

Mauana Schneider da Silva

**DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CROMO EM AMOSTRAS  
LIPÍDICAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA  
E ATOMIZAÇÃO EM FORNO DE GRAFITE**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestra em Química  
Orientador: Prof. Dr. Bernhard Welz

Florianópolis  
2016



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Mauana Schneider da  
Determinação de cádmio e cromo em amostras lipídicas por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite / Mauana Schneider da Silva ; orientador, Bernhard Welz - Florianópolis, SC, 2016.  
62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Química analítica instrumental. 3. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. 4. Determinação de cádmio e cromo. I. Welz, Bernhard. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



SUBSTITUIR PELA FOLHA DE APROVAÇÃO



Dedico este trabalho a todos aqueles  
que nunca desistem, mesmo quando  
parece impossível.



Tudo aquilo que o homem ignora, não existe  
para ele. Por isso o universo de cada um, se  
resume no tamanho de seu saber.  
(Albert Einstein)



## AGRADECIMENTOS

O mestrado é mais que um diploma, mais que um título, é um processo que envolve um grande aprendizado e crescimento pessoal. Onde o aluno passa de sujeito passivo ao sujeito ativo de sua produção científica, não apenas no processo da construção da dissertação, mas na construção de sua formação profissional como um todo. Este processo de, aos poucos, tornar-se independente, só é possível na presença de pessoas dispostas a ajudar nos momentos em que apenas “você” não é o suficiente. A estas pessoas, ofereço meus sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Bernhard Welz, que não apenas me mostrou o caminho durante o mestrado, mas também foi minha inspiração e um exemplo de profissional. A este que foi muito mais que um Professor, meu “muito obrigada” por compartilhar comigo seus conhecimentos e pelas horas dedicadas a mim com tanto zelo e carinho.

Aos amigos do CroMaas, que transformam o laboratório em um ambiente descontraído e cheio de energia positiva, e que suportaram bravamente os momentos de pirólise e atomização do óleo de peixe. Obrigada a todos que compartilharam o cheiro de tainha frita. Que as próximas gerações de pesquisadores cultivem a amizade que cultivamos e cultivaremos. Agradeço em especial ao Edinho pela parceria na execução deste trabalho, pelas horas de diversão e pelos conselhos nas horas difíceis. Ao Ivan e a Dai que sempre me auxiliaram quando precisei. Ciência não se faz sozinho, e eu aprendi isto com vocês.

Agradeço aos Professores do Departamento de Química da UFSC, pelas horas dedicadas na formação de profissionais, tanto na graduação quanto na pós-graduação. Ao CNPq e ao INCT pelo auxílio financeiro, que permitiu a execução deste trabalho com rapidez e qualidade.

Ao meu querido Xande e à minha pequena Natalie, pela paciência e suporte diários, que me permitiram chegar até aqui. Nada vale a pena se não for com vocês e por vocês. Meus agradecimentos eternos.



## RESUMO

O presente trabalho trata sobre um método simples para a determinação de cádmio e cromo em amostras lipídicas por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite. O método desenvolvido tem como principal objetivo permitir a determinação destes elementos traço em amostras de óleo de peixe, uma vez que este projeto faz parte de uma série de estudos em parceria com uma indústria do ramo de suplementos de OMEGA-3. O método desenvolvido apresenta como principais características: simplicidade no preparo da amostra, facilidade no manuseio e alta frequência analítica, uma vez que foi desenvolvido para ser aplicado em um grande volume de amostras. O preparo de amostra se dá pela simples diluição em 1-propanol. Foram utilizados tubos de grafite recobertos de platina e adição de paládio como modificador químico para a determinação de cádmio enquanto para a determinação de cromo não foi utilizado modificador químico permanente ou em solução. A exatidão do método foi avaliada pela comparação com os resultados obtidos por digestão assistida em micro-ondas, apresentando resultados concordantes com este método alternativo de preparo de amostra. Além de amostras de óleo de peixe, foram quantificadas as concentrações de cádmio e cromo em outras matrizes lipídicas como manteiga de leite e manteiga de cacau. Para cádmio, os limites de detecção e quantificação foram de 0,5 pg e 1,5 pg, respectivamente, a faixa de trabalho foi de 1,5 a 330 pg de cádmio com um coeficiente linear de 0,998. Para cromo, os limites de detecção e quantificação para o método proposto foram de 7 pg e 23 pg, respectivamente; a faixa linear foi de 23 a 1080 pg de cromo, com um coeficiente linear de 0,999.

**Palavras-chave:** Espectrometria de absorção atômica. Cádmio. Cromo.



## ABSTRACT

This work presents a simple method to determine cadmium and chromium in lipid samples in graphite furnace by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. The aim of the developed method is the determination of these trace elements in fish oil samples, since this project is part of a series of studies in partnership with an OMEGA-3 supplements industry. The method developed has the following main characteristics: simplicity of sample preparation, ease of handling and high frequency rate, once it has been developed to be applied in a large volume samples. The samples were prepared by dilution with 1-propanol. For cadmium determination a platinum coated graphite tube and palladium as chemical modifier were used. For chromium determination, no chemical permanent modifier or in solution was employed. The method was evaluated by the comparison with microwave-assisted digested samples, showing a good agreement with this alternative sample preparation. In addition, the concentrations of cadmium and chromium in butter and cocoa butter were measured. For cadmium, the limits of detection and quantification for the developed method were 0.5 pg and 1.5 pg respectively, the working range was 1.5 to 330 pg cadmium with a linear coefficient of 0.998. For chromium, the limits of detection and quantification for the developed method were 7 pg and 23 pg respectively, the working range was 23 to 1080 pg chromium with a linear coefficient of 0.999.

**Keywords:** Atomic absorption spectrometry. Cadmium. Chromium.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Esquema do equipamento de espectrometria de alta resolução com fonte contínua. 1) fonte de radiação 2) espelhos elipsoidais 3) atomizador 4) fenda de entrada do monocromador 5) espelhos parabólicos 6) prisma Littrow 7) espelhos de deflexão e fenda intermediária 8) rede echelle 9) detector CCD (adaptado de WELZ, 2005). 32

**Figura 2** - Curvas de pirólise e atomização para 10 pg de cádmio. (●) sem modificador; durante pirólise,  $T_{at} = 1400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (▲) 400  $\mu\text{g}$  de platina como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (■) 400  $\mu\text{g}$  de irídio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 40

**Figura 3** - Curvas de pirólise e atomização utilizando 30  $\mu\text{L}$  de solução de óleo de peixe em 1-propanol. (■) 400  $\mu\text{g}$  de irídio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (▲) 400  $\mu\text{g}$  de platina como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 42

**Figura 4** - Curvas de pirólise e atomização para os modificadores químicos utilizando 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol e tubo recoberto com platina, como modificador permanente. (■) sem modificador químico; pirólise  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (★) 15  $\mu\text{g}$  / 10  $\mu\text{g}$  de paládio e magnésio como modificador químico em solução; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 10  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador químico em solução; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 43

**Figura 5** - Curvas de pirólise e atomização para modificadores químicos em solução utilizando 10 pg de cádmio e tubo recoberto por platina. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (★) 15  $\mu\text{g}$ /10  $\mu\text{g}$  de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 10  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 44

**Figura 6** - Curvas de pirólise e atomização utilizando 200 pg de cromo. (◆) 400  $\mu\text{g}$  de zircônio como modificador permanente; durante pirólise,

$T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (■) sem modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 400  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 46

**Figura 7** - Curvas de pirólise e atomização para cromo, utilizando 30 $\mu\text{L}$  de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol. (■) sem modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 400  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (◆) 400  $\mu\text{g}$  de zircônio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 47

**Figura 8** - Curvas de pirólise e atomização de cromo utilizando 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol em tubo sem modificador permanente. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; atomização  $T_{pir}=1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (★) 15  $\mu\text{g}/10\text{ } \mu\text{g}$  de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; atomização  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 10  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 48

**Figura 9** - Curva de pirólise e atomização utilizando 200 pg de cromo em tubo sem modificador permanente. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (★) 15  $\mu\text{g}/10\text{ } \mu\text{g}$  de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (►) 10  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Preparo da amostra.	37
<b>Tabela 2</b> - Programa de temperatura e pressão para digestão assistida em micro-ondas.	38
<b>Tabela 3</b> - Programa de temperatura para cádmio utilizando platina como modificador químico permanente e paládio como modificador químico em solução.	45
<b>Tabela 4</b> - Programa de temperatura para cromo sem modificador químico permanente ou em solução.	50
<b>Tabela 5</b> - Resumo dos parâmetros otimizados para o método proposto para determinação de cádmio e cromo em amostras lipídicas.	50
<b>Tabela 6</b> - Parâmetros de mérito do método desenvolvido para determinação de cádmio e cromo.	51
<b>Tabela 7</b> - Resultados obtidos para cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe, manteiga de cacau e manteiga de leite.	52



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica (atomic absorption spectrometry).
<b>ASV</b>	Voltametria de redissolução anódica (anodic stripping voltametry).
<b>CCD</b>	Dispositivo de carga acoplada (charge coupled device).
<b>F AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica em chama (flame atomic absorption spectrometry).
<b>GF AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (graphite furnace atomic absorption spectrometry).
<b>HR-CS AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry).
<b>IARC</b>	Agência internacional de pesquisas em câncer (international agency of reseach on câncer).
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (inductively coupled plasma mass spectrometry).
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (inductively coupled plasma optical emission spectrometry).
<b>LOD</b>	Limite de detecção (limit of detection).
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação (limit of quantification).
<b><math>m_0</math></b>	Massa característica.
<b>MW</b>	Digestão assistida por micro-ondas (microwave assisted digestion).
<b>PGM</b>	Modificadores do grupo da platina (platinum group modifiers).
<b>R</b>	Coefficiente de correlação linear.
<b>STPF</b>	Forno com plataforma e temperatura estabilizada (Stabilized Temperature Platform Furnace).
<b>T (°C)</b>	Temperatura em graus Celsius.
<b><math>T_{at}</math></b>	Temperatura de atomização.
<b><math>T_{pir}</math></b>	Temperatura de pirólise.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	25
1.1	Óleo de peixe e OMEGA-3.....	25
1.2	Cádmio.....	27
1.3	Cromo .....	27
1.4	Métodos para determinação de cádmio e cromo.....	28
1.4.1	Controle das concentrações de cádmio em alimentos e suplementos alimentares .....	28
1.4.2	Controle das concentrações de cromo em alimentos e suplementos alimentares.....	29
1.4.3	Métodos propostos para determinação de cádmio e cromo em alimentos e suplementos alimentares .....	29
1.5	Espectrometria de absorção atômica.....	30
1.5.1	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha.....	31
1.5.2	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.....	31
1.6	Modificadores químicos.....	33
2	OBJETIVOS .....	35
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos.....	35
3	METODOLOGIA .....	36
3.1	Instrumentação .....	36
3.2	Reagentes e amostras .....	36
3.3	Recobrimento do tubo de grafite.....	37
4	Resultados e Discussão .....	39
4.1	Estudo do preparo da amostra .....	39
4.2	Otimização das temperaturas de pirólise e atomização.....	39
4.2.1	Cádmio.....	39
4.2.2	Cromo .....	45
4.3	Desempenho do método analítico .....	51
4.4	Verificação da exatidão e aplicação do método .....	52
5	CONCLUSÕES .....	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ÓLEO DE PEIXE E OMEGA-3

Peixes são uma parte importante da alimentação diária de pessoas de várias culturas ao redor do mundo. Apenas nos Estados Unidos, 2,2 bilhões de toneladas de peixes são consumidos anualmente [1]. Estes são fonte de proteínas, minerais e ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos são compostos orgânicos formados por uma cadeia de hidrocarboneto e um grupo carboxila, podendo estes ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados. São conhecidos como ácidos graxos essenciais, o grupo de ácidos graxos poli-insaturados ou monoinsaturados que o corpo humano não é capaz de sintetizar, sendo necessária a obtenção através do consumo de alimentos ricos nestes compostos [2]. OMEGA-3 são uma categoria de ácidos graxos essenciais poli-insaturados [3] e assim são chamados devido à insaturação no terceiro átomo de carbono contado à partir da extremidade não-carboxílica.

O consumo de peixe a principal fonte de OMEGA-3 para os seres humanos [2]. Sendo altamente recomendado a ingestão de ao menos duas porções semanais de peixes para se obter os benefícios deste ácido graxo essencial [4]. O OMEGA-3 entra na cadeia trófica a partir dos fitoplânctons e os animais que se alimentam destes, têm em sua estrutura grandes quantidades de OMEGA-3, sendo os peixes das famílias *Scombridae* (atum, cavala e serra), *Clupeidae* (sardinha e arenque) e *Salmonidae* (salmão e truta) os que possuem maior teor de ácidos graxos essenciais por porção [2]. O consumo em quantidades apropriadas de OMEGA-3 apresenta propriedades capazes de prevenir acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas [5], aumento no apetite [6], além de prevenir mal súbitos, ataques do coração, hipertensão [7] e cólicas menstruais [8].

Embora sejam alimentos riquíssimos em ácidos graxos de cadeias longas, os peixes e os alimentos à base de frutos do mar podem ser veículos de contaminação por metais-traço tóxicos, uma vez que ocorre a biomagnificação destes [9]. O controle das concentrações destes metais, tais como cádmio, chumbo, cromo, mercúrio, além de organoclorados em carne de peixe são de extrema preocupação [10].

Amplamente vendido em farmácias e lojas de suplementos alimentares, os suplementos à base de óleo de peixes podem ser encontrados na forma de óleos refinados, cápsulas ou até mesmo tabletes. Conhecidos popularmente como “cápsulas/tabletes de

OMEGA-3”, uma vez que suplementam o consumo deste ácido graxo, são uma alternativa para se obter os benefícios do consumo da carne de peixe sem o risco da contaminação por metais tóxicos [2].

Visando obter os benefícios do OMEGA-3, a utilização de óleo de peixe na produção de alimentos funcionais tem se mostrado bastante efetiva. A adição de OMEGA-3 tem se tornado comum na produção de pães, leite, iogurte e no preparo de ovos [11]. O enriquecimento de alimentos é uma alternativa ao consumo das cápsulas de óleo de peixe, já que estas costumam ser difíceis de ser engolidas, principalmente por crianças. Pessoas que não se alimentam de produtos de origem bovina também se beneficiam deste enriquecimento de alimentos com OMEGA-3. As cápsulas utilizadas nos medicamentos e também nos suplementos são feitas de gelatina, que por sua vez, tem origem bovina.

A extração de óleo de peixe data de séculos atrás, quando eram utilizados como combustível em lampiões. Várias patentes foram registradas, sempre visando obter maiores rendimentos e extraíndo com uma maior qualidade o óleo de peixe. O método mais empregado atualmente consiste em várias etapas, começando pelo cozimento dos peixes, que coagula as proteínas, quebra os depósitos de gordura e libera o óleo para a extração. Após o cozimento o material é prensado e/ou centrifugado, para remover boa parte da fração líquida presente na massa de peixe cozido. Ao retirar todo o líquido, a parte lipídica é então separada da água por evaporação [12]. Este método, embora simples, permite a utilização do óleo de peixe como suplemento alimentar, por não utilizar reagentes tóxicos para o ser humano. Outros métodos utilizando fluidos supercríticos, enzimas e solventes orgânicos também são empregados na extração do óleo de peixe, porém o óleo extraído por estas técnicas não é utilizado para fins alimentícios [2].

O óleo bruto extraído do peixe é uma mistura de ácidos graxos, pigmentos, esteróides, glicerídeos, fosfolipídeos e ocasionalmente, contaminantes como os metais tóxicos e compostos organoclorados. Portanto, é necessário um processo de refinamento do óleo de peixe para a remoção de todos os compostos que possam vir a causar danos à saúde, além de apresentarem características organolépticas indesejáveis ao produto final [2]. A separação de fosfolipídeos e de compostos cerosos é feita pela centrifugação do óleo com uma fase aquosa; a desacidificação, ou neutralização de ácidos graxos livres também é necessária; além da etapa de branqueio, que remove pigmentos e metais e a etapa de desodorização, removendo compostos que causam o cheiro característico de peixe [13]. Ao final deseja-se obter um óleo refinado

que se apresente límpido, sem cheiros que torne seu consumo mais palatável e principalmente, sem a presença de metais tóxicos.

## 1.2 CÁDMIO

Dentre os metais tóxicos comumente encontrados em alimentos de proveniência marinha, o cádmio está entre os mais danosos ao organismo [14]. Uma vez consumido, o cádmio se acumula no fígado e nos rins, com um tempo de meia-vida biológico entre 10 a 30 anos [15]. Esta residência no organismo, uma vez que não é metabolizado e excretado, causa a bioacumulação e a biomagnificação, podendo estar presente em animais marinhos em concentração até mil vezes maior que na água. A intoxicação por cádmio pode vir a causar disfunções renais e desmineralização dos ossos [15], além de ser apontado como um carcinogênico do Grupo-1 pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) [16]. O cádmio está presente nos alimentos provenientes do mar devido ação antropogênica, ao liberar contaminantes no sistema aquático, uma vez que o oceano é o destino final dos rejeitos domésticos e industriais [17].

Encontrado no meio marinho de baixa salinidade na forma iônica ou como hidróxido e de alta salinidade na forma de cloretos, ao entrar no organismo, acredita-se que se ligue às proteínas e outras moléculas orgânicas, formando sais com ácidos carboxílicos. Embora encontrado em peixes, mamíferos e aves, não se tem nenhuma comprovação que o cádmio tenha alguma função biológica no organismo humano ou em animais. Devido ao alto grau de toxicidade do cádmio, a Comissão Europeia da saúde dos alimentos aconselha o consumo de cádmio semanal máximo de  $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de massa corpórea [15].

## 1.3 CROMO

O cromo é tanto essencial quanto carcinogênico, dependendo do estado de oxidação em que se encontra. Como cromo trivalente, é um elemento-traço essencial para seres humanos e outros seres vivos, uma vez que age regulando o metabolismo de gorduras e a glicose natural. Encontrado em grãos, carnes, peixes, vegetais e cogumelos [18, 19], tem a recomendação de ingestão de 40 a 50  $\mu\text{g}$  por dia [20]. A falta do cromo no organismo pode causar ansiedade e fadiga, além de estar ligado a doenças cardiovasculares e diabetes.

Não há dados sobre a ingestão máxima tolerada de cromo trivalente, uma vez que este possui baixa toxicidade. Apenas

pouquíssimos casos de intoxicação por excesso de cromo foram reportados [21]. Por outro lado, o cromo hexavalente é um agente carcinogênico e mutagênico [22] sendo que a inalação do cromo hexavalente pode causar câncer nos pulmões, sendo então classificado como agente carcinogênico do Grupo-1 pela IARC [23]. Embora o cromo hexavalente possua um alto grau de toxicidade, assim como as outras espécies, com exceção do cromo trivalente, é raramente encontrado em alimentos [19].

Assim como o cádmio, o excesso de cromo no meio marinho é proveniente de ações antropogênicas. Peixes expostos a ambientes contaminados com excesso de cromo e cádmio apresentam uma diminuição na atividade de enzimas que combatem o stress oxidativo [24]. Estudos apontam que o cromo trivalente, encontrado em ambientes marinhos geralmente na forma de óxidos, pode sofrer bioacumulação e o excesso deste na biota marinha pode causar disfunções de crescimento, alteração na taxa de reprodução de sobrevivência no meio marinho [25].

## **1.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CROMO**

### **1.4.1 CONTROLE DAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Para evitar danos causados por intoxicação pelo consumo de alimentos ou suplementos contaminados, o Regulamento (EC) No 488/2014, estabeleceu valores máximos de cádmio permitido em alimentos e suplementos alimentares em  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  [26]. Para garantir a segurança e a exatidão das concentrações de cádmio em alimentos com alto teor de lipídios, a Comissão Europeia de Padrões estipulou uma lista de técnicas para a determinação de cádmio a nível traço. Grande parte dos métodos citados empregam espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) ou em forno de grafite (GF AAS) após calcinação, digestão assistida por micro-ondas ou por pressão, e técnicas utilizando voltametria de redissolução anódica (ASV) [27]. Os padrões britânicos estabelecem como técnica para determinação de cádmio em amostras de suplementos alimentares a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após digestão assistida por pressão [28]. Todos estes métodos padrão são laboriosos e necessitam de um preparo de amostras que envolve altas concentrações de ácido e peróxido de hidrogênio. Além disto, todos os métodos propostos

empregam algum tipo de digestão, sendo este, passível de contaminação, além de consumir tempo do analista.

#### **1.4.2 CONTROLE DAS CONCENTRAÇÕES DE CROMO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Para o controle das concentrações de cromo em alimentos ou suplementos alimentares, a Comissão Europeia para Padronizações, através do Regulamento EN 14082/2003 estabeleceu o uso de calcinação como forma de preparo de amostra, seguido de diluição em meio de ácido clorídrico e aplicado à GF AAS [29]. Novamente, o método padrão depende do emprego de reagentes tóxicos e de manuseio perigoso, além de técnicas laboriosas de preparo de amostra. O emprego da calcinação como preparo de amostra torna inviável o aproveitamento das amostras para determinação de espécies orgânicas ou elementos voláteis.

#### **1.4.3 MÉTODOS PROPOSTOS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CROMO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

O preparo da amostra para posterior análise é um fator determinante para o método a ser desenvolvido. Além de consumir tempo do analista, a etapa de preparo de amostra é crítica quanto ao risco de contaminações e erros instrumentais.

Considerado o “estado da arte”, a digestão assistida em micro-ondas é uma das técnicas de preparo de amostra mais aplicada para a determinação de elementos-traço. Em matrizes complexas, a digestão da amostra pode eliminar interferentes, além de permitir a inserção da amostra em um equipamento onde antes a suspensão ou a análise direta de sólidos eram um fator proibitivo. Para a determinação de 19 metais em níveis traço via espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), Juranovic *et al.* [30] utilizaram a digestão assistida por micro-ondas e compararam com métodos de digestão em bloco com frascos abertos e fechados. Para a maioria dos elementos-traço analisados, incluindo cádmio e cromo, foram obtidos resultados superiores com a utilização da digestão assistida em micro-ondas. Para elementos menos voláteis, a digestão em bloco obteve resultados similares à digestão em sistema fechado e por digestão assistida por micro-ondas. Embora a digestão seja eficiente para a

grande maioria dos analitos, exige uma quantidade alta de ácidos e reagentes oxidantes, além de programas de temperaturas demorados.

Para métodos em que a viscosidade e a tensão superficial não são um parâmetro significativo e que não causam interferências de transporte, o uso de emulsões pode ser empregado para a determinação de elementos-traço em óleos. Gudnuz e Akman [31] utilizaram emulsões e microemulsões para determinar chumbo, cobre, cromo, níquel e cádmio em amostras de óleo comestível por GF AAS. Também utilizando emulsão a partir de EDTA, e associado ao banho de ultrassom, Kara, Fisher e Hill [32] desenvolveram um método para a determinação das concentrações de alumínio, cálcio, cádmio, cobre, magnésio, manganês, níquel, titânio, vanádio e zinco em óleos comestíveis por ICP-MS. As microemulsões reduzem a viscosidade dos óleos, permitindo a injeção por amostradores automáticos, porém dependem de vários reagentes, geralmente um dispersante, ácidos e solventes orgânicos, o que pode acarretar em contaminações, além de exigir uma otimização das concentrações de cada um dos componentes da emulsão.

Em processos onde não há a necessidade da inserção da amostra em fase líquida, a análise direta dos sólidos pode ser empregada. Silva *et al.* [33] determinaram a concentração de cromo em fórmulas infantis por análise direta de sólidos e HR-CS GF AAS. Neste trabalho os autores pesaram as amostras diretamente nas plataformas de grafite, e inseriram no tubo de grafite sem nenhum tratamento prévio. Embora a técnica de análise direta de sólidos não exija muito tempo ou reagentes para o preparo da amostra pode ocorrer problemas envolvendo a heterogeneidade da amostra, o que acarreta em desvios padrão elevados. A técnica se mostra bastante eficiente quando o analito tem volatilidade diferente da matriz. No caso de ambos terem volatilidade parecida, isto poderá causar interferências, devido à alta concentração desta no tubo de grafite. Além destas limitações, a técnica exige um amostrador sofisticado que disponha de uma balança interna ou uma microbalança externa e um software capaz de fazer a normalização das curvas geradas. Atualmente, apenas uma empresa fabrica equipamentos e suprimentos para a análise direta de sólidos, o que é mais um fator limitante para a técnica [34].

## 1.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Alan Walsh [35], na década de 1950, propôs o primeiro modelo de espectrômetro de absorção atômica. Mesmo inicialmente sendo

recebida com descrença por parte dos espectroscopistas da época, a técnica rapidamente ganhou aceitação do meio acadêmico. Dentre os pesquisadores adeptos, Boris L'vov [36] dedicou sua vida a aprimorar a técnica, sendo ele o idealizador do conceito “atomização eletrotérmica”. Outros pesquisadores contribuíram para o sucesso e consolidação da espectrometria de absorção atômica para determinação de metais. Slavin e Manning [37] agregaram confiabilidade à técnica com o conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) que emprega o uso de plataforma, absorvância integrada, tubo de grafite com recobrimento pirolítico, modificadores químicos – em solução ou permanente, aquecimento transversal do tubo e aquecimento a toda potência na etapa de atomização.

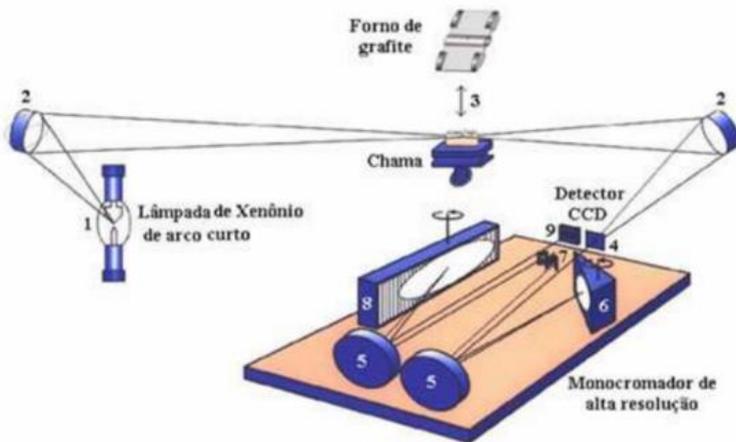
### **1.5.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE DE LINHA**

O equipamento é constituído por uma fonte de radiação, geralmente uma lâmpada de cátodo oco. A radiação então é modulada e incidida sobre a nuvem atômica proveniente da amostra, produzida por um forno de grafite, tubo de quartzo ou chama, que contendo átomos livres do mesmo elemento da lâmpada, irá absorver a energia, e esta diferença, entre a energia incidida e transmitida, irá gerar o sinal analítico. A energia transmitida passa por um monocromador, composto por uma rede de difração, a qual irá separar a linha de interesse das outras emitidas pela lâmpada. A radiação passa por espelhos, que direcionarão a radiação pela fenda de saída, para chegar ao detector, que medirá os sinais fotoelétricos, e, por fim, transmitir a uma interface de comunicação com o analista (computador). A correção de fundo é geralmente efetuada por uma lâmpada de deutério, ou com um sistema de correção baseada em efeito Zeeman, sendo o último, capaz de corrigir efeitos de fundo estruturado, diferente do corretor que utiliza fonte contínua de deutério, capaz apenas de corrigir eventos contínuos, se estes não forem afetados pelo campo magnético [38].

### **1.5.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA**

Embora muito parecido com os equipamentos de AAS convencionais, o instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) se diferencia

principalmente pela fonte de radiação, uma lâmpada de arco-curto de xenônio, com alta pressão, emitindo um contínuo espectral entre 190 a 900 nm e pelo sistema de monocromador duplo. O monocromador conta com um prisma Littrow como pré-dispersor e uma rede de difração echelle, que concede a alta resolução do intervalo espectral, melhor que 2 pm por pixel. O HR-CS AAS também conta com uma lâmpada de neônio, que emite linhas estreitas e intensas, para a correção do posicionamento do prisma e da rede echelle. Para a detecção é utilizado um dispositivo de carga acoplada (CCD) que conta com 588 pixels funcionando de forma independente e simultânea, dos quais, 200 são utilizados para fins analíticos, conforme ilustrado na Figura 1. Desta forma, é capaz de fornecer informações sobre a vizinhança espectral da linha analítica, gerando um gráfico tridimensional, onde a absorvância, o tempo de integração e os comprimentos vizinhos à linha analítica estão relacionados.



**Figura 1** - Esquema do equipamento de espectrometria de alta resolução com fonte contínua. 1) fonte de radiação 2) espelhos elipsoidais 3) atomizador 4) fenda de entrada do monocromador 5) espelhos parabólicos 6) prisma Littrow 7) espelhos de deflexão e fenda intermediária 8) rede echelle 9) detector CCD (adaptado de WELZ, 2005).

Os equipamentos de fonte contínua não dispõem de lâmpadas ou aparatos especiais para a correção de fundo. Uma vez que o sistema de alta resolução e os pixels trabalhando como detectores de forma independente podem fornecer informações precisas sobre a vizinhança

espectral, é possível visualizar a forma como o fundo se apresenta, podendo assim ser tomadas algumas medidas para a sua correção. Para eventos contínuos, ou seja, aqueles que afetam todos os pixels voltados para este fim, o software corrige automaticamente. Também pode ser utilizada a separação temporal do sinal e do fundo, pelo ajuste do intervalo de integração. E para casos de fundo estruturado com sobreposição temporal do espectro, é possível a correção pelo algoritmo de mínimos quadrados – A partir de um espectro previamente identificado, e salvo, o software é capaz de fazer a subtração deste do espectro gerado pela amostra, restando apenas o sinal do analito.

## 1.6 MODIFICADORES QUÍMICOS

Para métodos que utilizam forno de grafite, uma forma de garantir maior estabilidade térmica do analito e uma maior eliminação de interferentes é a utilização de modificadores químicos. Após um processo de recobrimento, ou adicionados à amostra no tubo de grafite, os modificadores químicos auxiliam na retenção do analito em altas temperaturas durante o processo de pirólise, auxiliando na remoção de concomitantes e melhorando a atomização [36]. Algumas matrizes são melhores decompostas pelas atividades catalíticas que ocorrem devido à presença do modificador. Seu emprego pode também aumentar a vida útil do tubo, pois evita a oxidação do carbono, além de não necessitar de temperaturas elevadas na etapa de limpeza, uma vez que evita que o analito forme carbetos refratários [39]. O modificador permanente atua como uma camada seladora do tubo de grafite. Sendo esse um metal cuja solução é injetada no tubo que sofre tratamento térmico, de modo a criar uma camada entre o carbono do tubo e o analito [40].

Modificadores do grupo da platina (PGM) são frequentemente empregados como modificadores permanentes na determinação de cádmio e algumas vezes utilizados na determinação de cromo em matrizes complexas. Acredita-se que PGM intercalam-se na estrutura do tubo após um programa de temperatura, que permite a formação destes compostos com grafite [41]. Todos os PGM interagem com facilidade com a maioria dos metais, formando ligas e compostos intermetálicos com maior ponto de ebulição que no próprio analito, fornecendo estabilidade mesmo quando empregado altas temperaturas de pirólise [42]. Esta estabilização térmica é essencial em análises que envolvem matrizes complexas e orgânicas, uma vez que temperaturas altas na etapa de pirólise são necessárias para a eliminação de interferências. Além da estabilidade térmica, os PGM fornecem uma proteção contra a

oxidação do tubo de grafite, resultando em uma maior vida útil do suprimento e não apresenta fundo [36].

Além dos modificadores químicos permanentes, um modificador químico em solução pode ser adicionado junto à amostra no tubo de grafite. Embora pouco se saiba sobre o comportamento dos modificadores químicos, acredita-se que estes tenham ação catalítica sobre a matriz, facilitando sua eliminação, além de prover maior estabilidade térmica ao analito [39].

A matriz lipídica do óleo de peixe, assim como de outros alimentos e suplementos alimentares gordurosos, podem ser um desafio para a determinação de elementos voláteis, fazendo-se necessário o uso de modificadores permanentes e em solução. A combinação paládio e magnésio é conhecida como “modificador químico universal” [43]. Sua eficácia é comprovada para muitos elementos, sendo comumente empregado nas determinações de cádmio e cromo [44]. Além da combinação paládio e magnésio, outras combinações de paládio com ácidos, e também apenas paládio como modificador químico em solução foram empregadas em vários estudos. Bermejo-Barrera *et al.* [45] estudaram o efeito de paládio e misturas com paládio como modificador químico obtendo bons resultados na determinação de cromo mesmo em altas temperaturas. Assim como Bulska *et al.* [46] obtiveram um acréscimo na sensibilidade e na estabilização da temperatura quando utilizaram paládio como modificador químico na determinação de cádmio.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolvimento de um método rápido, simples e que possa ser aplicado em grande escala para determinação de cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe e outros produtos com alto teor de lipídios.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Definir os parâmetros do programa de temperatura do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua;
- Estudar os modificadores químicos, tanto os permanentes quanto os em solução já mencionados na literatura, comparar seus resultados e selecionar dentre estes, o que melhor se adequa para a determinação de cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe;
- Otimizar as temperaturas de pirólise e atomização para cádmio e cromo;
- Verificar a possibilidade de calibração por padrão aquoso pela comparação com a curva por adição de analito;
- Quantificar amostras de óleo de peixe provenientes dos vários estágios de refinamento do óleo, assim como amostras comerciais de óleo de peixe;
- Comparar os valores obtidos pelo método desenvolvido com o método de preparo por digestão em micro-ondas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as medidas foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua ContrAA 600 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) com forno de grafite de aquecimento transversal. Como fonte de radiação, o equipamento conta com uma lâmpada de xenônio de arco curto de 300 W, operando em modo hot-spot, emitindo um espectro contínuo e intenso para os comprimentos de onda entre 185 e 900 nm; um monocromador duplo de alta resolução, formado por um pré-monocromador prisma e um monocromador de alta resolução com rede echelle. O equipamento também conta com um detector CCD de 588 pixels operando de forma simultânea e independente. Foram utilizados os comprimentos de onda de 228,8058 nm para a determinação de cádmio e 357,8687 nm para a determinação de cromo, sendo monitorada a absorvância integrada no CP  $\pm$  1 pixel. O espectrômetro foi controlado por um computador pessoal com processador “AMD Athlon 64”, 2,21 GHz, operando com o programa de aquisição de dados Aspect CS 2.1.0.0.

Foram utilizados tubos de grafite com recobrimento pirolítico com plataforma PIN integrada (Analytik Jena, Part No. 407-A81.025, Alemanha), recoberto ou não com zircônio, paládio, irídio ou platina 1 g L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e argônio com pureza >99,98% (White Martins, São Paulo, Brasil) como gás de purga. Para o preparo das amostras digeridas foi utilizado um forno de micro-ondas TOPWave IV (Analytik Jena, Alemanha) operando com oito frascos, com controle de temperatura e pressão independentes e sem contato.

#### 3.2 REAGENTES E AMOSTRAS

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada a 18,2 mΩ cm (MegaPure, São Paulo, Brasil). Para o preparo das amostras digeridas, foi utilizado HNO<sub>3</sub> 67% (Fluka, Neu-Ulm, Alemanha) destilado abaixo do ponto de ebulição e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37% (Vetec, Xéren, Brasil) de padrão analítico. As amostras foram preparadas utilizando 1-propanol  $\geq$  99,5% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) de padrão analítico, xileno (Nuclear, Brasil), metilisobutilcetona (Vetec, Diadema, Brasil) e HNO<sub>3</sub> (Fluka, Alemanha). Os padrões aquosos utilizados na otimização do programa de temperatura e curva de calibração foram preparados a partir da solução estoque de cádmio e

cromo  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich). As soluções foram preparadas e homogeneizadas em frascos de polipropileno de 15 mL do tipo Falcon.

Amostras de óleo de peixe bruto foram utilizadas no desenvolvimento do método para cromo e cádmio, respectivamente. O método desenvolvido foi aplicado em amostra de óleo de peixe bruto utilizado na fabricação de ração animal, amostra de óleo de peixe utilizado na produção de cápsulas de OMEGA-3 bruto e em quatro estágios do processo de refinamento (Golden OMEGA, Arica, Chile), além de amostras comerciais de manteiga de leite e manteiga de cacau.

### 3.3 RECOBRIMENTO DO TUBO DE GRAFITE

Dois modificadores permanentes e a ausência de modificadores são comparadas neste trabalho. Para cádmio, irídio e platina foram escolhidos devido à eficácia já comprovada por Bulska *et al.* [46] e Thomaidis *et al.* [47] respectivamente. Para cromo, zircônio e paládio foram escolhidos para este estudo, baseado em trabalhos anteriores [48, 49]. Os tubos de grafite foram então recobertos com  $400 \mu\text{g}$  de irídio, paládio, platina ou zircônio usando uma solução estoque a  $1 \text{ g L}^{-1}$ , em 10 ciclos de  $40 \mu\text{L}$  cada e aplicando o programa de temperatura descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** - Preparo da amostra.

<i>Etapa</i>	<i>T/°C s-1</i>	<i>Rampa /°C s-1</i>	<i>Tempo/s</i>	<i>Gás de purga /L min-1</i>
1	90	5	40	2,0
2	110	1	40	2,0
3	130	1	40	2,0
4	1200	300	25	2,0
5	2100	500	10	0
6	2100	0	5	2,0

Aproximadamente  $1 \text{ g}$  de amostra (óleo de peixe, manteiga bovina ou manteiga de cacau), foram pesadas em frascos de polipropileno e avolumados até  $5 \text{ mL}$  com 1-propanol. As amostras foram manualmente agitadas até completa homogeneização. A amostra também foi preparada na forma de microemulsão, pesando cerca de  $1 \text{ g}$  de amostra e adicionando  $1 \text{ mL}$  de xileno e  $250 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ , a amostra foi levada para o banho de ultrassom por 5 minutos, e após isto, foi

adicionado 1 mL de metilisobutilcetona e avolumado para 5 mL com 1-propanol. Para a verificação da exatidão do método, as mesmas amostras foram digeridas. Foi pesado cerca de 0,5 g de amostra e adicionados 5 mL HNO<sub>3</sub> 37% e 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. As amostras foram submetidas a um programa de digestão assistida em micro-ondas com o programa de temperatura e pressão descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** - Programa de temperatura e pressão para digestão assistida em micro-ondas.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura/°C</i>	<i>Pressão / bar</i>	<i>Rampa/°C s<sup>-1</sup></i>	<i>Tempo/min</i>
1	145	40	2	10
2	170	40	5	5
3	200	40	2	20
4	50	0	0	10
5	50	0	0	1

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO DO PREPARO DA AMOSTRA

Foram estudados dois métodos de preparo de amostra para o óleo de peixe. Um dos métodos utiliza uma microemulsão, sendo esta homogênea e capaz de reduzir a viscosidade das amostras de óleo de peixe. O preparo desta microemulsão foi realizado utilizando método já proposto na literatura [50]. Também foi utilizada apenas a diluição do óleo de peixe com 1-propanol. Ambos os preparos de amostra apresentaram a mesma facilidade de manipulação, reduzindo satisfatoriamente a viscosidade da amostra, o que permitiu a inserção desta no equipamento por meio do amostrador automático. Os métodos também não apresentaram divergências quanto a sensibilidade e desvio padrão. Desta forma, visando não só a praticidade do método a ser desenvolvido, quanto um menor risco de contaminação, foi adotado para os demais estudos e para a determinação dos metais tanto em óleo de peixe quanto nas outras amostras lipídicas, apenas a diluição em 1-propanol.

### 4.2 OTIMIZAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

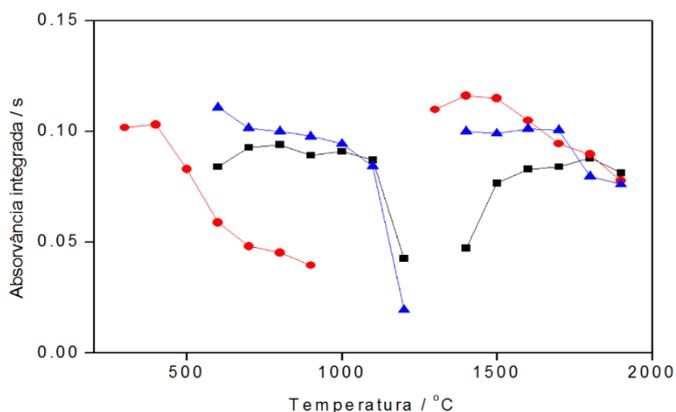
#### 4.2.1 CÁDMIO

O estudo dos modificadores permanentes foi iniciado pelo estudo do comportamento térmico de uma solução aquosa de cádmio a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Foram comparados os resultados obtidos utilizando tubos recobertos por platina ou irídio e comparados ao tubo sem o recobrimento por modificadores permanentes. Os resultados obtidos nesta investigação são mostrados na Figura 2.

Quando nenhum modificador químico permanente foi empregado, melhores resultados foram obtidos nas temperaturas de pirólise e atomização de  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $1400 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente. Estes resultados encontrados são coerentes com os mencionados na literatura. Bulska *et al.* [46] descreveu perdas a partir de  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  na etapa de pirólise, quando nenhum modificador foi empregado. Já para o tubo recoberto com platina, além do acréscimo na sensibilidade quando comparado ao tubo sem recobrimento, houve um acréscimo na estabilidade térmica, sendo que o analito se apresentou termicamente estável até  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ , e obteve uma maior resposta analítica quando foram

empregadas temperaturas de pirólise e atomização de 600 °C e 1600 °C respectivamente. Os resultados foram coerentes com o encontrado por Thomaidis *et al.* [47] que relataram maior sensibilidade quando temperaturas de pirólise de 650 °C foram empregadas, utilizando platina como modificador químico permanente. Já para o tubo recoberto com irídio, também houve um acréscimo na sensibilidade e na estabilidade térmica do cádmio, quando comparado ao tubo sem recobrimento, além de não apresentar perdas significativas em temperaturas de pirólise de até 1000 °C. Os melhores resultados foram obtidos quando as temperaturas de pirólise e atomização foram de 800 °C e 1800 °C respectivamente. Os resultados obtidos para o tubo recoberto com irídio estão em concordância com o relatado por Silva *et al.* [51].

Neste estudo foi possível observar uma maior sensibilidade quando se utilizou platina como modificador químico permanente. O estudo dos modificadores químicos permanentes em padrão aquoso servirá para comparação com o estudo dos modificadores químicos utilizando amostra de matriz lipídica, que será discutido adiante.



**Figura 2** - Curvas de pirólise e atomização para 10 pg de cádmio. (●) sem modificador; durante pirólise,  $T_{at} = 1400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 400$  °C. (▲) 400 µg de platina como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 800$  °C. (■) 400 µg de irídio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 800$  °C.

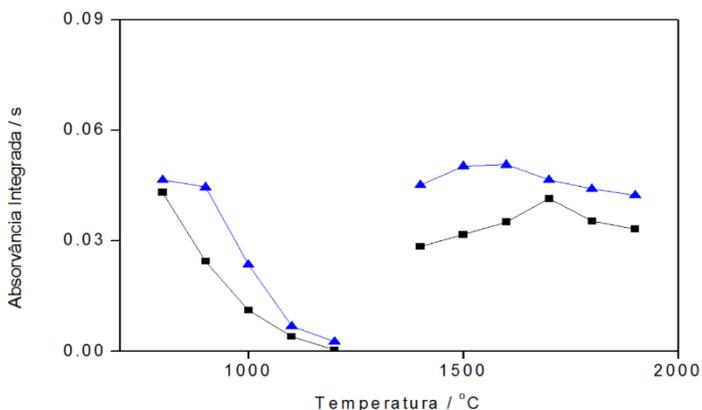
A determinação de metais em matrizes orgânicas complexas demanda etapas de pirólise em altas temperaturas e de longa duração.

Para a determinação de metais-traço em amostras de óleo de peixe, temperaturas de pirólise abaixo dos 800 °C se mostraram inadequadas para a eliminação satisfatória da matriz, causando fumaça durante a etapa de atomização. Uma vez que temperaturas abaixo dos 800 °C são proibitivas, os estudos sem modificadores permanentes para a determinação de cádmio foram descontinuados, já que as perdas do analito durante a etapa de pirólise são significantes acima de 400 °C.

Para investigar o comportamento térmico do cádmio na amostra, o mesmo estudo de modificadores foi procedido, utilizando uma solução de óleo de peixe diluído em 1-propanol e os resultados estão exibidos na Figura 3. Quando platina foi empregada como modificador químico permanente, a mais alta sensibilidade foi alcançada quando as temperaturas de pirólise e atomização de 800 °C e 1600 °C respectivamente, foram empregadas. Já para irídio como modificador químico permanente, embora não tenha apresentado um aumento de sensibilidade superior ao da platina, apresentou boa estabilidade térmica, e os melhores resultados foram obtidos quanto temperaturas de pirólise e atomização de 800 °C e 1700 °C respectivamente, foram empregadas.

Os resultados obtidos com o estudo de modificadores químicos permanentes utilizando amostra de óleo de peixe foram condizentes com os resultados obtidos utilizando padrão aquoso de cádmio. Este comportamento similar entre a amostra de óleo de peixe e o padrão aquoso de cádmio pode vir a permitir o uso da calibração com padrão aquoso para quantificar cádmio nas amostras de óleo de peixe. Uma vez que houve um acréscimo na sensibilidade ao usar platina, quando comparado ao uso de irídio, essa foi adotada como modificador permanente para os próximos estudos.

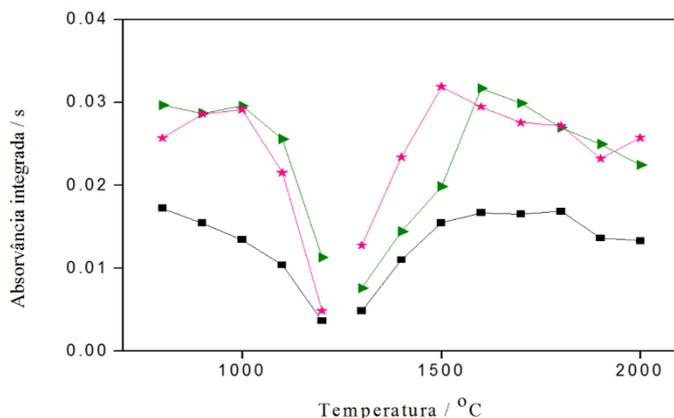
Embora o mecanismo de ação dos modificadores permanentes continue sendo alvo de discussões, acredita-se que além da estabilização térmica do analito devido à intercalação do metal nobre no grafite, via ligações covalentes fortes [39], a platina age como um catalisador na quebra de ligações C-C e C-H em compostos orgânicos [52]. Esta atividade catalítica da platina pode ser a razão pela qual se alcança maiores valores quando esta é utilizada como modificador permanente.



**Figura 3** - Curvas de pirólise e atomização utilizando 30  $\mu\text{L}$  de solução de óleo de peixe em 1-propanol. (■) 400  $\mu\text{g}$  de irídio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{\text{at}} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{\text{pir}} = 800$  °C. (▲) 400  $\mu\text{g}$  de platina como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{\text{at}} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{\text{pir}} = 800$  °C.

Modificadores químicos em solução são frequentemente empregados para promover o aumento da estabilidade térmica durante as análises, permitindo a aplicação de maiores temperaturas na etapa de pirólise, evitando perdas por difusão. A combinação de paládio e magnésio como modificadores em solução é comumente utilizada nas determinações de cádmio. Bons resultados foram reportados por Vale *et al.* [44], onde pirólises até 800 °C foram utilizadas sem perdas significativas. Bulska *et al.* [46] utilizaram paládio como modificador químico conseguindo bons resultados com pirólises de até 900 °C. O estudo dos modificadores químicos em solução foi executado utilizando um tubo recoberto por platina, uma solução de óleo de peixe em 1-propanol e adicionado sobre a amostra no tubo de grafite 10  $\mu\text{g}$  de paládio ou 15  $\mu\text{g}$  / 10  $\mu\text{g}$  de uma solução de paládio e magnésio. Ambos os modificadores químicos em solução apresentaram um aumento na sensibilidade em altas temperaturas quando comparado com o estudo sem modificador químico em solução. Ambos os modificadores também apresentaram comportamento parecido quanto ao aumento de estabilidade térmica e sensibilidade. Para temperaturas de pirólise até 1000 °C não houve perdas significativas do analito, sendo esta a temperatura ótima de pirólise tanto para a adição de paládio, quanto para

a adição da combinação paládio e magnésio. Já para o estudo das temperaturas de atomização, os sinais mais simétricos foram obtidos quando a etapa de atomização empregou a temperatura de 1700 °C, sem perdas significativas de sensibilidade. As temperaturas encontradas utilizando paládio como modificador químico em solução estão um pouco superiores com o encontrado por Bulska *et al.* [46]. Porém, o citado trabalho utiliza irídio como modificador permanente, e para a matriz estudada neste presente trabalho, platina apresentou melhores resultados como modificador permanente, conforme exibido na Figura 2. O estudo dos modificadores químicos em solução de óleo diluído em 1-propanol é mostrado na Figura 4.

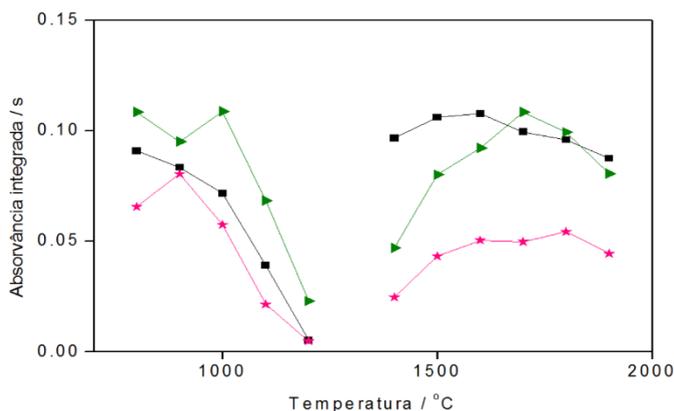


**Figura 4** - Curvas de pirólise e atomização para os modificadores químicos utilizando 20 µL de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol e tubo recoberto com platina, como modificador permanente. (■) sem modificador químico; pirólise  $T_{at} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 800$  °C. (★) 15 µg / 10 µg de paládio e magnésio como modificador químico em solução; durante pirólise,  $T_{at} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 800$  °C. (▶) 10 µg de paládio como modificador químico em solução; durante pirólise,  $T_{at} = 1700$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 800$  °C.

Uma forma de investigar a compatibilidade da calibração utilizando padrão aquoso com a amostra, é investigando o comportamento térmico do analito em solução. Para o estudo dos modificadores químicos em solução em padrão aquoso, foram utilizados 10 µL de uma solução de cádmio a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  e um tubo utilizando platina como modificador permanente. Como pode ser observado na Figura 5, o

acréscimo promovido pelo modificador químico no padrão aquoso não foi tão significativo quanto na amostra de óleo de peixe. Uma vez que o óleo de peixe é uma matriz complexa, formada majoritariamente por compostos lipídicos de cadeia longa, a ação dos PGM como catalisadores para a volatilização da matriz mostra-se mais pronunciada [43].

Devido à diferença no comportamento térmico entre as amostras de peixe e o padrão aquoso de cádmio quando o modificador paládio e magnésio foi empregado, este foi descartado como possível modificador químico. Contudo, o comportamento térmico do paládio como modificador químico em solução foi o mesmo tanto para a amostra de óleo de peixe quanto para o padrão aquoso de cádmio, com temperaturas ótimas de pirólise e atomização de 1000 °C e 1700 °C respectivamente, sendo este, adotado como modificador químico em solução para o método.



**Figura 5** - Curvas de pirólise e atomização para modificadores químicos em solução utilizando 10 pg de cádmio e tubo recoberto por platina. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ °C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ °C}$ . (★) 15 µg/10 µg de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ °C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 800\text{ °C}$ . (▶) 10 µg de paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 1700\text{ °C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 800\text{ °C}$ .

Com isto, a combinação platina como modificador permanente e paládio como modificador químico em solução foi adotada como ótima e utilizada para a verificação do método e quantificação das amostras.

As melhores condições foram então selecionadas para compor o programa de temperatura descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Programa de temperatura para cádmio utilizando platina como modificador químico permanente e paládio como modificador químico em solução.

<i>Etapa</i>	<i>T / °C</i>	<i>Rampa / °C s<sup>-1</sup></i>	<i>Tempo / s</i>	<i>Gás de purga / L min<sup>-1</sup></i>
Secagem	150	30	20	2,0
Secagem	250	30	25	2,0
Pirólise	1000	300	10	2,0
Atomização	1700	FP*	5	0
Limpeza	2000	1000	5	2,0

\*FP: potência máxima

#### 4.2.2 CROMO

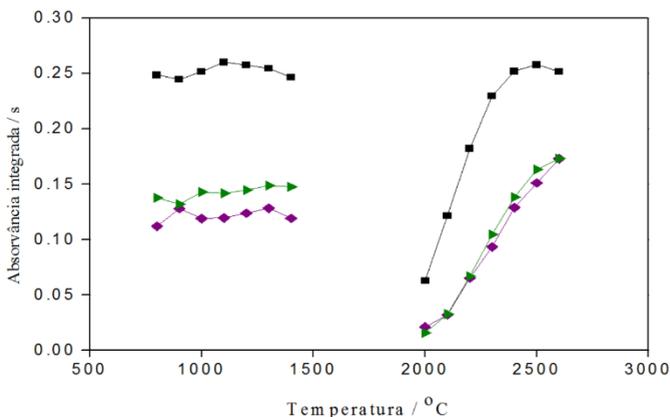
Para o estudo do comportamento térmico do cromo, foram escolhidos zircônio e paládio para a investigação dos modificadores permanentes uma vez que a eficácia destes é comprovada em trabalhos já publicados [45, 53]. Utilizando uma solução aquosa de cromo a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , foram comparados os resultados obtidos para as curvas de pirólise e atomização em um tubo sem modificador permanente, com os resultados obtidos utilizando tubos com recobrimento de zircônio e paládio. Os resultados deste estudo são mostrados na Figura 6.

Para o tubo sem recobrimento, os melhores resultados foram obtidos quando utilizadas temperaturas de  $1100 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2500 \text{ }^\circ\text{C}$  na etapa de pirólise e atomização. Resultado que corrobora com trabalhos já publicados [53]. Já para zircônio e paládio, as temperaturas de  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2600 \text{ }^\circ\text{C}$  de pirólise e atomização, respectivamente, apresentaram melhores resultados, e embora a estabilidade térmica tenha sido um pouco maior para os tubos recobertos por zircônio e paládio, não houve acréscimo na sensibilidade.

Os resultados apresentaram concordância quando comparados com os obtidos por Oliveira *et al.* [53], para tubo recoberto com paládio, que encontraram como condições ótimas temperaturas de  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2600 \text{ }^\circ\text{C}$  nas etapas de pirólise e atomização respectivamente. Bermejo-Barrera *et al.* [45] descreveram melhores resultados quando empregaram pirólise de  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$  em tubo recoberto por zircônio.

O resultado obtido para zircônio já era o esperado, uma vez que o zircônio como modificador permanente tem como finalidade selar o

tubo de grafite, evitando o contato do analito com o carbono, importantíssimo para se evitar efeitos de memória causados por analitos formadores de carbetos. Porém o cromo não é conhecido por formar carbeto refratários, embora seja notável que a interação carbono-cromo não só fornece estabilidade térmica, quando comparado ao tubo recoberto com outros modificadores, mas também fornece um acréscimo na sensibilidade.



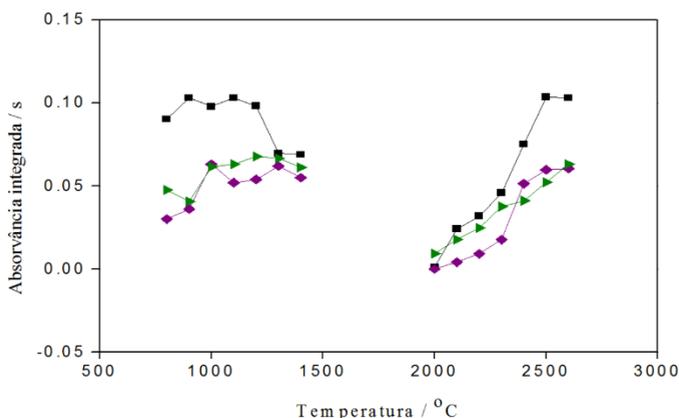
**Figura 6** - Curvas de pirólise e atomização utilizando 200 pg de cromo. (♦) 400 µg de zircônio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1300$  °C. (■) sem modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1100$  °C. (►) 400 µg de paládio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1300$  °C.

O comportamento térmico do cromo na amostra foi verificado a fim de se verificar a compatibilidade da calibração com padrão aquoso. Foi utilizada uma solução de óleo de peixe diluída em 1-propanol. O estudo foi procedido utilizando zircônio, paládio ou a ausência de modificador permanente. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 7.

Quando nenhum modificador é empregado, os melhores resultados são alcançados quando as temperaturas de 1100 °C e 2500 °C nas etapas de pirólise e atomização, respectivamente, são aplicadas. Estas temperaturas estão em concordância com as obtidas para solução aquosa. Zircônio como modificador permanente também apresentou resultados compatíveis com os obtidos para o padrão aquoso, com

temperaturas de 1300 °C e 2600 °C para as etapas de pirólise e atomização, respectivamente. Contudo, as condições ótimas para paládio como modificador químico permanente são um pouco diferentes das obtidas com padrão aquoso. O estudo das temperaturas de pirólise e atomização utilizando amostra de óleo de peixe apresentaram melhores resultados quando as temperaturas de 1000 °C e 2600 °C para pirólise e atomização, respectivamente, foram empregadas, ficando 300 °C abaixo do obtido para o padrão aquoso na etapa de pirólise.

Assim como no estudo do padrão aquoso, o sinal analítico decresceu com o emprego de modificadores permanentes. Baseado nos resultados obtidos, foi descartada a utilização de modificadores permanentes nos estudos subsequentes com cromo.

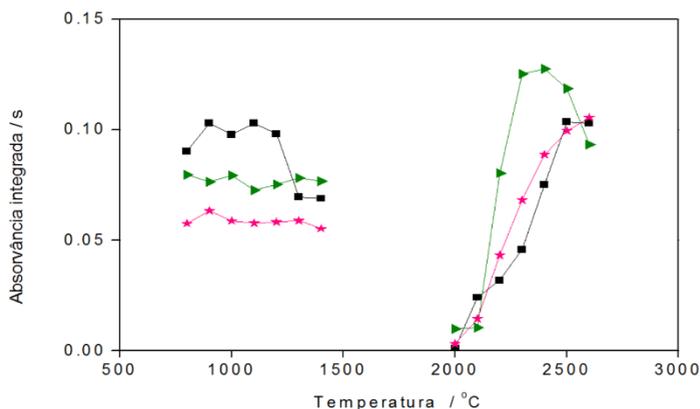


**Figura 7** - Curvas de pirólise e atomização para cromo, utilizando 30µL de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol. (■) sem modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1100$  °C. (►) 400 µg de paládio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1300$  °C. (◆) 400 µg de zircônio como modificador permanente; durante pirólise,  $T_{at} = 2400$  °C; durante atomização,  $T_{pir} = 1300$  °C.

Embora o uso de modificador permanente não tenha se mostrado necessário, foi estudado o comportamento térmico do cromo na presença de modificadores químicos em solução. Foram escolhidos para comparação 10 µg de paládio e a combinação de 15 µg de paládio e 10 µg de magnésio, adicionados sobre a amostra no tubo de grafite. Os resultados desta investigação são exibidos na Figura 8.

A adição de paládio ou a combinação de paládio e magnésio mantiveram a estabilidade térmica do cromo até 1400 °C. Contudo, conforme o número de leituras no mesmo tubo eram feitas, na presença dos modificadores químicos em solução, o valor da absorvância integrada aumentava, indicando um provável efeito de memória. Para averiguar este comportamento, foram feitas várias leituras com o tubo vazio após leituras com a amostra. Nenhum sinal analítico foi detectado com o tubo vazio.

Conforme descrito por de Quadros e Borges [54], este aumento no sinal pode ser atribuído ao uso de 1-propanol como diluente. O 1-propanol permite a migração do analito para o interstício dos poros do tubo de grafite, e é gradualmente liberado a altas temperaturas de atomização. Uma vez que o cromo não é conhecido por ser um elemento formador de carbeta, na ausência de modificadores químicos em solução, todo o cromo é liberado na etapa de atomização, e limpeza, já quando são aplicados paládio e magnésio junto à amostra, devido à estabilidade térmica fornecida ao analito pelo modificador químico, o cromo permanece nos poros do grafite mesmo após a etapa de limpeza. Acredita-se que ao adicionar 1-propanol proveniente da amostra em um novo ciclo, o cromo remanescente consegue migrar para uma região onde pode ser atomizado.

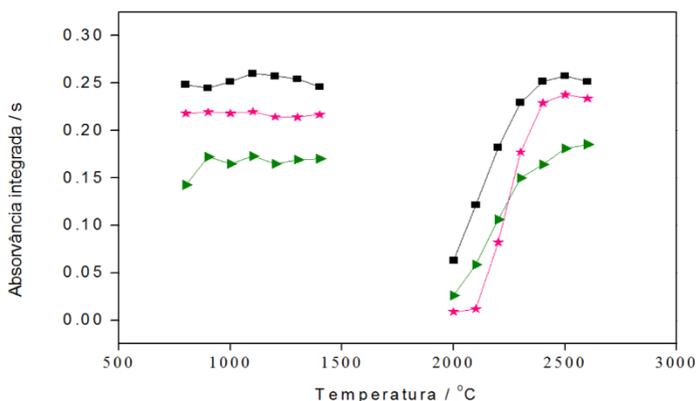


**Figura 8** - Curvas de pirólise e atomização de cromo utilizando 30 µL de uma solução de óleo de peixe em 1-propanol em tubo sem modificador permanente. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500$  °C; atomização  $T_{pir}=1100$  °C. (★) 15 µg/10 µg de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500$  °C; atomização  $T_{pir} = 1100$  °C. (►) 10 µg de

paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ °C}$ ; durante atomização,  $T_{pir} = 1100\text{ °C}$ .

Para averiguar o efeito do 1-propanol como veículo para o mencionado efeito, foi efetuado um estudo dos modificadores químicos em solução, mas desta vez, utilizando uma solução de padrão aquoso de cromo. As curvas de pirólise atomização efetuadas com uma solução padrão de  $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  de cromo não apresentaram o acréscimo antes observado, sendo esta uma evidência que o fenômeno é causado pela presença do 1-propanol como diluente.

A não ser pelo efeito mencionado anteriormente, o comportamento térmico do cromo no padrão aquoso foi concordante com o obtido para a amostra de óleo de peixe. Para evitar esse feito, não foi adotado o uso de modificadores químicos em solução. Os resultados obtidos estão na Figura 9.



**Figura 9** - Curva de pirólise e atomização utilizando 200 pg de cromo em tubo sem modificador permanente. (■) sem modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ °C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ °C}$ . (★) 15  $\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{g}$  de paládio e magnésio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ °C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ °C}$ . (►) 10  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador químico; durante pirólise,  $T_{at} = 2500\text{ °C}$ ; durante atomização  $T_{pir} = 1100\text{ °C}$ .

Baseado nos estudos do comportamento térmico do cromo, não serão utilizados modificadores químicos permanentes ou em solução. As temperaturas para o tubo sem modificador foram fixadas em  $1100\text{ °C}$  e  $2500\text{ °C}$  para as etapas de pirólise e atomização, respectivamente. O

programa de temperatura otimizado para cromo está exibido na Tabela 4.

**Tabela 4** - Programa de temperatura para cromo sem modificador químico permanente ou em solução.

<i>Etapa</i>	<i>T / °C</i>	<i>Rampa / °C s<sup>-1</sup></i>	<i>Tempo / s</i>	<i>Gás de purga / L min<sup>-1</sup></i>
Secagem	150	30	20	2,0
Secagem	250	30	25	2,0
Pirólise	1100	300	10	2,0
Atomização	2500	FP*	5	0
Limpeza	2600	1000	5	2,0

\*FP: potência máxima

Os resultados obtidos pelas otimizações, que envolveram o preparo da amostra e o programa de temperatura do forno de grafite para a possível determinação dos analitos por espectrometria de absorção atômica permitiram o desenvolvimento de um método para determinação de cádmio e cromo em amostras lipídicas. Os principais parâmetros e as condições ótimas encontradas estão dispostos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resumo dos parâmetros otimizados para o método proposto para determinação de cádmio e cromo em amostras lipídicas.

<i>Parâmetros</i>	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>
Preparo da amostra	Aproximadamente 1 g de óleo de peixe diluído para 5 mL com 1-propanol	Aproximadamente 1 g de óleo de peixe diluído para 5 mL com 1-propanol
Utilização de modificadores químicos permanentes	Tubo de grafite com recobrimento pirolítico modificado com 400 µg de platina	Tubo de grafite com recobrimento pirolítico sem a utilização de modificadores permanentes
Utilização de modificadores químicos em solução	Adição de 5 µL de uma solução 1 g L <sup>-1</sup> de paládio ao tubo de grafite junto da amostra	Sem adição de modificadores químicos em solução.
Temperaturas de pirólise e atomização	1000 °C/ 1700 °C	1100 °C/ 2500 °C

### 4.3 DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO

Diferentes parâmetros de mérito, tais como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de correlação (R) e faixa linear, foram avaliados. O LOD e LOQ foram estimados pela multiplicação por 3 e 10 do valor do desvio padrão de 10 medidas do branco, respectivamente divididos pelo coeficiente angular da curva de calibração. O LOD e LOQ para cádmio foi de 0,5 pg e 7 pg, respectivamente. Para cromo o LOD e LOQ foi de 1,5 pg e 23 pg, respectivamente. A massa característica ( $m_0$ ) foi calculada como a massa suficiente para resultar uma absorvância integrada de 0,0044 s, apresentando valores de 1,5 pg e 3 pg para cádmio e cromo, respectivamente. A faixa linear para os dois analitos foi avaliada, sendo que a curva de calibração se mostrou dentro da linearidade até 330 pg para cádmio e 1080 pg para cromo. Além da curva de calibração com padrão aquoso (aquosa), foram construídas curvas de calibração por adição de padrão em meio alcoólico (*spike*), que apresentaram sensibilidade muito similares, confirmando a possibilidade da calibração com padrão aquoso. As curvas foram construídas com concentrações variando de 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 11  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cádmio e 0,75  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 36  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cromo, utilizando um volume de 30  $\mu\text{L}$ . Os parâmetros de mérito estão disponíveis na Tabela 6.

**Tabela 6** - Parâmetros de mérito do método desenvolvido para determinação de cádmio e cromo.

<i>Parâmetro de mérito</i>	<i>Cádmio</i>	<i>Cromo</i>
Equação da reta (aquosa)	$y = 0,0535 + 0,1043x$	$y = 0,0014 + 0,0381x$
Equação da reta (Spike)	$y = 0,0384 + 0,094x$	$y = 0,016 + 0,0323x$
R	0,998	0,999
Faixa linear (pg)	1,5 – 330	23 – 1080
LOD (pg)	0,5	7
LOD (ng g <sup>-1</sup> )	0,2	2
LOQ (pg)	1,5	23
LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	0,7	7

Os limites de quantificação apresentados são suficientemente baixos para mensurar quantidades máximas estipuladas pelas legislações vigentes, como por exemplo, o regulamento (EC)No 488/2014, que estipula o valor máximo de cádmio em suplementos alimentares de 1  $\mu\text{g g}^{-1}$  [26] e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

estipula a concentração máxima de  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  de cádmio em produtos à base de leite, como a manteiga [55]. Já para cromo, embora os valores máximos não sejam frequentemente estipulados, as legislações chinesas permitem valores abaixo de  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  de cromo para produtos derivados de leite e  $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$  de cromo para produtos derivados de peixe [56].

#### 4.4 VERIFICAÇÃO DA EXATIDÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e otimizado foi aplicado em uma amostra de óleo de peixe proveniente de indústria brasileira e quatro amostras de óleo de peixe de indústria chilena (Golden OMEGA, Arica, Chile), referentes a quatro processos de refinamento do óleo de peixe. O método também foi aplicado em outras matrizes lipídicas, como manteiga de cacau e manteiga de origem bovina. Como forma de avaliar a exatidão do método proposto, os valores encontrados foram comparados utilizando digestão assistida por micro-ondas (MW). Os resultados encontrados estão exibidos na Tabela 7.

**Tabela 7** - Resultados obtidos para cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe, manteiga de cacau e manteiga de leite.

<i>Amostra</i>	<i>Cádmio /<math>\mu\text{g g}^{-1}</math></i>	<i>Cromo /<math>\mu\text{g g}^{-1}</math></i>	<i>Cádmio MW /<math>\mu\text{g g}^{-1}</math></i>	<i>Cromo MW /<math>\mu\text{g g}^{-1}</math></i>
Óleo estágio 1	$1,36 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,39 \pm 0,2$	$1,27 \pm 0,04$
Óleo estágio 2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Óleo estágio 3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Óleo estágio 4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Óleo Br1	< LOQ	$1,3 \pm 0,1$	< LOQ	$1,2 \pm 0,05$
Manteiga de cacau	$0,007 \pm 0,001$	$0,017 \pm 0,04$	< LOQ	$0,020 \pm 0,01$
Manteiga bovina	< LOQ	$0,051 \pm 0,01$	< LOQ	$0,050 \pm 0,01$

Baseando-se no teste-t, foram feitas comparações entre os resultados obtidos utilizando o método proposto e o método por digestão assistida em micro-ondas. Dentro de um intervalo de confiança de 95%, em nenhuma das amostras os resultados obtidos com o método proposto

apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao método de comparação.

Embora o método tenha sido otimizado utilizando apenas amostra de óleo de peixe, a concordância dos resultados obtidos com o método proposto em relação ao método de comparação para a manteiga de cacau e a manteiga de origem bovina sugerem que o método desenvolvido também pode ser aplicado para outras matrizes lipídicas, tanto de origem animal quanto vegetal.

Outra forma de se verificar a exatidão de um método desenvolvido é o estudo de adição e recuperação do analito nas amostras. Foram adicionadas quantidades de cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe de forma que as concentrações fossem próximas ao limite de quantificação e também próximas ao ponto médio da faixa linear. Os resultados da recuperação para cádmio foram de 90% para a concentração próxima ao limite de quantificação ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de cádmio) e 80% para a concentração próxima ao ponto médio ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de cádmio). Já para cromo, os resultados da recuperação foram de 80% para a amostra dopada com concentração próxima ao limite de quantificação ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de cromo) e 105% para a amostra dopada e com concentração próximo ao ponto médio da curva ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cromo).

Os resultados obtidos para os estágios 2, 3 e 4 do refinamento do óleo de peixe indicam que os métodos utilizados pela Golden OMEGA para a obtenção do óleo de peixe para consumo humano são eficazes em relação à cádmio e cromo a nível-traço. Os resultados obtidos para estes estágios ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica.



## 5 CONCLUSÕES

Um novo método simples e confiável para determinação de cádmio e cromo em amostras de óleo de peixe utilizando apenas 1-propanol como diluente foi desenvolvido. As determinações foram feitas utilizando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite. A diluição com 1-propanol permitiu o uso de amostrador automático, antes impossível, devido à alta viscosidade da amostra. O comportamento térmico dos analitos em soluções de padrão aquoso foram condizentes com o comportamento térmico dos analitos quando utilizado, para cádmio, platina como modificador químico permanente e adicionado paládio como modificador químico em solução. Já para cromo, o comportamento térmico da amostra e da solução padrão foram condizentes quando utilizado tubo sem modificador químico permanente e sem a adição de modificador químico em solução. Esta semelhança entre os comportamentos permitiu a calibração externa com padrão aquoso. A determinação de cromo e cádmio em amostras de óleo de peixe, manteiga de leite e manteiga de cacau mostrou-se adequado com os resultados encontrados utilizando digestão assistida por micro-ondas. O estudo de adição e recuperação do analito nas amostras de óleo de peixe obtiveram um alto percentual de recuperação, de 80% e 90% para cádmio e 80% e 105% para cromo. A utilização de 1-propanol no preparo da amostra ao invés de soluções ácidas ou oxidantes reduz a periculosidade e a quantidade dos resíduos gerados, além de não depender do uso de equipamentos caros ou laboriosos, como digestores, fibras para a limpeza da amostra ou banhos de ultrassom.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Loke, C. Geslani, B. Takenaka, P. Leung, An Overview of Seafood Consumption and Supply Sources: Hawai'i Versus U.S., *Economic Issues*, 22 (2012) 9.
- [2] N. Rubio-Rodriguez, S. Beltran, I. Jaime, S.M. de Diego, M.T. Sanz, J.R. Carballido, Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review, *Innov Food Sci Emerg*, 11 (2010) 1-12.
- [3] C.A. Martin, V.V.d. Almeida, M.R. Ruiz, J.E.L. Visentainer, M. Matshushita, N.E.d. Souza, J.V. Visentainer, Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos, *Revista de nutrição*, 19 (2006) 9.
- [4] J.J. Lara, M. Economou, A.M. Wallace, A. Rumley, G. Lowe, C. Slater, M. Caslake, N. Sattar, M.E.J. Lean, Benefits of salmon eating on traditional and novel vascular risk factors in young, non-obese healthy subjects, *Atherosclerosis*, 193 (2007) 213-221.
- [5] A.M. Dellatre, P.V. Staziaki, A.C. Ferraz, Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults., 2015, pp. 187-201.
- [6] S. Damsbo-Svendsen, M.D. Ronsholdt, L. Lauritzen, Fish oil-supplementation increases appetite in healthy adults. A randomized controlled cross-over trial, *Appetite*, 66 (2013) 62-66.
- [7] K.S. Sidhu, Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil, *Regul Toxicol Pharm*, 38 (2003) 336-344.
- [8] B. Deutch, E.B. Jorgensen, J.C. Hansen, Menstrual discomfort in Danish women reduced by dietary supplements of omega-3 PUFA and B-12 (fish oil or seal oil capsules), *Nutr Res*, 20 (2000) 621-631.
- [9] M.S. Cheung, W.X. Wang, Analyzing biomagnification of metals in different marine food webs using nitrogen isotopes, *Mar Pollut Bull*, 56 (2008) 2082-2088.

- [10] M.I. Gladyshev, N.N. Sushchik, O.V. Anishchenko, O.N. Makhutova, G.S. Kalachova, I.V. Gribovskaya, Benefit-risk ratio of food fish intake as the source of essential fatty acids vs. heavy metals: A case study of Siberian grayling from the Yenisei River, *Food Chem*, 115 (2009) 545-550.
- [11] S. Rahmawaty, P. Lyons-Wall, K. Charlton, M. Batterham, B.J. Meyer, Effect of replacing bread, egg, milk, and yogurt with equivalent omega-3 enriched foods on omega-3 LCPUFA intake of Australian children, *Nutrition*, 30 (2014) 1337-1343.
- [12] Food and Agriculture Organization, The production of fish meal and oil, Rome, Italy, 1986.
- [13] J. Cmolik, J. Pokorny, Physical refining of edible oils, *Eur J Lipid Sci Tech*, 102 (2000) 472-486.
- [14] H. Okyere, R.B. Voegborlo, S.E. Agorku, Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine, *Food Chem*, 179 (2015) 331-335.
- [15] A. Jan, B. Diane, A. Cockburn;, J.-P. Cravedi;, E. Dogliotti;, A.D. Domenico;, M.L. Fernández-Cruz;, J.F.-G. Peter Fürst, C.L. Galli;, P. Grandjean;, J. Gzyl;, G. Heinemeyer;, N. Johansson;, A. Mutti;, J. Schlatter;, R.v. Leeuwen;, C.V. Peteghem;, P. Verge;, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *The EFSA Journal*, 980 (2009) 139.
- [16] International Agency for Research on Cancer, Summaries & evaluations: Cadmium and cadmium compounds (Group 1). , *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.*, 58 (1993).
- [17] Y.R. Ju, W.Y. Chen, C.M. Liao, Assessing human exposure risk to cadmium through inhalation and seafood consumption, *J Hazard Mater*, 227 (2012) 353-361.
- [18] F. Guerrero-Romero, M. Rodriguez-Moran, Complementary therapies for diabetes: The case for chromium, magnesium, and antioxidants, *Arch Med Res*, 36 (2005) 250-257.
- [19] European Commission Health & Consumer Protection, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Trivalent Chromium, in: *S.O.C.-M.o.s.c.s.c.-o.a. networks (Ed.)*, Brussels, Belgium, 2003.

- [20] R.A. Anderson, Chromium, glucose intolerance and diabetes, *J Am Coll Nutr*, 17 (1998) 548-555.
- [21] Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc, National Academic Press 2002.
- [22] S. Deflora, M. Bagnasco, D. Serra, P. Zancchi, Genotoxicity of Chromium Compounds - a Review, *Mutat Res*, 238 (1990) 99-172.
- [23] International Agency for Research on Cancer, Summaries & evaluations: Chromium and Chromium compounds. Chromium[VI] (Group 1), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 49 (1990).
- [24] D. Saglam, G. Atli, Z. Dogan, E. Baysoy, C. Gurler, A. Eroglu, M. Canli, Response of the Antioxidant System of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness, *Turk J Fish Aquat Sc*, 14 (2014) 43-52.
- [25] A.S. Barreto, Chromium in human nutrition: a review, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 1994, pp. 171.
- [26] Technical European Commission, Commission regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs, *Official Journal of the European Union*, 57 (2014) 5.
- [27] Joint Research Centre, Official methods for the determination of heavy metals in feed and food, in: E.U.R. Laboratory (Ed.), 2012.
- [28] British Standards Institute, Foodstuffs —Determination of trace elements — Determination of arsenic, cadmium, mercury and lead in foodstuffs by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) after pressure digestion, in: B. Standards (Ed.) BS EN 15763:2009, 2009.
- [29] European Standard, Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ashing, EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003, pp. 4.
- [30] I. Juranovic, P. Breinhoelder, I. Steffan, Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES, *J Anal Atom Spectrom*, 18 (2003) 54-58.

- [31] S. Gunduz, S. Akman, Investigation of trace element contents in edible oils sold in Turkey using microemulsion and emulsion procedures by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, *Lwt-Food Sci Technol*, 64 (2015) 1329-1333.
- [32] D. Kara, A. Fisher, S. Hill, Extraction of trace elements by ultrasound-assisted emulsification from edible oils producing detergentless microemulsions, *Food Chem*, 188 (2015) 143-148.
- [33] A.S. Silva, G.C. Brandao, G.D. Matos, S.L.C. Ferreira, Direct determination of chromium in infant formulas employing high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and solid sample analysis, *Talanta*, 144 (2015) 39-43.
- [34] C.S. Nomura, C.S.d. Silva, P.V. Oliveira, Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão, *Química Nova*, 31 (2008) 9.
- [35] A. Walsh, The Application of Atomic Absorption Spectra to Chemical Analysis, *Spectrochim Acta*, 7 (1955) 108-117.
- [36] M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, Geração química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, *Revista Analytica*, 1 (2004) 8.
- [37] W. Slavin, D.C. Manning, G.R. Carnrick, The stabilized temperature platform furnace, *Atomic Spectroscopy* 2(1981) 8.
- [38] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [39] H.M. Ortner, E. Bulska, U. Rohr, G. Schlemmer, S. Weinbruch, B. Welz, Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry - mechanisms of action (A tutorial review), *Spectrochim Acta B*, 57 (2002) 1835-1853.
- [40] R.E. Sturgeon, S.N. Willie, G.I. Sproule, P.T. Robinson, S.S. Berman, Sequestration of Volatile Element Hydrides by Platinum Group Elements for Graphite-Furnace Atomic-Absorption, *Spectrochim Acta B*, 44 (1989) 667-682.
- [41] A.B. Volynsky, Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim Acta B*, 55 (2000) 103-150.
- [42] Landolt-Boernstein, Group IV, Macroscopic and Technical Properties of Matter, New Series, Springer-Verlag, Berlin, 1991.

- [43] G. Schlemmer, B. Welz, Palladium and Magnesium Nitrates, a More Universal Modifier for Graphite-Furnace Atomic-Absorption Spectrometry, *Spectrochim Acta B*, 41 (1986) 1157-1165.
- [44] H.R. Oliveira, M.F. Mesko, M.G.R. Vale, C.A.P. Silveira, R.S. Picoloto, E.M. Becker, Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis, *Microchem J*, 116 (2014) 55-61.
- [45] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Pineiro, J. Moreda-Pineiro, A. Bermejo-Barrera, Comparative study on the use of Ir, W and Zr-coated graphite tubes for the determination of chromium in slurries of human scalp hair by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360 (1998) 712-716.
- [46] E. Bulska, K. Liebert-Ilkowska, A. Hulanicki, Optimization of electrochemical deposition of noble metals for permanent modification in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 53 (1998) 1057-1062.
- [47] E.A.P. Nikolaos S. Thomaidis, Panayotis A. Siskos, Comparison of three digestion methods for the determination of the aqua regia soluble content of lead, cadmium and chromium in sewage sludges by ETAAS, *Microchimica Acta*, 119 (1995) 8.
- [48] L.A. Pereira, I. Amorim, J.B.B. da Silva, Determination of cadmium, chromium and lead in marine sediment slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using permanent modifiers, *Talanta*, 68 (2006) 771-775.
- [49] F.A. Silva, C.C.F. Padilha, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture, *Talanta*, 69 (2006) 1025-1030.
- [50] H.R. Cadornim, E.R. Pereira, E. Carasek, B. Welz, J.O.B. de Andrade, Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace, *Talanta*, 146 (2016) 203-208.

- [51] J.B.B. da Silva, M. Bertilia, O. Giacomelli, I.G. de Souza, A.J. Curtius, Iridium and rhodium as permanent chemical modifiers for the determination of Ag, As, Bi, Cd, and Sb by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchem J*, 60 (1998) 249-257.
- [52] G.A. Somorjai, D.W. Blakely, Mechanism of Catalysis of Hydrocarbon Reactions by Platinum Surfaces, *Nature*, 258 (1975) 580-583.
- [53] E.P. Oliveira, R.E. Santelli, R.J. Cassella, Combined use of Pd and HF as chemical modifiers for the determination of total chromium in produced waters from petroleum exploration by ET AAS, *Microchem J*, 89 (2008) 116-122.
- [54] D.P.C. de Quadros, D.L.G. Borges, Determination of Trace Elements in B5-diesel Oil by HR-CS ET AAS Using a Simple Dilute-and-Shoot Approach, *J Brazil Chem S<sup>o</sup>C*, 24 (2013).
- [55] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC No 42, de 29 de agosto de 2013, in: ANVISA (Ed.), *Diário Oficial da União*, 2013, pp. 3.
- [56] J. Clever, M. Jie, China's Maximum Levels for Contaminants in Foods FAIRS Subject Report, US Department of Agriculture, 2014, pp. 19.