e Fe em amostras de solo utilizando SS-HR-CS GF AAS.

Parâmetro	Solo ^a		
	Cd		Fe
Faixa de trabalho	10–70 pg / 1–7 µg L ⁻¹	20–200 ng / 2–20 mg L ⁻¹	200–4000 ng / 20–400 mg L ⁻¹
Curva Analítica	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0058 m_{\text{Cd}} + 0,0092$	$A_{\Sigma \pm 2, \text{int}} = 0,0021 m_{\text{Fe}} + 0,0353$	$A_{\Sigma \pm 2, \text{int}} = 0,0008 m_{\text{Fe}} + 0,2451$
R ²	0,9998	0,9991	0,9985
m_0	0,7 pg	2,0 ng	6 ng
LOD	1,0 pg / 14 µg kg ⁻¹	12 ng / 170 mg kg ⁻¹	n.d. ^b
LOQ	3,0 pg / 43 µg kg ⁻¹	40 ng / 570 mg kg ⁻¹	n.d. ^b

Baseado na introdução de 0,007 mg da amostra no tubo de grafite.; b -n.d. = não foi determinado, condição para análise do analito em alta concentração, somente.

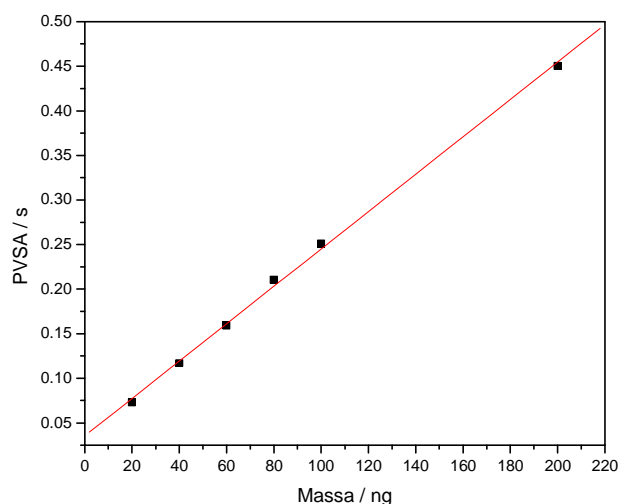


Figura 43 -Curva de calibração, com padrões aquosos, para ferro, faixa linear de 20-200 ng (2-20 mg L⁻¹) - $A_{\text{int}} = 0,0022m_{\text{Fe}} + 0,05778$ - $R^2 = 0,99571$ - $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 2600^\circ\text{C}$.

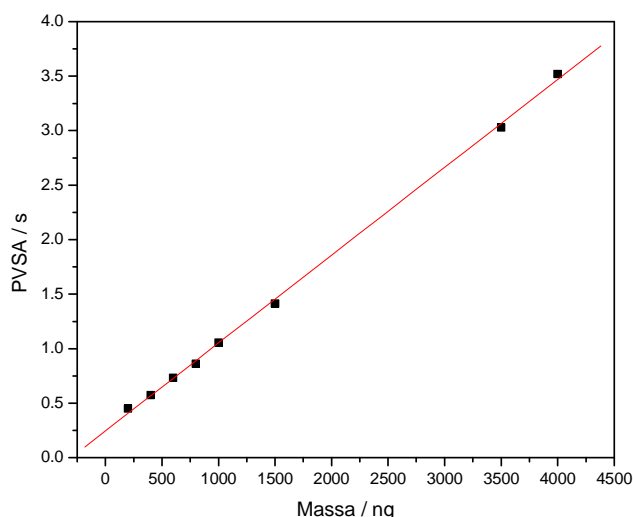


Figura 44 – Curva de calibração, com padrões aquosos, para ferro, faixa linear de 200-4000 ng (20-400 mg L⁻¹) - $A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0008m_{\text{Fe}} + 0,2443$ – $R^2 = 0,9995$ - $T_p = 700^\circ\text{C}$; $T_a = 2600^\circ\text{C}$.

A precisão sob condições de repetitividade foi expressas em termos de desvios padrão relativo obtidos para 5 medidas das amostras referências estudadas. A precisão do método proposto que variou entre 4 a 7% para cádmio e ficou próximo a 20% para ferro. A exatidão foi investigada e confirmada através da boa concordância entre os resultados obtidos para 5 replicatas da amostra CRM (BCR 142) em nível estatístico de 95% (**Tabela 16**).

Tabela 16 Resultados obtidos para determinação de ferro em CRM por SS-HR-CS GF AAS usando calibração aquosa e Ir+ W como modificador permanente.

CRM	Cd / mg kg ⁻¹		Fe / g kg ⁻¹	
	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado
BCR 142	0,25 ± 0,09	0,24 ± 0,07	28,0 ^a	27,9 ± 5,9

^a expresso em Fe₂O₃

Os resultados deste trabalho estão apresentados no artigo, Simultaneous Determination of Cd and Fe in Beans and Soil of Different Regions of Brazil using High-resolution Continuum Source Graphite Furnace

Atomic Absorption Spectrometry and Direct Solid Sampling, **anexo 4**, aceito para publicação na revista Journal of Agricultural and Food Chemistry.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias desenvolvidas mostraram-se simples e rápidas, sendo de grande valia em laboratórios de rotina, pois proporcionam rapidez e eficácia para ações da Vigilância Sanitária.

A possibilidade da determinação simultânea de elementos utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite torna essa técnica atrativa para os laboratórios de rotina, mas deve-se enfatizar a necessidade de otimizar a metodologia de modo a manter as condições STPF durante as medidas. Deste modo, é possível alcançar resultados precisos, exatos e com baixo limite de quantificação.

A técnica HR-CS AAS é capaz de analisar simultaneamente, elementos inorgânicos com flexibilidade na faixa linear, mantendo boa sensibilidade e alta precisão devido a baixa razão sinal/ruído. A técnica é versátil e permite resolver problemas inerentes à espectrometria de absorção atômica com fonte de linha, em especial no que concerne ao sistema de correção de fundo.

A introdução direta de amostras sólidas, sem prévio tratamento, é uma importante contribuição para a química analítica, pois permite reduzir a quantidade das amostras, manter a integridade das mesmas e fornece o ciclo analítico mais rápido. Estas vantagens podem representar um avanço no desenvolvimento de técnicas de análise especiação, visto ser, a digestão da amostra, um dos maiores obstáculos a ser contornado nas análises com este objetivo. Em contra partida, o uso de amostras sólidas apresenta muitas vezes repetitividade, superior a 10% RSD. Esse valor elevado pode ser atribuído à falta de homogeneidade das amostras, pois é muitas vezes melhor ter um valor exato e impreciso do que boa precisão para valores errôneos.

Devem ser mencionadas, ainda, as dificuldades encontradas, no processo de validação, referentes à calibração, à influência da matriz e ao branco analítico. Estas dificuldades vêm sendo superadas de tal forma que os resultados obtidos com uso de padrões de calibração em meio aquoso somado ao uso das condições STPF, que minimizam a maioria das interferências não-espectrais, tem se mostrado bastante eficiente.

Em função das características apresentadas, pode-se recomendar esta técnica para determinação de elementos traços simultaneamente com

elementos essenciais, desde que as conduções operacionais e técnicas sejam respeitadas.

O uso da espectrometria de absorção atômica de alta resolução, somado a introdução de amostras sólidas, vai possibilitar um controle mais efetivo dos produtos de interesses para vigilância sanitário em relação ao cumprimento das legislações vigentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ACAR O. Molybdenum, Mo-Ir and Mo-Ru coating as permanent chemical modifier for the determination of cadmium and lead in sediments and soil samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Chimica ACTA**. v. 542, p. 280-286, 2005.
2. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Top 20 Hazardous Substances from the CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2003. **Disponível em:** <http://www.atsdr.cdc.gov/> . Acesso: 7 out. 2005.
3. AMORIM, F. A. C., LOBO, I.P., SANTOS, V. L. C. S., FERREIRA, S.L.C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.
4. APOSTOLI, P. Elements in environmental and occupational medicine. **Journal of Chromatography B**, (Article in press), 2001.
5. AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.M. **Gerenciamento da Toxicidade**, 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2003.203p.
6. BARBER, M. 2000 total diet study of 12 elements- aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, manganese, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. **The Food Standards Agency**, March, 2004.
7. BEACH, J.; TUME, P.; LONGAN, L.; REVERT, F.; BECH, J.; TUME, L.; TEMPIO, M. Concentration of Cd, Cu, Pb, Zn, Al, and Fe in soils of Manresa, NE Spain **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 14, p. 257-266, 2008.
8. BEATY, R.D.; KERBER, J.D. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. Nowalk, Ont.: Perkin Elmer Corporation, 1993.
9. BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN U.; HUANG, M.D.; OKRUSS, M.; RADZIUK, B. Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 61, p. 1015–1030, 2006.
10. BERG, T.; LICHT, D. International legislation on trace elements as contaminants in food: a review. **Food Additives and Contaminants**. v. 19, n. 10, p. 916-927, 2002.

11. BIEGO, G.H.; JOYEUX, M.; HARTEMANN, P.; DEBRY, G. Daily intake of essential mineral and metallic micropollutants from foods in France. **The Science of the total Environment**, v. 217, p. 27-36, 1998.
12. BOLGER, P.M.; YESS, N.J.; GURDERSON, E.L.; TROXEL, T.C.; CARRINGTON, C.D. Identification and reduction of source of dietary lead in United States. **Food Additives and Contaminants**. v.13, p.94653-60, 1996.
13. BORGES, D.L.G.; SILVA, A. F.; WELZ, B.; CURTIUS A.J.; HEITMANN, U. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 21, p. 763-769, 2006.
14. BORGES, D.L.G.; CURTIUS A.J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da Espectrometria de Absorção atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua. **Revista Analytical**. v. 18, p. 58-67, 2005.
15. BORGES, D.L.G.; DIAS, L.F.VEIGA, M.A.M.S.; CURTIUS A.J. Determination of cadmium in sediments and in sewage sludge by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry using iridium as permanent modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 14, n.2, p. 291-296, 2003.
16. BRASIL. Decreto nº 55871, de 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 alimento, alterado pelo Decreto nº 691 de 13 de Abril de 1962. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 abr. 1965.
17. BRASIL.RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez.. 2002.
18. BRASIL. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o regulamento técnico: "Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos e seus anexo:

- “limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set. 1998. Seção 1, parte 1.
19. BRASIL. Resolução RDC nº 130, de 26 de maio de 2003. Considera próprio para consumo humano o sal que contiver teor igual ou superior a 20 (vinte) miligramas até o limite máximo de 60 (sessenta) miligramas de iodo por quilograma de produto. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 maio de 2003.
20. BRASIL. Portaria nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Adota valores como níveis de IDR para as vitaminas, minerais e proteínas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de jan. 1998.
21. BRUSSARD, J.H., VANDOKKUM,W., VANDER PAAUW,C.G., DEVOS,R. H., DEKORT,W. L. A.M. , AND LOWIK,M. R. H. Dietary intake of food contaminants in The Netherlands (Dutch Nutrition Surveillance System) **Food Additives and Contaminants**. V. 13, p. 561- 573, 1996.
22. CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C.K.R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**. v. 34, n. 5, p. 529-537, Out. 2000.
23. CALDAS, E.D.; TRESSOU, J.; BOON, P.E. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides – A probabilistic approach. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, p. 1562-1571, 2006.
24. CALDAS, E.D; MIRANDA, M.C.C; CONCEIÇÃO, M.H.; SOUZA, L.C.K.R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and potential risk for consumers. v. 42, p. 1877-1883, 2004.
25. CALDAS, E.D.; BOON, P.E.; TRESSOU, J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. **Toxicology**. v. 222, p. 132-142, 2006.
26. CAL-PRIETO, M.J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J.M.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal

- atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**. v. 56, p. 1-51, 2002.
27. CARRERAS, H. A. ; WANNAZ, E. D.; PIGNATA, M.L. Assessment of human health risk related to metals by the use of biomonitors in the province of Cordoba, Argentina. **Environmental Pollution**. V. 157, p. 117-122, 2009.
28. CHEUNG CHUNG, S.W.; KWONG, K.P.; YAU, J.C.W.; WONG, W.W.K. Dietary exposure to antimony, lead and mercury of secondary school students in HongKong. **Food Additives and Contaminants**. v.25, n. 7, p.831- 840, 2008.
29. COLUCCI, A.C.A.; PHILIPPI, S.T.; SLATER, B. Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar para avaliação do consumo alimentar de crianças de 2 a 5 anos de idade. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 4, p. 393-401, 2004.
30. Congresso Nacional, Comissão Parlamentar Conjunta do Mercosul. Resolução Mercosul GMC/RES. Nº 102/94. Aprova os limites de tolerância para contaminantes inorgânicos. Disponível em: <http://www.cancilleria.gov.ar/comercio/mercosur/normativa/resolucion/1994/res10294.html>
31. Congresso Nacional, Comissão Parlamentar Conjunta do Mercosul. Resolução Mercosul GMC/RES. Nº 103/94. Princípios Gerais para Estabelecimento de Níveis Máximo de Contaminantes Químicos em Alimentos. Disponível em: <http://www.comercio.gov.ar/dnpce/documentos/resolucion1031994.doc>
32. Dabeka, R. W.; McKenzie, A. D. Survey of lead, cadmium, fluoride, nickel, and cobalt in food composites and estimation of dietary intakes of these elements by Canadians in 1986-1988. **Journal of AOAC International**. v. 78, p. 897± 909, 1995
33. Dabeka, R. W.; McKenzie, A. D.; Lacroix, G. M. A.; Cleroux, C., Bowe, S.; Graham, R.A.; Conacher, H. B. S.; Verdier, P. Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary intake of arsenic by Canadian adults and children. **Journal of AOAC International**, v. 76, p. 14-25, 1993.

34. DEDNA, J.; TSALEV, D.L. **Hydride Generation atomic absorption spectrometry**. New York: Wiley, 1995.
35. DYBING, E.; DOE, J.; GROTEN, J.; O'BRIEN, J.; RENWICK, A.G.; SCHLATTER, J.; STEINBERG, P.; TRITSCHER, A.; WALKER, R.; YOUNES, M. Hazard characterization of chemical in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues. **Food and chemical Toxicology**. v. 40, p.237-282, 2002.
36. Environmental Health Guidance Note Arsenic march, 2002. **Disponível em:** <http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/2676.pdf> Acesso em: 04 Dez. 2007.
37. EURACHEN. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC. 1998, 61p.
38. FÁVARO, D.I.T.; MAIHARA, V.A.; MAFRA, D.; SOUZA, A.; VASCONCELLOS, M.B.A.; CORDEIRA, M. B.; COZZOLINO, S.M.F. Application of NAA to the determination of mineral and trace elements in Brazilian diets at IPEN/CNEN/SP. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v. 244, n. 1, p. 241-245, 2000.
39. FELDMANN, J.; JOHN, K.; PENGPRESCHA, P.; Arsenic metabolism in Seaweed -eating sheep from Northern Scotland, **Journal of Analytical Chemistry**. v. 368, p. 116 –121, 2000
40. FRANCESCONI, K. A.; Toxic metal species and food regulations-making a healthy choice. **Analyst**, v. 132, p. 17-20, 2007.
41. FRESCHI, G.P.G.; FRESCHI, C.D.; GOMESNETO, J. A. Evaluation of different rhodium modifiers and coatings on the simultaneous determination of As, Bi, Pb, Sb, Se and of Co, Cr, Cu, Fe, Mn in milk by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchim Acta**. v.161, p. 129-135, 2008.
42. FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT. **Quality Assurance in Analytical Chemistry**. New York: Weinheim-VCH, 1995.
43. GALEAZZI, M.A.M.; DOMENE, S.M.A.; SICHIERI, R. Estudo Multicêntrico sobre Consumo alimentar. **Caderno de Debate-** Revista do Núcleo de Estudo e Pesquisa em Alimentação – NEPA/UNICAMP – Volume especial, 1997.

44. Gonzaga, B.I. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-brasil**. São Paulo: USP, 2002157p. il Tese - Universidade de São Paulo –Faculdade Ciências Farmácia, São Paulo.
45. Gramiccioni, L.; Ingraio, G.; Milana, M. R.; Santaroni, P.; Tomassi, G. Aluminum levels in Italian diets and in selected foods from aluminium utensils. **Food Additives and Contaminants**. v. 13, p.767- 774, 1996.
46. Guidelines for the Study of Dietary Intakes of Chemical Contaminants – World Health Organization – WHO Offset Publication nº 87, Geneva, 1985.
47. HANSEN, H.; RAAB, A.; JASPARS, M.; MILNE, B.F.; FELDMANN, J. Sulfur – containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA (III)] and identified as a natural metabolite in urine: major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity. **Chemical Research Toxicology**, v.17, p.1086-1091, 2004.
48. Harnly, J.M. The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 14, p. 137-146, 1999.
49. HEITMANN, U.; SCHIITZ, M.; BECKER-ROSS H.; FLOREK, S. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 51. p. 1095–1105, 1996.
50. HIEFTJE, G. M. Atomic Absorption Spectrometry- Has it Gone or Where is it Going? **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 4, p. 117-122, 1989.
51. HUBAL, E.A.C.; SHELDON, L.S.; BURKE, J.M.; McCURDY, T.R.; BERRY, M.R.; RIGAS, M.L.; ZARTARIAN, V.G.; FREEMAN, N.C.G. Children's Exposure assessments: A Review of factors influencing children's Exposure, and the data available to characterize and assess that exposure. **Environmental Health Perspectives**. v. 108, n. 6, p. 475-486, 2000.
52. INCQS – **Procedimento Operacional Padrão –POP nº 651120035** “Avaliação da Precisão e Expressão de análises”.

53. INCQS - **Manual da Qualidade nº. 65.1120.065** – Orientação para Validação de métodos analíticos. Maio de 2007.
54. INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**-revisão 01: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Março 2003.
55. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/pesquisa/pesquisa.php?palavras=POF&pagina_atual=1&tema=0. Acesso em 23 nov. 2007.
56. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=35>. Acesso em 29 nov. 2007
57. KORN, MGA.; BOAMORTE, E.S.; SANTOS, D.C.M.B.; CASTRO, J.T.; BARBOSA, J.T.P.; TEIXEIRA, A.P.; FERNANDES, A.P.; WELZ, B.; SANTOS, W.P.C.; SANTOS, E.B.G.N.; KORN, M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**. v. 43, p. 67-92, 2008.
58. LIANG, L.; LAZOFF, S.; CHAN, C.; HORVAT, M.; WOODS, J. Determination of arsenic in ambient water at sub-part-per-trillion levels by hydride generation Pd coated platform collection and GFAAS detection. **Talanta**, v.47, p.569-583, Feb. 1998.
59. LIMA, E.C.; KRUG, F.J.; JACKSON, K.W. Evaluation of tungsten-rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 53, p. 1791-1804, 1998.
60. LLOBET, J.M.; FALCÓ, G.; TEIXIDÓ, A.; DOMINGO, L. Concentration of arsenic, cadmium, mercury and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 838—842, 2003.

61. LVOV, B.V. Continuum source vs. line source on the way toward absolute graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 54, p. 1637–1646, 1999.
62. MALACRINA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva. **Ciência Tecnologia Alimentar**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
63. MANSOUR, S. A.; BELA, M. H.; ABOU-ARAB, A. A.K.; GAD, M. F. Monitoring of pesticides and heavy metals in cucumber fruits produced from different farming systems. **Chemosphere**. V. XXX, p.XXX, 2009.
64. MATTOS, A.T.; FONTES, M.P.F.; COSTA, L.M.; M.A. MARTINEZ, M.A. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristic of Brazilian soils. . **Environmental Pollution**. v. 111, p. 429-435, 2001.
65. MIN, K.S.; IWATA, N.; TETSUTIKAWAHARA, N.; ONOSAKA, S.; TANAKA, K.; Effect of hemolytic and iron-deficiency anemia on intestinal absorption and tissue accumulation of cadmium. . **Toxicology Letters**. v. 179, p. 48-52, 2008.
66. MOHRI, T.; HISNAGA, A.; ISHINISHI, N. Arsenic intake and excretion by Japanese adults: A 7-Days duplicate Diet study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 521-529, 1990.
67. Muller, M.; Anke, M.; Illing-Gunther, H.; Thiel, C. Oral cadmium exposure of adults in Germany. 2: Market basket calculations. **Food Additives and Contaminants**, v.15, p.135 -141, 1998
68. MUÑOZ, O.; BASTIAS, J.M.; ARAYA, M.; MORALES, A.; ORELLANA, C.; REBOLLEDO, R.; VELZ, D. Estimation of the dietary intake of cadmium, lead, mercury, and arsenic by population of Santiago (Chile) using a total diet study. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 1647-1655, 2005.
69. MUÑOZ, O.; DÍAZ, O.; LEYTON, I.; NÚÑEZ, N.; DEVESA, V.; SUÑER, M.A.; VELEZ, D.; MONTORO, R. Vegetable collected in the cultivated Andean area of Northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 642-647, 2002.

70. NOMURA, C.S.; SILVA, C.S.; OLIVEIRA, P.V. Análise de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma Revisão. **Química Nova**. v. 31. n. 1. p. 104-113, 2008.
71. OHNO, K.; YANASE, T.; MATSUO, Y.; KIMURA, T.; RAHMAN, M.H.; MAGARA, Y.; MATSUI, Y. Arsenic intake via water and food by population living in an arsenic-affected area of Bangladesh. **Science of the Total Environment**. v. 381, p. 68-76, 2007.
72. PENNINGTON, J.A.T.; SCHOEN, S.A. Estimates of dietary exposure to aluminum. **Food Additives and Contaminants**. v. 12, p. 119-128, 1995.
73. PIVETTA, F.; PORTO, M.F.S.; MACHADO, J.M.H.; MOREIRA, J.C.; FREITAS, C.M.; FURTADO, J.S. Perspectiva para a formulação de uma política nacional de segurança química no Brasil. **Série Fiocruz Eventos Científicos 4**, p. 63 – 77, 2002.
74. POPOLIM, W.; PENTEADO, M. DE V.C.; Estimate of dietary exposure to sulphites using Brazilian students as a sample population. **Food Additives and Contaminants**. v.22, n. 11, p.1106- 1112, 2005.
75. REEVES, P.G.; CHANEY, R.L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. **Science of the Total Environment**. v. 8, p. 13-19, 2008.
76. RENWICK, A.G.; BARLOW, S.M.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; BOOBIS, A.R.; DYBING, E.; ELDER, L.; EISENBRAND, G.; GREIG, J.B.; KLEINER, J.; LAMBE, J.; MULLER, D.J.G.; SMITH, M.R.; TRITSCHER, A.; TUIJTELAARS, S.; VAN DEN BRANDT, P.A.; WALKER, R.; KROES, R. Risk characterisation of chemical in food and diet. **Food and Chemical Toxicology**. v. 41, p. 1211-1271, 2003.
77. RUBIO, C. ; GUTIERREZ, Á.; BURGOS, A.; HARDISSON, A.; Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain. **Food Additives and Contaminants**. v.25,n. 8, p.946-952, 2008.
78. SALEH, Z. A.; BRUNN, H.; PAETZOLD, R.; HUSSEIN, L. Nutrients and chemical residues in an Egyptian total mixed diet. **Food Chemistry**. v. 63, p. 535- 541, 1998.

79. SALVO, V.L.M.A.; GIMENO, S.G.A. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. **Revista de saúde Pública**. v. 36, n. 4, p. 505-512, 2002.
80. SANTOS, L.M.G.; JACOB, S. C. Avaliação do risco por ingestão de arsênio presente em produtos da cesta básica dos brasileiros. **Revista Higiene Alimentar**. v. 19, n. 137, p. 66-72, 2005.
81. SANTOS, L.M.G.; Gonçalves, J.M. JACOB, S. C. Determinação Simultânea de As, Cd e Pb em amostras de água purificada para hemodiálise por Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, após otimização multivariada baseada no uso de planejamento experimental. **Química Nova**. v.31, n. 5, p. 975-979.
82. SCHIERI, R. Avaliação do Consumo Alimentar – Congresso – Avaliação da Exposição Humana a Contaminantes em Alimentos: dados e metodologia – Brasília- DF , UNB 17-20 de abril de 2006.
83. SILVA, A. F.; BORGES, D.L. G.; WELZ, B.; VALE, M.G.R.; SILVA, M.M.; KLASSEN, A.; HEITMANN U. Method development for the determination of thallium in coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source high-resolution monochromator and CCD array detector. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 59, p. 841–850, 2004.
84. SLATER, B.; PHILIPPI, S.T.; MARCHIONI, D.M.L.; FISBERG, R.M. Validação de questionário de frequência alimentar- QFA: considerações metodológicas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6, n. 3, p. 200-208, 2003.
85. SILVA, A. F.; BORGES, D.L. G.; LEPRI, F.G.; WELZ, B.; CURTIUS A.J.; HEITMANN, U. Determination of cadmium in coal using sampling graphite furnace high-resolution continuum source absorption spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**. v. 382, p. 1835-1841, 2005.
86. SILVA, E.G.P.; HATJE, V.; SANTOS, W.N.L.; COSTA, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; FERREIRA, S.L.C. Fast method for the determination of copper, manganese and iron in seafood samples. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 259-263, 2008.

87. SLAVIN, W. Atomic absorption spectroscopy. The present and future **Analytical Chemistry**. v. 54, n.6, p. 685A-694A, 1982
88. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of Instrumental Analyses**. 5.ed. Orlando, Fla: Harcourt Brace College, 1992.
89. SMITH, M. FOSIE-" Food Safety in Europe (FOSIE): risk assessment of chemicals in the food and diet: overall introduction. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 141-144, 2002.
90. Souza, S.V.C; Junqueira, R.G. [A procedure to assess linearity by ordinary least squares method](#). **Analytical Chemical Acta**, v. 552, n.1-2, p.25- 35, 2005.
91. Souza SVC, Lima JA, Teodoro JC, Junqueira RG. In-house validation of a multi-residue method for determining residual avermectin in cow's milk by HPLC coupled with fluorescence detection. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 274, n.4, p.823-836, 2007.
92. THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**. v. 74,n. 5, p. 835-855, 2002.
93. VALE, M.G.R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W.N.L. Current Status of direct sampling for electrothermal atomic absorption Spectrometry- A Critical Review of the Development between 1995and 2005. **Applied Spectroscopy Reviews**. v. 41, p.377-400, 2006.
94. Vale MGR, Damini ICF, Klassen A, . Silva MM, Welz B, Silva AF, Leprie FG, Borges DLG, Heitmann U. [Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry](#). **The Microchemical Journal**. v.77, n.2, p. 131-140, 2004
95. VASSILEVA, E.; BAETEN, H.; HOENIG. Advantages of iridium permanent modifier in fast programs applied to trace-element analysis of plants sample by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry** v. 369, p. 491-495, 2001.
96. VIEIRA, M. A.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J., Determination of arsenic in sediment, coal and fly ash slurries after ultrasonic treat by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in iridium-

- treated graphite tube. **Spectrochimimica Acta Part B**, 2002, 2057-2067p.
97. WELZ B, M. SPERLING, **Atomic Absorption Spectrometry**. 1999. Wiley-VCH, Weinheim.
98. WELZ B, BECKER-ROSS H, FLOREK S, HEITMANN U. 2005. High-Resolution Continuum Source AAS - **The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry**. Wiley-VCH, Weinheim.
99. WELZ, B.; Schelemmer, G.; Mudakavi, J. R. Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Part 5.* Performance for the Determination of 21 Elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** v.7, n.8, 1257-1271, 1992.
100. WELZ, B.; VALE, M.G.R.; BORGES, D.L.G.; HEITMANN, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**. v. 389, p. 2085-2095, 2007.
101. WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN U.; VALE, M.G.R. High-resolution Continuum-source Atomic Absorption Spectrometry – What Can We Expect? **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.2, p.1-10, 2003.
102. WELZ B. [High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry](#). **Analytical Bioanalytical Chemistry**., 381 (1): 69-71, 2005.
103. WILHELM, M.; WITTSIEPE, J.; SCHREY, P.; BUDDE, U.; IDEL, H. Dietary intake of cadmium by children and adults from Germany using duplicate portion sampling. **The Science of the Total Environmental**. v. 285, p. 11-19, 2002.
104. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – Evaluation of certain food additives and the contaminants for estimation of intake: sixteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Technical Report Series N° 505**, 1972.
105. WORLD HEALTH ORGANIZATION Public Health Guidance Note – Excessive Lead Exposure march, 2002. **Disponível em:**

- <http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/2665.pdf>. Acesso em: 04 Dez. 2007.
106. World Health Organization Public Health Guidance Note –Cadmium March, 2002. **Disponível em:** <http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/2665.pdf>. Acesso em: 04 Dez. 2007.
107. World Health Organization. Environmental Health Guidance Note Arsenic March, 2002. **Disponível em:** <http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/2676.pdf> [Acesso em: 04 Dez. 2007.
108. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer -Monographs on the evaluation of carcinogenic Risks to humans Metal and Metallic Compound. 1980; 23:39.
109. YSART, G.; MILLER, P.; CREWS, H.; ROBB P.; BAXTER, M.; L'ARGY, C.; LOFTHOUSE, S.; SARGENT, C.; HARRISON N.; Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study. **Food Additives and Contaminants**. v.16, n. 9, p.391- 403, 1999.
110. YUSA, V.; SUELVE, T.; RUIZ-ATIENZA, L.; CERVERA, M.L.; BENEDITO, V. AND PASTOR, A. Monitoring programme on cadmium, lead and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. **Food Additives and Contaminants Part B**. v.1, n. 1, p.22-31, 2008.

Anexo 1

- Planilhas estatísticas



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Fe em amostras de solo		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	4
Equipamento:	HR-CS AAS	Responsável:	

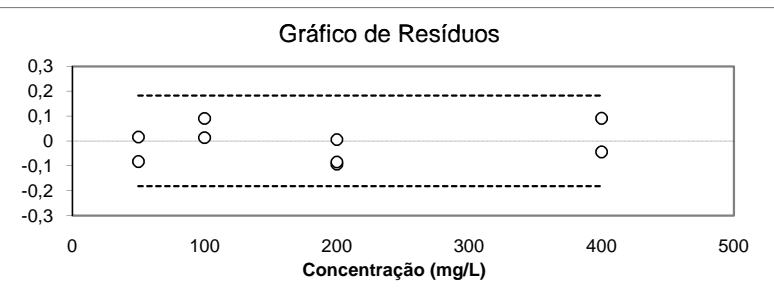
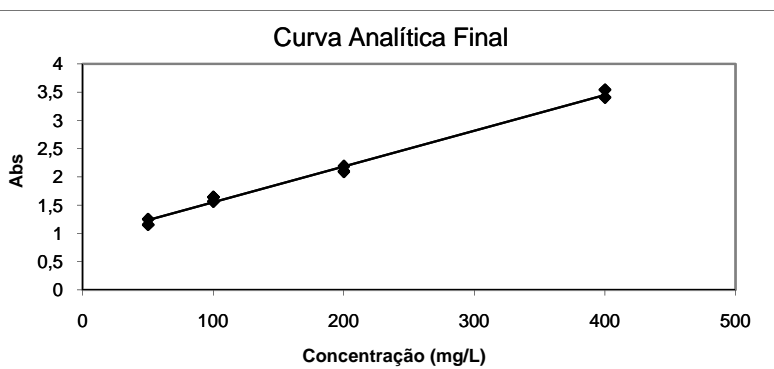
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/L	Resposta Abs
1	01	5,00E+01	1,15E+00
	02	5,00E+01	1,25E+00
	03	5,00E+01	1,02E+00
2	04	1,00E+02	1,56E+00
	05	1,00E+02	1,64E+00
	06	1,00E+02	1,64E+00
3	07	2,00E+02	2,19E+00
	08	2,00E+02	2,09E+00
	09	2,00E+02	2,10E+00
4	10	4,00E+02	3,54E+00
	11	4,00E+02	3,41E+00
	12	4,00E+02	3,06E+00

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,95
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,92

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,65
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	0,89
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,32

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	5,73E-03
t_L calculado	-1,00E-01
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,31E+00
p	9,23E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Estadísticas da Regressão

Coefficiente Angular (b):	6,33E-03	Coefficiente Linear (a):	9,19E-01
r	0,9959	R ²	0,9918
N	10	Graus de Liberdade	8

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	6,04E+00	6,04E+00	9,65E+02	1,25E-09
resíduos	8	5,01E-02	6,26E-03		
Ajuste	4	2,60E-02	6,50E-03	1,08E+00	4,72E-01
erro puro	4	2,41E-02	6,02E-03		
total	9	6,09E+00			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Ferro - SS-HR CS AAS		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	4
Equipamento:	Protótipo	Responsável:	

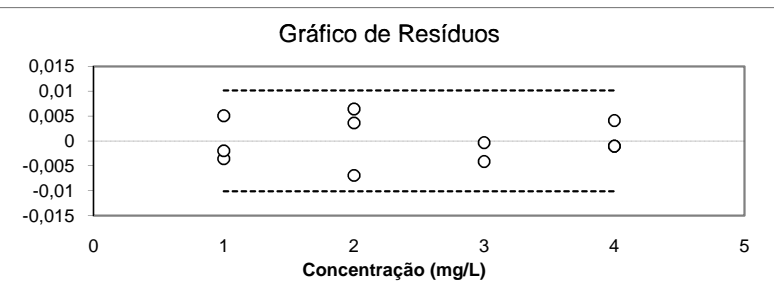
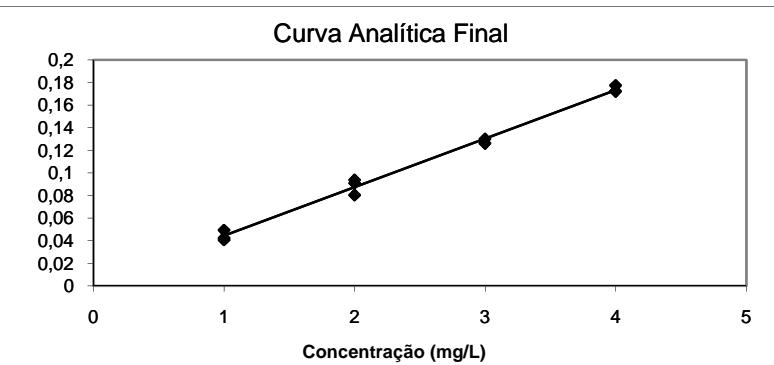
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/L	Resposta
1	01	1,00E+00	4,08E-02
	02	1,00E+00	4,95E-02
	03	1,00E+00	4,24E-02
2	04	2,00E+00	9,10E-02
	05	2,00E+00	9,38E-02
	06	2,00E+00	8,04E-02
3	07	3,00E+00	1,26E-01
	08	3,00E+00	1,30E-01
	09	3,00E+00	1,12E-01
4	10	4,00E+00	1,72E-01
	11	4,00E+00	1,77E-01
	12	4,00E+00	1,72E-01

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,92

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,31
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	0,93
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,32

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	2,02E-05
t_L calculado	1,04E+00
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,26E+00
p	3,27E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Estadísticas da Regressão

Coefficiente Angular (b):	4,30E-02	Coefficiente Linear (a):	1,48E-03
r	0,9967	R ²	0,9934
N	11	Graus de Liberdade	9

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,72E-02	2,72E-02	1,35E+03	4,11E-11
resíduos	9	1,82E-04	2,02E-05		
Ajuste	4	1,47E-05	3,68E-06	1,10E-01	9,74E-01
erro puro	5	1,67E-04	3,34E-05		
total	10	2,74E-02			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Cd usando SS-HR CS AAS		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	4
Equipamento:	protótipo	Responsável:	Lisia

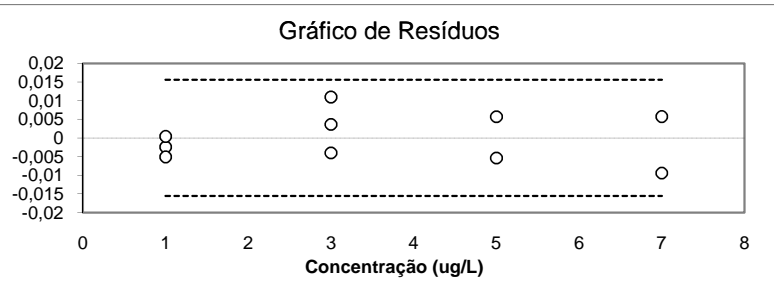
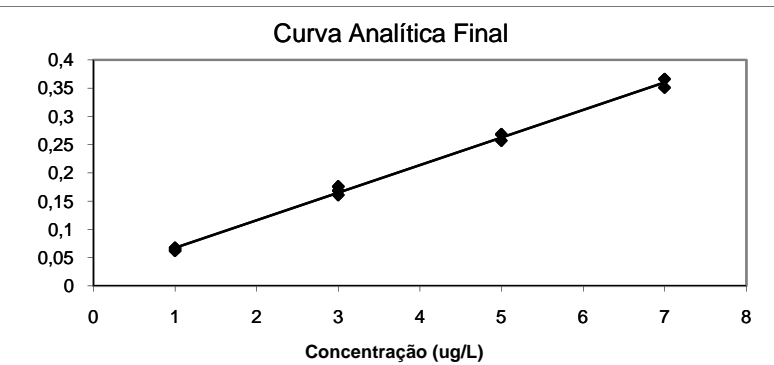
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. ug/L	Resposta
1	01	1,00E+00	6,51E-02
	02	1,00E+00	6,24E-02
	03	1,00E+00	6,79E-02
2	04	3,00E+00	1,69E-01
	05	3,00E+00	1,61E-01
	06	3,00E+00	1,76E-01
3	07	5,00E+00	2,57E-01
	08	5,00E+00	2,46E-01
	09	5,00E+00	2,69E-01
4	10	7,00E+00	3,51E-01
	11	7,00E+00	3,35E-01
	12	7,00E+00	3,66E-01

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,92

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	3,24
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	0,89
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,32

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	4,74E-05
t_L calculado	-4,81E-01
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,31E+00
p	6,43E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Estadísticas da Regressão

Coefficiente Angular (b):	4,88E-02	Coefficiente Linear (a):	1,87E-02
r	0,9984	R ²	0,9968
N	10	Graus de Liberdade	8

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,15E-01	1,15E-01	2,53E+03	2,71E-11
resíduos	8	3,65E-04	4,56E-05		
Ajuste	4	6,08E-05	1,52E-05	2,00E-01	9,26E-01
erro puro	4	3,04E-04	7,61E-05		
total	9	1,16E-01			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

Anexo 2

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE As, Cd E Pb EM AMOSTRAS DE ÁGUA PURIFICADA PARA HEMODIÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE, APÓS OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA BASEADA NO USO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Lisia Maria G. dos Santos*, Jaylei M. Gonçalves e Silvana do Couto Jacob

Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-360 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 19/12/06; aceito em 30/11/07; publicado na web em 24/7/08

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ARSENIC, CADMIUM AND LEAD BY GF AAS IN PURIFIED WATER SAMPLES FOR HEMODIALYSIS AFTER MULTIVARIATE OPTIMIZATION BASED ON FACTORIAL DESIGN. This paper reports the development of a methodology for simultaneously determining As, Cd and Pb, employing GF AAS with polarized Zeeman-effect background correction. In order to make the procedure applicable, the influence of pyrolysis and atomization temperatures and the amount of chemical modifiers were studied. Factorial and central composite designs were used to optimize these variables. Precision and accuracy of the method were investigated using Natural Water Reference material, Nist SRM 1640. Results are in agreement with certified values at the 95% confidence limit when the Student *t*-test is used. This methodology was used for quality control of purified water for hemodialysis.

Keywords: factorial design; purified water for hemodialysis; inorganic contamination.

INTRODUÇÃO

A contaminação das águas por substâncias químicas tóxicas é uma ameaça à qualidade da vida humana e, de modo especial, para aquelas pessoas que sofrem de insuficiência renal e necessitam de hemodiálise.

A hemodiálise é um processo de filtragem e depuração das substâncias indesejáveis do sangue, como a creatinina e a uréia, realizada em pacientes portadores de insuficiência renal crônica ou aguda. No processo de hemodiálise, o sangue do paciente é retirado e impulsionado, por uma bomba, até o filtro de diálise, conhecido como dialisador. No dialisador, o sangue é então exposto à solução de diálise (Na, K, bicarbonato, Ca, Mg, Cl, acetato) através de uma membrana semipermeável, permitindo as trocas entre as substâncias do sangue e do dialisato. Posteriormente, o sangue “filtrado” é devolvido ao paciente pelo acesso vascular.

A água utilizada no processo de hemodiálise deve obedecer à Resolução RDC nº 154, de 15 de Junho de 2004,¹ da Agência Nacional de Saúde (ANVISA). Esta resolução estabelece os limites máximos permitidos para contaminantes inorgânicos na água para diálise, sendo que arsênio, cádmio e chumbo estão entre os principais contaminantes a serem controlados. Estes contaminantes, por serem extremamente tóxicos, fazem parte do programa de controle da qualidade da água para diálise, realizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), a fim de monitorar e garantir a segurança deste tratamento.

A concentração dos contaminantes em água ocorre, geralmente, em níveis de traço, sendo necessário, para detectá-los e quantificá-los, o uso de técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS),^{2,3} utilizada neste trabalho.

Devido aos fatores mencionados, houve a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia para a determinação, na rotina, das concentrações dos elementos de interesse (arsênio, cádmio e chum-

bo) de forma simultânea, minimizando custos e aumentando a rapidez da resposta analítica, de modo a permitir maior controle do tratamento por parte dos hemocentros. Para tanto, foi empregado um planejamento fatorial experimental, a fim de otimizar a rotina da determinação de arsênio, cádmio e chumbo por GF AAS. O planejamento fatorial experimental é uma ferramenta estatística que, por sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizada pelos químicos analíticos, pois permite avaliar as condições ideais de trabalho e a otimização de metodologias.⁴ Em especial, utilizando as técnicas espectroanalíticas, podemos citar Cassella *et al.*,⁵ que empregaram planejamento fatorial de segunda ordem para obter as condições ideais na determinação de arsênio em amostras de petróleo, por GF AAS. Outro trabalho citado na literatura é o de Pereira-Filho *et al.*,⁶ onde é apresentada uma metodologia para obtenção dos valores ótimos para as temperaturas de pirólise e atomização na determinação de Al, Cd, Mo e Pb, usando planejamento fatorial.

Para executar um planejamento fatorial experimental é preciso determinar quais os fatores (variáveis independentes) e qual a resposta de interesse (variável dependente) para o sistema que se deseja estudar. Também é preciso definir que objetivo se quer alcançar com os experimentos, porque isto definirá que tipo de planejamento deverá ser utilizado. Devido a sua simplicidade e baixo custo, o planejamento fatorial de dois níveis, completo ou fracionário,⁴ é muito utilizado em estudos preliminares ou como passo inicial para uma otimização. Neste tipo de planejamento, cada fator é estudado em dois níveis (máximo e mínimo) e, portanto, supõe-se uma linearidade nos efeitos dos fatores. Para a obtenção de uma superfície de resposta não linear, e obtenção de um ponto ótimo, é necessário avaliação de um maior número de pontos.^{7,8}

Neste trabalho foi feito, inicialmente, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{4-1}), com um ponto central, para avaliar os fatores que apresentavam maiores efeitos na resposta analítica do método. Posteriormente, com os resultados obtidos, procurou-se um ponto ótimo para as temperaturas de pirólise e atomização que satisfizesse as condições ideais para determinar, simultaneamente, As, Cd e Pb através da metodologia de superfície de resposta (RSM).

*e-mail: lisia.maria@rjnet.com.br

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados num espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite e detecção simultânea de até quatro elementos (SIMAA 6000, da Perkin Elmer). O equipamento é dotado de tubo de grafite, com aquecimento transversal e plataforma integrada recoberta com grafite pirolítico, corretor de fundo tipo efeito Zeeman, amostrador automático (As-72) e lâmpadas de descarga, sem eletrodos (EDL), de arsênio, cádmio e chumbo.^{9,10}

Durante o estudo das variáveis, mantiveram-se fixos os seguintes parâmetros: volume de injeção das amostras e dos padrões em 20 μL , volume dos modificadores em 5 μL e temperaturas de secagem em 110 e 130 $^{\circ}\text{C}$.

Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura, desionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore). Os reagentes foram adquiridos da empresa Merck e utilizados dentro dos respectivos prazos de validade.

Solução analítica contendo 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo e 0,2% v/v de HNO_3 , usado como conservante. Esta solução foi preparada, diariamente, pela diluição da solução estoque, contendo 1 000 mg L^{-1} (Tritisol Merck) de As (H_3AsO_4), Cd (CdCl_2) e Pb [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$]. Uma solução com 0,2% v/v, na ausência destes elementos, foi preparada e utilizada como branco. Os modificadores químicos foram preparados com sais de elevado grau de pureza destinados a esta finalidade, contendo 10.000 mg L^{-1} de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Suprapur, Merck).

Para controle da qualidade dos resultados analíticos, utilizaram-se amostras de referência de água certificadas pelo *National Institute of Standards and Technology (Nist, Natural Water n° 1640)*, com teores conhecidos de As ($26,67 \pm 0,41 \mu\text{g kg}^{-1}$), Cd ($22,79 \pm 0,96 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Pb ($27,89 \pm 0,14 \mu\text{g kg}^{-1}$).

As amostras para análise foram coletadas em hemocentros da cidade do Rio de Janeiro, pela Secretaria Estadual de Saúde, e encaminhadas ao INCQS/FIOCRUZ. As coletas foram efetuadas em diferentes pontos do processo de tratamento da água: entrada da rede, osmose e pós-osmose reversa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo das variáveis independentes: temperatura de pirólise, temperatura de atomização e modificadores químicos

Para desenvolver o processo de análise simultânea de As, Cd e Pb, por GF AAS, primeiramente, foi proposto um planejamento fatorial fracionário de dois níveis, com ponto central, para verificar quais variáveis, dentre as previamente selecionadas (temperatura de atomização, temperatura de pirólise e concentração dos modificadores químicos) poderiam causar maior variação na resposta analítica.

Os níveis adotados para as variáveis de temperatura basearam-se no comportamento eletrotérmico dos elementos e nas temperaturas utilizadas nas determinações mono elementar de As, Cd e Pb. Em geral, a temperatura de pirólise é selecionada pelo elemento mais volátil e a temperatura de atomização pelo elemento menos volátil. A escolha dos modificadores químicos baseou-se na literatura disponível, onde se verificou que, apesar de haver diversas substâncias sendo usadas como modificadores químicos, a mistura

$\text{Pd} + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ é conhecida, desde o começo dos anos 90, como o “modificador universal” por apresentar bom desempenho para a grande maioria dos elementos determinados por GF AAS.^{3,11} Em função disso, optamos por trabalhar com estes dois modificadores, sendo as concentrações adotadas baseadas nas determinações mono elementares dos três elementos (As, Cd, Pb).

Um planejamento fatorial completo, no estudo proposto, requereria 16 experimentos (2^4 - quatro fatores), mas, como o objetivo era selecionar os fatores que mais influenciariam na resposta analítica, optou-se por um planejamento fracionário 2^{4-1} , onde apenas 8 experimentos são necessários. Este tipo de planejamento despreza os termos de ordem superior que, geralmente, são os menos significativos.⁷ Todos os fatores foram analisados em dois níveis (máximo e mínimo) e num ponto central, realizado em quadruplicata, totalizando 12 experimentos. Na Tabela 1 encontramos os níveis das temperaturas e dos modificadores que foram estudados.

Tabela 1. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central

Fatores	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)
Temperatura de pirólise ($^{\circ}\text{C}$)	600	800	1000
Temperatura de atomização ($^{\circ}\text{C}$)	1400	1800	2200
Concentração de modificador Mg ($\text{NO}_3)_2$ - (mg L^{-1})	0,6	1,2	1,8
Concentração de modificador Pd ($\text{NO}_3)_2$ - (mg L^{-1})	0,5	1	2

A execução do planejamento consistiu em realizar os ensaios e registrar as respostas analíticas observadas (absorvâncias), para todas as combinações de níveis.

As respostas analíticas obtidas, através dos resultados experimentais, foram inseridas no programa Statistica 6.0,¹² o que permitiu avaliar as interações entre as variáveis estudadas e a sua influência sobre a resposta analítica de interesse.

Este planejamento fracionário foi utilizado para detectar a magnitude dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes. Isto foi verificado pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e pela estimativa do erro experimental (erro puro), que permite verificar de maneira quantitativa se o modelo representado é satisfatório, o que só é possível através das replicatas do ponto central, uma vez que não se fez replicatas dos demais pontos. Conforme se pode observar nas Figuras 1, 2 e 3 os fatores

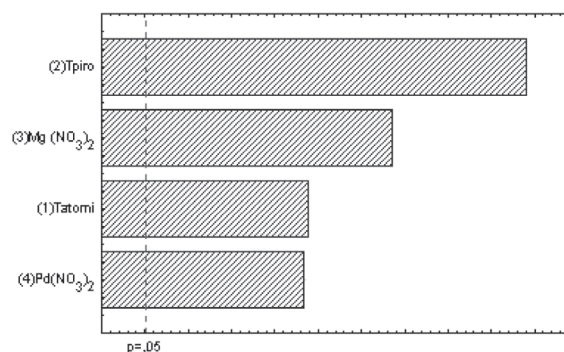


Figura 1. Gráfico de Pareto mostra os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o arsênio

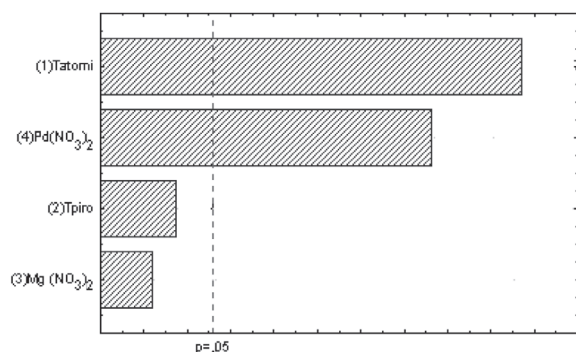


Figura 2. Gráfico de Pareto mostra os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para cádmio

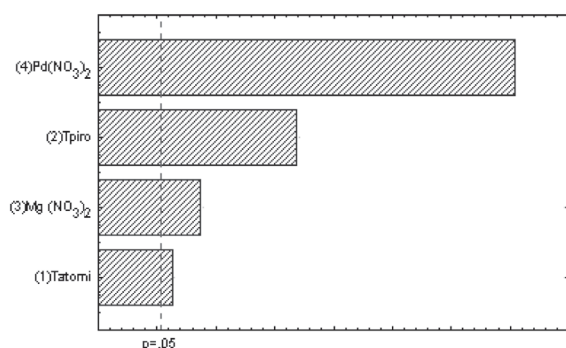


Figura 3. Gráfico de Pareto mostra os efeitos das variáveis sobre a sensibilidade da metodologia para o chumbo

que tiveram um *p-level* menor que 0,05 são, estatisticamente, significativos e podem influenciar de maneira positiva ou negativa no resultado esperado.

Otimização multivariada

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos foram selecionados e a metodologia de análise de superfície de resposta foi executada para obtenção do ponto ótimo. Esta metodologia baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais, quadráticas ou de ordem superior, para descreverem o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até atingir uma região ótima (máximo e mínimo) da superfície de resposta investigada.^{7,8}

O processo de otimização para determinação simultânea de arsênio, cádmio e chumbo por GF AAS foi dividido em duas etapas: primeiro foi realizada a otimização da temperatura de pirólise e do modificador Pd (NO₃)₂ e, posteriormente, a otimização das temperaturas de pirólise e de atomização. Este método permitiu chegar ao valor ótimo da resposta através de um pequeno número de experimentos.

Planejamento 1

Nessa etapa, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta em torno das condições previamente estabelecidas: temperatura de pirólise, de 600 a 1000 °C, e concentração do modificador químico, de 0,5 a 2 mg L⁻¹.

Para atingir a região ótima foi feito um planejamento fatorial de dois níveis com pontos centrais e axiais (Tabela 2).

Neste planejamento, a temperatura de atomização (2000 °C) e

Tabela 2. Planejamento 1: Valores para a temperatura de pirólise e concentração de Pd(NO₃)₂ usados no planejamento composto central; temperatura de atomização = 2000 °C; concentração do modificador Mg(NO₃)₂ = 0,6 mg L⁻¹

	T pirólise (°C)	Pd(NO ₃) ₂ mg L ⁻¹	Abs Integrada As	Abs Integrada Cd	Abs Integrada Pb
1	600	0,500	0,0026	0,0126	0,0122
2	600	2,000	0,0051	0,0107	0,0122
3	1000	0,500	0,0032	0,0026	0,0142
4	1000	2,000	0,0020	0,0059	0,0096
5	517	1,000	0,0025	0,0130	0,0118
6	1083	1,000	0,0044	0,0110	0,0890
7	800	Zero	0,0050	0,0052	0,0137
8	800	2,414	0,0042	0,0086	0,0112
9 (C)	800	1,000	0,0055	0,0081	0,0107
10 (C)	800	1,000	0,0043	0,0097	0,0120
11 (C)	800	1,000	0,0059	0,0085	0,0110
12 (C)	800	1,000	0,0045	0,0086	0,0117
13 (C)	800	1,000	0,00540	0,00950	0,01210

a concentração do modificador Mg(NO₃)₂ (0,6 mg L⁻¹) foram mantidas constantes.

Com dados da Tabela 2 e através da opção *Central composite, non-factorial, surface design* do programa Statistica 6.0,¹² construiu-se uma superfície de resposta, representando a interação entre a temperatura de pirólise e a concentração do modificador Pd(NO₃)₂. Este planejamento permitiu verificar a presença de um ponto crítico, através da aplicação do critério de Lagrange, levando à obtenção das coordenadas do ponto máximo da superfície. Este ponto representa a situação onde se obtém a maior sensibilidade para o método. A Tabela 3 apresenta estes valores para os elementos em estudo.

Tabela 3. Valores ótimos obtidos, segundo o planejamento 1

	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Temperatura de pirólise	800 °C	900 °C	700 °C
Concentração Pd(NO ₃) ₂	1,0 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	0,9 mg L ⁻¹

No entanto, neste estudo, busca-se encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam, simultaneamente, todas as variáveis dependentes e que levem a maior sensibilidade. Para tal usou-se a otimização com restrições, que recebe o nome de método de programação não linear.⁷ O Statistica 6.0 usa a abordagem usada por Derringer e Suich (1980), que utiliza as funções *desirability*. Com esta abordagem foi possível encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfazem, simultaneamente, as variáveis dependentes.

Os valores encontrados para estas variáveis foram: temperatura de pirólise = 1000 °C e concentração do modificador Pd(NO₃)₂ = 1 mg L⁻¹. Estes valores correspondem ao ponto de maior absorvância e, portanto, ao ponto de maior sensibilidade para os três elementos, arsênio, cádmio e chumbo.

Analisando estes resultados, percebemos que a temperatura de pirólise, para o elemento cádmio, foi muito alta (Figura 4), comparada com a temperatura utilizada na análise mono elementar.

Em função disso, optou-se pela realização de um segundo planejamento, onde avaliamos a temperatura de atomização, por ser a variável de maior influência na análise do cádmio, conforme mos-

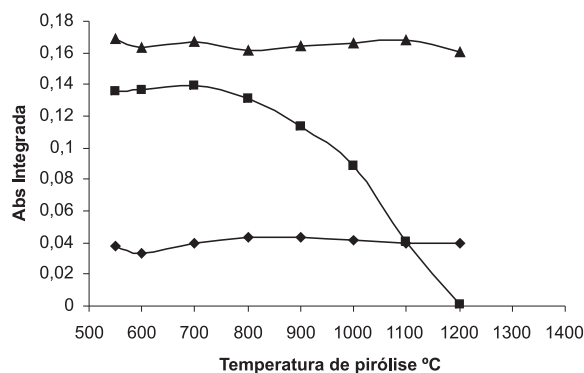


Figura 4. Curva de pirólise para os diferentes elementos em estudo com 0,6 mg L⁻¹ de Mg(NO₃)₂ e temperatura de atomização 2000 °C: (♦) arsênio, (■) cádmio e (▲) chumbo

trado no estudo preliminar, junto com a temperatura de pirólise, que representa o ponto crítico para análise desse elemento.

Planejamento 2

Neste planejamento, a concentração do modificador Pd(NO₃)₂ foi mantida igual a 1 mg L⁻¹, segundo a otimização anterior, e a concentração do modificador Mg(NO₃)₂ igual a 0,6 mg L⁻¹, porque esta variável não tem um efeito significativo na sensibilidade do método para cádmio e chumbo. Optou-se por adotar a concentração usada para a análise mono elementar do elemento arsênio, visto que este elemento sofre maior influência desta variável nos resultados.

Os experimentos realizados estão indicados na Tabela 4. Estes resultados foram manipulados seguindo o mesmo caminho do planejamento 1.

Tabela 4. Planejamento 2: Valores para as temperaturas de pirólise e de atomização usados no planejamento composto central; concentração de Pd(NO₃)₂ = 1 mg L⁻¹; concentração de Mg(NO₃)₂ = 0,6 mg L⁻¹

	T atomização (°C)	T pirólise (°C)	Abs Integrada As	Abs Integrada Cd	Abs Integrada Pb
1	1400	600	0,0037	0,0316	0,0024
2	1400	1000	0,0002	0,0204	0,0052
3	2200	600	0,0755	0,0260	0,1549
4	2200	1000	0,0784	0,0176	0,1535
5	1234	800	0,0015	0,0160	0,0002
6	2366	800	0,0739	0,0627	0,1381
7	1800	517	0,0169	0,0261	0,1807
8	1800	1083	0,0243	0,0035	0,1738
9 (C)	1800	800	0,0175	0,0237	0,1819
10 (C)	1800	800	0,0228	0,0250	0,1842
11 (C)	1800	800	0,0232	0,0251	0,1837
12 (C)	1800	800	0,0220	0,0245	0,1839
13 (C)	1800	800	0,0225	0,0253	0,1840

Os valores encontrados para as variáveis foram: temperatura de pirólise = 800 °C e temperatura de atomização = 2200 °C, que correspondem ao ponto de maior sensibilidade para os três elementos, arsênio, cádmio e chumbo. A Tabela 5 apresenta o programa de temperaturas que apresentou as melhores condições para atingir o objetivo deste trabalho.

Tabela 5. Programa de temperaturas que levou à melhor resposta

Fases	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo (s)	Fluxo Interno (mL min ⁻¹)	Gás	Leitura
1	110	1	30	250	N	
2	130	15	30	250	N	
3	800	10	20	250	N	
4	2200	0	3	250	-	*
5	2450	1	3	250	N	

Análise das características do método

Com a definição das condições ideais para a metodologia proposta, realizamos o estudo dos parâmetros de validação da mesma.

A Tabela 6 apresenta as figuras de mérito da metodologia estudada para análise dos elementos de interesse.

Tabela 6. Figuras de mérito para análise simultânea de arsênio, cádmio e chumbo por GF AAS – modelo SIMAA 6000

Parâmetros	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Faixa de Trabalho (µg L ⁻¹)	4 - 20	1-5	20-100
% RSD	1,8	1,3	0,9
LD (µg L ⁻¹)	1,0	0,1	1,0
LQ (µg L ⁻¹)	4,0	0,4	3,5

A validação da metodologia, segundo os parâmetros do INMETRO,¹³ mostrou que o método estudado apresenta precisão e exatidão, tendo sido obtida uma recuperação que variou entre 98 a 110%, para o arsênio, 97 a 102%, para o cádmio e 92 a 118%, para o chumbo.

CONCLUSÃO

A utilização do planejamento fatorial possibilitou definir quais parâmetros, dentre os selecionados, afetariam, de forma mais significativa, a análise simultânea de arsênio, cádmio e chumbo. Além disso, permitiu analisar o sistema de maneira multivariada, buscando estudar todas as variáveis que compunham o sistema experimental, pois, conforme observado experimentalmente, existe interação entre os parâmetros selecionados, o que não seria possível ser percebido na otimização univariada. O planejamento experimental permitiu eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos deu mais objetividade científica nas conclusões.

A otimização das variáveis, através do uso da metodologia de superfície de resposta, foi bem sucedida, visto que se obteve as condições ideais para determinação simultânea dos três elementos, mesmo tendo, estes elementos, características diferentes entre si, principalmente em relação à temperatura de volatilização. Pôde-se constatar que o uso desta metodologia, com sensibilidade e exatidão adequadas, possibilitou a redução dos custos com reagentes e equipamentos, levando também a uma maior rapidez na resposta analítica.

O uso desta ferramenta permitiu a implantação e validação de uma metodologia de Controle de Qualidade da água purificada utilizada nos hemocentros, proporcionando maior rapidez e eficácia para as ações de Vigilância Sanitária, portanto espera-se que o presente estudo sirva para incentivar o uso do planejamento experimental fatorial como uma ferramenta no desenvolvimento de novas metodologias em química analítica.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/FIOCRUZ e à Capes pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Portaria nº 154, 15 de Junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jun. 2004.
2. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry - 3rd ed., Completely Revised Edition*, Wiley - VCH; Weinheim, 1999.
3. Welz, B.; Schelemmer, G.; Mudakavi, J. R.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, 7/8, 1257.
4. Costa, M. L.; Korn, M. G. A.; Castro, J. T.; Santos, W. P. C.; Carvalho, E. V.; Nogueira, A. R.A.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 149.
5. Cassella, R. J.; Sant'Ana, O. D.; Santelli, R. E.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2002**, 57, 1967.
6. Pereira -Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z.; *Quim. Nova* **2002**, 25,246.
7. Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Ed. Unicamp: São Paulo, 1996.
8. Calado, V.; Montgomery, D.; *Planejamento de Experimento usando o Statistica*, Ed.- e- papers: Rio de Janeiro, 2003.
9. Perkin Elmer, *The THGA Graphite Furnace: Techniques and Recommended Conditions*, 1991.
10. Funk,W.; Dammann, V.; Donnevert, G.; *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Weinheim-VCH: New York, 1995.
11. Acar, O.; *Talanta* **2001**, 51, 1235.
12. Statistica for Windows; *StatSoft*, Inc, Tulsa, USA,1999.
13. INMETRO; *DOQ-CGCRE-008 -revisão 00: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*, Outubro 2002, <http://www.inmetro.gov.br>, acessada em Dezembro 2006.

Anexo 3



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry

Lisia M.G. dos Santos^{a,b}, Rennan G.O. Araujo^a, Bernhard Welz^{a,*}, Silvana do C. Jacob^b, Maria Goreti R. Vale^c, Helmut Becker-Ross^d

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil

^b Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde–INCQS–Fiocruz, Av. Brazil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro–RJ, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre–RS, Brazil

^d ISAS - Institute for Analytical Sciences, Department of Interface Spectroscopy, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2008

Received in revised form 2 December 2008

Accepted 3 December 2008

Available online xxx

Keywords:

Grain products

Simultaneous determination of Cd and Fe

High-resolution continuum source AAS

Electrothermal atomization

Direct solid sample analysis

ABSTRACT

Cadmium and iron are antagonistic elements in the sense that they produce different effects in the human body. Both elements have to be determined routinely in grain products, cadmium because of its toxicity, and iron because all grain products, according to Brazilian law, have to contain a minimum of 42 mg kg⁻¹ Fe to combat anemia. A routine screening method has been developed for the quasi simultaneous determination of cadmium and iron using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. The primary absorption line at 228.802 nm has been used for Cd, and an adjacent secondary line at 228.726 nm for the determination of Fe. Various chemical modifiers have been investigated, and a mixture of tungsten and iridium, applied as a permanent modifier, showed the best performance; it stabilized Cd up to a pyrolysis temperature of 700 °C and did not over-stabilize Fe. Two atomization temperatures were used sequentially, 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe, because of their significantly different volatilities. The characteristic masses obtained were 0.9 pg for Cd and 1.2 ng for Fe. The limits of detection (3σ, n = 10) were 0.6 μg kg⁻¹ for Cd and 0.5 mg kg⁻¹ for Fe. The relative standard deviation ranged from 3 to 7% for Cd and from 4 to 13% for Fe, which is satisfactory for the purpose. The accuracy of the method was confirmed by the analysis of three certified reference materials; the results were in agreement with the certified values at a 95% confidence interval. The Cd content in the investigated grain products was between 0.9 and 10.5 μg kg⁻¹, but most of them did not contain the required minimum amount of iron.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The chemical analysis of human food is a topic of interest for consumers and health professionals. Because of this, significant research has been carried out in order to aware government authorities about the need of controlling and supervising the quality of food [1–3]. Cadmium and iron are very important elements for two completely different reasons. Cadmium is an extremely toxic element even at low concentration; it was classified as carcinogenic of group 1 [4], by the International Agency for Research on Cancer (IARC), and set at the 7th position in the list of the most aggressive substances to health and to the environment by the Program for Answers, Reparations and Environmental Responsibilities (Cercla)

of the ATSDR-EPA [5]. The *Codex Alimentarius* limits the concentration of Cd in food to a maximum of 0.2 mg kg⁻¹ [6], and Brazilian legislation sets an upper limit of 1.0 mg kg⁻¹ [7]. Iron, in contrast, is an essential element, and iron deficiency in food may cause diseases, such as anemia. Many researchers, and also the World Health Organization, are therefore recommending fortification of food, mainly of grain products, with iron as one of the best options to combat iron deficiency. Brazilian legislation, for example, requires a minimum content of 42 mg kg⁻¹ Fe in all kind of grain products in order to combat anemia in the country [8].

Usually, food samples are analyzed after they were brought into solution by traditional techniques, such as dry ashing or wet digestion [9]. For the subsequent determination of trace elements these techniques present some limitations associated with (a) the applied temperature, (b) the form in which the analyte is present in the sample, (c) the chemical environment in the ashing/digestion stage, and (d) the dilution that is inevitably associated with any digestion, which obviously affects the limits of detection that can be attained.

* Corresponding author. Fax: +55 48 3721 6850.

E-mail address: Welz@qmc.ufsc.br (B. Welz).

Contamination and/or losses by volatilization are among the most frequent sources of systematic errors and affect directly the accuracy of analytical results [10]. An alternative to minimize these problems is the direct analysis of solid samples, which presents a number of advantages such as high detection power, high speed of analysis, minimum risk of contamination and loss of the analyte(s), and the absence of toxic and/or corrosive chemicals [11]. The only disadvantage of this technique is the higher imprecision due to the natural heterogeneity of solid samples [12–14].

High-resolution continuum source absorption spectrometry (HR-CS AAS), which has been investigated as an alternative to line source AAS (LS AAS) since the 1960s [15] has finally become feasible in the 1990s [16,17] and became commercially available a few years ago. The technique and the instrumental concept have been fully described by Welz et al. [15]. The major features of this technique are the use of a single radiation source for all analytes and wavelengths, the visibility of the spectral environment around the analytical line at high resolution, and its unsurpassed background correction capabilities that make it ideally suited for the direct analysis of complex samples. Particularly for the direct analysis of solid samples, HR-CS AAS has demonstrated its superiority over conventional LS AAS [11].

Although the currently available spectrometers for HR-CS AAS are not designed for simultaneous multi-element determination, it is possible to determine more than one element at a time if the absorption line of a second (or third) element appears within the spectral interval that reaches the CCD array detector, which is between about 0.4 and 2 nm, depending on the wavelength range. This second line, almost inevitably, is a less sensitive analytical line, and, although there are ways to increase or reduce sensitivity in HR-CS AAS [18], the sensitivity ratio between the two lines has to be in accordance with the analytical task. Additional problems for the simultaneous determination of more than one element in ET AAS are the selection of compromise pyrolysis and atomization temperatures and to choose a chemical modifier that is equally suited for both elements. Usually it is considered difficult to determine elements of significantly different volatility simultaneously with this technique.

The goal of the present work has been to investigate the possibility of a simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling (SS) analysis in order to establish a fast routine screening procedure for food analysis. There is an iron absorption line at 228.726 nm close to the main resonance line of cadmium at 228.802 nm, i.e., it is available for simultaneous determination. The sensitivity of the secondary iron line is also some two orders of magnitude lower than that of the primary resonance line, which roughly corresponds to the difference in concentration between the two elements in food samples. The major challenge, hence, has been to develop a temperature program and to find a modifier that is compatible with the significantly different volatility of the two analytes.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

All experiments were carried out using a prototype high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, based on a Model AAS 6 Vario (Analytik Jena, Jena, Germany), from which all optical components have been removed and replaced by a spectrometer built at ISAS (Berlin, Germany). This spectrometer consists of a high-intensity xenon short-arc lamp operating in a hot-spot mode, a high-resolution double monochromator and a CCD array detector. The double monochromator consists of a pre-dispersing prism monochromator and a high-resolution echelle

Table 1

Temperature program for the simultaneous determination of cadmium and iron in food samples by SS-HR-CS AAS using W-Ir as the permanent modifier.

Stage	Temperature (°C)	Ramp (°C s ⁻¹)	Hold time (s)	Ar flow rate (L min ⁻¹)
Drying	90	10	10	2.0
Drying	130	5	5	2.0
Pyrolysis	700	50	15	2.0
Auto Zero*	700	100	1	0
Atomization*	1700	2000	3	0
Atomization*	2600	3000	12	0
Cleaning	2600	1000	3	2.0

* Signal registration in these stages

grating monochromator, both in Littrow mounting, resulting in a resolution of $\lambda/\Delta\lambda \approx 140,000$, corresponding to a resolution per pixel of $\sim 2 \mu\text{m}$ at the cadmium line. The system is controlled by a Pentium III personal computer (100 MHz), running a data acquisition program developed at ISAS Berlin. Details of this equipment have been described in previous publications of our group [19,20]. The primary resonance line for Cd at 228.802 nm, and the adjacent secondary line for Fe at 228.726 nm were used for the simultaneous determination of the two elements. The atomic absorption for both elements was measured using peak volume selected absorbance (PVSA) [18] using three pixels ($A_{\Sigma 3, \text{int}}$), corresponding to a spectral interval of $\sim 6.0 \mu\text{m}$, as these conditions resulted in the best signal-to-noise (S/N) ratio.

The transversely heated graphite tube atomizer system supplied by Analytik Jena together with the Model AAS 6 Vario was used throughout. All experiments were carried out using pyrolytically coated solid sampling (SS) graphite tubes without dosing hole (Analytik Jena Part No. 407-A81.303) and SS platforms (Analytik Jena Part No. 407-152.023). The samples were weighed directly onto the SS platforms using an M2P microbalance (Sartorius, Göttingen, Germany) and inserted into the graphite tube using a pre-adjusted pair of tweezers, which is part of the SSA 5 manual solid sampling accessory (Analytik Jena). For the measurement of solid samples the PVSA was normalized for a sample mass of 1 mg, as it is impossible (and unnecessary) to weigh and introduce always the same sample mass into the graphite furnace. Aqueous standards and modifier solutions were injected manually onto the SS platform using micropipettes with disposable tips. Argon (99.996%, White Martins, São Paulo, Brazil) was used as purge and protective gas throughout. The optimized graphite furnace temperature program used for the simultaneous determination of Cd and Fe is shown in Table 1. Obviously, the solid samples analyzed in this work would not need any drying stage; nevertheless, the same temperature program has been used for aqueous standards and for the solid samples in this work for simplicity reason.

A vibration ball mill Model MM 200 (Retsch, Düsseldorf, Germany) with agate balls has been used to grind the bread and biscuit samples.

2.2. Standard solutions, modifiers and samples

A standard solution containing 1000 mg L⁻¹ Cd was prepared from a Spex standard (Spex, Eddison, NJ, USA) and a 1000 mg L⁻¹ Fe solution was prepared from a Titrisol concentrate (Merck). The calibration solutions were prepared daily through serial dilutions of the stock solution with the addition of 0.5% (v/v) nitric acid. De-ionized water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) with a resistivity of 18 M Ω cm was used throughout. The following atomic absorption standard solutions were used for the permanent modifiers: 1000 mg L⁻¹ Ir and 1000 mg L⁻¹ W (both from Fluka, Buchs, Switzerland). In order to coat the platform surface with a permanent modifier, ten aliquots of 40 μL each of the modifier solu-

Table 2

Temperature program for the thermal deposition of the permanent modifier on the SS graphite platform; the gas flow was 2 L min⁻¹ in all stages.

Stage	Temperature (°C)	Ramp (°C s ⁻¹)	Hold time (s)
1	130	30	20
2	400	30	20
3	1000	100	10
4	2000	100	5

tion were injected onto the platform, and the temperature program shown in Table 2 was executed after each injection, resulting in a total mass of 400 µg of modifier on the SS platform. In order to coat the platform with the W–Ir mixed permanent modifier, five aliquots of 40 µL of the W modifier solution were applied first, each one followed by the temperature program shown in Table 2, then five aliquots of 40 µL of the Ir modifier solution were applied, also followed by the same temperature program, resulting in a coating with 200 µg each of W and Ir.

The following certified reference materials (CRM) have been used in this work: NIST SRM 1567a wheat flour, NIST SRM 1573a tomato leaves (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and BCR No. 191 brown bread (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

One wheat flour, one corn flour, two samples of French bread and two samples of biscuits have been collected from local supermarkets in Florianópolis, SC, for this investigation. The samples were dried in a stove at 70 °C for a period of 48 h; then they were ground in a vibration ball mill with agate balls for 30 min with a frequency of 30 s⁻¹; the samples have not been sieved, as a very fine powder has been obtained after the treatment in the mill.

3. Results and discussion

3.1. Method development

The currently available spectrometers for HR-CS AAS are not designed for simultaneous multi-element determination. Nevertheless, it is possible to determine more than one element at a time if the absorption line of a second element is located within the spectral interval that reaches the detector. In the case of Cd this interval corresponds to about ±0.2 nm at both sides of the analytical line. This is of only minor interest in flame AAS, where fast sequential determination of several analytes under optimized conditions is obviously the better choice [21]. In ET AAS, in contrast, where fast sequential determination is not feasible because of the transient nature of the absorbance signals, simultaneous determination of more than one analyte is of great interest, as it reduces analysis time proportionally. However, several requirements have to be met in order to make this approach feasible, and conditions have to be optimized, as any simultaneous determination implies compromises.

The first requirement is that the sensitivity ratio between the elements to be determined at the available analytical lines corresponds roughly to the concentration ratio of the analytes in the samples to be analyzed. Although HR-CS ET AAS offers various possibilities to increase or decrease sensitivity by choosing appropriate pixels for measurement [18], particularly the option to increase sensitivity is limited. Fortunately this condition was fulfilled in the present case, as the iron line at 228.725 nm is about two orders of magnitude less sensitive than the primary resonance line at 248.327 nm, and about three orders of magnitude less sensitive than cadmium at the 228.802-nm line, as shown in Fig. 1. This corresponds in a first approximation to the situation in grain products, where the concentration of cadmium is typically 3–4 orders of magnitude lower than that of iron.

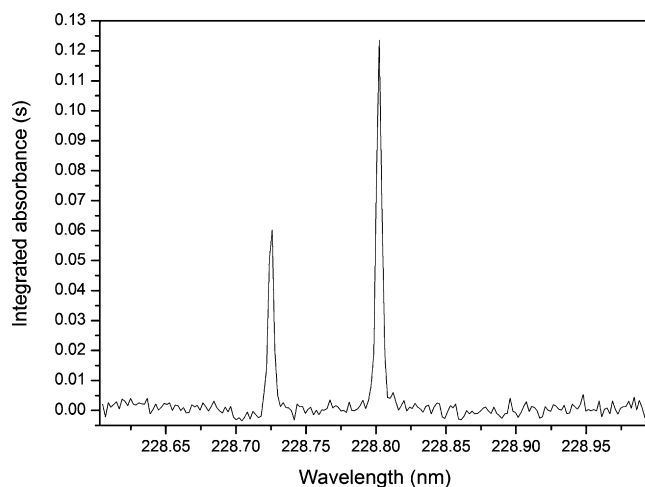


Fig. 1. Integrated absorbance spectrum in the vicinity of the cadmium resonance line at 228.802 nm using an aqueous standard containing 50 µg Cd and 30 ng Fe; pyrolysis temperature: 700 °C; atomization temperature: 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe; W–Ir mixed permanent modifier.

Another problem in the present case is the significantly different volatility of cadmium and iron, which requires careful optimization of the compromise conditions. It is obvious that the most volatile element determines the maximum pyrolysis temperature, and the most refractory element determines the atomization temperature. An additional problem is the selection of a suitable modifier, as it is well known that cadmium requires a chemical modifier, as otherwise it is lost already at pyrolysis temperatures above 300 °C, at least from aqueous solution. Iron, on the other hand, does not need a modifier, and it might be ‘over-stabilized’ by the use of a modifier, i.e., become even more difficult to atomize.

Only permanent chemical modifiers have been considered in this work, as the goal has been the development of a fast routine procedure, and injecting manually a modifier solution on top of each solid sample would have complicated the procedure considerably. Iridium and tungsten alone and a combined tungsten and iridium (W–Ir) permanent modifier have been investigated in this work. The pyrolysis and atomization temperatures have been optimized using a univariate approach, as for a given modifier, temperature is the only variable that determines the measured signal. Multivariate approaches have been used occasionally to determine optimum pyrolysis and atomization temperatures; however, the result might be falsified by artifacts and suggest less-than-optimum temperatures. In addition, valuable details might be overlooked that appear in ‘conventional’ univariate pyrolysis and atomization curves.

Two reference materials (BCR No. 191, brown bread and NIST SRM 1573a, tomato leaves) and aqueous standard solutions have been used for the development and optimization of the method, but only the results obtained for the brown bread CRM will be shown. The curves for the tomato leaves CRM have been very similar, and the behavior of the aqueous standards will be discussed where necessary.

The pyrolysis and atomization curves for Cd in the brown bread CRM without modifier and with the three permanent modifiers (Ir, W and W–Ir) are shown in Fig. 2a and b. In contrast to aqueous standards, where Cd without a modifier is lost at pyrolysis temperatures above 300 °C, no significant losses have been observed from the CRM up to about 600 °C. Above this temperature Cd was lost rapidly, and neither Ir alone nor W alone used as permanent modifier could prevent these losses, although some stabilizing effect has been observed. The W–Ir mixed permanent modifier stabilized Cd up to a pyrolysis temperature of 700 °C, which was sufficient to

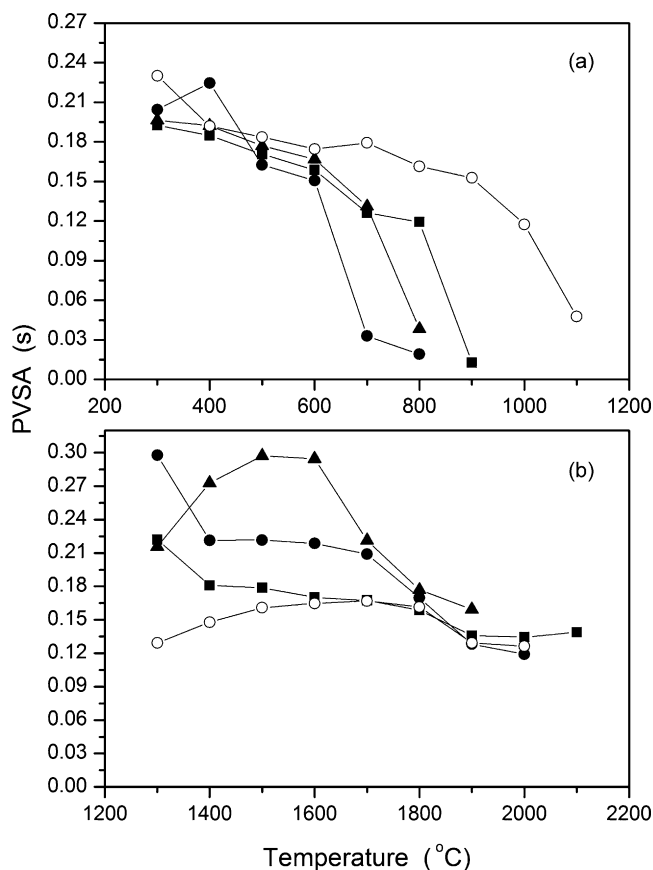


Fig. 2. Pyrolysis and atomization curves for Cd in CRM BCR 191 brown bread; -●- without modifier; -▲- W permanent modifier; -■- Ir permanent modifier; -○- W-Ir permanent modifier; a – pyrolysis curves; atomization temperature of 1600 °C without modifier and 1800 °C with permanent modifier; b – atomization curves; pyrolysis temperature of 500 °C without modifier and 700 °C with permanent modifier.

efficiently remove the bulk of the matrix. The atomization curve for Cd without a modifier shows the typical behavior for a volatile element, i.e., a maximum, in this case around 1500–1600 °C, followed by a decrease in sensitivity; this is due to the increasing diffusion velocity at higher temperatures, which results in a shorter residence time of the atoms in the absorption volume. The atomization curves with the permanent modifiers exhibit lower sensitivity up to about 1700 °C, which indicates an incomplete release of Cd at these temperatures due to the stabilizing power of the modifiers. Above this temperature the sensitivity becomes very similar to that without modifier, indicating a complete release of the analyte from the modifier and the same diffusion losses with further increasing temperature.

Fig. 3 shows the absorbance signal for Cd and the background for the brown bread CRM without and with correction for continuous background using the W-Ir mixed permanent modifier, a pyrolysis temperature of 700 °C and an atomization temperature of 1700 °C. It is obvious that the background can be corrected without any problems, resulting in a very smooth atomization signal for Cd.

The pyrolysis and atomization curves for Fe in the brown bread CRM are shown in Fig. 4a and b. Iron exhibits very high thermal stability up to at least 1500 °C even without a modifier, which is typical for this element. The explanation for the lower sensitivity obtained with the W-Ir mixed permanent modifier can be obtained from the atomization curves in Fig. 4b. When the atomization curves without modifier and with the W-Ir mixed modifier are compared, the similarity with the corresponding atomization curves for Cd becomes obvious. Although Fe is a much less volatile element, the

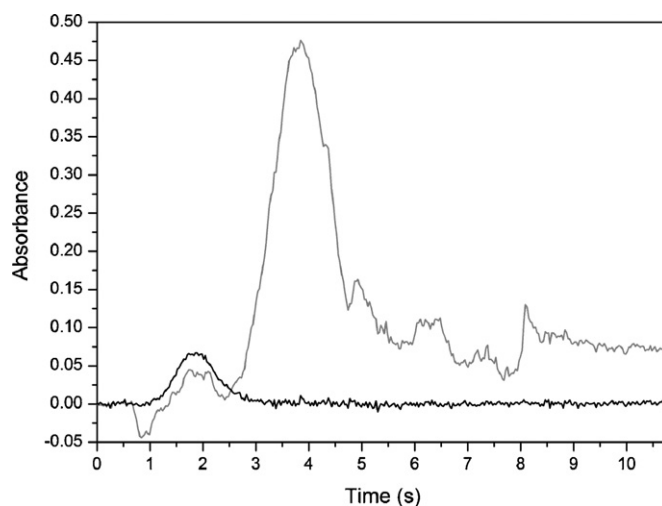


Fig. 3. Absorbance signals measured for BCR 191 brown bread CRM at the center pixel at 228.802 nm using the Ir-W permanent modifier, using a pyrolysis temperature of 700 °C and an atomization temperature of 1700 °C; gray line: without background correction; black line: with correction for continuous background absorption.

curve without modifier also exhibits a maximum at 2000 °C and a decreasing sensitivity for higher atomization temperatures. In the presence of the W-Ir mixed modifier complete release of Fe is only achieved at 2500 °C, where the atomization curve coincides with

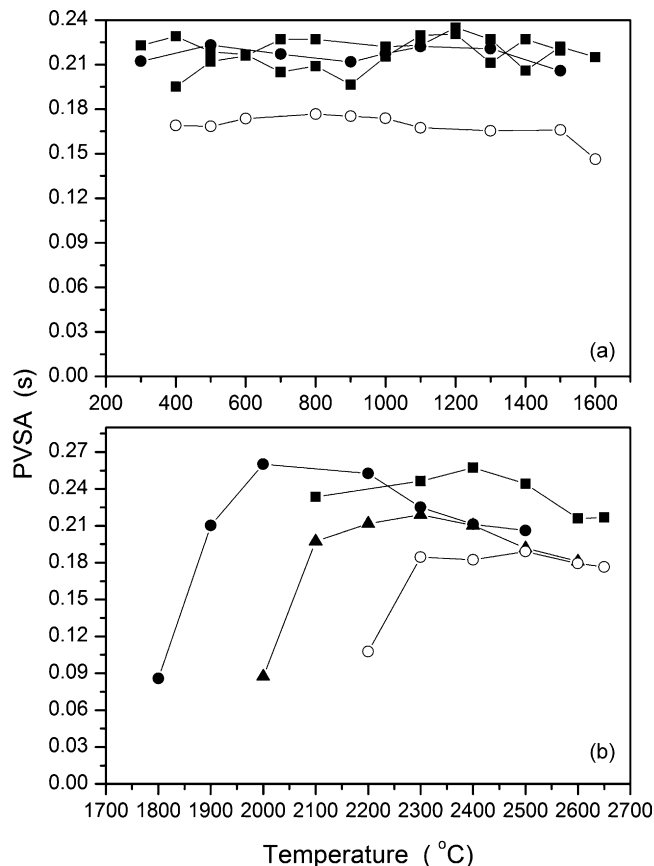


Fig. 4. Pyrolysis and atomization curves for Fe in CRM BCR 191 brown bread; -●- without modifier; -▲- W permanent modifier; -■- Ir permanent modifier; -○- W-Ir permanent modifier; a – pyrolysis curves; atomization temperature of 2500 °C without modifier and 2600 °C with permanent modifier; b – atomization curves; pyrolysis temperature of 500 °C without modifier and 700 °C with permanent modifier.

Table 3

Figures of merit for the simultaneous determination of Cd and Fe by SS-HR-CS ET AAS at 228.802 nm and 228.726 nm, respectively, using the temperature program in Table 1.

Parameter	Analyte	
	Cd	Fe
Analytical range	3–70 pg/0.3–7 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.6–40 ng/0.26–4 mg L^{-1}
Analytical curve, aqueous standards	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0051 m_{\text{Cd}} + 0.0098$	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0037 m_{\text{Fe}} + 0.0091$
Analytical curve using CRM	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0051 m_{\text{Cd}} + 0.0033$	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0037 m_{\text{Fe}} + 0.0022$
R	0.9981	0.9992
LOD ^a	0.9 pg/0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0.8 ng/0.5 mg kg^{-1}
LOQ ^a	3.0 pg/2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2.6 ng/1.7 mg kg^{-1}
m_0	0.9 pg	1.2 ng

^a Based on 1.5 mg of sample mass

that without a modifier. The apparently slightly higher sensitivity obtained with W and Ir alone is actually an artifact; both modifiers are 'over-stabilizing' iron, resulting in a poorly defined, very broad atomization signal that is very difficult to integrate.

According to these results it becomes apparent that the W–Ir mixed modifier gives best results for both analytes, although Fe obviously would not need any modifier at all. It also became apparent that the bulk of the matrix could be removed at a pyrolysis temperature of 700 °C in the presence of this modifier. However, it also became obvious that no common atomization temperature could be used for the two analytes without impairing significantly the performance for Cd. For this reason, two atomization temperatures were used sequentially, 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe, according to the program shown in Table 1. The atomization signals obtained for the two analytes for an aqueous standard and for the brown bread CRM are shown in Fig. 5a and b. Although the determination of the two elements is not strictly 'simultaneous', we prefer to use this term in order to distinguish the procedure used in this work from 'fast sequential' procedures that include a change of wavelength and of other experimental parameters, as it is common practice in HR-CS AAS with flame atomization [21].

3.2. Calibration and figures of merit

Several calibration approaches were proposed in the literature to compensate for potential matrix effects in direct SS-ET AAS, such as calibration against solid standards (usually CRM) with a matrix composition and analyte concentration similar to that of the sample to be analyzed, and the 'generalized analyte addition method', a three-dimensional calibration technique [22]. The latter has been applied by only a limited number of authors due to its complexity, whereas the former is routine in other solid sampling techniques, such as arc and spark emission and X-ray fluorescence. The major problem associated with the use of solid CRM for calibration, besides the high cost of these materials, is that the uncertainty of the certified value adds to the uncertainty of the calibration and hence of the final analytical result. However, if the literature about SS-ET AAS of the last 15–20 years is consulted, the vast majority of determinations have actually been carried out using aqueous standards for calibration [12], which is mostly due to the uncompromising use of the stabilized temperature platform furnace (STPF) concept [23]. Besides the classical components, which include atomization from a L'vov platform, integration over the peak area and the use of a chemical modifier, the introduction of transversely heated, spatially isothermal atomizers had a significant contribution to freedom from interferences. The weak link in LS AAS has always been the background correction, a problem that has been finally solved with the introduction of HR-CS ET AAS, which also reflects in the publications about direct SS using aqueous standards for calibration [11]. Calibration against aqueous standards and against a solid CRM has been compared in this work, and the slopes of the calibration curves have been found to be very similar, as shown in Table 3. The appearance times and peak shapes are

also very similar for the two analytes in aqueous solution and for direct SS analysis, as has been shown in Fig. 5a and b. The aqueous standard in Fig. 5a corresponds to a mass of 50 pg Cd and 30 ng Fe, and the PVSA values were 0.262 and 0.124 s, respectively; in Fig. 5b 1.022 mg of CRM BCR 191 was introduced into the graphite atomizer, corresponding to 29 pg Cd and 42 ng Fe, and the PVSA values were 0.147 and 0.160 s, respectively. This is another indication for a very similar atomization behavior and the absence of matrix effects.

Table 3 also shows the other figures of merit for the simultaneous determination of Cd and Fe in grain products by SS-HR-CS ET AAS. The linearity assessment was based on the methodology described by Souza and Junqueira [24]. Three calibration curves were prepared on different days, with concentration levels of 1, 3, 5 and 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd (corresponding to 10, 30, 50, 70 pg Cd), and 1, 2, 3 and 4 mg L^{-1} Fe (corresponding to 10, 20, 30 and 40 ng Fe).

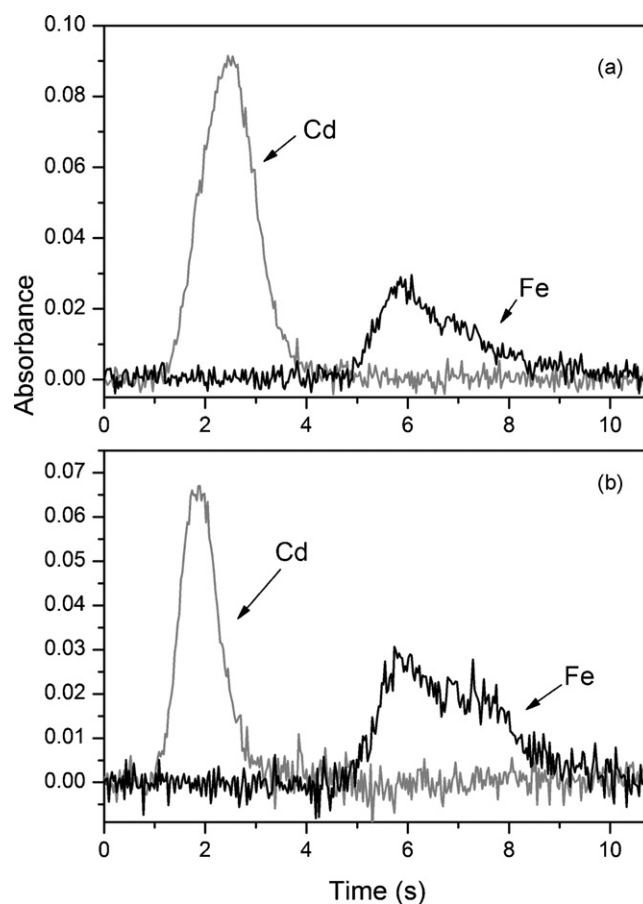


Fig. 5. Superimposed absorbance signals for Cd (gray line) and Fe (black line) after automatic correction for continuous background absorption; pyrolysis temperature: 700 °C; atomization temperature: 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe; a – aqueous standard; b – BCR 191 brown bread CRM.

Table 4
Results obtained for the determination of cadmium and iron in CRM by SS-HR-CS ET AAS using aqueous calibration standards and NIST SRM 1567a for solid calibration and Ir–W as a permanent modifier.

CRM	Analyte	Certified/mg kg ⁻¹	Found/mg kg ⁻¹	
			Aqueous calibration	Solid calibration
BCR 191	Cd	0.028 ± 0.002	0.025 ± 0.002	0.026 ± 0.002
NIST 1573a		1.52 ± 0.04	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
NIST 1567a		0.026 ± 0.002	0.023 ± 0.001	Used for calibration
BCR 191	Fe	40.7 ± 2.4	37.8 ± 6.3	43.4 ± 7.4
NIST 1573a		367 ± 7	342 ± 19	400 ± 21
NIST 1567a		14.1 ± 0.5	15.2 ± 1.5	Used for calibration

The linearity was tested by examining a plot of residuals produced by linear regression of the response on the concentration in an appropriate calibration set. The statistic test (Ryan-Joine, Levene, Durbin-Watson) has been carried out by comparing the lack-of-fit variance with that due to pure error, which confirmed the linearity of the calibration curves for Cd and Fe [25–27].

In this work precision is expressed as relative standard deviation (%RSD) of five replicate measurements of a CRM. Although five replicates might appear insufficient to obtain a reliable RSD, it has been found that the values do not improve significantly in SS-ET AAS when a greater number of replicates are used. The RSD values were between 3 and 7% for Cd and between 4 and 13% for Fe. The significantly higher RSD for the latter element could be due to the omnipresence of this element in the environment, i.e., due to some contamination; however, as no systematic bias has been observed, it is more likely due to the inhomogeneous distribution of iron in the investigated CRM.

The accuracy of the method has been evaluated by analyzing three CRM of different composition, demonstrating the wide applicability of the method [28], using both aqueous standards and a solid CRM for calibration. The results, shown in Table 4 confirm that there is no significant difference between both calibration techniques, based on a Student's *t*-test at a confidence level of 95% [26].

The limit of detection (LOD) was calculated according to the 'zero mass response' [22,28,29] as three times the standard deviation of the signal obtained for 10 repetitive "atomizations" of an empty SS platform, only containing the modifier. The LOD was 0.6 µg kg⁻¹ for Cd and 0.5 mg kg⁻¹ for Fe. The limit of quantification (LOQ), defined as ten times the standard deviation, was 2.0 µg kg⁻¹ for Cd and 1.3 mg kg⁻¹ for Fe.

The characteristic mass for Cd found in this work was 0.9 pg, which is in agreement with literature data; the characteristic mass found for Fe was 1.2 ng, and no values could be found in the literature for this line for comparison. The high sensitivity of the method can be attributed mainly to the absence of any dilution for the SS procedure.

3.3. Analysis of real samples

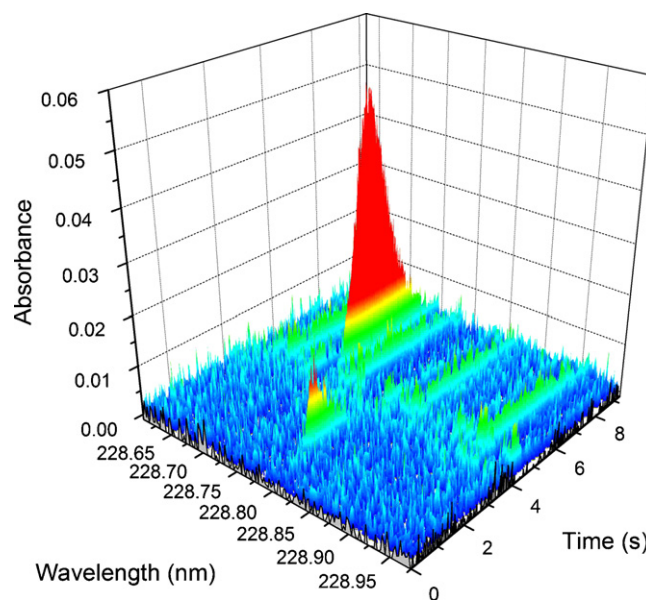
The simultaneous determination of Cd and Fe was also used to evaluate the concentration of these elements in a few selected local grain products, wheat flour, corn flour, bread and biscuits. The concentrations of Cd and Fe found in these products, using aqueous standards for calibration, are shown in Table 5. The values for cadmium were in the range between 0.9 µg kg⁻¹, a value close to the LOD, and 10.5 µg kg⁻¹ values that are well below those established by the *Codex Alimentarius* (0.2 mg kg⁻¹) and the Brazilian National Health Surveillance Agency–ANVISA (1.0 mg kg⁻¹) [7]. For Iron, the values ranged from 15.7 mg kg⁻¹ to 72.7 mg kg⁻¹. Considering Brazilian legislation [8], which requires enriching any grain product with Fe to at least a concentration of 42 mg kg⁻¹, the levels of Fe in the wheat and corn flour samples, with values below 20 mg kg⁻¹,

Table 5
Results of the simultaneous determination of cadmium and iron in different grain products collected in local supermarkets of Florianópolis, Brazil, using SS-HR-CS ET AAS and calibration against aqueous standards; all values are average and standard deviation of *n* = 5 determinations.

Sample	Found concentration	
	Cd/µg kg ⁻¹	Fe/mg kg ⁻¹
Wheat flour	5.9 ± 0.6	15.7 ± 4.7
Corn flour	0.9 ± 0.3	19.8 ± 2.7
French bread A	10.5 ± 0.3	37.2 ± 2.0
French bread B	6.2 ± 0.7	34.0 ± 2.7
Biscuit A	3.5 ± 0.9	72.7 ± 17.3
Biscuit B	7.5 ± 0.6	60.8 ± 0.6

and in the bread samples, with values below 42 mg kg⁻¹, were lower than the minimum amount required. Only the biscuit samples had iron levels above the minimum amount required by law.

The wheat and corn flour and the bread samples did not exhibit any molecular absorption except for the continuous background absorption shown in Fig. 3. For the biscuit samples, in contrast, a structured molecular absorption appeared together with the atomization of Fe, as is shown in Fig. 6. This spectrum has been identified as being due to the sulfur monoxide SO; it could be removed by least-squares background correction [30] using a reference spectrum established with an aqueous solution of (NH₄)₂SO₄. However, this correction was actually found to be unnecessary, as none of the

**Fig. 6.** Absorbance over time and wavelength for a biscuit sample in the vicinity of Cd resonance line at 228.802 nm; pyrolysis temperature: 700 °C; atomization temperature: 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe.

molecular absorption 'lines' was overlapping with the iron line, so that no interference could be observed.

4. Conclusion

This work has shown that it is possible to determine more than one analyte simultaneously (or quasi simultaneously) using HR-CS ET AAS if their absorption lines are within the spectral interval that reaches the CCD array detector. This is obviously a situation that might not be found for a great number of cases, but besides for iron, which has more than 600 absorption lines, cobalt, chromium and nickel, which all have more than 200 absorption lines, are other candidates, the lines of which might be found in the vicinity of other analytes. The other condition that has to be fulfilled is that the sensitivity ratio between the analytical lines combines with the concentration ratio of the analytes in the samples to be analyzed. This condition has been fulfilled in the present application, but it might as well be similar for a large number of other biological materials, so that the proposed procedure might be extended to other samples. The present work has also shown that a significantly different volatility of the analytes is not a barrier that would make their simultaneous determination impossible in HR-CS ET AAS, which is an important aspect, considering future equipment that might offer truly simultaneous multi-element ET AAS. Last not least, the present work has demonstrated one more time that HR-CS AAS is ideally suited for interference-free direct SS-ET AAS, and that aqueous standards can be used for calibration. And it has been shown one more time that permanent chemical modifiers can be used successfully for direct SS ET AAS.

Acknowledgement

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). R.G.O.A., B.W. and M.G.R.V. have research scholarships from CNPq and L.M.G.S. has a scholarship from CAPES. The authors are also grateful to Analytik Jena AG for the donation of the HR-CS AAS prototype.

References

- [1] A.G. Renwick, S.M. Barlow, I. Hertz-Picciotto, A.R. Boobis, E. Dybing, L. Elder, G. Eisenbrand, J.B. Greig, J. Kleiner, J. Lambe, D.J.G. Muller, M.R. Smith, A. Tritscher, S. Tuijtelaars, P.A. van den Brandt, R. Walker, R. Kroes, *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 1211.
- [2] O. Muñoz, J.M. Bastias, M. Araya, A. Morales, C. Orellana, R. Rebolledo, D. Velez, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1647.
- [3] B. Welz, D.L.G. Borges, U. Heitmann, in: S. Caroli (Ed.), *The Determination of Chemical Elements in Food: Applications for Atomic and Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA, 2007, p. 81.
- [4] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Top 20 Hazardous Substances from the CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.
- [5] E. Vassileva, H. Baeten, M. Hoenig, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 491.
- [6] World Health Organization. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives Series: 59. Geneva: IPCS-International Programme on Chemical Safety, 2008 <http://www.codexalimentarius.net>.
- [7] BRASIL. Decreto nº 55871, de 26 de março do 1965. Modifica o Decreto nº 50040, de 24 de Janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimento, alterado pelo Decreto nº 691 de 13 de Abril de 1962. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 abr. 1965.
- [8] BRASIL. Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico, constante do anexo desta Resolução. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 2002.
- [9] M.G.A. Korn, E.S. da Boa Morte, D.C.M.B. dos Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C. dos Santos, E.B.G.N. dos Santos, M. Korn, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2008) 67.
- [10] C.S. Noumura, C.S. da Silva, P.V. Oliveira, *Quim. Nova* 31 (2008) 104.
- [11] B. Welz, M.G. Vale, D.L.G. Borges, U. Heitmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2085.
- [12] M.G. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 377.
- [13] A.F. da Silva, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1835.
- [14] B. Welz, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 69.
- [15] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *High-resolution Continuum Source AAS—The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [16] U. Heitmann, M. Schutz, H. Becker-Ross, S. Florek, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 1095.
- [17] J.M. Harnly, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 137.
- [18] U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 1222.
- [19] M.G.R. Vale, I.C.F. Damin, A. Klassen, M.M. Silva, B. Welz, A.F. Silva, F.G. Lepri, D.L.G. Borges, U. Heitmann, *Microchem. J.* 77 (2004) 131.
- [20] A.F. Silva, D.L.G. Borges, B. Welz, M.G.R. Vale, M.M. Silva, A. Klassen, U. Heitmann, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 841.
- [21] J.L. Raposo Júnior, S.R. de Oliveira, N.M. Caldas, J.A. Gomes Neto, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 198.
- [22] U. Kurfürst, in: U. Kurfürst (Ed.), *Solid Sample Analysis—Direct And Slurry Sampling Using GF AAS and ETV-ICP*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1998, p. 21.
- [23] W. Slavin, D.C. Manning, G.R. Carnrick, *At. Spectrosc.* 2 (1981) 137.
- [24] S.V.C. Souza, J.A. Lima, J.C. Teodoro, R.G. Junqueira, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 274 (2007) 823.
- [25] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed., Ellis Harwood Limited, England, 1998.
- [26] D.L.G. Borges, A.J. Curtis, B. Welz, U. Heitmann, *Revista Analytica* 18 (2005) 58.
- [27] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [28] INMETRO. DOQ-CGCRE-008-revisão 01: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Março 2003.
- [29] S.V.C. Souza, R.G. Junqueira, *Anal. Chem. Acta* 552 (2005) 25.
- [30] D.L.G. Borges, A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtis, U. Heitmann, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 763.

Anexo 4

- Artigo aceito para publicação na revista Journal of Agricultural and Food Chemistry

Simultaneous Determination of Cd and Fe in Beans and Soil of Different Regions of Brazil Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Solid Sampling

LISIA M. G. DOS SANTOS,^{†,‡} BERNHARD WELZ,^{*,†,¶} RENNAN G. O. ARAUJO,^{†,§}
 SILVANA DO C. JACOB,[‡] MARIA GORETI R. VALE,^{||,¶} ANDREAS MARTENS,[⊥]
 IRLAND B. GONZAGA MARTENS,[#] AND HELMUT BECKER-ROSS[∇]

[†]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis–SC, Brazil, [‡]Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde—INCQS-Fiocruz, Av. Brazil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro–RJ, Brazil, [¶]Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia—INCT de Energia e Ambiente do CNPq, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador–BA, Brazil, [§]Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju–SE, Brazil, ^{||}Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre–RS, Brazil, [⊥]Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, Technical University Braunschweig, Germany, [#]Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belem–PA, Brazil, and [∇]ISAS—Institute for Analytical Sciences, Department of Interface Spectroscopy, Berlin, Germany

A fast routine screening method for the simultaneous determination of cadmium and iron in bean and soil samples is proposed, using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. The primary absorption line at 228.802 nm has been used for the determination of cadmium, and an adjacent secondary line, at 228.726 nm, for iron. Fourteen bean samples and 10 soil samples from nine states all over Brazil have been analyzed. The limits of detection (3σ , $n = 10$) were $2.0\ \mu\text{g kg}^{-1}$ for Cd and $4.5\ \text{mg kg}^{-1}$ for Fe. The relative standard deviation ranged from 4 to 7% for Cd and from 5 to 28% for Fe, which is usually acceptable for a screening method. The accuracy of the method has been confirmed by the analysis of two certified reference materials; the results were in agreement with the certified values at a 95% confidence interval.

KEYWORDS: Bean and soil samples; simultaneous determination of Cd and Fe; high-resolution continuum source AAS; graphite furnace atomization; direct solid sample analysis

1. INTRODUCTION

Since soil contamination by anthropogenic sources has increased significantly in many parts of the world, soil pollution has become an important environmental issue in industrialized countries. Heavy metals might influence the soil quality, the agricultural production and the groundwater quality, affecting human health through the water supply and foods (1). The content of metallic elements in foods depends on their concentration in the soil, their availability, and their capacity to be incorporated by the plants.

Cadmium is extremely toxic even at low concentration levels; it was classified as carcinogenic of group 1 (2) by the International Agency for Research on Cancer (IARC), and set in the seventh position in the list of the substances most aggressive to health and to the environment by the Program for Answers Reparations and Environmental Responsibilities (Cercla) of the ATSDR-EPA (3). Concern has therefore been expressed in several recent publications about pollution in environmental and health areas, because humans and animals are constantly exposed to such risks through air, soil, water and food (4).

The retention of cadmium in soil is positively correlated to cation exchange capacity, organic matter and pH, and appears to be negatively correlated to the amount of free iron oxide (5). Some studies show that foods contaminated with cadmium affect the absorption of important elements such as zinc, calcium and iron, essential in combating anemia (6), and that the iron depletion results in an increased intestinal absorption of Cd, and its subsequent transfer to the body circulation and tissues, particularly liver and kidneys (7, 8).

In developing countries, anemia affects predominantly the low-income group of the population, and it has in general a great impact on the quality of life in so-called Third World Countries. The increased risk for various infectious diseases is directly related to the reduction of immune resistance generated by anemia (9). Legumes, such as beans, constitute the main source of proteins and are a good source of mineral elements, such as iron, for large groups of population in Latin America and Africa. However, soil contamination affects the iron absorption and could cause damage to public health (10).

Recently a method for the simultaneous determination of cadmium and iron in grain products has been developed by our group (11) using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS) (12)

*Corresponding author. E-mail: Welz@qmc.ufsc.br. Fax: +55-48-3721-6850.

and direct solid sampling (SS) analysis. The latter technique is particularly suited for fast screening analyses, as essentially no sample preparation is necessary, avoiding in addition all potential sources of error associated with this stage of an analysis. Direct SS analysis also provides the highest possible sensitivity, as no dilution at all is involved in this technique. In addition, HR-CS GF AAS has been shown to be an extremely rugged technique that makes possible direct SS analysis of complex samples using aqueous standards for calibration (13).

The purpose of this work was to investigate the possibility of extending the simultaneous determination of Cd and Fe to bean and soil samples coming from different regions of Brazil, in order to establish a fast routine screening procedure for this kind of analysis. While no major difficulties were expected for the bean samples, the soil samples have been a real challenge, first, because the matrix is obviously very much different, and second, because the iron content in soils is typically in the g kg^{-1} range, whereas it is in the mg kg^{-1} range in the beans, and the cadmium content is in the $\mu\text{g kg}^{-1}$ range in both types of samples. Possibilities to reduce the sensitivity of this technique, which usually offers the highest sensitivity, had therefore to be investigated in order to reach the goal.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Instrumentation. All the experiments were carried out using a prototype high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, based on a model AAS 6 Vario (Analytik Jena, Jena, Germany), from which all optical components, including the detector and controls, had been removed and replaced by a spectrometer built at ISAS (Berlin, Germany). This spectrometer consists of a high-intensity xenon short-arc lamp operating in a hot-spot mode, a high-resolution double monochromator and a CCD array detector. The double monochromator consists of a predispersing prism and a high-resolution echelle grating monochromator, resulting in a resolution of $\lambda/\Delta\lambda \approx 140,000$, corresponding to a resolution of ~ 1.6 pm per pixel at the cadmium line. The system is controlled by a Pentium III personal computer (100 MHz), running a data acquisition program developed at ISAS Berlin. Details of this equipment were described in previous publications of our group (12, 14, 15). The primary resonance line for Cd at 228.802 nm and the adjacent secondary line for Fe at 228.726 nm have been used for the simultaneous determination of the two elements. The atomic absorption for cadmium has been measured using peak volume selected absorbance (PVSA) (16) using three pixels ($A_{\Sigma 3,\text{int}}$), corresponding to a spectral interval of ~ 5 pm, as the best signal-to-noise ratio was obtained under these conditions. Iron in bean samples has been determined using the same measurement principle; however, the concentration of iron in the soil samples was too high, so that measurement at the line wings ($A_{\Sigma \pm 2,\text{int}}$) had to be used in order to reduce sensitivity and increase the working range.

The transversely heated graphite tube atomizer system supplied by Analytik Jena together with the model AAS 6 Vario has been used throughout. All experiments were carried out using pyrolytically coated SS graphite tubes without dosing hole (Analytik Jena Part No. 407-A81.303) and SS platforms (Analytik Jena Part No. 407-152.023). The samples were weighed directly onto the SS platforms using an M2P microbalance (Sartorius, Göttingen, Germany) and inserted into the graphite tube using a preadjusted pair of tweezers, which is part of the SSA 5 manual solid sampling accessory (Analytik Jena). For the measurement of solid samples the PVSA was normalized for a sample mass of 1 mg, as it is impossible (and unnecessary) to weigh and introduce always the same sample mass into the graphite furnace. Aqueous standards and modifier solutions were injected manually onto the SS platform using micropipets with disposable tips. Argon (99.996%, White Martins, São Paulo, Brazil) was used as purge and protective gas throughout. The optimized graphite furnace temperature program used for the simultaneous determination of Cd and Fe is shown in Table 1. The typical time required for one measurement including weighing and introducing the sample is about 2 min, so that five replicate measurements could be made within 10 min.

2.2. Reagents and Standard Solutions. A standard solution containing 1000 mg L^{-1} Cd was prepared from a Spex standard (Spex,

Table 1. Graphite Furnace Temperature Program for the Simultaneous Determination of Cadmium and Iron in Bean and Soil Samples by SS–HR–CS AAS Using W–Ir as the Permanent Modifier

stage	temp/°C	ramp/°C s ⁻¹	hold time/s	Ar flow rate/L min ⁻¹
drying	90	10	10	2.0
drying	130	5	5	2.0
pyrolysis	700	50	15	2.0
auto zero ^a	700	100	1	0
atomization ^a	1700	2000	3	0
atomization ^a	2600	3000	12	0
cleaning	2600	1000	3	2.0

^a Signal registration in these stages.

Table 2. Temperature Program for the Thermal Deposition of the Permanent Modifier on the SS Graphite Platform^a

stage	temp/°C	ramp/°C s ⁻¹	hold time/s
1	130	30	20
2	400	30	20
3	1000	100	10
4	2000	100	5

^a The gas flow was 2 L min^{-1} in all stages.

Eddison, NJ), and a 1000 mg L^{-1} Fe solution was obtained by diluting a Titrisol concentrate (Merck, Darmstadt, Germany) to volume. The calibration solutions were prepared daily through serial dilution of the stock solutions with the addition of 0.5% (v/v) nitric acid. Deionized water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA) with a resistivity of $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ was used throughout. Atomic absorption standard solutions of 1000 mg L^{-1} Ir and 1000 mg L^{-1} W (both from Fluka, Buchs, Switzerland) have been used for the permanent modifiers. In order to coat the platform with the W–Ir mixed permanent modifier, five aliquots of $40 \mu\text{L}$ of the W modifier solution were applied first, each one followed by the temperature program shown in Table 2, and then five aliquots of $40 \mu\text{L}$ of the Ir modifier solution were applied, also followed by the same temperature program, resulting in a coating with $200 \mu\text{g}$ each of W and Ir.

The following certified reference materials (CRM) have been used in this work: BCR No. 191 Brown Bread and BCR No. 142 Light Sandy Soil (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

2.3. Collection and Preparation of the Samples. Fourteen bean samples and ten soil samples, collected in nine states of Brazil, have been investigated in this study. Most of the samples have been collected at experimental farms of Embrapa (Brazilian enterprise for research in agronomy and cattle breeding) or similar institutions. The soil samples were always taken close to the area where the beans (mostly *Faseolus vulgaris* L.) were grown. Ten soil samples were collected from each field, using a gauge auger (Eijkelcamp Agrisearch Equipment, The Netherlands) or a custom-made hand auger. The samples were collected in polyethylene bags and kept in an ice chest during transportation; then all bags were sealed and stored at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. In the laboratory the samples were allowed to warm to room temperature, and dried at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in an air-ventilated oven for 24 h. The samples were allowed to cool over silica gel and stored in closed polyethylene cups. All samples were first ground manually in an agate mortar until the material passed a mesh of 0.5 mm ; roots and plant material were removed during this procedure. Further grinding was done using a planetary ball mill (Fritsch Pulverisette model 05.102) with agate cups, lids and balls. The cups were rotated at 300 rpm for 20 min ; the final fineness was $< 100 \mu\text{m}$. The analysis by SS–HR–CS GF AAS has been carried out without further sample treatment. The sample mass weighed onto the SS platforms was typically between 0.09 mg and 0.15 mg of soil.

A total amount of $1\text{--}2 \text{ kg}$ of beans without pod was collected at each location in sealed plastic bags; the samples were transported in an ice chest and later stored at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ until further treatment. The frozen beans were allowed to warm up to room temperature slowly; shells and damaged beans were removed. The samples were weighed and dried at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in an air-ventilated oven for at least 24 h and treated in a laboratory mixer with stainless steel blades until a fine powder was obtained. Before the analysis by SS–HR–CS GF AAS, the samples were ground one more time in a vibration ball mill (model MM 200, Retsch, Düsseldorf, Germany) with

agate balls at a frequency of 30 s^{-1} for 30 min; the samples were not sieved, as a very fine powder was obtained after the treatment in the mill. The sample mass weighed onto the SS platforms was typically between 1.0 mg and 1.5 mg of beans.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Method Development. The currently available spectrometers for HR-CS AAS are not designed for simultaneous multielement determination. Nevertheless, it is possible to determine more than one element at a time if the absorption line of a second element is located within the spectral interval that reaches the detector, which is about 0.3 nm at 200 nm and about 0.6 nm at 400 nm. This is of only minor interest in flame AAS, where fast sequential determination of several analytes under optimized conditions is clearly the better choice (17). In GF AAS, however, where fast sequential determination is not feasible because of the transient nature of the absorbance signals, simultaneous determination of more than one analyte is of great interest, as it reduces analysis time proportionally. However, several requirements have to be met in order to make this approach feasible, and conditions have to be optimized, as any simultaneous determination implies compromises.

One of the requirements is that a compromised graphite furnace temperature program can be established that makes possible the simultaneous determination of the analytes of interest without too many sacrifices in sensitivity and overall performance. This condition could be fulfilled in the simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using W–Ir as permanent chemical modifier and a two-step atomization, as shown in Table 1 (11). Another requirement is that the sensitivity ratio between the elements to be determined at the available analytical lines corresponds roughly to the concentration ratio of the analytes in the samples to be analyzed. This was for example the case for the simultaneous determination of Cr and Fe (18), and Co and V (19) in crude oil. This condition was also fulfilled in the analysis of grain products (11), as the iron line 228.726 nm is about 2 orders of magnitude less sensitive than the primary line 248.327 nm, and about 3 orders of magnitude less sensitive than cadmium at the 228.802 nm line. This situation is shown in Figure 1 for the CRM Brown Bread, and it has been anticipated that the same could apply for the bean samples. However, it could also be expected that the developed method could not be transferred directly to soil samples, which are usually rich in iron, particularly in many regions of Brazil.

Fortunately HR-CS AAS offers various possibilities to decrease sensitivity and increase linearity by choosing appropriate pixels for measurement (12, 16). Maximum sensitivity and the best S/N ratio are usually obtained when the integrated absorbance measured at three or five pixels at the line core is summed, a procedure called peak volume selected absorbance, PVSA (16). On the other hand, sensitivity can be reduced and the linear working range extended significantly when measurement is made at the line wings; this becomes obvious from Figure 2, where the absorbance signals recorded at different pixels in the vicinity of the iron line at 228.726 nm are shown for BCR CRM 142 (Light Sandy Soil). A careful study has been carried out recently about the possibility to extend the linear working range for the determination of iron using measurement at the line wings (20), and the results of this study have been used in this work for the simultaneous determination of Cd and Fe in soil samples.

3.2. Calibration and Validation. Several calibration approaches were proposed in the literature to compensate for potential matrix effects in direct SS–GF AAS, such as calibration against solid standards (usually CRM) with a matrix composition and analyte concentration similar to those of the sample to be

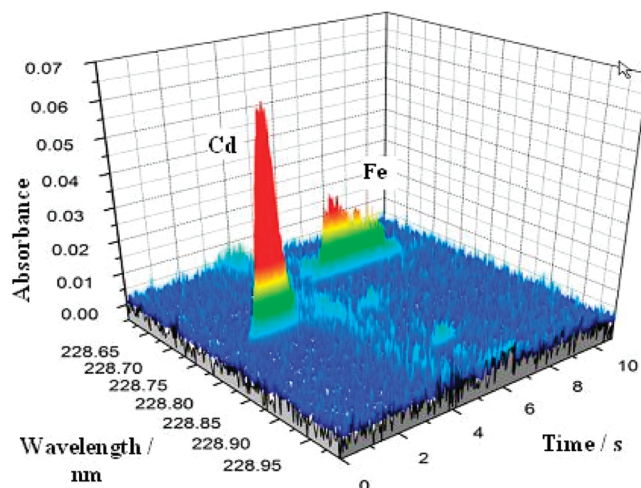


Figure 1. Time- and wavelength-resolved absorbance spectrum for the BCR CRM 191 (Brown Bread) in the vicinity of the cadmium resonance line at 228.802 nm; pyrolysis temperature, 700 °C; atomization temperature, 1700 °C for Cd and 2600 °C for Fe; W–Ir mixed permanent modifier.

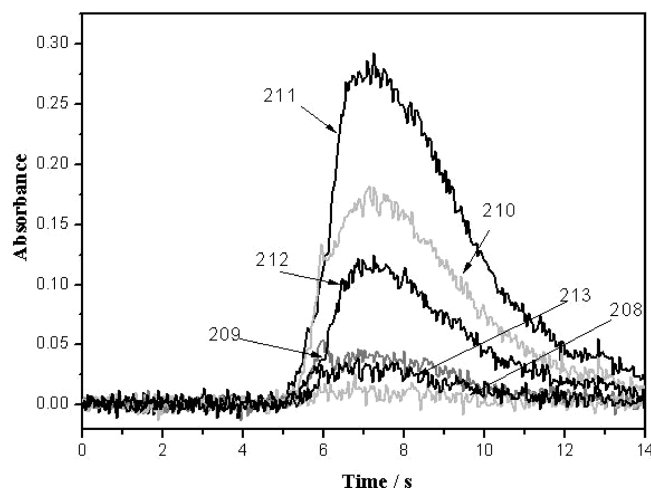


Figure 2. Transient absorbance signals measured for BCR CRM 142 (Light Sandy Soil) at pixels 208–213 in the vicinity of the secondary iron line at 228.725 nm (pixel 211); pyrolysis temperature, 700 °C; atomization temperature, 2600 °C; W–Ir mixed permanent modifier; sample mass, 0.043 mg.

analyzed, and a three-dimensional analyte addition technique (21). However, if the literature about SS–GF AAS of the last 15–20 years is consulted, the vast majority of determinations have actually been carried out using aqueous standards for calibration (13, 21), which is mostly due to the uncompromising use of the stabilized temperature platform furnace concept (22). The main components of this concept are (i) atomization from a L'vov platform, (ii) integration over the peak area, (iii) the use of a chemical modifier and (iv) efficient background correction. The latter one was always the weak link in conventional AAS, a problem that has been finally solved with the introduction of HR-CS GF AAS, which also reflects in the publications about direct solid sampling using aqueous standards for calibration (13).

Calibration against aqueous standards has therefore been investigated in this work as well, as it is without doubt the most convenient approach for a screening procedure. The linearity assessment was based on the methodology described by Souza et al. (23) The calibration curves have been prepared, with concentration levels of 1, 3, 5, and $7\ \mu\text{g L}^{-1}$ Cd (corresponding to 10, 30,

50, 70 pg of Cd), and 1, 2, 4, and 6 mg L⁻¹ Fe (corresponding to 10, 20, 40, and 60 ng of Fe) for the determination of Cd in beans and soil and the determination of Fe in bean samples; for the determination of Fe in soil samples, calibration curves have been prepared with concentrations of 20, 50, 100, 200, and 400 mg L⁻¹ Fe (corresponding to 200, 500, 1000, 2000, and 4000 ng of Fe). The linearity has been tested by examining a plot of residuals produced by linear regression of the response on the concentration in an appropriate calibration set. The statistic test (Ryan–Joiner, Levene, Durbin–Watson) has been carried out by comparing the lack-of-fit variance with that due to pure error, which confirmed the linearity of the calibration curves for Cd and Fe (24).

Two CRM have been used to validate the method, BCR CRM 191, Brown Bread, and BCR CRM 142, Light Sandy Soil. The results, which are shown in **Table 3**, clearly confirm that aqueous standards can be used for this kind of analysis, giving results that are within the 95% confidence interval of the certified values. The only concern might be the precision of the iron determination in soil, which exhibits high uncertainty. This is without doubt due to the very small sample size of typically <0.1 mg used for these determinations and to the natural inhomogeneity of the iron distribution in soil samples.

3.3. Figures of Merit. The figures of merit of the method have been established using aqueous calibration standards and are summarized in **Table 4**. The data are in part different for bean and soil samples, at least in concentration, as the data for beans have been based on an average sample mass of 0.5 mg, whereas those for soil are calculated for 0.07 mg of sample. For the analysis of real samples, however, lower or higher masses have been used, depending on the actual analyte concentrations. All measurements of Cd and Fe in the bean samples are based on the PVSA of three pixels ($A_{\Sigma 3, \text{int}}$) around the line core. The measurements of Cd in soil samples are based on the same principle, whereas those for Fe in soil samples are based on the summation of the integrated absorbance measured at two side pixels (209 + 213; refer to **Figure 2**) that are located at the two line wings ($A_{\Sigma \pm 2, \text{int}}$) symmetrically to the line center. Two calibration curves of significantly different inclination have been obtained in this case for low and high iron concentrations, respectively, as has been described previously (20).

Table 3. Results Obtained for the Determination of Cd and Fe in BCR CRM 191 (Brown Bread) and BCR CRM 142 (Light Sandy Soil) Using the Proposed Procedure and Aqueous Standards for Calibration ($n = 5$)

CRM	Cd/mg kg ⁻¹		Fe/g kg ⁻¹	
	certified	found	certified	found
BCR 191	0.028 ± 0.002	0.025 ± 0.002	0.0407 ± 0.0024	0.0410 ± 0.0086
BCR 142	0.25 ± 0.09	0.24 ± 0.07	28.0 ^a	27.9 ± 5.9

^a Expressed as Fe₂O₃

The limit of detection (LOD) was calculated according to the 'zero mass response' (25) as three times the standard deviation of the signal obtained for 10 repetitive atomization cycles with an empty SS platform, only containing the modifier. The LOD was 2.0 μg kg⁻¹ for Cd and 4.5 mg kg⁻¹ for Fe in the bean samples, and 14 μg kg⁻¹ for Cd and 170 mg kg⁻¹ for Fe in the soil samples, respectively. The limit of quantification (LOQ) is defined as ten times the standard deviation, using the same measurements as for the LOD.

The characteristic mass (m_0), which is defined as the analyte mass that gives a PVSA of 0.0044 s, has been determined in this work as 0.7 pg for Cd, which is in agreement with literature data; the characteristic mass found for Fe was 1.0 ng using the PVSA of three pixels and 2.0 ng for sum of the pixel 209 and 213; no values could be found in the literature for this line for comparison.

The precision is defined as the closeness of agreement between independent test results under stipulated conditions (26). In this work precision is expressed as relative standard deviation (% RSD) of five replicate measurements of a CRM (refer to **Table 3**). The RSD values were between 4% and 7% for Cd and between 5% for Fe in the bread CRM and 28% in soil CRM. The significantly higher RSD for Fe in soil is most likely due to the very small sample mass used for this determination and the inhomogeneous distribution of iron in the investigated CRM.

3.4. Analysis of Real Samples. The proposed method has been used for the simultaneous determination of cadmium and iron in bean and soil samples from different regions of Brazil; the results of the investigation, using aqueous standards for calibration, are shown in **Table 5**. The concentration of cadmium in most of the bean samples, except for two, was below 2 μg kg⁻¹, a value that is

Table 5. Results Obtained for the Determination of Cadmium and Iron in Bean and Soil Samples Using SS–HR–CS GF AAS and Aqueous Standards for Calibration^a

state	type	beans		soil	
		Cd/μg kg ⁻¹	Fe/mg kg ⁻¹	Cd/μg kg ⁻¹	Fe/g kg ⁻¹
Amazonas	brown	10 ± 1	57 ± 10	315 ± 54	67 ± 22
	black	24 ± 6	80 ± 6		
Pará	brown	<2	57 ± 6	<14	4.7 ± 1.6
Ceará	brown	<2	61 ± 6	30 ± 6	78 ± 16
Goiás	white	<2	99 ± 16	57 ± 8	>200
Mato Grosso do Sul	brown	<2	127 ± 28	24 ± 1	47 ± 10
Minas Gerais	brown	<2	104 ± 13	<14	133 ± 63
	brown	<2	117 ± 19		
Paraná	black	<2	103 ± 12	28 ± 1	87 ± 36
Santa Catarina	black	<2	111 ± 21	62 ± 4	11 ± 2
	brown	<2	69 ± 13	14 ± 5	<0.5
Rio Grande do Sul	black	<2	161 ± 21	40 ± 6	118 ± 44
	brown	<2	159 ± 16		

^a For details refer to the text.

Table 4. Figures of Merit for the Simultaneous Determination of Cd and Fe by SS–HR–CS ET AAS at 228.802 and 228.726 nm, Respectively^a

parameter	beans ^b		soil ^c		
	Cd	Fe	Cd	Fe	
calibration range	10–70 pg/1–7 μg L ⁻¹	10–60 ng/1–6 mg L ⁻¹	10–70 pg/1–7 μg L ⁻¹	20–200 ng/2–20 mg L ⁻¹	200–4000 ng/20–400 mg L ⁻¹
analytical curve	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0058m_{\text{Cd}} + 0.0092$	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0046m_{\text{Fe}} + 0.0019$	$A_{\Sigma 3, \text{int}} = 0.0058m_{\text{Cd}} + 0.0092$	$A_{\Sigma \pm 2, \text{int}} = 0.0021m_{\text{Fe}} + 0.0353$	$A_{\Sigma \pm 2, \text{int}} = 0.0008m_{\text{Fe}} + 0.2451$
R	0.9998	0.9998	0.9998	0.9991	0.9985
m_0	0.7 pg	1.0 ng	0.7 pg	2.0 ng	6 ng
LOD	1.0 pg/2.0 μg kg ⁻¹	2.2 ng/4.5 mg kg ⁻¹	1.0 pg/14 μg kg ⁻¹	12 ng/170 mg kg ⁻¹	nd ^d
LOQ	3.0 pg/6.0 μg kg ⁻¹	7.5 ng/15 mg kg ⁻¹	3.0 pg/43 μg kg ⁻¹	40 ng/570 mg kg ⁻¹	nd ^d

^a For details refer to the text. ^b Calculated for an average sample mass of 0.5 mg. ^c Calculated for an average sample mass of 0.07 mg. ^d nd = not determined; conditions used for high analyte concentrations only.

well below the limits established by the *Codex Alimentarius* (0.2 mg kg^{-1}) and the Brazilian National Health Surveillance Agency—ANVISA (1.0 mg kg^{-1}) (27). It is interesting to note that the only cadmium concentrations above the LOQ were found in beans that had been grown on a soil the cadmium content of which was about an order of magnitude above the average for all the other soils. This suggests a direct correlation between the cadmium content in soil and in beans, although the number of samples analyzed here is clearly too small to allow any statistical comparison. The values obtained for cadmium in soil samples were between < 14 and $315 \mu\text{g kg}^{-1}$, with an average around $31 \mu\text{g kg}^{-1}$, not considering the soil from Amazonas. These values are well below those found ($< 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$), and the limits established (3.0 mg kg^{-1}) for agricultural soils in Europe (28). The cadmium concentration in Brazilian soil is related to various factors, such as organic matter, pH, CaCO_3 , that influence absorption and retention of this element (5).

The content of iron in beans ranged from 57 mg kg^{-1} to 159 mg kg^{-1} . According to Embrapa the amount of iron in beans should be approximately 76 mg kg^{-1} , which corresponds to 29% of women's daily needs and 55% of men's needs (29). Hence, we can say that the beans produced in Brazil do have a sufficiently high iron content, which is in contrast to many grain products, which do not provide a sufficient iron supply (11). The iron content in the investigated soils ranged from $< 0.5 \text{ g kg}^{-1}$ to 133 g kg^{-1} . The high concentration of iron, in the soil samples, has been according to expectation because of the reddish color of most of the samples, characteristic of the iron oxide. There appears to be no correlation between the iron content in the soil that varied by more than 2 orders of magnitude, and that in the beans grown on that soil, which varied by less than a factor of 3. This means that the iron uptake by the plants is regulated by a mechanism that is independent of the iron content in the soil and that also assures sufficient iron content in the beans in case the soil is low in iron.

LITERATURE CITED

- Beach, J.; Tume, P.; Longan, L.; Revert, F.; Bech, J.; Tume, L.; Tempio, M. Concentration of Cd, Cu, Pb, Zn, Al, and Fe in soils of Manresa, NE Spain. *Environ. Monit. Assess.* **2008**, *14*, 257–266.
- World Health Organization. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives Series: 59*; IPCS-International Programme on Chemical Safety: Geneva, 2008. <http://www.codexalimentarius.net>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Top 20 Hazardous Substances from the CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.
- Mirlean, N.; Roisenberg, A. The effect of emissions of fertilizer production on the environment contamination by cadmium and arsenic in southern Brazil. *Environ. Pollut.* **2006**, *143*, 335–340.
- De Matos, A. T.; Fontes, M. P. F.; Da Costa, L. M.; Martinez, M. A. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristic of Brazilian soils. *Environ. Pollut.* **2001**, *111*, 429–435.
- Reeves, P. G.; Chaney, R. L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Sci. Total Environ.* **2008**, *398*, 13–19.
- Min, K. S.; Iwata, N.; Tetsutikawahara, N.; Onosaka, S.; Tanaka, K. *Toxicol. Lett.* **2008**, *179*, 48–52.
- Min, K. S.; Ueda, H.; Kihara, T.; Tanaka, K. Increased hepatic accumulation of ingested Cd is associated with up regulation of

- several intestinal transporters in mice fed diets deficient in essential metals. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106*, 284–289.
- Moura, N. C.; Canniatti-Brazaca, S. G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 270–276.
 - Laparra, J. M.; Glahn, R. P.; Miller, D. D. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10999–11005.
 - Dos Santos, L. M. G.; Araujo, R. G. O.; Welz, B.; Jacob, S. C.; Vale, M. G. R.; Becker-Ross, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2009**, *78*, 577–583.
 - Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U. *High-Resolution Continuum Source AAS - The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
 - Welz, B.; Vale, M. G. R.; Borges, D. L. G.; Heitmann, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 2085–2095.
 - Vale, M. G. R.; Damin, I. C. F.; Klassen, A.; Silva, M. M.; Welz, B.; Silva, A. F.; Lepri, F. G.; Borges, D. L. G.; Heitmann, U. Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* **2004**, *77*, 131–140.
 - Silva, A. F.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M.; Klassen, A.; Heitmann, U. Method development for the determination of thallium in coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source high-resolution monochromator and CCD array detector. *Spectrochim. Acta, Part B* **2004**, *59*, 841–850.
 - Heitmann, U.; Welz, B.; Borges, D. L. G.; Lepri, F. G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **2007**, *62*, 1222–1230.
 - Raposo Júnior, J. L.; De Oliveira, S. R.; Caldas, N. M.; Gomes Neto, J. A. Evaluation of alternate lines of Fe for sequential multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in soil extracts by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 198–202.
 - Dittert, I. M.; Silva, J. S. A.; Araujo, R. G. O.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Becker-Ross, H. Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **2009**, *64*, 537–543.
 - Dittert, I. M.; Silva, J. S. A.; Araujo, R. G. O.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Becker-Ross, H. Simultaneous determination of cobalt and vanadium and their volatile fractions in crude oil using direct analysis by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, accepted for publication September 30, 2009.
 - Welz, B.; Santos, L. M. G.; Araujo, R. G. O.; Jacob, S. C.; Vale, M. G. R.; Becker-Ross, H. Unusual calibration curves observed for iron using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B*, accepted for publication September 28, 2009.
 - Vale, M. G. R.; Oleszczuk, N.; Dos Santos, W. N. L. Current status of direct sampling for electrothermal atomic absorption Spectrometry - A critical review of the development between 1995 and 2005. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41*, 377–400.
 - Slavin, W.; Manning, D. C.; Carnrick, G. R. The stabilized temperature platform furnace. *At. Spectrosc.* **1981**, 137–145.
 - Souza, S. V. C.; Lima, J. A.; Teodoro, J. C.; Junqueira, R. G. In-house validation of a multi-residue method for determining residual avermectin in cow's milk by HPLC coupled with fluorescence detection. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 823–836.
 - Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed.; Ellis Harwood Ltd: England, 1998.

- (25) Kurfürst, U. In *Solid sample analysis – Direct and slurry sampling using GF AAS and ETV-ICP*; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 1998; pp 115-116.
- (26) Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999.
- (27) BRASIL. Decreto n° 55871, de 26 de março do 1965. Modifica o Decreto n° 50040, de 24 de Janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimento, alterado pelo Decreto n° 691 de 13 de Abril de 1962. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 abr. 1965.
- (28) Gonzaga, B. I. *Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-brasil*; Universidade de São Paulo, Brazil, 2002.

- (29) <http://www.cnparf.embrapa.br/parperfeito/feijao/composicao.htm>, accessed in April 2009.

Received July 20, 2009. Revised manuscript received September 9, 2009. Accepted September 14, 2009. The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. L.M.G.d.S. has a scholarship from CAPES, and R.G.O.A., B.W. and M.G.R.V. have research scholarships from CNPq. The authors are also grateful to Analytik Jena AG for the donation of the prototype HR-CS GF AAS equipment.