



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

MÁRIO MARQUES DA SILVA JUNIOR

**DETERMINAÇÃO DIRETA DE CHUMBO, CÁDMIO E MERCÚRIO EM
VINAGRE DE ÁLCOOL EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA.**

Salvador
2013

MÁRIO MARQUES DA SILVA JUNIOR

**DETERMINAÇÃO DIRETA DE CHUMBO, CÁDMIO E MERCÚRIO EM
VINAGRE DE ÁLCOOL EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador
2013

A minha mãe, a minha esposa, as minhas irmãs e irmão, meu orientador Prof.
Dr. Sergio Ferreira e a todos os amigos que estiveram sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por ter me incentivado, motivado, me encaminhado a ser o homem que eu sou e, principalmente, ter acreditado em mim todos os momentos.

Agradeço a minha esposa Jamile por está comigo todos esses anos sempre do meu lado, pelo seu companheirismo e me apoiar em todos os momentos, nos bons e nos ruins.

Agradeço as minhas irmãs, Mariana e Maira e o meu irmão Henrique que, sempre foram motivo de inspiração para que eu continuasse estudando e com quem sempre pude contar.

Ao meu orientador professor Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira pela amizade, paciência, confiança, ensinamentos e pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa.

Ao meu amigo, padrinho e colega de laboratório Danilo Leão.

A Laiana Oliveira pela grande contribuição no trabalho.

A Lindomar Portugal pela amizade e ensinamentos transmitidos

Aos amigos Geovane Brandão e Geraldo Matos pela contribuição e colaboração neste trabalho.

Aos amigos do GRPQQ: Fernanda, Liz, Robson, Jeane, Arlene, Michael, Raineldes, Prof. Neyla, Prof. Ana Pinto, Ivanice, Uenderson, Augusto, Douglas... pelo apoio e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório 409: Gabriel, Larissa, Geysa, Milena e a todos os outros.

A Lidiane e Carina pela amizade e confiança.

Aos amigos Gilmaro e Pablo.

Aos grandes amigos de estudo Alex Trindade, Vinícius Silva e Otélicio Costa pelos grandes momentos de estudo e descontração

Aos amigos da UFBA: Karine, Renato, Henrique, Gilvan.

A todos os professores que passaram durante a minha formação.

Ao Curso de Química da Universidade Federal da Bahia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Enfim, quero agradecer a todos que participaram direta ou indiretamente à realização desta etapa da minha vida.

“Liberte-se da escravidão mental. Ninguém além de nós,
pode libertar nossas mentes”

Bob Marley

RESUMO

O vinagre é um condimento de grande consumo na alimentação de humanos em todo o mundo. Sabe-se que a composição de vinagre inclui alguns ácidos orgânicos que são agentes complexantes para íons metálicos, entre os quais chumbo, cádmio, mercúrio e outros íons. Neste sentido, procedimentos analíticos visando determinação desses elementos em vinagre são sempre oportunos. O presente trabalho teve como objetivo, estabelecer estratégias analíticas visando a determinação direta de chumbo, cádmio e mercúrio em vinagre de álcool empregando a espectrometria de absorção atômica. Para a análise de chumbo foi utilizado ET AAS e a otimização das condições instrumentais foram estabelecida por metodologia univariada. Assim, os resultados obtidos para as temperaturas de pirólise e atomização foram 800 °C e 2000 °C, respectivamente, utilizando alumínio como modificador químico, limite de detecção de 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$, limite de quantificação de 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$, precisão expressa como desvio padrão relativo 2,04% e massa característica de 26,4 μg . A exatidão foi avaliada mediante testes de adição e recuperação, os valores de recuperação encontrados variaram numa faixa de 90 à 110%. O método foi aplicado na determinação de chumbo em treze amostras de vinagre de álcool e as concentrações encontradas variaram de 1,93 a 9,98 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o cádmio por ET AAS, foi aplicada uma nova função de resposta múltipla visando avaliar de forma qualitativa e quantitativa os picos obtidos. Fatores como temperatura de pirólise e atomização, tempo de pirólise e massa de modificador foram avaliadas na etapa de otimização, onde foi estabelecida empregando-se planejamento fatorial completo de dois níveis para o estudo preliminar dos fatores e planejamento Box-Behnken concernentes à determinação das condições críticas. Após aplicação e determinação do planejamento, os valores otimizados apresentaram temperatura de pirólise e atomização de 645 °C e 2000 °C, tempo de pirólise 7s e massa de modificador 3 μg . Nestas condições, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 4,2 ng L^{-1} e 14,0 ng L^{-1} , respectivamente. A precisão em termos de desvio padrão relativo foi de 1,9% e a massa característica de 1,2 μg . A exatidão do método proposto foi avaliada através da comparação dos resultados de concentração de cádmio obtidos pelo método direto com aqueles obtidos pelo método da digestão ácida e não foram observadas diferenças significativas entre os dois métodos. O método foi aplicado na determinação de cádmio em treze amostras de vinagre de álcool e os teores encontrados as variam de 20,0 a 880,0 ng L^{-1} . Para determinação de mercúrio, foi utilizando planejamento fatorial completo de dois níveis e planejamento Box-Behnken para otimizar as condições experimentais para geração de vapor frio de mercúrio e determinação empregando CV AAS, considerando os fatores volume de tetrahidroborato de sódio, volume álcool isoamílico, concentração de tiouréia e tempo de sonicação, onde apresentaram condições ótimas iguais a 42 mL min^{-1} , 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, 0,4% e 20 min, respectivamente. Sob essas condições o método limites de detecção 1,4 ng L^{-1} , limite de quantificação 47,0 ng L^{-1} e desvio padrão relativo 3,1%. As amostras de vinagre de álcool apresentaram uma concentração de mercúrio 58,0 a 798,0 ng L^{-1} .

ABSTRACT

Vinegar is a condiment large consumption in human's feeding throughout the world. It is known that the vinegar's composition includes some organic acids which can act as complexing agents for metal ions, including lead, cadmium, mercury and other ions. Considering the above, analytical procedures aiming determination of these elements in vinegar are always opportune. The present study aimed to establish analytical strategies aiming at the direct determination of lead, cadmium, mercury in alcohol vinegar employing the atomic absorption spectrometry. For the analysis of lead was used ET AAS and optimization of instrumental conditions were established by univariate methods. Thus, the results obtained for the pyrolysis e atomization temperatures were 800 °C and 2000 °C, respectively, using aluminum as a chemical modifier, detection limit of 0.16 mg L⁻¹, quantification limit of 0.53 mg L⁻¹, precision expressed as relative standard deviation 2.04% and characteristic mass of 26.4 pg. The precision was assessed by tests of addition and recovery, the recovery values found ranged from 90 to 110%. This method was applied to the determination of lead in thirteen samples alcohol vinegar and the concentrations found range from 1.93 to 9.98 g L⁻¹. For cadmium by ET AAS, was applied a new function of multiple response aiming to evaluate qualitatively and quantitatively the peaks obtained. Factors such as pyrolysis e atomization time and pyrolysis mass modifier were evaluated in the optimization step, which was established using full factorial design of two levels for preliminary evaluation of factors and Box-Behnken design to determination of critical conditions. After application and evaluating of planning, optimized values presented pyrolysis e atomization temperature of 645 °C and 2000 °C, pyrolysis's time 7s and mass modifier 3µg. Under these conditions, the limits of detection and quantification obtained were 4,2 ng L⁻¹ and 14,0 ng L⁻¹, respectively, the precision in terms of relative standard deviation was 1.9% and 1.2 pg of characteristic mass. The precision of the proposed method was evaluated by comparing the results of cadmium concentration obtained by the direct method with those obtained by the method of acid digestion and no significant differences were observed between the two methods. The method was applied in the determination of cadmium in thirteen samples alcohol vinegar and the levels found to range from 20,0 a 880,0 ng L⁻¹. For determination of mercury was use full factorial design of two levels and Box-Behnken design to optimize the experimental conditions to cold vapor mercury generation and determination employing CV AAS, considering the factors amount of sodium tetrahydroborate, amount isoamyl alcohol, thiourea's concentration and sonication time, where optimal conditions presented equal to 0.09 MPa, 400 µ L⁻¹ 10.4% and 20 min, respectively. Under these conditions the limits of detection's method 1,4 ng L⁻¹, quantification's limit 47,0 ng L⁻¹ and relative standard deviation 3.1%. The samples of alcohol vinegar exhibited a mercury's concentration of from 58,0 a 798,0 ng L⁻¹.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Forno de grafite com a plataforma de L'vov, fonte Skoog.....	28
Figura 2 – Curvas de temperaturas de pirólise e atomização, usando 5 µg de modificador químico alumínio e 15 s de tempo de pirólise.....	37
Figura 3 – Curvas de calibração externa em ácido nítrico 0,5% (—) e curva de adição de analito (—).	38
Figura 4 – Curvas de calibração externa em meio acético 4% v/v (—) e de adição de analito (—).....	39
Figura 5 – Curvas de calibração externa em meio acético - alcoólico 4% v/v (—) e curva de adição de analito (—).....	40
Figura 6 - Sinal analítico para absorção atômica em ETAAS.....	48
Figura 7 - Representação das variáveis no pico de absorção	49
Figura 8 – Gráfico de Pareto obtido usando a absorvância como única resposta....	52
Figura 9 – Gráfico de Pareto obtido usando o IEQ como única resposta.....	53
Figura 10 – Gráfico de Pareto obtido usando a resposta múltipla.	55
Figura 11 – Sinal analítico do experimento 7 a uma temperatura de atomização de 1800° C, temperatura de pirólise de 400 °C, tempo de pirólise de 5 s e massa de modificador de 7 µg.....	56
Figura 12 – Sinal analítico do experimento 13 a uma temperatura de atomização de 1800° C, temperatura de pirólise de 800 °C, tempo de pirólise de 5 s e massa de modificador de 3 µg.....	56
Figura 13 – Superfícies de respostas obtidas através da matriz Box Behnken.....	59
Figura 14 – Curvas de calibração externa e calibração com adição de analito.....	60
Figura 15 - Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado e acoplado ao HR-CS AAS. Fonte: SILVA 2012.	63
Figura 16 – Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2 ⁴	67
Figura 17 - Gráfico de Pareto para o planejamento Box-Behnken	70
Figura 18 – Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs tempo de sonicação vs concentração de tiouréia.....	70
Figura 19 – Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs pressão vs concentração de tiouréia.	71

Figura 20 – Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs pressão vs tempo de sonicação.	71
Figura 21 – Curvas de calibração externa em meio acético - alcoólico 4% v/v (—) e curva de adição de analito (—).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo (2^2)	30
Tabela 2 - Exemplo de matriz de planejamento Box-Behnken para 3 fatores	31
Tabela 3 – Código das marcas de amostras de vinagre de álcool avaliadas.	34
Tabela 4 – Programa de temperatura utilizado para determinação de chumbo por ET AAS.	37
Tabela 5 - Curvas de calibração empregando a técnica de adição de padrão para as 13 amostras de vinagre de álcool.....	41
Tabela 6 - Valores de recuperação para determinação de chumbo em amostras de vinagre de álcool.	45
Tabela 7 – Avaliação de chumbo em vinagre de álcool utilizando determinação direta por ET AAS.	46
Tabela 8 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^4	51
Tabela 9 – Matriz do planejamento Box-Behnken.	57
Tabela 10 – Valores das condições experimentais ótimas para determinação de cádmio em vinagre de álcool.....	59
Tabela 11 – Valores de LD, LQ, RSD (%), e massa característica para o método proposto.	61
Tabela 12 – Comparação dos valores de concentração de cádmio obtidos pelo método de análise direta com o método de digestão	62
Tabela 13 – Avaliação de cádmio em vinagre de álcool utilizando o método com resposta múltipla proposto.	62
Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial completo (2^4) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.....	66
Tabela 15 – Matriz Box-Behnken para determinação de mercúrio.	69
Tabela 16 – Condições ótimas para determinação de mercúrio em vinagre de álcool empregando CV-HR AAS.....	72
Tabela 17 – ANOVA gerada a partir dos valores obtidos experimentalmente. Termos significativos estão destacados em vermelho.	72
Tabela 18 – Valores de LD, LQ e RSD para o método proposto.	74

Tabela 19 - Valores de recuperação para determinação de mercúrio em amostras de vinagre de álcool.	75
Tabela 20 – Concentração de mercúrio em amostras de vinagre de álcool obtidas pelo método proposto.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria e Absorção Atômica (<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ABS	Absorvância
AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica (<i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i>)
ANAV	Associação Nacional das Indústrias De Vinagre
ANOVA	Análise de Variância
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (<i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
HR-CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Fonte Contínua e Alta Resolução com Vapor Frio (<i>Cold Vapor High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HR-GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua com Forno de Grafite (<i>High Resolution Continuous Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ICP MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1. O CHUMBO E SUA TOXICIDADE	20
3.2. O CÁDMIO E SUA TOXICIDADE.....	21
3.3. O MERCÚRIO E SUA TOXICIDADE	23
3.4. VINAGRE	24
3.4.1. Metais em vinagre	25
3.5. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	26
3.5.1. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS).....	27
3.5.2. Espectrometria de absorção atômica com vapor frio.....	28
3.6. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA	29
3.6.1. Planejamento fatorial completo 2^k	29
3.6.2. Planejamento Box-Behnken	30
3.6.3. Resposta múltipla	31
3.7. DETERMINAÇÃO DIRETA	32
4. METODOLOGIA	34
4.1. AMOSTRAS	34
4.2. LIMPEZA DE MATERIAL	34
5. DETERMINAÇÃO DIRETA DE CHUMBO EM VINAGRE DE ÁLCOOL POR ET AAS	35
5.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	35
5.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	35
5.3. OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL.....	36
5.3.1. Otimização das temperatura de pirolise e atomização	36
5.3.2. Curvas analíticas para avaliação do efeito de matriz.....	38
5.3.2.1. Curva de calibração em ácido nítrico	38
5.3.2.2. Curva de calibração em meio acético	39
5.3.2.3. Curva de calibração em meio acético - alcoólico	39
5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	41

5.4.1.	Limites de detecção e de quantificação.....	41
5.4.2.	Massa característica.....	42
5.4.3.	Precisão.....	43
5.4.4.	Exatidão.....	44
5.5.	ANÁLISE DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE VINAGRE DE ÁLCOOL	46
6.	DETERMINAÇÃO DIRETA DE CÁDMIO EM VINAGRE DE ÁLCOOL POR ET AAS.....	47
6.1.	RESPOSTA MULTIPLA IEQ (ÍNDICE DE AVALIAÇÃO QUALITATIVA)	48
6.2.	INSTRUMENTAÇÃO.....	49
6.3.	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	50
6.4.	OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL.....	50
6.5.	CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ.....	60
6.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	61
6.6.1.	Parâmetros analíticos	61
6.6.2.	Exatidão.....	61
6.7.	APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	62
7.	DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM VINAGRE SE ÁLCOOL POR CV HR-CS AAS.....	63
7.1.	INTRUMENTAÇÃO	63
7.2.	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	64
7.3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	64
7.4.	OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL	65
7.4.1.	Planejamento fatorial completo 2 ⁴	65
7.4.2.	Planejamento Box-Behnken	68
7.5.	CURVAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ	73
7.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
7.6.1.	Precisão.....	74
7.7.	ANÁLISE DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE VINAGRE DE ÁLCOOL.....	75
8.	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A determinação de metais em alimentos apresenta suma importância devido à identificação de fontes de minerais, assim como permite verificar a presença de metais tóxicos. Com isso, nos últimos anos, há um crescente interesse na determinação de vários elementos essenciais e não essenciais em alimentos. Os não essenciais trazem uma maior preocupação por conta da exposição e distúrbios causados por estes, levando-se a situações especiais de doenças (HAESE et al., 1995).

Dentre as fontes de contaminação dos alimentos por estes metais, pode-se destacar a poluição do solo devido à irrigação com águas poluídas, material particulado emitido por automóvel e escapamentos industriais, pesticidas e fertilizantes (TOKALIOĞLU, 2012). Outras formas de contaminação podem ser observadas devido a processos agrícolas e manipulação (TUZEN et al., 2005). Alimentos e derivados de plantas, que apresentam área folhosa relativamente grande, a exemplo do espinafre, repolho, alface e outros com alto poder de absorção, podem conter níveis elevados quando cultivados perto de fontes contaminadas (OYMAK et al., 2009).

Diversos trabalhos têm sido reportados na literatura sobre determinação de metais em alimento, principalmente os não essenciais, que mesmo em quantidades vestigiais, são de difícil metabolização pelo corpo humano e muito prejudiciais. Assim, a determinação de metais em amostras de alimentos e ambientais é uma questão muito importante para a saúde humana (MENDIL et al., 2013).

Entre os metais que causam distúrbios ao organismo, podem ser citados. Os seguintes: a) chumbo que não apresenta funcionalidade fisiológica e é considerado o mais comum dos contaminantes (MOREIRA; MOREIRA 2004); b) o cádmio que por sua vez possui efeito cancerígeno e a exposição ocupacional está associada com o câncer de pulmão em seres humanos (WAALKES, 2000); c) o mercúrio, que é um elemento extremamente tóxico mesmo em baixas concentrações e possui natureza acumulativa, além de ser de difícil eliminação do organismo, sendo que

uma das maiores fontes de contaminação é através da ingestão de alimentos (DA SILVA, et al., 2013)

O vinagre possui um importante papel na produção de alimentos, devido ao seu alto consumo e porque está presente em uma grande quantidade de produtos industrializados como molhos, ketchup, maionese, entre outros (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008). A contaminação por metais pode ter origem endógena ou antrópica, devido ser a matéria-prima utilizada, ou devido aos procedimentos de produção (NDUNG'U et al., 2004).

Em função da baixa concentração desses metais nas amostras, a determinação deles mostra-se um trabalho ainda maior. Com isso é preciso usar técnicas analíticas cada vez mais sensíveis. Assim, as técnicas espectroanalíticas se destacam pela sua sensibilidade e capacidade de análises em nível traço, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP MS), a espectrometria de fluorescência atômica (AFS), a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) e a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS). Essas técnicas agregam uma gama de vantagens, como baixos limites de detecção e quantificação (ULUSOY et al., 2013).

A determinação de metais traço, em certas ocasiões, requer uma etapa de pré-tratamento da amostra. Porém, esses processos são demorados e geralmente requerem grandes quantidades de reagentes, que são caros, geram resíduos perigosos, e podem contaminar as amostras (KORN et al., 2008). Contudo, a análise direta, mostra-se vantajosa em comparação com os métodos que requerem a digestão da amostra, diminuindo assim a perda de analitos voláteis, reduzindo a fonte de contaminação e custos reduzidos (IVANENKO et al., 2012).

Os parâmetros instrumentais destas técnicas analíticas podem ser otimizados de forma univariada, a partir da qual se estuda um fator de cada vez fixando-se os outros, ou de forma multivariada, na qual todos os fatores são otimizados simultaneamente, o que possibilita assim analisar como cada fator se comporta com a variação do outro e até mesmo as suas interações (FERREIRA et al., 2007).

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para determinação direta de chumbo, cádmio e mercúrio em amostras de vinagre de álcool empregando a espectrometria de absorção atômica (AAS). Metodologia multivariada foi aplicada na otimização das condições experimentais dos métodos desenvolvidos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar chumbo, cádmio e mercúrio em amostras de vinagre de álcool empregando espectrometria de absorção atômica por determinação direta.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar metodologia de determinação direta para avaliar os teores de chumbo, cádmio e mercúrio em amostras de vinagre de álcool.
- Determinar de chumbo em amostras de vinagre de álcool por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmico (ET AAS);
- Empregar planejamento fatorial completo e matriz Box-Behnken para otimizar os parâmetros instrumentais para determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico (ET AAS);
- Utilizar planejamento fatorial completo e matriz Box-Behnken na otimização das condições de geração do vapor frio para determinação de mercúrio empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e geração de vapor frio (HR-CV AAS)

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. O CHUMBO E SUA TOXICIDADE

O chumbo é encontrado de forma natural na superfície da terra de modo bastante difundido. Suas principais fontes naturais incluem emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e emissões provenientes do mar, embora devido à ação antropogênica exista uma maior difusão desse metal através da queima de combustíveis e atividades industriais (QUITERIO et al., 2001).

Embora não apresente nenhuma funcionalidade fisiológica, o chumbo é nocivo em concentrações extremamente baixas (MOREIRA; MOREIRA 2008). Estudos em animais mostram que em baixas dosagens, o efeito do chumbo está diretamente relacionado a alterações funcionais devido a exposição desse metal (CORY-SLECHTA et al., 1985).

Dentre os diversos problemas a saúde do ser humano que o chumbo promove, pode-se destacar uma associação a um enorme número de alterações fisiológicas do sistema nervoso podendo levar a distúrbios mentais (DIETRICH et al., 2001). Altas concentrações de chumbo são encontradas nos ossos. Porém, seus efeitos não podem ser observados e pouco se sabe como ocorre a substituição do chumbo pelo cálcio (SERVICES, 2007). O chumbo pode causar também a encefalopatia em crianças e adultos, anemia e eritropoiéticas na medula óssea sendo rara a sua manifestação, problemas endocrinológicos onde o chumbo interfere na produção de proteínas e absorção de vitaminas, efeitos sobre o crescimento, problemas renais entre outros (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

Nesse sentido, existe uma preocupação em saber os teores desse metal em alimentos. Assim, diversas técnicas analíticas são empregadas para determinação de chumbo.

Dessuy et al. (2012), desenvolveram um método simples para determinação total de chumbo em copos de liga de estanho produzidos no Brasil empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com

contínua (HR-GF AAS). A exatidão do método foi avaliada através de testes de adição e recuperação e também a partir da comparação dos resultados com aqueles obtidos por ICP OES. Os teores de chumbo variaram em torno de 1 mg g^{-1} .

LEMOS; FERREIRA, et al. (2001) propuseram um sistema on-line para pré-concentração de chumbo, o qual foi baseado na adsorção química de chumbo II em espuma de poliuretano impregnado com 2-(2-benzothiazolylazo)-2-p-cresol (BTAC). As determinações foram feitas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O método foi aplicado para a análise de amostras de frutos do mar, como camarão, ostra, peixe, caranguejo, entre outros. As concentrações de chumbo nas amostras variaram de $0,83$ a $2,75 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

Lima et al. (2012) determinaram chumbo orgânico e total em amostras de água através de separação em fase sólida com cartucho Sep-Pak C-18. Primeiro as amostras passavam pelo cartucho, sendo o chumbo consecutivamente eluído com metanol para separação e determinação do chumbo orgânico, em seguida determinação de chumbo total nas amostras de água.

No trabalho de PORTUGAL et al. (2011) foi proposto um método para a determinação de chumbo em antiácidos de alumínio e magnésio empregando ET AAS para detecção e utilizando fosfato de amônio como modificador químico. O método foi aplicado para determinação de chumbo em cinco amostras de antiácidos e o teor de chumbo variou entre 87 e 943 mg g^{-1} .

3.2. O CÁDMIO E SUA TOXICIDADE

O cádmio pode ser encontrado naturalmente em rochas, petróleo, carvão, solo e água, e também a partir de emissões por atividade vulcânica (FRANCHI; BALLARIN, 2013). Porém de forma escassa, a exposição nos humanos ocorre geralmente através de duas fontes principais: a primeira é por via oral (por água e ingestão de alimentos e bebidas contaminadas), e a segunda por inalação. Os fumantes são os mais expostos ao cádmio porque os cigarros contêm este elemento. Alguns órgãos vitais são alvos da toxicidade do cádmio, em organismos intensamente expostos, o cádmio ocasiona graves enfermidades (SILVIA, 2009).

O cádmio é um contaminante inorgânico com alto poder de fixação em sistemas orgânicos e de difícil excreção. Pode ser encontrado ao longo de toda cadeia biológica, sendo considerado um elemento potencialmente tóxico, além de apresentar uma série de riscos à saúde humana por acumular-se no fígado, rins e baço (SQUID et al., 2013).

Este elemento não possui essencialidade em nenhuma função orgânica para o ser humano e mesmo em baixas concentrações pode apresentar elevada toxicidade levando efeitos adversos ao organismo como insuficiência renal e lesão hepática (MENA, et al., 2013), podendo também afetar o esqueleto (SANTARUG; MOORE, 2004).

Logo, há uma preocupação em quantificar os teores deste metal em alimentos. Assim várias técnicas espectroanalíticas são utilizadas para determinação do cádmio.

OYMAK et al. (2009), aplicaram um método de co-precipitação de cádmio usando uma combinação de 2-mercaptobenzotiazole (MBT) como um reagente de quelação e detecção por GF AAS. O método foi aplicado em diversas amostras de alimentos e a concentração de cádmio apresentou um valor médio de $6,63 \text{ ng g}^{-1}$.

SOLIDIFIED et al. (2011), empregaram um procedimento de microextração em fase líquida para determinar cádmio em amostras de água. Neste método, FAAS foi utilizado para as determinações e os valores de recuperação encontrados para cádmio foram de 94,5 a 101,5 %.

BORGES et al. (2011), aplicaram amostragem por suspensão para determinar cádmio em amostras de fertilizantes utilizando HR-CS GF AAS, as concentrações de cádmio encontrada nas amostras estudadas variaram entre 0,07 a $5,5 \text{ mg g}^{-1}$.

DA SILVA et al. (2011), determinaram cádmio em amostras de arroz utilizando ET AAS com alumínio como modificador químico permanente, o método proposto foi utilizado para determinação do teor de cádmio em amostras de arroz onde, as concentrações variaram entre 11,6 a $44,9 \text{ ng g}^{-1}$.

3.3. O MERCÚRIO E SUA TOXICIDADE

O mercúrio ocorre no ambiente associado a outros elementos, sendo o enxofre o mais comum. Pode ser encontrado tanto na forma inorgânica como orgânica formando complexos com grupos alquil (MICARONI et al., 2000). Além de processos naturais, como erupções vulcânicas, o mercúrio poder ser encontrado na atmosfera devido à atividade antropogênica a partir da queima de combustíveis fósseis e atividades industriais (LEOPOUD et al., 2001).

A exposição por mercúrio pode ocorrer por ingestão de alimentos contaminados, inalação e contato direto com o metal. Isso pode causar problemas adversos no organismo humano (LAIRD et al. 2007). Dentre as formas de mercúrio, o metilmercúrio é a forma mais tóxica e bioacumulável de mercúrio. A sua forma Hg^{2+} apresenta grande afinidade com enzimas, proteínas e hemoglobina (MICARONI et al 2000). Já o mercúrio na sua forma elementar, pode ser bastante tóxico quando inalado, em função de poder ser carregado para o sangue (GUNEY et al. 2013). Diversos problemas a saúde estão relacionados ao mercúrio, como doenças cardiovasculares, danos na função endotelial, aterosclerose e hipertensão (HONG et al., 2013). Assim, torna-se necessário a determinação dos teores deste metal em alimentos.

Diversas técnicas analíticas são empregadas para determinação de mercúrio. DA SILVA et al. (2013), desenvolveram um sistema FIA com multiseringas para determinação de mercúrio em amostras de arroz por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS), onde foi utilizado planejamento fatorial para otimização dos parâmetros experimentais. A validação do método proposto foi feita utilizando material de referência certificado e a faixa de concentração de mercúrio encontrado foi de 2,12 a 7,25 ng g⁻¹.

SILVA et al. (2012), propuseram um procedimento de amostragem por suspensão para determinação de mercúrio. Para isto foi utilizado matriz Box-Beheken para otimização dos parâmetros experimentais como volume e concentração de ácido clorídrico, volume de álcool isoamílico, concentração de tiouréia, entre outros. As determinações foram feitas utilizando CV AAS e o método apresentou teores de mercúrio que variaram entre 4,10-13,72 ng g⁻¹.

MENG et al. (2013), utilizaram um método simples e de baixo custo para determinação de mercúrio baseado na reação de complexação de mercúrio com o 2,4-bis(4-fenilazofenilaminodiazó) benzenossulfônico (BPPABSA). Os fatores que afetavam o sistema foram investigados de forma univariada. Os teores de mercúrio encontrados foram de 0,018 a 0,024 $\mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de cereais.

3.4. VINAGRE

O vinagre é um condimento utilizado na preparação de alimentos em todo o mundo. Ele apresenta importante papel na produção e preparo de diversos tipos de alimentos, como nos seguintes produtos industrializados: molhos, ketchup, maionese, entre outros (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008). Algumas variedades de vinagres são consideradas especialidades culinárias em todo o mundo, como o vinagre Sherry e o vinagre balsâmico tradicional de Modena (MARRUFO-CURTIDO et al., 2012). O vinagre pode ainda ser considerado um rico complemento na alimentação humana devido ao seu poder nutritivo e biorregulador (MECCA et al., 1979).

Vinagre é produzido a partir de matérias-primas de origem agrícola, que apresentam amido ou açúcares como uvas, maçãs, arroz e cana de açúcar, entre outros. A produção é o resultado de dois processos de fermentação: a conversão dos açúcares do mosto em etanol pelas leveduras e a oxidação do álcool para o ácido acético por bactérias do ácido acético (CALLEJÓN et al., 2012).

No Brasil, segundo a ANAV (Associação Nacional das Industrias de Vinagre), a produção chega à 174 milhões de litros por ano, sendo que 80% desta produção é proveniente da fabricação de vinagre de álcool. Já nos países europeus, o consumo triplica, mas as principais matérias-primas são o vinho e as frutas.

Além do uso culinário, o vinagre também é utilizado de outras formas como o combate a *Salmonella*. Alguns estudos mostram que ele pode ser eficaz na redução da população dessa bactéria em alimentos contaminados ou mesmo em outros ambientes devido aos diversos ácidos existentes no vinagre (STELZLENI et al.(2013); SENGUN; KARAPINAR, 2004).

São poucas as informações sobre a composição química do vinagre. A legislação brasileira estabelece como parâmetros de qualidade apenas o teor de acidez volátil, extrato seco reduzido, concentração de álcool, cinzas, cloretos e sulfatos (RIZZON; MIELE, 1998). Também estão presentes no vinagre ácidos orgânicos, como: ácido cítrico, málico e tartárico, que são resultantes dos processos de fermentação e podem agir como agentes complexantes de metais (REGMI et al., 2012; CHOI et al., 2012).

3.4.1. Metais em vinagre

A contaminação por metais em vinagre pode ter origem endógena devido à matéria-prima utilizada, ou antrópica devido aos procedimentos de produção (NDUNG'U et al., 2004a). Além disso, poucos trabalhos são reportados na literatura em relação a determinação de metais em vinagre em todo o mundo. Devido ao alto consumo, surge uma significativa importância no conhecimento dos teores de chumbo em vinagre de diferentes tipos.

OLIVEIRA; NETO (2007) utilizaram padronização interna com bismuto para determinação direta de chumbo em amostras de vinagre de alho, vinho, maçã e arroz utilizando rutênio como modificador químico com co-injeção de Pd/Mg(NO₃)₂. A concentração de chumbo variou de 2,6 a 31 µg L⁻¹. O método foi validado comparando os resultados do método direto com o digerido e com material de referência de água usando os resultados para bismuto. Em outro trabalho foi utilizado tungstênio como modificador químico permanente com co-injeção de paládio e magnésio para determinação direta de chumbo em amostras de vinagre (OLIVEIRA; NETO, 2007).

Dessuy et al. (2012), desenvolveram um método simples para determinação total de chumbo e cádmio lixiviado por cerveja, vinagre, vinho, ácido acético, entre outros em copos de liga de estanho produzidos no Brasil por HR FAAS com chama, a precisão do método foi estabelecida através de ensaios de recuperação e comparação com resultados obtidos por ICP OES, a concentração de chumbo variou em torno de 1 mg g⁻¹.

Em outro trabalho, NDUNG'U et al. (2004) desenvolveu procedimentos de preparo de amostra, incluindo digestão ácida com e sem a adição de peróxido de hidrogênio e fotólise utilizando a adição de uma mistura de ácido nítrico e peróxido. A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de vinagre de vinho, vinagre balsâmico, entre outros. As determinações foram feitas por ET AAS e ICP MS, e os teores de chumbo variaram de 15 a 307 $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinagre balsâmico e 36 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinagre de vinho.

FRESCHI et al. (2013), desenvolveram um método de determinação direta de chumbo em amostras de vinagre de vinho tinto e branco por ET AAS. Nesse trabalho os autores utilizaram uma mistura de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificadores químicos. A recuperação de chumbo variou de 93 a 103%.

SAEI-DEHKORDI et al. (2011), determinaram chumbo, cádmio, cobre e zinco em diversos tipos de vinagres produzidos e comercializados no Iran. As medidas foram feitas utilizando cronopotenciometria de descarregamento rápido (SCP) e os resultados foram comparados com valores encontrados por GF AAS. As concentrações dos metais avaliados foram: cobre de 12,79 a 1,129 ng mL^{-1} , chumbo de 3,32 a 253 ng mL^{-1} , cádmio (não detectável) e zinco de 26,12 a 3,725 ng mL^{-1} .

3.5. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para determinação de metais. Dentre estas, a espectrometria de absorção atômica (AAS) mostra-se bem difundida principalmente no emprego de determinações de metais em níveis traço e ultra-traço em diversas matrizes complexas, sejam matrizes alimentícias, ambientais ou biológicas (BORGES et al., 2005).

A técnica baseia-se no princípio de que átomos livres (estado gasoso) gerados em um atomizador podem absorver radiação de frequência específica emitida por uma fonte espectral. A quantificação da radiação absorvida obedece desta forma, os princípios da lei de Beer (BORGES et al., 2005).

Dentre as técnicas de absorção atômica, tem-se:

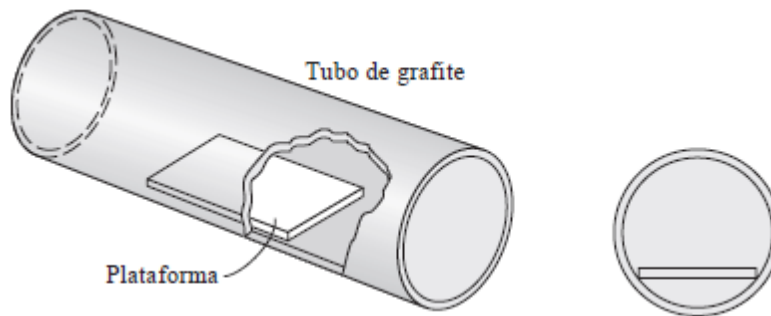
- Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS);
- Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS);
- Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS);
- Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS):
 - ✓ Forno de grafite (GF AAS);
 - ✓ Filamento de tungstênio (WET AAS).

3.5.1. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS)

O uso de atomização eletrotérmica ficou conhecido devido as contribuições de L'vov (1961) quando introduziu novos conceitos a técnica, como a utilização de tubos de grafite revestidos piroliticamente com plataforma e aquecimento transversal (Figura 1).

Além disso, a aplicação de correção de sinal de fundo por efeito Zeeman proporcionou um aumento da sensibilidade da técnica. O efeito Zeeman é baseado na aplicação de um campo magnético para separar as linhas espectrais degeneradas em componentes com diferentes características de polarização a absorção do analito e do fundo, os quais podem ser então diferenciados por causa dos seus comportamentos magnéticos e de polarização distintos (SKOOG et al., 2002).

Figura 1 – Forno de grafite com a plataforma de L'vov, fonte Skoog.



A ET AAS mostra-se como uma técnica com sensibilidade adequada para determinações de metais a níveis de traços em amostras orgânicas e inorgânicas, sem necessidade de uma etapa prévia de pré-concentração (FERREIRA et al., 2009). Além disso, esta técnica apresenta uma boa seletividade para os elementos estudados e requer pequenos volumes de amostra (FERREIRA et al., 2011).

3.5.2. Espectrometria de absorção atômica com vapor frio

A espectrometria de absorção com geração de vapor frio (CV AAS) é a técnica mais utilizada na determinação de mercúrio nas mais diversas matrizes. O método é baseado na redução de mercúrio iônica a mercúrio elementar, normalmente utilizando SnCl_2 ou NaBH_4 . O vapor de mercúrio é arrastado por um gás inerte até o caminho óptico onde são feitas as medidas de absorção (ODA et al., 1981).

Na técnica de geração de vapor frio, as determinações são realizadas utilizando-se a altura do pico de absorvância. No caso de ser usada a integração, o tempo teria que ser muito grande devido ao caráter do pico. (Welz; Sperling, 1999), mostrando-se bastante vantajosa na medida que apresenta uma alta sensibilidade e seletividade, devido a sua remoção eficiente do analito, o que minimiza os efeitos de interferência da matriz (D'ULIVO; DEDINA, 1996)

3.6. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

As ferramentas quimiométricas vêm sendo aplicadas com bastante frequência nos últimos anos, a fim de resolver problemas de otimização de métodos analíticos. Uma de suas vantagens é a redução do número de experimentos, acarretando um menor consumo de reagentes e desprendendo menos tempo e trabalho de laboratório. Logo, se constituem em formas de metodologias mais viáveis do que os métodos univariados. Os métodos multivariados proporcionam um estudo simultâneo de vários fatores, permitindo a avaliação da importância e significância estatística dos mesmos. Além disso, outra vantagem é a possibilidade de avaliação das interações entre os fatores (TARLEY et al., 2009).

A otimização multivariada é realizada em dois passos. Primeiramente são feitas as identificações das variáveis significativas, enquanto que a segunda etapa relaciona a otimização da resposta. As variáveis significativas podem ser identificadas utilizando-se de métodos de rastreio, tais como a aplicação de um planejamento fatorial completo. Porém, a otimização completa, com valores experimentais otimizados pode ser obtidas através da identificação do comportamento correto da resposta. Para isso, a utilização da metodologia de superfície de resposta (RSM), é a mais apropriada (CALDAS et al., 2013).

3.6.1. Planejamento fatorial completo 2^k

O planejamento fatorial completo é considerado uma das primeiras etapas para o planejamento de experimentos, pois são avaliadas todas as influências relacionadas às variáveis experimentais, bem como os fatores e efeitos de interação entre elas sobre a resposta. Um planejamento fatorial completo consiste em uma matriz 2^k , onde as combinações de fatores k são investigadas em dois níveis (LUNDSTEDT et al., 1998). Um exemplo de planejamento fatorial completo está ilustrado na Tabela 1, onde apresenta 2 fatores, e os experimentos relacionados as possíveis combinações, sendo (+) o nível superior e (-) o nível inferior, para cada fator estudado.

Tabela 1 - Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo (2^2)

Experimentos	A	B
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

3.6.2. Planejamento Box-Behnken

Após uma avaliação do nível de significância dos fatores investigados uma metodologia de superfície de resposta pode ser utilizada para otimização dos experimentos. Assim, otimizar significa encontrar os valores para as variáveis em estudo que produzirão uma melhor resposta, isto é, encontrar uma região em que todos os fatores resultem nas melhores respostas (TEÓFILO, 2006).

O planejamento Box-Behnken é uma ferramenta quimiométrica bastante usada para otimização de métodos analíticos. Essa metodologia permite a construção de modelos quadráticos, dando os valores críticos do experimento, ou seja, valores otimizados do sistema em estudo. O planejamento Box-Behnken é considerada uma metodologias de superfície de resposta mais eficientes que outras formas, como, por exemplo, o composto central, sendo que a eficiência de um planejamento experimental é definida pela razão entre os números de coeficientes estimados pelo modelo e o número de experimentos (FERREIRA et al., 2007).

A matriz Box-Behnken é gerada a partir da função $N = 2k(k - 1) + Co$, sendo que N é o numero de experimentos, k é o número de fatores e Co é o número de pontos centrais. Assim, um exemplo dessa matriz pode ser observado na Tabela 2, sendo (+) o nível superior e (-) o nível inferior para cada fator estudado e (0) é a media dos dois níveis de cada fator determinado como ponto central.

Tabela 2 - Exemplo de matriz de planejamento Box-Behnken para 3 fatores

Experimento	A	B	C
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13 (PC*)	0	0	0
14 (PC*)	0	0	0
15 (PC*)	0	0	0

*PC – Ponto central

3.6.3. Resposta múltipla

O desenvolvimento de métodos analíticos, muitas vezes envolve duas ou mais respostas quimiométricas em sua otimização. Nestes casos, pode-se fazer o uso de respostas múltiplas. Estas respostas múltiplas são estabelecidas, a partir do sistema que está sendo otimizado. Dos métodos para obtenção de resposta múltipla o mais utilizado foi aquele proposto por Derringer e Suich (1980), o qual faz uso de uma função de desejabilidade D .

BALLUS et al. (2011), propuseram um procedimento para análise de compostos fenólicos em azeite de oliva extra-virgem por eletroforese capilar. Nesse foi aplicado o método do composto central para análise das superfícies de respostas e uma função foi criada a fim de se obter uma resposta avaliando os tempos de migração e a largura da base de cada pico do sinal analítico obtido.

ZAN, DE et al. (2011), desenvolveram um método empregando a cromatografia de íons de emparelhamento para a análise simultânea dos componentes nicarbazina em aditivos alimentares. Para isto, o sistema foi composto por quatro variáveis, incluindo a composição da fase móvel e temperatura do forno, a função foi aplicada para cinco respostas individuais obtidas no estudo.

Além da função de desejabilidade, outras funções vêm sendo aplicadas para obtenção de resposta múltipla, como no trabalho descrito por FERREIRA et al. (2003), que desenvolveram um sistema de pré-concentração em linha para a determinação das concentrações de cobre por FAAS. Na etapa de otimização do método uma função de múltipla resposta foi proposta baseada no sinal analítico obtido e o tempo de pré-concentração.

ARAGÃO et al. (2005), propuseram um método para pré-concentração de cádmio e chumbo utilizando extração em ponto nuvem. Uma função de resposta múltipla foi desenvolvida para determinar as condições experimentais adequadas para a pré-concentração simultânea desses dois íons. A função foi calculada utilizando a seguinte equação $MR = (abs_{Cd} / abs_{max-Cd}) + (abs_{Pb} / abs_{max-Pb})$, onde (abs_{Cd}) e (abs_{Pb}) são os sinais analíticos para cada experimento e (abs_{max-Cd}) e (abs_{max-Pb}) são os valores máximos de absorvância obtidos para o cádmio e chumbo, respectivamente, em todos os experimentos multivariados.

3.7. DETERMINAÇÃO DIRETA

Devido à complexidade da matriz, muitas vezes faz-se a necessidade de uma etapa de pré-tratamento da amostra. Contudo, estes processos não dispõem um tempo e custos elevados e em sua grande maioria requerem grandes quantidades de reagentes, gerando resíduos perigosos que podem contaminar as amostras (KORN et al., 2008). Contudo, a análise direta, ou seja, a determinação de analitos, sem decomposição da matriz, sejam estas líquidas, sólidas ou em suspensão, mostra-se vantajosa em comparação com os métodos que requerem digestão da amostra, diminuindo assim a perda de analito voláteis, minimizando as fontes contaminação e custos de análise (IVANENKO et al., 2012).

OLIVEIRA et al. (2011), desenvolveram um método para a determinação direta de Cu, Cd, Ni e Pb em substâncias húmicas aquáticas por GF AAS. As substâncias húmicas foram isoladas das amostras de águas ricas em matéria orgânica. A exatidão do método foi avaliada utilizando testes de adição e recuperação de analito. Todas as percentagens de recuperação de analitos variaram na faixa de 93-98%, com um desvio padrão relativo inferior a 4%.

AMORIM et al. (2010), aplicaram um método para determinação de molibdênio em leite e outros alimentos para crianças por ET AAS empregando a amostragem em suspensão. Nesse, foi utilizado nióbio como modificador químico permanente com co-injeção de európio. A exatidão foi avaliada por testes de adição e recuperação de analito e por análise de material de referência certificado. As concentrações de molibdênio variaram entre 0,034 e 1,57 $\mu\text{g g}^{-1}$.

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRAS

Foram obtidas treze amostras de vinagre de álcool para análise. Todas as amostras foram adquiridas em quatro diferentes cidades: Salvador, Jequié, Amargosa e Jaguaquara. Este número reflete as marcas de vinagre de álcool comercializadas nessas localidades. A Tabela 3 mostra os códigos estabelecidos para cada uma.

Tabela 3 – Código das marcas de amostras de vinagre de álcool avaliadas no trabalho.

Código	Local de fabricação	Local de coleta	Código	Local de fabricação	Local de coleta
Va1	Paulista – PE	Salvador – BA	Va8	Paulista – PE	Salvador – BA
Va2	Lagarto – SE	Salvador – BA	Va9	Paulista – PE	Salvador – BA
Va3	Paulista – PE	Salvador – BA	Va10	Aracaju – SE	Jaguaquara - BA
Va4	Lagarto – SE	Jaguaquara – BA	Va11	Valinhos – SP	Jequié - BA
Va5	Paulista – PE	Salvador – BA	Va12	Valinhos – SP	Jequié - BA
Va6	Paulista – PE	Salvador – BA	Va13	Paulista – PE	Jaguaquara - BA
Va7	F. de Santana - BA	Amargosa – BA			

4.2. LIMPEZA DE MATERIAL

Toda vidraria foi previamente descontaminada antes de sua utilização. Primeiramente, a vidraria foi imersa em uma solução de Extran 5% (MERCK, Alemanha) durante 24 horas. Em seguida, a vidraria foi enxaguada com água deionizada e imersa em uma solução de ácido nítrico 10% durante 48 horas. Por fim, foram lavadas com água ultrapura e colocada para secar.

5. DETERMINAÇÃO DIRETA DE CHUMBO EM VINAGRE DE ÁLCOOL POR ET AAS

5.1. INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho, todas as análises foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), modelo AAS ZEE nit 600 (Analytick Jena AG, Jena, Germany) com correção de fundo por efeito Zeeman. O equipamento dispõe de um atomizador que utiliza tubo de grafite com aquecimento transversal (THGA), portado de uma plataforma integrada (PIN) recoberta com grafite pirolítico (Analytik Jena AG), o que proporciona um aquecimento mais uniforme durante as análises. Para introdução das amostras no ET AAS, foi utilizado um auto-amostrador líquido de alta precisão, modelo MPE 60 (Analytick Jena AG).

Como fonte de radiação para as medidas experimentais, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco (HCL) de chumbo (Varian, Mulgrave, VA, Austrália), com uma intensidade de corrente de 5 mA operando com um comprimento de onda de 283,3 nm e largura da fenda espectral de 0,5 nm. Como gás de purga, foi utilizado argônio com alto grau de pureza de 99,997% (White Martins, Salvador-Bahia, Brasil), com uma taxa de fluxo de 2 L min⁻¹, durante todas as etapas, exceto na etapa de atomização, para a qual o fluxo de gás foi interrompido.

Os sinais analíticos foram medidos por valor de absorvância integrada (A_{int}), que se baseia no cálculo da área total do pico.

5.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de alto grau analítico. Os padrões de chumbo foram preparados a partir de sucessivas diluições de um padrão de chumbo de 1000 mg L⁻¹ (MERCK, Alemanha), em ácido nítrico 0,5%.

Para preparação das soluções padrões, utilizou-se água ultrapura obtido a partir de um sistema de purificação modelo Milli-Q Plus (Bedford, MA, USA), com resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Como modificador químico foram utilizados $5 \mu\text{g}$ de alumínio. Estudos anteriores demonstraram a eficiência do alumínio como modificador químico. Ferreira et al. (2011) utilizaram alumínio como modificador químico para determinação de chumbo em amostras de cachaça. DA SILVA et al. (2011) usaram alumínio como modificador permanente para determinação de cádmio em arroz.

5.3. OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL

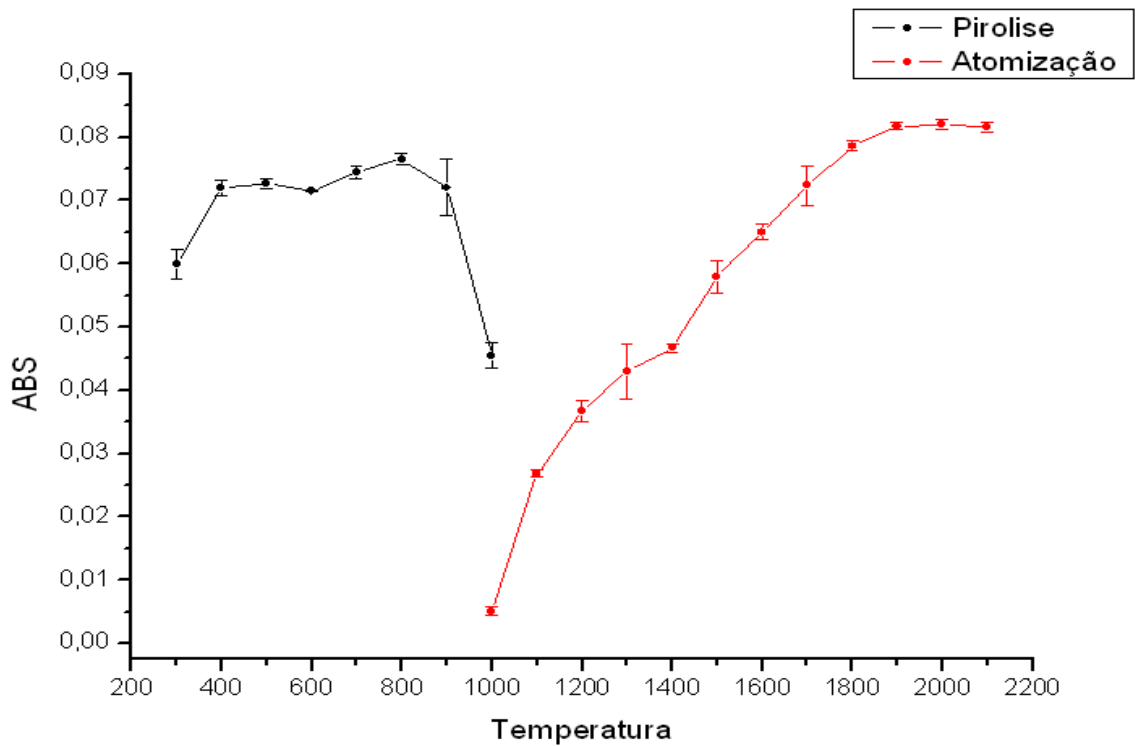
5.3.1. Otimização das temperaturas de pirólise e atomização

O estudo das melhores temperaturas de pirólise e atomização faz-se necessário para garantir que na etapa de pirólise toda a matriz, exceto o analito em estudo, foi eliminada, e na etapa de atomização todo analito seja atomizado em uma única etapa.

Para otimização das temperaturas de pirólise e atomização, nesta parte do trabalho, foi utilizada a amostra Va1 dopada com chumbo numa concentração final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Figura 2 mostra as curvas de pirólise e atomização que foram obtidas neste estudo. A temperatura de pirólise foi avaliada na faixa de 300 a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que a temperatura de atomização foi fixada em $2000 \text{ }^\circ\text{C}$. Já a temperatura de atomização foi investigada no intervalo de 1000 - $2100 \text{ }^\circ\text{C}$, fixando-se a temperatura de pirólise em $800 \text{ }^\circ\text{C}$. Durante todas as medidas, o tempo de pirólise e a massa de modificador foram fixados em 15 s e $5 \mu\text{g}$, respectivamente.

Figura 2– Curvas de temperaturas de pirólise e atomização, usando 5 µg de modificador químico alumínio e 15 s de tempo de pirólise.



A Tabela 4 mostra os valores de temperatura otimizados para a determinação de chumbo que foram utilizados em todas as análises.

Tabela 4 – Programa de temperatura utilizado para determinação de chumbo por ET AAS.

Etapas	Temperatura	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo
Secagem	90	10	10
Secagem	120	20	10
Pirólise	800	100	15
Atomização	2000	FP*	5
Limpeza	2550	FP*	5

*FP – Full Power

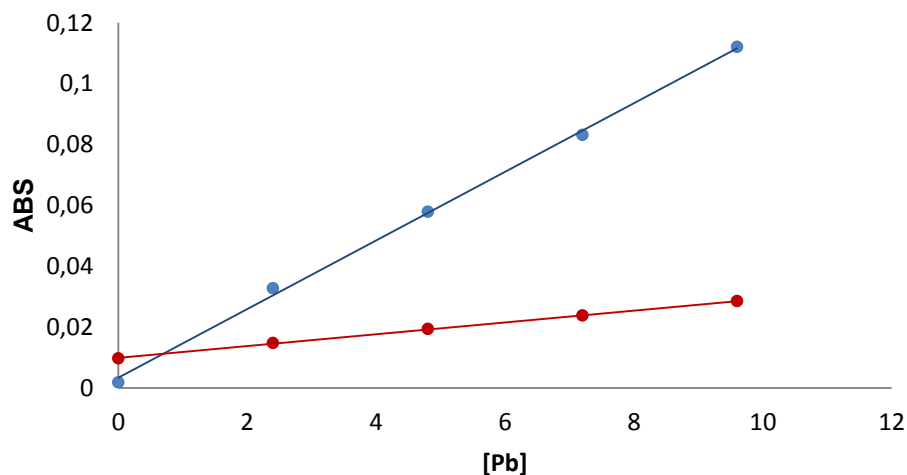
5.3.2. Curvas analíticas para avaliação do efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz é de suma importância para verificação e escolha da melhor técnica de calibração a ser utilizada, pois o mesmo pode gerar resultados falsos como interferências do sinal do analito de interesse.

5.3.2.1. Curva de calibração em ácido nítrico

Primeiramente, foi obtida uma curva de calibração externa usando padrões contendo ácido nítrico 0,5% (v/v) e as seguintes concentrações de chumbo: 0,0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva de calibração externa apresentou a equação $\text{ABS} = (0,01128 \pm 0,00076) [\text{Pb}] + (0,00335 \pm 0,00045)$, em um nível de confiança de 95%. A inclinação da curva analítica em meio ácido foi comparada com a inclinação da curva obtida pela técnica de adição de padrão, com adições de 0,0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, que apresentou a equação $\text{ABS} = (0,00194 \pm 0,00009) [\text{Pb}] + (0,00989 \pm 0,00050)$, em um nível de confiança de 95%. Pode-se observar que as inclinações das curvas são estatisticamente diferentes, o que impede a utilização da curva em meio ácido como técnica de calibração. Esta diferença pode ser observada na Figura 3.

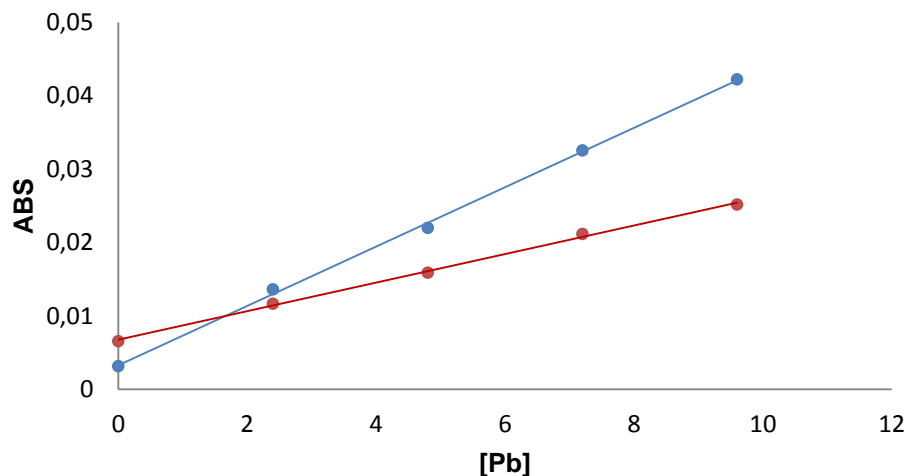
Figura 3 – Curvas de calibração externa em ácido nítrico 0,5% (—) e curva de adição de analito (—).



5.3.2.2. Curva de calibração em meio acético

Em outro teste, foi feita uma curva analítica em meio acético 4% (v/v) contendo as seguintes concentrações de chumbo: 0,0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva analítica obtida nestas condições apresentou a equação $\text{ABS} = (0,00404 \pm 0,00138) [\text{Pb}] + (0,00675 \pm 0,00085)$. Comparada com a curva obtida a partir da técnica de adição de padrão, que apresentou a equação $\text{ABS} = (0,00195 \pm 0,00024) [\text{Pb}] + (0,00676 \pm 0,00139)$, pode-se observar, que as inclinações das duas curvas são estatisticamente diferentes (Figura 4). Assim, a curva em meio acético também não pode ser usada como técnica de calibração para o método.

Figura 4 – Curvas de calibração externa em meio acético 4% v/v (—) e de adição de analito (—).

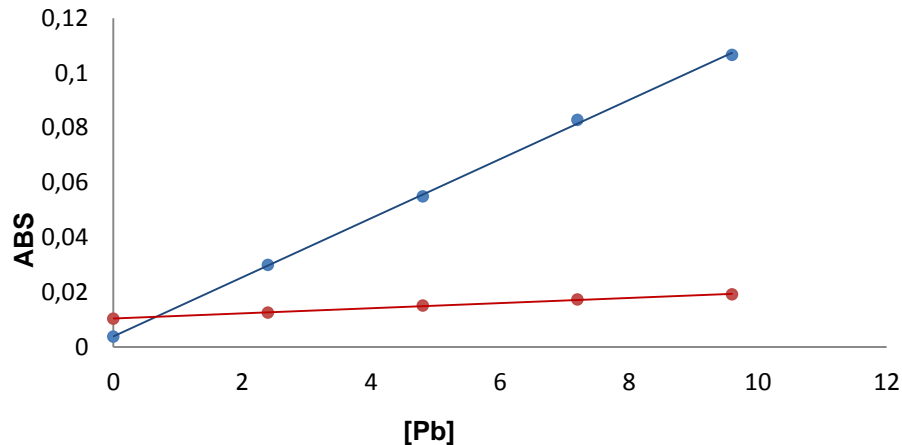


5.3.2.3. Curva de calibração em meio acético - alcoólico

Um terceiro teste foi realizado a fim de se obter um meio para a curva de calibração externa que apresentassem características mais próximas das amostras. Assim, foi feita uma curva de calibração externa em meio acético – alcoólico, de acordo com a composição percentual destes dois componentes existentes nas amostras. As duas curvas foram feitas nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente. Contudo, as inclinações das curvas também apresentaram diferenças significativas. Enquanto que a curva de calibração externa feita em meio acético –

alcoólico apresentou a equação $ABS = (0,01077 \pm 0,00042) [Pb] + (0,0039 \pm 0,0025)$, a equação da curva de adição de analito foi $ABS = (0,00187 \pm 0,00017) [Pb] + (0,01042 \pm 0,00049)$. A diferença entre as curvas pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 – Curvas de calibração externa em meio acético - alcoólico 4% v/v (—) e curva de adição de analito (—).



Pode-se observar que em todas as três curvas calibração com adição de padrão sempre apresentaram valores de inclinação menores do que a técnica de calibração externa. Isso leva a conclusão de que há uma interferência de matriz bastante acentuada na determinação direta de chumbo nas amostras de vinagre de álcool.

Desta forma, para determinação direta de chumbo nas amostras de vinagre de álcool, foram obtidas curvas de calibração empregando a técnica de adição de padrão no sentido de contornar as interferências causadas pela matriz das amostras. As curvas de calibração com a técnica de adição de analito nas amostras de vinagre de álcool foram construídas a partir de sucessivas adições do padrão de chumbo que variaram entre 2,4 a 9,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A tabela 5 mostra todas as curvas determinadas nas 13 amostras de vinagre de álcool.

Tabela 5 – Equação das curvas de calibração empregando a técnica de adição de padrão para as 13 amostras de vinagre de álcool.

AMOSTRA	EQUAÇÃO DA CURVA
AVa1	$ABS = (0,00195 \pm 0,00015) [Pb] + (0,0068 \pm 0,00085)$
AVa2	$ABS = (0,00224 \pm 0,00022) [Pb] + (0,0053 \pm 0,0013)$
AVa3	$ABS = (0,00237 \pm 0,00019) [Pb] + (0,0046 \pm 0,0011)$
AVa4	$ABS = (0,00187 \pm 0,00017) [Pb] + (0,0104 \pm 0,00049)$
AVa5	$ABS = (0,00164 \pm 0,00014) [Pb] + (0,00531 \pm 0,00051)$
AVa6	$ABS = (0,001190 \pm 0,000059) [Pb] + (0,0055 \pm 0,00021)$
AVa7	$ABS = (0,00343 \pm 0,00063) [Pb] + (0,0342 \pm 0,0011)$
AVa8	$ABS = (0,009928 \pm 0,000070) [Pb] + (0,0013 \pm 0,00025)$
AVa9	$ABS = (0,00175 \pm 0,00013) [Pb] + (0,0023 \pm 0,00046)$
AVa10	$ABS = (0,00177 \pm 0,00010) [Pb] + (0,0026 \pm 0,00037)$
AVa11	$ABS = (0,00252 \pm 0,00020) [Pb] + (0,0078 \pm 0,00073)$
AVa12	$ABS = (0,00173 \pm 0,00014) [Pb] + (0,0052 \pm 0,00050)$
AVa13	$ABS = (0,0014151 \pm 0,000059) [Pb] + (0,0013 \pm 0,00021)$

5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.4.1. Limites de detecção e de quantificação

Dentre as características que envolvem uma análise utilizando técnicas analíticas, têm-se os limites de detecção e de quantificação.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (IUPAC, 1978). O limite de detecção é usualmente calculado utilizando a equação:

$$LD = \frac{3\sigma}{s}$$

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser obtido por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (WELZ; SPERLING, 1999). Neste trabalho o limite de quantificação foi obtido através do desvio padrão do branco e calculado utilizando a equação:

$$LD = \frac{10\sigma}{s}$$

Onde, σ é o desvio padrão obtido através dos sinais analíticos de dez brancos e s é o coeficiente angular da inclinação da curva de calibração por adição de padrão da amostra V_{a1} .

Os sinais do branco foram obtidos através da injeção de 5 μg de modificado no tubo de grafite. Logo o limite de detecção do método foi de 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.4.2. Massa característica

Massa característica, pode ser definida como a massa necessária do analito que produzirá um sinal analítico com valor absorvância integrada será de 0,0044 s,

correspondente a 1 % de absorção (GONZÁLES et al., 1999) Logo, a massa característica foi obtida através da injeção de 20 µL de amostra no forno de grafite.

A massa característica é calculada utilizando a equação:

$$m_0 = \frac{\text{Volume de padrão injetado } (\mu\text{L}) * \text{Concentração característica } (\mu\text{g L}) * 0,0044}{\text{ABS média}}$$

onde, m_0 é a massa característica, ABS média é o sinal de absorvância integrada obtido através do padrão de chumbo utilizado. Assim, o valor encontrado para a massa característica foi de 26,4 pg.

5.4.3. Precisão

A precisão mede o grau de variação das respostas de um método analítico, originados através de valores obtidos por diversas repetições de um experimento utilizando a mesma amostra ou padrões. Pode-se obter a precisão de duas formas: através da repetitividade que mede o grau de semelhança entre os valores, a partir de respostas independentes obtidas utilizando o mesmo método e sob mesmas condições experimentais; e pode ser medida também através da reprodutibilidade que avalia as respostas independentes obtidos por outros métodos.

A precisão pode ser representada de várias formas. Uma delas é o desvio padrão relativo (RSD%) que pode ser calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{RSD} = \frac{\sigma}{\text{média}} 100\%$$

Sendo que, σ é o desvio padrão.

A precisão para a determinação direta de chumbo para três amostras de vinagre de álcool, sendo que foram feitas sete determinações repetitivas expressas em RSD%, foram de 2,22; 4,14 e 4,16, para uma concentração de chumbo de 3,43; 2,37 e 1,93, respectivamente.

5.4.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico pode ser considerada como o grau de concordância entre o valor real obtido através de um método em comparação com um valor de referência (GONZÁLEZ et al., 1999).

A exatidão pode ser obtida por diversas formas, sendo que três se destacam:

- Uso de material de referência certificado;
- Comparação dos valores entre métodos diferentes;
- Ensaio de recuperação de analito.

O uso de material de referência, dentre estas formas, baseia-se na análise do material pelo método proposto e comparação dos resultados obtidos com os valores certificados. Um dos problemas deste método é que, na sua grande maioria, são de alto custo e limitados a certos tipos de amostras.

A comparação de valores entre métodos diferentes, dentre as três formas, é a mais utilizada. Tem como objetivo analisar a mesma amostra utilizando outros métodos analíticos e, em seguida, promove-se a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, considerando-se um determinado nível de confiança. Mas nem sempre a processos de referência ou até mesmo a possibilidade de utilização de outros métodos.

Dentre as formas de exatidão citadas, o ensaio de recuperação de matriz é um método para validação de processos analíticos, confiável, simples e rápido. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de

determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BEATRIZ et al., 2004).

O estudo de recuperação consistiu na adição de diferentes concentrações conhecidas de analito a amostra e a determinação das mesmas. Assim pode ser calculado em forma percentual utilizando a equação

$$\text{Rec} = \frac{[\text{valor obtido} - \text{valor real}]}{\text{valor real}} \times 100$$

Neste trabalho, foi utilizado o método de recuperação de analito, devido a inexistência de material de referência certificado de vinagre de álcool e por apresentar diversas interferências na utilização de outros métodos.

Os valores de recuperação para chumbo em amostras de vinagre de álcool podem ser encontrados na Tabela 6, onde os valores de recuperação variaram de 95 a 110%.

Tabela 6 - Valores de recuperação para determinação de chumbo em amostras de vinagre de álcool.

AMOSTRA	RECUPERAÇÃO (%)	AMOSTRA	RECUPERAÇÃO (%)
AVa1	100	AVa8	108
AVa2	110	AVa9	90
AVa3	102	AVa10	97
AVa4	98	AVa11	95
AVa5	97	AVa12	101
AVa6	98	AVa13	103
AVa7	109		

5.5. DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE VINAGRE DE ÁLCOOL

Baseado nos resultados obtidos, pode-se determinar a concentração de chumbo nas 13 diferentes amostras vinagre de álcool por ETAAS a um nível de confiança de 95 % ,Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação de chumbo em vinagre de álcool utilizando determinação direta por ET AAS.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g L}^{-1}$)	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g L}^{-1}$)
AVa1	3,46 \pm 0,08	AVa8	0,13 \pm 0,01
AVa2	2,37 \pm 0,10	AVa9	1,31 \pm 0,07
AVa3	1,93 \pm 0,08	AVa10	1,45 \pm 0,06
AVa4	5,57 \pm 0,09	AVa11	3,23 \pm 0,08
AVa5	3,24 \pm 0,09	AVa12	3,03 \pm 0,08
AVa6	4,62 \pm 0,05	AVa13	0,94 \pm 0,04
AVa7	9,98 \pm 0,18		

6. DETERMINAÇÃO DIRETA DE CÁDMIO EM VINAGRE DE ÁLCOOL POR ET AAS

O uso de planejamento experimental para a otimização das condições instrumentais para métodos ET AAS vem sendo aplicado em alguns trabalhos, porém somente é utilizado a absorvância integrada como resposta quimiométrica. No entanto, a avaliação da forma do sinal analítico, geralmente, é feita de forma qualitativa, com base em observações da forma do pico, devido a isso se torna difícil a otimização através de um método de superfície de resposta, pois nem sempre o melhor sinal analítico está atribuída a melhor forma do pico.

FERREIRA et al. (2009), otimizaram um sistema para determinação de cádmio em vinhos brasileiros empregando um planejamento fatorial completo de 2 níveis, os fatores estudados foram tempo e temperatura de pirólise, temperatura de atomização e massa de modificador. A validação da metodologia de determinação direta empregando ET AAS foi estabelecida através de comparação dos valores obtidos com os valores encontrados pelo método de digestão ácida. Assim a concentração de cádmio variou de 0,146 a 1,563 $\mu\text{g L}^{-1}$,

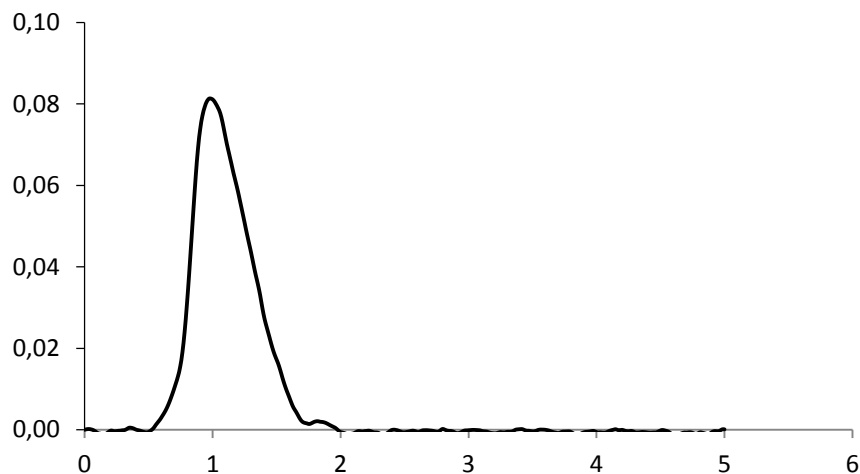
No trabalho de DIAS et al. (2006), foi empregado um método de determinação direta de chumbo em amostra de nafta por ET AAS, para isto a otimização das condições experimentais foi realizada utilizando planejamento fatorial 2^3 e os fatores estudados foram tempo e temperatura de pirólise, temperatura de atomização. Esta primeira etapa mostrou que apenas as temperaturas de pirólise e atomização eram significativas. Em seguida foi aplicado um planejamento fatorial 3^2 para estabelecer as condições críticas do sistema. Este método foi aplicado na determinação de chumbo em três amostras de nafta e os teores variam entre 2,7 a 5,7 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nesta etapa do trabalho, foi desenvolvida uma nova estratégia para avaliar qualitativamente e quantitativamente, os picos obtidos durante a otimização de um processo proposto para a determinação da concentração de cádmio em vinagre utilizando ET AAS.

6.1. RESPOSTA MULTIPLA IEQ (INDICE DE AVALIAÇÃO QUALITATIVA)

Para determinação de cádmio foi utilizado uma resposta múltipla, IEQ. Esta resposta baseou-se no sinal analítico que foram medidos por valores de absorvância integrada, A_{int} (área de pico) e perfil do sinal analítico obtido, ou seja, foi avaliado o perfil do pico obtido através do sinal de absorvância. Como o sinal analítico para absorção atômica em ET AAS é um sinal transiente, ou seja, em uma medida tem-se um máximo de absorção e depois um decaimento do sinal como mostra na Figura 6.

Figura 6 - Sinal analítico de referência para absorção atômica em ETAAS.



sendo assim, um sinal analítico ótimo para ET AAS seria aquele com um perfil estreito, ou seja, pouca cauda refletindo assim um processo de atomização mais rápido e efetivo.

A função utilizada nesta etapa do trabalho para calcular a resposta múltipla, foi construída para que todos os parâmetros estivessem contidos nela. Assim, a função baseou-se na soma da absorção pela razão da metade da altura do pico pela largura, para calcular a resposta utilizou-se a seguinte equação.

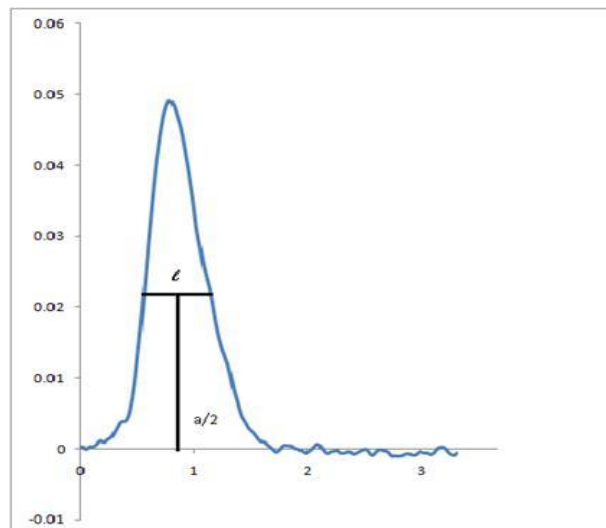
$$RM = A_{int} * +[(a/2)/l]*$$

onde:

- A_{int} - absorvância integrada
- a - altura do pico
- l - largura do pico

Para melhor visualização desta função, todas as variáveis estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Representação das variáveis no pico de absorção



6.2. INSTRUMENTAÇÃO

Durante a realização deste trabalho, todos os experimentos foram realizados utilizando o mesmo equipamento que foi empregado no trabalho anteriormente descrito.

Como fonte de radiação foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de cádmio (Varian, Mulgrave, VA, Austrália) com comprimento de onda de 228,8 nm e banda

espectral de 0,5 nm. Foi utilizado argônio como gás de purga, com pureza de 99,997 % (White Martins, Salvador, Brasil), com uma taxa de fluxo interno de 2,0 L min⁻¹, durante todas as etapas, exceto durante a atomização, no qual o fluxo foi interrompido.

6.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções e padrões utilizados foram preparados com água de alta pureza obtida por um sistema Mille-Q (Millipore, Bedford, EUA) com uma resistividade específica de 18 MΩ-cm. Todos os reagentes utilizados foram de alto grau analítico. Os padrões foram preparados a partir de sucessivas diluições de uma solução estoque de cádmio de 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) em ácido nítrico 0,5%. Alumínio foi utilizado como modificador químico.

6.4. OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL

Para determinação de cádmio em amostras de vinagre de álcool utilizando ET AAS, foi aplicado planejamento fatorial completo de dois níveis para avaliar a significância dos fatores estudados. O planejamento foi construído envolvendo as variáveis temperatura de atomização, temperatura de pirólise, tempo de pirólise e massa de modificador. Assim, a matriz correspondente ao planejamento fatorial completo para estes fatores, juntamente com seus valores reais e codificados estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz do planejamento fatorial completo 2⁴ para determinação de cádmio em amostras de vinagre.

Exp,	Py-t	At-t	Massa de modificador	Py-tempo	Abs,	IEQ	Abs-n	IEQ-n	Resposta Múltipla
1	-1 (400)	-1 (1300)	-1 (3)	-1 (5)	0,00975	0,00210	0,2092	0,0322	0,2414
2	-1 (400)	-1 (1300)	-1 (3)	1 (15)	0,00505	0,00400	0,1084	0,0621	0,1705
3	-1 (400)	-1 (1300)	1 (7)	-1 (5)	0,00298	0,00690	0,0639	0,1071	0,1710
4	-1 (400)	-1 (1300)	1 (7)	1 (15)	0,00117	0,00130	0,0251	0,0202	0,0453
5	-1 (400)	1 (1800)	-1 (3)	-1 (5)	0,04660	0,06090	1,0000	0,9457	1,9456
6	-1 (400)	1 (1800)	-1 (3)	1 (15)	0,04195	0,04970	0,9002	0,7717	1,6720
7	-1 (400)	1 (1800)	1 (7)	-1 (5)	0,04275	0,03210	0,9174	0,4984	1,4158
8	-1 (400)	1 (1800)	1 (7)	1 (15)	0,04124	0,02360	0,8850	0,3665	1,2514
9	1 (800)	-1 (1300)	-1 (3)	-1 (5)	0,01316	0,01730	0,2824	0,2686	0,5510
10	1 (800)	-1 (1300)	-1 (3)	1 (15)	0,01337	0,01150	0,2869	0,1786	0,4655
11	1 (800)	-1 (1300)	1 (7)	-1 (5)	0,00690	0,00400	0,1481	0,0621	0,2102
12	1 (800)	-1 (1300)	1 (7)	1 (15)	0,00663	0,00300	0,1423	0,0466	0,1889
13	1 (800)	1 (1800)	-1 (3)	-1 (5)	0,04288	0,06440	0,9202	1,0000	1,9202
14	1 (800)	1 (1800)	-1 (3)	1 (15)	0,03675	0,04590	0,7886	0,7127	1,5014
15	1 (800)	1 (1800)	1 (7)	-1 (5)	0,04367	0,03220	0,9371	0,5000	1,4371
16	1 (800)	1 (1800)	1 (7)	1 (15)	0,03850	0,04040	0,8262	0,6273	1,4535
17	0 (600)	0 (1550)	0 (5)	0 (10)	0,02831	0,00780	0,6075	0,1211	0,7286
18	0 (600)	0 (1550)	0 (5)	0 (10)	0,02812	0,00740	0,6034	0,1149	0,7183
19	0 (600)	0 (1550)	0 (5)	0 (10)	0,02929	0,00750	0,6285	0,1165	0,7450
20	0 (600)	0 (1550)	0 (5)	0 (10)	0,02857	0,00760	0,6131	0,1180	0,7311

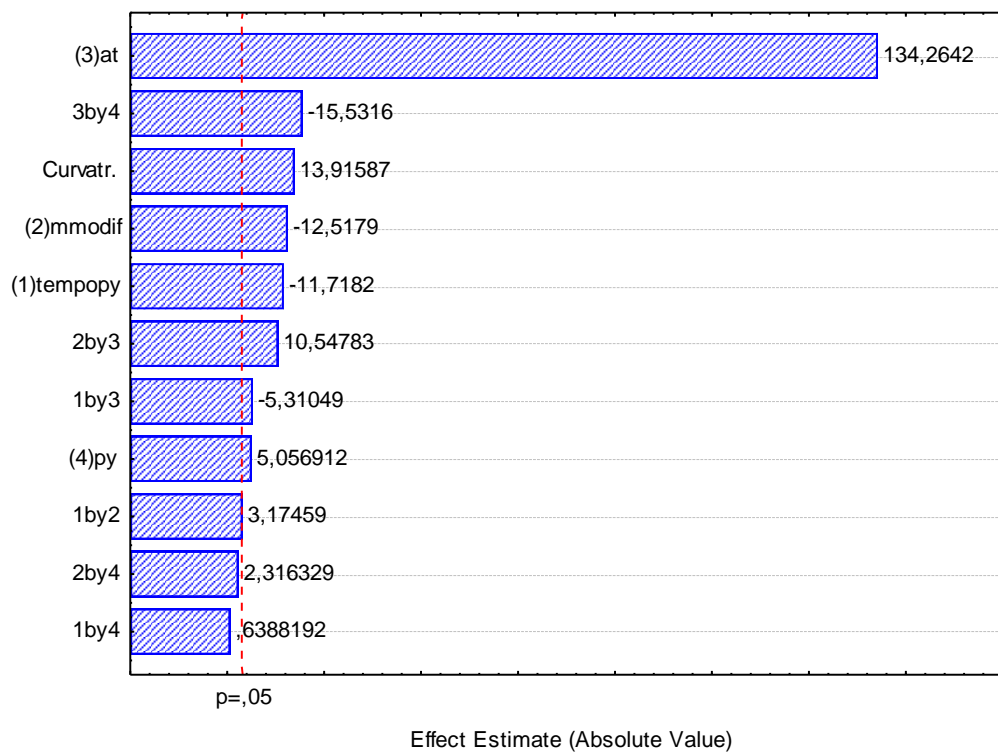
Py-t: temperatura de pirólise; At-t: Temperatura de atomização; Py-tempo: tempo de pirólise; Abs: absorvância integrada; IEQ: Índice de avaliação qualitativa; Abs-n ; normalização da absorvância integrada; IEQ-n: ; normalização do Índice de avaliação qualitativa.

Os valores de absorvância e a razão foram normalizados a fim de que os mesmos tivessem a mesma dimensão. Os valores normalizados foram obtidos dividindo-se todos os valores de absorvância e de razão pelo maior valor encontrado nas respostas, respectivamente. Assim, as respostas estão entre 0 e 1.

Diante desta matriz foi possível gerar três gráficos de Pareto para avaliar a significância do método e mostrar a concordância dos dados analisados.

Primeiramente, pode-se avaliar o planejamento estudado observando apenas os valores de absorvância. Logo para esta forma temos o gráfico de Pareto demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Gráfico de Pareto obtido usando a absorvância como única resposta.



O gráfico demonstra que todos os fatores estudados são estatisticamente significativos. Os valores dos efeitos são:

Temperatura de atomização = $0,03442 \pm 0,00082$

Massa de modificador = $- 0,00321 \pm 0,00082$

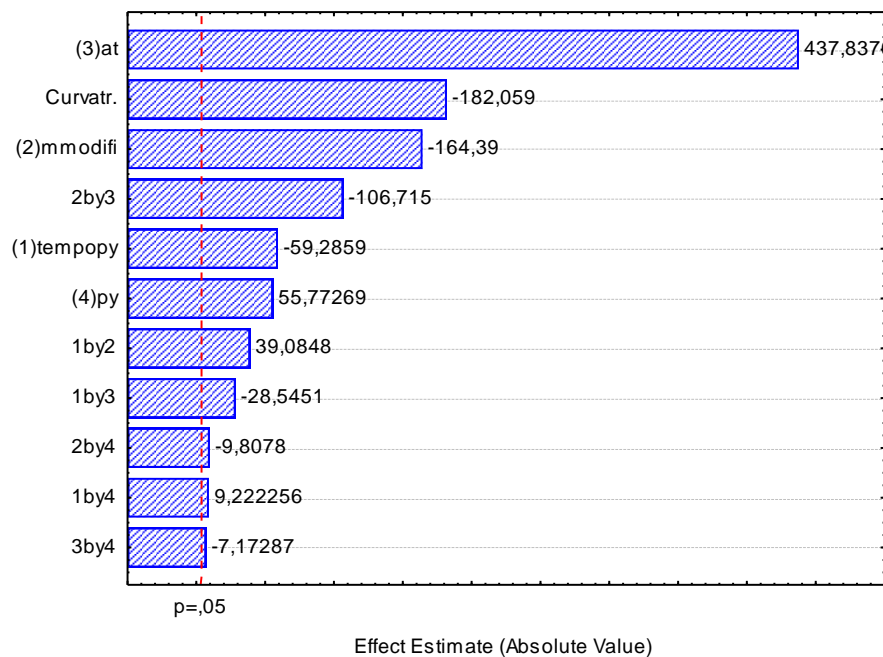
Tempo de pirólise = $- 0,00300 \pm 0,00082$

Temperatura de pirólise = $0,000130 \pm 0,00082$

Pode-se observar, que o fator que apresentou o maior efeito para este estudo foi a temperatura de atomização. Isso demonstra que quanto maior for a temperatura um maior número de átomos estarão livres na fase gasosa obtendo assim um melhor sinal de absorvância. Os outros valores por sua vez, também apresentaram efeito significativo para o domínio estudado, sendo que a temperatura de atomização foi o fator que apresentou o menor efeito.

Avaliando os fatores em relação ao perfil do sinal obtido, ou seja, o IEQ, gerou-se um gráfico de Pareto demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Gráfico de Pareto obtido usando o IEQ como única resposta



O gráfico de Pareto da Figura 9 demonstra similaridade com o gráfico utilizando somente a absorvância como resposta, Figura 8, onde para esta avaliação os fatores dos efeitos são:

$$\text{Temperatura de atomização} = 0,03739 \pm 0,00027$$

$$\text{Massa de modificador} = - 0,01404 \pm 0,00027$$

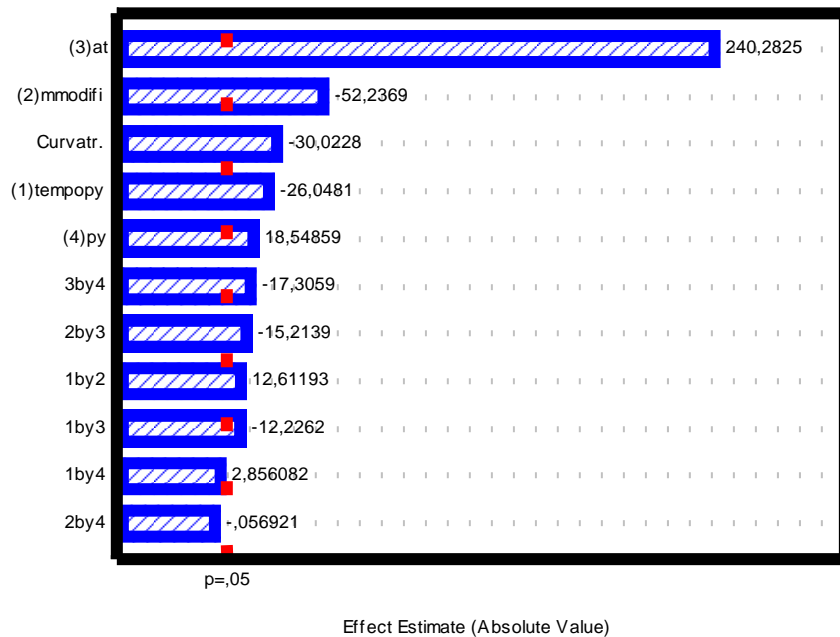
$$\text{Tempo de pirólise} = - 0,00506 \pm 0,00027$$

$$\text{Temperatura de pirólise} = 0,00476 \pm 0,00027$$

Novamente, o efeito da temperatura de atomização foi relativamente maior. Isso se explica pelo fato de que em temperaturas mais elevadas os átomos vão para uma fase gasosa mais rapidamente, influenciando diretamente na formação do pico de absorvância. Outro valor que apresentou um efeito relativamente alto foi a massa de modificador utilizada, para o qual um valor de massa menor produz resultados melhores. O modificador químico, é utilizado para se obter um tempo de residência maior do analito em estudo no forno, isso indica que menores valores de massa de modificado utilizados estão garantidos a permanência do analito no forno e liberando-os de uma forma mais rápida na etapa de atomização.

Através do planejamento fatorial utilizando a resposta múltipla, com os valores de absorvância e razão normalizado como resposta, pode-se então gerar o gráfico de Pareto para o método proposto, representado na Figura 10.

Figura 10 – Gráfico de Pareto obtido usando a resposta múltipla.



Avaliando o gráfico de Pareto utilizando a resposta múltipla observa-se que o sinal de absorvância e o perfil do pico obtido estão diretamente correlacionados. Este fato é explicado observando-se os três gráficos de Pareto obtidos, onde o fator que apresentou a maior significância foi a temperatura de atomização seguida por massa de modificador, tempo de pirólise e temperatura de pirólise.

Os valores dos efeitos para o planejamento 2^4 utilizando a resposta múltipla foram:

$$\text{Temperatura de atomização} = 1,319 \pm 0,017$$

$$\text{Massa de modificador} = - 0,286 \pm 0,017$$

$$\text{Tempo de pirólise} = - 0,143 \pm 0,017$$

$$\text{Temperatura de pirólise} = 0,101 \pm 0,017$$

Diante dos efeitos dos fatores avaliados, todos os fatores foram significativos, demonstrando então a aplicabilidade do método proposto.

A eficácia da resposta múltipla avaliando o sinal de absorvância juntamente com o IQE, pode ser observado através das Figuras 11 e 12 que representam os sinais dos experimentos 7 e 13.

Figura 11 – Sinal analítico do experimento 7 a uma temperatura de atomização de 1800° C, temperatura de pirólise de 400 °C, tempo de pirólise de 5 s e massa de modificador de 7 µg

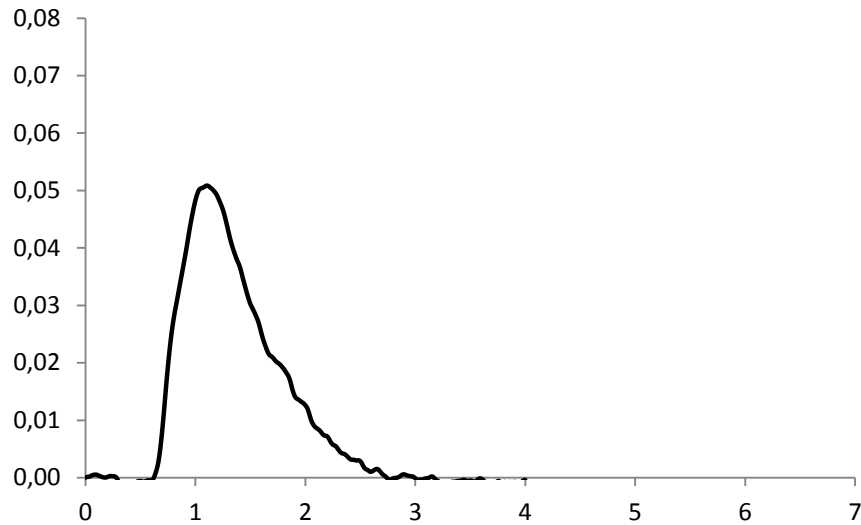
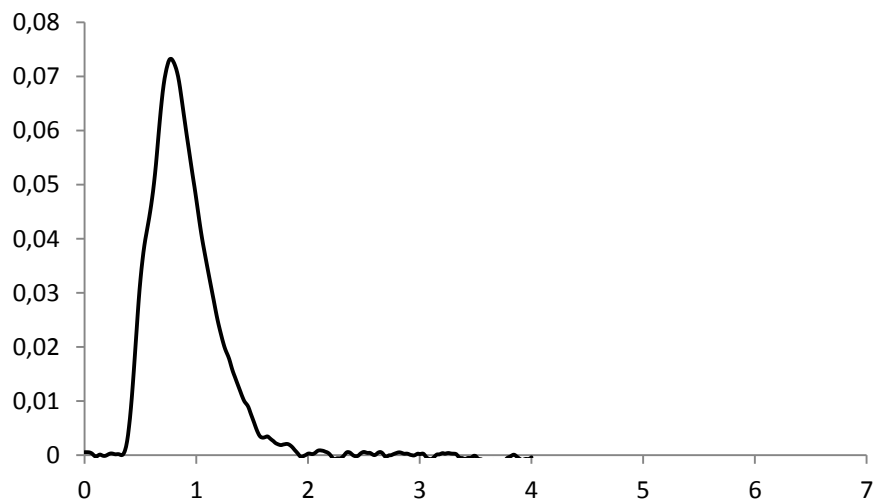


Figura 12 – Sinal analítico do experimento 13 a uma temperatura de atomização de 1800° C, temperatura de pirólise de 800 °C, tempo de pirólise de 5 s e massa de modificador de 3 µg.



Nestes dois casos, pode-se observar claramente que as formas dos dois picos de absorvância são bastante diferentes. Isso é demonstrado também pelo valor do IEQ, onde os valores para o experimento 7 e 13 são 0,03210 e 0,06440, respectivamente. Contudo, numa avaliação mais criteriosa, evidenciando os sinais de absorvância integrada para os experimentos 7 e 13, os valores são bastante semelhantes, 0,04275 e 0,04288, respectivamente). Logo estes aspectos mostram

mais um indicio da eficiência do método, isso é corroborado com a resposta múltipla obtida através da função criada, sendo que para o experimento 7 o valor é de 1,4158 e 1,9201 para o experimento 13 , o qual apresentou melhor resultado qualitativo.

Diante dos resultados obtidos, foi escolhido um novo domínio experimental para a determinação das condições ótimas utilizando o planejamento Box-Behnken para determinação de cádmio em amostras de vinagre de álcool. Os valores do novo domínio experimental estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Matriz do planejamento Box-Behnken.

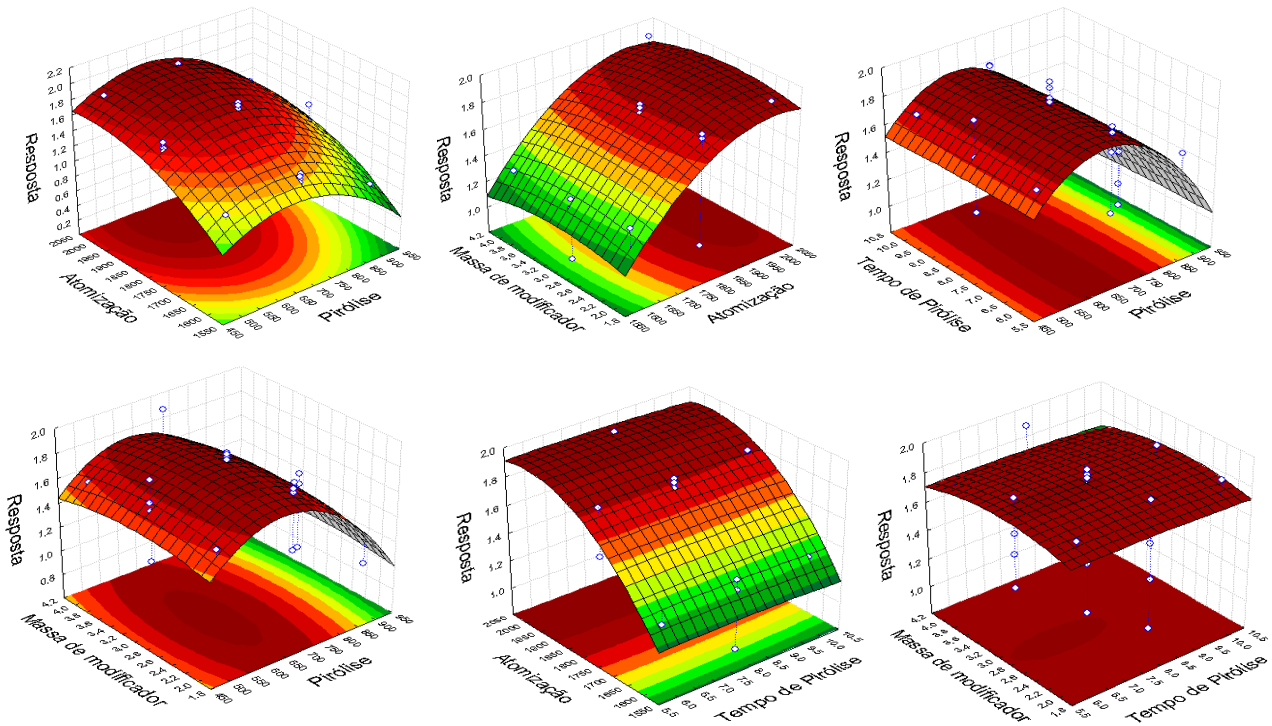
Exp,	Py-t	Py-time	At-t	Massa de Modificador	Abs	IEQ	Abs-n	IEQ-n	Resposta Múltipla
1	-1 (500)	-1 (6)	0 (1800)	0 (3)	0,04197	0,04819	0,9491	0,6711	1,6202
2	1 (900)	-1 (6)	0 (1800)	0 (3)	0,03170	0,05055	0,7169	0,7039	1,4814
3	-1 (500)	1 (10)	0 (1800)	0 (3)	0,04183	0,04863	0,9460	0,6772	1,6814
4	1 (900)	1 (10)	0 (1800)	0 (3)	0,02345	0,04803	0,5303	0,6688	1,2567
5	0 (700)	0 (8)	-1 (1600)	-1 (2)	0,04241	0,02660	0,9591	0,3704	1,3614
6	0 (700)	0 (8)	1 (2000)	-1 (2)	0,04073	0,06479	0,9211	0,9022	1,9010
7	0 (700)	0 (8)	-1 (1600)	1 (4)	0,04342	0,01987	0,9819	0,2767	1,2824
8	0 (700)	0 (8)	1 (2000)	1 (4)	0,03797	0,07181	0,8587	1	1,9447
9	0 (700)	0 (8)	0 (1800)	0 (3)	0,04175	0,05866	0,9441	0,8169	1,8313
10	-1 (500)	0 (8)	0 (1800)	-1 (2)	0,03874	0,04839	0,8761	0,6739	1,6079
11	1 (900)	0 (8)	0 (1800)	-1 (2)	0,01991	0,03741	0,4503	0,5210	1,0160
12	-1 (500)	0 (8)	0 (1800)	1 (4)	0,04422	0,03769	1	0,5249	1,5701
13	1 (900)	0 (8)	0 (1800)	1 (4)	0,02620	0,04402	0,5925	0,6130	1,2583
14	0 (700)	-1 (6)	-1 (1600)	0 (3)	0,04342	0,01773	0,9819	0,2469	1,2501
15	0 (700)	1 (10)	-1 (1600)	0 (3)	0,04262	0,02359	0,9638	0,3285	1,3206
16	0 (700)	-1 (6)	1 (2000)	0 (3)	0,03816	0,06612	0,8630	0,9208	1,8630

17	0 (700)	1 (10)	1 (2000)	0 (3)	0,03824	0,06522	0,8648	0,9080	1,8511
18	0 (700)	0 (8)	0 (1800)	0 (3)	0,04283	0,05265	0,9686	0,7332	1,7648
19	-1 (500)	0 (8)	-1 (1600)	0 (3)	0,03980	0,02049	0,9001	0,2853	1,2099
20	1 (900)	0 (8)	-1 (1600)	0 (3)	0,02276	0,02256	0,5147	0,3142	0,8560
21	-1 (500)	0 (8)	1 (2000)	0 (3)	0,03653	0,06869	0,8261	0,9566	1,8650
22	1 (900)	0 (8)	1 (2000)	0 (3)	0,02255	0,05830	0,5099	0,8119	1,3917
23	0 (700)	-1 (6)	0 (1800)	-1 (2)	0,04328	0,05553	0,9787	0,7733	1,8185
24	0 (700)	1 (10)	0 (1800)	-1 (2)	0,04148	0,06008	0,9380	0,8367	1,8466
25	0 (700)	-1 (6)	0 (1800)	1 (4)	0,04380	0,04594	0,9905	0,6397	1,6852
26	0 (700)	1 (10)	0 (1800)	1 (4)	0,04086	0,04931	0,9240	0,6867	1,6698
27	0 (700)	0 (8)	0 (1800)	0 (3)	0,04376	0,05403	0,9896	0,7524	1,8068

Py-t: temperature de pirólise; At-t: Temperatura de atomização; Py-tempo: tempo de pirólise; Abs: absorvância integrada; IEQ: Índice de avaliação qualitativa; Abs-n: normalização da absorvância integrada; IEQ-n: normalização do Índice de avaliação qualitativa.

Com os valores obtidos através do planejamento Box-Behnken, foram geradas as superfícies de resposta, que são apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Superfícies de respostas obtidas através da matriz Box Behnken.



O modelo matemático obtido pelo Box-Behnken foi utilizado para obter as condições de máximo utilizando a resposta múltipla como resposta quimiométrica. Assim os valores ótimos para as condições experimentais na determinação de cádmio para o intervalo estudado, estão indicados na Tabela 10

Tabela 10 – Valores das condições experimentais ótimas para determinação de cádmio em vinagre de álcool.

	Mínimo	Crítico	Máximo
Temperatura de pirólise	500	643.022	900
Tempo de pirólise	6	7.066	10
Temperatura de atomização	1600	1991.467	2000
Massa de modificador	2	3.025	4

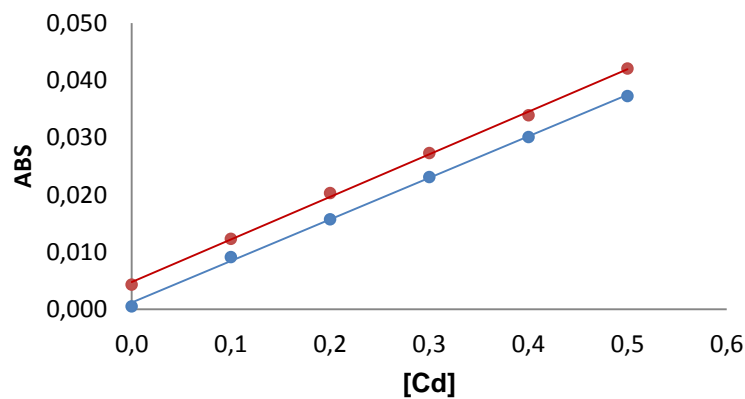
Como o software do GF AAS não permite adicionar estes valores, os valores utilizados para todo o restante do trabalho foram: temperatura de pirólise de 645 C°, tempo de pirólise de 7 s, temperatura de atomização de 2000C° e massa de modificador de 3 µg.

6.5. CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

Utilizando as condições otimizadas, foi avaliado o efeito de matriz, onde foram comparadas as inclinações das curvas de calibração externa e a de calibração com adição de padrão.

As duas curvas estão apresentadas na Figura 14.

Figura 14 – Curvas de calibração externa e calibração com adição de analito.



Assim, a curva de calibração externa apresentou a equação $Abs = (0.0726 \pm 0.0039)[Cd] + (0.0012 \pm 0.0010)$ e a curva de calibração com adição de padrão apresentou a equação $Abs = (0.0743 \pm 0.0035)[Cd] + (0.0048 \pm 0.0011)$. Como podem ser observadas, as inclinações das duas curvas não apresentaram diferença significativa com uma confiança de 95%. Este teste demonstra que a curva de calibração externa pode ser utilizada para a quantificação cádmio nas amostras de vinagre de álcool, pois não há interferência de matriz na determinação direta.

6.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

6.6.1. Parâmetros analíticos

O método proposto foi validado mediante a obtenção de seus parâmetros analíticos, como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão estimada como RSD(%) e massa característica. Os valores destes parâmetros são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores de LD, LQ, RSD (%), e massa característica para o método proposto.

LD	14,0 ng L ⁻¹
LQ	42,0 ng L ⁻¹
RSD	1,9%
Massa característica	1,2 pg

6.6.2. Exatidão

Devido à inexistência de material de referência certificado ou até mesmo um que apresentasse características próximas para vinagre, a exatidão do método proposto foi avaliada através da comparação dos resultados de concentração de cádmio obtidos pelo método direto com aqueles obtidos pelo método da digestão ácida. As amostras foram submetidas a digestão ácida em um sistema de refluxo (FERREIRA et al., 2013c), no qual foram utilizados 5 mL de amostras, 4 mL de ácido nítrico concentrado e 3 mL de peróxido de hidrogênio. A concentração de cádmio das amostras digeridas foram determinadas por ET AAS. A Tabela 12 mostra os valores de concentração de cádmio obtidos pelos dois métodos.

Tabela 12 – Comparação dos valores de concentração de cádmio obtidos pelo método de análise direta com o método de digestão

Amostra	Método direto (ng L⁻¹)	Desvio padrão	RSD(%)	N° de observações	Método de digestão (ng L⁻¹)	Desvio padrão
AV1	47,50 ± 1,60	0,64	1,35	3	48,49 ± 1,27	0,51
AV2	880 ± 19	20,54	2,33	7	890 ± 10	4,02
AV3	27,86 ± 1,09	0,44	1,58	3	28,78 ± 0,25	0,10
AV5	47,55 ± 0,47	0,51	1,07	7	45,92 ± 0,90	0,36
AV6	24,98 ± 1,02	0,41	1,64	3	24,57 ± 0,82	0,33
AV13	20,31 ± 0,97	0,39	1,92	3	20,01 ± 1,02	0,41

6.7. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

O método proposto para determinação de cádmio em amostras de vinagre de álcool foi aplicado nas 13 amostras citadas no item 4. As concentrações de cádmio obtidas para as amostras estão apresentados na Tabela 13. Todos os resultados foram avaliados a um nível de confiança de 95%.

Tabela 13 – Avaliação de cádmio em vinagre de álcool utilizando o método com resposta múltipla proposto.

Amostras	[Cd] ng L⁻¹	Amostras	[Cd] ng L⁻¹
Av1	47,50 ± 1,60	Av8	<LOQ
Av2	880 ± 19	Av9	<LOQ
Av3	27,86 ± 1,09	Av10	<LOQ
Av4	<LOQ	Av11	<LOQ
Av5	47,55 ± 0,47	Av12	<LOQ
Av6	24,98 ± 1,02	Av13	20,31 ± 0,97
Av7	<LOQ		

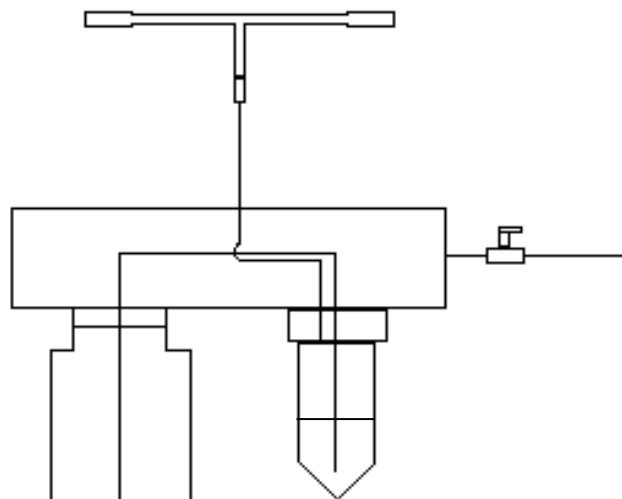
7. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM VINAGRE SE ÁLCOOL POR CV HR-CS AAS

7.1. INSTRUMENTAÇÃO

Para as medidas do teor de mercúrio, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha). Como fonte de radiação, o ContrAA 700 possuía uma lâmpada de arco curto de xenônio com alta intensidade de radiação operando no modo hot-spot, com uma intensidade de corrente de 13 A. O mesmo possui um monocromador duplo de alta resolução e um dispositivo de carga acoplada (CCD) como detector. Todas as medidas foram realizadas usando a linha principal do mercúrio, a qual possui comprimento de onda de 253,6519 nm. A medida do sinal analítico neste trabalho foi determinada através da altura do pico de absorvância.

Um sistema de geração de hidreto/vapor frio, módulo HS50 (Analytik Jena AG), como mostra na Figura 15, foi acoplado ao espectrômetro para geração de vapor frio de mercúrio.

Figura 15 - Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado e acoplado ao HR-CS AAS. Fonte: SILVA 2012



7.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de alto grau analítico. Os padrões de mercúrio foram preparados a partir de sucessivas diluições de um padrão de 1000 mg L⁻¹ (MERCK, Alemanha) em ácido nítrico 0,05%. Para preparação das soluções padrões, utilizou-se água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação de água modelo Milli-Q Plus (Bedford, MA, USA), com resistividade específica de 18,2 MΩ cm⁻¹.

A solução de hidróxido de sódio 0,05% (m/v), necessária para estabilização da solução de tetrahydroborato de sódio, foi preparada dissolvendo-se 0,50 g de hidróxido de sódio em água ultrapura para um volume final de 500 mL.

Uma solução de ácido clorídrico com concentração de 6,0 mol L⁻¹ foi preparada a partir da diluição de um ácido concentrado (MERCK, Alemanha) 37% em água ultrapura.

Solução de tetrahydroborato de sódio 1% (m/v) foi preparada em hidróxido de sódio 0,05%.

Soluções de tiouréia 1 % (m/v) utilizada no procedimento foram preparada a partir da dissolução de 0,25 g de tiouréia (MERCK, Alemanha) em água ultrapura.

7.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para o preparo das amostras, um volume de 12,5 mL de amostra de vinagre foi transferido, para um balão de 25 mL, e 3,10 mL de HCl concentrado foram adicionados para que atingisse uma concentração final de 1,5 mol L⁻¹. O sistema foi então submetido à sonicação em banho ultrassônico a uma temperatura de 50°C. Após sonicação e resfriamento, a solução foi avolumada com água ultrapura e 10 mL foram transferidas para frasco reacional (tubo de centrífuga 50 mL), ao qual foi adicionado de álcool isoamílico como antiespumante e em seguida foram feitas as análises. Na sequência, foram realizadas as medidas de mercúrio por HR-CS AAS usando o módulo HS 50 para geração de vapor frio. Para isso, 4 mL

de solução de redutora foram pneumaticamente injetados no frasco reacional, sendo o mercúrio (II) reduzido a Hg^0 . O vapor de mercúrio gerado foi então transportado para a célula de quartzo, pelo gás argônio, e a medida de Hg foi realizada em 253,6915 nm.

7.4. OTIMIZAÇÃO E RESULTADOS PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRA DE VINAGRE DE ÁLCOOL

A otimização das condições experimentais consiste na realização de diversos ensaios para que se tenha uma condição ótima para o sistema proposto. Para isso foi feito primeiramente um planejamento fatorial completo 2^4 , para analisar quais fatores possuíam significância e se havia interação entre eles. A partir destes dados foi aplicado um planejamento Box-Behnken para obtenção das condições ótimas do método proposto.

Como fatores foram analisados, volume de tetrahidroborato de sódio, volume álcool isoamílico, concentração de tiouréia e tempo de sonicação, assim como das interações entre eles. Os outros fatores inclusos neste trabalho, como concentração de ácido clorídrico, concentração e volume de tetrahidroborato de sódio, foram fixados utilizando as condições experimentais para geração de vapor frio de mercúrio, já otimizadas no trabalho de SILVA (2012b).

7.4.1. Planejamento fatorial completo 2^4

O planejamento fatorial completo 2^4 foi aplicado para estudos preliminares de quais fatores poderiam ser significantes no método proposto, juntamente com suas interações. Para isso foram utilizados 10 mL de amostra e em seguida, suas absorvâncias foram determinadas por HR-CS AAS. As respostas obtidas através dos experimentos foram avaliadas em termos de absorvância (altura de pico). A matriz do planejamento fatorial completo esta representada na Tabela 14.

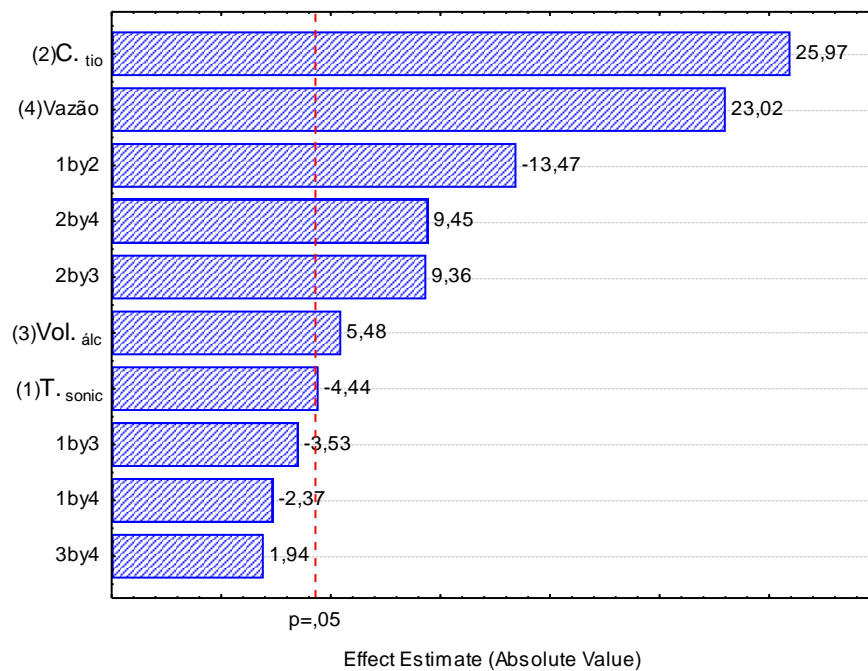
Tabela 14 - Matriz do planejamento fatorial completo (2^4) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.

Exp.	V. (mL min ⁻¹)	Vol. álcool*(μ L)	C. tio*(%)	T. sonic*(min)	Abs
1	+ (30)	+ (400)	+ (0,1%)	+ (40)	0,02111
2	+ (30)	+ (400)	+ (0,1%)	- (20)	0,03318
3	+ (30)	+ (400)	- (0,0%)	+ (40)	0,01209
4	+ (30)	+ (400)	- (0,0%)	- (20)	0,00795
5	+ (30)	- (200)	+ (0,1%)	+ (40)	0,01457
6	+ (30)	- (200)	+ (0,1%)	- (20)	0,02448
7	+ (30)	- (200)	- (0,0%)	+ (40)	0,01690
8	+ (30)	- (200)	- (0,0%)	- (20)	0,00831
9	- (14)	+ (400)	+ (0,1%)	+ (40)	0,01248
10	- (14)	+ (400)	+ (0,1%)	- (20)	0,01460
11	- (14)	+ (400)	- (0,0%)	+ (40)	0,00629
12	- (14)	+ (400)	- (0,0%)	- (20)	0,00707
13	- (14)	- (200)	+ (0,1%)	+ (40)	0,01098
14	- (14)	- (200)	+ (0,1%)	- (20)	0,01120
15	- (14)	- (200)	- (0,0%)	+ (40)	0,00688
16	- (14)	- (200)	- (0,0%)	- (20)	0,00658
Pc	0 (14)	0 (300)	0 (0,05%)	0 (30)	0,01922
Pc	0 (14)	0 (300)	0 (0,05%)	0 (30)	0,01836
Pc	0 (14)	0 (300)	0 (0,05%)	0 (30)	0,01970

* V – Vazão de boridreto (mL min⁻¹), Vol_{álc} – volume de álcool isoamilico, C_{tio} – concentração de tiourea e T. sonic – tempo de sonicação.

A partir das respostas obtidas através do planejamento fatorial completo foi possível gerar um gráfico de Pareto, a partir do qual se pode analisar a significância dos fatores investigados, bem como de suas interações.

Figura 16 – Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2⁴.



Analisando o gráfico de Pareto, pode-se observar que todos os fatores estudados foram significativos.

$$\text{Concentração da tiouréia} = 0,0088 \pm 0,0014$$

$$\text{Vazão do tetrahidroborato de sódio} = 0,0078 \pm 0,0014$$

$$\text{Volume de álcool isoamilico} = 0,0018 \pm 0,0014$$

$$\text{Tempo de sonicação} = - 0,0015 \pm 0,0014$$

O fator de maior significância foi à concentração da tiouréia, que apresentou um efeito positivo, isso quer dizer que, com o aumento da concentração da tiouréia tem-se uma maior resposta analítica, pois a tiouréia atua como agente complexante

para o mercúrio. Outro fator que apresentou um alto valor de significância foi a vazão de tetrahidroborato de sódio que teve um efeito positivo, ou seja, assim como a concentração da tiouréia, aumentando a vazão a resposta analítica também aumenta. Isso se ocorre, pois com um maior aumento de vazão uma quantidade maior de tetrahidroborato de sódio é injetada no tubo reacional, onde ocorre a redução de mercúrio de modo mais rápido. O tempo de sonicação não apresentou uma significância relevante, contudo sua interação com a concentração de tiouréia foi bastante significativa, isso ocorre devido ao fato de que, quanto maior o tempo de sonicação maior será a quantidade de mercúrio que será extraída da amostra e complexada com a tiouréia.

Diante dos resultados do planejamento fatorial completo 2^4 foi aplicado o planejamento Box-Behnken a fim de se obter as condições ótimas dos fatores em estudo (vazão tetrahidroborato de sódio, tempo de sonicação e concentração de tiouréia) para determinação de Hg em amostras de vinagre de álcool *in natura*.

7.4.2. Planejamento Box-Behnken

Para obter as condições ótimas para determinação de mercúrio em amostras de vinagre usando CV-HR AAS, foi construído um planejamento Box-Behnken com as três variáveis: vazão tetrahidroborato de sódio, tempo de sonicação e concentração de tiouréia. Isto gerou uma matriz com 15 experimentos. As variáveis e os seus respectivos domínios foram estabelecidos após a avaliação do gráfico de Pareto que foi obtido no planejamento fatorial 2^4 . Mesmo tendo valor significativo, o volume de álcool isoamílico foi fixado em 400 μL . A Tabela 15 mostra a matriz com os valores codificados e os valores reais dos fatores utilizados no planejamento Box-Behnken.

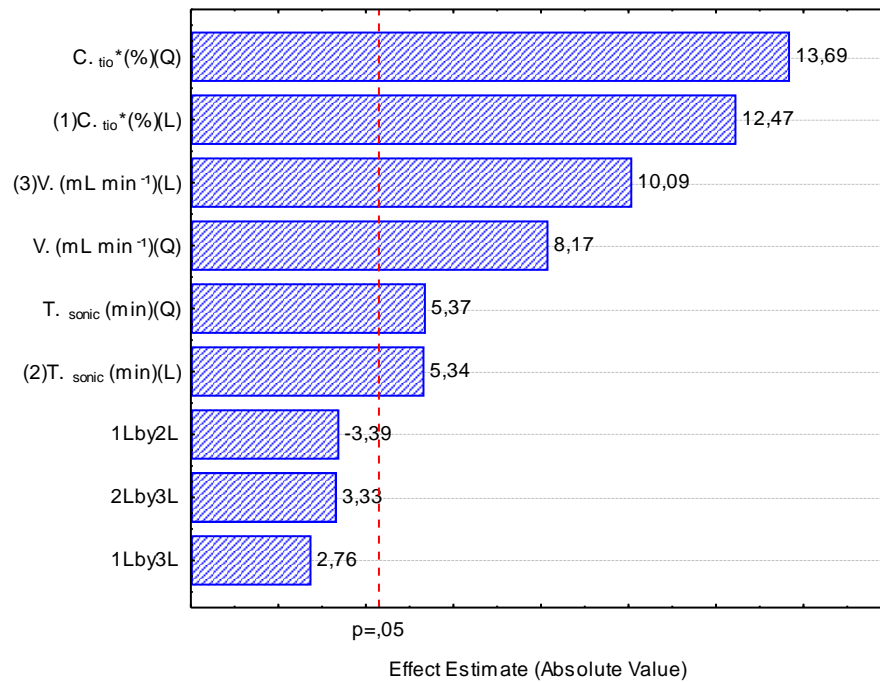
Tabela 15 – Matriz Box-Behnken para determinação de mercúrio.

Exp	C. tio*(%).	T. sonic*(min)	V. (mL min⁻¹)	ABS
1	-1 (0,2%)	-1 (5)	0 (35)	0,02283
2	1 (0,6%)	-1 (5)	0 (35)	0,03897
3	-1 (0,2%)	1 (25)	0 (35)	0,04258
4	1 (0,6%)	1 (25)	0 (35)	0,03677
5	-1 (0,2%)	0 (15)	-1 (22)	0,02160
6	1 (0,6%)	0 (15)	-1 (22)	0,01681
7	-1 (0,2%)	0 (15)	1 (48)	0,03543
8	1 (0,6%)	0 (15)	1 (48)	0,04846
9	0 (0,4%)	-1 (5)	-1 (22)	0,03046
10	0 (0,4%)	1 (25)	-1 (22)	0,03535
11	0 (0,4%)	-1 (5)	1 (48)	0,04306
12	0 (0,4%)	1 (25)	1 (48)	0,06946
Pc	0 (0,4%)	0 (15)	0 (35)	0,06730
Pc	0 (0,4%)	0 (15)	0 (35)	0,06415
Pc	0 (0,4%)	0 (15)	0 (35)	0,07062

* V – Vazão de boridreto (mL min⁻¹), Vol_{áic} – concentração de tioureia e T. sonic – tempo de sonicação.

A partir dos dados obtidos através dos experimentos, pode-se então gerar o gráfico de Pareto para o planejamento Box-Behnken e suas respectivas superfícies de resposta. A figura 16 mostra o gráfico de Pareto gerado através do planejamento.

Figura 17 - Gráfico de Pareto para o planejamento Box-Behnken



A Figura 17 mostra a significância de cada fator no planejamento Box-Behnken. Pode-se observar que todos os fatores foram significativos para o domínio experimental estudado, sendo que a tiouréia foi o fator mais significativo.

As Figuras 18, 19, 20 mostram as superfícies de resposta encontradas para o planejamento Box-Behnken.

Figura 18 – Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs tempo de sonicação vs concentração de tiouréia.

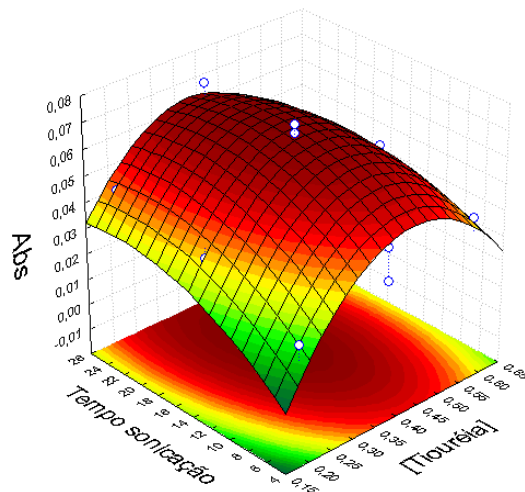


Figura 19 – Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs vazão tetrahydroborato de sódio vs concentração de tiouréia.

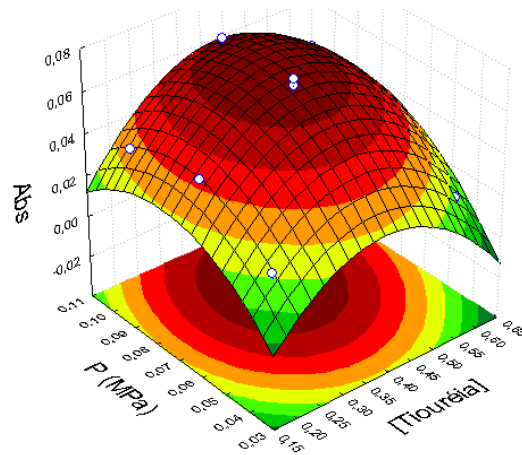
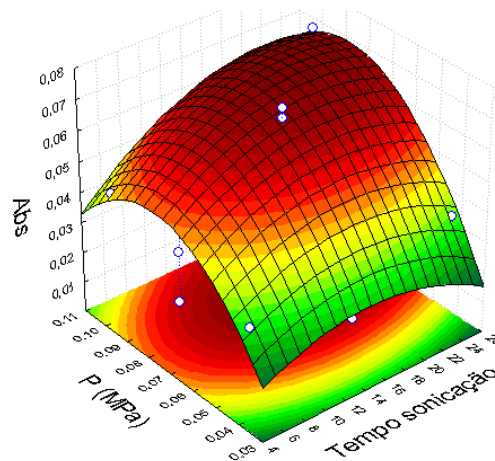


Figura 20– Superfície de resposta gerado a partir do planejamento Box-Behnken para ABS vs vazão tetrahydroborato de sódio vs tempo de sonicação.



Observando as Figuras 18, 19, 20, conclui-se que a região de ótimo dos fatores avaliados está dentro do domínio experimental estudado. Os valores otimizados para o método proposto foram: 41,48 mL min⁻¹ para vazão tetrahydroborato de sódio, 19,79 min para o tempo de sonicação e 0,41% para a concentração de tiouréia. Porém, devido a limitações do equipamento os valores foram aproximados.

A Tabela 16 mostra as condições ótimas para determinação de mercúrio em amostras de vinagre de álcool empregando o método proposto.

Tabela 16 – Condições ótimas para determinação de mercúrio em vinagre de álcool empregando CV-HR AAS.

Fator	Valores ótimos
[HCl]	1,5 mol L ⁻¹
[NaBH ₄]	1 %
Volume de NaBH ₄	4 mL
Volume de álcool isoamílico	400 µL
[Tiouréia]	0,4%
Tempo de sonicação	20 min
Vazão tetrahidroborato de sódio	42 mL min ⁻¹

A Tabela 17 apresenta a Análise de Variância (ANOVA) gerada a partir dos dados experimentais obtidos e mostra que para o domínio experimental estudado o método proposto não apresentou falta de ajuste.

Tabela 17 – ANOVA gerada a partir dos valores obtidos experimentalmente. Termos significativos estão destacados em vermelho.

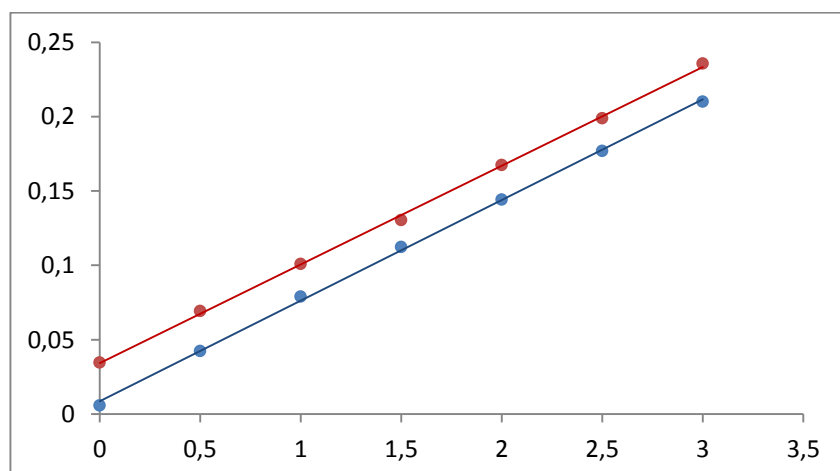
Fator	SS	f	MS	F	p
(1) C. tio*(%) L+Q	0,002002	2	0,001001	95,78812	0,010332
(2) T. sonic*(min) L+Q	0,000599	2	0,0003	28,67851	0,033694
(3) V. (mL min ⁻¹) L+Q	0,001761	2	0,00088	84,23935	0,011732
1*2	0,00012	1	0,00012	11,51966	0,076925
1*3	0,000079	1	0,000079	7,60025	0,11024

2*3	0,000116	1	0,000116	11,10354	0,079473
Falta de ajuste	0,000024	3	0,000008	0,77321	0,606489
Erro puro	0,000021	2	0,00001		
Total SS	0,00441	14			

7.5. CURVAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

A avaliação do efeito de matriz foi realizada a partir da comparação da inclinação da curva de calibração externa com a inclinação da curva obtida através da técnica de adição de padrão. A Figura 21 mostra as curvas obtidas através das duas técnicas. A curva de calibração externa apresentou a equação $ABS = (0,0677 \pm 0,0021) [Hg] + (0,0086 \pm 0,0039)$, enquanto a curva obtida pela técnica de adição de padrão apresentou a equação $ABS = (0,0664 \pm 0,0020) [Hg] + (0,0343 \pm 0,0037)$, ambas a um nível de confiança de 95%. Sendo assim, pode-se concluir que as inclinações das duas curvas são estatisticamente semelhantes, a um nível de confiança de 95%. Desta forma, pode-se aplicar a técnica de calibração externa para determinação de mercúrio em amostras de vinagre de álcool pelo método proposto

Figura 21 – Curvas de calibração externa em meio acético - alcoólico 4% v/v (-----) e curva de adição de analito (-----).



7.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

7.6.1. Precisão

A precisão do método proposto foi avaliada através dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e RSD(%), os valores são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Características analíticas para o método de determinação de mercúrio.

LD	14,0 ng L ⁻¹
LQ	47,0 ng L ⁻¹
RSD	3,1%

A linearidade da curva analítica também foi avaliada para propósitos de validação do método. Pode-se observar que o método apresentou uma faixa linear de concentração na faixa de 0,047-20 µg L⁻¹ de mercúrio.

Devido à inexistência de material de referência certificado ou até mesmo um material que apresentasse características similares à do vinagre, a exatidão do método proposto foi avaliada através da técnica de adição e recuperação de analito.

Os valores de recuperação para mercúrio em amostras de vinagre de álcool podem ser encontrados na Tabela 19, onde apresentaram valores em torno de 100%.

Tabela 19 - Valores de recuperação para determinação de mercúrio em amostras de vinagre de álcool.

Amostra Va5		
Adicionado	Concentração Hg (ng L⁻¹)	Recuperação (%)
0	398,25 (797,9)*	—
0,5	895,55	99
2,0	2346,25	97

* Valor real da amostra considerando o fator de diluição.

7.7. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE VINAGRE DE ÁLCOOL

O método proposto foi então aplicado para a análise das 13 amostras de vinagre álcool. Assim, os valores de concentração de mercúrio encontrados nas amostras analisadas estão dispostos na Tabela 20.

Tabela 20 – Concentração de mercúrio em amostras de vinagre de álcool obtidas pelo método proposto.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO Hg (ng L⁻¹)	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO Hg (ng L⁻¹)
1	318,5 ± 41,1	8	< LQ
2	218,6 ± 61,2	9	206,9 ± 32,5
3	330,3 ± 42,9	10	280,4 ± 61,8
4	286,7 ± 4,0	11	< LQ
5	797,9 ± 101,0	12	759,4 ± 46,7
6	567,3 ± 16,2	13	58,1 ± 25,6
7	486,5 ± 10,5		

8. CONCLUSÃO

A determinação de metais em vinagre torna-se de fundamental importância pelo seu extenso consumo, bem como a quantificação de metais que são tóxicos mesmo em níveis de traço.

Os métodos desenvolvidos para determinação de chumbo, cádmio e mercúrio em vinagre de álcool mostraram-se adequados para determinação destes metais, apresentando bons limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão satisfatórias.

A determinação direta mostrou-se satisfatória à medida que não houve necessidade de preparo de amostra minimizando, assim, fontes de contaminação da amostra, perdas de analitos voláteis, o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

Para o chumbo, o cádmio e o mercúrio os valores de concentração encontrados nas amostras de vinagre de álcool foram sempre menores que os valores estabelecidos pela legislação.

O método proposto para determinação direta de chumbo em amostras de vinagre de álcool por ET AAS demonstrou ser um método muito eficaz devido a sua sensibilidade e seletividade. Além de apresentar baixo limite de quantificação para determinação de chumbo.

O emprego da função IEQ para avaliar qualitativa e quantitativamente os sinais obtidos durante a otimização multivariada do método proposto para determinação das concentrações de cádmio em vinagre por ET AAS aplicando a resposta múltipla resposta quimiométrica foi satisfatório, além de apresentar gerar modelos que foram validados e se apresentaram bem ajustados aos dados experimentais.

O método proposto apresentou precisão e exatidão adequadas e tem um limite de quantificação, que é suficientemente baixo para a determinação das concentrações de cádmio em vinagre.

Para determinação de mercúrio em amostras de vinagre de álcool, o método proposto mostrou-se eficiente, obtendo boa precisão e exatidão e limites de quantificação adequados para a determinação deste metal.

O uso da otimização multivariada, apresentou ser uma ferramenta eficaz para otimização das variáveis experimentais que foram significativas para determinação de mercúrio por CV AAS.

O vinagre não possui uma legislação de controle específica, o mesmo é avaliado apenas pelo teor de acidez volátil, extrato seco reduzido, concentração de álcool, cinzas, cloretos e sulfatos (RIZZON; MIELE, 1998). Assim, o único modo de investigar se os teores de chumbo, cádmio e mercúrio encontrados nas amostras são toleráveis é fazendo uma comparação com outros tipos de alimentos que possuem características semelhantes, como bebidas alcoólicas fermentadas, sucos de frutas e xaropes naturais e bebida alcoólica fermento-destiladas.

REFERÊNCIAS

AMORIM, F. R.; FRANCO, M. B.; NASCENTES, C. C.; SILVA, J. B. B. Direct Determination of Molybdenum in Milk and Infant Food Samples Using Slurry Sampling and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 41–48, 2010.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE VINAGRE (ANAV). Disponível em: <http://www.anav.com.br/index.php>, acessado em: 19.08.2013.

ARAGÃO, N. M. DE; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; FERREIRA, S. L. C.; ANDRADE, J. B. DE. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 67, n. 5, p. 1007–13, 2005.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; Bruns, Roy E.; GODOY, H.T. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, p. 1181-1187, 2011

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine -- a review. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60–70, 2008.

BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; SALES, C.; JARDIM, F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

BORGES, A. R.; BECKER, E. M.; LEQUEUX, C.; et al. Method development for the determination of cadmium in fertilizer samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 7, p. 529–535, 2011. Elsevier B.V.

BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. n. 1, 2005.

CALDAS, L. F. S.; PAULA, C. E. R. DE; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Application of a four-variables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. **Fuel**, v. 105, p. 503–511, 2013.

CALLEJÓN, R. M.; AMIGO, J. M.; PAIRO, E.; et al. Classification of Sherry vinegars by combining multidimensional fluorescence, parafac and different classification approaches. **Talanta**, v. 88, p. 456–62, 2012.

CHARY, N. S.; KAMALA, C. T.; RAJ, D. S. S. Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 513–24, 2008.

CHOI, Y.-S.; AHN, B. J.; KIM, G.-H. Extraction of chromium, copper, and arsenic from CCA-treated wood by using wood vinegar. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 328–31, 2012.

CORY-SLECHTA, D. A.; WEISS, B.; COX, C. Performance and exposure indices of rats exposed to low concentrations of lead. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 291–9, 1985.

DA SILVA, D. G.; JUNIOR, MARIO M. S.; SILVA, L. O. B.; PORTUGAL, L. A.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2495-2500, 2011

DE JESUS, R. M.; JUNIOR, M. M. S.; MATOS, G. D.; DOS SANTOS, A. M. P.; FERREIRA, S. L. C. Validation of a digestion system using a digester block/cold finger system for the determination of lead in vegetable foods employing electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 3, p. 942-946, 2011

DESSUY, M. B.; DE JESUS R. M.; BRANDÃO G. C.; FERREIRA, S.L.C.; VALE, M. G.; WELZ, W. , Fast sequential determination of antimony and lead in pewter alloys using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Food Additives And Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 30, n. 1, p. 202-207, 2013

DERRINGER, G.; SUICH, R. SIMULTANEOUS-OPTIMIZATION OF SEVERAL RESPONSE VARIABLES. **Journal Of Quality Technology**. v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980

DIAS, F. D. S.; SANTOS, W. N. L. DOS; COSTA, A. C. S.; et al. Application of multivariate techniques for optimization of direct method for determination of lead in naphtha and petroleum condensate by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 158, n. 3-4, p. 321–326, 2006.

DIETRICH, K. N.; RIS, M. D.; SUCCOP, P. A; BERGER, O. G.; BORNSCHEIN, R. L. Early exposure to lead and juvenile delinquency. **Neurotoxicology And Teratology**, v. 23, n. 6, p. 511–8, 2001.

D'ULIVO, A.; DEDINA, J. Interferences in hydride atomization studied by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 481 – 498, 1996.

FERREIRA, S. L.; BEZERRA, M. A.; DOS SANTOS, W. N.; NETO, B. X. Application of Doehlert designs for optimisation of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 61, n. 3, p. 295-303, 2003

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A.S.; DOS SANTOS W. N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–86, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; JESUS, R. M. DE; MATOS, G. D.; ANDRADE, J. B. DE; BRUNS, R. E. Multivariate Optimization and Validation of an Analytical Method for the Determination of Cadmium in Wines Employing ET AAS. , v. 20, n. 4, p. 788–794, 2009.

FERREIRA, S. L.C. ; SILVA, L. O.B. ; DE SANTANA, F. A. ; JUNIOR, MARIO M.S. ; MATOS, GE. D. ; DOS SANTOS, W. N.L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307-310, 2013.

FERREIRA, S. L. C.; PORTUGAL, L. A.; MATOS, G. D.; DA SILVA, D. G.; DE JESUS, R. M.; BRITO, G. B. Aluminium as chemical modifier for the determination of lead in sugar cane spirits using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 3, n. 5, p. 1168-1171, 2011.

FRANCHI, N.; BALLARIN, L. Influence of cadmium on the morphology and functionality of haemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. **Comparative Biochemistry And Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, v. 158, n. 1, p. 29–35, 2013.

FRESCHI, G. P. .; DAKUZAKU, C. S.; MORAES, M. DE; NÓBREGA, J. A; GOMES NETO, J. A. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 10, p. 1987–1993, 2001.

GUNEY, M.; WELFRINGER, B.; DE REPENTIGNY, C.; ZAGURY, G. J. Children's Exposure to mercury - Contaminated Soils: Exposure Assessment and Risk Characterization. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 65, n. 2, n. 345-355, 2013.

HAESE, P. C. D.; LANDEGHEM, G. F. VAN; LAMBERTS, L. V; BROE, E. DE. Mikrochimica Acta HPLC-AAS Hybrid Technique for Studying the Speciation of Trace Metals (Al , Fe , Si , Hg) in Biological Fluids : A Review of Applications , Recent Experiences and Perspectives. , v. 90, p. 83–90, 1995.

HONG, D.; CHO, S. H.; PARK, S. J.; KIM, S. Y.; PARK, S. B. Hair mercury level in smokers and its influence on blood pressure and lipid metabolism. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 103–7, 2013.

IVANENKO, N. B.; SOLOVYEV, N. D.; IVANENKO, A. A; GANEEV, A. A. Application of Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry with high-frequency modulation polarization for the direct determination of aluminum, beryllium, cadmium, chromium, mercury, manganese, nickel, lead, and thallium in human blood. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 63, n. 3, p. 299–308, 2012.

KORN, M.G.A. ; CASTRO, Jacira Teixeira ; BARBOSA, J.T.P. ; MORTE, E. S. B. ; TEIXEIRA, A. P. ; WELZ, B. ; SANTOS, W. P. C. ; Fernandes, A.P. ; Santos, E.B.G.N. ; KORN, Mauro . Sample Preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods- A Review. *Applied Spectroscopy Reviews* (Softcover ed.), v. 43, p. 67-92, 2008

LAIRD, B. D.; VAN DE WIELE, T. R.; CORRIVEAU, M. C.; JAMIESON, H. E.; PARSONS, M. B.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environmental science & technology*, v. 41, n. 15, p. 5542-5547, 2007

LEMONS, V. A.; FERREIRA, S. L. C. On-line preconcentration system for lead determination in seafood samples by flame atomic absorption spectrometry using polyurethane foam loaded with 2- (2-benzothiazolylazo) -2- p -cresol. , v. 441, p. 281–289, 2001.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters – A Review. ***Analytica Chimica Acta***, v. 663, p. 127-138, 2010.

LIMA, D. C.; MATOS, G. D.; BARBOSA, J. T. P.; GRASSI, M. T.; KORN, M. G. A.; DE ANDRADE, J. B. . ; FERREIRA, S. L. C.. A separation system for lead fractionation in river water using electrothermal atomic absorption spectrometry. ***Journal of Analytical Atomic Spectrometry***, v. 28, p. 156-160, 2012.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; et al. Experimental design and optimization. ***Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems***, v. 42, n. 1-2, p. 3–40, 1998.

MARRUFO-CURTIDO, A.; CEJUDO-BASTANTE, M. J.; DURÁN-GUERRERO, E.; et al. Characterization and differentiation of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE–GC–MS). ***LWT - Food Science and Technology***, v. 47, n. 2, p. 332–341, 2012.

MECCA, F.; ANDREOTTI, R.; VERONELLI, L. L'aceto: tecnologia industriale e tradizionale impiego nell'industria conserviera utilizzazione in cucina. 1. ed. Brescia, 1979.

MENA, C.; CABRERA, C.; LORENZO, M.L. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: Possible sources of contamination. ***Science of the total environment***, v. 181 n. 3 p. 201-208 2013

MENDIL, D.; KIRIS, T.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Separation-preconcentration of Cu, Cd, Pb and Ni in various water and food samples on Sepabeads SP-207. ***International Journal of Food Science & Technology***, v. 48, n. 6, p. 1201–1207, 2013.

MENG, S.; WANG, J.; FAN, Y.; ZHAO, Q.; GUO, Y. Spectrophotometric determination of trace mercury(II) in cereals with 2,4-bis(4-

phenylazophenylaminodiazo)benzenesulfonic acid. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 488–494, 2013.

MOREIRA, F.; MOREIRA, J. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004.

MOREIRA, F. R., MOREIRA, J. C., A Importância da Análise de Especificação do Chumbo em Plasma para a Avaliação dos Riscos à Saúde. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 2, 251-260, 2004

NDUNG'U, K.; HIBDON, S.; FLEGAL, A R. Determination of lead in vinegar by ICP-MS and GFAAS: evaluation of different sample preparation procedures. **Talanta**, v. 64, n. 1, p. 258–263, 2004a.

ODA, C. E.; INGLE, J. D. CONTINUOUS-FLOW COLD VAPOR ATOMIC-ABSORPTION DETERMINATION OF MERCURY. **ANALYTICAL CHEMISTRY**. v. 53, n. 13, p. 2030-2033, 1981

OLIVEIRA, A. P. DE; VILLA, R. D.; GOVEIA, D.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H. Direct Determination of Cu , Cd , Ni and Pb in Aquatic Humic Substances by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. , p. 220–224, 2011.

OLIVEIRA, S. R. DE; NETO, J. A. G. Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of Pd/Mg(NO₃)₂. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1046–1050, 2007.

OYMAK, T.; TOKALIOĞLU, Ş.; YILMAZ, V.; KARTAL, Ş.; AYDIN, D. Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1314–1317, 2009a.

PORTUGAL, L. A.; MATOS, G. D.; LIMA, D. C.; et al. Determination of lead in aluminum and magnesium antacids using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 29–31, 2011.

QUITERIO, S. L.; FÁTIMA, M. DE; MOREIRA, R. Uso da poeira e do ar como indicadores de contaminação ambiental em áreas circunvizinhas a uma fonte de emissão estacionária de chumbo Use of dust and air as indicators of environmental pollution in areas adjacent to a source of stationary lead emission. , v. 17, n. 3, p. 501–508, 2001.

REGMI, U.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques. **Analytica chimica acta**, v. 732, p. 137–44, 2012.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, n.1 / 2, p. 25-31, 1998

SAEI-DEHKORDI, S. S.; FALLAH, A. A.; GHAFARI, E. Determination of Lead, Cadmium, Copper, and Zinc Content in Commercial Iranian Vinegars Using Stripping Chronopotentiometry. **Food analytical methods**, v. 5, n. 4, p. 767–773, 2011.

SALEMI, A.; SHAFIEI, E.; VOSOUGH, M. Optimization of matrix solid phase dispersion coupled with gas chromatography electron capture detection for determination of chlorinated pesticides in soil. **Talanta**, v. 101, p. 504–9, 2012.

SATARUG, S., MOORE, M.R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environmental health**, p. 1099–1103, v.112 2004.

SENGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). **International journal of food microbiology**, v. 96, n. 3, p. 301–5, 2004.

SILVA, D. G. DA; PORTUGAL, L. A; SERRA, A. M.; FERREIRA, S. L. C.; CERDÀ, V. Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry. **Food chemistry**, v. 137, n. 1-4, p. 159–63, 2013.

SILVA, L. O. B, estratégias analíticas para minimização da etapa de preparo de amostra para determinação de mercúrio em amostras alimentícias e ambientais. Dissertação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SILVA, L. O. B.; SILVA, D. G.; LEO, D. J.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Slurry Sampling for the Determination of Mercury in Rice Using Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **Food analytical methods**, v. 5, n. 6, p. 1289–1295, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12161-012-9371-0>>. Acesso em: 20/8/2013.

SILVIA, M.F.C. Biodisponibilidade de nutrientes. 3º Ed. atual. E ampl.-Barueri, SP: Manole, 2009.

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

SOLIDIFIED, U. E.; ORGANIC, F.; ATOMIC, F.; SPECTROMETRY, A. Ultrasound-Assisted Emulsification Solidified Floating Organic Drop Microextraction for the Determination of Trace Cadmium in Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. , v. 22, n. 3, p. 446–453, 2011.

SQUID, G.; SOUAYED, N.; YAKTITI, F.; MAAROUFI, K. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 89, p. 1–7, 2013.

STELZLENI, A. M.; PONRAJAN, A.; HARRISON, M. A. Effects of buffered vinegar and sodium dodecyl sulfate plus levulinic acid on *Salmonella Typhimurium* survival, shelf-life, and sensory characteristics of ground beef patties. **Meat science**, v. 95, n. 1, p. 1–7, 2013.

TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, n. 1-2, p. 11–19, 2005.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L. DOS; et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58–67, 2009.

REINALDO F. T.; FERREIRA, M. M. C. Teófilo, r. F. Quimiometria ii: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TOKALIOĞLU, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2504–8, 2012.

TOXICOLOGICAL PROFILE FOR LEAD U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry August 2007

TUZEN, M.; SOYLAK, M.; PARLAR, K. Cadmium and lead contamination in tap water samples from Tokat, Turkey. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 75, n. 2, p. 284–9, 2005.

ULUSOY, H. İ.; AKSOY, Ü.; AKÇAY, M. Simultaneous pre-concentration of Pb and Sn in food samples and determination by atomic absorption spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 4, p. 725–733, 2013.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 79, n. 1-4, p. 241–4, 2000.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3^a ed. Weinheim, Germany: VCH, 1999.

ZAN, M. M. DE; TEGLIA, C. M.; ROBLES, J. C.; GOICOECHEA, H. C. A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives: chemometric tools for improving the optimization and validation. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 142–50, 2011.