



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**Raimundo Rafael Gamela**

**Desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da presença de elementos  
essenciais e potencialmente tóxicos em fórmulas infantis**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale**

**Porto Alegre, abril de 2017**

Raimundo Rafael Gamela

**Desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da presença de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em fórmulas infantis**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale

Porto Alegre, abril de 2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Gamela, Raimundo Rafael

Desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da presença de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em fórmulas infantis / Raimundo Rafael Gamela. -- 2017.

57 f.

Orientadora: Maria Goreti Rodrigues Vale.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Fórmulas infantis. 2. Elementos essenciais . 3. Elementos potencialmente tóxicos. 4. Análise direta de sólidos. 5. HR-CS GF AAS. I. Vale, Maria Goreti Rodrigues , orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, com exceção das colaborações as quais foram devidamente citadas nos agradecimentos, entre o período de maio de 2015 e maio de 2017, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos sob orientação da Professora Doutora Maria Goreti Rodrigues Vale. A dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela seguinte banca examinadora:

**Comissão examinadora:**

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios  
Doutor em Ciência de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

Profa. Dra. Márcia Messias da Silva  
Doutora em Química  
IQ/UFRGS

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Doutor em Ciência de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

Profa. Dra. Maria Goreti R. Vale  
Docente do Instituto de Química e  
Instituto de Ciência e Tecnologia de  
Alimentos/UFRGS  
(Orientadora)

Raimundo Rafael Gamela  
(Mestrando)

Porto Alegre, abril de 2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida que tem me concedido e pelas todas as virtudes que coloca na minha vida.

Á minha família pelo amor e apoio.

Á professora Maria Goreti, pela confiança, orientação, carinho e conhecimentos transmitidos ao longo dos anos de mestrado.

Á professora Márcia Messias pelo carinho e conhecimentos transmitidos.

Á professora Morgana Dessuy pela confiança, ensinamento e conhecimentos transmitidos.

Ao meu amigo David Adriano Nota pela parceria e por ter tornado os meus dias divertidos.

Á meu amigo Carlos Alface que sempre acreditou em mim.

Aos meus colegas do laboratório por todo apoio e momentos de alegria vividos ao longo dos 2 anos.

Agradecimentos especiais vão para os meus colegas e amigos Álvaro Duarte, Wiliam Boschetti, Eliana Barrera, Flávio Nakadi pelo apoio moral, ensinamentos, parcerias e momentos de desconcentração ao longo do mestrado.

Aos professores e ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida em convênio com o Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique através do edital CNPq/MCT-MZ, mestrado processo número 190082/2014-3.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

**Muito Obrigado**

À minha irmã Albertina Rafael Gamela

(in memoriam)

Dedico

## **RESUMO**

O consumo de fórmulas infantis no Brasil, utilizadas como substituto do leite materno, tem aumentado nos últimos anos de forma significativa. Tal fato é uma preocupação para os órgãos de saúde pois, o aleitamento materno exclusivo até no mínimo 6 meses, deixou de fazer parte de nutrição da maioria dos lactentes. Os produtos utilizados como substituto do leite materno contêm quantidades suficientes de vitaminas e nutrientes que ajudam no desenvolvimento normal do organismo dos lactentes. Entretanto, além de elementos essenciais, podem conter elementos potencialmente tóxicos presentes na matéria prima ou oriundos das etapas de processamento e armazenamento das mesmas. No presente trabalho foram desenvolvidos métodos analítico para determinar a presença de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Pb e Tl) e essenciais (Cu e Mn) em fórmulas infantis, utilizando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite e análise direta de sólidos. As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas nos mercados da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, todas na forma sólida (pó) com diferentes composições e matéria prima (arroz, aveia, soja e leite). As curvas de calibração foram realizadas com soluções padrão aquosas e os métodos otimizados foram aplicados nas amostras em estudo. Em todas as amostras os elementos As, Cd, Pb e Tl apresentaram valores de concentração abaixo do limite de detecção. Das seis amostras analisadas, três apresentaram valores de concentração de Cu abaixo dos parâmetros mínimos estabelecidos pela legislação brasileira, enquanto que para o Mn todas amostras apresentaram valores de concentração dentro dos parâmetros mínimos da legislação brasileira. Os métodos desenvolvidos foram simples, exatos e precisos, podendo ser utilizados para análise de rotina.

**Palavras-chave:** Fórmulas infantis, elementos essenciais e potencialmente tóxicos, análise direta de sólidos, HR-CS GF AAS.

## **ABSTRACT**

The consumption of infant formula in Brazil, as a replacement of breast milk, has lately increased significantly. It is a major concern for health agencies because the exclusive breastfeeding up to at least 6 months is no longer part of most infants. The products used as a substitute of the breast milk contain sufficient amounts of vitamins and nutrients, which helps in the normal development of the infants. However, besides the essential elements, it may contain potentially toxic elements present in raw material or from of the processing and storage stages of the same. In the present work the presence of the essential (Cu e Mn) and potentially toxic elements (As, Cd, Pb e Tl) in infant formulas were evaluated. For this, analytical methods were developed for the determination of As, Cd, Cu, Mn, Pb and Tl using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling analysis in infant formulas. The samples were acquired in Porto Alegre's market, RS, Brazil, all in powder form with different compositions and raw materials (rice, oats, soy and bovine milk). The calibration curves were performed with aqueous standard solutions and the optimized methods were applied in the study samples. In all samples, the concentration values of As, Pb, Cd and Tl were below of the limit of detection. For the analyzed samples, three of them present the concentration values of Cu lower than the minimum parameters established by Brazilian legislation, while for Mn, all samples present the concentration values within the minimum parameters of Brazilian legislation. The developed methods for the determination of these elements in infant formulas were simple, exacts and precise, and can be applicated for the routine analysis.

**Keywords:** infant formulas, essential and potentially toxic elements, direct solid sampling analysis, HR-CS GF AAS.



## LISTA DE FIGURAS

AAS – Espectrometria de absorção atômica (do inglês *“Atomic Absorption Spectrometry”*)

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

CASCADE – Contaminantes químicos na cadeia de alimentos (do inglês *“Chemical as contaminants in the food chain”*)

CCD – Dispositivo de carga acoplado (do inglês *“Charge couple device”*)

CP – Pixel central (do inglês *“Central pixel”*)

CRM - Material de referência certificado (do inglês *“Certified reference material”*)

F AAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês *“Flame atomic absorption spectrometry”*)

FAO – Organização para alimentos e agricultura (do inglês *“Food and agriculture organization”*)

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês *“Graphite furnace atomic absorption spectrometry”*)

HR-CS AAS - Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do inglês *“High resolution continuum source atomic absorption spectrometry”*)

HR-CS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (do inglês *“High resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry”*)

ICP OES - Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês *“Inductively Coupled plasm optical emission spectrometry”*)

ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês *“Inductively Coupled Plasm Mass Spectrometry”*)

LOD – Limite de detecção (do inglês *“Limit of detection”*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês *“Limit of quantification”*)

LS – Fonte de linha (do inglês *“Line source”*)

LS AAS - Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês *“Line source atomic absorption spectrometry”*)

$m_0$  – Massa característica (do inglês *“Characteristic mass”*)

MWD – Digestão assistida por micro-ondas (do inglês *“Microwave digestion”*)

OMS – Organização mundial da saúde

SS – Amostragem sólida (do inglês *“Solid sampling”*)

Ta – Temperatura de atomização

Tp – Temperatura de pirólise

WHO – Organização mundial da saúde (do inglês *“World health organization”*)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).....	31
---	----

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros de mérito para determinação de As, Cd, Pb e TI em fórmulas infantis usando HR-CS GF AAS .....	39
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Importância do leite materno.....	18
3.2 Fórmulas infantis.....	19
3.3 Consumo de fórmulas infantis no Brasil.....	20
3.4 Legislação brasileira para fórmulas infantis.....	21
3.5 Minerais.....	22
3.5.1 Cobre.....	23
3.5.2 Manganês.....	24
3.5.3 Cádmio.....	24
3.5.4 Arsênio.....	25
3.5.5 Chumbo.....	25
3.5.6 Tálcio.....	26
3.6 Determinação de metais em fórmulas infantis.....	27
3.7 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.....	29
3.8 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (HR-CS GF AAS).....	32
3.9 Análise direta.....	33
3.9.1 Análise direta de sólidos por GF AAS.....	33
3.9.2 Análise de suspensão por GF AAS.....	35
4. METODOLOGIA.....	38
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
5.1 Artigo.....	40
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	48

6.1 Discussão geral.....	48
6.2 Conclusões.....	49
Referências.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

A alimentação é um fator importante para o crescimento e o desenvolvimento infantil, pois a infância constitui um período de rápido desenvolvimento físico, biológico, imunológico e mental. Portanto, é fundamental proporcionar uma dieta adequada para crianças entre zero e dois anos. O primeiro alimento com o qual os bebês têm contato é o leite materno, considerado um alimento completo por conter todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento, sendo recomendado o seu uso exclusivo, até o sexto mês de vida. Somente após esse período recomenda-se a inserção de outros tipos de alimentos como chás, sucos, água, outros leites e alimentos pastosos (WHO, 2002; KAZI, *et al.*, 2010).

A ingestão inadequada de nutrientes é crítica nos primeiros anos de vida em termos de crescimento e desenvolvimento saudáveis, uma vez que a baixa ingestão ou redução da biodisponibilidade de nutrientes pode levar a deficiências e causar prejuízo à função corporal como o aumento do risco de doença cardíaca isquêmica, hipertensão, diabetes e obesidade na vida adulta.

Entretanto, por diferentes razões como a impossibilidade de amamentação, dietas especiais são necessárias para substituir ou complementar o leite materno. Nestes casos, fórmulas industrializadas precisam ser introduzidas à dieta dos bebês. Estes alimentos complementares preparados comercialmente, contêm quantidades de nutrientes (minerais e vitaminas) para satisfazer os requisitos dos lactentes (até 1 ano de idade) e crianças da primeira infância (entre 1 a 3 anos de idade) (ZAND, *et al.*, 2011; NBCAL, 2002).

Muitas indústrias produtoras de fórmulas infantis adicionam minerais e vitaminas nestes produtos em níveis de concentrações maiores do que presentes no leite humano para compensar a sua biodisponibilidade, o que de certa forma preocupa a confiabilidade dos valores de nutrientes declarados nos rótulos destes alimentos (KAZI, *et al.*, 2009).

Além disso, as fórmulas substituintes do leite materno e os alimentos destinados à alimentação infantil, além dos elementos essenciais, podem conter elementos potencialmente tóxicos derivados da presença natural desses contaminantes na matéria-prima utilizada ou durante o processamento e armazenamento (MEHARG, *et al.*, 2008; KAZI, *et al.*, 2010).

Apesar dos benefícios das fórmulas infantis como uma das principais fontes de alimento para lactentes, a presença de contaminantes, tais como metais pesados, podem representar riscos para a saúde das crianças. Por apresentarem altas taxas metabólicas devido ao desenvolvimento do organismo, os lactentes consomem relativamente mais alimentos do que um adulto, quando se compara a relação entre a quantidade ingerida (em massa) por peso corporal. Assim, pode se citar, por exemplo, que um lactente pode absorver até 50% de Pb existente em um alimento, enquanto que em homem adulto essa absorção chega apenas a 10% (PANDELOVA *et al.*, 2012). Existem evidências de que os vegetais podem acumular vários níveis de concentração de mercúrio, chumbo, cádmio, zinco e cobre nas partes comestíveis e não comestíveis, podendo colocar em risco a saúde dos latentes caso estes vegetais sejam utilizados para o fabrico de alimentos infantis (PANDELOVA *et al.*, 2012).

Minerais são substâncias inorgânicas essenciais e tem importantes funções bioquímicas no organismo humano. Por outro lado, estes mesmos elementos, quando ingeridos em excesso, podem ser tóxicos. Por exemplo, à alta exposição de Mn na infância pode resultar em uma síndrome que afeta o equilíbrio neurotóxico da dopamina que controla o comportamento (WELZ, SPERLING, 1999; SARACOGLU *et al.*, 2007; PANDELOVA *et al.*, 2012).

Existem órgãos como a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (do inglês *“European Food Safety Authority”* EFSA, 2006, 2017), a Organização da Agricultura para Alimentação e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO do inglês *“Food and Agriculture Organization/World Health Organization”*, 2005, 2011) e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL, 2013) são organizações internacionais que controlam os níveis de concentração de minerais e elementos potencialmente tóxicos em alimentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), principal instituição do Ministério da Saúde (MS) é responsável pelo controle e fiscalização de alimentos. Este órgão estabelece os níveis de concentração de minerais em fórmulas infantis, os quais estão associados ao valor energético, isto é, a cada 100 (ANVISA, 1998).

Do ponto de vista nutricional, é de extrema importância a determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em fórmulas infantis para garantir o desenvolvimento normal dos lactentes. Assim, amostras de fórmulas infantis para lactentes com diferentes composições: leite de vaca, soja, arroz, e arroz e aveia foram utilizadas para a investigação de elementos potencialmente tóxicos arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e tálio (Tl) e determinação de elementos essenciais cobre (Cu) e

manganês (Mn). Para tanto, é necessário dispor de métodos analíticos rápidos e confiáveis, que possam ser aplicados nas análises de rotina para a determinação de metais em fórmulas infantis.



## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em fórmulas infantis comercializadas no mercado brasileiro. Para tanto, foi analisada a possibilidade para o desenvolvimento de métodos analíticos, via espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).

Os elementos investigados foram Arsênio (As), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Chumbo (Pb), Tálcio (Tl). Em todos procedimentos o foco principal foi a redução do tratamento das amostras e o emprego das soluções padrão aquosa, a fim de tornar os métodos mais simples e facilmente aplicáveis a análise de rotina.

O objetivo traçado foi atingido através da execução das metas listadas abaixo:

**I.** Investigar a viabilidade do emprego da análise direta de amostras sólidas por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS) para a determinação de elementos traço (As, Cd, Cu, Mn, Pb e Tl) em fórmulas infantis;

**II.** Estudar a necessidade do emprego de modificadores químicos para determinação de elementos traço;

**III.** Estabelecer os parâmetros de mérito;

**IV.** Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras de diferentes fórmulas infantis comercializadas no mercado brasileiro;

**V.** Comparar os resultados obtidos com os limites estabelecidos pela ANVISA e outras agências internacionais.

### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos sobre o estado da arte do tema em destaque no qual é feita uma revisão bibliográfica sobre alguns conceitos considerados importantes como: importância do aleitamento materno, o conceito de fórmulas infantis e órgãos legislativos, e consumo de fórmulas infantis no Brasil.

No que concerne ao estado da arte da pesquisa, foi revisado de forma sucinta as diferentes técnicas aplicadas para determinação de metais em fórmulas infantis bem como em alimentos similares e preparo de amostra.

#### 3.1 Importância do leite materno

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) o leite materno é considerado um alimento essencial sob ponto de vista nutritivo e imunológico, pois, é a fonte de nutrientes que a criança necessita para ter um desenvolvimento físico, imunológico e emocional. Portanto, este deve ser de uso exclusivo até ao sexto mês de vida, e no fim deste período pode ser introduzido outro tipo de alimento como complemento alimentar.

O leite materno possui quantidades baixas de beta-lactoglobulina, e a proteína majoritária é a alfa-lactalbumina que é de fácil digestão e apresenta maior potencial de proteção à saúde quando comparada ao leite de vaca, que não é um alimento recomendado para crianças menores de um ano (VASCONCELOS, 2012; IKEM *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Brown *et al.*, (1989) e Chater (2009) apontam que o aleitamento materno confere muitos benefícios importantes à saúde como a prevenção contra doenças infecciosas, doenças gastrointestinais, diarreias e outras. Além disso, constitui uma fonte de economia para a família em países em via de desenvolvimento onde grande parte da população apresenta renda familiar baixa (Department of health and human services-US, 2011).

A falta do aleitamento materno exclusivo durante os primeiros seis meses de vida, aliado a alimentação complementar inadequada podem influenciar negativamente no desempenho escolar, baixo desenvolvimento intelectual e social (OMS, 2005).

### 3.2 Fórmulas infantis

A ANVISA (1998) considera fórmulas infantis todo produto na forma líquida ou em pó destinado a alimentação de lactentes, em substituição total ou parcial do leite humano para satisfação das necessidades nutricionais sob uma prescrição.

A Norma Brasileira de comercialização de alimentos para lactente e primeira infância (NBCAL, 2002), classifica as fórmulas infantis em:

a) **Fórmulas de nutrientes para recém-nascidos de alto risco** são indicadas especificamente para suplementar a alimentação dos recém-nascidos prematuros ou de alto risco;

b) **Fórmulas infantis para lactentes** é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes sadios durante os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias);

c) **Fórmulas infantis para necessidades dietoterápicas específicas** a sua composição é alterada com objetivo de atender as necessidades específicas decorrentes das alterações fisiológicas, patológicas temporária ou permanente;

d) **Fórmulas infantis de segmento** é o produto em forma líquida ou em pó, utilizado como substituto do leite materno a partir do sexto mês, quando indicado, e para crianças de primeira infância de doze meses a três anos.

Muitas fórmulas infantis são derivadas de animais ou plantas e a composição, essencialmente, é à base de formulações de leite de vaca, soja ou de outros animais e/ou vegetais consideradas adequadas para a alimentação de lactentes (ANVISA, 1998; IKEM *et al.*, 2002).

Assim, a inserção destes produtos como complemento alimentar na dieta dos lactentes se deve a diversas razões metabólicas ou tendo em vista o aumento das necessidades nutricionais, que já não são satisfeitas pelo aleitamento materno (KAZI *et al.*, 2010). Os substitutos do leite materno devem fornecer quantidades suficientes de energia e nutrientes para a rápida taxa de crescimento dos bebês. É preciso lembrar que além do leite materno, as fórmulas infantis são as únicas fontes de nutrientes indicadas para complementação do leite materno para lactentes (SOUAD, *et al.*, 2006; LJUNG, *et al.*, 2011; PANDELOVA, *et al.*, 2012).

No entanto, a Sociedade Brasileira de Pediatria (2012) explica que o substituto do leite materno à base de leite vaca não é um alimento recomendado a crianças com menos de um ano de idade. São nutricionalmente adequado pois, apresentam elevados

teores de sódio, cloretos, potássio, fósforo, quantidades insuficientes de carboidratos, de ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (BORTOLINI, et al., 2013). Por outro lado o leite de vaca é um alimento muito alergênico para crianças, e seu consumo tem sido associado ao desenvolvimento de atopia, provoca microenterorragias devido à imaturidade do trato gastrointestinal, provocando perdas sanguíneas, com isso, pode afetar o desenvolvimento normal dos lactentes (CASTILHO, BARROS, 2010; BORTOLINI, et al., 2013).

### **3.3 Consumo de fórmulas infantis no Brasil**

Os problemas relacionados à amamentação no contexto da alimentação infantil são muito antigos. Na metade do século XIX, diversas pesquisas foram realizadas com objetivo de encontrar um substituto para o leite materno no período de desmame. Na literatura são descritas algumas opções como as amas-de-leite, leite de vaca adicionando-se açúcar e água; adição de creme e água limonada para diminuir o pH do leite, favorecendo uma melhor digestão do leite pelo trato gastrointestinal, dentre outros recursos (BOSI, MACHADO, 2005). Portanto, o aleitamento artificial na forma de mamadeira com leite de vaca, possibilitado pelo progresso da esterilização, veio substituir a amamentação mercenária (as amas-de-leite) (BOSI, MACHADO, 2005).

Assim, com o desenvolvimento das pesquisas, os profissionais de saúde passaram a prescrever as novas alternativas para alimentação infantil, considerando-as seguras e benéficas para as crianças (BOSI, MACHADO, 2005).

No final do século XIX, o leite em pó começou a ser utilizado desde o momento da secção do cordão umbilical, exaltando-se a composição do produto que teria toda segurança na substituição do aleitamento materno. Assim, vários produtos complementares do leite materno foram produzidos, aumentando as propagandas de alimentos infantis (ABRANTES, TABAI, 2013).

No Brasil, a Companhia Industrial e Comercial Brasileira de produtos alimentares, foi à primeira empresa multinacional na produção do leite em pó em 1921, dominando o mercado de leite em pó e de outros alimentos complementares para alimentação infantil (AMORIM, 2005; CHATER, 2009).

Chater (2009) explica que nos últimos anos, as propagandas utilizadas pelas indústrias aludindo o consumo de fórmulas infantis como substituto do leite materno foram aumentando significativamente. No entanto, as consequências no desmame

precoce e na desnutrição cresceram, e isto, constitui uma preocupação as entidades do governo brasileiro bem como para OMS.

No ano de 2010, Brasil registrou um crescimento cerca de 1,2 milhões de dólares em vendas no setor de alimentos para bebês e crianças compreendida entre 0-4 anos de idade, que representam 7,5 % da população brasileira (WHO, 2015). A partir deste período, o número de venda e procura de alimentos convenientes e nutritivos como alternativas do leite materno foi aumentando, e com isso, foi lançada uma inovação na indústria de alimentos para bebês com novas opções de embalagens, tamanho e em composição (WHO, 2015). No entanto, essa tendência está em conflito com as políticas do governo brasileiro, as quais restringem a publicidade de alimentos para lactentes e crianças da primeira infância, estimulando o aleitamento materno (VASCONCELOS, 2012).

### **3.4 Legislação brasileira para fórmulas infantis**

Medidas legislativas para formulações infantis são vistas como importantes na promoção da saúde e auxiliam na melhoria de qualidade de vida dos lactentes. As fórmulas infantis para lactentes estão sujeitas aos mesmos procedimentos administrativos exigidos para o registro de alimentos em geral (ANVISA, 1998). Este órgão estipula os limites mínimos e máximos de minerais que devem estar presentes em fórmulas infantis em função do valor energético, isto é, em cada 100 Kcal. Assim, os valores de concentração de minerais nestes produtos são de acordo com a faixa etária e finalidade.

Conforme estabelecido pela (ANVISA, 2011a; ANVISA, 2011b, ANVISA, 2011c) no artigo 4º das resoluções RDC nº 43, 44 e 45, de 19 de setembro de 2011, respectivamente, no seu parágrafo único estabelece que: as fórmulas infantis para lactentes cuja composição e rotulagem atendam os critérios estabelecidos nesta resolução e no regulamento técnico de fórmulas infantis de seguimento para lactentes e/ou crianças da primeira infância podem ser indicadas também para lactentes de 0 a 12 meses incompletos e/ou crianças da primeira infância, conforme o caso.

As resoluções RDC nº 43 e 44, de 19 de setembro de 2011 (ANVISA, 2011b, ANVISA, 2011b c) estabelecem o mínimo de 35 µg para Cu e 1 µg para Mn em cada 100 kcal de fórmula infantil. É importante salientar que estas resoluções não estabelecem os limites máximos, mas apresenta um limite superior de referência (LSR)

aparentemente seguro, e que não deve ser considerado como valores a serem alcançados que são 120  $\mu\text{g}$  e 100  $\mu\text{g}$  para Cu e Mn por cada 100 kcal (ANVISA, 2011b, ANVISA, 2011b c).

Ao demais, as fórmulas infantis estão sujeitas as resoluções RDC n° 42 e 46 de 19 de setembro de 2011, que dispõe sobre o regulamento técnico de compostos de nutrientes e aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologias para alimentos destinados a lactentes e crianças da primeira infância (ANVISA, 2011d, ANVISA, 2011e).

Com relação aos elementos potencialmente tóxicos como As, Cd, Pb e Sn, foi encontrada uma legislação emitida pela (ANVISA, 2016) que ainda está em Consulta Pública n° 209, de 20 de junho de 2016. Esta legislação versa sobre os contaminantes inorgânicos em fórmulas infantis para lactentes cujo os limites máximos tolerados são: 0,02, 0,01, 0,01 e 50  $\text{mg Kg}^{-1}$  para As, Cd, Pb e Sn, respectivamente (ANVISA, 2011). No entanto, para o Tl não foi encontrada nenhuma legislação para este elemento em fórmulas infantis e alimentos no geral.

Ao nível da região do MERCOSUL (2013) é utilizado um regulamento técnico que dispõe sobre os limites máximos de contaminantes em alimentos (leite fluido e produtos lácteos). Este regulamento, estabelece o limite máximo de 0,05, 0,05 e 0,02  $\text{mg Kg}^{-1}$  para As, Cd e Pb, respectivamente. Para o Tl não foi encontrada uma legislação nacional e internacional que estipule os limites máximos.

Existem outras legislações internacionais como da FAO/WHO e EFSA. A FAO/WHO (2011) estabelece os limites de 0,1, 0,8 e 0,3  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para As, Cd e Pb, respectivamente, em alimentos. Por outro lado, o limite de elementos potencialmente tóxicos em alimentos estabelecido pela EFSA (2017) é de 0,020  $\text{mg Kg}^{-1}$  para Pb e 0,10  $\text{mg Kg}^{-1}$  para Cd. Entretanto, os limites máximos de As e Tl não estão especificados.

### **3.5 Minerais**

Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010), a variação da deficiência de alguns minerais, raros ou praticamente inexistentes no organismo humano, se deve a questões sócio econômicas e divisões geográficas. Entretanto, alimentos à base de plantas são as principais fontes de nutrientes para satisfazer as necessidades

nutricionais, ao contrário do que acontece com alimentos de origem animal que não são boas fontes de nutrientes.

É sabido que minerais são uma fonte confiável de nutrientes essenciais de forma equilibrada e biodisponível para desenvolvimento normal do organismo humano. Em sistemas biológicos os minerais são separados em duas categorias: macronutrientes são todos aqueles que se encontram em maior quantidade no organismo humano como por exemplo Ca, K, Mg, Na e P. Os micronutrientes, que também podem ser chamados de elementos traço, são aqueles que se encontram em menor quantidade no organismo e mesmo assim desempenham funções importantes para o funcionamento normal dos seres humanos, são exemplos desses elementos Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; OLESZCZUK, *et al*, 2007).

### 3.5.1 Cobre

O cobre ocorre naturalmente em rochas, água, solo, sedimentos e em níveis baixos nos particulados. É um elemento essencial para todos os organismos vivos, participa como cofator em várias enzimas, incluindo as fenolases e na assimilação do ferro para formação de hemoglobina e em quantidades maiores, pode desencadear efeitos tóxicos. Por exemplo, a longa exposição à poeira de cobre, causa irritações no nariz, boca e olhos, dores de cabeça, tonturas e náuseas. A alta ingestão de Cu pode ocasionar danos ao sistema respiratório, gastrointestinal, hematológico, hepático, endócrino e efeitos oculares. Não se sabe se o Cu pode causar efeitos carcinogênicos, devido à falta de estudos que comprovem este fato (WELZ, SPERLING, 1999; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; OSREDKAR, SUSTAR, 2011).

O cobre entra no ambiente por meio de depósitos de lixo de material inorgânico, esgotos, combustão dos combustíveis fósseis e nos alimentos, advém, principalmente, do uso dos compostos de Cu que participam da formulação de fungicidas e fertilizantes fosfatados utilizados na agricultura, sendo estes, os mais suscetíveis a ameaçar a saúde humana (WELZ, SPERLING, 1999).

Além das fontes de Cu descritas acima, alimentos como carnes, sementes, farelo de cereais e outras constituem fontes alimentares deste elemento. Assim, tem sido recomendado pela EFSA (2006) uma IDR 0,9 mg/dia para homens e mulheres adultos.

Considerando as diretrizes das políticas nacionais de controle de minerais e nutrientes em alimentos, a ANVISA (2005) através da Resolução RDC nº 269, de 22 de

setembro de 2005 estabelece que a IDR para lactentes de 0 à 6 meses é de 200 µg/dia e de 6 à 11 meses é de 220 µg/dia.

### 3.5.2 Manganês

O manganês é o segundo metal pesado mais abundante na crosta terrestre. Como um metal não-nobre, está presente na natureza na forma de seus compostos nos estados de oxidação +1 e +7. O Mn pode ser encontrado na natureza como elemento traço em solos, e, frequentemente, junto com o ferro em águas subterrâneas. Grandes quantidades deste elemento são encontradas em depósitos de óxidos ferromanganês e outros elementos no fundo do mar (WELZ, SPERLING, 1999).

O manganês é elemento essencial e está presente em todas as células vivas. No organismo humano é um componente da arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase, e desempenha um papel como co-factor de certos sistemas enzimáticos (WELZ, SPERLING, 1999; EFSA, 2006).

Os alimentos são as importantes fontes de exposição de Mn para a população em geral, e as suas concentrações variam em gênero alimentícios, sendo que os níveis mais elevados podem ocorrer em alimentos de origem vegetal (EFSA, 2006). Atualmente não existe uma ingestão diária recomendada (IDR) formal para Mn. Contudo, uma ingestão dietética segura e adequada é estimada entre 2 à 5 mg/dia para adultos (EFSA, 2006).

Conforme estabelecido pela ANVISA na Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, os valores de IDR de proteínas, vitaminas e minerais foram estabelecidos como parâmetro de ingestão de nutrientes por indivíduos e diferentes grupos populacionais (ANVISA, 2005). Assim, esta resolução estabelece que a IDR para lactentes de 0 à 6 meses é 0,003 mg/dia e de 6 à 11 meses é 0,6 mg/dia.

Entretanto, a alta exposição de Mn pode resultar em uma síndrome neurotóxico que afeta o balanço da dopamina e o controle do comportamento (ERICSON *et al.*, 2007).

### 3.5.3 Cádmio

O cádmio é um elemento que se encontra distribuído amplamente no meio ambiente como resultado de processos antropogênicos (WELZ, SPERLING, 1999).

Uma substância é considerada tóxica quando possui um potencial para provocar efeitos adversos a saúde em consequência da sua interação com o organismo. No caso



de Cd e seus compostos são considerados tóxicos, pois, muitos efeitos indesejáveis são conhecidos tanto nos homens, como nas plantas e animais (FERNANDES, MAINIER, 2014).

O consumo de alimentos contaminados por este elemento, constitui a fonte de exposição para humanos. A acumulação de Cd no organismo pode causar câncer de pulmão e próstata, induzir a disfunção renal, osteomalacia e deficiências reprodutivas (GARCÍA-RICO, LEYVA-PEREZ, JARA-MARINI, 2007). Devido as suas características cancerígenas, a EFSA (2012) estabeleceu uma IDR de 2,5 µg/Kg de peso corporal (EFSA, 2012).

#### **3.5.4 Arsênio**

O arsênio é um elemento traço e tóxico, e pode ocorrer em duas formas: arsênio orgânico e inorgânico, as quais se encontram na natureza devido a fontes naturais e atividades antropogênicas (PASIAS, THOMAIDIS, PIPERAKI, 2013).

A forma inorgânica é a mais nociva ao homem, sendo considerada carcinogênica. A toxicidade das espécies de As (III) é várias vezes superior à das espécies de As (V). A via mais comum de exposição humana é através do consumo de água contaminada, alimentos, porém, a inalação de gases e ingestão de pó podem ser também importantes fontes de exposição (KAPAJ *et al.*, 2006).

Conforme o estudo feito pelo Instituto de Medicina da Academia Nacional, Washington (2006), não foi determinada a IDR para o As em alimentos. Embora não tenha sido estabelecido a IDR, pode haver um risco de efeitos adversos com a ingestão de As nos alimentos ou no abastecimento de água ao atual nível máximo de contaminação de 50 mg / L, estabelecido nos Estados Unidos.

Assim, no organismo humano o As pode se acumular em tecidos como pele, cabelo e unhas, resultando em vários sintomas como a hiperpigmentação queratose e um crescente risco de contrair câncer (KAPAJ *et al.*, 2006).

#### **3.5.5 Chumbo**

O chumbo é um elemento que está presente na natureza através de depósitos naturais, sendo que a galena (PbS) é o minério mais abundante. As atividades antropogênicas tais como queima de combustíveis fosseis, mineração e outros processos

de fabricação favorecem a sua ampla distribuição no meio ambiente (MOREIRA, MOREIRA, 2004; SHRIVAS, PATEL, 2010).

O chumbo é um metal potencialmente tóxico não essencial que se acumula no organismo e afeta todos os órgãos. Os mecanismos de toxicidade envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a habilidade do chumbo de inibir a ação do cálcio e de interagir com proteínas (MOREIRA, MOREIRA, 2004; GARCÍA-RICO, LEYVA-PEREZ, JARA-MARINI, 2007).

A toxicidade deste elemento resulta principalmente de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos  $-SH$ ,  $-H_2PO_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ), que funcionam como doadores de elétrons (MOREIRA, MOREIRA, 2004).

A assimilação contínua de Pb pode causar problemas neurológicas irreversíveis, doenças renais, efeitos cardiovasculares, toxicidade reprodutiva, bem como danos nos rins e cérebro (SHRIVAS, PATEL, 2010; ANDRADE *et al.*, 2013). Devido o efeito do desenvolvimento neurológico, as crianças e lactentes são os subgrupos mais sensíveis ao Pb, e a estimativa média de exposição alimentar é de 0,03 à 9  $\mu g kg^{-1}$  por peso corporal por dia (FAO/WHO, 2011).

### 3.5.6 Tálcio

É um elemento que se encontra na crosta terrestre em nível traço, na forma pura ou combinado com outras substâncias tais como bromo, cloro, iodo (WELZ, SPERLING, 1999; PETER, VIRARAGHAVAN, 2005).

As principais fontes antropogênicas deste elemento são emissões e os resíduos sólidos provenientes da combustão do carvão e da fundição ferrosa e não ferrosa. O Tl é altamente tóxico, e a sua exposição pode ser feita através de ar, água e alimentos contaminados (PETER, VIRARAGHAVAN, 2005).

Em humanos, o Tl é absorvido através da pele e membranas mucosas, e pode se acumular nos ossos, medula renal, bem como no sistema nervoso central. Como consequência dessa acumulação no organismo, provoca a intoxicação aguda afetando o sistema nervoso, rins, pulmões fígado, hipertensão e pode causar a morte (PETER, VIRARAGHAVAN, 2005; TATSI, TURNER, 2014). A ingestão deste elemento, foi especificado uma dose de referência de 0,07  $\mu g/kg$  de peso corporal por dia (AESAN, 2012).

### 3.6 Determinação de metais em fórmulas infantis

De acordo com a literatura, diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas para a determinação de metais, tais como: espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) e espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), cada uma com suas vantagens e desvantagens (SKOOG *et al.*, 2008).

Trabalho realizado por Viñas *et al.*, (2000) usando a técnica de espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico (ET AAS do inglês, *electrothermal atomic absorption spectrometry*) determinaram Se, Cd e Pb, em diferentes tipos de fórmulas infantis comercializados na Espanha utilizando amostragem por suspensão. Os autores encontraram valores de Cd, Se e Pb estavam abaixo do limite de detecção para todas as amostras.

Ikem *et al.*, (2002), usando a técnica de ICP OES determinaram 26 elementos em fórmulas infantis (em pó e líquido) dentre eles os essenciais (Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, and Zn) e não essenciais (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U, and V) provenientes dos Estados Unidos da América, Ucrânia e Nigéria utilizando a digestão ácida no preparo de amostras. Os resultados obtidos, mostraram que com exceção de Al e Ba, algumas marcas apresentaram altas concentrações, os demais elementos determinados estavam abaixo do recomendado pela FAO/WHO e União Europeia (EU do inglês European Union).

No Marrocos, Souad *et al.*, (2006), empregaram GF AAS para determinar Pb e Al em amostras de cabelos de lactentes, em alimentos destinados à sua alimentação e em leite materno utilizando a digestão ácida no preparo de amostras. Os autores encontraram concentrações de Al nas fórmulas infantis, 730% e 920% maiores, para a formulação destinada a primeira e segunda idade, respectivamente, do que a concentração presente no leite materno. Estes valores excederam os limites recomendados pela FAO/WHO.

Koreňovská (2006), utilizou a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS do inglês *Hydride generation atomic absorption spectrometry*) e

injeção em fluxo para determinar As, Sb e Se em peixes, arroz, leveduras, frutas e outros alimentos na Eslováquia. Para o preparo de amostras, o autor utilizou a digestão assistida por micro-ondas (MWD). Os valores de concentração de As em óleo alcançaram o limite máximo recomendado pela legislação do país, e concentrações que ultrapassaram o limite máximo para Se em vegetais.

Utilizando a MWD no preparo de amostras, Saracoglu *et al.*, (2007), determinaram as concentrações de Cu, Mn, Fe, Zn, Se, Cr, Al e Ni em dezenove tipos de fórmulas infantis de seis diferentes marcas comerciais da Turquia usando GF AAS e F AAS. Os valores determinados estavam em conformidade com os limites legais constantes na legislação do país.

Por ICP-MS, Meharg *et al.*, (2008), utilizando a digestão ácida no preparo de amostras, analisaram alguns alimentos na China, destinados ao consumo infantil, contendo arroz e derivados em sua formulação. Foram encontradas concentrações de As que excediam os níveis considerados seguros no país.

Kazi *et al.*, (2009), usando a técnica de GF AAS e MWD, determinaram Al, Pb e Cd em fórmulas infantis comercializadas em Paquistão, e os resultados foram inferiores aos recomendados pela FAO/OMS.

Kazi *et al.*, (2010), determinaram Al, Cd, Ni e Pb em diferentes alimentos infantis usando a técnica de GF AAS e EAU para o preparo de amostra. Os resultados encontrados estavam de acordo com os limites permitidos pela legislação em Paquistão, com exceção de Cd que foi alto nas fórmulas infantis feitas à base de arroz.

Um projeto denominado “substâncias contaminantes da cadeia de produção de alimentos” (CASCADE, 2010) do inglês, (*Chemicals as Contaminants in the Food Chain*) foi desenvolvido para avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos disponíveis na União Europeia utilizando as técnicas de F AAS e GF AAS. O preparo de amostras para a determinação de micronutrientes foi por digestão ácida, enquanto que para os elementos traço foi realizado por análise direta de sólidos. Nas amostras de alimentos para bebês, foram determinados dez elementos essenciais e não-essenciais e, foi encontrado Cd e Zn em todas as amostras analisadas. Foram determinados também, os teores de Fe, Pb, Se, Hg, Cu, Ni, Ca e Mn. A partir dos resultados obtidos chegaram a conclusão que os alimentos para bebês, provenientes da Eslováquia, apresentavam os maiores níveis de Cd em todas as amostras analisadas.

Ainda no escopo do projeto CASCADE, Pandelova *et al.*, (2012), determinaram Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em alimentos para bebês mais vendidos na

Europa. Os autores empregaram as técnicas de ICP OES e ICP-MS, e a digestão ácida foi usada no preparo das amostras. No trabalho foram encontradas concentrações de Cd que excediam ao máximo recomendado pela autoridade europeia em segurança alimentar (EFSA do inglês, *European Food Safety Authority*).

Hernández-Martínez e Navarro-Blasco (2012) determinaram Pb e Cd em 91 amostras de cereais infantis, comercializados na Espanha, usando a técnica de ET AAS e digestão ácida no preparo das amostras. Os resultados encontrados estavam de acordo com a legislação em vigor no país e com outras pesquisas feitas, tendo sido observado apenas uma pequena variação para Cd.

Na Coreia do Sul, Khan *et al.*, (2013) validaram métodos analíticos para determinação simultânea de Cr, Mo e Se em fórmulas infantis usando a técnica de ICP OES e ICP-MS, e digestões ácidas no bloco fechado e MWD foram utilizadas no preparo de amostras. Os valores encontrados estavam de acordo com as normas nutricionais vigentes naquele país.

Mir-Marques *et al.*, (2015), usando a digestão ácida no preparo de amostras e a técnica de ICP OES determinaram o perfil mineral de 14 elementos em 35 frascos de alimentos para bebês comercializados no mercado Espanhol. Os resultados encontrados para Fe, Zn e Ca foram muito inferiores ao recomendado na legislação em vigor no país.

No Brasil, Silva *et al.*, (2015), determinaram Cr em fórmulas infantis comercializadas no mercado Brasileiro, empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite por análise direta de sólidos (SS-HR-CS ET AAS do inglês, *Solid Sampling High Resolution Continuum Source Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*). Os autores concluíram que os valores encontrados foram inferiores aos permitidos pela legislação Brasileira. É importante ressaltar que este é o único trabalho na literatura que aborda a determinação de elementos traço em fórmulas infantis usando análise direta de sólidos.

### **3.7 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua**

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é usada para determinação quantitativa de elementos de uma ampla variedade de amostras líquidas, sólidas, gasosas, até mesmo suspensão, podendo ser associado a sistemas de análise em fluxo e permitir estudos de especiação química (SKOOG, *et al.*, 2008). O princípio da técnica baseia-se na medida da atenuação da intensidade da radiação eletromagnética,

proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental (BORGES, *et al.*, 2005). Normalmente utiliza uma chama (F AAS) ou um tubo de grafite (GF AAS) como atomizadores.

Os primeiros instrumentos para medida de absorção atômica foram desenvolvidos na metade do século XX, utilizavam uma fonte contínua, uma vez que esta era a única fonte confiável de radiação disponível naquela época. No entanto, às limitações instrumentais como a baixa resolução de monocromador na época, tornava difícil a detecção de uma pequena redução na intensidade de emissão em um pequeno intervalo espectral em frente de um fundo luminoso (BORGES, *et al.*, 2005). Somente em 1952 Alan Walsh, concluiu que fontes de emissão de linhas (LS) com linhas mais estreitas possíveis seriam necessárias para medidas em AAS, uma vez que uma resolução de aproximadamente 2 picômetros seria necessária, se uma fonte contínua fosse utilizada. Então, instrumentos de AAS com fontes de linha (LS AAS) foram e são, até hoje, utilizados com todas as suas vantagens e limitações; as mais usadas são lâmpadas de cátodo oco (WELZ, SPERLING, 1999; BORGES, *et al.*, 2005).

Entretanto, a literatura relata muitas tentativas feitas sem sucesso para utilização de uma fonte contínua como fonte de radiação em AAS (WELZ, *et al.*, 2014). Somente em 1996, o grupo do Prof. Becker-Ross, do Institute for Analytical Sciences, Berlim, Alemanha desenvolveu o primeiro instrumento de Espectrometria de Absorção atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS do inglês, *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*), cuja configuração é a que mais se aproxima da atualidade (BORGES, *et al.*, 2005).

O atual equipamento de HR-CS AAS, lançado no mercado em 2002, é constituído por uma lâmpada de arco-curto de xenônio de alta pressão operando em modo *hot spot*, um duplo monocromador de alta resolução (DEMON) e um detector constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD - do inglês *charge-couple device*) com 588 *pixels*, dos quais 200 são usados para fins analíticos e os restantes são utilizados para monitoramento e ajustes de componentes internos do equipamento (WELZ, *et al.*, 2005, 2007, 2010).

A técnica HR-CS AAS, além de operar com uma única fonte de radiação de altíssima intensidade em toda faixa espectral (190–900 nm) apresenta vantagens quando comparada com a LS AAS (WELZ, *et al.*, 2005, 2010), tais como:

(i) Melhorias no sinal devido o monitoramento simultâneo dos 200 *pixels* efetuado pelo detector CCD, cada um funcionando como um detector independente, o que em

conjunto com a elevada intensidade da radiação da lâmpada de Xe melhora os valores de limites de detecção;

(ii) Permite monitorar a vizinhança espectral das linhas analíticas, tornando possível avaliar uma terceira dimensão, o comprimento de onda;

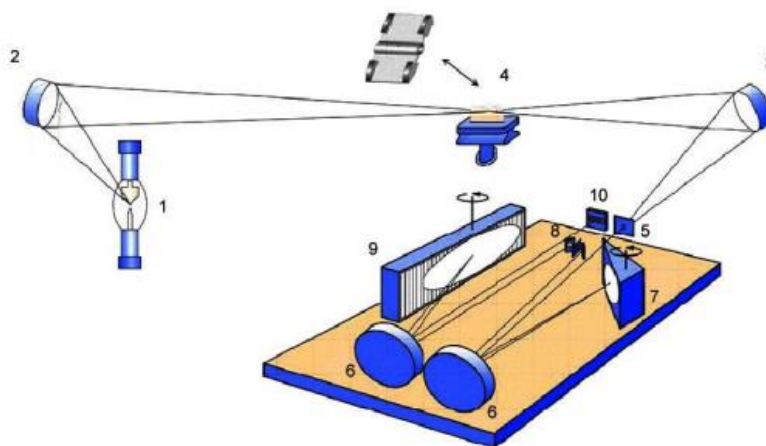
(iii) Apresenta um maior potencial para correção de fundo, possibilitando detectar interferências em tempo real, corrigindo com eficiência, eventos espectrais indesejáveis, como rápidas mudanças contínuas na absorção do fundo;

(iv) Possibilita uma correção matemática, para interferências que não podem ser resolvidas no tempo, através do algoritmo de mínimos quadrados, no qual é possível gerar um espectro de referência do fundo e subtraí-lo do espectro de interesse;

(v) Possibilita a realização de análises multielementares e o uso de linhas secundárias sem compromisso ou perdas de precisão.

A figura 1 mostra a representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.

**Figura 1-** Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS). Sendo: (1): lâmpada de arco curto de Xe; (2,3) espelhos elipsoidais focalizadores; (4) atomizador (chama ou forno de grafite); (5) fenda de entrada; (6) espelhos parabolóides; (7) prisma; (8) fenda intermediária ajustável; (9) rede *echelle* e (10) detector CCD.



Fonte: Adaptado de Borges *et al.*, 2005.

### **3.8 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (HR-CS GF AAS)**

A técnica de GF AAS foi desenvolvida por L'vov em 1959. Ela é muito empregada para determinação de baixas concentrações em diversos tipos de matrizes, pois apresenta alta seletividade e sensibilidade necessitando de volume reduzido de amostra na ordem de 10 a 40  $\mu\text{L}$ . Consiste no aquecimento do forno de grafite por resistência através da passagem de uma alta corrente elétrica a baixa voltagem, o qual passa por diversas etapas de aquecimento até a atomização dos analitos (WELZ, SPERLING, 1999; DESSUY, 2011).

A técnica GF AAS apresenta algumas vantagens quando comparado a F AAS, além da eliminação da matriz nas etapas de aquecimento (secagem e pirólise), o tempo de residência durante a atomização e 100% dos analitos introduzidos no forno são atomizados, o que torna a técnica menos sujeita aos efeitos do tamanho e volatilidade das partículas e confere uma maior sensibilidade (WELZ, SPERLING, 1999).

A técnica de GF AAS, embora seja monoelementar, tem sido bastante empregada devido a sua excelente sensibilidade, além de permitir análise de amostras com elevado teor de matéria orgânica e viscosidade e, na maioria dos casos, possibilita a calibração utilizando padrões aquosos (WELZ, SPERLING, 1999).

Esta técnica permite a análise direta de amostras sólidas (SS do inglês *Solid Sampling*), o que diminui etapas de pré-tratamento da amostra, como a dissolução ou a decomposição, que demanda muito tempo, envolvendo longo procedimento de preparo, com riscos de perda de analito por volatilização ou contaminação e necessidade de grandes quantidades de reagentes, principalmente ácidos concentrados, sendo assim uma etapa crítica. Por outro lado, uma vez que as amostras não são diluídas, melhores limites de detecção são alcançados (WELZ, SPERLING, 1999). Na área de alimentos, a técnica de SS-GF AAS aliada à análise direta de sólidos vem sendo aplicada em diversos tipos de matrizes (OLESZCZUK *et al.*, 2007; ARAUJO, *et al.*, 2008; dos SANTOS *et al.*, 2009; de ANDRADE, *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015; dos SANTOS *et al.*, 2016; POZZATTI *et al.*, 2017).



### 3.9 Análise direta

#### 3.9.1 Análise direta de sólidos por GF AAS

Análise direta de sólidos é uma técnica que oferece possibilidade de se obter informações sobre a composição elementar como um mínimo preparo de amostras. A técnica de GF AAS tem mostrado ser uma excelente alternativa, pois simplifica a introdução amostras sólidas dentro do atomizador, apresenta boa seletividade e sensibilidade. A análise direta de sólidos pode ser feita por dois procedimentos: via suspensão e amostragem direta (KRUG, ROCHA, 2016).

Esta forma de introdução de amostra apresenta inúmeras vantagens quando comparada aos métodos convencionais por via húmida como: (i) tratamento simples e rápido das amostras; (ii) redução no tempo de preparo de amostras; (iii) redução de contaminação; (iv) redução de perdas de analitos por volatilização; (v) menor geração de resíduos; (vi) uso de menor quantidade de amostra para análise; (vii) alta sensibilidade, pois as amostras não são diluídas e (viii) apresentam melhores limites de detecção e (ix) possibilita a calibração com padrão aquoso (KORN *et al.*, 2008; KRUG, ROCHA, 2016). Devido a essas vantagens, SS tem se mostrado atrativa e promissora para determinação de elementos em níveis traço e ultra-traço em diversas amostras sólidas (KRUG, ROCHA, 2016).

Apesar das vantagens associadas à análise direta de sólidos, alguns fatores devem ser considerados quando se aplica esta técnica, tais como:

**Influência do tamanho de partícula:** diminuição do tamanho de partícula é uma alternativa de homogeneizar o material, e requer um mínimo pré-tratamento que pode ser feito por meio de moagem. Neste sentido, a moagem aumenta a microhomogeneidade, e melhora a precisão e exatidão dos resultados. Diferentes tipos de moinhos como o almofariz, moinhos de faca ou de bolas e criogênicos tem sido utilizado para diminuir o tamanho de partícula das amostras (KRUG, ROCHA, 2016).

**Influência da massa da amostra:** as menores massas utilizadas para análise, associadas à falta de homogeneidade na distribuição dos analitos na amostra, podem afetar a precisão dos resultados com elevados desvios padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) acima de 10%. Nesta situação, é necessário que a massa mínima utilizada represente a amostra como um todo sem afetar a precisão e a exatidão dos resultados (KRUG, ROCHA, 2016). Por outro lado, o uso de quantidade maiores de

massa de amostra pode favorecer a formação de elevado sinal de fundo, o que tem ocasionado a presença de interferências espectrais (BORGES, 2013). Atualmente o HR-CS AAS vem sendo utilizado, para investigar e corrigir interferências com bastante sucesso.

A literatura reporta diversos trabalhos utilizando análise direta de sólidos para determinação de metais em diversas amostras. Silva *et al.*, (2015) determinaram Cr em fórmulas infantis utilizando a técnica de HR-CS GF AAS e amostragem direta de sólidos. Os autores utilizaram Mg 0,1% (m/v) como modificador químico; e uma solução contendo 6% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20% (v/v) etanol e 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> para melhorar o contato entre o modificador e amostra sólida, e para minimizar a formação de resíduos carbônicos. A curva de calibração foi feita contra padrões aquosos, e a exatidão do método foi verificada com análise de material de referência certificado. Assim, foi possível desenvolver um método preciso e exato para determinação de Cr em amostras de fórmulas infantis por análise direta de sólidos.

Dos Santos *et al.*, (2016) desenvolveram um método para determinação simultânea de Cu e Fe em amostras de farinha por análise direta de sólidos, empregando a técnica de HR-CS GF AAS. Para a determinação destes elementos não foi necessário o uso do modificador químico, e a curva de calibração com soluções padrão aquosos foi utilizada para a quantificação dos analitos. Para a verificação da exatidão do método desenvolvido, foram utilizados dois CRM: de farinha de arroz (1568a) e farinha de trigo (1567a); os resultados mostraram que o método desenvolvido foi simples, exato e preciso.

Pozzatti *et al.*, (2017) determinaram Cd, Cr e Cu em vegetais da família Solanaceae empregando a técnica de HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos. As amostras foram liofilizadas, moídas e passadas numa malha de 200 µm para diminuir o tamanho de partículas. Para a determinação destes elementos não foi necessário o uso de modificador químico, com exceção de Cd, para o qual os autores utilizaram uma mistura de 5 µg Pd + 3 µg Mg. As curvas de calibração com soluções padrão aquosos foram utilizadas para a quantificação de analitos nestas amostras, e a verificação da exatidão dos métodos desenvolvidos foram utilizados 2 CRM: de folha de espinafre (1570a) e de folha de tabaco (CTA-VTL-2).

### 3.9.2 Análise de suspensão por GF AAS

A suspensão é um outro procedimento de análise de sólidos que consiste na introdução de amostras na forma de dispersão. A suspensão apresenta vantagens como: (i) minimização do risco de contaminação da amostra; (ii) eliminação ou redução de perda de analitos que podem eventualmente ser volatilizados durante a etapa de pré-tratamento; (iii) redução do uso de reagentes perigosos ou corrosivos; (iv) pode ser igualmente aplicado à determinação de amostras orgânicas e inorgânicas; (v) possibilita a determinação de elementos voláteis seguindo abordagens de geração de vapor químico e, (vi) permite a análise de especiação (em contraste à amostragem direta de sólidos) com derivatização de reações ou procedimentos apropriados de separação. Outra vantagem importante é que podem ser utilizadas soluções padrão aquosas para calibração (FERREIRA, *et al.*, 2010; KORN, *et al.*, 2008).

Entretanto, para a utilização da suspensão no preparo de amostra, e para não comprometer a análise durante a medição com chama ou com forno de grafite é necessário ter em conta alguns fatores, tais como:

**Meio diluente:** o diluente atua como um agente extrator melhorando a precisão e a exatidão do método pela transferência de analitos para fase líquida. A escolha do diluente está relacionado com o tipo de matriz e características do analito. Na maioria das vezes tem sido utilizado ácido nítrico e clorídrico, bem como a combinação dos dois ácidos como diluentes para a extração de analitos (CAL-PRIETO, *et al.*, 2002; FERREIRA, *et al.*, 2010). Às vezes, soluções alcalinas como tetra metil hidróxido amônio (TMHA) tem sido utilizadas como diluente para solubilizar matrizes biológicas (FERREIRA, *et al.*, 2010).

**Agentes estabilizantes:** as características físicas e químicas de amostras sólidas, muitas das vezes requerem a adição de reagentes especiais para dispersar partículas sólidas aglomeradas ou para evitar a sedimentação de partículas. O Triton X-100 e o glicerol são frequentemente utilizados como agentes estabilizantes para o preparo de suspensão (CAL-PRIETO *et al.*, 2002; FERREIRA, *et al.*, 2010).

**Homogeneidade:** é bem sabido que uma agitação apropriada é necessária para se obter uma suspensão homogênea. Existem diversas alternativas utilizadas para a homogeneização da suspensão como agitação mecânica (magnética ou agitação por vórtex), borbulhamento de gás, agitação ultrassônica e a manual, cada uma com suas vantagens e desvantagens (FERREIRA, *et al.*, 2010). A agitação mecânica (magnética

ou agitação por vórtex) são considerados de fácil operação, ampla disponibilidade e de baixo custo, e são utilizados para preparar grandes volumes de amostra de suspensão. Para o borbulhamento de gás, o procedimento é simples, um fluxo de gás argônio é diretamente aplicado aos frascos contendo a suspensão por ser analisada. A agitação ultrassônica pode ser feita com um banho de ultrassom ou utilizando uma sonda ultrassônica. A agitação manual normalmente usando uma micropipeta é mais simples e econômica, é considerada como sendo mais eficiente para materiais com baixa densidade na presença de agentes estabilizantes (CAL-PRIETO *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010).

O uso de suspensão no preparo de amostras para determinação de metais em diferentes amostras mostrou ser bem sucedido como reportado na literatura. Tokman (2007) determinou Cu e Mn em suplementos multivitamínicos utilizando a técnica de GF AAS e análise por suspensão. As amostras foram preparadas adicionando o Triton X-100 como dispersante. As curvas de calibração com soluções padrão aquosas foram utilizadas para a quantificação dos analitos, e a verificação dos métodos desenvolvidos foi realizado com materiais de referência certificados. Os métodos desenvolvidos foram simples, rápidos e exatos.

Araujo *et al.*, (2008) compararam análise direta de sólidos e amostragem por suspensão para determinação de Cd em farinha de trigo empregando GF AAS. Para a determinação deste elemento foram utilizados a mistura de 10 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico, 0,05% (v/v) Triton X-100 para assegurar uma distribuição homogênea do modificador químico sobre as amostras sólidas. Para a suspensão, 30 µg Pd + 12 µg Mg e 0,05% (v/v) Triton X-100 foram utilizados como modificador químico; as curvas de calibração utilizando soluções padrão aquosas foram utilizadas para quantificação de Cd nos dois procedimentos. O método desenvolvido foi avaliado com uso de CRM, e os resultados das amostras obtidos utilizando estes procedimentos foram concordantes a um nível de confiança de 95 %.

A introdução da técnica de HR-CS AAS trouxe novas possibilidades para análise direta de sólidos. O conjunto do duplo monocromador de alta resolução (DEMON) e um detector constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada permitem obter literalmente a informação tridimensional, isto é, absorvância ao longo do tempo e sobre o comprimento de onda. Com isso, é possível detectar interferências em tempo real, corrigindo com eficiência, eventos espectrais indesejáveis na linha analítica. Outro ponto importante, está relacionado com a seleção de número de pixels,

devido ao fato de cada pixel fazer a sua própria medida e cálculo de absorvância ou absorvância integrada, os valores medidos por pixels individuais podem ser adicionados sem afetar a linearidade da curva de calibração (WELZ *et al.*, 2014). Além disso, se requerido, apenas pixel central (CP) ou pixels laterais nas asas das linhas analíticas podem ser usados para diminuir a sensibilidade em amostras muito concentradas, deste modo é possível a flexibilização dos parâmetros de mérito. E mais, como todas as linhas secundárias estão disponíveis com mesma intensidade, elas podem ser usadas para determinação de analitos em amostras muito concentradas, bem como para resolver problemas de interferências espectrais (WELZ *et al.*, 2014).

#### 4. METODOLOGIA

A determinação de metais em fórmulas infantis foi realizada utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua Modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) com dois atomizadores separados: chama e tubo de forno de grafite aquecido transversalmente.

Os elementos As, Cd, Cu, Mn, Pb e Tl foram determinados utilizando tubos de grafite para amostragem sólida (Analytik Jena, Parte N° 407- A81.303) e plataformas de grafite SS (Analytik Jena, Parte N° 407-152.023), revestidas pirolíticamente. As amostras foram pesadas diretamente sobre as plataformas utilizando uma microbalança M2P com precisão de 0,001 mg (Sartorius, Göttingen, Alemanha). Uma pinça, que faz parte do acessório de amostragem manual SSA 6 (Analytik Jena), foi utilizada para transferir as plataformas SS para o atomizador. Gás argônio comercial, pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil), foi utilizado como gás de purga, com um fluxo de 2,0 L min<sup>-1</sup> durante todas as etapas do programa de aquecimento, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás é interrompido. As medidas foram realizadas em quintuplicata.

Devido a altas concentrações nas amostras, foi utilizado para Cu apenas 1 pixel central (CP do inglês *center pixel*), enquanto que para As, Cd, Pb, Tl e Mn foi considerado o somatório da absorvância integrada de três pixels e central da linha (CP) mais cada um dos seus *pixels* adjacentes, CP  $\pm$  1 para a avaliação do sinal analítico. Os sinais de absorvância integradas foram baseadas na área do pico em todos os experimentos.

Em todos os experimentos, água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Milli-Q Millipore, Bedford, MA, EUA), foi utilizada para o preparo de padrões e reagentes do grau analítico. Todos os recipientes e vidraria foram mantidos em ácido nítrico 10% durante 24 h e lavados com água desionizada antes da sua utilização.

Os parâmetros de mérito: limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados utilizando três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de 10 medidas de um branco dividido pela inclinação da curva de calibração, através das equações 1 e 2. As medidas do branco para a investigação As, Cd, Pb e Tl, e determinação de Cu e Mn foram realizadas de acordo com a técnica de "resposta em massa zero"

(KURFÜRST, 1998), neste caso, é introduzido repetidamente uma plataforma de amostragem sólida vazia, seguida por um ciclo de atomização regular.

A determinação da massa característica ( $m_0$ ) foi feita por uma regra de três relacionando o valor de um padrão, com massa conhecida, e sua respectiva absorvância.

**Equação 1:**  $LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{S}$

**Equação 2:**  $LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$

Sendo  $\sigma$  desvio padrão de dez medidas do branco e  $S$  o coeficiente angular da curva de calibração. Para obtenção dos LOD e LOQ em valores relativos, foi utilizado o valor de massa máxima empregado (WELZ, SPERLING, 1999).

Para a investigação de elementos potencialmente tóxicos e determinação de elementos essenciais, foram utilizadas seis (6) amostras de fórmulas infantis de marcas diferentes, todas na forma sólida (pó), com base em diferentes tipos de matérias-primas (arroz, aveia, leite bovino e soja), adquiridas no mercado local (Porto Alegre, Brasil). A escolha das amostras foi de forma aleatória, tendo sido escolhida as marcas mais populares. Para avaliar a exatidão dos resultados dos métodos desenvolvidos foi empregado um CRM: rice fluor NIST SRM (1568a). Os valores da concentração obtidos foram concordantes com os valores certificados, baseados em test t student a 95% de confiança.

Os elementos potencialmente tóxicos como As, Cd, Pb e Tl apresentaram valores inferiores ao LOD. As figuras de mérito para a determinação de As, Cd, Pb, e Tl estão mostradas na tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros de mérito para determinação de As, Cd, Pb e Tl em fórmulas infantis usando HR-CS GF AAS.

Parâmetros	Equação de regressão	R	LOD	LOQ	$m_0$ (pg)
	Linear		( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
As	$A = 0,00463 + 0,1954m(\text{ng})$	0,9997	0,05	0,16	20
Cd	$A = 0,0031 + 0,0145m(\text{ng})$	0,9983	0,1	0,4	0,3
Pb	$A = 0,0037 + 1,0522 m(\text{ng})$	0,9919	0,5	2,1	4
Tl	$A = 0,0067 + 0,0531m(\text{ng})$	0,9975	60	200	88

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

### 5.1 Artigo

**Título:** Development of analytical methods for the determination of copper and manganese in infant formula using high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Publicado na revista Analytical Methods.**

#### Destaques

- ❖ Foram determinados Cu e Mn em amostras de fórmulas infantis por HR-CS GF AAS e análise direta de sólidos.
- ❖ As amostras analisadas são provenientes dos mercados da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, todas na forma de pó e contém diferentes composições como: arroz, leite de vaca, arroz e aveia.
- ❖ O principal foco foi a redução do tratamento das amostras e o emprego das soluções padrão aquosas, com a finalidade de tornar os métodos mais simples e aplicáveis a análise de rotina.
- ❖ Algumas amostras apresentaram valores de concentração de Cu abaixo dos limites mínimos estabelecidos pela legislação brasileira, enquanto que para Mn todas as amostras estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela ANVISA.





Cite this: DOI: 10.1039/c6ay03332f

# Development of analytical methods for the determination of copper and manganese in infant formula using high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis

Raimundo R. Gamela,<sup>a</sup> Álvaro T. Duarte,<sup>b</sup> Eliana G. Barrera,<sup>b</sup> Bernhard Welz,<sup>cd</sup> Morgana B. Dessuy,<sup>bd</sup> Márcia Messias da Silva<sup>bd</sup> and Maria Goreti R. Vale<sup>ib\*bd</sup>

Two fast, simple and reliable methods for the determination of Cu and Mn in infant formula composed of different types of raw materials (rice, oats, bovine milk and soybean) were developed using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS) and direct solid sample analysis. All measurements were carried out without any chemical modifier and with aqueous standard solutions for calibration. The optimum pyrolysis temperature was 1300 °C for both analytes, and atomization temperatures were 2300 °C and 2100 °C for Cu and Mn, respectively. The characteristic mass was 8.0 pg for both analytes; the limits of detection and quantification were 0.003  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 0.01  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, for Cu, based on a sample mass of 3.0 mg, and 0.01  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 0.04  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, for Mn, based on a sample mass of 1.0 mg. The concentrations obtained ranged from 1.3 to 6.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Cu and 0.7 to 17.2  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Mn. The accuracy of the methods was evaluated using the certified reference material NIST SRM 1568a (rice flour) and the results presented no significant difference between the certified and found concentrations. The methods are sensitive, simple and do not require any sample pretreatment besides milling and homogenization of samples.

Received 11th December 2016  
Accepted 20th March 2017

DOI: 10.1039/c6ay03332f

[rsc.li/methods](http://rsc.li/methods)

## 1. Introduction

Human breast milk is the first food for new born babies, and it is considered a complete food, as it contains all the necessary nutrients for the development of babies and its exclusive use is recommended for at least the first six months of their life.<sup>1,2</sup> However, in certain situations, breastfeeding might not be possible, and special diets are required to replace or complement human breast milk. In these cases, industrialized infant formula must be introduced to infant diet. These complementary foods contain amounts of vitamins and minerals to meet the requirements of young children (1 to 3 years) and infants (under 1 year of age).<sup>2,3</sup>

During the industrial production of infant formula, some minor elements can be removed and essential micronutrients

are normally added to the formulations at levels higher than those present in human milk to compensate for the fact that these micronutrients added to infant formula are absorbed by the body to a lesser extent than those in breast milk.<sup>4,5</sup> Examples of such micronutrients are copper (Cu) and manganese (Mn), which are essential elements for the nutrition of infants and have a variety of biochemical functions in living organisms.<sup>6,7</sup>

Copper is an essential constituent of proteins and it helps in the formation of blood cells, hormones and antioxidant enzymes,<sup>7</sup> while Mn is essential for all living cells and plays an important role in the human organism as a cofactor for a variety of enzymes, formation of bones and metabolism of amino acids, cholesterol, and carbohydrates.<sup>6–8</sup>

In Brazil, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) is the government institution that controls the minimum limits of minerals in infant formulas. ANVISA has set the minimum parameters of minerals by energy values, indicating a minimum amount necessary for each essential element per 100 kcal in infant formulas.<sup>9</sup>

Considering the nutritional aspect of infant formula and the importance of the presence of essential elements, such as described above for Cu and Mn, the development of analytical methods to determine such elements in this type of food is of great interest.

<sup>a</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mgrvale@ufrgs.br

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq-INCT de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

Different analytical techniques can be employed for the determination of trace elements in infant formulas. For example, Cu and Mn have been determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) in infant formula by slurry sampling<sup>5</sup> and in baby foods after a microwave-assisted digestion using nitric acid and hydrogen peroxide.<sup>10</sup> Other techniques widely used for Cu and Mn determination in baby food are inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES)<sup>3,11,12</sup> and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).<sup>13</sup>

High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS AAS) appears to be a good alternative for the determination of trace elements in a wide range of matrices. This technique uses a high-intensity xenon short-arc lamp as the primary radiation source, a high-resolution double monochromator and a linear charge-coupled device (CCD) array detector, which enables achieving better limits of detection (LODs) and an extended linear working range. It offers new possibilities for background correction, and three-dimensional imaging of the environment of the analytical line, which is not possible in traditional AAS.<sup>14–20</sup> Furthermore, the combination of this technique with graphite furnace (GF) atomization further facilitates direct solid sample (SS) analysis in HR-CS SS-GF AAS, avoiding pre-treatment stages, fundamental in most mentioned analysis techniques, such as digestion of samples, and offers the possibility to obtain accurate results by simple calibration with aqueous standards.<sup>19–21</sup> Moreover, since the samples are not diluted, improved detection limits are typically obtained using direct SS analysis;<sup>7,19,21</sup> however, only few studies were published for the determination of metals in infant formulas using HR-CS SS-GF AAS.<sup>22,23</sup> Pretreatment stages, besides being time-consuming, include the risk of analyte loss and/or contamination,<sup>7</sup> require additional reagents, particularly acids, and are known to be the most critical step of an analytical method.

Therefore, the goal of this work was the development of rapid, precise and accurate analytical methods for the determination of Cu and Mn in infant formula by HR-CS GF AAS using direct SS analysis.

## 2. Experimental

### 2.1 Instrumentation

A high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, Model contraAA 700 (Analytik Jena, Jena, Germany), has been used for all experiments. The spectrometer is equipped with two separate atomizers: a flame and a transversely heated graphite tube furnace, but only the latter one was used in the present work. The spectrometer consists of a high-intensity xenon short-arc lamp operating in a hot-spot mode, which emits a continuous spectrum between 190 and 900 nm, a high resolution double monochromator (prism and echelle grating monochromator, both in Littrow mounting) and a CCD array detector with 588 pixels, 200 of which are used for analytical purposes.

The analytical lines at 324.754 nm (100% of relative sensitivity) and 403.076 nm (7% relative sensitivity) were used for the determination of Cu and Mn, respectively. Peak volume selected

Table 1 Graphite furnace heating program for the determination of Cu and Mn in infant formulas using HR-CS SS-GF AAS

Stages	Temperature, °C	Ramp, °C s <sup>-1</sup>	Hold, s	Gas flow rate, L min <sup>-1</sup>
Drying 1	90	3	20	2
Drying 2	150	5	20 <sup>a</sup> , 10 <sup>b</sup>	2
Pyrolysis	1300 <sup>a,b</sup>	300	30	2
Atomization	2300 <sup>a</sup> , 2100 <sup>b</sup>	3000	8 <sup>a</sup> , 10 <sup>b</sup>	0
Cleaning	2400 <sup>a</sup> , 2200 <sup>b</sup>	500	4	2

<sup>a</sup> Cu. <sup>b</sup> Mn.

absorbance (PVSA)<sup>24</sup> was used for signal evaluation. In the case of Cu, the integrated absorbance of only the center pixel (CP) was used, which corresponds to a spectral interval of 1.9 pm, and its sensitivity was appropriate for the analysis of all samples. For Mn, as it was present in a wide concentration range in the samples, and aiming for the use of only one calibration curve (in order to simplify the method), it was necessary to summate the integrated absorbance of the center pixel and the two adjacent ones (CP ± 1), which corresponds to a spectral interval of 1.9 pm.

Transversely heated, pyrolytically coated SS graphite tubes (Analytik Jena, Part no. 407-A81.303) and SS graphite platforms (Analytik Jena, Part no. 407-152.023) were used for all measurements. An M2P microbalance with an accuracy of 0.001 mg (Sartorius, Gottingen, Germany) was used for weighing the samples directly on the SS platforms. A pre-adjusted pair of tweezers, which is part of the SSA 6 manual solid sampling accessory (Analytik Jena), was used to transfer the SS platforms to the atomizer. Argon with a purity of 99.996% (White Martins, Sao Paulo, Brazil) was used as the purge gas with a flow rate of 2.0 L min<sup>-1</sup> during all stages, except during atomization, when the Ar flow was stopped. The optimized graphite furnace temperature program used for the determination of Cu and Mn is shown in Table 1.

### 2.2 Reagents

Nitric acid (Merck, Germany), previously purified by sub-boiling distillation in a quartz sub-boiling still (Kurner Analytentechnik, Rosenheim, Germany), and ultrapure water with a specific resistivity of 18 MΩ cm, from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA), were used for the preparation of all aqueous standard solutions. All containers and glassware were soaked in 1.4 mol L<sup>-1</sup> nitric acid for 24 h and rinsed abundantly with high-purity deionized water before use. The Cu and Mn stock standard solutions (1000 mg L<sup>-1</sup> in 0.014 mol L<sup>-1</sup> nitric acid), all from Specsol (Brazil), and the chemical modifier solution containing 0.05% (m/v) Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 0.03% (m/v) Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> was prepared by the dilution of stock solutions (Merck) of 10 g L<sup>-1</sup> Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 10 g L<sup>-1</sup> Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

### 2.3 Samples, certified reference material and procedures

Six infant formula samples of different brands, all in powder form, based on different types of raw materials (rice, oats,

bovine milk and soybean), purchased at local markets (Porto Alegre, Brazil) were used in this study for Cu and Mn determination. The most popular brands of baby food have been selected for this study. The original samples were not homogeneous enough for our purpose; therefore, all samples were ground in a micro-mill, A-11 Basic (IKA-Werke, Germany). The milling consisted of 3 cycles of 20 s each. The samples were dried in a stove at 65 °C for 3 h. After cooling to room temperature, the samples were sieved through a 45 µm polyester sieve and kept in sealed plastic vials inside of a desiccator until further sample processing. A certified reference material (CRM) of rice flour, NIST SRM 1568a (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA), was employed for method optimization and validation.

The sample mass (0.01 to 3.0 mg) was weighed directly on the platform using a microbalance (refer to Section 2.1) and introduced into the graphite tube of HR-CS-GF AAS for the determination of Cu and Mn, followed by a regular atomization cycle. Each of the six samples was analyzed at least five times.

### 3. Results and discussion

A rice-based infant formula was used to optimize the method developed for the Cu and Mn determination. The chemical modifier has the function of preventing the release of the analyte during the drying and pyrolysis stages without affecting the sensitivity of the element.<sup>25</sup> Thus, in this work the universal chemical modifier (a mixture of Pd and Mg), which already has been reported in the literature for Cu and Mn determination,<sup>26–28</sup> was chosen to investigate the influence of a chemical modifier on the pyrolysis and atomization temperatures for the determination of both elements. The analysis was performed by introducing the chemical modifier onto the solid sample on the platform.

#### 3.1 Influence of the sample mass

The influence of the sample mass introduced into the graphite tube on the integrated absorbance was initially investigated with an unmilled sample of infant formula, as shown in Fig. 1a.

This figure shows that it was not possible to achieve a linear correlation between the sample mass weighed on the platform and the integrated absorbance values for copper in unmilled samples, which might be caused by a lack of micro-homogeneity of the sample and influences directly the accuracy of the results. After grinding the samples in the micro-mill as described in Section 2.3, a linear correlation between the sample mass inserted into the graphite tube and the integrated absorbance values was obtained, as can be seen in Fig. 1b for Cu and 1c for Mn. The correlation between the integrated absorbance and the sample mass was linear in the mass range from 0.01 to 3.0 mg for Cu and 0.02 to 1.0 mg for Mn.

#### 3.2 Pyrolysis and atomization temperatures

The pyrolysis and atomization curves, shown in Fig. 2 (for Cu) and 3 (for Mn), were established with an aqueous standard solution and a rice-based infant formula, with and without the addition of a mixture of 5 µg Pd and 3 µg Mg as the chemical

modifier in solution for both analytes. Because it is almost impossible and unnecessary to weigh always the same sample mass, integrated absorbance values were normalized to 0.1 mg for Cu and to 0.05 mg for Mn for better comparison.

For both elements, the pyrolysis and atomization curves with and without the chemical modifier did not show any significant difference, which suggests that using any chemical modifier is not necessary for Cu and Mn determination in this kind of matrix, due to their inherent thermal stability.<sup>7,25,29</sup>

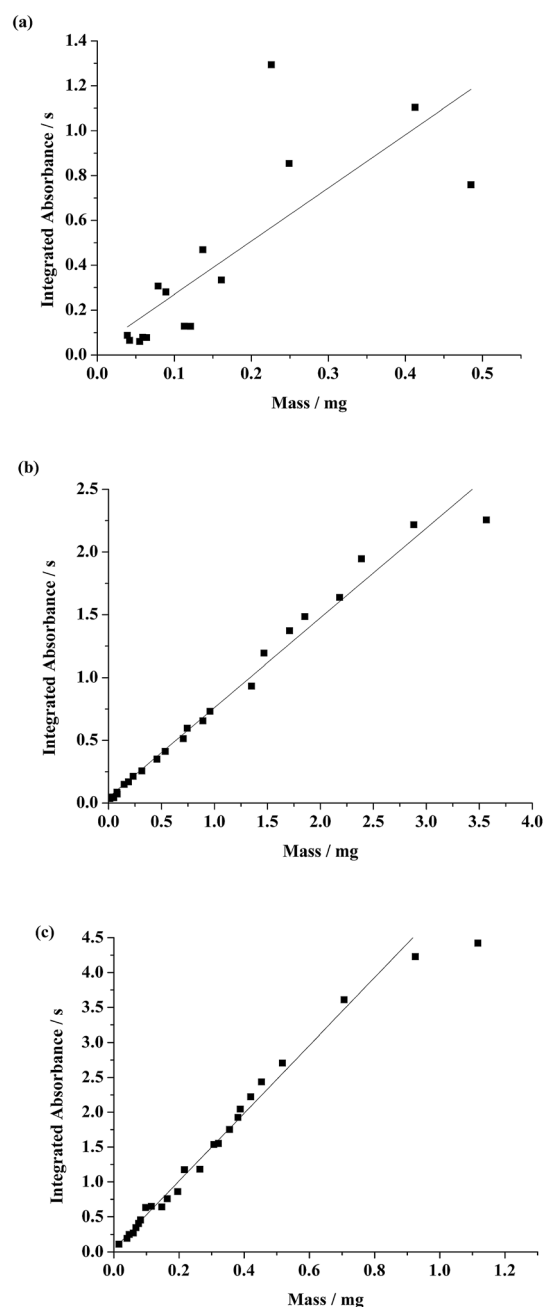


Fig. 1 Correlation between the sample mass inserted into the graphite furnace and the measured integrated absorbance values for: (a) Cu determination in an unmilled sample, (b) Cu determination in a milled sample (particle size < 45 µm) and (c) Mn determination in a milled sample (particle size < 45 µm).

To establish the optimal pyrolysis temperature for Cu, the profile and the intensity of the analytical signals obtained at an atomization temperature of 2300 °C and pyrolysis temperatures in the range of 300–1700 °C were evaluated. For aqueous standard solution, the integrated absorbance values were stable up to 1500 °C. For the sample, the pyrolysis curve exhibits a plateau between 300 °C and 1300 °C, and at higher pyrolysis temperatures, the integrated absorbance decreases, indicating the loss of Cu. At a pyrolysis temperature of 1300 °C, the signals were symmetrical and without background absorption, indicating a total matrix removal. Thus, 1300 °C was considered the optimum pyrolysis temperature and it was employed in all further experiments for Cu determination.

For Mn, using an atomization temperature of 2100 °C, recommended by the instrument manufacturer, pyrolysis temperatures in the range of 300–1700 °C were investigated. Like in the case of Cu, the integrated absorbance signal for the aqueous standard solution was thermally stable up to 1500 °C, and for the sample, it indicated the loss of Mn for pyrolysis temperatures higher than 1300 °C. Due to its thermal stability and absence of background absorption, the optimal pyrolysis temperature chosen and employed in all further experiments for Mn determination was 1300 °C.

Atomization temperatures were evaluated between 1700 °C and 2300 °C for Cu and Mn in an aqueous standard solution and a rice-based infant formula. For Cu, a plateau is reached between 2100 °C and 2300 °C for the standard solution and between 2000 °C and 2300 °C for the sample. In the case of Mn, the integrated absorbance values showed a plateau between 1900 °C and 2300 °C for both the aqueous standard solution and sample. Atomization temperatures of 2100 °C for Mn and 2300 °C for Cu have been chosen, based on the well-defined

absorbance signals obtained for the two analytes under these conditions as shown in Fig. 4.

### 3.3 Figures of merit and analytical results

The figures of merit for the determination of Cu and Mn using HR-CS SS-GF AAS are presented in Table 2. The calibration curves were established using a blank and aqueous standard solutions in the concentration range of 8–120  $\mu\text{g L}^{-1}$  Cu (0.08–1.2 ng Cu) for measurements at 324.754 nm, and 7.5–150  $\mu\text{g L}^{-1}$  Mn (0.075–1.5 ng Mn) at 403.076 nm. The linear regression equation and the corresponding correlation coefficient are shown in Table 2.

The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using three and ten times, respectively, the standard deviation of 10 measurements of a blank divided by the slope of the calibration curve. The blank measurements were carried out according to the “zero mass response” technique,<sup>30</sup> introducing repeatedly an empty solid sampling platform, followed by a regular atomization cycle. The relative LOD and LOQ were calculated for normalized sample masses of 0.1 mg and 0.05 mg for Cu and Mn, respectively. The characteristic mass ( $m_0$ ) is defined as the analyte mass corresponding to an integrated absorbance of 0.0044.

According to Table 2, the LODs obtained for Cu (0.003  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and Mn (0.01  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) are typically somewhat better than those found in the literature by line source GF AAS and HR-CS GF AAS using direct SS analysis. Such studies reported LOD values in the range of 0.006  $\mu\text{g g}^{-1}$  to 2.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Cu<sup>23–25</sup> and 0.012 to 0.015  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Mn, respectively.<sup>23,26,31,32</sup> However, these LODs are not really comparable, as, in this work, only the CP was used for Cu with HR-CS GF AAS, and a less sensitive line was used for Mn. The parameters for Cu and Mn could be

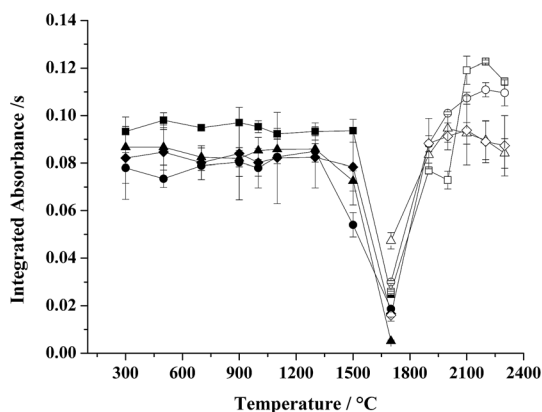


Fig. 2 Pyrolysis (full symbols) and atomization curves (open symbols) for copper; atomization temperature for pyrolysis curves:  $T_a = 2300$  °C; in 0.15 ng Cu in 10  $\mu\text{L}$  of 0.014 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (■) without the chemical modifier and (●) with the chemical modifier; in infant formula, integrated absorbance normalized for 0.1 mg of sample, (▲) without the chemical modifier and (◆) with the chemical modifier. Pyrolysis temperature for atomization curves:  $T_p = 1300$  °C; in 0.15 ng Cu in 10  $\mu\text{L}$  of 0.014 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (□) without the chemical modifier and (○) with the chemical modifier; in infant formula, integrated absorbance normalized for 0.1 mg of sample, (Δ) without the chemical modifier and (◇) with the chemical modifier.

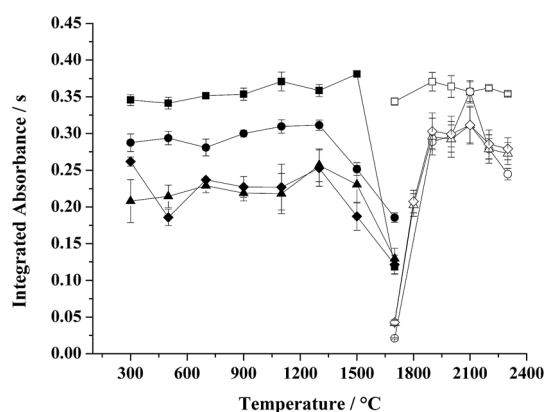


Fig. 3 Pyrolysis (full symbols) and atomization curves (open symbols) for manganese; atomization temperature for pyrolysis curves:  $T_a = 2100$  °C; in 0.6 ng Mn in 10  $\mu\text{L}$  of 0.014 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (■) without the chemical modifier and (●) with the chemical modifier; in infant formula, integrated absorbance normalized for 0.05 mg of sample, (▲) without the chemical modifier and (◆) with the chemical modifier. Pyrolysis temperature for atomization curves:  $T_p = 1300$  °C; in 0.6 ng Mn in 10  $\mu\text{L}$  of 0.014 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (□) without the chemical modifier and (○) with the chemical modifier; in infant formula, integrated absorbance normalized for 0.05 mg of sample, (Δ) without chemical modifier and (◇) with the chemical modifier.

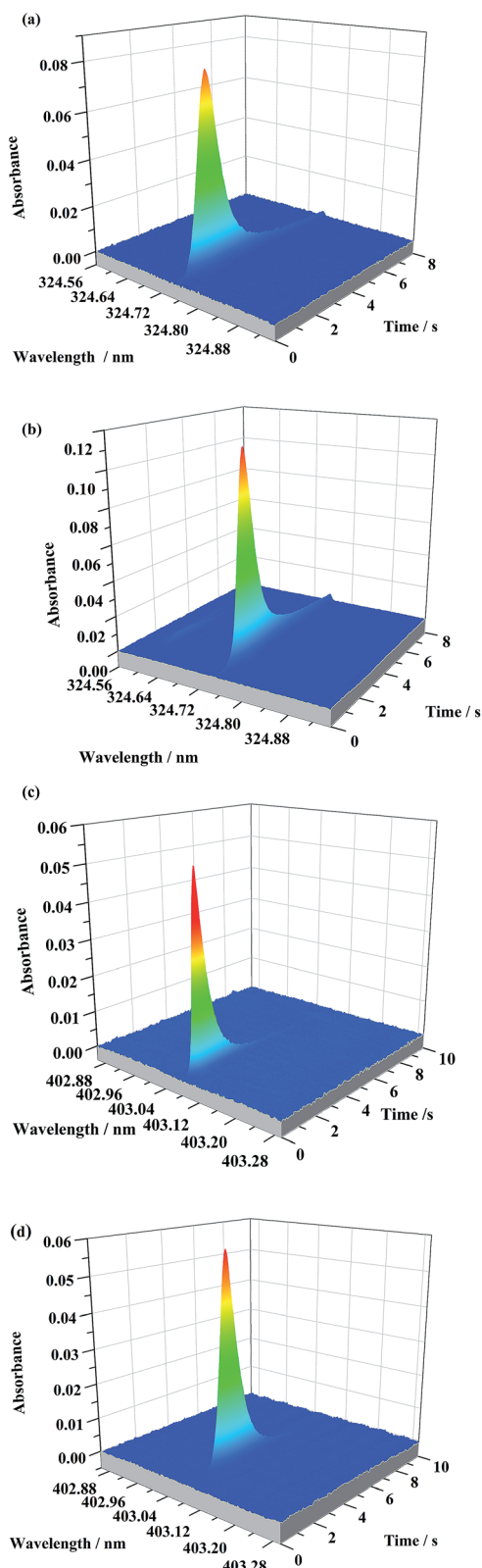


Fig. 4 Time-resolved absorbance spectra of Cu using  $T_p = 1300\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_a = 2300\text{ }^\circ\text{C}$  in: (a) 0.15 ng in 10  $\mu\text{L}$  of aqueous standard solution,  $A_{\text{int}} = 0.0989\text{ s}$  and (b) 0.253 mg of infant formula,  $A_{\text{int}} = 0.1877\text{ s}$ ; and for Mn using  $T_p = 1300\text{ }^\circ\text{C}$  and  $T_a = 2100\text{ }^\circ\text{C}$  in (c) 0.3 ng in 10  $\mu\text{L}$  of aqueous standard solution,  $A_{\text{int}} = 0.19303\text{ s}$  and (d) 0.037 mg of infant formula,  $A_{\text{int}} = 0.2591\text{ s}$ .

Table 2 Figures of merit for determination of Cu and Mn in infant formulas by HR-CS SS-GF AAS, using aqueous standard solutions for calibration

Parameters	Cu $\lambda = 324.754\text{ nm}$ (CP)	Mn $\lambda = 403.076\text{ nm}$ (CP $\pm 1$ )
LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	0.003	0.01
LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	0.01	0.04
$m_o$ (pg)	8.0	8.0
Linear regression equation	$A_{\text{int}} = 0.0135 + 0.4929\text{ m (ng)}$	$A_{\text{int}} = 0.0022 + 0.4825\text{ m (ng)}$
Correlation coefficient	0.9996	0.9992
Calibration range (ng)	0.08–1.2	0.075–1.5
Precision (%) <sup>b</sup>	4–11	2–10

<sup>a</sup> LOD and LOQ calculated to be 3 mg and 1 mg of sample for Cu and Mn, respectively. <sup>b</sup> Relative standard deviation for 5 replicate measurements of sample.

improved by using 3 pixels and a more sensitive analytical line, respectively.

Two papers were found in the literature reporting Cu and Mn determination using HR-CS GF AAS under similar conditions employed in the present work. Lepri *et al.*<sup>29</sup> determined Cu and Mn and other elements in activated charcoal and carbon black using direct SS analysis. The authors used the analytical lines at 324.754 nm for Cu and 403.076 nm for Mn, and three pixels for both elements. It was unnecessary to use any chemical modifier and the LODs of 0.006 ng for Cu and Mn (calculated from data provided by authors) are close to the values obtained in the present work, 0.01 ng for both elements. Krawczyk *et al.*<sup>32</sup> applied HR-CS GF AAS to determine Cu and Mn and other elements in multivitamin dietary supplements by slurry sampling using the most sensitive analytical lines 324.754 nm and 279.482 nm for Cu and Mn, respectively, and a mixture of Pd + Mg as the chemical modifier. The LODs obtained in the present work are better than those obtained by Krawczyk, 0.17 ng for Cu and 0.07 ng for Mn. It must be emphasized that the determination of these elements in infant formula using direct SS analysis was not found in the literature. Considering food matrices, only three papers were found reporting Cu and Mn determination using GF AAS and HR-CS GF AAS, one of them for baby food<sup>23</sup> and the other for green coffee<sup>26</sup> and multivitamin.<sup>32</sup>

The trueness of our methods was evaluated by the analysis of a certified reference material of rice flour (NIST SRM 1568a). The found values are in agreement with the certified ones, based on a Student's *t* test at 95% confidence level ( $t_{\text{critical}} = 2.78$ ;  $t_{\text{calculated}} = 1.09$ ) for Cu and ( $t_{\text{critical}} = 2.78$ ;  $t_{\text{calculated}} = 1.59$ ) for Mn, as shown in Table 3.

Table 3 Results obtained for the determination of Cu and Mn in certified reference material NIST SRM 1568a rice flour by HR-CS SS-GF AAS,  $n = 5$

CRM	Cu/ $\mu\text{g g}^{-1}$		Mn/ $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Certified	Found	Certified	Found
Rice flour 1568a	2.4 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	20.0 $\pm$ 1.6	21.3 $\pm$ 1.8

**Table 4** Values declared on the labels and results obtained for Cu and Mn in infant formula using HR-CS SS-GF AAS,  $n = 5^a$

Sample	Concentration/ $\mu\text{g g}^{-1}$			
	Found Cu	Label Cu	Found Mn	Label Mn
Bovine milk #1	1.3 $\pm$ 0.0	3.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.5
Bovine milk #2	2.4 $\pm$ 0.2	3.9	0.9 $\pm$ 0.1	0.6
Soybean #1	6.8 $\pm$ 0.3	4.6	4.4 $\pm$ 0.3	3.0
Soybean #2	4.7 $\pm$ 0.4	N.d.	4.0 $\pm$ 0.3	N.d.
Rice	1.8 $\pm$ 0.1	N.d.	12.3 $\pm$ 1.7	N.d.
Rice and oats	2.4 $\pm$ 0.2	N.d.	17.2 $\pm$ 2.3	N.d.

<sup>a</sup> N.d. = not declared.

**Table 5** The content of Cu and Mn in the investigated samples calculated per 100 kcal

Sample	Analyte mass/ $\mu\text{g (100 kcal)}^{-1}$	
	Cu	Mn
Bovine milk #1	25.6	13.8
Bovine milk #2	46.2	17.3
Soybean #1	140.8	91.1
Soybean #2	98.6	83.9
Rice	48.5	331.2
Rice and oats	63.8	457.2

Six infant formulas of different brands and raw materials were analyzed using HR-CS SS-GF AAS for the determination of Cu and Mn, and the results are shown in Table 4. The concentrations ranged between 1.3 and 6.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Cu and 0.7 and 17.2  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Mn, and the results were compared with those labeled on the commercial infant formulas. It is worth mentioning also that only half of the analyzed samples contain information about these minerals on their labels. For Cu, two samples presented lower concentrations and one of them presented a higher concentration than that stated on their corresponding labels. For Mn, all of them presented higher concentrations than those described on the infant formula labels.

The concentrations of Cu and Mn were also compared with Brazilian legislation, which sets the minimum parameters of minerals by energy values. Considering 100 kcal, each formulation should have at least 60  $\mu\text{g Cu}$  and 5  $\mu\text{g Mn}$ .<sup>9</sup> Therefore, based on the found concentrations and the label information of each infant formula, the content of analytes was calculated and is shown in Table 5 for 100 kcal. From all analyzed infant formulas, three of them presented concentration levels of Cu below the minimum value established by Brazilian legislation, while for Mn, all of them presented concentration levels within the Brazilian legislation, in part significantly above the recommended minimum value; however, the maximum limits allowed for the concentrations of Cu and Mn in infant formulas are not established by the Brazilian legislation.

## 4. Conclusion

The developed methods for the determination of Cu and Mn in infant formula by HR-CS GF AAS using direct solid sample analysis proved to be accurate, simple, sensitive and precise using calibration with aqueous standards and no need to use a chemical modifier, being appropriate for routine applications. The direct solid sampling technique is not only advantageous because of its simplicity but also because it allows a reduced sample handling and risk of contamination due to reagents and/or analyte loss.

The same procedure might well be used with minor modification for the determination of a variety of other elements in similar matrices with similar results.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for their financial support. E. G. B has a research scholarship from CAPES (Process no. 23038007479201144). R. R. G., A. T. D., M. M. S. B. W. and M. G. R. V. have research scholarships from CNPq (Process no. 190082/2014-3, 161819/2015-0, 308775/2013-9, 305085/2011-5 and 305679/2015-5, respectively).

## References

- 1 T. G. Kazi, N. Jalbani, J. A. Baig, M. B. Arain, H. I. Afridi, M. K. Jamali, A. Q. Shah and A. N. Memon, *Food Chem.*, 2010, **119**, 1313–1317.
- 2 K. Ljung, M. Grander and M. Vahter, *Food Chem.*, 2011, **127**, 943–951.
- 3 N. Zand, B. Z. Chowdhry, F. B. Zotor, D. S. Wray, P. Amuna and S. Pullen, *Food Chem.*, 2011, **128**, 123–128.
- 4 T. G. Kazi, N. Jalbani, J. A. Baig, H. I. Afridi, G. A. Kandhro, M. B. Arain, M. K. Jamali and A. Q. Shah, *Food Chem. Toxicol.*, 2009, **47**, 1425–1429.
- 5 C. S. Larrañaga and I. N. Blasco, *Food Chem.*, 2009, **115**, 1048–1055.
- 6 M. Pandelova, W. L. Lopez, B. Michalke and K. W. Schramm, *J. Food Compos. Anal.*, 2012, **27**, 120–127.
- 7 B. Welz and M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd edn, 1999.
- 8 J. E. Ericson, F. M. Crinella, A. C. Stewart, V. D. Allhusen, T. Chan and R. T. Robertson, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2007, **29**, 181–187.
- 9 Regulamento Técnico referente as Fórmulas Infantis para Lactentes e as Formulas Infantis de Seguimento, Portaria no 977 de 05 de Dezembro de 1998, [http://www.nutricaoemfoco.com.br/NetManager/documentos/portaria no 977](http://www.nutricaoemfoco.com.br/NetManager/documentos/portaria%20no%20977), accessed August 2016.
- 10 S. Saracoglu, K. O. Saygi, O. D. Uluozlu, M. Tuzen and M. Soylak, *Food Chem.*, 2007, **105**, 280–285.
- 11 A. Ikem, A. Nwankwoalab, S. Oduyungboa, K. Nyavora and N. Egiebora, *Food Chem.*, 2002, **77**, 439–447.

- 12 A. Mir-Marques, A. G. Maso, M. L. Cervera and M. de la Guardia, *Food Chem.*, 2015, **172**, 238–244.
- 13 S. M. Azcarate, R. Gil, P. Smichowski, M. Savio and J. M. Camiña, *Microchem. J.*, 2017, **130**, 1–6.
- 14 B. Welz, M. G. R. Vale, S. Florek, O. Michael, M. Huang and H. Becker-Ross, *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry, Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- 15 B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann and M. G. R. Vale, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, **14**, 220–229.
- 16 B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek and U. Heitmann, *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- 17 B. Welz, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, M. G. R. Vale and U. Heitmann, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 873–883.
- 18 M. Resano and E. Garcia-Ruiz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 323–330.
- 19 B. Welz, M. G. R. Vale, D. L. G. Borges and U. Heitmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 2085–2095.
- 20 M. Resano, M. Aramendía and M. A. Belarra, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 2229–2250.
- 21 M. G. R. Vale, N. Oleszczuk and W. N. L. dos Santos, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2006, **41**, 377–400.
- 22 A. S. Silva, G. C. Brandao, G. D. Matos and S. L. C. Ferreira, *Talanta*, 2015, **144**, 39–43.
- 23 P. Vinas, M. Pardo-Martinez and M. Hernandez-Cordoba, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 5789–5794.
- 24 U. Heitmann, B. Welz, D. L. G. Borges and F. G. Lepri, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 1222–1230.
- 25 S. d. O. Souza, L. L. François, A. R. Borges, M. G. R. Vale and R. G. O. Araujo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2015, **114**, 58–64.
- 26 N. Oleszczuk, J. T. Castro, M. M. Silva, M. G. A. Korn, B. Welz and M. G. R. Vale, *Talanta*, 2007, **73**, 862–869.
- 27 M. Tüzen, *Food Chem.*, 2003, **80**, 119–123.
- 28 Z. Ajtony, N. Szoboszlai, E. K. Susko, P. Mezei, K. Gyorgy and L. Bencs, *Talanta*, 2008, **76**, 627–634.
- 29 F. G. Lepri, D. L. G. Borges, R. G. O. Araujo, B. Welz, F. Wendler, M. Krieg and H. Becker-Ross, *Talanta*, 2010, **81**, 980–987.
- 30 U. Kurfürst, in *Solid Sample Analysis*, ed. U. Kurfürst, Springer, Berlin, 1998, p. 115.
- 31 C. E. R. de Paula, G. F. B. Cruz, C. M. S. P. Rezende and R. J. Cassella, *Microchem. J.*, 2016, **127**, 1–6.
- 32 M. Krawczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **88**, 377–384.

## 6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

### 6.1 Discussão geral

O trabalho consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos para avaliar a presença de minerais (Cu e Mn) e elementos potencialmente tóxicos (As, Cu, Cd, Mn, Pb, e Tl) em amostras de fórmulas infantis. Tendo em conta que alguns elementos podem ser considerados potencialmente tóxicos mesmo em baixas concentrações, é importante a determinação destes elementos em fórmulas infantis para garantir o desenvolvimento normal dos lactentes.

Para a determinação destes elementos foi utilizada a técnica de HR-CS GF AAS por análise direta de sólidos. Todas as amostras apresentaram valores de concentração de As, Cd, Pb e Tl inferiores ao LOD.

O artigo publicado teve como título: Development of analytical methods for the determination of copper and manganese in infant formula by HR-CS GF AAS and direct solid sample analysis. Para a otimização dos métodos foram construídas curvas de massa, pirólise e atomização. Além disso, foi avaliada a necessidade do uso de modificador químico devido à instabilidade térmica dos analitos, isto é, foram construídas curvas de pirólise e atomização com e sem adição de modificador químico Pd + Mg. Considerando que o modificador químico não influenciou no comportamento térmico dos analitos, o mesmo não foi mais usado nos experimentos.

Foram estabelecidos os parâmetros de mérito usando curvas de calibração com padrões aquosos. A verificação da exatidão dos métodos desenvolvidos foi realizada usando um CRM (rice flour). Os valores obtidos foram estatisticamente concordantes com os certificados, baseados em test t a um nível de 95% de confiança ( $t_{crítico}=2.78$ ;  $t_{calculado}=1.09$ ) e para Cu ( $t_{crítico} = 2.78$ ;  $t_{calculado} 1.59$ ).

Os métodos desenvolvidos foram aplicados para a determinação de analitos em seis amostras de fórmulas infantis, todas em pó com diferentes composições: a base de arroz, leite de vaca, soja e, arroz e aveia. As concentrações obtidas foram comparadas com as descritas no rótulo das amostras, e apenas três delas apresentam informação de concentração de Cu e Mn nos rótulos. Para Cu duas amostras apresentaram valores de concentração inferior do que está descrito nos rótulos e uma delas apresenta maior concentração comparativamente com o descrito no rótulo. Para Mn todas amostras



apresentam valores de concentração acima do que está descrito nos rótulos das fórmulas infantis.

## 6.2 Conclusões

A aplicação da técnica de HR-CS GF AAS por análise direta de sólidos demonstrou ser eficiente pois, permitiu o desenvolvimento de dois métodos analíticos para determinação de Cu e Mn em amostras de fórmulas infantis de forma simples, rápido e preciso, podendo ser aplicados em análise de rotina com um mínimo preparo de amostras e sem necessidade do uso de modificador químico.

A quantificação dos analitos foi realizada com o uso de padrões aquosos para calibração. Os elementos As, Pb, Cd e Tl, apresentaram valores de concentração inferiores ao LOD. Os resultados das concentrações de Cu e Mn foram comparados com os valores nos rótulos das amostras quando os mesmos estavam descritos. As amostras de fórmulas infantis a base de arroz e soja são as que apresentam maior concentração destes elementos comparativamente aos valores dos rótulos.

As concentrações das amostras foram comparadas com a legislação Brasileira (ANVISA) em vigor no país, sendo que para o Cu três amostras apresentaram concentrações abaixo dos parâmetros mínimos estabelecidos pela legislação brasileira. Para o Mn os valores encontrados estão dentro dos parâmetros mínimos da legislação brasileira, contudo, significativamente acima dos parâmetros mínimos recomendados.

No presente estudo, não foi utilizado um número suficiente de amostras que possam ser consideradas representativas para avaliar a extensão de amostras que apresentam maior ou menor concentração de Cu e Mn em fórmulas infantis em função da legislação em vigor no país. Neste sentido, sugere-se para os trabalhos futuros a aplicação dos métodos desenvolvidos para determinação destes elementos com uma maior quantidade de amostras.

## Referências

- ABRANTES, V.R.S.; TABAI, K.C. infant formula: the advertising on infant formula labels and its adequacy to the current legislation. **Revista Brasileira de Economia de Viçosa**, v. 24, p. 021-037, 2013.
- AMORIM, S. T. P. Alimentação infantil e o marketing da indústria de alimentos. Brasil, 1960 – 1988. **História: Questões & Debates**, v. 42, p. 95-111, 2005.
- ANDRADE, M.T.S. et al. Determination of lead concentration in breast milk and blood of lactating women in an interior city of Brazil. **International Journal of Nutrology**, v. 6, p. 95-100, 2013.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 977 de 05 de dezembro de 1998. Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para Lactentes e às fórmulas infantis de seguimento. Disponível em: <  
[http://www.nutricaoemfoco.com.br/NetManager/documentos/portaria\\_no\\_977,\\_de\\_5\\_d\\_e\\_dezembro\\_de\\_1998.pdf](http://www.nutricaoemfoco.com.br/NetManager/documentos/portaria_no_977,_de_5_d_e_dezembro_de_1998.pdf). Acesso em: 15 dez. 2016.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 43, de 19 de setembro de 2011a. Regulamento técnico sobre para fórmulas infantis para lactentes. Disponível em:<  
<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk4MQ%2C%2C>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011b. Regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: <  
<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk4MA%2C%2C>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011c. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. Disponível em:  
<<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk4Mg%2C%2C>. Acesso: 02 mai. 2017.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 42, de 19 de setembro de 2011d. Regulamento técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância. Disponível em:<  
<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk3OQ%2C%2C>. Acesso em: 02 mai. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 46, de 19 de setembro de 2011 e. Regulamento sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. Disponível em: <

<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk4Mg%2C%2C>. Acesso em: 02 mai. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta Pública nº 209, de 20 de junho de 2016. Proposta de limites máximos tolerados (LMT) de contaminante arsênio inorgânico, cádmio total, chumbo total e estanho inorgânico em alimentos infantis.

Disponível em:<

<https://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2862128/%281%29CP+209-2016+-+Proposta+de+norma+em+discuss%C3%A3o.pdf/fbb4af9d-c374-4595-8d6e-097c11d870e1>. Acesso em: 02 mai. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. "Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em:<

<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjIxNQ%2C%2C>. Acesso em: 02 mai. 2017

ARAUJO, R.G.O. et al. Comparison of direct solid sampling and slurry sampling for the determination of cadmium in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 77, p. 400–406, 2008.

BORGES, D.L.G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58-67, 2005.

BORGES, A.R. **Determinação de metais em fertilizantes e calcário utilizando análise direta por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2013.

BORTOLIN, G.A. et al. Early cow's milk consumption among Brazilian children: results of a national survey. **Jornal de Pediatria**, v. 89 (6): p. 608–613, 2013.

BOSI, M. L.M.; MACHADO, M.T. Amamentação-um resgate histórico. **Cadernos esp - escola de saúde pública do ceará** - v. 1, 2005.

BROWN, K.H. et al. Infant feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Peru). **Pediatrics**, v. 83, p. 31-40, 1989.

CASCADE publishable final activity report. Chemicals as contaminants in the food Chain: an NOE for research, risk assessment and education. Department of biosciences at novum Institute of environmental health and department of woman and child health, Stockholm, Sverige. Disponível em: <

[https://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/f\\_f\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/f_f_en.pdf). Acesso em: 10 jan. 2017.

CHATER, M.M.F. **Rotulagem de produtos destinados a lactentes e crianças da primeira infância**. Monografia de especialização, Universidade de Brasília, 2009.

Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods, 2005. Disponível em: <  
[http://liberterre.fr/liberterres/codex/z-pdf-codex/al28\\_26e.pdf](http://liberterre.fr/liberterres/codex/z-pdf-codex/al28_26e.pdf). Acesso em: 6 mar. 2017.

Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods, 2011. Disponível em:  
<[ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06\\_INFe.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06_INFe.pdf). Acessado em: mar. 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química e análise de alimentos de Fennema**, 4 ed. Porto Alegre: artmed, 2010.

de ANDRADE, C.K. et al. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166–173, 2014.

Department of Health and Human Services. The surgeon general's call to action to support breastfeeding, 2011. Disponível em: <  
<https://www.surgeongeneral.gov/library/calls/breastfeeding/calltoactiontosupportbreastfeeding.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

DESSUY, M.B. **Desenvolvimento de estratégias analíticas usando espectrometria de absorção atômica para avaliar a composição de copos de liga peltre e lixiviação de de cádmio, chumbo e antimônio**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2011.

Dietary Reference Intakes (DRI). The essential guide to nutrients requirement. Disponível em:<  
[https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic\\_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf](https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf). Acesso em: 02 mai. 2017.

dos SANTOS, L.M.G. et al. Becker-Ross, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 577–583, 2009.

dos SANTOS, L.O. et al. Direct and simultaneous determination of copper and iron in flours by solid sample analysis and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Analytical Methods**, DOI 10.1007/s12161-016-0600-9, 2016.

ERICSON, J.E. et al. Prenatal manganese levels linked to childhood behavioral disinhibition. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 29, p. 181-187, 2007.

European Food Safety Authority (EFSA). Metals as contaminants in foods. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food>. Acesso em: 13 mar. 2017.

European Food Safety Authority (EFSA). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals, february 2006. Disponível em: <[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa\\_rep/blobserver\\_assets/ndatolerableuil.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf). Acesso em: 13 mar. 2017.

European Food Safety Authority (EFSA). Cadmium dietary exposure in the European population. Disponível em:<<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2551>. Acesso em: 02 mai. 2017.

FERREIRA, S.L.C. et al. Slurry sampling—an analytical strategy for the determination of metals and metalloids by spectroanalytical techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, p. 44–62, 2010.

FERNANDES, L.H.; MAINIER, F. B. Os riscos da exposição ocupacional ao cádmio. **Revista Eletrônica Sistemas e Gestão**, v. 9, p. 194-199, 2014.

GARCÍA-RICO, L.; LEYVA-PEREZ, J.; JAR A-MARINI, M. E. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1599–1605, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; NAVARRO-BLASCO, I. Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. **Food Control**, v. 26, p. 6–14, 2012.

IKEM, A. et al. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. **Food Chemistry**, v. 77, p. 439–447, 2002.

KAPAJ, S. et al. Human health effects from chronic arsenic poisoning— a review. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 41, p. 2399–2428, 2006.

KAZI, T.G. et al. Determination of toxic elements in infant formulae by using electrothermal atomic absorption spectrometer. **Food Chemistry Toxicology**, v. 47, p. 1425–1429, 2009.

KAZI, T.G. et al. Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1313–1317, 2010.

KHAN, N. et al. Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3566–3570, 2013.

KOREŇOVSKÁ, M. Determination of arsenic, antimony, and selenium by FI-HG-AAS in foods consumed in Slovakia. **Food Nutrition Research**, v. 45, p. 84-88, 2006.

KORN, M.G.A. et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67-92, 2008.

KRUG, F.J.; ROCHA, F.R.P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, ed. Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, 2016.

KURFÜRST, U. **Solid Sample Analysis: Direct and slurry sampling using GF AAS and EVT-ICP**, ed. Ulrich. Kurfürst, Springer, Berlin, 1998.

LJUNG, K. et al. High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods. A matter of concern. **Food Chemistry**, v. 127, p. 943–951, 2011.

MEHARG, A.A. et al. **Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. Environmental Pollution**, v. 152, p. 746–749, 2008.

MIR-MARQUÉS, A. et al. Mineral profile of Spanish commercial baby food. **Food Chemistry**, v. 172, p. 238–244, 2015.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, 19–29, 2004.

Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e Crianças da Primeira Infância (NBCAL), 2002. Promoção comercial dos produtos abrangidos pela NBCAL. Disponível em: <  
[http://www.anvisa.gov.br/propaganda/cartilha\\_nbcalf.pdf](http://www.anvisa.gov.br/propaganda/cartilha_nbcalf.pdf). Acesso em: 13 dez. 2016.

OLESZCZUK, N. et al. Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 73, p. 862–869. 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Estratégia global para a alimentação de lactentes e crianças de primeira infância. Edição especialmente produzida pela IBFAN Brasil, para o I encontro nacional sobre segurança alimentar na primeira infância, setembro, 2005. Disponível em: <  
<http://www.ibfan.org.br/cursos/eventos/RELATORIOENSAPI.pdf>. Acesso em: 15 dez. de 2016.

OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. **Journal of Clinical Toxicology**, doi:10.4172/2161-0495.S3-001, 2011.

PANDELOVA, M. et al. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. **Journal of Food**, v. 27, p. 120–127, 2012.

PASIAS, I. N.; THOMAIDIS, N. S.; PIPERAKI, E. A. Determination of total arsenic and inorganic species in rice and rice flour by electromthermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 1-6, 2013.

PETER, A.L.J.; VIRARAGHAVAN, T. Thallium: a review of public health and environmental concerns. **Environment International**, v. 31, p. 493-501, 2005.

POZZATTI, M. et al. Determination of Cadmium, chromium and copper in vegetables of the solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Analytical Methods**, v. 9, p. 329-337, 2017.

Regulamento Técnico da MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/RDC%2Bn%C2%BA%2B42\\_2013\\_final.pdf/eec629cf-8d17-422b-a362-366b275c1a00?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/RDC%2Bn%C2%BA%2B42_2013_final.pdf/eec629cf-8d17-422b-a362-366b275c1a00?version=1.0)>. Acesso em: 16 mar. 2017.

SARACOGLU, S. et al. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 280–285, 2007.

SHRIVAS, K.; PATEL, D. K. Separation and preconcentration of trace level of lead in one drop of blood sample by using grafite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 414-417, 2010.

SILVA, A.S. et al. Direct determination of chromium in infant formulas employing high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and solid sample analysis. **Talanta**, v. 144, p. 39–43, 2015.

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de química analítica**, 8ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2008.

Sociedade Brasileira de Pediatria. Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. Departamento de Nutrologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2012.

SOUAD, C. et al. Trace element level in infant hair and diet, and in the local environment of the Moroccan city of Marrakech. **Science of the Total Environment**, v. 370, p. 337–342, 2006.

Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN). Report of the Scientific Committee regarding criteria for the estimation of concentrations for the discussion of proposals for migration limits of certain heavy metals and other elements from ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs. Disponível em: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_cc\\_ingles/FOOD\\_CONTACT\\_MATERIALS\\_.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_cc_ingles/FOOD_CONTACT_MATERIALS_.pdf). Acesso em: 02 mai. 2017.

SHRIVAS, K.; PATEL, D. K. Separation and preconcentration of trace level of lead in one drop of blood sample by using grafite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 414-417, 2010.

Sociedade Brasileira de Pediatria. Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. Departamento de Nutrologia. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2012.

Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN). Report of the Scientific Committee regarding criteria for the estimation of concentrations for the discussion of proposals for migration limits of certain heavy metals and other elements from ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs. Disponível em: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_cc\\_ingles/FOOD\\_CONTACT\\_MATERIALS\\_.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_cc_ingles/FOOD_CONTACT_MATERIALS_.pdf). Acesso em: 02 mai. 2017.

TOKMAN, N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 87-94, 2007.

VASCONCELOS, A. C. **Alimentos para lactentes e crianças de primeira infância: Uma avaliação da rotulagem e do conteúdo da vitamina A e ferro**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2012.

VIÑAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 121–130, 2000.

TATSI, K.; TURNER, A. Distributions and concentrations of thallium surface waters of a region impacted by historical metal mining (Cornwall, UK). **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 139-146, 2014.

WADHWA, S.K. et al. Polyhydroxybutyrate-B-polyethyleneglycol block copolymer for the solid phase extraction of lead and copper in water, baby foods, tea and coffee samples. **Food Chemistry**, v. 152, p. 75-80, 2014.



WELZ, B.; SPERLING M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3 ed., Wiley-VCH, Weinheim, New York, 1999.

WELZ, B. et al. **High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry**, Wiley-VCH, Weinheim, New York, 2005.

WELZ, B. et al. High-resolution continuum source Atomic absorption spectrometry – An analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta B**; v. 62, p. 873-883, 2007.

WELZ, B. et al. **High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry – Theory and Applications In: Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd, 2010.

WELZ, B. et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, Present and Future Aspects – A critical Review. **Journal Brazilian chemical society**, v. 25, p. 799-821, 2014.

World Health Organization (WHO). Baby food trends in Brazil and Norway, 2015. Disponível em: <  
[http://www.who.int/nutrition/topics/CF\\_babyfood\\_trends\\_brazilandnorway\\_euromonitor.pdf](http://www.who.int/nutrition/topics/CF_babyfood_trends_brazilandnorway_euromonitor.pdf). Acesso em: 5 dez. 2016.

World Health Organization (WHO). The optimal duration of exclusive breastfeeding - A systematic review, Geneva, 2002. Disponível em: <  
[http://www.who.int/nutrition/publications/optimal\\_duration\\_of\\_exc\\_bfeeding\\_review\\_eng.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/optimal_duration_of_exc_bfeeding_review_eng.pdf). Acesso em: 15 jan. 2017.

World Health Organization (WHO). Prepared by the Seventy-third meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives and contaminants, Geneva, 2011. Disponível em:<  
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v64je01.pdf>. Acesso em: 02 mai. 2017.

ZAND, N. et al. Essential and trace elements content of commercial infant foods in the UK. **Food Chemistry**, v. 128, p. 123–128, 2011.