UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estratégias analíticas para a determinação direta de alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Simone Soares de Oliveira Borges

Área de concentração: Química Analítica
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Nívia Maria Melo Coelho
Co-Orientador: Prof. Dr. José Bento Borba da Silva

Uberlândia
2016

SIMONE SOARES DE OLIVEIRA BORGES

Estratégias analíticas para a determinação direta de alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Nívia Maria Melo Coelho
Co-Orientador: Prof. Dr. José Bento Borba da Silva

UBERLÂNDIA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B732e
2016

Borges, Simone Soares de Oliveira, 1964-
Estratégias analíticas para a determinação direta de alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite / Simone Soares de Oliveira Borges. - 2016.
96 f. : il.

Orientadora: Nívia Maria Melo Coelho.
Coorientador: José Bento Borba da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Metais - Teses. 3. Cerveja - Análise - Teses. 4. Vinho - Análise - Teses. I. Coelho, Nívia Maria Melo. II. Silva, José Bento Borba da. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 55/PPQUI.

DATA: 26/08/2016
DISCENTE: Simone Soares de Oliveira Borges **MATRÍCULA:** 11213QMI011
TÍTULO DO TRABALHO: Estratégias analíticas para a determinação direta de alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química
LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estratégias analíticas para especiação química.

Às oito horas do dia vinte e seis de agosto do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Frederico Garcia Pinto, da Universidade Federal de Viçosa, Júlio César José da Silva, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Douglas Queiroz Santos, da Escola Técnica de Saúde/UFU, Alam Gustavo Trovó, do Instituto de Química da UFU e Nívia Maria Melo Coelho, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Frederico Garcia Pinto – UFV

Prof. Dr. Júlio César José da Silva – UFJF

Prof. Dr. Douglas Queiroz Santos – ESTES/UFU

Alam Gustavo Trovó
Prof. Dr. Alam Gustavo Trovó – IQUFU

Nívia M. M. Coelho
Professor(a) Orientador(a): Nívia Maria Melo Coelho – IQUFU

"... Obrigada, Senhor, porque nasci,
Obrigada, porque creio em Ti.
... e porque me socorres com amor,
Hoje sempre,
Obrigada, Senhor!"
(Trecho do "Poema da Gratidão" de Amélia Rodrigues
(espírito), psicografia de Divaldo Pereira Franco)

Pai

Foi difícil continuar esta jornada sem a sua presença
E mais difícil será este dia sem a sua presença
Mais sei que o senhor estará lá me aparando como
sempre fez, apenas não poderei vê-lo
Obrigado pai pelos seus ensinamentos e pela luta pela vida
Tenho certeza que um dia nos encontraremos
Saudade pai amado
A você dedico a minha Tese
Á memória de meu Pai, Linconln

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas.

Ao meu amado esposo, Waldomiro, pelo carinho, companheirismo e incentivo.

À minha adorada mãe, Ercilia, e a minha querida irmã, Silvinha, e sobrinhas, Gabrielle e Manuelle pelo amor e amparo.

À memória do meu Pai, Lincoln, pelo amor, dedicação e luta pela vida.

Aos meus estimados amigos, presentes e distantes, pela torcida e encorajamento.

À Profa. Dra. Nívia Maria Melo Coelho, pela orientação, carinho, amizade e incentivo prestados ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Bento Borba da Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela orientação, carinho, amizade e incentivo prestados ao longo deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Espectroscopia Aplicada, Maria Soledad, Eliezer, Clesiano, Fernanda e Danielle, pelo companheirismo e amizade.

A Ione pela amizade e companheirismo.

Ao meus queridos companheiros de trabalho Bruno, Vanessa e Thais, obrigado pela paciência e carinho, que Deus abençoe a vida de voces.

À CNPq e CAPES, pela bolsa de estudo concedida e a FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi a determinação de alumínio em cervejas e vinhos tintos, chumbo em cerveja e cobre em *ice-drinks* (RTD) empregando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS), sem digestão prévia das amostras. Estratégias multivariadas (planejamentos fatoriais e Planejamento Composto Central CCD) foram usadas para otimização do sistema. O uso de modificadores permanentes mostrou ser uma alternativa eficaz para minimização de efeitos de matriz. Após a otimização da temperatura de pirólise, a maior parte dos estudos, observou-se atomização livre de interferências. Fato que permite a calibração com soluções de padrões preparados em água. Para o chumbo em cerveja foi necessária a calibração com padrões preparados na matriz (calibração por ajuste de matriz).

Limites de detecção de 0,4; 0,3; 1,4 e 0,5 μg L^{-1}, limites de quantificação de 1,3; 1,0; 4,8 e 1,6 μg L^{-1} e massas características de 16,0; 7,3; 16,3; 11,0 foram obtidos para alumínio em vinhos tintos, cobre em *ice-drinks* (RTD) e alumínio e chumbo em cervejas, respectivamente. O coeficiente de variação foi menor que 5% para todas as matrizes. A precisão do método foi estimada pela aplicação do teste de adição e recuperação, onde valores entre 83 a 109% foram obtidos. Testes de validação tais como limites de detecção e quantificação, massas características, exatidão e precisão intra-ensaios foram concordantes com a literatura.

Os resultados deste estudo mostram que teores de alumínio em amostras de vinhos são preocupantes desde que o vinho é uma bebida consumida por várias pessoas.

Palavras-chave: metais, bebidas, otimização, GF AAS.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine aluminum in beer and red wine samples, lead in beer samples and copper in ice-drinks (RTD) samples by eletrothermic atomization spectrometry, without samples preparation. Multivariate strategies (factorial and central composite design) were used for optimization of system. The use of permanent modifier showed a good way to minimize of the matrix effects. After optimization of pyrolysis temperature, in most studies, the atomization free of interference was obtained. This fact is proved by opportunity of calibration by standard solutions in water. Only for lead determination in beer was necessary a calibration using the matrix.

Detection limits of 0.4, 0.3, 1.4 and 0.5 μg L^{-1}, quantification limits of 1.3, 1.0, 4.8 and 1.6 μg L^{-1}, characteristic mass of 16.0, 7.3, 16.3, 11.0 were found for aluminum in red wine, copper in ice drinks (RTD) and aluminum and lead in beers, respectively. The coefficient of variation was less than 5% for all matrices. The precision of the method was estimated by applying addition and recovery test where values were between 83-109%. Tests of validation such as detection and quantification limits, characteristic mass, and accuracy and precision were accordingly of literature.

The results of present studies indicate that aluminum levels in wine are concern since the wine is a beverage consumed for some people.

Keywords: metal ions, beverage, optimization, GF AAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo de um Forno de Grafite..... 28

Figura 2a – Tubo de grafite..... 29

Figura 2b – Representação de um tubo de grafite ilustrando a plataforma de L'vov inserida..... 29

Figura 3 – Posição correta do capilar na introdução da amostra..... 29

Figura 4 – Etapas que compõem um programa de temperatura em uma determinação por GF AAS..... 30

Figura 5 – Exemplo de curvas de TP e TA..... 36

Figura 6 – Gráfico de Pareto..... 39

Figura 7 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de alumínio em vinhos tintos..... 53

Figura 8 – Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA para a determinação de alumínio em vinhos tintos.... 56

Figura 9 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para a determinação de alumínio em vinhos tintos, por GF AAS (n = 3)..... 58

Figura 10 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de cobre em *ice-drinks*..... 64

Figura 11 – Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA para a determinação de cobre em *ice-drinks*..... 66

Figura 12 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para a determinação de cobre em *ice-drinks* por GF AAS (n = 3)..... 68

Figura 13 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de alumínio em cervejas..... 75

Figura 14 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de chumbo em cervejas..... 75

Figura 15 – Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA para a determinação de alumínio em cervejas..... 79

Figura 16 – Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA para a determinação de chumbo em cervejas..... 79

Figura 17 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para a determinação de alumínio em cervejas, por GF AAS (n = 3)..... 81

Figura 18 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para a determinação de chumbo em cervejas, por GF AAS (n = 3)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites máximos de tolerância para alguns contaminantes inorgânicos em bebidas..... **25**

Tabela 2 – Alguns trabalhos com modificação química em diferentes matrizes..... **34**

Tabela 3 – Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3..... **38**

Tabela 4 – Matriz do planejamento composto central com 2 variáveis..... **41**

Tabela 5 – Contaminação artificial (*spikes*) das matrizes estudadas para cada analito para a realização da triagem, para escolha dos modificadores permanentes..... **47**

Tabela 6 – Programa de temperaturas de forno para tratamento do tubo de grafite pirolítico com plataforma de L'vov com modificadores permanentes (500 μg)..... **48**

Tabela 7 – Triagem entre os modificadores para a determinação de alumínio em vinhos tintos..... **51**

Tabela 8 – Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de alumínio em vinhos tintos utilizando como modificador químico permanente ródio e nióbio..... **52**

Tabela 9 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas na determinação de alumínio em vinhos tintos utilizando ródio como modificador químico permanente..... **55**

Tabela10– Programa de forno otimizado para determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS utilizando como modificador químico permanente ródio..... **57**

Tabela 11- Figuras de mérito para o método de determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS..... **59**

Tabela 12- Determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos, nacionais (n) e importados (i) por GF AAS armazenadas em garrafas de vidro (gv) e Tetra Pak (tp)..... **61**

Tabela 13- Triagem entre os modificadores para a determinação de cobre em *ice-drinks*..... **62**

Tabela 14- Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de cobre em *ice-drinks* utilizando como modificador químico permanente o zircônio e tungstênio..... **63**

Tabela 15- Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas na determinação de cobre em *ice-drinks* utilizando tungstênio como modificador químico permanente..... **65**

Tabela 16- Programa de forno otimizado para a determinação de cobre com o uso de tungstênio como modificador químico permanente em amostra de *ice-drinks* por GF AAS..... **67**

Tabela 17- Figuras de mérito para o método de determinação de cobre em *ice-drinks,* por GF AAS..... **68**

Tabela 18- Determinação de cobre em diferentes tipos de amostras de *ice-drinks* armazenadas em diferentes embalagens, onde: g = garrafa; l = lata; t = Tetra Pak; v = vodka e c = cachaça..... **71**

Tabela 19- Triagem entre os modificadores para a determinação de alumínio em cervejas..... **72**

Tabela 20- Triagem entre os modificadores para a determinação de chumbo em cervejas..... **73**

Tabela 21- Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de alumínio em cervejas utilizando ródio e zircônio como modificador químico permanente..... **73**

Tabela 22- Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de chumbo em cervejas utilizando irídio e rutênio como modificador químico permanente..... **74**

Tabela 23- Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas, na determinação de alumínio em cervejas, utilizando ródio como modificador químico permanente..... **77**

Tabela 24- Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas na determinação de chumbo em cervejas claras utilizando irídio como modificador químico permanente..... **78**

Tabela 25- Programa de forno otimizado para a determinação de alumínio e chumbo em cervejas por GF AAS..... **80**

Tabela 26- Figuras de mérito para o método de determinação de alumínio e chumbo em amostras de cervejas, por GF AAS..... **82**

Tabela 27- Determinação de alumínio e chumbo em amostras de cervejas por GF AAS, onde: (L) latas, (G) garrafas, (N) nacionais e (I) importadas..... **84**

LISTA DE SIGLAS

RTD	Pronto para beber (do inglês: *ready-to-drink*)
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (do inglês: *Flame Atomic Abosrption Spectrometry*)
HG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos (do inglês*: Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*)
TS-FF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico. (do inglês *Thermospray Flame Atomic Absorption Spectrometry*)
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. (do inglês*: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*)
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UV-VIS	Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
FAO/WHO	Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas / Organização Mundial da Saúde (do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization)*
PAN	(1-(2-piridilazo)-2-naftol)
CCD	Planejamento Composto Central (do inglês: *Central Composite Design*)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês: *Enviroment Protection Agency*)
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos (do inglês: *Hierarchical Clusters Analysis*)
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês: *Principal Component Analysis*)

STPF	Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada (do inglês: *Stabilized Temperatura Platform Furnace*)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
CRM	Material de Referência Certificado (do inglês: *Certified Reference Material*)
CV	Coeficiente de Variação
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica (do inglês: *Association of Analytical Communities*)

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	18
2	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	19
2.1	Bebidas alcoólicas	19
2.2	Metais em Bebidas	22
2.2.1	A Importância da Determinação de Al, Pb e Cu em Bebidas	22
2.3	Metodologias analíticas para determinação de metais em diferentes tipos de bebidas	25
2.4	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS)	27
2.5	Estratégias de otimização	34
2.5.1	Planejamento e otimização de experimentos	34
2.6	Validação analítica	41
3	**OBJETIVOS**	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	**METODOLOGIA EXPERIMENTAL**	46
4.1	Instrumentação e acessórios	46
4.2	Reagentes, soluções e amostras	46
4.3	Limpeza do material	47
4.4	Tratamento do tubo de grafite com modificadores permanentes	47
4.5	Otimização das condições de análise	48
4.6	Validação da Metodologia Analítica	49
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	50
5.1	Determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS	50
5.1.1	Otimização do programa de temperaturas para determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS	51
5.1.2	Validação do método para a determinação de alumínio por GF AAS	57
5.1.3	Determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos por GF AAS	60
5.2	Determinação de cobre em amostras de *ice-drinks* por GF AAS	62
5.2.1	Otimização do programa de temperaturas para a determinação de cobre em *ice-drinks*	62

5.2.2 Validação do método.para a determinação de cobre bem *ice-drinks*.por GF AAS..... 67
5.2.3 Determinação de cobre em amostras de *ice-drinks* por GF AAS..... 70
5.3 Determinação de alumínio e chumbo em cervejas por GF AAS..... 72
5.3.1 Otimização das condições analíticas para as determinações de alumínio e chumbo em amostras de cervejas por GF AAS..... 72
5.3.2 Validação dos métodos para a determinação de alumínio e chumbo em cervejas por GF AAS..... 80
5.3.3 Determinação de chumbo e alumínio em amostras de cervejas por GF AAS..... 83
6 CONCLUSÕES..... 86
7 REFERÊNCIAS..... 87

1. INTRODUÇÃO

Os metais são constituintes naturais da crosta terrestre e encontram-se amplamente distribuídos na natureza. No entanto, as atividades antropogênicas podem aumentar o nível de concentração dos metais no meio ambiente ocasionando sérios danos à saúde humana. Este é o caso dos elementos alumínio, cádmio e chumbo que mesmo presentes em baixas concentrações podem causar ao homem doenças respiratórias, neurológicas, cardíacas, ósseas, câncer, entre outras (POMO *et al*., 2014). A maioria dos organismos vivos precisa de alguns metais em doses muito pequenas, pois eles participam do metabolismo e formação de muitas proteínas, enzimas, vitaminas e pigmentos respiratórios. Tão pequenas que costumamos chamá-los de micronutrientes, como é o caso do zinco, magnésio, cobalto e do ferro (constituinte da hemoglobina). Estes metais podem vir a se tornar tóxicos e perigosos à saúde quando suas concentrações limite são ultrapassadas (POMO, *et al*., 2014).

Dentre as varias formas de exposição do homem aos metais destaca-se a ingestão da água e de alimentos contaminados. A contaminação de alimentos pode ocorrer durante as etapas de processamento, embalagem e estocagem dos alimentos ou da matéria prima usada na fabricação dos alimentos industrializados.

Ainda que as bebidas como a cerveja e o vinho sejam benéficas à saúde humana, estas bebidas podem acarretar sérios problemas, principalmente no que diz respeito às contaminações quando os valores encontrados de tais contaminantes estiverem acima daqueles permitidos pela legislação (GONZÁLEZ-MUÑOZ *et al*., 2008).

Diante deste contexto, torna-se importante identificar e avaliar a presença de metais em bebidas industrializadas como cervejas e vinhos e *ice-drinks* conhecida também como *ready-to-drinks* (RTDs), uma vez que o consumo destas bebidas tem aumentado muito nos últimos anos (AQUILANI *et al*., 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho torna-se relevante pela necessidade de se desenvolver métodos seguros, exatos, sensíveis e com possibilidade de análise direta, com um mínimo ou nenhum preparo de amostra, que permitam a determinação de metais em baixas concentrações em amostras de bebidas alcoólicas. Além disso, as bebidas do tipo *ice-drinks* são relativamente uma novidade no mercado, necessitando, portanto, de uma avaliação da presença desses íons.

Uma ampla variedade de técnicas analíticas espectrométricas tem sido utilizada para a determinação de metais em bebidas alcoólicas, tais como Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) (UBUOH *et al*., 2013), Espectrometria de Absorção Atômica

com Geração de Hidretos (HG AAS) (TSEV *et al*., 2005), Espectrometria de Absorção Atômica com Aerossol Térmico e Forno Tubular na Chama (TS-FF-AAS) (REZENDE *et al*., 2011), Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS) (FRANCISCO *et al*., 20015), Espectrometria de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (FROES *et al*., 2009), Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) (PETROPULOS-IVANOVA *et al*., 2013), entre outras.

Dentre as diversas técnicas, a GF AAS é amplamente utilizada em analises de rotina para a determinação de metais em baixas concentrações, em função de vários fatores: a) alta sensibilidade e seletividade; b) baixos limites de detecção (LD) c) requerem pequenos volumes de amostra; d) elevada rapidez e) baixo custo operacional relativo.

Assim o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver procedimentos analíticos para determinações dos elementos alumínio, cobre e chumbo em amostras de cervejas, vinhos e *ice-drinks* por GF AAS com o mínimo de preparo da amostra. Estes elementos são mais comuns em situações de contaminação por migração, biocumulação e toxicidade no organismo humano, como no caso do alumínio, cobre e chumbo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bebidas alcoólicas

A cerveja é uma bebida amplamente difundida e de intenso consumo, sendo conhecida desde a antiguidade em diversos países do mundo. Ela pode ser definida como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação do malte de cevada, contendo lúpulo e água de boa qualidade. Podendo ainda utilizar-se de outras matérias primas como arroz ou trigo (TAN *et al*., 2015). O malte apresenta alto teor de amido, conferindo sabor e aroma característicos à cerveja. O lúpulo tem duas funções na produção de cerveja, a de propiciar amargor e aroma. Também o lúpulo possui propriedades de biocida natural, que desfavorecem a contaminação bacteriana e, o mesmo contribui para a estabilidade e o sabor da espuma (CAETANO *et al*., 2011). A levedura é obtida a partir da fermentação natural do malte da cevada, na qual o açúcar existente nos próprios ingredientes é transformado em álcool (SILVA *et al*., 2012).

Nos últimos anos tem-se relatado na literatura a importância das bebidas como cerveja e vinho, em relação ao seu benefício para saúde humano devido suas propriedades

nutricionais e medicinais (SOHRABVANDI *et al*., 2012; ÁLVAREZ *et al*., 2012; YAO *et al*., 2015; MEDINA *et al*., 2015; HIGGINS *et al*., 2015).

Do ponto de vista nutricional, a cerveja contém quantidades significativas de vitaminas do complexo B (B1, B2), A, D e E. Um litro de cerveja contém cerca de 210 mg de vitaminas e polifenóis. Os polifenóis possuem propriedades antioxidantes que reduzem o risco de doenças coronarianas, cancro e doenças ósseas, o malte que é rico em carboidratos, minerais, oligoelementos e vitaminas, também possui o lúpulo que apresenta propriedades antibióticas, anti-inflamatórias e sedativas, estimula o apetite, entre outras (SANCHEZ *et al*., 2010).

OBARA *et al*., (2009) avaliaram o efeito da isohumulona, um componente da cerveja que tem a propriedade de deixar a cerveja amarga. Os resultados mostraram que a ingestão de isohulomes melhora a hiperglicemia e diminui a gordura corporal em indivíduos com pré-diabetes. Em um outro estudo efetuado por PEDRERA-ZAMORANO *et al*., (2009) foi avaliado em um grupo de mulheres, o aumento da massa óssea comparando as que consumiam ou não cerveja. Provavelmente este aumento da massa óssea se deve a presença de fito estrogênio, um dos principais componentes da cerveja. Já SOHRABVANDI *et al*., (2012) em seu artigo de revisão, relacionaram os aspectos positivos e negativos do consumo de cerveja para a saúde. Os autores relatam dados de pesquisas que mostram que o consumo de bebidas alcoólicas (incluindo cerveja) com teores relativamente baixos de álcool, podem trazer vários benefícios para saúde, incluindo benefícios nutricionais, efeitos antimutagênicos e anticancerígenos e redução de doenças cardiovasculares. Mas estes estudos também relatam que quando bebidas alcoólicas são consumidas em quantidades excessivas, resultam em alguns distúrbios a saúde, tais como alergia e aumento da concentração de ácido úrico. Em outro estudo realizado por MEDITA *et al.,* (2015) foram avaliados as propriedades medicinais da cerveja, devido à presença de compostos antioxidantes (polifenóis), que reduz a presença de radicais livres no corpo humano. Segundo YAO *et al*., (2015) afirmaram que o uso regular de cerveja pode auxiliar na prevenção de doenças neurológicas, tais como Alzheimer e o mal de Parkinson. Em seus estudos os autores conseguiram isolar uma substância chamada de xanthohumol, que possui uma ação antioxidante em nosso organismo. Este composto pode ser facilmente detectado em vários tipos de plantas secas e que são amplamente utilizadas para a fabricação de muitos tipos de bebidas fermentadas, onde a cerveja está incluída. Os estudos foram realizados em ratos, submetendo suas células nervosas a um estresse oxidativo. A escolha por estas células neuronais, e pelo fato das mesmas não apresentarem quase nenhuma capacidade de regeneração. Além disso, os estudos mostram que as doenças

neurológicas ocorrem pelo processo de oxidação que as células nervosas sofrem com o passar do tempo. O xanthohumol apresentou uma ação bastante eficaz em bloquear esse efeito oxidativo.

O vinho é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em todo o mundo. Este resulta da fermentação alcoólica do sumo das uvas, em que os açúcares por ação de leveduras são transformados em álcool com desprendimento de dióxido de carbono (FIKET *et al*., 2011). O vinho é composto por água, álcoois, açúcares, ácidos orgânicos (provenientes da uva: málico e cítrico; e os provenientes da fermentação: succínico, láctico e acético), minerais, potássio, cálcio e sódio, compostos fenólicos (taninos que conferem ao vinho sabor e coloração, flavonas e antocianinas) e substâncias nitrogenadas (GRINDLAY *et al*., 2009).

A presença de metais no vinho está geralmente relacionada com a composição mineral do solo, com os processos de absorção das videiras, pelo uso de aditivos, fungicidas e equipamentos utilizados na vinificação, tendo em conta a sua acidez, o vinho é susceptível, por corrosão dos materiais (MIRANDA *et al*., 2010; VILLIERS *et al*., 2012).

Segundo ÁLVAREZ *et al*., (2012) o consumo diário de vinho em quantidades moderadas contribui significativamente para supri as necessidades do organismo humano em elementos essenciais como cálcio, cobre, ferro, potássio, zinco, magnésio, manganês, níquel entre outros.

CHEN *et al*., (2010) afirmam que o vinho tinto tem sido utilizado para minimizar o efeito a um grande número de condições patológicas. Estudos indicam que o vinho tinto pode diminuir os fatores inflamatórios, reduzir a migração de neutrófilos, e regular a imunidade. Por estas bioatividades de anti-inflamação, anti-oxidação, o vinho tinto pode ser um agente terapêutico eficaz para controlar os sintomas e prevenir a recorrência de miocardite. Em seu estudo de revisão GUILFORD *et al*., (2011) relataram que o consumo regular e moderado de vinho, particularmente o tinto, traz benefícios para a saúde, protegendo contra doenças cardiovasculares, arterosclerose, hipertensão, certos tipos de cancro, diabetes tipo 2 e distúrbios neurológicos, além de possuir efeitos anti-inflamatórios. O mecanismo de ação do vinho tem sido atribuído a suas propriedades antioxidantes. Como o vinho é uma mistura complexa, é provável que um grande número de componentes químicos, bem como os seus metabólitos, funcionam sinergeticamente para impactar a saúde humana.

As bebidas comercializadas no Brasil, denominadas de *ice-drinks*, são conhecidas em outros países como *"ready-to-drink* (RTDs)", como "*alcopops*" e também como "*premixed alcohol beverages*" ou bebida moderna *(novel beverage*) (COPELAND *et al*., 2007). Essas bebidas são misturas de destilados (aguardente, rum, vodca, entre outros) com suco de frutas

ou refrigerantes gaseificados, com teor alcoólico final em torno de 5% (v/v), semelhante ao da cerveja (FROES *et* al., 2015).

2.2. Metais em bebidas

2.2.1. A Importância da Determinação de Al, Pb e Cu em Bebidas

Nos últimos anos tem-se relatado na literatura a importância das bebidas como cerveja e vinho, em relação ao seu benefício para saúde humana. Entretanto, mesmo sendo benéficas, estas bebidas podem acarretar sérios problemas para a saúde, principalmente no que diz respeito as contaminações por constituintes potencialmente tóxicos, quando as concentrações destes estiverem acima daqueles que são permitidos pelas legislações.

A contaminação por metais podem ocorrer durante as diferentes etapas de processamento, acondicionamento, armazenagem, pelo uso de fertilizantes, fungicida, pesticidas entre outras como exemplo podemos citar: a calda da bordalesa, um fungicida à base de sulfato de cobre e cal, diluídos em água que é muito utilizado nas videiras. Embora seja um fungicida de uso relativamente antigo, a calda bordalesa é considerada um dos produtos mais eficientes no combate de algumas doenças de plantas, principalmente das frutíferas. Assim, a utilização continuada da calda nas áreas de vitivinicultura para o controle de doenças fúngicas promove o acúmulo de cobre nos solos (ANDREAZZA et al., 2013). Os fertilizantes fosfatados por conterem em sua composição metais como chumbo e cádmio podem contribuir para a contaminação com estes elementos nos alimentos através das plantas cultivadas em solos adubados (AYDIN *et al*., 2010). De acordo com STOFILOV *et al*., (2009) e KARADJOVA *et al*., (2009), os principais fatores que determinam o conteúdo de metais em vinhos são a contribuição do solo onde o vinhedo é cultivado e a capacidade das uvas de absorver minerais.

A migração de elementos principalmente no caso de alumínio para alimentos e bebidas acondicionados em latas pode ser outra importante fonte de contaminação.

Os relatos sobre a contaminação de chumbo em bebidas vêm desde a antiguidade, onde este metal era utilizado na confecção de utensílios domésticos como taças e vasos usados no acondicionamento do vinho (KABATA-PENDIAS *et al*., 2007). O elemento chumbo possui dois estados de oxidação (Pb^{2+} e Pb^{4+}) ocorrendo no ambiente principalmente na valência 2+, e seus compostos são, na maioria, pouco solúveis em água. Existem duas classes de compostos de chumbo: os inorgânicos, que são os formados por sais e óxidos de

chumbo, e os orgânicos que são o chumbo tetraetila e o chumbo tetrametila. Uma vez absorvidos, todos os compostos inorgânicos atuam no organismo da mesma forma. Os compostos orgânicos são lipossolúveis e podem ser absorvidos pela pele e por via respiratória. A absorção do chumbo pelo corpo humano é lenta e depende não só da dose como também de fatores tais como a idade do indivíduo, condições fisiológicas, nutricionais e possivelmente fatores genéticos (MOREIRA *et a*l., 2004; ATSDR, 2007).

A intoxicação crônica por chumbo, nomeada de saturnismo, causa: irritabilidade, agressividade, dores de cabeça, dores abdominais, doenças renais, osteoporose, anemias, acidente vascular cerebral. Não existem evidências significantes de que o chumbo exerça qualquer papel essencial no metabolismo do homem. O limite máximo permitido de chumbo para a ingestão é de 25 μg kg^{-1} de peso corpóreo para adultos, crianças e bebês (FLORA, *et al.,* 2012; ATSDR, 2007). Estudos evidenciaram que crianças e gestantes são mais suscetíveis à contaminação por chumbo. Testes realizados em cobaias comprovaram que os processos genéticos ou cromossômicos sofrem interferências pelo chumbo podendo também produzir alterações na estabilidade da cromatina, inibindo reparo de DNA e agindo como agente cancerígeno (ZINI *et al*., 2009).

O cobre é um metal que apresenta quatro estados de oxidação (Cu^0, Cu^+, Cu^{2+} e Cu^{3+}), sendo um elemento essencial para plantas e animais, pois atua na síntese de enzimas, tecidos e ossos. Entretanto, o cobre bivalente (Cu^{2+}) é tóxico e cancerígeno, podendo apresentar problemas de biocumulação, onde pode vir a se acumular no organismo e gerar possíveis reações tóxicas, causando doenças como: problemas respiratórios, depressão, dores musculares, doenças renais, hemorragia gastrointestinal entre outras. A quantidade de cobre para um adulto é estimada entre 1,2 a 2,0 mg/dia (MAHMOOD *et al*., 2013).

Embora existam muitos elementos inorgânicos que são considerados essenciais para a vida, alguns são conhecidos por serem altamente tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas. Um dos elementos que pertencem a esta categoria é o alumínio. O alumínio é o metal mais abundante da litosfera, está presente, na natureza, apenas no estado oxidado Al^{3+}. Não há evidências que o alumínio tenha qualquer função vital em plantas ou animais. Sendo um elemento não essencial, o alumínio não está sujeito a qualquer um dos mecanismos homeostático que surgiram durante o curso da evolução para regular o metabolismo de elementos essenciais, podendo portanto, se acumular no organismo. O mecanismo de ação da toxicidade do alumínio não é conhecido, mas se sabe que este elemento compete nos sistemas biológicos com cátions, especialmente o magnésio (apesar da diferença do estado de oxidação), e liga-se à transferrina e ao citrato na corrente sanguínea. Liga-se irreversivelmente

a componentes do núcleo celular e inibe a formação de microtúbulos a nível neuronal. Os níveis tóxicos de alumínio no organismo podem levar a cólicas, distúrbios gastrointestinais, anemia, dor de cabeça, diminuição do funcionamento do rim e do fígado, esquecimento, enfraquecimento dos ossos e músculos, e reduções das atividades mentais (EXLEY, 2016; YOKEL, 2016). Pacientes com mal de Alzheimer apresentam altas concentrações de alumínio no cérebro (BONDY, 2016). Ferreira et al., (2008) em um estudo evidenciaram que a exposição ao alumínio tem relação com o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer. Em sua pesquisa foram selecionados 34 trabalhos, destes, 68% estabeleceram relação entre o alumínio e a doença de Alzheimer, 23,5% não apresentaram dados conclusivos e 8,5% não estabeleceram nenhuma relação entre o alumínio e a doença. Apesar da existência de posicionamentos tanto a favor quanto contrários, nos últimos anos têm sido relatados estudos científicos que associam a presença de alumínio com o desenvolvimento da doença de Alzheimer (FERREIRA *et al*., 2008).

De um modo geral os metais em contato com o organismo, acabam atraindo para si duas substâncias essenciais do corpo: proteínas e enzimas. Eventualmente eles se unem a algumas delas, impedindo que funcione o que pode levar até a morte. Os metais pesados também se ligam às paredes celulares, dificultando o transporte de nutrientes.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Decreto nº 42 de 29 de Agosto de 2013 e da Portaria nº 126, de 24 de junho de 2005 do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Portaria nº 126, de 24 de junho de 2005, regulamentam sobre limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em alimentos e bebidas.

A Tabela 1 apresenta os limites máximos de tolerância para alguns contaminantes inorgânicos em bebidas. Vale ressaltar que embora o alumínio apresenta toxicidade mesmo em baixas concentrações, não foi encontrado em nenhum compêndio nacional ou internacional a respeito dos valores máximos permitidos em diferentes bebidas.

Tabela 1. Limites máximos de tolerância para alguns contaminantes inorgânicos em bebidas

Contaminantes inorgânicos	Alimentos em que podem ser encontrados	Limite Máximo de Tolerância (LMT)
Arsênio (As)	Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho	0,10 mg kg^{-1} (a)
Arsênio (As)	Vinhos	0,20 mg L^{-1} (a)
Chumbo (Pb)	Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho	0,20 mg kg^{-1} (a)
Chumbo (Pb)	Vinhos	0,15 mg L^{-1} (a)
Chumbo (Pb)	Bebidas alcoólicas	0,50 mg kg^{-1} (a)
Cádmio (Cd)	Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho	0,02 mg kg^{-1} (a)
Cádmio (Cd)	Vinhos	0,01 mg L^{-1} (a)
Cádmio (Cd)	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,02 mg kg^{-1} (a)
Estanho (Sn)	Bebidas enlatadas	150 mg kg^{-1} (a)
Cobre (Cu)	Bebidas alcoólicas fermentadas	5,0 mg kg^{-1} (b)

Fontes: (Partes de Tabelas)
[a]Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Decreto nº 42, de 29 de Agosto de 2013.,
[b]Portaria nº 126, de 24 de junho de 2005 do Ministério Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

2.3. Metodologias analíticas para determinação de metais em diferentes tipos de bebidas

Diante deste quadro, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas, exatas e de baixo custo para a determinação de metais em bebidas alcoólicas.

A GF AAS é uma técnica muito utilizada em análise de rotina para a quantificação de constituintes inorgânicos, uma vez que permite obtenção de LD em níveis de μg L^{-1} a ng L^{-1} e também possibilita a realização de análise direta de amostras líquidas e sólidas em suspensão (WELZ, *et al*., 1999).

No trabalho proposto por NASCENTES *et al*., (2005), uma metodologia analítica foi desenvolvida para a determinação de cobre, manganês, chumbo e zinco em amostras de cervejas por TS-FF-AAS sem a necessidade de digestão das amostras, adotando apenas a desgaseificação em banho ultrassônico e posterior diluição com uma solução de ácido nítrico

*Segundo a ANVISA os limites máximos são expressos em miligramas por quilogramas (mg kg^{-1}), exceto para vinho que é expressa em miligramas por litro (mg L^{-1}).

0,14 mol L^{-1}. Os LD obtidos foram 2,2; 18; 1,5 e 0,9 μg L^{-1} para cobre, manganês, chumbo e zinco, respectivamente.

UBUOH *et al.*, (2013), determinaram alumínio, cádmio, cromo, cobre, ferro, níquel, chumbo e zinco em cervejas em latas, utilizando FAAS como método de detecção após digestão ácida. Os resultados das análises mostraram que as concentrações de cromo, ferro, níquel, cádmio e chumbo nas cervejas em lata selecionadas, estavam acima dos níveis estipulados pela legislação, enquanto os metais zinco, alumínio e cobre, estavam abaixo destes limites. O estudo mostrou que existe a necessidade de melhorar a qualidade do processamento das cervejas comercilaizadas em lata. Em outro estudo realizado por DONADINI, *et al.*, (2008), arsênio, cádmio e chumbo foram avaliados em dezenove amostras de cervejas de marcas diferentes utilizando a técnica ICP-MS. O procedimento usado baseou-se na desgaseificação das amostras e posterior digestão em bloco digestor (100 ºC) com 2,00 mL de ácido nítrico e 2,00 mL de peróxido de hidrogênio até o clareamento total da solução.

VERÍSSIMO *et al.*, (2008) estudaram a migração de alumínio em amostras de cerveja e chá, acondicionadas em latas amassadas, por espectroscopia de absorção molecular na região do Ultravioleta e Visível (UV-VIS) e F AAS. Os resultados mostraram que houve um aumento na concentração de alumínio na cerveja e no chá acondicionado em latas amassadas. O estudo conclui que bebidas acondicionadas em latas de alumínio devem ser consumidas preferencialmente nos dois primeiros meses após a fabricação, visando minimizar a migração do alumínio para a bebida.

EKANEM *et al.*, (2000) utilizaram a técnica de GF AAS para a determinação de alumínio em diferentes matrizes: carne assada em papel alumínio, bebidas e medicamentos como vitamina C, aspirina e paracetamol. A partir dos resultados obtidos, os autores concluiram que na amostra de carne assada, houve um aumento na concentração de alumínio, provavelmente pela migração do alumínio do papel para a carne. Já nas amostras de medicamentos e bebidas, os valores encontrados ficaram abaixo do valor recomendado pela Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO).

FRANCISCO *et al.*, (2015) propuseram um método para a determinação direta de alumínio, cobre, cromo, ferro e níquel em refrigerantes por GF AAS. As amostras foram acondicionadas em garafas de plástico, vidro e alumínio. O método foi otimizado através da construção de curvas de pirólise e atomização. Os valores de recuperações ficaram entre 92-104%. Os LDs para alumínio, cobre, cromo, ferro e níquel foram de 2,3; 0,93; 0,17; 0,90 e 1,2 mg L^{-1}, respectivamente. Os autores concluiram que nem o sabor nem o tipo de embalagem

foram afetados pelo aumento das concentrações de ferro e alumínio nas amostras. Por outro lado, o material de embalagem influenciou na concentração de cobre, cromo e níquel, e apenas a concentração de cobre afetou o sabor. O tipo de embalagem não foi responsável pelo aumento das concentrações de ferro e alumínio nas amostras.

Um procedimento de extração no ponto nuvem e detecção por TS-FF-AAS foi proposto REZENDE *et al*., (2011) para determinação de cádmio em refrigerantes. O reagente 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) foi utilizado como complexante e Triton X-114 como surfactante. As variáveis que afetam a pré-concentração foram otimizadas através de um planejamento fatorial 2^3 e planejamento composto central (CCD). O valor obtido para o LD foi de 0,0178 μg L^{-1}. A exatidão do método proposto foi avaliada atraves de adição e recuperação que ficaram entre 88-104%. O procedimento desenvolvido permitiu a determinação de cádmio em nível de μg L^{-1} em amostras de refrigerantes. A metodologia desenvolvida pode ser aplicada como uma ferramenta de controle de qualidade para determinação de outros elementos presentes em baixas concentrações em refrigerantes.

FROES *et al*., (2015) desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação de alumínio, bário, cálcio, cádmio, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, níquel, chumbo, estanho e zinco por ICP OES em amostras de *ice-drinks*. As recuperações foram de 80 a 120% sendo aceitáveis de acordo a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA). Neste mesmo estudo, foi feita a classificação das amostras quanto à marca do i*ce-drink* e o tipo de destilado usado na sua composição através da Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA).

2.4. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS)

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) baseia-se na absorção da energia radiante pelas espécies atômicas neutras, não-excitadas, em estado gasoso. Cada espécie atômica possui um espectro de absorção formado por uma série de raias estreitas características, devido às transições eletrônicas envolvendo os elétrons externos. Na absorção atômica, o elemento a ser determinado é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa, denominado atomização, através da qual se faz passar o feixe de radiação proveniente de uma fonte apropriada como uma lâmpada de catodo oco (WELZ, *et al*., 1999; SKOOG *et al*., 2009).

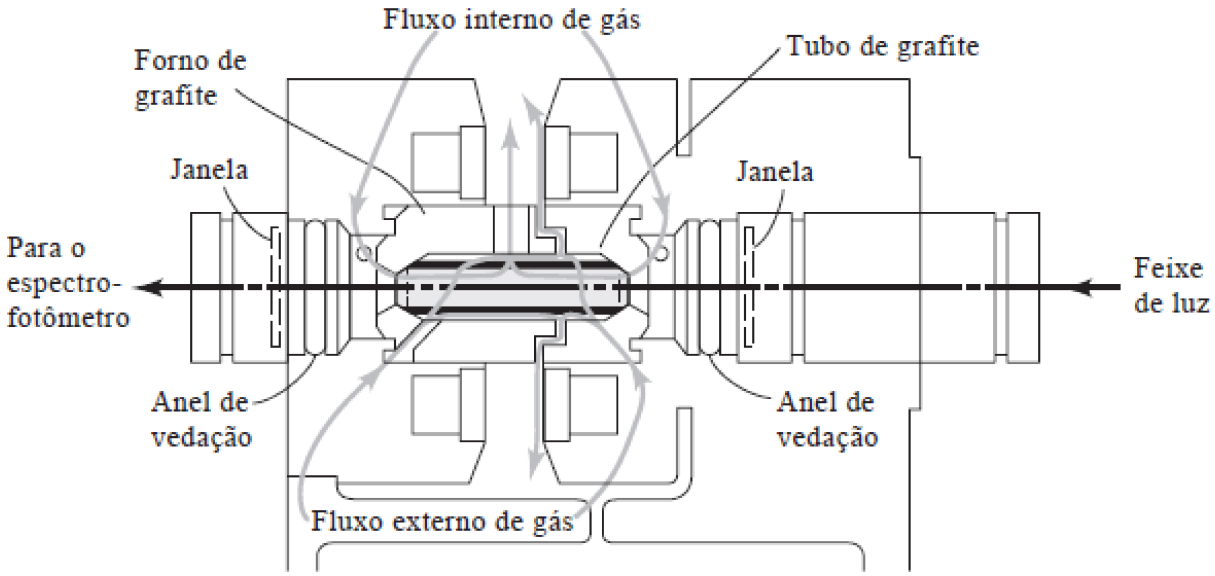
As principais técnicas analíticas em Espectrometria de Absorção Atômica são baseadas na atomização em chama FAAS, geração de hidretos HG AAS e na atomização em

forno de grafite ou em filamento de tungstênio GF AAS. A técnica de GF AAS, apesar de ser monoelementar, é adequada para a determinação de baixas concentrações de metais e semimetais, apresentando alta sensibilidade, uma vez que são obtidos baixos LD e LQ (de μg L^{-1} a ng L^{-1}) em comparação aos valores obtidos utilizando F AAS (mg L^{-1}, cerca de mil vezes menos sensível) (AZEVEDO, *et al*., 2013).

A alta sensibilidade da técnica de GF AAS é devida, primeiramente ao fato que a alíquota da amostra colocada dentro do forno é toda atomizada em um curto período de tempo aliada em alguns casos pela eliminação *in situ* da matriz diretamente na etapa da calcinação (pirólise) (SKOOG *et al*., 2009). Além disso, a técnica possibilita análise direta da amostra, utilização de uma fonte de radiação específica para o analito, boa seletividade e exigência de pequenos volumes de amostra (10 a 100 μL) (WELZ, *et al*., 1999).

O forno de grafite consiste em um tubo de um cilindro oco de grafite com cerca de aproximadamente 2,0 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno com orifício central onde uma micropipeta ou auto amostrador injeta a amostra. O tubo de grafite se ajusta aos eletrodos localizados na extremidade do sistema atomizador onde são resfriados à água. Um fluxo de gás interno, geralmente argônio, flui das extremidades para a parte central evitando a entrada do ar e eliminando os vapores gerados pela matriz. A Figura 1 apresenta o esquema ilustrativo de um forno de grafite.

Figura 1. Esquema ilustrativo de um Forno de Grafite



Fonte: (SKOOG *et al*., 2009)

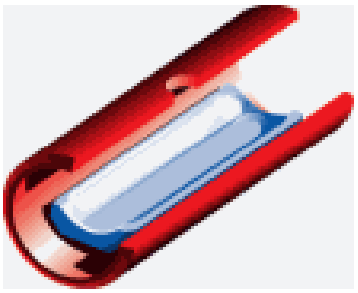
Com a finalidade de se obter condições mais reprodutíveis e uma atomização gradativa mais eficiente, geralmente são empregados tubos de grafite com uma plataforma denominada plataforma de L'vov. A plataforma de L'vov é colocada em uma posição tal, que o calor irradia das paredes do forno aquecendo o argônio e este por sua aquece a plataforma. O aquecimento excepcionalmente rápido da plataforma de menor massa, leva a uma maior eficiência de atomização e à temperatura de atomização (TA) mais baixas, proporcionando maior tempo de vida para o tubo de grafite e menor tempo de análise (LAJUNEN, 1992).

A Figura 2a representa um tubo de grafite e a Figura 2b um tubo de grafite em um corte longitudinal ilustrando a inserção da plataforma de L'vov.

Figura 2a. Tubo de grafite



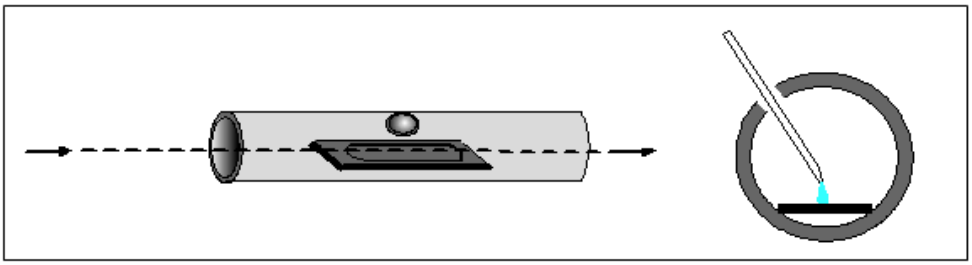
Figura 2 b. Representação de um tubo de grafite ilustrando a plataforma de L'vov inserida



Fonte**:** Perbsul Equipamentos para Laboratórios

A injeção da amostra no interior do tubo de grafite é uma etapa muito importante, que interfere na qualidade dos resultados. Se a posição do capilar que introduz a amostra no interior do tubo de grafite não for correta, a reprodutibilidade e a sensibilidade obtidas não serão as melhores. A Figura 3 ilustra a posição correta deste capilar que, caso seja posicionado de forma incorreta, ocasionará uma má distribuição da amostra e comprometerá a uniformidade do aquecimento ou até mesmo a possibilidade de perda de analito.

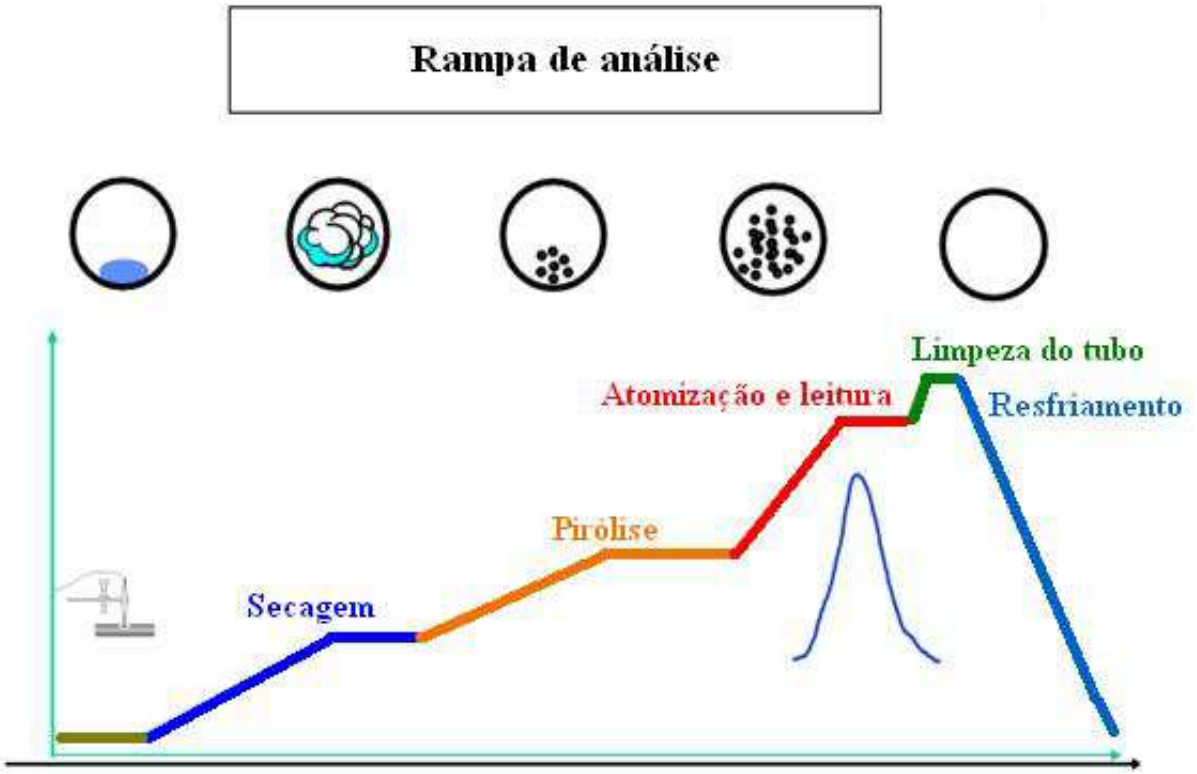
Figura 3. Posição correta do capilar na introdução da amostra



Fonte: Agilent Technologies, Inc.

A atomização adequada da amostra num forno de grafite requer um programa de aquecimento do forno conforme mostrado da Figura 4. O programa de temperaturas escolhido depende do elemento a determinar e da matriz da amostra. Um programa típico compreende quatro patamares de temperatura conforme descrito a seguir.

Figura 4. Etapas que compõem um programa de temperatura em uma determinação por GF AAS



Fonte: Agilent Technologies, Inc.

Secagem – O principal objetivo desta fase é a secagem da amostra pela remoção do solvente que é conseguido com um aquecimento a temperaturas superiores ou próximas das temperaturas de ebulição do solvente. Nesta etapa, o solvente é evaporado lentamente da amostra de maneira controlada, para evitar respingos e perda da amostra, formação de picos duplos e irregulares, que podem levar a imprecisão dos resultados. Inicialmente, é recomendável aperfeiçoar a sequência de secagem, observando-se a condensação do vapor do solvente em um pequeno espelho ou pela webcam (nos equipamentos que possuem estes dispositivos), posicionada no interior do forno de grafite, dependendo do equipamento. O vapor do solvente deve condensar regularmente sendo importante que nenhum vapor seja observado 5-10 s antes do final da secagem (BUTCHER, *et al.*, 1998).

Calcinação ou pirólise – Esta fase tem como objetivo a eliminação dos componentes da matriz tanto quanto possível antes da atomização, diminuindo a possibilidade de interferência e reduzindo a intensidade do sinal de fundo. O tempo e a temperatura de pirólise (TP) devem ser controlados de tal forma que se elimine ao máximo os componentes da matriz sem perdas do analito, ou seja, são determinados pelas estabilidades térmicas relativas do analito e da matriz. O tempo de pirólise deve ser suficientemente longo para permitir que o sinal de fundo retome a linha base antes da atomização. Modificadores químicos costumam ser empregados para a estabilização do analito em elevadas temperaturas, tornando a matriz mais volátil e o analito termicamente mais estável para uma etapa de pirólise mais efetiva, sem perdas do sinal de absorvância integrada (BUTCHER, *et al*., 1998).

Atomização – Considerada uma das etapas mais importante, e onde ocorre a formação de átomos gasosos no estado fundamental no interior do tubo de grafite, absorvendo parte da radiação proveniente da fonte. Em seguida, é feita a leitura e a integração da absorvância. A temperatura selecionada nessa etapa deve ser aquela que garanta a máxima atomização do analito e a formação de sinais transientes típicos e repetitivos. Uma velocidade de aquecimento rápida e uma baixa TA são desejáveis a fim de prolongar o tempo de vida útil do tubo (BUTCHER, *et al*., 1998).

Limpeza – Para evitar o efeito de memória entre as amostras, aplica-se, durante um tempo de 2 a 3 segundos, uma temperatura mais elevada que a TA (LAJUNEN, 1992). Ocorre também uma etapa de resfriamento, que na maioria dos equipamentos, é feita automaticamente. Neste caso, espera-se que a temperatura do forno esteja próxima a temperatura ambiente para que a próxima amostra seja introduzida no atomizador (LAJUNEN, 1992).

Durante todo o programa de temperatura, a atmosfera é inerte e obtida por dois fluxos independentes de um gás inerte, geralmente argônio. O fluxo externo passa ao redor do tubo de grafite protegendo-o da degradação a altas temperaturas por contato com oxigênio da atmosfera, enquanto que o fluxo interno elimina o ar e carrega vapores da matriz da amostra durante todo o programa, exceto na etapa de atomização. Durante a atomização, o fluxo interno de gás é interrompido e o tubo de grafite e aquecido rapidamente ate uma temperatura suficientemente elevada para que o analito seja atomizado. Os átomos vaporizados absorvem a radiação que passa por dentro do tubo e a intensidade da radiação transmitida é medida (LAJUNEN, 1992; WELZ *et al*., 1999).

A técnica de GF AAS fornece alta sensibilidade, seletividade e baixo consumo de amostra, entretanto, está sujeita a interferências, que podem ser classificadas em físicas e químicas. Alterações na introdução da amostra, sinais de *background* (absorção não

específica, fundo) e efeitos de memória podem originar interferências físicas. As interferências químicas podem ser causadas por reação do analito com os componentes da matriz, que não são eliminados totalmente na etapa da pirólise interferindo no processo de atomização ou com o material do tubo. Visando superar essas interferências, foi proposto o uso de modificadores químicos, que tem a finalidade de auxiliar a retenção do analito em elevadas temperaturas durante a etapa da pirólise, removendo interferentes da matriz, e/ ou reduzindo a temperatura de volatilização da mesma.

Para que uma substância seja considerada um modificador químico, deve cumprir uma série de requisitos: (1) ser efetivo para um grande número de analitos, (2) não contribuir para absorção de fundo, (3) estabilizar o analito pelo menos a 1000 ºC para garantir a total eliminação da matriz na etapa de pirólise; (4) não reduzir o tempo de vida dos tubos de grafite, (5) ter elevada pureza, (6) não afetar negativamente a sensibilidade e (7) ser eficaz no programa de temperaturas escolhido. (VOLYNSKY, 2004).

Existem dois tipos de modificadores, os convencionais, onde o modificador, presente em solução, é introduzido no atomizador junto com a amostra; e os modificadores permanentes, que são depositados na parede do tudo de grafite ou sobre a superfície da plataforma.

Em relação à modificação química clássica a modificação permanente apresenta algumas vantagens como, por exemplo, a utilização de reagentes de pureza moderada, a minimização do tempo total de análise e o aumento do tempo de vida útil do tubo de grafite (FRESCHI *et al*., 2008).

A impregnação da superfície da plataforma e das paredes do forno com o modificador pode ocorrer de três formas: a) imersão do tubo de grafite ou da plataforma em uma solução do reagente modificador por um determinado intervalo de tempo. Esta técnica é pouco utilizada devido à baixa eficiência de impregnação; b) eletrodeposição do elemento sobre a superfície do forno ou sobre a plataforma. Requer a montagem de uma célula eletroquímica e apresenta a desvantagem de cobrir totalmente a superfície da plataforma impedindo a presença de sítios de carbono ativo; c) deposição térmica do elemento modificador. É a prática mais utilizada, pois é obtida pelo próprio programa do forno e não recobre totalmente a superfície da plataforma (FROES *et al*., 2006; BULSKA *et al*., 1998).

Vários elementos já foram utilizados como modificadores químicos, entretanto, os elementos comumente utilizados como modificadores convencionais são cobre, níquel, nitrato de paládio e nitrato de magnésio, ácido cítrico, entre outros. Dentre os modificadores, a mistura de paládio e nitrato de magnésio ficou conhecida como “modificador universal”

devido ao fato de apresentar um bom desempenho para a grande maioria dos elementos determinados pela técnica GF AAS (FROES *et al*., 2006).

Os elementos preferidos para a aplicação como modificador permanente são os do grupo da platina: platina, irídio, rutênio, ródio e paládio; os elementos formadores de carbetos principalmente: zircônio, nióbio, tantálio, titânio e tungstênio; ou combinações de modificadores que formam carbetos com os elementos do grupo da platina, como: tungstênio–ródio, tungstênio–irídio, tungstênio–rutênio. A escolha por esses elementos deve-se levar em conta os seus altos pontos de fusão (entre 2400 e 3300 ^{o}C), o que possibilita o uso de elevadas TA e limpeza sem a perda do modificador, característica do termo permanente. Possuem também a habilidade de atuar como catalisadores, eliminando os concomitantes da matriz previamente à atomização do analito, minimizando ou eliminando possíveis interferentes (FROES *et al*., 2006).

Na década de 70 o controle efetivo das interferências era difícil, pois o forno de grafite não era isotérmico (como é a plataforma). Na determinação de elementos mais voláteis ou menos refratários, durante o aquecimento do tubo de grafite, como o gás é aquecido pela radiação de calor do forno, o mesmo pode não atingir uma temperatura ideal para que os átomos permaneçam no estado gasoso fundamental, princípio da AAS. Assim, em temperatura mais baixa do gás no interior do forno, os átomos podem recombinar formando moléculas, como a absorção molecular não é detectada pela AAS, os sinais analíticos obtidos serão incorporados aos sinais de fundo (*background*) causando uma perda de sensibilidade analítica pela diminuição de átomos que poderiam absorver a radiação da lâmpada e por outro lado, caso ocorra um aumento significativo nos sinais de fundo, a correção pode não ser satisfatória gerando erros nas medições. Então, SLAVIN *et al*., (1981) introduziram o conceito de STPF *(Stabilized Temperature Platform Furnace*) – Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada para estabelecer melhores condições analíticas para a técnica. Trata-se de um conjunto de condições que devem ser aplicadas, ao mesmo tempo, nas determinações por GF AAS, a fim de garantir medidas de absorvâncias reprodutivas e livres de interferências. As condições STPF podem ser resumidas em: a) uso de plataforma de L'vov com aquecimento da plataforma de maneira homogênea; b) cálculo da concentração do analito baseado na absorvância integrada ao invés da altura do pico de absorção; c) aquecimento eletrônico rápido para obter medidas mais precisas do sinal de absorvância e minimizar interferências; d) interrupção do fluxo de gás na atomização; e) diferença máxima de 1000 ºC entre as etapas da TP e da TA; f) uso de modificadores químicos para minimizar interferências; g) correção de fundo baseada no efeito Zeeman (SLAVIN *et al*., 1981).

A Tabela 2 apresenta alguns trabalhos com modificação química permanente em diferentes matrizes.

Tabela 2. Alguns trabalhos com modificação química em diferentes matrizes

Modificador	Metal	Amostras	Referência
W	Cr	Soro Humano	FABRINO, *et al*., 2015
Zr	Sb		
W	Cd	Mandioca	OLIVEIRA, *et a*l., 2013
TI	Pb		
Zr/Ir	Pb, Cd, As e Ni	Material Atmosférico Particulado	PASIAS, *et al*., 2013
W/$Cu(NO_3)_2$ co-injeção	Hg	Músculo de peixe	MORAES, *et al*., 2013
W	Cr	Leite Materno	LARA, *et a*l., 2015
Ta	Pb	Xarope de ervas	DIAS, *et al*., 2015
W co-injeção	Cu e Pb	Álcool combustível	SANTOS, *et al*., 2012
Nb/Pb co-injeção	Pb	Batom	SOARES, *et al*., 2013
Ir/Nb Ir/W	Sb	Sedimentos	DOBROW, *et al*., 2011

2.5. Etratégias de otimização

2.5.1. Planejamento e otimização de experimentos

Para obter resultados satisfatórios com a técnica de GF AAS é necessário otimizar as condições analíticas como TP e TA e o tipo de modificador químico. No modo convencional (univariado) este estudo é realizado por meio de curvas de TP e de TA.

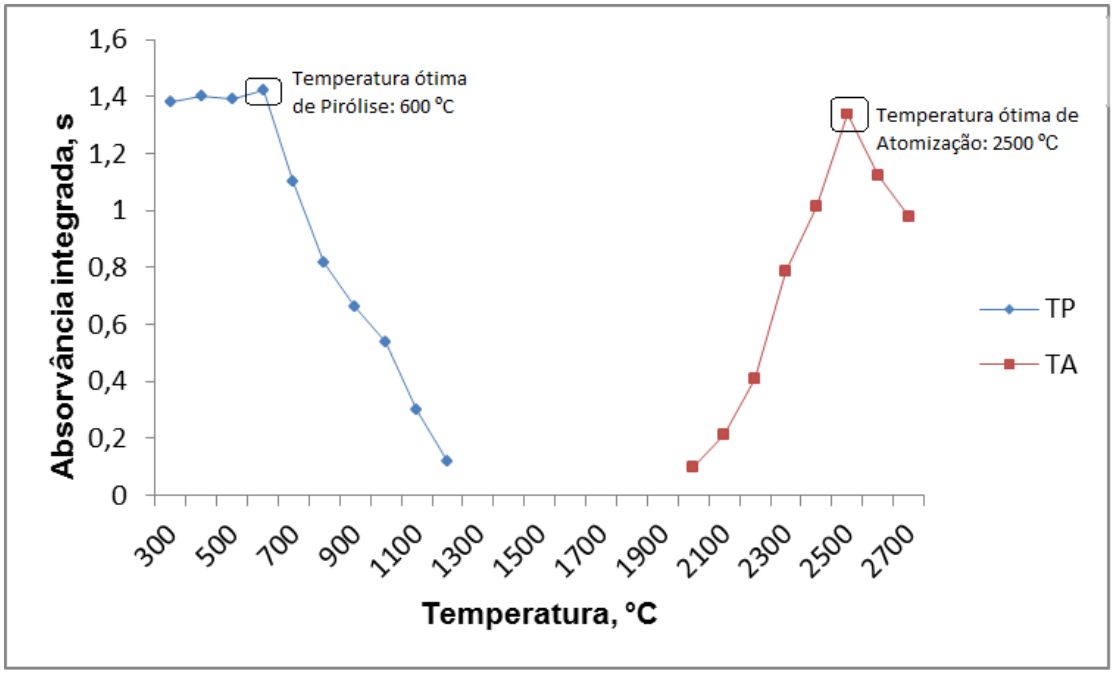
Nessa metodologia investiga-se, em momentos distintos, as TP e TA mais adequadas. A TA é fixada no valor recomendado pelo fabricante do equipamento ou outro valor de

referência é escolhido. Em seguida, o valor da TP é estabelecido em um patamar mínimo, normalmente a 300 ºC. Uma solução contendo a amostra com o elemento de interesse é empregada. As leituras do sinal analítico do elemento são feitas nestas condições, e em seguida a TP é aumentada de 100 ºC em 100 ºC exceto para cádmio e mercúrio que este valor normalmente é de 50 ºC. Medidas são feitas nessas novas condições e o processo se repete, sempre aumentando a TP e mantendo a TA fixa até que: a diferença entre as duas temperaturas fique em torno de 500 ºC, ou haja deformação do sinal analítico (pico de absorção) em relação ao que é observado rotineiramente em GF AAS, ou então, ocorra diminuição do sinal analítico. Os resultados das leituras em absorvância integrada para cada condição de análise são plotados em um gráfico em função das TP. Observa-se no gráfico a TP máxima antes da ocorrência de um decréscimo brusco do sinal analítico. Esta temperatura é considerada a ideal para pirólise da matriz sem perda de analito. A TP estabelecida nessa etapa é utilizada para o estudo da melhor TA.

A otimização da TA é feita por metodologia semelhante à otimização da TP. A TP é fixada no valor otimizado, as medidas são feitas em diferentes TA (com decréscimos também de 100 ºC) até que o comportamento do sinal analítico seja semelhante ao ocorrido na otimização da TP (WELZ *et al*., 1999). A Figura 5 apresenta exemplo de um gráfico com curva de TP e TA para determinação de níquel em presença do irídio como modificador químico permanente.

Entretanto, as principais desvantagens da análise univariada são o grande número de ensaios necessários para otimização e a falta de informações acerca das interações entre a variável em estudo e as demais variáveis que afetam o sistema. É importante salientar que nos sistemas químicos, as variáveis costumam se correlacionar fortemente, interagindo através de mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e/ou antagônicos. Ao negligenciar as interações entre as variáveis, como na análise univariada, o resultado obtido não necessariamente corresponde às condições que levam ao ótimo verdadeiro, podendo implicar na perda de informações relevantes e de resposta analítica.

Figura 5. Exemplo de Curvas de TP e de TA



Fonte: A autora

Neste contexto, o uso de análise multivariada permite o estudo de todas as variáveis simultaneamente, assim como de suas interações, correlacionando seus efeitos com a propriedade de interesse, no caso com a resposta analítica. Isso pode ser realizado usando métodos quimiométricos baseados em planejamentos e otimização de experimentos, que tornam possível avaliar o papel das variáveis, a predição das interações entre as variáveis e a otimização das condições experimentais do processo de aplicação, utilizando um número reduzido de experimentos, e consequentemente, reduzindo o consumo de reagentes e a geração de resíduos (BARROS NETO *et a*l., 2010).

Provavelmente, a otimização de parâmetros experimentais de relevância seja uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente daqueles que objetivam o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala onde procura responder questões como: quais as variáveis relevantes? quais os valores que devem ser ensaiados? qual a ordem de estudo das variáveis? qual a melhor resposta a ser analisada? como desenvolver um trabalho de otimização, com o mínimo de trabalho experimental?

Diante desta problemática, cada pesquisador tem a sua forma de enfrentar este trabalho, normalmente apoiado na experiência acumulada na área. Dentre as várias alternativas existentes, destaque pode ser dado aos métodos de planejamentos fatoriais, os quais permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir

de um número reduzido de ensaios experimentais. Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento (BARROS NETO *et a*l., 2010).

Assim, o modelo fatorial completo pode ser usado para determinar dentre as variáveis experimentais e suas interações quais têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. Este passo é chamado de triagem das variáveis. O número de experimentos a serem realizados é definido pelo número de fatores (variáveis) e níveis (valores) estabelecidos, onde para a combinação de *k* fatores investigada em 2 níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos (todas as combinações possíveis de valores codificados em −1 e +1), no caso de k = 3 variáveis, por exemplo, resulta no total de 8 experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos (concentrações de uma substância, valores de pH, etc.) são codificados pelos valores (−1) para o nível mais baixo e (+1) para o nível mais alto. Para fatores qualitativos (tipos de modificadores, tipos de catalisadores etc,) como não existem valores altos ou baixos, fica a critério do analista o código escolhido para cada nível (TEÓFILO *et al*., 2006).

Na técnica de GF AAS, para o planejamento fatorial as variáveis TP e TA foram avaliadas atribuindo 2 valores de temperaturas, um menor e outro maior, baseando em conhecimentos prévios ou nas condições sugeridas pelo fabricante do equipamento para o analito em questão. No caso específico da escolha do modificador, por ser uma variável qualitativa e possuir um número de diferentes modificadores a disposição, a estratégia empregada foi a realização de uma pré-seleção, onde foram escolhidos 2 dentre aqueles que apresentaram melhores resultados analíticos, ou seja, maior sinal de absorção e menor sinal de fundo (*backgraund*), para inserção no planejamento fatorial.

O efeito de uma variável é definido como a mudança na resposta causada pela variação de nível ou níveis da variável. Para estudar o efeito de qualquer variável sobre a resposta é preciso fazê-la variar e registrar o resultado dessa variação. Isso implica na realização de experimentos em, pelo menos, 2 níveis. Alterações nos níveis das variáveis podem afetar a resposta experimental através de seus efeitos principais (efeitos individuais) e dos efeitos das interações entre as variáveis (2ª ordem ou superior) (BARROS NETO *et a*l., 2010).

A partir de todas as possíveis combinações entre os valores codificados para cada variável e usando o produto dos sinais originais das variáveis para obter os sinais das

interações de 2ª ordem e de ordem superior, é possível elaborar uma matriz de coeficientes de contrastes. Na Tabela 3, tem-se como exemplo a matriz de um planejamento fatorial 2^3.

Tabela 3. Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3

	Variáveis			*Interações*			
Média	x_1	x_2	x_3	x_{12}	x_{13}	x_{23}	x_{123}
+	−	−	−	+	+	+	−
+	+	−	−	−	−	+	+
+	−	+	−	−	+	−	+
+	+	+	−	+	−	−	−
+	−	−	+	+	−	−	+
+	+	−	+	−	+	−	−
+	−	+	+	−	−	+	−
+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

O planejamento experimental estatístico pode ser realizado por diferentes programas computacionais e, dentre as várias análises feitas, os resultados podem ser fornecidos em forma de gráficos, tais como: o gráfico de Pareto e de superfície de resposta. Então, uma das maneiras mais simples e comumente usada para interpretar os resultados de um planejamento fatorial é o gráfico de Pareto para os efeitos estimados.

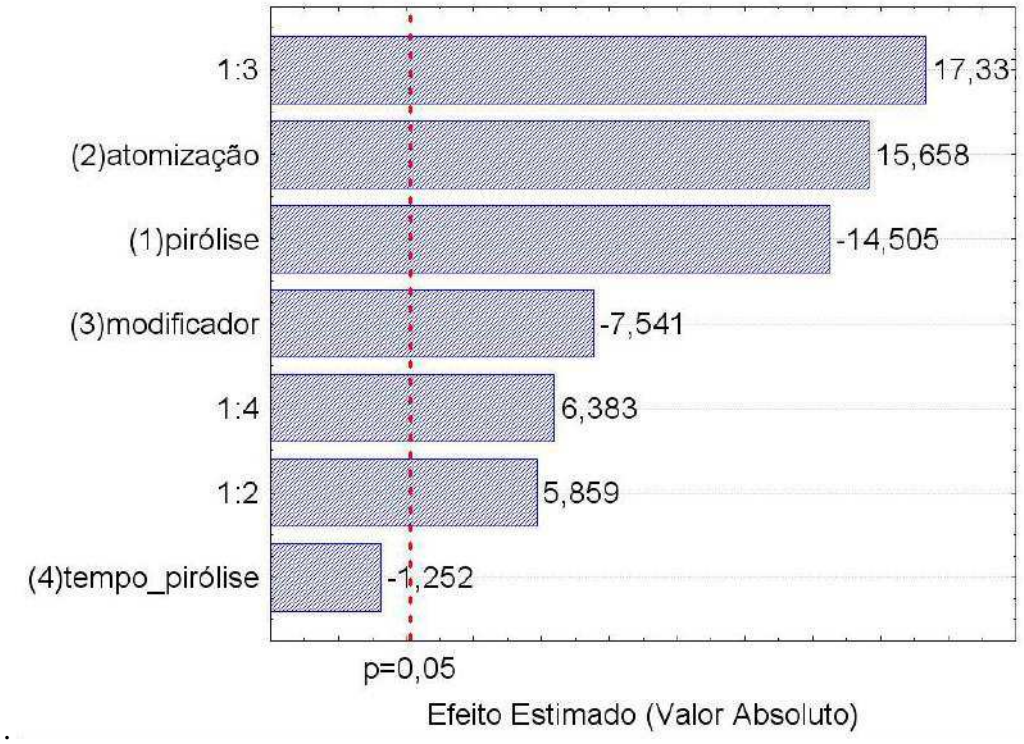
O gráfico de Pareto tem o aspecto de um gráfico de barras que correspondem às intensidades dos efeitos e de suas interações e o sinal (+ ou −) indica qual dos dois níveis influenciou mais significativamente na resposta. Cada causa é quantificada em termos da sua contribuição para o problema e colocada em ordem decrescente de influência. A linha tracejada em vermelho corresponde ao efeito mínimo que uma variável ou interação entre elas deve produzir para causar variação significativa no sinal analítico, com uma confiança de

95%. Através da análise do gráfico visualiza-se de maneira simples quais variáveis são ou não significativas, como mostrado na Figura 6.

No gráfico de Pareto os efeitos positivos (acima do nível de significância) das variáveis individuais, indicam que a utilização de níveis elevados é necessária para atingir uma alta eficiência de resposta. Por outro lado, os valores negativos, indicam que os níveis baixos é que devem ser usados para alcançar uma alta eficiência. Em relação aos efeitos estimados das interações, um valor negativo indica a necessidade de inverter a tendência de pelo menos uma das variáveis para obter uma alta eficiência de resposta.

Conforme o exemplo mostrado na Figura 6, apenas a variável 4 (tempo de pirólise) não atinge o limite, sendo assim uma variável que não influencia significativamente na resposta analítica e, portanto deve ter seu valor fixado nos estudos posteriores. A interação entre as variáveis 1 e 3 apresentou efeito maior que as variáveis principais sendo sua influência na resposta mais significativa, como possui sinal positivo, a combinação de manter a temperatura de pirólise e o modificador em nível baixo (−1) causa aumento na intensidade da resposta analítica. Caso fosse negativo, é preciso identificar se uma das duas variáveis ou ambas deveria ser mantida em nível alto (+1) para não diminuir a intensidade da resposta. Já a temperatura de atomização, com sinal positivo deve ser mantida em nível alto (+1).

Figura 6. Exemplo de Gráfico de Pareto



Fonte: A autora

Após a realização dos experimentos de triagem os fatores significativos são utilizados em uma metodologia de análise de superfície de resposta para a otimização do experimento, encontrando os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, atingir a região ótima na superfície definida pelos fatores (BARROS NETO *et a*l., 2010).

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, consequentemente, dão condições de explorar, ou seja, modelar e deslocar o sistema até a sua otimização. O gráfico de superfície de resposta fornece uma visualização tridimensional da variação de 2 variáveis independentes em relação à variável dependente (resposta analítica) (BARROS NETO *et a*l., 2010).

O Planejamento Composto Central (CCD), do inglês, "Central Composite Design" possivelmente é a classe de planejamentos, mais utilizada para ajustar modelos quadráticos. Também são utilizados planejamentos Doehlert e Box-Behnken para metodologias de superfície de resposta com eficiência semelhante ao CCD (TEÓFILO *et al*., 2006).

O CCD consiste num planejamento do tipo estrela formado por 3 séries de experimentos:

i) um planejamento fatorial 2^k (todas as combinações possíveis de valores codificados em +1 e −1);

ii) 2k pontos axiais ou estrela (codificados em +α e −α), onde ;

iii) cp replicatas no ponto central (codificado em 0).

Assim, o número de experimentos é dado por $N = 2^k + 2k + cp$, sendo que para k = 2 variáveis e com 5 ensaios no ponto central, um total de 13 experimentos, em que as 2 variáveis foram codificadas em 5 níveis (−1,41; −1; 0; +1 e +1,41). Na Tabela 4, tem-se como exemplo a matriz do CCD com 2 variáveis (TEÓFILO *et al*., 2006).

A análise da função da superfície de resposta baseia-se no princípio da obtenção de uma região de máxima tendência, a partir do qual a relação matemática entre a função de resposta e as variáveis independentes pode ser aproximada por um polinômio quadrático. Onde as suas derivadas parciais igualadas a zero proporcionam o ponto estacionário, o qual pode representar um ponto de máximo, mínimo ou sela. O processo de otimização é finalizado caso a função apresente um máximo ou um mínimo desejável, que corresponderá às condições ótimas de análise. Entretanto, ao obter um ponto de sela, deve-se deslocar para uma nova região experimental e construir um novo planejamento (BARROS NETO *et a*l., 2010).

Tabela 4. Matriz do planejamento composto central com 2 variáveis

Planejamento CCD – 2^2		
x_1	x_2	
−1	−1	Planejamento fatorial
+1	−1	
−1	+1	
+1	+1	
0	0	Ponto central
−α	0	Pontos axiais
+α	0	
0	−α	
0	+α	

Fonte: (TEÓFILO *et al*., 2006)

2.6. Validação Analítica

A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos, estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilitar o conhecimento das limitações e da confiabilidade das medidas realizadas nas análises.

Qualquer técnica analítica depende de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do que se pretende atingir para um bom desempenho da técnica.

☞ **Linearidade**: é a capacidade de um método analítico de gerar sinais linearmente proporcionais à concentração de uma substância ou elemento em análise, é avaliada através da análise de uma série de soluções padrão, no mínimo, 5 concentrações diferentes, que abrangem a faixa de concentração de interesse gerando uma curva de calibração analítica (ANVISA, 2003). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação (r) no mínimo igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

☞ **Seletividade – Interferência de matriz**: capacidade de um método analítico medir exatamente a resposta de um analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes, alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque esses compostos afetam diretamente a resposta. Os efeitos de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, esses problemas podem ser superados através da calibração por adição de padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação ou detecção (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2010).

A curva de calibração em meio aquoso do instrumento, ou seja, com os padrões preparados em água, relaciona a resposta do aparelho com a massa do analito, sem levar em conta a interferência da matriz, já a curva de calibração por adição de analito à matriz visa eliminar interferência da matriz e de outras etapas do método.

O efeito de matriz, seletividade, pode ser testado comparando-se as inclinações das curvas de calibração do instrumento, sem a matriz, com a curva de calibração por adição de analito à matriz. Se as inclinações destas 2 curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito. Para tal, são preparadas 3 curvas de calibração em meio aquoso e 3 curvas de calibração por adição de analito, com leituras em triplicatas (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

☞ **Limite de detecção (LD)**: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não exatamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado pela Equação 1 (ANVISA, 2003).

$$LD = \frac{s_a \times 3}{IC} \qquad \text{(Equação 1)}$$

onde:

S_a = desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do branco da curva de calibração por adição de analito à matriz;
IC = a inclinação da curva de calibração.

☞ **Limite de quantificação (LQ)**: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com certo nível de confiança. Normalmente é o ponto de menor valor na curva de calibração. Pode ser expresso pela Equação 2. (ANVISA, 2003).

$$LQ = \frac{s_a \times 10}{IC} \qquad \text{(Equação 2)}$$

onde:

S_a = desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do branco da curva de calibração por adição de analito à matriz;
IC = a inclinação da curva de calibração.

☞ **Exatidão:** é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida. A exatidão pode ser estimada pelo uso de material de referência certificado (CRM), pela comparação do método proposto com um método de referência ou pelo uso de ensaios de recuperação na matriz (BRITO *et al.*, 2003). No caso dos estudos de adição e recuperação, uma recuperação ideal seria de 100%, mais flutuações dentro da faixa de 20% são consideradas aceitáveis (WELZ, *et al.*, 1999). Para o cálculo das recuperações é empregada a Equação 3, (IMETRO, 2003).

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1 - C_2/C_3) \times 100 \qquad \text{(Equação 3)}$$

onde,

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,
C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada,
C_3 = concentração adicionada.

☞ **Precisão**: avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou pelo coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 4 (ANVISA, 2003).

$$CV(\%) = \frac{s}{C} \times 100 \qquad \text{(Equação 4)}$$

em que, *s* é o desvio padrão e *C*, a concentração média determinada.

A precisão pode ser considerada em 3 níveis: Repetibilidade (precisão intra-ensaios), Precisão intermediária (precisão inter-ensaios) e Reprodutibilidade (precisão inter-laboratórios).

☞ **Sensibilidade:** a sensibilidade de métodos em AAS é dada pela concentração característica B_0 ou c_0 ou pela massa característica (m_0). Essa concentração ou massa corresponde a uma absorvância integrada de 0,0044 abs (1% de absorção). No método com forno de grafite, o volume de amostra pode variar com a viscosidade e capacidade do tubo. A massa característica é calculada pela Equação 5 sendo a unidade usada para sua quantificação o picograma (10^{-12} g) (WELZ, *et al.*, 1999).

$$Massa\ característica = \frac{volume\ (\mu L) \times concentração\ (\mu g\ L^{-1}) \times 0{,}0044}{absorvância\ da\ amostra - absorvância\ do\ branco} \qquad \text{(Equação 5)}$$

A sensibilidade também pode ser caracterizada pelo LD e pelo LQ.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de estratégias analíticas para a determinação direta, sem necessidade de digestão da amostra, de metais comprovadamente tóxicos como alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas como cervejas, vinhos, bebidas a base de cachaça e vodka do tipo comercializado como *ice-drinks*, empregando a técnica de GF AAS e otimizações multivariadas (planejamentos fatoriais e CCD).

3.2. Objetivos Específicos

☞ selecionar a melhor TA, TP e o tipo de modificador químico permanente para chumbo e alumínio em amostras de cerveja, cobre em amostras de *ice-drinks* e alumínio em amostras de vinho tinto, com uso de otimização multivariada (planejamento fatorial e CCD) para estabelecer as condições experimentais;

☞ introdução direta da amostra sem nenhum tratamento preliminar e nenhum processo de digestão associado;

☞ validação das metodologias desenvolvidas;

☞ aplicação da metodologia validada para cada uma das amostras citadas acima acondicionadas em latas, garrafas de vidro e Tetra Pak.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentação e Acessórios

As análises foram feitas em um Espectrômetro de Absorção Atômica Analyst 400 Perkin Elmer (Shelton, USA), equipado com forno de grafite HGA-800, amostrador automático. A correção do sinal de fundo (*background*) foi realizada com lâmpada de deutério e como fonte de radiação utilizou-se lâmpadas de catodo oco monoelementares de alumínio, chumbo, cobre e cádmio da Perkin Elmer. Como gás de purga o argônio N50 da Air Liquide® (White Martins, Contagem, MG, Brasil), com grau de pureza de 99,999%. As medidas de absorvâncias foram feitas em tubos de grafite pirolíticos com plataforma de L'vov (Perkin Elmer B3-0001254) e "*vials*" do forno de grafite para receber as amostras a serem levadas ao forno de grafite pelo pipetador automático. As leituras foram feitas em absorvância integrada (área do pico). Em todos os estudos multivariados o volume das soluções de calibração e amostras introduzidas no forno de grafite foi sempre de 20 μL.

Para a otimização multivariada utilizou-se o programa STATISTICA® 6.0 para Windows (StatSoft).

4.2. Reagentes, Soluções e Amostras

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de pureza analítica e água deionizada em sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, EUA).

Para o preparo das soluções de calibração e das contaminações artificiais das amostras (*spikes),* foram utilizadas soluções padrões de alumínio, chumbo e cobre Titrisol (Merck®), todas de pureza analítica. Estas foram preparadas por diluições apropriadas de soluções estoque de (1 mg L^{-1}) de cada metal e acidificadas conforme recomendações do fabricante.

Todas as amostras de cervejas foram desgaseificadas agitando-se ou transferindo de um béquer para outro. O tempo consumido para eliminar a espuma dependeu do tipo de cerveja e da temperatura.

Para a obtenção de sinais analíticos mensuráveis, as amostras de cerveja, vinho e i*ce-drink*, escolhidas aleatoriamente foram contaminadas com os analitos em diferentes concentrações como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Contaminação artificial (*spikes*) das matrizes estudadas para cada analito para a realização da triagem, para escolha dos modificadores permanentes

Analito	Matriz	Contaminação (µg L^{-1})
Al	Cerveja	20
Al	Vinho	50
Cu	*Ice-drink*	40
Pb	Cerveja	25

As amostras de cervejas, vinhos tinto e *ice-drinks,* em diferentes tipos de marcas e embalagens (caixa Tetra Pak, lata de alumínio e garrafa de vidro), foram adquiridas em supermercados locais na cidade de Belo Horizonte e de Uberlândia e guardadas refrigeradas em geladeira até o momento da análise.

4.3. Limpeza do material

Os frascos utilizados para o armazenamento das soluções e as vidrarias foram descontaminados através da inserção dos mesmos em um banho de ácido nítrico 20% (v/v) (Merck®) por pelo menos 24 horas e, passado este tempo, fez-se o enxágue com água deionizada no mínimo três vezes. Em seguida, os frascos foram colocados para secagem a temperatura ambiente cobertos com papel livre de metais ou em capela de exaustão.

Para a lavagem do capilar do amostrador automático, utilizou-se uma solução de Triton X-100 0,1% (v/v) (Merck®) em ácido nítrico 0,2% (v/v) (Merck®) para limpar e evitar a adsorção de analitos e entupimento do capilar do amostrador.

4.4. Tratamento do Tubo de Grafite com Modificadores Permanentes

Os tubos de grafite pirolíticos com plataforma de L'vov, foram modificados por tratamento térmico com soluções de 1000 mg L^{-1} de: tungstênio, ródio, irídio, rutênio, tântalo, zircônio e nióbio (Fluka®), sendo que este tratamento foi feito de acordo com um programa de forno específico (SILVA *et al.*, 1999) como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Programa de temperaturas de forno para tratamento do tubo de grafite pirolítico com plataforma de L'vov com modificadores permanentes (500 μg)

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de Argônio ($L\ min^{-1}$)	Estágios
1	90	5	15	300	Secagem
2	140	5	15	300	Secagem
3	**1000**	**10**	**10**	**300**	**Pirólise**
4	**2000**	**0**	**5**	**0**	**Atomização***
5	20	1	10	300	Resfriamento

***Etapa em que ocorre a deposição do modificador**

Um volume de 25 μL das soluções de 1000 mg L^{-1} dos modificadores foram introduzidos no interior do tubo de grafite com plataforma, através do pipetador automático e submetidos ao programa de temperatura do forno, sendo este procedimento repetido 20 vezes obtendo-se uma plataforma tratada com 500 μg do modificador permanente.

4.5. Otimização das Condições de Análise

A primeira etapa da otimização consistiu na escolha dos melhores modificadores químicos permanentes com a finalidade de aproximar as condições de otimização às condições de análise.

Com as condições do programa de forno recomendadas pelo fabricante para a determinação de metais em água, em cada caso, foram testados diferentes tubos de grafite com plataforma, tratados com os modificadores químicos permanentes: tungstênio, ródio, irídio, rutênio, tântalo, zircônio e nióbio, bem como a condição sem modificador, para selecionar os 2 tubos (tratados com os modificadores químicos permanentes citados acima), que apresentarem melhores sinais analíticos. Aleatoriamente, um é escolhido para o nível baixo (−1) e o outro para o nível alto (+1) do planejamento fatorial.

Além do uso de modificador químico, a TP e a TA também são fatores (variáveis) que devem ser avaliados pelo planejamento fatorial. Para a triagem das variáveis foi feito um

planejamento fatorial completo do tipo 2^3, determinando quais variáveis são ou não significativas, bem como as interações entre elas, de acordo com a resposta do correspondente gráfico de Pareto. As variáveis não significativas são fixadas e o uso do modificador químico permanente definido, já que se trata de um parâmetro qualitativo e não pode ser refinado. Na etapa seguinte, um método de superfície de resposta CCD, foi utilizado para otimizar as variáveis significativas no planejamento fatorial para, enfim, obter as melhores condições analíticas.

4.6. Validação da Metodologia Analítica

Afim de verificar alguma provável interferência da matriz no método proposto, compara-se o perfil das curvas obtidas através da calibração por adição de padrão em meio aquoso (sem a matriz) e da calibração por adição de padrão na amostra (calibração por ajuste de matriz), para cada analito em meio ácido nítrico 5% (v/v). Para isso, foram construídas 3 curvas de calibração aquosa (sem a matriz) e 3 curvas por ajuste de matriz para cada metal, estas últimas na presença das matrizes em estudo, todas com leituras em triplicatas. As inclinações angulares obtidas para ambas as curvas foram comparadas mediante aplicação do teste F de homogeneidade de variâncias e o teste *t de Student* de comparação de médias ao nível de 95% de confiança (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

Se através do estudo estatístico citado anteriormente a média dos coeficientes angulares das curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz não forem significativamente diferentes pode-se afirmar que não há interferência da matriz. Neste caso o desvio padrão empregado para o cálculo dos LD e LQ será obtido a partir de leituras do branco da curva de calibração aquosa e, sendo esta curva empregada nos estudos posteriores. Mas, se os testes estatísticos mostrarem que as inclinações das curvas de calibração aquosa e por ajuste de matriz forem significativamente diferentes, o desvio padrão usado para o cálculo do LD e LQ do método será obtido a partir de leituras do branco da curva por ajuste de matriz, sendo essa empregada nos estudos subsequentes.

O desempenho analítico do método desenvolvido foi avaliado por meio da obtenção de algumas figuras de mérito. As faixas utilizadas na calibração analítica foram selecionadas obedecendo à lei de Beer na qual existe uma correlação entre as concentrações do analito nas curvas e as absorvâncias obtidas em cada ponto. Geralmente, no mínimo 5 níveis de concentrações mais o branco são suficientes para se obter uma boa linearidade para os

métodos desenvolvidos, a qual é verificada pelo coeficiente de correlação (r) que deve ser maior ou igual a 0,99 (ANVISA, 2003).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado a amostra, sendo verificada a partir de, 15 determinações da mesma amostra fortificadas com os analitos contemplando o intervalo linear da curva selecionada (aquosa ou ajuste de matriz), ou seja, 3 níveis de concentração, baixa, média e alta, com 5 réplicas cada (ANVISA, 2003).

A precisão é calculada por estudo de repetibilidade (precisão intra-ensaios) utilizando as mesmas amostras empregadas no cálculo da exatidão (recuperação). Neste caso, para cada nível de concentração foi calculado o CV (percentual) e após foi calculado o CV médio para os 3 níveis de concentração (ANVISA, 2003).

A sensibilidade é calculada através da massa característica (m_o), que é a massa do analito necessária para produzir um sinal de 0,0044 s de absorvância integrada, que corresponde a 1% de absorção (WELZ *et al*., 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de alumínio em vinhos tintos

Nas análises por GF AAS para obtenção de resultados satisfatórios é necessário otimizar as condições analíticas como TP, TA e o tipo de modificador, pois tais variáveis exercem um papel fundamental na sensibilidade, exatidão e precisão de cada método desenvolvido. Normalmente, os equipamentos fornecem informações sobre os programas de aquecimento para soluções aquosas, mas quando aplicadas estas condições para amostras complexas, os resultados podem ser comprometidos devido ao efeito de matriz. Vale ressaltar que todas as otimizações no desenvolvimento de métodos analíticos devem ser otimizadas na presença da matriz em estudo, pois estas matrizes podem ter componentes que podem causar interferências no bom desempenho analítico do método para um determinado analito a ser quantificado em uma dada matriz, ou seja, não se pode otimizar condições experimentais para uma dada matriz e se aplicar em outra (WELZ *et al*., 1999).

Diante disso é necessária a realização da otimização dos programas de temperatura para garantir a completa evaporação do solvente, bem como a eliminação dos constituintes da matriz da amostra através da TP, que possibilita a redução de eventuais interferências, antes da realização da atomização do analito.

5.1.1. Otimização do programa de temperaturas para determinação de alumínio em vinhos tintos

A otimização do programa de temperatura do forno para a determinação de alumínio em vinhos tinto seguiu o seguinte procedimento: inicialmente a partir de uma amostra de vinho tinto selecionada aleatoriamente, e artificialmente contaminada (*spikes*) com 50 μg L^{-1} de alumínio, foi previamente realizado um estudo de triagem entre os modificadores químicos permanentes (tungstênio, ródio, irídio, rutênio, tântalo, zircônio e nióbio, bem como a condição sem modificador), utilizando as condições recomendadas pelo fabricante (programa de temperaturas de forno) para determinação do analito em solução aquosa. A triagem entre os modificadores se faz necessária pois sendo variável qualitativa, posteriormente inviabiliza um planejamento fatorial com todos os modificadores, isso aumenta exponencialmente o número de experimentos a serem realizados. Portanto, uma triagem realizando uma medida por modificador e pré-selecionando os 2 melhores resultados para compor o planejamento fatorial é mais coerente. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos na etapa de triagem entre os modificadores.

Tabela 7. Triagem entre os modificadores para a determinação de alumínio em vinhos tintos

Leitura	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	W	0,1126 ± 0,007
2	**Rh**	**0,3034 ± 0,004**
3	Ir	0,1843 ± 0,008
4	Ru	0,1847 ± 0,005
5	Ta	0,1783 ± 0,002
6	Zr	0,2311 ± 0,002
7	**Nb**	**0,2864 ± 0,004**
8	Sem	0,1858 ± 0,007

***média de três replicatas. Em destaque os melhores resultados.**

Baseando-se no melhor sinal de absorvância (com maior sensibilidade, fundo corrigido e perfil simétrico compatível com sinais analíticos do forno de grafite) os 2 melhores modificadores químicos permanentes escolhidos para compor o planejamento fatorial 2^3 junto com as variáveis TP e TA foram o ródio e o nióbio. Na Tabela 8 é apresentada a matriz do planejamento fatorial 2^3 empregado e os respectivos valores de absorvância integrada medidos experimentalmente.

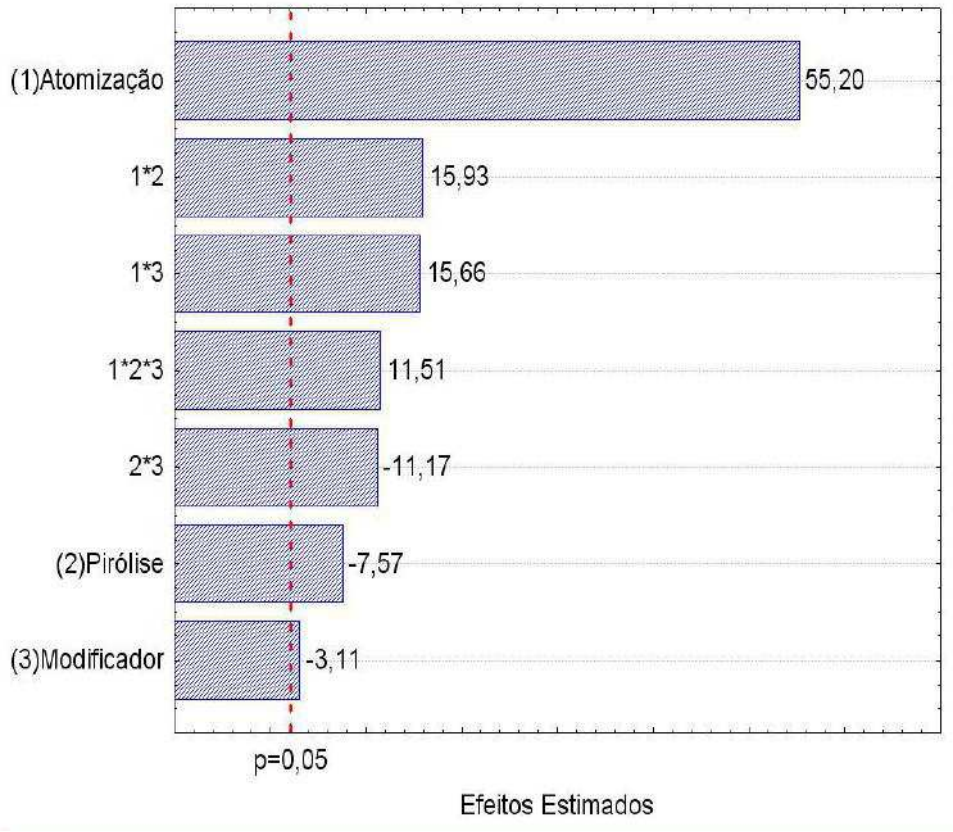
Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de alumínio em vinhos tintos utilizando como modificador químico permanente ródio e nióbio

Leitura	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	2300 (−1)	1200 (−1)	Rh (−1)	0,1451 ± 0,003
2	2500 (+1)	1200 (−1)	Rh (−1)	0,3444 ± 0,001
3	2300 (−1)	1800 (+1)	Rh (−1)	0,2080 ± 0,004
4	2500 (+1)	1800 (+1)	Rh (−1)	0,2960 ± 0,002
5	2300 (−1)	1200 (−1)	Nb (+1)	0,2165 ± 0,002
6	2500 (+1)	1200 (−1)	Nb (+1)	0,3056 ± 0,002
7	2300 (−1)	1800 (+1)	Nb (+1)	0,1875 ± 0,004
8	2500 (+1)	1800 (+1)	Nb (+1)	0,2587 ± 0,002

***média de três replicatas.**

Com a finalidade de analisar a significância das variáveis individuais e suas interações, foram calculados todos os efeitos: principais, 2ª ordem e 3ª ordem, e juntamente foi estabelecido um limite com 95% de confiança (representado pela linha tracejada no gráfico de Pareto) levando em conta a variância do erro experimental e o teste *t de Student*. Tais resultados são visualizados através do gráfico de Pareto mostrado na Figura 7, onde todos os efeitos foram significativos para a resposta analítica (intensidades acima do limite).

Figura 7. Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de alumínio em vinhos tintos



Nesse momento, será detalhado a interpretação deste gráfico de Pareto, lembrando que ocorre uma "concorrência" entre as tendências dos efeitos, que se dá conforme o seguinte:

i) a TA foi à variável que apresentou o efeito principal mais significativo, e como possui sinal positivo (+55,20), implica que deve ser mantida em nível alto (TA = 2500 ºC) para se obter uma resposta analítica (absorvância integrada) mais alta;

ii) as demais variáveis TP e tipo de modificador apresentaram efeitos principais com sinal negativo (−7,57 e −3,11 respectivamente), implicando que devem ser mantidas em nível baixo (TP = 1200 ºC e ródio como modificador) para também se obter uma resposta analítica mais alta, porém como tem intensidades menores que as dos efeitos das interações (2ª e 3ª ordem), as tendências dos efeitos das interações sobrepõem as dos efeitos principais para a TP e o tipo de modificador;

iii) os efeitos das interações de 2ª ordem (1*2 e 1*3) e de 3ª ordem (1*2*3) possuem sinal positivo (+15,93; +15,66 e +11,51 respectivamente), implicando que as tendências dos efeitos principais, tanto positivas quanto negativas, devem ser obedecidas originalmente para se obter uma melhor resposta analítica;

iv) o efeito da interação de 2ª ordem (2*3) possui sinal negativo (−11,17), implicando que pelo menos uma das tendências dos efeitos principais TP (2) e tipo de modificador (3), deve ser alterada para se obter uma melhor resposta analítica, entretanto como possui intensidade menor que os demais efeitos das outras interações (11,17 < 11,51, 15,66 e 15,93), deve prevalecer as tendências discutidas no item iii;

v) como resultados finais, temos que a TA deve ser mantida em nível alto (TA = 2500 ºC), a TP em nível baixo (TP = 1200 ºC) e o tipo de modificador em nível baixo (ródio), que por se tratar de uma variável qualitativa será fixada durante os próximos estudos usando o planejamento CCD.

Assim, prossegue-se os estudos usando ródio como modificador químico permanente e construindo uma matriz do planejamento CCD para duas variáveis, como apresenta a Tabela 9, na região próxima às TP de 1200 °C e de TA de 2500 ºC, conforme resultados obtidos no planejamento fatorial.

Tabela 9. Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas na determinação de alumínio em vinhos tintos utilizando ródio como modificador químico permanente

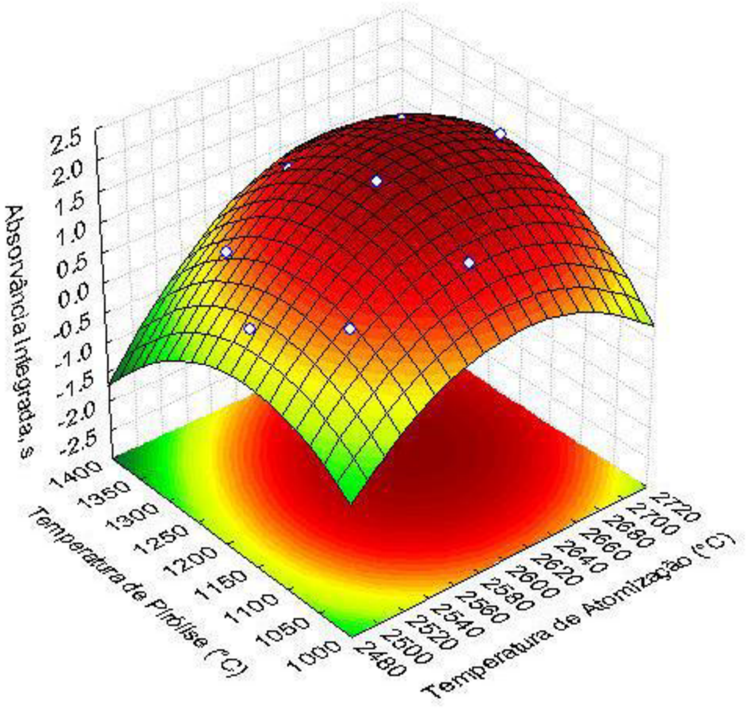
Leitura	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Absorvância integrada (s)*
1	2530 (−1)	1100 (−1)	0,804
2	2530 (−1)	1300 (+1)	0,713
3	2670 (+1)	1100 (−1)	1,221
4	2670 (+1)	1300 (+1)	1,652
5	2501 (−1,41)	1200 (0)	0,388
6	2699 (+1,41)	1200 (0)	1,78
7	2600 (0)	1059 (−1,41)	1,493
8	2600 (0)	1341 (+1,41)	1,199
9 (PC)	2600 (0)	1200 (0)	1,882
10 (PC)	2600 (0)	1200 (0)	1,883
11 (PC)	2600 (0)	1200 (0)	1,875
12 (PC)	2600 (0)	1200 (0)	1,874
13 (PC)	2600 (0)	1200 (0)	1,882

***médias em duplicata, exceto para as leituras no ponto central. s_{PC} = ± 0,004**

A partir desta matriz do planejamento acima é gerada a superfície de resposta obtida pelo CCD, como mostra a Figura 8. Devido a significância dos efeitos quadráticos das variáveis a superfície apresenta uma acentuada curvatura na região indicando que existe uma proximidade ao ponto estacionário ou ponto ótimo, no caso da Figura 8 representando um ponto de máximo. Na proximidade da região de ótimo, uma função matemática de 2ª ordem

(quadrática e de interação linear) que incorpora o efeito de curvatura pode ser ajustada. Os níveis das variáveis que maximizam a resposta analítica e que correspondem as condições experimentais otimizadas, então podem ser obtidos pelas derivadas parciais da função quando igualadas a zero.

Figura 8. Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA determinação de alumínio em vinhos tintos



A Equação 6 apresenta a função matemática da superfície de resposta, de onde através das derivadas parciais, chega-se às condições otimizadas das TP e de TA, que foram de 1210 °C e 2630 °C.

$$Abs = -(586{,}644 \pm 83{,}417) + (0{,}437 \pm 0{,}059)\,TA - (0{,}00009 \pm 0{,}00001)\,TA^2 + (0{,}022 \pm 0{,}019)\,TP - (0{,}00003 \pm 0{,}00001)\,TP^2 + (0{,}0002 \pm 0{,}00001)\,TATP \quad \text{(Equação 6)}$$

onde, Abs é a absorvância integrada, TP e da TA.

A Tabela 10 apresenta os valores correspondentes às condições otimizadas a serem utilizadas no programa de temperaturas de aquecimento do forno de grafite, para a determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos, usando ródio como modificador químico permanente.

Tabela 10. Programa de forno otimizado para determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS utilizando como modificador químico permanente ródio

Etapa	Temperatura (ºC)	Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (mL min^{-1})
Secagem	90	5	20	250
Secagem	160	15	30	250
Pirólise	**1210**	**10**	**20**	**250**
Atomização*	**2630**	**0**	**5**	**0**
Limpeza	2700	1	2	250

*** leitura nesta etapa.**

5.1.2. Validação do método para a determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS

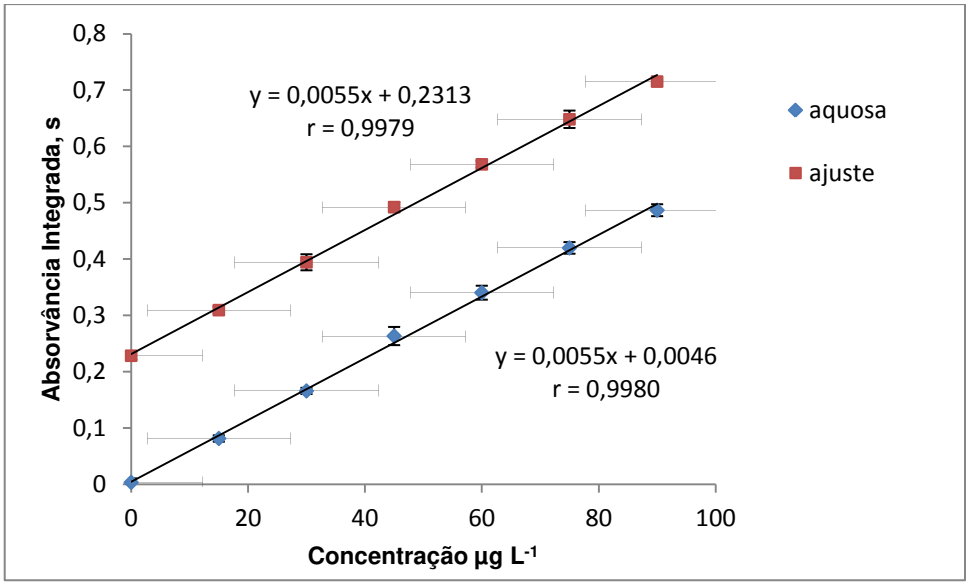
Após a etapa de otimização, algumas figuras de mérito foram calculadas com a finalidade de validar o método proposto para a determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos.

Para avaliar o efeito de matriz e escolher o método de calibração, um experimento envolvendo o método por adição de padrão foi realizado utilizando uma amostra de vinho tinto, de modo a obter-se as concentrações finais de (15,0; 30,0; 45,0; 60,0; 75,0 e 90,0 μg L^{-1} de Al^{3+}). Outra curva em meio aquoso (sem a matriz) foi preparada nas mesmas concentrações da curva por ajuste de matriz (com a matriz). As medidas para cada ponto das curvas de calibração foram realizadas em triplicatas.

O efeito de matriz foi avaliado por meio dos coeficientes angulares obtidos na curva em meio aquoso e por ajuste de matriz, através da aplicação do teste F e teste *t de Student*. Como não houve diferença significativa a um nível de 95% de confiança, na comparação das inclinações das duas curvas, os estudos posteriores foram realizados com a calibração em meio aquoso.

O método apresentou resposta linear às concentrações de alumínio compreendidas na faixa de 1,3 a 90,0 µg L^{-1}, com coeficientes de correlação maiores que 0,99 para ambas as curvas de calibração (aquosa e por ajuste de matriz), como pode ser visto na Figura 9.

Figura 9. Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de alumínio em vinhos tintos, por GF AAS (n=3)



Na Tabela 11 estão apresentadas as principais figuras de mérito obtidas para o método otimizado para a determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o coeficiente de correlação médio apresenta-se superior a 0,99. A sensibilidade dada pela massa característica pode ser considerada adequada, apesar de um pouco superior àquela recomendada pelo fabricante para determinação de alumínio em solução aquosa do analito. Esses valores indicados pelo fabricante são obtidos em condições ideais em que a calibração é realizada em meio aquoso, com reagentes ultrapuros e em equipamentos recém fabricados.

Pela inexistência de materiais de referência certificados para bebidas, a exatidão do método proposto foi avaliada através de testes de adição e recuperação, que consistiram em adicionar à amostra de vinho tinto concentrações de (30, 60 e 90 µg L^{-1} de Al^{3+}), cada qual com fortificação de 5 amostras. Conforme pode se observar para os 3 níveis de recuperação os valores ficaram próximos a 100%, contemplando a faixa entre 80-120% preconizada pela (EPA).

Tabela 11. Figuras de mérito para o método de determinação de alumínio em vinhos tintos por GF AAS

Parâmetro	Resultados
Equação de regressão (*n* = 3)	Y = 0,0055x + 0,0046
r (n = 3*)*	0,9980 ± 0,002
Faixa de trabalho (μg L^{-1})	1,3 – 90
LD (μg L^{-1})	0,4
LQ (μg L^{-1})	1,3
Massa característica (n = 6, pg)[a]	16,02 ± 0,63
Coeficiente de variação intra-ensaios médio, concentrações de 30, 60 e 90 μg L^{-1} (n = 15)[b]	2,23%
Faixa de porcentual de recuperação, % (3 níveis, n = 5 amostras por nível)[c]	83-109

[a] massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de alumínio em água = 10,0 pg; [b] Valor aceitável de 15% Associação Oficial de Química Analítica (AOAC). [c] Valor aceitável de 80 a 120% EPA

A precisão (coeficiente de variação intra-ensaio), foi determinada em termos de repetibilidade, foi determinada calculando-se o CV percentual de ensaios realizados em 3 níveis de fortificação (30, 60 e 90 μg L^{-1} de Al^{3+}), sendo bem inferiores aos valores máximos prescritos na literatura que é de 15% segundo a AOAC, o que confirma a boa precisão analítica do método desenvolvido.

AMORIM *et al*. (2006) efetuaram a determinação direta de alumínio em refrigerantes por GF AAS usando zircônio como modificador permanente. Neste estudo, os autores obtiveram um LD de 11,3 μg L^{-1}. FRANCISCO *et al.* (2015), na determinação direta de alumínio em refrigerantes brasileiros carbonatados por GF AAS, obtiveram um LD para alumínio de 0,69 μg L^{-1}. LARA *et al.* (2005) determinaram elementos traços (alumínio, cádmio, cálcio, cobre, ferro, chumbo e cromo) em vinhos argentinos após digestão ácida e determinação por GF AAS. O LD obtido pelos autores para alumínio foi de 0,3 μg L^{-1}. FROES *et al.* (2015) determinaram elementos traços (alumínio, bário, cálcio, cádmio, cromo, cobre, potássio, magnésio, sódio, níquel, chumbo, estanho e zinco) empregando a técnica de ICP OES em *Ready-to-Drink*, obtendo um LD de 1,93 μg L^{-1} para o alumínio.

Como pode ser observado na Tabela 11, o LD obtido pelo método proposto apresentou valores menores que os métodos apresentados em outros trabalhos. Alguns destes métodos não oferecem uma sensibilidade suficiente para a determinação direta, e uma etapa de pré-concentração é necessária. Outros métodos podem ser mais atraentes por causa de seus LDs mais baixos, no entanto, empregam técnicas com custos mais elevados, mais trabalhosas e que requer uma maior quantidade de reagentes. O método desenvolvido neste estudo é rápido, sem nenhum preparo de amostra (análise direta), tornando-se assim, adequado para a determinação deste elemento de forma simples e rápida. Contudo, eficiente, exata, precisa e com boa aplicabilidade em análise de rotina, por exemplo, em controle de qualidade em bebidas.

5.1.3. Determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos por GF AAS

Uma vez concluída a etapa de validação o método proposto foi aplicado para a determinação das concentrações de alumínio em 10 amostras de marcas diferentes de vinhos tintos, nacionais (n) e importados (i), armazenadas em garrafas de vidro (gv) e Tetra Pak (tp). A fim de se obter sinais analíticos dentro da faixa linear de trabalho, foi realizada a diluição das amostras na proporção 1:10 (v/v), quando necessário. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Os valores encontrados de Al^{3+} encontram-se na faixa de 166 a 513 μg L^{-1}. Sendo que o valor mais alto encontrado, de 513 μg L^{-1} de alumínio, foi determinado em uma amostra de vinho acondicionado em uma embalagem Tetra Pack. Esse valor representa um provável efeito migração quanto ao material constituído da embalagem sobre a amostra. Embalagens do tipo garrafa de vidro são menos propensas a migração de alumínio em relação as embalagens de lata e Tetra Pack. Tais tipos de embalagens são mais sujeitas a uma maior lixiviação do material, promovendo a migração de alumínio, contaminando a amostra FRANCISCO *et al*. (2015).

No trabalho de FRANCISCO *et al*. (2015), os autores encontraram valores de concentrações para alumínio em refrigerantes de 34 a 461 μg L^{-1}, enquanto que no estudo de LARA *et al*. (2005) a faixa dos teores encontrada para o alumínio em amostras de vinhos argentinos brancos e tintos foi de 17 a 18 μg L^{-1}.

Apesar de não se ter encontrado uma legislação ou orientação estabelecendo valores limites para a presença de alumínio em bebidas, na literatura ocorrem relatos de estudos abordando o fato de que mesmo à ausência de qualquer efeito essencial do alumínio à vida

humana, este metal é associado com diversos tipos de doenças (EXLEY, 2016; YOKEL, 2016 e BONDY, 2016).

Tabela 12. Determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos, nacionais (n) e importados (i) por GF AAS armazenadas em garrafas de vidro (gv) e Tetra Pak (tp)

Amostra	**Valor Determinado (µg L^{-1})**
1-n-gv	333 ± 8,7
2-n-tp	297 ± 7,5
3-i-gv	219 ± 13,8
4-i-tp	314 ± 6,0
5-n-tp	**513 ± 5,3**
6-n-gv	166 ± 4,5
7-i-tp	310 ± 1,9
8-n-gv	227 ± 6,3
9-i-gv	306 ± 3,2
10-n-tp	338 ± 3,7
11-i-gv	220 ± 14,3

Segundo a Organização Internacional do Vinho (OIV), a produção de vinhos em 2015 aumentou 2%, atingindo 275,7 milhões de hectolitros. A previsão é que o consumo mundial direto da bebida e a demanda de vinho para usos industriais como fabricação de conhaque, vinagre e vermute, atinjam 248,8 milhões de hectolitros (OIV, 2016). O abundante consumo e a associação a doenças, justificam a aplicabilidade do método proposto para a determinação direta de alumínio em amostras de vinhos tintos.

5.2. Determinação de Cobre em amostras de *ice-drinks* por GF AAS

5.2.1. Otimização do programa de temperaturas para a determinação de cobre em *ice-drinks*

A otimização do programa de temperaturas do forno para a determinação de cobre em *ice-drinks* seguiu um procedimento semelhante ao descrito no item 5.1.1., onde foram otimizadas as condições analíticas para a determinação de alumínio em amostras de vinhos tintos, porém a amostra de *ice-drink* foi artificialmente contaminada com 40 μg L^{-1} de cobre. Também a partir do programa de temperaturas de forno recomendadas pelo fabricante do equipamento, para a determinação de cobre em meio aquoso. Os resultados obtidos na triagem com destaque para os 2 melhores, no caso zircônio e tungstênio, estão apresentados na Tabela 13. Conforme justificado no método anterior, por se tratar de uma variável qualitativa, tais modificadores juntamente com a TP e a TA compuseram o planejamento fatorial 2^3, representado na Tabela 14, junto com as respectivas respostas experimentais.

Tabela 13. Triagem entre os modificadores para a determinação de cobre em *ice-drinks*

Leitura	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	**W**	**0,5968 ± 0,006**
2	Rh	0,3540 ± 0,008
3	Ir	0,2433 ± 0,009
4	Ru	0,2567 ± 0,010
5	Ta	0,2764 ± 0,004
6	**Zr**	**0,4764 ± 0,005**
7	Nb	0,2886 ± 0,007
8	Sem	0,1918 ± 0,007

***média de três replicatas. Em destaque os melhores resultados.**

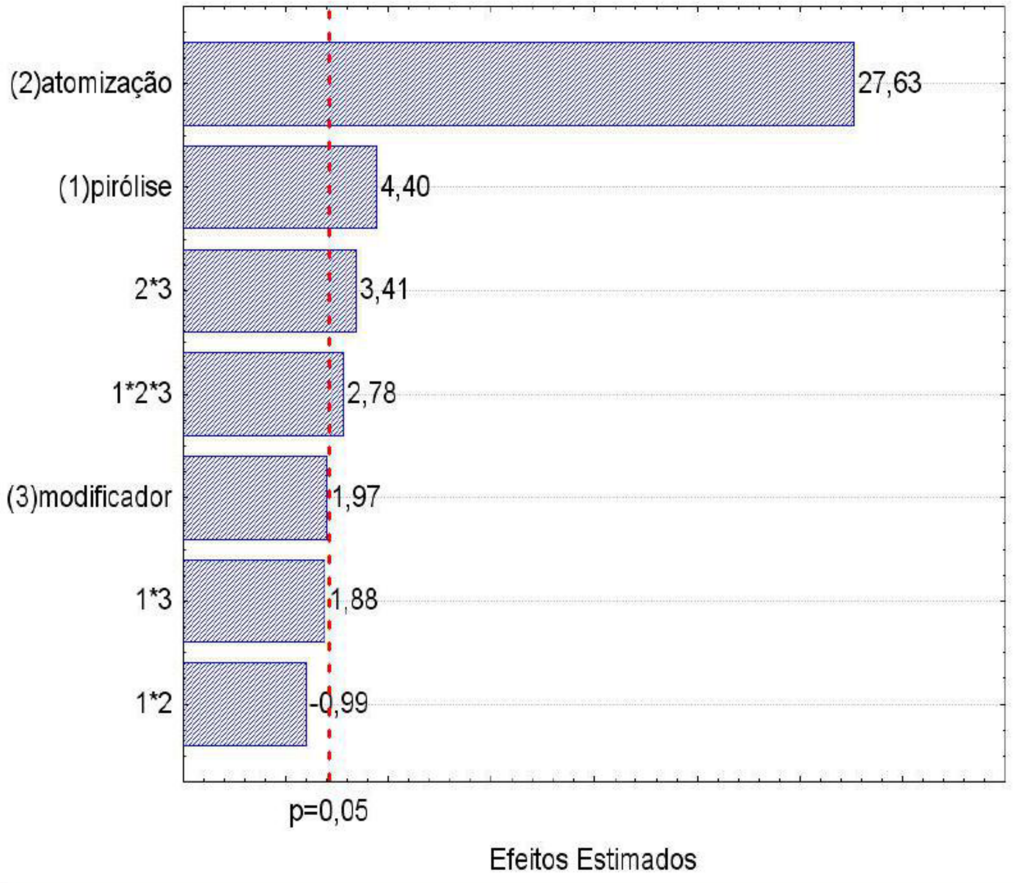
Tabela 14. Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de cobre em *ice-drinks* utilizando como modificador químico permanente o zircônio e tungstênio

Leitura	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	1600 (−1)	500 (−1)	Zr (−1)	0,123 ± 0,007
2	2700 (+1)	500 (−1)	Zr (−1)	0,092 ± 0,010
3	1600 (−1)	1500 (+1)	Zr (−1)	0,470 ± 0,007
4	2700 (+1)	1500 (+1)	Zr (−1)	0,571 ± 0,007
5	1600 (−1)	500 (−1)	W (+1)	0,033 ± 0,008
6	2700 (+1)	500 (−1)	W (+1)	0,174 ± 0,002
7	1600 (−1)	1500 (+1)	W (+1)	0,610 ± 0,009
8	2700 (+1)	1500 (+1)	W (+1)	0,660 ± 0,002

***média de triplicatas**

A partir dessa matriz de planejamento foi construído um gráfico de Pareto apresentado na Figura 10, onde observa-se que todos os efeitos principais e das interações 2*3 e 1*2*3 foram significativos e positivos, implicando por parte dos efeitos principais, que estes devam ser mantidos em nível alto (+1), e segundo os efeitos das interações, que as tendências dos efeitos principais não sejam alteradas. Vale ressaltar, que mesmo o efeito da variável tipo de modificador (3) estando no limite da significância, as duas interações que participa: 2*3 e 1*2*3 são significativas e com maiores intensidades, daí justificar a escolha por mantê-la no nível alto conforme sua tendência individual.

Figura 10. Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^3 para a determinação de cobre em *ice-drinks*



Assim, os estudos posteriores foram feitos definindo qualitativamente o tungstênio como modificador químico permanente e construindo uma matriz do CCD na região próxima a TP de 1500 °C e a TA de 2700 °C, como apresenta a Tabela 15.

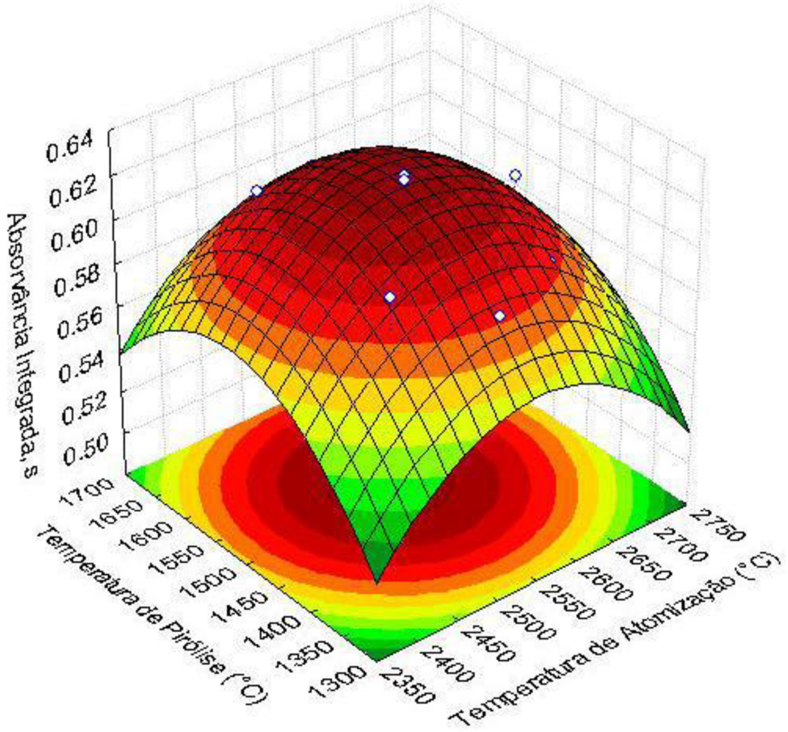
Tabela 15. Matriz de experimentos do planejamento CCD para otimização das variáveis significativas na determinação de cobre em *ice-drinks* utilizando tungstênio como modificador químico permanente

Leitura	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Absorvância integrada (s)*
1	2450 (−1)	1400 (−1)	0,607
2	2450 (−1)	1600 (+1)	0,616
3	2650 (+1)	1400 (−1)	0,591
4	2650 (+1)	1600 (+1)	0,599
5	2409 (−1,41)	1500 (0)	0,588
6	2690 (+1,41)	1500 (0)	0,605
7	2550 (0)	1359 (−1,41)	0,590
8	2550 (0)	1641 (+1,41)	0,605
9 (PC)	2550 (0)	1500 (0)	0,626
10 (PC)	2550 (0)	1500 (0)	0,624
11 (PC)	2550 (0)	1500 (0)	0,626
12 (PC)	2550 (0)	1500 (0)	0,626
13 (PC)	2550 (0)	1500 (0)	0,624

***médias em duplicata, exceto para as leituras no ponto central. s_{PC} = ± 0,001**

Na Figura 11 apresenta a superfície de resposta obtida através da matriz do planejamento CCD. Nota-se uma curvatura característica de um ponto de máximo. A função matemática ajustada a superfície está apresentada na Equação 7, onde as derivadas parciais igualadas a zero resultam nas condições otimizadas para as temperaturas de atomização e de pirólise que foram de 2545 °C e 1520 °C, respectivamente.

Figura 11. Superfície de resposta gerada pelo CCD para a otimização das variáveis TP e TA para a determinação de cobre em *ice-drinks*



$$Abs = -(10{,}593 \pm 2{,}781) + (0{,}007 \pm 0{,}002)\,TA - 0{,}000001\,TA^2 + (0{,}004 \pm 0{,}001)\,TP - 0{,}000001\,TP^2 + 0{,}00000003\,TATP \qquad \text{(Equação 7)}$$

onde, Abs é a absorvância integrada, TP a de TA.

A Tabela 16 apresenta os valores correspondentes às condições otimizadas a serem utilizadas no programa de temperaturas de aquecimento do forno de grafite, para a determinação de cobre em amostras de *ice-drinks*, usando tungstênio como modificador químico permanente.

Tabela 16. Programa de forno otimizado para a determinação de cobre com o uso de tungstênio como modificador químico permanente em amostra de *ice-drinks* por GF AAS

Etapa	Temperatura (ºC)	Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de argônio (mL min^{-1})
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	**1520**	**10**	**20**	**250**
Atomização*	**2545**	**0**	**5**	**0**
Limpeza	2600	1	5	250

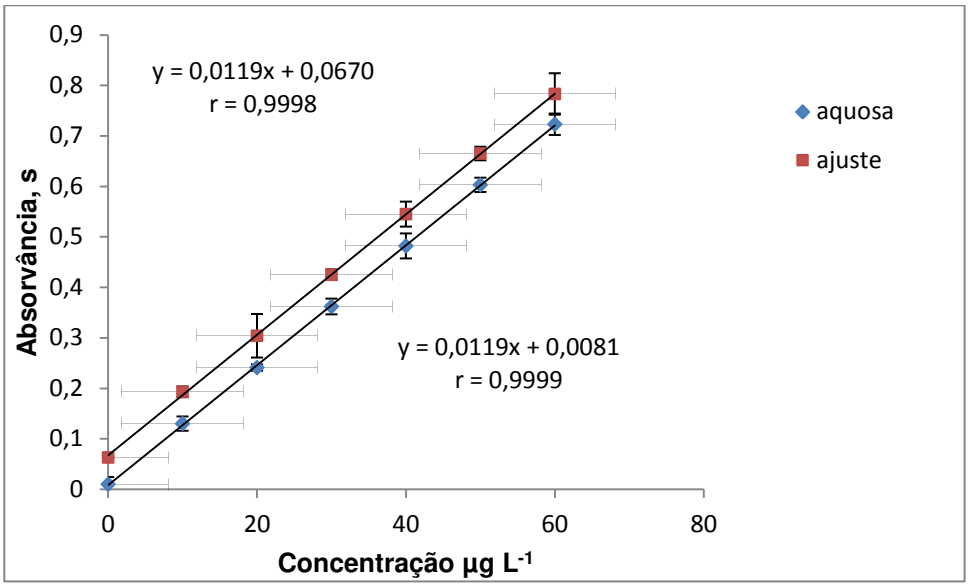
*** leitura nesta etapa**

5.2.2. Validação do método para a determinação de cobre em *ice-drinks* por GF AAS.

O método apresentou resposta linear às concentrações de cobre compreendidas na faixa de 1 a 60,0 µg L^{-1}, com coeficientes de correlação maiores que 0,99 para ambas as curvas de calibração aquosa (sem a matriz) e por ajuste de matriz (com a matriz), como pode ser visto na Figura 12. Também pode ser visto que as inclinações das curvas de calibração não apresentou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% (teste F e teste *t de Student*), demonstrando não haver efeito de matriz. Assim, os estudos posteriores foram realizados com calibração em meio aquoso.

.

Figura 12. Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de cobre em *ice-drinks* por GF AAS (n = 3)



Na Tabela 17 estão apresentadas as principais figuras de mérito obtidas para o método otimizado para determinação de cobre em amostras de *ice-drinks*.

Tabela 17. Figuras de mérito para o método de determinação de cobre em *ice-drinks,* por GF AAS

Parâmetro	**Resultados**
Equação de regressão (*n* = 3)	Y = 0,0012x + 0,0081
r (n = 3*)*	0,9999 ± 0,0004
Faixa de trabalho (µg L^{-1})	1 – 60
LD (µg L^{-1})	0,3
LQ (µg L^{-1})	1,0
Massa característica (n = 6, pg)[a]	7,3 ± 0,6
Coeficiente de variação intra-ensaios médio, concentrações de 15, 30 e 45 µg L^{-1} (n = 15)[b.]	5,30
Faixa de porcentual de recuperação, % (3 níveis, n = 5 amostras por nível)[c]	87 – 97

[a] massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de cobre em água = 4,0 pg;

[b] Valor aceitável de 15% AOAC. [c] Valor aceitável de 80 a 120% EPA.

Na Tabela 17, observa-se que o coeficiente de correlação médio obtido foi superior a 0,99. Os valores obtidos para o LD e LQ foram compatíveis com a técnica de GF AAS. Em relação à sensibilidade avaliada pela massa característica, esta foi superior àquela recomendada pelo fabricante, mas pode ser considerada aceitável em se tratando da introdução direta de uma bebida rica em açúcares, comparada aquela medida com padrão em meio aquoso.

A exatidão do método foi avaliada através de teste de adição e recuperação, a qual foram adicionados à amostras de *ice-drinks* concentração de (15, 30 e 45 μg L^{-1} de Cu^{2+}), cada qual com fortificação de cinco amostras. Em relação aos porcentuais de recuperação obtidos, estes se encontram dentro da faixa aceitável da literatura que é de 80 a 120% segundo a EPA.

A precisão (coeficiente de variação intra-ensaios), em termos de repetibilidade, foi determinada calculando-se o CV percentual de ensaios realizados em 3 níveis de fortificação (15, 30 e 45 μg L^{-1} de Cu^{2+}), sendo bem inferiores aos valores máximos prescritos na literatura que é de 15% segundo a AOAC, confirmando uma boa precisão analítica do método desenvolvido.

MIRANDA *et al*., (2010) determinaram cobre em amostras de cachaças empregando *fast sequential* - F AAS e obtiveram um LD de 15 μg L^{-1} e um LQ de 51 μg L^{-1}, usando prata na concentração de 2 mg L^{-1} como padrão interno, demonstrando que a mesma foi efetiva como padrão interno. Os autores analisaram 5 amostras de cachaças encontrando valores de concentração para o cobre entre 0,066 a 6,64 mg L^{-1}. A exatidão e a precisão do método proposto foram avaliadas comparando com resultados obtidos usando a técnica de ICP OES após digestão ácida. Os resultados obtidos com ambas as técnicas foram concordantes com um nível de confiança de 95%. FROES *et al*., (2015) determinaram as concentrações de vários metais incluindo o cobre em RTDs usando ICP OES, obtendo LD para cobre de 0,2 μg L^{-1} enquanto o LQ foi de 0,7 μg L^{-1}, com uma recuperação percentual média (n=3 amostras) de 111,3%, estando dentro do aceitável pela EPA. A faixa de concentração obtida para 30 amostras foi de 4-8 μg L^{-1}. FRANCISCO *et al*., (2015) determinaram o conteúdo de metais em refrigerantes por GF AAS, obtiveram um LQ para o cobre de 0,93 μg L^{-1}. Os resultados obtidos em refrigerantes brasileiros em diferentes sabores apresentaram concentrações de cobre desde abaixo do LQ até 7,2 μg L^{-1}. CALDAS *et al*., (2009) estudaram o efeito de diferentes modificadores na determinação de cobre, arsênio e chumbo em cachaças por GF AAS, obtendo um LD de 1,4 μg L^{-1}. Os resultados obtidos na análise de 10 amostras de cachaças foram concordantes com aqueles os obtidos por ICP-MS. O melhor modificador

avaliado para a determinação de cobre, no caso, foi o irídio com co-injeção de nitrato de paládio/nitrato de magnésio. Neste trabalho, os resultados obtidos para a determinação de cobre variaram entre menor que 140 a 3096 μg L^{-1}.

Através da Tabela 17, pode-se observar que o LD obtido para a determinação de cobre em amostra de *ice-drinks* apresentou valores menores que os métodos apresentados em outros trabalhos. Muitos destes métodos não oferecem uma sensibilidade suficiente para a determinação direta, sendo necessária uma etapa de pré-concentração. Alguns métodos podem ser mais atraentes por causa de seus LD mais baixos, no entanto empregam técnicas com custos mais elevados. O método desenvolvido neste estudo é rápido, sem nenhuma etapa de pré-concentração ou seja análise direta, tornando-se assim, adequado para a determinação de cobre nessa matriz.

5.2.3. Determinação de cobre em amostras de *ice-drinks* por GF AAS

A Tabela 18 apresenta os níveis de cobre determinados em 14 amostras de tipos, sabores e marcas diferentes de *ice-drinks,* armazenadas em garrafas de vidro (gv), latas (l) e do tipo Tetra Pak (tp). Os valores encontrados para cobre foram na faixa de 5,2 a 34,2 μg L^{-1}, sendo que o valor mais elevado para cobre foi obtido para ice de cachaça em garrafa com uma concentração de 34,2 μg L^{-1}. Provavelmente este valor encontrado se deve ao azinhavre. Ou seja, durante o processo de destilação da cachaça, há formação de "azinhavre", de carbonato básico de cobre nas paredes internas do alambique e de seus componentes. Essa mistura solúvel de [$CuCO_3$, $Cu(OH)_2$] é dissolvida pelos vapores alcoólicos ácidos que percorrem as paredes de cobre do alambique. Se a concentração desse elemento ocorrer em proporções elevadas, pode contaminar a bebida, além de provocar problemas à saúde do indivíduo. Mas mesmo assim, o valor encontrado está dentro do limite aceitável que é de 5 mg L^{-1} MDIC, INMETRO. FROES *et al*., (2015) desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação de alumínio, bário, cálcio, cádmio, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, níquel, chumbo, estanho e zinco por ICP OES em amostras de *ice-drinks*. O valor do LD obtido para cobre foi de 0,2 μg L^{-1}. Os autores deste trabalho encontraram recuperações em torno de 80 a 120%, estando dentro do aceitável pela EPA.

Tabela 18. Determinação de cobre em diferentes tipos de amostras de *ice-drinks* armazenadas em diferentes embalagens, onde: gv = garrafa de vidro; l = lata; tp = Tetra Pak; v = vodka e c = cachaça

Amostra	Valor Determinado (μg L^{-1})*
1-gv, v	20,5 ± 0,5
2-gv, v	21,4 ± 0,5
3-l, v	14,6 ± 0,9
4-l, c	< LQ
5-tp, c	< LQ
6-l, c	5,2 ± 0,9
7-l, v	< LQ
8-gv, c	23,9 ± 0,9
9-tp, c	15,5 ± 0,5
10-tp, c	< LQ
11-l, c	18,5 ± 0,2
12-t, v	10,2 ± 0,5
13- gv, c	**34,2 ± 0,9**
14-gv, v	20,5 ± 0,7
15-l, v	23,6 ± 1,4

*** Valor máximo permitido = 5 mg L^{-1} MDIC, INMETRO**

Vale ressaltar que, embora não hajam relatos sobre a quantidade consumida de bebidas do tipo *ice-drinks*, tais bebidas estão sendo ingeridas mundialmente em grande quantidades, principalmente sendo consumida pelo público mais jovem. Alguns estudos tiveram início, visando avaliar as consequências do consumo de bebidas *ice-drinks* na saúde das pessoas e, possíveis relações com o surgimento de doenças graves. Assim, se justifica o interesse pelo desenvolvimento de um método capaz de determinar cobre em *ice-drinks*.

5.3. Determinação de Alumínio e Chumbo em Cervejas por GF AAS

5.3.1. Otimização das condições analíticas para a determinação de alumínio e chumbo em amostras de cervejas por GF AAS

Nas otimizações dos programas de temperaturas do forno para as determinações, tanto de alumínio quanto de chumbo, em amostras de cervejas, também foram empregados procedimentos na sequência descrita nas otimizações anteriores. A partir de uma amostra selecionada aleatoriamente de cerveja, armazenada em recipiente de lata, realizou-se a triagem dos dois melhores modificadores químicos permanentes, que no caso do alumínio foram ródio e zircônio, como mostra a Tabela 19, enquanto que para o chumbo foram irídio e rutênio, conforme Tabela 20. Em ambos os casos foi construído um planejamento fatorial 2^3, sendo: i) com os valores de TA de 2300 ºC e 2700 °C, e com valores de TP de 1500 °C e 2100 °C para o alumínio; ii) com os valores de TA de 2000 ºC e 2700 °C, e com valores de TP de 500 °C e 1500 °C para o chumbo.

Tabela 19. Triagem entre os modificadores para a determinação de alumínio em cervejas

Leitura	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	W	0,1090 ± 0,006
2	**Rh**	**0,2368 ± 0,002**
3	Ir	0,0856 ± 0,005
4	Ru	0,0935 ± 0,007
5	Ta	0,0972 ± 0,004
6	**Zr**	**0,1344 ± 0,005**
7	Nb	0,1028 ± 0,002
8	Sem	0,0863 ± 0,007

***média de três replicatas. Em destaque os melhores resultados.**

Tabela 20. Triagem entre os modificadores para a determinação de chumbo em cervejas

Leitura	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	W	0,0966 ± 0,004
2	Rh	0,0991 ± 0,005
3	**Ir**	**0,1760 ± 0,002**
4	**Ru**	**0,1333 ± 0,001**
5	Ta	0,0664 ± 0,004
6	Zr	0,0964 ± 0,002
7	Nb	0,0926 ± 0,006
8	Sem	0,1278 ± 0,002

***média de três replicatas. Em destaque os melhores resultados.**

A Tabela 21 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 construída para triagem de variáveis para a determinação de alumínio em amostras de cervejas, enquanto que a Tabela 22 apresenta a matriz para o chumbo.

Tabela 21. Matriz de planejamento fatorial (2^3) para triagem de variáveis para a determinação de alumínio em cervejas utilizando ródio e zircônio como modificador químico permanente

Leitura	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	2300 (−1)	1500 (−1)	Rh (−1)	0,220 ± 0,003
2	2700 (+1)	1500 (−1)	Rh (−1)	0,829 ± 0,004
3	2300 (−1)	2100 (+1)	Rh (−1)	0,153 ± 0,002
4	2700 (+1)	2100 (+1)	Rh (−1)	0,562 ± 0,001
5	2300 (−1)	1500 (−1)	Zr (+1)	0,164 ± 0,001
6	2700 (+1)	1500 (−1)	Zr (+1)	0,387 ± 0,008
7	2300 (−1)	2100 (+1)	Zr (+1)	0,108 ± 0,005
8	2700 (+1)	2100 (+1)	Zr (+1)	0,262 ± 0,008

***média de triplicatas.**