



FURG

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA
COMBINADA COM HR-CS FAAS PARA A DETERMINAÇÃO
DE COBRE EM ALIMENTOS LÁCTEOS INFANTIS**

Lisliane Kickofel

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2024

AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA COMBINADA COM HR-CS FAAS PARA A DETERMINAÇÃO DE COBRE EM ALIMENTOS LÁCTEOS INFANTIS

por

LISLIANE KICKOFEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2024

Ficha Catalográfica

K46a Kickofel, Lisliane.
Avaliação da dispersão da matriz em fase sólida combinada com HR-CS FAAS para a determinação de cobre em alimentos lácteos infantis / Lisliane Kickofel. – 2024.
71 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande/RS, 2024.
Orientador: Dr. Bruno Meira Soares.

1. Alimentos lácteos infantis 2. MSPD 3. HR-CS FAAS 4. Cobre
5. Preparo de Amostra I. Soares, Bruno Meira II. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e
Ambiental

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DA DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE
SÓLIDA COMBINADA COM HR-CS FAAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE COBRE EM ALIMENTOS LÁCTEOS
INFANTIS

Elaborada por

Lisliane Kickofel

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica
e Ambiental

Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente



BRUNO MEIRA SOARES

Data: 06/03/2024 10:21:15-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG)
(Presidente-Orientador)

Documento assinado digitalmente



PAOLA DE AZEVEDO MELLO

Data: 06/03/2024 14:17:22-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Paola de Azevedo Mello (UFSM)

Documento assinado digitalmente



ELIEZER QUADRO ORESTE

Data: 06/03/2024 20:26:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eliézer Quadro Oreste (FURG)

Rio Grande, 05 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela oportunidade de aprendizado durante o período. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho com a bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental (PPGQTA) e aos órgãos de fomento, pela oportunidade de executar o trabalho pelo período.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Meira Soares pela oportunidade, confiança em me orientar, acreditar no desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos, pelas contribuições tirando dúvidas e orientando, pelo compartilhamento do seu conhecimento, além da paciência, pois sabemos que não é fácil se dedicar a tudo ao mesmo tempo.

Ao Douglas Rezende pelo incentivo, novamente, em fazer o Mestrado, por ser parceiro nas horas boas e ruins. Por me ajudar a não desistir quando se tem vontade e lembrar porque estou aqui e de onde quero chegar e me incentivar sempre à docência e à pesquisa.

À Amanda Duarte Pimentel pela amizade, conversas diárias quando não estava dando certo e dizer que Mestrado é curto, mas que tudo dá certo, e que passou por este período e sabe o quanto nos estressamos, mas que sabemos onde queremos chegar.

À Bibiana Vieira, quero te agradecer pela amizade, pelo companheirismo, carinho e por aturar cada surto durante o período do mestrado, por cada palavra dita me dizendo para não desistir, até mesmo brigando comigo por muitas vezes não acreditar em mim, na minha capacidade e me mostrar que tenho e muita.

A Msc^a. Maiara Helena de Melo Malinowski, Paloma Konzgen, Msc^a Ana Claudia Beduhn Luckow, Enilin de Mendonça de Azevedo e Kaiane Quevedo Ribeiro que fazem parte do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Espectrometria (GEPAE), pela amizade, por toda ajuda oferecida durante a execução do trabalho, por me dizer para fazer cada etapa com calma, pois na pressa erramos, por tirar as dúvidas mais simples, pela paciência e dedicação e pela contribuição de todas.

Ao Dr. Jean Lucas de Oliveira Arias e ao Dr. João dos Santos Espinelli Junior pela ajuda sem medir esforços na utilização da técnica de HR-CS GF AAS e HR-CS FAAS, me ensinando com dedicação e paciência para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Ednei Gilberto Primel e Dr^a. Sergiane Caldas Barbosa por me receberem no laboratório Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), pela disposição em ajudar no desenvolvimento deste trabalho, pelas dicas e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Diego da Costa Cabreira, Dr. Jean Lucas de Oliveira Arias (novamente) e à Dr^a Roseane D' Avila por me receberem no Centro Integrado de Análises (CIA) e estarem a disposição sempre contribuindo com os conhecimentos e compartilhando experiências de diferentes áreas.

Ao professor Dr. Carlos Francisco Ferreira de Andrade, à Msc^a. Alessandra Costa e à Dr^a Renata Rodrigues de Moura pela oportunidade de conhecer o Laboratório de Hidroquímica e por compartilharem seus conhecimentos, me ensinando com dedicação nas etapas de preparo de amostra e pela parceria.

À professora Dr^a. Anelise Christ Ribeiro e Rejane Martins pela oportunidade de conhecer o Laboratório de Química de Alimentos (LQA), contribuindo para o desenvolvimento do trabalho e por compartilhar os seus conhecimentos.

Ao Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) pela parceria e por oportunizar a realização de parte dos experimentos deste trabalho, pela recepção de todos do grupo e por cada ensinamento.

Ao Laboratório de Eletroespectro Analítica (LEEA) pela parceria e por poder executar uma parte deste trabalho, pela parceria dos alunos presentes contribuindo com os ensinamentos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-Sul) e Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) pelo espaço concedido para a realização das análises e às colaborações para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Nutrição infantil.....	5
2.2 Fórmulas infantis	6
2.3 Composição das fórmulas infantis	9
2.4 Métodos analíticos empregados para determinação elementar	12
2.4.1 Técnicas de determinação	12
2.4.2 Métodos de preparo de amostras.....	13
2.5 Métodos analíticos empregados para a determinação elementar em alimentos infantis.....	15
2.6 Dispersão da matriz em fase sólida.....	22
2.6.1 Princípios básicos	22
2.6.2 Modificações da MSPD	23
2.7 MSPD e a Química Analítica Verde	25
2.8 Aplicações da MSPD.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Instrumentação	32
3.2 Reagentes.....	34
3.3 Amostras	34
3.4 Determinação da composição centesimal das amostras.....	35
3.4.1 Determinação do teor de umidade	35
3.4.2 Determinação do teor de cinzas.....	35
3.4.3 Determinação do teor de proteínas pelo método de Kjeldahl	36
3.4.4 Método de Gerber	37

3.4.5. Determinação do teor de carboidratos	38
3.5 Descontaminação das vidrarias.....	38
3.6 Descontaminação dos suportes sólidos.....	38
3.7 Procedimento da MSPD.....	38
3.8 Determinação do teor de carbono orgânico total	39
3.9 Procedimento de decomposição por MAD.....	39
3.10 Fluxograma dos procedimentos empregados	40
3.11 Análise estatística.....	40
3.12 Validação do método analítico.....	41
3.12.1 Limite de detecção e quantificação	41
3.12.2 Linearidade	41
3.12.3 Exatidão e precisão.....	42
3.13 Tratamento de resíduos.....	42
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	43
4.1 Avaliação dos parâmetros da MSPD	43
4.1.1 Efeito do tipo de suporte sólido	43
4.1.2 Efeito da solução extratora.....	49
4.1.3 Efeito da proporção massa de amostra/suporte sólido	50
4.1.4 Avaliação do tempo de maceração	52
4.2 Performance analítica do método	53
4.3 Métrica AGREE.....	55
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da MSPD original.....	22
Figura 2 - Imagens de MEV representando a etapa de dispersão da MSPD, empregando amostras de sedimento marinho: (a) florisil; (b) florisil + amostra; (c) sílica; (d) sílica + amostra.....	23
Figura 3 - Esquema com as etapas da VA-MSPD.....	24
Figura 4 - Publicações na plataforma Web os Science, contendo as palavras-chave “matrix solid-phase dispersion” e “MSPD”, nos últimos 24 anos.....	26
Figura 5 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento deste estudo.....	40
Figura 6 - Influência do tipo de suporte sólido na extração de Cu em amostras de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$), os marcadores (quadrados brancos) representam a concentração de TOC (g L^{-1}) e as barras de erros representam os desvios padrão.	43
Figura 7 – Imagens obtidas por MEV representando a etapa de dispersão do MSPD, empregando amostra de fórmula infantil: (a) apenas amostra; (b) apenas amostra (após mistura); (c) alumina; (d) alumina + amostra (após mistura); (e) areia; (f) areia + amostra (após mistura); (g) C18; (h) C18 + amostra (após mistura); (i) florisil; (j) florisil + amostra (após mistura); (k) sílica; (l) sílica + amostra (após mistura); (m) terra diatomácea; e (n) terra diatomácea + amostra (após mistura).....	45
Figura 8 - Imagens demonstrando o aspecto de uma chama $\text{C}_2\text{H}_2\text{-Ar}$ em um HR-CS FAAS no momento da aspiração de extratos da MSPD (oriundos de amostras de fórmula infantil) (a) apenas com filtração simples e (b) com filtração simples + filtros de seringa com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$	47
Figura 9 - Influência da solução extratora na extração de Cu em amostras de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e	

as barras de erros representam os desvios padrão.

.....49

Figura 10 - Influência da proporção entre massa de amostra e suporte sólido na extração de Cu em amostra de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e as barras de erros representam os desvios padrão.....51

Figura 11 - Influência do tempo de maceração na extração de Cu em amostra de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e as barras de erros representam os desvios padrão.52

Figura 12 - Curva de calibração externa para a avaliação da linearidade..... 53

Figura 13 - Pictograma obtido pelo *software* AGREE representando o (A) MAD/HR CS GF AAS (método comparativo) e (B) MSPD/HR CS FAAS (método proposto).....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de fórmulas infantis (Adaptado de BRANDÃO, 2015; MANARINI, 2017).....	7
Tabela 2 - Conteúdo de vitaminas, minerais e outras substâncias para fórmulas de seguimento (adaptado de ANVISA, 2011).....	9
Tabela 3 - Ingestão Diária Recomendada para Lactentes e Crianças (Adaptado de ANVISA, 2005).	11
Tabela 4 - Trabalhos sobre determinação elementar em alimentos infantis.	17
Tabela 5 - Trabalhos reportados na literatura empregando a MSPD e suas derivações para a determinação elementar ou análise de especiação.....	27
Tabela 6 - Programa de temperatura empregado na determinação de Cu por HR-CS GF AAS.....	32
Tabela 7 - Condições instrumentais empregadas na determinação de Cu por HR-CS FAAS.....	33
Tabela 8 - Amostras de alimentos infantis utilizadas no desenvolvimento do trabalho.	35
Tabela 9 – Fator de conversão de nitrogênio total em proteínas em diferentes amostras de alimentos.....	37
Tabela 10 - Composição centesimal (g/100g) das amostras de alimentos lácteos infantis.....	49
Tabela 11 - Determinação de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) por HR-CS FAAS (após MSPD) e por HR-CS GF AAS (após MSPD e MAD) (resultados expressos como média \pm desvio padrão, n = 3).....	54
Tabela 12 - Valores de LOD e LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) para MSPD/HR-CS FAAS (método proposto), MSPD/HR-CS GF AAS e MAS/HR-CS.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AADES, Solventes eutéticos profundos à base de aminoácidos, do inglês *Amino acids-based deep eutectic*
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária
3. ANN, Análise por ativação neutrônica, do inglês instrumental neutron activation
4. AAP, Academia Americana de Pediatria
5. ASV, Voltametria de redissolução anódica, do inglês *Anodic stripping voltammetry*
6. BiT-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida com bolas em tubo, do inglês *Balls-in-tube matrix solid-phase dispersion*
7. CD, Decomposição ácida induzida por placa elétrica, do inglês *Digestion acid induced by electric hot plate*
8. DPASV, Voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, do inglês *Differential pulse anodic stripping voltammetry*
9. DEMON, Monocromador duplo *Echelle*, do inglês *Duble-Echelle monochromator*
10. DIT, Diiodotirosina, do inglês *Diiodotyrosine*
11. DRX, Difração de raios X, do inglês *X-ray diffraction*
12. ESPGHAN, Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição, do inglês *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*
13. ET AAS, Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *Eletrothermal atomic absorption spectrometry*
14. FAAS, Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *Flame atomic absorption spectrometry*
15. FT-IR, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*
16. GC-MS Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa, do inglês *Gas chromatography coupled mass spectrometry*
17. GF AAS, Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectrometry*
18. HG AAS, Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *Hydride imito fn atomic absorption spectrometry*
19. HPLC-DAD, Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês *High Performance liquid chromatography-diode array detection*

20. HPLC-ICP-MS, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *High-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*
21. HR-CS AAS, Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, do inglês *High resolution-continuum source atomic absorption spectrometry*
22. IC, Cromatografia de íons, do inglês *Ion chromatography*
23. IC-CD Cromatografia de íons com detecção por condutividade, do inglês *Ion Chromatography-Conductivity Detection*
24. IC-CD-MS Cromatografia de íons com detecção por condutividade e espectrometria de massa, do inglês *Ion chromatography-conductimetric and mass detection*
25. ICP-MS, Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma-mass spectrometry*
26. ICP OES, Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
27. IL-VF-MSPD Dispersão da matriz em fase sólida forçada por vórtice à base de líquido iônico, do inglês *Ionic liquid-based imito-forced matrix solid-phase dispersion*
28. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
29. IMF, Fórmula infantil à base de leite, do inglês *infant milk-based*
30. ISF, Infantis à base de soja, do inglês *infant soy-based*
31. KI, Iodeto de potássio
32. LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*
33. LMT, Limite Máximo Tolerado
34. LOD, Limite de detecção, do inglês *Limit of detection*
35. LOQ, Limite de quantificação, do inglês *Limit of quantification*
36. MAD, Decomposição assistida por micro-ondas, do inglês *Microwave-assisted digestion*
37. MAE, Extração assistida por micro-ondas do inglês *Microwave-assisted extraction*
38. MEV, Microscopia eletrônica de varredura
39. MIC, Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *Microwave-induced combustion*
40. MIT, Monoiodotirosina do inglês *Monoiodotyrosine*
41. MSPD, Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix solid-phase dispersion*

42. MW-AD, Decomposição ácida assistida por micro-ondas, do inglês *Microwave-assisted acid digestion*
43. MWCNTs, Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês *Multiwall carbon nanotubes*
44. MWCNTs-MSPD, Nanotubos de carbono de paredes múltiplas assistida pela dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Multiwall carbon nanotubes assisted matrix solid-phase dispersion*
45. NAA, Análise por ativação neutrônica, do inglês *Neutronic activation analysis*
46. OMS, Organização Mundial da Saúde
47. RGE, Refluxo gastroesofágico
48. RSD, Desvio padrão relativo, do inglês *Relative standard deviation*
49. SBP, Sociedade Brasileira de Pediatria
50. SD, Desvio padrão, do inglês *Standard deviation*
51. SD-SEGD-CVG, Vapor frio induzido por descarga de eletrodo de solução de gota única, do inglês *Single-drop solution electrode discharge-induced cold vapor*
52. SEM/EDAX, Microscopia eletrônica de varredura/análise de energia dispersiva de raios X, do inglês *Scanning electron microscopy/energy dispersive analysis of X-ray*
53. SPE, Extração em fase sólida, do inglês *Solid-phase extraction*
54. SWASV, Voltametria redissolução anódica de onda quadrada, do inglês *Square wave anodic stripping voltammetry*
55. TOC, Carbono orgânico total, do inglês *Total organic carbon*
56. VA-MSPD, Dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex, do inglês *Vortex-assisted matrix solid-phase dispersion*
57. UA-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion*
58. UHPLC-MS/MS, Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por espectrometria de massas em série, do inglês *Ultra-high performance liquid-liquid chromatography-mass spectrometry in tandem*
59. UHPLC-UV, Cromatografia líquida de ultra alta performance com detector ultravioleta, do inglês *Ultra high performance liquid chromatography-ultraviolet detector*

RESUMO

Título: Avaliação da dispersão da matriz em fase sólida combinada com HR-CS FAAS para a determinação de cobre em alimentos lácteos infantis

Autor: Lisliane Kickofel

Orientador: Prof. Dr. Bruno Meira Soares

Este estudo propõe, pela primeira vez, o desenvolvimento de um método analítico utilizando a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) para a extração de cobre de fórmulas infantis e alimentos à base de leite para posterior determinação utilizando espectrometria de absorção atômica com fonte de alta resolução com atomização em chama (HR-CS FAAS). O método proposto foi avaliado utilizando fórmula infantil de seguimento (1 a 3 anos) e aplicado em amostras de fórmulas infantis de partida (0 a 6 meses) e de seguimento (6 a 12 meses), leite em pó e composto lácteo. Os parâmetros da MSPD foram cuidadosamente investigados e ao empregar 0,25 g amostra, 0,25 g de terra diatomácea como suporte sólido, HNO_3 1 mol L^{-1} como solução extratora e maceração por 1 min, foram obtidos valores concordantes com os valores de referência. O limite de detecção do método foi de $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$. A precisão foi avaliada comparando os resultados usando os seguintes métodos: *i*) método proposto (MSPD/HR-CS FAAS) e *ii*) decomposição das amostras por digestão assistida por micro-ondas (MAD) e quantificação por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS). Os extratos da MSPD também foram quantificados usando HR-CS GF AAS. Não houveram diferenças significativas entre os resultados e as concordâncias variaram de 95 a 103%. As concentrações de cobre variaram de 0,40 a $3,8 \mu\text{g g}^{-1}$ usando o método proposto, com RSDs inferiores a 10%. O método proposto mostrou-se eficiente para a determinação de cobre em fórmulas infantis e leite em pó, oferecendo vantagens como rapidez, simplicidade, baixo custo, baixo consumo de energia, geração reduzida de resíduos (devido ao uso de uma solução aquosa de extração), utilização de materiais de fontes renováveis (terra diatomácea como suporte sólido) e minimização da exposição do analista. Esses atributos estão alinhados com os princípios da Química Analítica Verde.

Palavras-chave: Alimentos lácteos infantis, MSPD, HR-CS FAAS, Cobre, Preparo de Amostra.

ABSTRACT

Title: Evaluation of matrix solid-phase dispersion combined with HR-CS FAAS for copper determination in milk-based infant foods

Author: Lisliane Kickofel

Advisor: Prof. Dr. Bruno Meira Soares

This study proposes, for the first time, the development of an analytical method using the matrix solid-phase dispersion (MSPD) for extraction of copper from infant formulas and milk-based foods for further determination using high resolution-continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS). The proposed method was evaluated using follow-up infant formula (1 to 3 years), and applied to samples of starting (0 to 6 months) and follow-up (6 to 12 months) infant formulas, milk powder, and dairy compound. MSPD parameters were investigated, and by employing a 0.25 g sample, 0.25 g of diatomaceous earth as a solid support, 1 mol L⁻¹ HNO₃ as the extraction solution, and 1 min of blending, higher agreements with reference values were obtained. The limit of detection of the method was 0.35 µg g⁻¹. Accuracy was assessed by comparing the results using the following methods: *i*) proposed method (MSPD/HR-CS FAAS); and *ii*) decomposition of samples by microwave-assisted digestion (MAD) and quantification by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS). The MSPD extracts were also quantified using HR-CS GF AAS. No significant difference was found between the results. The agreements ranged from 95 to 103%, and no significant difference was observed between the results. Copper concentrations ranged from 0.40 to 3.8 µg g⁻¹ using the proposed method, with RSDs lower than 10%. The proposed method proved to be efficient for the determination of copper in infant formulas and milk powder, offering advantages such quickness, simplicity, low cost, low energy consumption, reduced waste generation (due to the use of an aqueous extraction solution), utilization of materials from renewable sources (diatomaceous earth as a solid support), and minimized analyst exposure. These attributes align with the principles of Green Analytical Chemistry.

Keywords: Infant formula, Milk-based infant foods, MSPD, HR-CS FAAS, Copper, Sample preparation.

1. INTRODUÇÃO

A fase mais importante para o desenvolvimento infantil são os primeiros 6 meses de idade, na qual a ingestão de nutrientes adequados é essencial para o seu desenvolvimento, crescimento e saúde. Durante esse período, a amamentação deve ser a única fonte de nutrição e é recomendado continuar amamentando por pelo menos dois anos ou mais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) são os órgãos que regulamentam a ingestão de nutrientes nos alimentos infantis no Brasil e no mundo, respectivamente. A ANVISA e OMS estabelecem os índices de ingestão diária recomendada (IDR) para lactentes (0 a 12 meses) e crianças de primeira infância (1 a 3 anos), sendo recomendada a ingestão de proteínas, vitaminas e minerais.

Os elementos essenciais que necessitam ser consumidos diariamente são o Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), P (Fósforo), Flúor (F), Mg (Magnésio), Mn (Manganês) e Zinco (Zn), vitaminas (A, B1 B2, B6, B12, C, D, E, K) e proteínas como a caseína (ANVISA, 2018; ANVISA, 2005; ANVISA 2011). Um dos elementos que exerce uma função muito importante no desenvolvimento infantil é o Cu, o qual auxilia no funcionamento do sistema imunológico, no metabolismo energético, pigmentação do cabelo e pele, transporte de Fe no organismo, além de ser um antioxidante que auxilia na proteção dos danos causados por radicais livres e na manutenção dos tecidos conjuntivos (ANVISA, 2018). Sendo assim, a quantidade de IDR de Cu para lactentes de 0 a 6 meses é de 200 µg, para lactentes de 7 a 11 meses é de 220 µg e para crianças de primeira infância de 1 a 3 anos é de 340 µg (ANVISA, 2005; KILIC *et al.*, 2018). Após os primeiros seis meses de vida, é recomendado introduzir outras formas de alimentos (de origem vegetal ou animal), além de continuar com a amamentação. Fórmulas infantis são amplamente consumidas como suplementos alimentares em todo o mundo e podem ser utilizadas sob avaliação e recomendação médica, principalmente quando a amamentação não é possível. (PAIVA, MORGANO & BRAGOTTO, 2019).

Existem diversos tipos de fórmulas infantis. Fórmulas para prematuros ricas em proteínas e gorduras essenciais para o desenvolvimento das funções neurais, visuais, psicomotoras. Fórmulas antirrefluxo para bebês que apresentam regurgitação, contendo carboidratos e enriquecidas com Fe. Fórmulas infantis sem lactose, para

bebês com intolerância à lactose. Fórmulas para crianças com alergia à proteína do leite de vaca (APLV). Além disso, existem as fórmulas infantis de partida (até os 6 meses) e de seguimento (após os 6 meses). Portanto, é extremamente importante monitorar a composição dos alimentos consumidos por lactentes e crianças de primeira infância.

Muitos autores têm relatado o uso da espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e da espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para análise elementar, pois são técnicas que permitem a determinação multielementar com a sensibilidade necessária para análise de traços. No entanto, esses instrumentos têm um custo significativo de aquisição e requerem vazões substanciais de argônio para manter o plasma (KORN *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2020). A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) tem ganhado destaque na determinação de metais e não metais, incluindo elementos majoritários e traços, em diferentes tipos de amostras. A técnica permite determinações mono e multielementares. Ao utilizar a HR-CS FAAS, é possível realizar determinações rápidas e sequenciais de vários elementos (GAMELA *et al.*, 2019). Já a HR-CS GF AAS é uma técnica altamente sensível que também permite a determinação simultânea de dois ou mais elementos, desde que estejam sendo monitorados na mesma janela espectral. Além disso, a partir de um espectro tridimensional (3D), é possível o monitoramento da região espectral e a aplicação de várias formas de correção de interferências espectrais, como correção de fundo por eventos contínuos e o uso do método dos mínimos quadrados (WELZ *et al.*, 2014). Embora a HR-CS GF AAS permita a amostragem de sólidos (SS), a maioria das técnicas analíticas anteriormente descritas requer a introdução da amostra na forma de solução para evitar interferências espectrais e não espectrais. Portanto, um eficiente preparo da amostra é essencial.

Métodos de preparo de amostra, como decomposição por via seca, decomposição por via úmida em sistema aberto (SARACOGULO *et al.* 2007), decomposição assistida por micro-ondas (MAD) (KIANI *et al.*, 2022; KILIC *et al.*, 2018; BARGELLINI *et al.*, 2016) e extração assistida por ultrassom (UAE) (GAMELA *et al.*, 2019), têm sido utilizados para a determinação elementar em amostras de fórmulas infantis e alimentos para bebês, visando a determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos. Portanto, estudos recentes têm se concentrado em reduzir o consumo de solventes e reagentes tóxicos, miniaturizar os processos, gerar menos

resíduos e explorar materiais alternativos provenientes de fontes renováveis. Além disso, também tem como objetivo minimizar o tempo gasto na preparação das amostras. Como resultado, as tendências atuais na Química Analítica enfatizam métodos que estejam alinhados com os princípios da Química Analítica Verde (GAC) (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI e NAMIEŚNIK, 2013).

Um método de preparo de amostra que tem sido recentemente aplicado para a determinação elementar é a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD). A MSPD foi introduzida por BARKER *et al.* (1989), para o preparo de amostras sólidas ou semissólidas visando a extração de drogas e seus metabólitos em tecidos (músculo bovino). A primeira MSPD proposta, consistia em macerar em um almofariz (de vidro, porcelana ou ágata) uma mistura contendo amostra e um suporte sólido (material abrasivo). Neste processo, ocorre a dispersão da amostra na superfície do suporte sólido pela força mecânica aplicada na maceração e o rompimento da estrutura física da matriz, promovendo a diminuição da interação do analito com a matriz, formando uma nova fase, além da diminuição do tamanho de partícula. Depois da maceração, a mistura é transferida para cartuchos de extração em fase sólida (SPE) e empacotada em uma coluna vazia. Após, ocorre a eluição dos analitos usando um solvente adequado (BARKER *et al.*, 1989; CALDAS *et al.*, 2013).

A MSPD sofreu algumas mudanças ao longo dos anos como no trabalho desenvolvido por Sebastià *et al.* (2010), que propôs a substituição da etapa de empacotamento em cartucho de SPE pela transferência da mistura (amostra + suporte sólido) para tubos de fundo cônicos de vidro, seguido de agitação em vórtex e centrifugação. Mais tarde, no trabalho de Caldas *et al.* (2013), os autores implementaram essa modificação e propuseram uma nova nomenclatura, a dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD). A MSPD tem sido empregada em diversos trabalhos para a extração de compostos orgânicos em uma variedade de amostras (DANEK *et al.*, 2021; FRAMIL *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2019; MUJAHID *et al.*, 2022; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2009). No entanto, foram encontrados poucos trabalhos na literatura que determinaram metais, não metais ou espécies químicas metálicas empregando a MSPD (DENG *et al.*, 2015; FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2023; LUCKOW, 2023; MALINOWSKI *et al.*, 2022; PING *et al.*, 2012; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2018). Portanto, há um universo de possibilidades para explorar visando a extração de analitos inorgânicos empregando a MSPD como uma nova proposta no preparo de amostras.

Além disso, o emprego de suportes sólidos oriundos de fontes renováveis e/ou quimicamente mais verdes e solventes não tóxicos podem contribuir para atender aos princípios da GAC (GALUSZKA *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2010). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a MSPD para a extração de Cu em alimentos lácteos infantis visando a posterior quantificação por HR-CS FAAS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrição infantil

A fase mais importante do desenvolvimento infantil é do nascimento até os 6 meses de idade, pois nesse período a ingestão de nutrientes é essencial para o desenvolvimento. A ANVISA e a OMS são os órgãos que regulam e estabelecem os parâmetros ideais para a nutrição infantil e definem que o leite materno atende os níveis de IDR e deve ser a única fonte de alimentação a ser introduzida nos primeiros meses de vida (KILIC *et al.*, 2018). No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece algumas classificações acerca da saúde da criança, aleitamento materno e alimentação Complementar, como segue:

- *Aleitamento materno exclusivo* – quando a criança recebe apenas leite materno, direto da mama ou leite humano de outra fonte, sem outros líquidos ou sólidos, apenas com a exceção de medicamentos, ao qual o leite fornece todos os nutrientes necessários.
- *Aleitamento materno predominante* – quando a criança recebe, além da amamentação, água ou outros tipos de bebidas à base de água ou sucos de frutas.
- *Aleitamento materno* – quando a criança recebe o leite materno diretamente da mama, independentemente de estar recebendo outro tipo de alimento.
- *Aleitamento materno complementado* – quando a criança recebe além do leite materno, a introdução de outros alimentos sólidos ou semissólidos para complementação e não substituição do leite materno.
- *Aleitamento materno misto ou parcial* – quando a criança recebe leite materno e outros tipos de leite.

Após os 6 meses de vida recomenda-se a introdução complementar de outras formas de alimentos de origem vegetal ou animal para atender aos níveis de IDR, mas é recomendada a amamentação até 2 anos ou mais (PAIVA, MORGANO & BRAGOTTO, 2019). Quando há a impossibilidade do consumo de leite materno, por

fatores associados à saúde da mãe (incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus T-linfotrófico humano (HTLV), ou hepatites A,B e C) (SAGER, MCCULLOCH & SCHODER, 2018) pode ser recomendado o uso das fórmulas infantis, as quais são consumidas mundialmente e possuem os nutrientes recomendados para o desenvolvimento infantil. Algumas sociedades científicas Nacionais e Internacionais recomendam o seu uso em casos específicos, como a Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN), a Academia Americana de Pediatria (AAP) e a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP).

Os compostos lácteos não são produtos considerados leite, e sim produtos comercializados na forma de pó resultante da mistura do leite ou de substâncias alimentícias lácteas (como soro de leite, leite fermentado, manteiga e creme de leite), não lácteas (como açúcares, edulcorantes nutritivos, chocolate, café e frutas) ou ambas. Os ingredientes lácteos devem representar uma mistura cerca de no mínimo 51% do total de ingredientes de produtos, como óleos vegetais, leite reconstituído, canola, soja, açúcar e outras substâncias químicas que influenciam no sabor e aroma. Além disso, esses compostos são classificados como ultraprocessados. Portanto, não são recomendados para crianças menores de 2 anos, devido a presença de altos teores de açúcares e aditivos alimentares em sua composição (MAPA, 2007). Já o leite em pó, leite em pó instantâneo e os demais destinados ao consumo humano, são produtos obtidos através da desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado apto para consumo, mediante processos industriais adequados. Esses produtos podem ser classificados de acordo com o teor de gordura e/ ou proteínas correspondentes (MAPA, 2018).

2.2 Fórmulas infantis

As fórmulas infantis são produtos industrializados feitos a partir do leite de vaca e/ou outros animais, vegetais, soja ou proteínas hidrolisadas. As fórmulas infantis que são derivadas do leite de vaca são as que mais se assemelham com o leite materno (ALMEIDA *et al.*, 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil (MS) recomendam o uso exclusivo do leite materno nos 6 primeiros meses de vida. Entretanto, quando a amamentação não pode ser realizada, existe a necessidade de suprir o leite materno com as fórmulas infantis, devido a problemas

de saúde da lactante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). As fórmulas de partida são as fórmulas infantis comercializadas na forma líquida ou em pó, utilizadas, quando indicadas, para os primeiros 6 meses de vida, contendo na sua composição os nutrientes necessários para a suplementação da criança (ANVISA, 2011a,b,c). Já as fórmulas infantis de seguimento são produtos, em forma líquida ou em pó, utilizado, quando indicado, para lactentes e crianças de primeira infância saudáveis. Lactentes são crianças de zero a 12 meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias). Crianças de primeira infância são crianças de 12 a 36 meses de idade. As fórmulas infantis de seguimento para lactentes podem ser alteradas ou preparadas para atender as necessidades recomendadas pelo acompanhamento do pediatra, devido a alterações fisiológicas ou doenças temporárias ou permanentes, a fim de atender a crianças com algum tipo de alergia (ANVISA, 2011). Na Tabela 1, constam algumas classificações para alguns tipos de fórmulas infantis.

Tabela 1 - Tipos de fórmulas infantis (Adaptado de BRANDÃO, 2015; MANARINI, 2017).

Tipo	Função/indicação
Para prematuros	Suprir as carências nutricionais de bebês prematuros. Rica em proteínas, gorduras, adição de ácidos graxos específicos, essenciais para o desenvolvimento cerebral, visual e psicomotor e com modificações para facilitar a decomposição (teor proteico e gorduras de óleos vegetais)
Anti-refluxo	Atuar na remediação do refluxo gastroesofágico (RGE em bebês que apresentam regurgitação. Composição rica em carboidratos (amido de arroz ou de milho), gorduras e proteínas, com enriquecimento de Fe e aminoácidos.
Sem lactose	Para bebês com intolerância à lactose. Sua fórmula contém nucleotídeos e ácidos graxos, baixo teor de lactose, Vitamina B12, Vitamina B1, Vitamina D, Vitamina B6; KI, Vitamina K, Selenito de Sódio, Vitamina C, Vitamina E, FeSO ₄ e ZnSO ₄ .

Hipoalergênica	Para bebês que exibem alergia ao leite de vaca (APLV). Fórmulas infantis à base de proteína do soro do leite parcialmente hidrolisada.
À base de soja	Para bebês a partir dos 6 meses, que contenham algum tipo de intolerância à lactose ou proteína do leite de vaca (APLV).

O refluxo gastroesofágico, é um quadro comum na primeira infância, caracterizado por um movimento involuntário e repetitivo do conteúdo do estômago ao esôfago. Nos recém-nascidos, o RGE apresenta-se na forma de regurgitações que ocorrem após a amamentação ou ingestão de outros alimentos. As fórmulas infantis anti-regurgitação têm por sua composição os hidratos de carbono distribuídos em lactose, amido de milho, amido pré-gelatinizado, carboidratos, proteínas, gorduras, caseína, óleos vegetais, entre outros. Os nutrientes necessários, como vitaminas e metais essenciais, são adaptados a formulação conforme a necessidade da criança (PENNA *et al.*, 2003).

No caso do nascimento de crianças prematuras que necessitem de alimentação por fórmula, esta deve ter a mesma composição do leite materno, contendo todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do prematuro, incluindo proteínas, gorduras, carboidratos derivados de polímeros de glicose e baixas concentrações de lactase, pois o seu intestino ainda não possui a maturidade necessária para fazer a degradação da enzima (SILVA, 2019).

As fórmulas sem lactose são recomendadas para crianças com alergia a lactose, carboidrato que se encontra no leite materno ou no leite de vaca. Por essa razão, estas fórmulas têm por base carboidratos como a glicose (CORDERO, PRADO & BRAVO 2018).

Para crianças que possuem alergia a proteína do leite de vaca (APLV), especialmente as proteínas do coalho (caseína) e do soro (alfa-lacto albumina e beta-lactoglobulina) do leite, a recomendação pediátrica é a dieta alimentar restrita (sem os alergênicos) à mãe, para que seja mantida a alimentação com leite materno, especialmente nos 6 primeiros meses. No entanto, em casos graves e após os 6 primeiros meses, pode ser recomendado o uso de fórmulas à base de soja, que são adaptadas contendo aminoácidos, carboidratos, polímeros de glicose e/ou sacarose,

Ca, Fe, Mg, P, Zn e suplementos de aminoácidos (CORDERO, PRADO & BRAVO 2018).

2.3 Composição das fórmulas infantis

As composições das fórmulas infantis são variadas, mas geralmente contém nutrientes essenciais como o Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Zn, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais, os quais desempenham um papel fundamental no sistema biológico do ser humano, mas quando ingeridos em excesso podem ser tóxicos (KILIC *et al.*, 2018; KIANI *et al.*, 2022; PAIVA, MORGANO & BRAGOTTO, 2019). A ESPGHAN classifica alguns dos componentes das fórmulas infantis.

- Gordura: mistura de óleos vegetais que fornecem os ácidos graxos essenciais (AGE), dentre eles ácido linoleico e o alfa-linolênico.
- Carboidratos: as fórmulas contêm lactose apenas ou associação de lactose com polímeros de glicose (maltodextrina).
- Proteínas: polimérica (soro do leite/caseína) ou parcialmente hidrolisada (soro).
- Minerais: há modificação nos teores dos minerais, tentando aproximar os seus teores aos do leite materno.

O termo limite superior de referência (LSR) é um limite para nutrientes e outras substâncias, obtido a partir das necessidades nutricionais dos lactentes ou crianças de primeira infância e do histórico de uso estabelecido aparentemente seguro, não devendo ser interpretados como valores a serem alcançados (ANVISA, 2011). Na Tabela 2, estão demonstrados o conteúdo de vitaminas, minerais e outras substâncias que devem fazer parte da composição das fórmulas infantis de seguimento, de acordo com a Resolução RDC Nº 44 de 19 de setembro de 2011 da ANVISA.

Tabela 2 - Conteúdo de vitaminas, minerais e outras substâncias para fórmulas de seguimento (adaptado de ANVISA, 2011).

Nutriente	Unidade	Mínimo	Máximo	LSR
Ácido Fólico	µg/100 kcal	10	-	50
Ácido Pantotênico	µg /100 kcal	400	-	2000
Biotina	µg/100 kcal	1,5	-	10

Niacina	µg/100 kcal	300	-	1500
Riboflavina	µg/100 kcal	80	-	500
Tiamina	µg/100 kcal	60	-	300
Vitamina A	µg RE /100 kcal	60	180	-
Vitamina B6	µg/100 kcal	35	-	175
Vitamina B12	µg/100 kcal	0,1	-	0,5
Vitamina C	mg/100 kcal	10	-	30
Vitamina D3	µg/100 kcal	1	3	-
Vitamina E	mg alfa-TE /100 kcal	0,5	-	5
Vitamina K	µg/100 kcal	4	-	27
Cálcio	mg/100 kcal	50	-	140
Cloreto	mg/100 kcal	50	160	-
Cobre	µg/100 kcal	35	-	120
Ferro	mg/100 kcal	0,9	2	-
Fósforo	mg/100 kcal	25	-	100
Iodo	µg/100 kcal	10	-	60
Magnésio	mg/100 kcal	5	-	15
Manganês	µg/100 kcal	1	-	100
Potássio	mg/100 kcal	60	180	-
Selênio	µg/100 kcal	1	-	9
Sódio	mg/100 kcal	20	60	-
Zinco	mg/100 kcal	0,5	-	1,5
Colina	mg/100 kcal	7	-	50
Mio-Inositol	mg/100 kcal	4	-	40

Para o Cu, o LSR é 120 µg/100 kcal. A ingestão de Cu é fundamental no desenvolvimento da criança. Por isso, o cobre é um elemento essencial para o organismo, fazendo parte de vários processos metabólicos no organismo, como nos processos de oxidação-redução, auxiliando no sistema imunológico, no metabolismo energético, pigmentação do cabelo e pele, transporte do Fe no organismo, antioxidante na proteção de danos causados pelos radicais livres, além de atuar na

manutenção dos tecidos conjuntivos e na produção de energia celular através da respiração (ANVISA, 2018).

As fontes de Cu na alimentação humana são diversas, como em carnes, cereais, frutos do mar, sementes e nozes, grãos integrais, leguminosas e frutas secas. A quantidade de ingestão diária recomendada de cobre pode variar com base em fatores individuais, como idade, sexo e estado de saúde. Com isso, a ANVISA (2005) recomenda a IDR para proteínas, vitaminas e sais minerais para lactentes e crianças, como demonstrado na Tabela 3 (SARACOGLU *et al.* 2007).

Tabela 3 - Ingestão Diária Recomendada para Lactentes e Crianças (Adaptado de ANVISA, 2005).

Nutrientes	Unidade	Lactente		Crianças
		0 - 6 meses	7 - 11 meses	12 - 36 meses
Proteína (1)	g	9,1	11	13
Vitamina A (2) (a)	µg (RE)	375	400	400
Vitamina D (2) (b)	µg	5	5	5
Vitamina C (2)	mg	25	30	30
Vitamina E (2) (c)	mg	2,7	2,7	5
Tiamina (2)	mg	0,2	0,3	0,5
Riboflavina (2)	mg	0,3	0,4	0,5
Niacina (2)	mg	2	4	6
Vitamina B6 (2)	mg	0,1	0,1	0,5
Ácido fólico (2)	µg	48	48	95
Vitamina B12 (2)	µg	0,4	0,5	0,9
Biotina (2)	µg	5	6	8
Vitamina K (2)	µg	5	10	15
Cálcio (2)	mg	300	400	500
Ferro (2)(d)	mg	0,27	9	6
Magnésio (2)	mg	36	53	60
Zinco (2)(e)	mg	2,8	4,1	4,1

Iodo (2)	µg	90	135	75
Fósforo (1)	mg	100	275	460
Flúor (1)	mg	0,01	0,5	0,7
Cobre (1)	µg	200	220	340
Selênio (2)	µg	6	10	17
Cromo (1)	µg	0,2	5,5	11
Manganês (1)	mg	0,003	0,6	1,2

(a) 1 micrograma retinol = 1 micrograma RE; 1 micrograma betacaroteno = 0,167 micrograma RE; 1 micrograma de outros carotenóides provitamina A = 0,084 micrograma RE; 1 UI = 0,3 micrograma de retinol equivalente (2).

(b) 1 micrograma de colicalciferol = 40 UI.

(c) mg alfa-TE; 1,49 UI = 1 mg d-alfa-tocoferol (1).

(1) INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes. National Academic Press, Washington D.C., 1999- 2001.

(2) FAO/OMS. Human Vitamin and Mineral Requirements. In: Report 7th Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand, 2001. xxii + 286p.

2.4 Métodos analíticos empregados para determinação elementar

2.4.1 Técnicas de determinação

As técnicas analíticas comumente empregadas para a determinação elementar são a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS), as quais permitem, na maioria das aplicações, determinações monoelementares. As técnicas analíticas multielementares como a ICP OES e a ICP-MS permitem a determinação de vários elementos em uma mesma análise com sensibilidade adequada para a análise de traços. Entretanto, os espectrômetros ICP OES e ICP-MS possuem elevado custo relativo de aquisição e as técnicas demandam experiência do operador para contornar possíveis interferências espectrais e não espectrais (KORN *et al.*, 2008; TAVAKOLI, JAMALI & NEZHADALI, 2021). Outras técnicas como a voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV), a voltametria de redissolução anódica de varredura linear e a voltametria redissolução anódica de onda quadrada (SWASV), também têm sido aplicadas em diferentes áreas para a determinação elementar com destaque para a sua elevada sensibilidade e seletividade (OLIVEIRA *et al.*, 2022; MACIEL *et al.*, 2019;

HEINEMAN *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2016). A análise por ativação neutrônica (NAA) é uma técnica analítica capaz de determinar a composição elementar de diversos tipos de amostras, sem precisar de um pré tratamento e pouca quantidade de amostra para análise. A NAA está baseada na emissão de radiação gama característica dos elementos presentes na amostra e se caracteriza por não ser uma técnica destrutiva da amostra, além de ser uma técnica multielementar com elevada exatidão (COSTA & MENEZES, 2012; MAYR, 2021).

A HR-CS AAS é uma técnica que difere das técnicas de espectrometria de absorção atômica com fonte de linhas (LS-AAS) pela fonte de radiação e pela alta resolução do monocromador. A fonte de radiação é uma lâmpada de arco curto de Xe. Para a seleção dos comprimentos de onda, a técnica utiliza um monocromador duplo de alta resolução (DEMON) contendo um prisma para pré-seleção de ordens espectrais e uma rede de difração do tipo *Echelle* com correção simultânea do fundo (*background*) nas proximidades da linha analítica. A técnica permite análises em baixas concentrações (na ordem de até $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng g^{-1}) em amostras sólidas, líquidas ou suspensões. A atomização em forno de grafite permite a determinação de 2 ou mais elementos, desde que possam ser monitorados na mesma janela espectral. A técnica também permite o monitoramento de interferências espectrais através de um espectro 3D e a resolução de interferências por diferentes métodos de correção de fundo. Adicionalmente, entre as suas aplicações destacam-se a análise direta de sólidos e a determinação elementar utilizando espectros moleculares com estrutura rotacional fina (WELZ *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2005). No entanto, a maioria das técnicas analíticas demandam a introdução da amostra na forma de solução (digeridos, extratos ou suspensões), necessitando de um eficiente preparo de amostra para eliminar as interferências na etapa de determinação.

2.4.2 Métodos de preparo de amostras

No geral, os métodos de preparo de amostras visando a posterior determinação elementar envolvem a decomposição da amostra empregando ácidos concentrados e aquecimento em sistemas abertos ou fechados, através da queima ou pirólise da amostra por métodos baseados na combustão da amostra ou através da extração dos analitos para uma fase aquosa envolvendo ou não uma etapa de pré-concentração.

A decomposição por via seca se baseia na queima/pirólise de materiais orgânicos ou inorgânicos em elevadas temperaturas à pressão atmosférica. A amostra é colocada em um cadinho de platina ou porcelana e a decomposição é feita em fornos do tipo mufla. Após a decomposição, podem ser obtidos óxidos e/ou sais que podem ou não ser solúveis em água ou soluções ácidas. Porém, a decomposição em forno mufla não é recomendada para elementos voláteis, além de ser um método moroso e passível de contaminação (FLORES *et al.*, 2019).

A decomposição por via úmida de amostras orgânicas em sistemas abertos ou fechados geralmente é feita utilizando ácidos minerais concentrados e oxidantes auxiliares com aquecimento. A escolha do método está ligada ao tipo de amostra, à concentração e volatilidade do analito, entre outros fatores. Na decomposição em sistemas abertos utiliza-se uma maior massa de amostra e demanda um maior consumo de reagentes comparado a sistemas fechados. Como principais desvantagens, elementos voláteis podem ser volatilizados durante o aquecimento, além do maior risco de contaminação e longos tempos de decomposição (BARIN *et al.*, 2019).

Já a decomposição em sistemas fechados, especialmente com aquecimento por radiação micro-ondas, é o estado da arte do preparo de amostra para a determinação elementar, pois minimiza os problemas associados aos sistemas abertos, fornece maior segurança ao operador e uma maior eficiência de decomposição por atingir maiores temperaturas e pressões nos frascos de decomposição. No entanto, em sistemas fechados utiliza-se uma menor massa de amostra comparada aos sistemas abertos e os fornos micro-ondas são equipamentos que possuem um elevado custo de aquisição (BARIN *et al.*, 2019).

A decomposição assistida por micro-ondas (MAD), foi proposta no final da década de 70, mas não houveram avanços em sua utilização durante a primeira década, somente a partir da década de 80, o avanço das técnicas de determinação com elevada sensibilidade, exigiu que os métodos de preparo de amostras passassem a ser mais eficientes. Então, passou a ser investigado o emprego da decomposição da amostra sob altas temperaturas e pressões, aumentando a eficiência de decomposição, total ou parcial da amostra. A decomposição da amostra baseia-se na oxidação da matéria orgânica com auxílio de ácidos minerais (como o HNO_3) e oxidantes auxiliares (como o H_2O_2), os quais tem o seu poder oxidante maximizado sob o efeito da temperatura que aumenta através da interação da radiação micro-

ondas com a amostra, a qual é absorvida e convertida em energia térmica. O aquecimento ocorre por dois mecanismos: (i) *rotação dipolar*, onde a interação entre as moléculas com momento dipolar e a radiação eletromagnética resulta em um movimento intermitente, o qual é convertido em energia térmica e (ii) *migração iônica*, onde os íons presentes na solução são influenciados pelos campos magnético e elétrico das micro-ondas, resultando em dissipação da energia na forma de calor. Portanto, a aplicabilidade da decomposição por radiação de micro-ondas para o preparo de amostras com matrizes complexas, muitas vezes tem sido um atrativo e tem sido melhorada ao longo dos anos. As amostras são inseridas em frascos (geralmente de quartzo ou Teflon) resistentes a altas temperaturas e pressões (podendo chegar até 300 °C e 100 bar, respectivamente). A massa de amostra e o tipo de ácido concentrado devem ser considerados fatores importantes para uma decomposição completa (MORAES *et al.*, 2019).

2.5 Métodos analíticos empregados para a determinação elementar em alimentos infantis

Neste trabalho, foi feita uma revisão sobre métodos analíticos empregados para a determinação elementar em alimentos infantis, como pode ser visualizado na Tabela 4. Métodos de preparo de amostra como a decomposição por via seca (SARACOGLU *et al.*, 2007), decomposição por via úmida em sistema aberto (PARKER *et al.*, 2022; JANNAT *et al.*, 2017; SILVA, 2015; SADEGHI *et al.*, 2014; DABEKA *et al.*, 2011; SARACOGLU *et al.*, 2007), MAD (KIANI *et al.*, 2022; BASARAN, 2022; KILIC *et al.*, 2018; SAGER, MCCULLOCH & SCHODER, 2018; BARGELLINI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2013; ZAND *et al.*, 2012; ZAND *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2010; KAZI *et al.*, 2009; SARACOGLU *et al.*, 2007; VIÑAS, MARTÍNEZ E CÓRDOBA, 2000) e extração assistida por ultrassom (UAE) (GAMELA *et al.*, 2019) têm sido aplicados para determinação elementar em amostras de fórmulas infantis e alimentos para bebês visando a determinação tanto de elementos essenciais como potencialmente tóxicos. No entanto, como já foi relatado anteriormente, os sistemas abertos são métodos morosos, com grande consumo de reagentes e passíveis de perda dos analitos por volatilização. A MAD é baseada em sistemas modernos e bastante eficientes, mas demandam instrumentação de custo elevado. A tendência da Química Analítica está baseada no desenvolvimento de métodos rápidos, simples, miniaturizados e de baixo

custo. Métodos que gerem menos resíduos, que utilizem reagentes obtidos de fontes renováveis, reagentes diluídos e, preferencialmente, aquosos e que sejam capazes de substituir solventes tóxicos por alternativas ambientalmente amigáveis (GALUSZKA *et al.*, 2013). Portanto, neste trabalho está sendo proposto o emprego da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) como método alternativo de preparo de amostra para a determinação elementar em alimentos infantis.

Tabela 4 - Trabalhos sobre determinação elementar em alimentos infantis.

Amostra	Elementos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Limite de detecção (LOD)	Referências
Alimentos para bebês (fruta, leguminosa, vegetais de raiz ou grãos)	As, Cd, Pb e Hg	Digestão ácida em bloco digestor (0,4 a 5 g de amostra, 8 mL de HNO ₃ , 1 mL de H ₂ O ₂ , 5 mL HCl)	ICP-MS	(mg kg ⁻¹) 0,003	PARKER <i>et al.</i> , 2022
Leite em pó e papinhas	Al, As, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Se e Zn	MAD (2 g de amostra, 10 mL de HNO ₃ e H ₂ O ₂ (9:1, v/v))	ICP OES	(µg kg ⁻¹) As: 0,018 Al: 0,04 Cd: 0,04 Pb: 2,17 Co: 0,043 Cu: 0,31 Cr: 0,096 Fe: 0,16 Mn: 0,066 Hg: 0,3 Ni: 0,29 Se: 1,15 Zn: 0,27	KIANI <i>et al.</i> , 2022
Fórmula infantil	As, Cd, Pb e Hg	MAD (0,2 g de amostra, 5 mL de HNO ₃ 65%)	GF AAS	(µg L ⁻¹) Al: 0,009 Cd: 0,036	BAŞARAN, 2022

				Pb: 0,042 Hg: 0,078	
Fórmulas infantis e alimentos para bebês	As, Cd e Pb	MAD (0,4 g da amostra, 8 mL de HNO ₃ , 2 mL de H ₂ O ₂)	ICP-MS	(µg L ⁻¹) As: 0,09 Cd: 0,10 Pb: 0,11	KILIC <i>et al.</i> , 2018
Fórmulas infantis e leite em pó (integral e desnatado)	Bi, Cd, Pb, Co, Ni, Ti e Y	MAD (0,25 g de amostra, 3,8 mL de HNO ₃ , 0,1 mL de HF 40%) MAD (1 g de amostra, 8 ml KClO ₃ 7%, HNO ₃ 4,5 mol L ⁻¹)	ICP-MS	Não informado	SAGER, MCCULLOCH & SCHODER, 2018
Leite em pó e papinhas (à base de arroz e à base de trigo)	Fe	Digestão via úmida (2 g de amostra, 10 mL de HNO ₃ , 450°C por 24 h, HCl 0,2 mol L ⁻¹)	DPASV	Não informado	JANNAT <i>et al.</i> , 2017
Fórmulas infantis	Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Se e Zn	MAD (2 mL de amostra, 7 mL de HNO ₃ e 1 mL de H ₂ O ₂)	ICP-MS	(µg L ⁻¹) Cd: 0,04 Pb: 0,04 Cu: 0,23 Cr: 0,18 Fe: 0,27 Mn: 0,14 Ni: 0,11	BARGELLINI <i>et al.</i> , 2016

				Se: 0,15 Zn: 0,55	
Fórmula infantil e cereais (arroz, milho e aveia)	Ca, Fe, P, Mg, Mn, Se, Na e Zn	Digestão por via úmida (0,5 g de amostra, 5 mL de HNO ₃ e 2 mL de H ₂ O ₂ , 140 °C por 5 h)	ICP OES ET AAS	(ng g ⁻¹) 3,74	SILVA, 2015
Alimentos de desmame e Leite em pó	Cd, Cu, Pb e Zn	Digestão por via úmida (2 g de amostra, 5 mL de HNO ₃ , 450-500 °C por 24 h)	DPASV	Não informado	SADEGHI <i>et al.</i> , 2014
Fórmulas infantis à base de leite	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn	MAD (0,4 g de amostra, 6 mL de HNO ₃)	ICP OES	Não informado	SILVA <i>et al.</i> , 2013
Alimentos infantis (aves e peixe)	Ca, Fe, Mg, K, Na, Zn, Se, Mo, Co, Cu, Cr, As, Ba, Ni, Cd, Sb, Pb, Hg e Al	MAD (0,5 g de amostra, 5 mL HNO ₃ , 1,7 mL HCl, 0,5 mL de H ₂ O ₂)	ICP OES ICP-MS	Não informado	ZAND <i>et al.</i> , 2012
Alimentos infantis	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Se, Na e Zn	MAD (0,5 g de amostra, 5 mL de HNO ₃ 70%, 0,5 mL de H ₂ O ₂ 30%, 20 min)	ICP OES	Não informado	ZAND <i>et al.</i> , 2011

Fórmulas infantis	Al, Cd e Pb	<p>Digestão ácida (20 g de eletrólito, 20 g de fórmula pronta para uso, 25 mL de HNO₃ e 20 mL de HClO₄)</p> <p>Digestão ácida (20 g de eletrólito, 10 g de fórmula líquida conc., 25 mL de HNO₃ e 20 mL de HClO₄)</p> <p>Digestão ácida (20 g de eletrólito, 10 g de fórmula em pó conc., 25 mL de HNO₃ e 20 mL de HClO₄)</p>	ICP-MS	<p>(ng g⁻¹)</p> <p>À base de leite</p> <p>Al: 440</p> <p>Cd: 0,23</p> <p>Pb: 0,9</p> <p>À base de soja</p> <p>Al: 730</p> <p>Cd: 1,18</p> <p>Pb: 1,45</p>	DABEKA <i>et al.</i> , 2011
Fórmulas infantis e leites	Ca, Cd, Pb e Zn	<p>MAD (0,4 g amostra em pó, 5 mL HNO₃, 2,5 mL H₂O₂)</p> <p>MAD (1,0 mL de amostra líquida, 5 mL HNO₃, 2,5 mL H₂O₂)</p>	AVS	<p>(µg L⁻¹)</p> <p>Ca: 0,206</p> <p>Cd: 0,62</p> <p>Pb: 2,71</p> <p>Zn: 1,89</p>	CASTRO <i>et al.</i> , 2010
Fórmula infantil	Al, Cd e Pb	MAD (0,2 g de amostra, 2 mL de HNO ₃ -H ₂ O ₂)	GF AAS	<p>(µg L⁻¹)</p> <p>Al: 1,2</p> <p>Cd: 0,05</p> <p>Pb: 0,55</p>	KAZI <i>et al.</i> , 2009
Fórmulas Infantis	Al, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Se e Zn	Decomposição por via seca (1 g de amostra, 1-2 mL de HNO ₃)	GF AAS	<p>(mg L⁻¹)</p> <p>Cu: 0,013</p> <p>Zn: 0,019</p>	SARACOGLU <i>et al.</i> , 2007

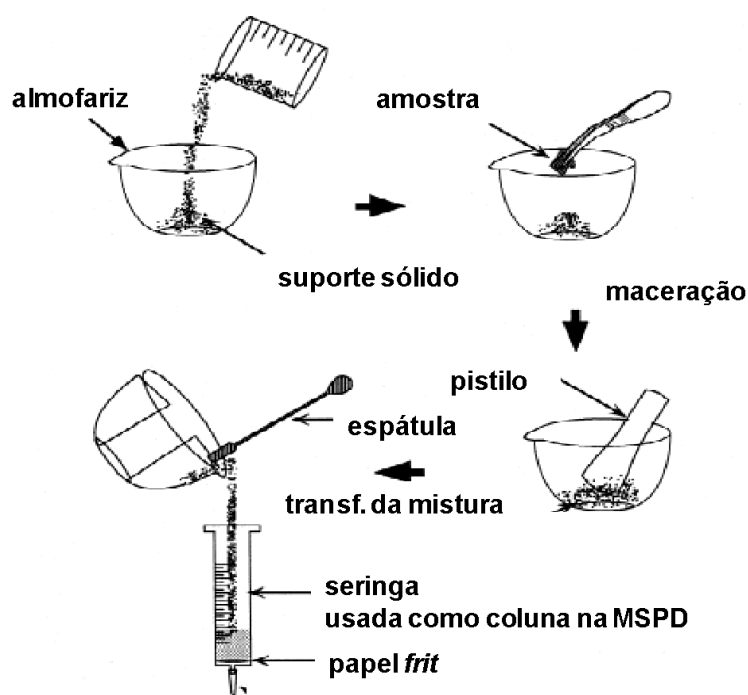
		Digestão por via úmida (1 g de amostra e 16 mL HNO ₃ :H ₂ O ₂ 6:2)		Fe: 0,011 Mn: 0,010	
		Digestão por micro-ondas (1 g de amostra, 6 mL de HNO ₃ e 2 mL de H ₂ O ₂)			
Alimentos infantis	Cd, Pb e Se	MAD (1-2 g de amostra, 3 mL de HNO ₃ e 0,5 mL de H ₂ O ₂)	ET AAS	(ng g ⁻¹) Cd: 0,4 Pb: 3,4 Se: 5,2	VIÑAS, MARTÍNEZ E CÓRDOBA, 2000
Fórmulas Infantis	Ca, Fe, Mg, K, Na e Zn	UAE (0,25 g de amostra, HNO ₃ ou HCl 50% (v/v))	FAAS	(mg kg ⁻¹) Ca: 96 Fe: 13 Mg: 0,48 K: 14 Na: 137 Zn: 12	GAMELA <i>et al.</i> , 2019

2.6 Dispersão da matriz em fase sólida

2.6.1 Princípios básicos

A MSPD foi proposta por Barker *et al.* (1989) para a extração de drogas e seus metabólitos de músculo bovino, sendo uma alternativa para o preparo de amostras viscosas, sólidas ou semissólidas. A MSPD baseia-se na maceração da amostra com um suporte sólido abrasivo. Logo após a maceração, a mistura (amostra e suporte sólido) é empacotada em uma coluna vazia ou em cartuchos empregados na SPE. Em seguida, a mistura é eluída com um solvente que tenha interação com o analito empregando um sistema sob vácuo. Na Figura 1, estão representadas as etapas da MSPD original (BARKER *et al.*, 1989).

Figura 1 - Esquema da MSPD original.

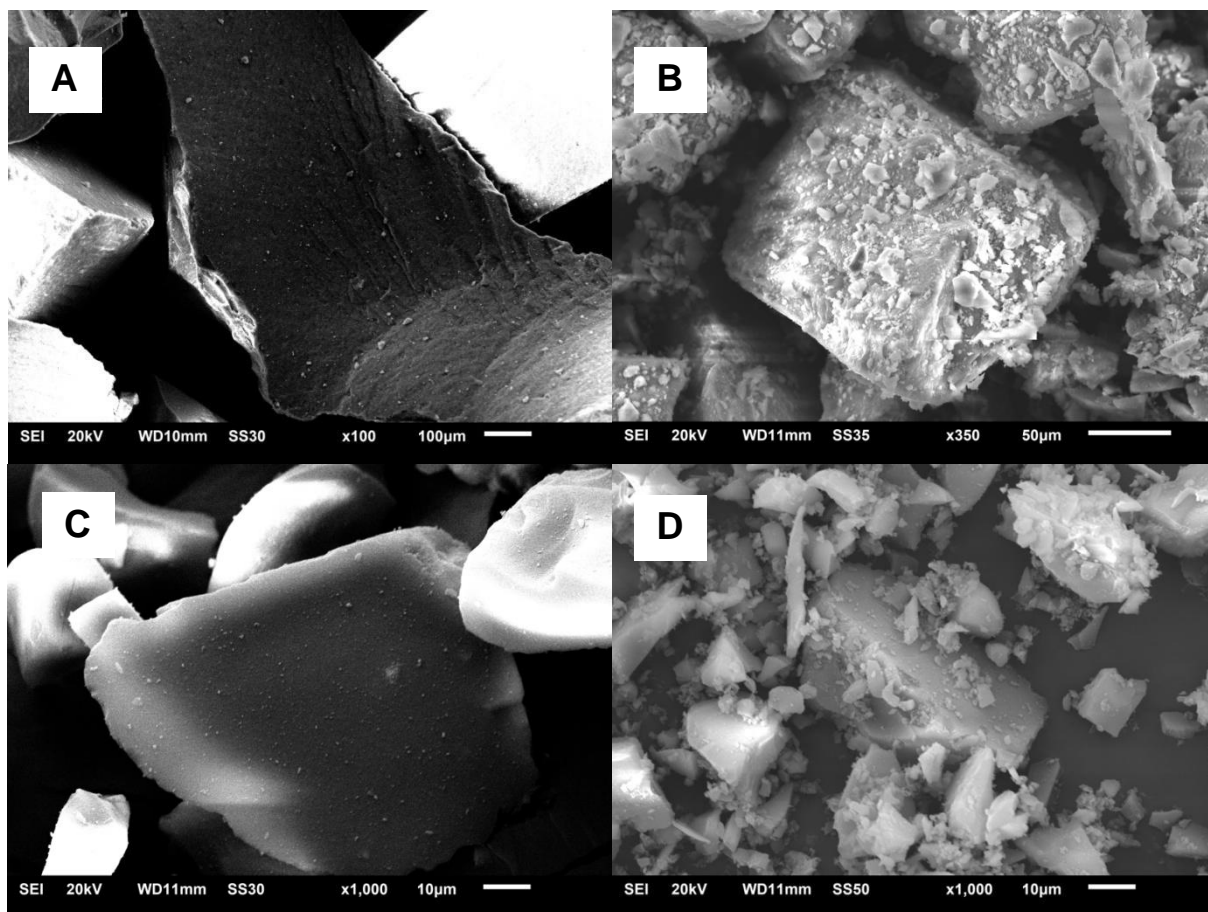


Fonte: Adaptado de Barker *et al.* (1989).

Durante a maceração ocorre a dispersão da amostra na superfície de um suporte sólido, promovendo a ruptura da estrutura física da amostra e diminuindo a interação entre o analito e os demais constituintes da matriz expondo a matriz ao solvente de extração (BARKER *et al.*, 1989; BARKER, 2007; HOFF *et al.*, 2022). Na Figura 2, é possível visualizar o efeito da dispersão da matriz na superfície do suporte

sólido. Nas Figuras 2a e 2c, estão representadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos suportes sólidos florissil e sílica, respectivamente. Nas Figuras 2b e 2d estão demonstrados os suportes sólidos após a etapa de maceração juntamente com amostras de sedimento marinho. É possível observar as pequenas partículas de amostra dispersas na superfície dos suportes sólidos após 5 min de maceração.

Figura 2 - Imagens de MEV representando a etapa de dispersão da MSPD, empregando amostras de sedimento marinho: (a) florissil; (b) florissil + amostra; (c) sílica; (d) sílica + amostra.



Fonte: Adaptado de Caldas *et al.* (2013a).

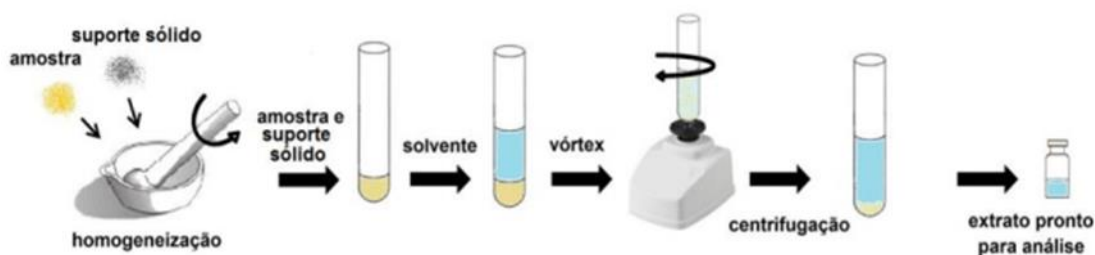
2.6.2 Modificações da MSPD

Algumas modificações têm sido propostas na MSPD original, como a MSPD utilizando esferas em um tubo de polipropileno (BiT-MSPD) (KEMMERICH *et al.*,

2020), MSPD assistida por ultrassom (UA-MSPD) (GUIMARÃES *et al.*, 2023), o emprego de nanotubos de carbono de paredes múltiplas na etapa de dispersão (MWCNTs-MSPD) (DENG *et al.*, 2015), agitação em vórtex na presença do solvente de extração (CALDAS *et al.*, 2013b; DUARTE *et al.*, 2012; MALINOWSKI *et al.*, 2022; LUCKOW, 2022), entre outras. As modificações têm por objetivo a redução de tempo, reagentes, custos e minimizar o número de etapas de preparo de amostra.

Sebastià *et al.* (2010) sugeriram uma modificação na MSPD original, através da substituição da etapa de empacotamento da mistura em cartuchos de SPE pela transferência da mistura para tubos de vidro de fundo cônico. A etapa de eluição também foi substituída pela adição do solvente de extração no tubo de vidro com posterior agitação em vórtex e centrifugação. Caldas *et al.* (2013b), empregaram a mesma modificação e utilizaram a nomenclatura dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD), com o objetivo de reduzir o tempo de extração, melhorar a eficiência de extração devido o maior tempo de contato da amostra com o solvente, além da diminuição do número de etapas. Na Figura 3, estão representadas as etapas envolvidas na VA-MSPD.

Figura 3 - Esquema com as etapas da VA-MSPD.



Fonte: Adaptado de CALDAS *et al.* (2013b).

A eliminação da etapa de empacotamento da amostra (após a sua maceração com o suporte sólido) melhora, em tese, os RSDs das extrações, pois o empacotamento pode gerar caminhos preferenciais durante a eluição. Além disso, os empacotamentos não são reproduzíveis por ser uma etapa manual. Desde então, a substituição do empacotamento pela transferência da mistura para tubos de PP juntamente com a substituição da etapa de eluição pela etapa de agitação em vórtex tem sido bastante empregada (CALDAS *et al.*, 2013b; DUARTE *et al.*, 2012;

MALINOWSKI *et al.*, 2022; LUCKOW, 2022; ROMBALDI *et al.*, 2015; HERTZOG *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2018).

2.7 MSPD e a Química Analítica Verde

Pensando em um meio ambiente mais limpo e seguro, a Química tem se dedicado a minimizar os impactos ambientais causados pelo descarte indevido de resíduos, incluindo indústrias, laboratórios, hospitais, entre outros. Com isso, foi proposto por Gałuszka, Migaszewski & Namiesnik (2013), o desenvolvimento de métodos buscando a proteção do meio ambiente, principalmente na área da Química Analítica. Para isso, foram estabelecidos os 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC). Todos os princípios são importantes do aspecto químico, mas vale ressaltar alguns que têm ganhado destaque como: Integrar processos e operações analíticas visando reduzir o consumo de energia e reagentes (princípio número 4); automatizar e miniaturizar os métodos (princípio número 5); reduzir o volume de resíduos e dispor adequadamente aqueles que são gerados (princípio número 7); priorizar o uso de reagentes de fontes renováveis (princípio número 10) e eliminar ou substituir reagentes tóxicos (princípio número 11).

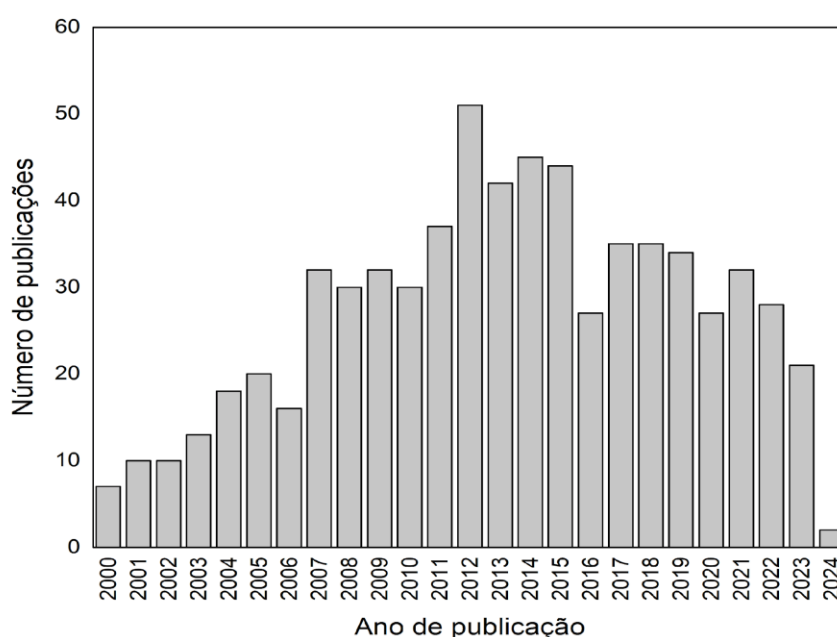
Visando seguir os princípios da GAC, o emprego de suportes sólidos (verdes), menos etapas no preparo de amostra, utilização de menor massa e/ou volume de amostra e menor volume e concentração de reagentes, levando a uma menor geração de resíduos, utilização de solventes menos tóxicos, a MSPD pode ser uma alternativa viável de aplicação como método de preparo de amostra para determinação elementar.

Dessa forma, propostas de trabalhos recentes têm investigado o emprego de diversos suportes sólidos, sendo eles sintéticos ou naturais (oriundos de fontes renováveis). Entre os sintéticos, destacam-se C18, C8, alumina, florissil, sílica (CAPRIOTTI *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2012) e MWCNTs (DENG *et al.*, 2015). Entre os naturais, terra diatomácea (RADIŠIĆ *et al.*, 2013; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2012), areia do mar (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; LUCKOW, 2022; MALINOWSKI *et al.*, 2022), quitosana, quitina e concha de mexilhão (CALDAS *et al.*, 2013; ROMBALDI *et al.*, 2015; HERTZOG *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2018) têm sido reportados na literatura.

2.8 Aplicações da MSPD

Existem muitos trabalhos na literatura que aplicam a MSPD como método de preparo de amostra para a extração de compostos orgânicos. Em uma pesquisa na plataforma *Web of Science* pelas palavras-chave “*matrix solid-phase dispersion*” e “MSPD” foram encontrados 720 trabalhos, incluindo artigos de revisão e artigos originais. Na Figura 4, estão apresentados os trabalhos que empregaram a MSPD como método de preparo de amostra nos últimos 24 anos.

Figura 4 - Publicações na plataforma *Web of Science*, contendo as palavras-chave “*matrix solid-phase dispersion*” e “MSPD”, nos últimos 24 anos.



De 1999 até 2012 houve um crescimento no número de publicações envolvendo o tema MSPD, se mantendo constante até 2015 e posteriormente houve uma ligeira queda. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos que empregam a MSPD o fazem para a extração de compostos orgânicos, como agrotóxicos, hormônios, micotoxinas, drogas, entre outros. Até o momento, poucos estudos têm aplicado a MSPD como preparo de amostras para a determinação elementar ou análise de especiação. Na Tabela 5, constam os trabalhos que empregaram a MSPD para a determinação elementar ou análise de especiação.

Tabela 5 – Trabalhos reportados na literatura empregando a MSPD e suas derivações para a determinação elementar ou análise de especiação.

Amostras	Elementos ou espécies químicas	Preparo de amostra	Técnica de determinação	LOD	Referência
Ervas medicinais	As	UA-MSPD (50 mg amostra, AADES 2, 40 kHz, 4000 rpm 10 min)	ICP-MS	($\mu\text{g g}^{-1}$) 0,039	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2023
Algas comestíveis	As(III), As(V), DMA, MMA	MSPD (0,25 g de amostra, 0,25 g de areia, 10 mL de água ultrapura)	LC-ICP-MS	($\mu\text{g g}^{-1}$) DMA: 0,10	LUCKOW, 2023
Algas marinhas	Br, Cl, F e I	MSPD (0,1 g de amostra, 1 g de areia do mar, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L ⁻¹)	IC	($\mu\text{g g}^{-1}$) Br: 19 Cl: 26 F: 27 I: 28	MALINOWSKI <i>et al.</i> , 2022

Frutos do mar	Cd	MSPD (0,21 g de amostra, 0,13 g de PEI, 8 mL HNO ₃ 50%/H ₂ O ₂ (v/v))	FT-IR SEM/EDAX DRX	($\mu\text{g kg}^{-1}$) 2,5	WANG <i>et al.</i> , 2018
Peixe	Hg	MWCNTs-MSPD (1 g de peixe, 0,5 mg MWCNTs, 5 min de maceração, 0,15 g C18, 100 μL (0,5 % L-cisteína: 4% HCOOH))	SD-SEGD-CVG	($\mu\text{g L}^{-1}$) 0,01	CHEN <i>et al.</i> , 2017
Algas marinhas	KI, MIT, DIT	MSPD (50 mg de amostra, 50 mg SBA-15, 0,4 mL de 0,2 mM IL [C12 mim]Br)	UHPLC-UV	(ng mL^{-1}) KI: 3,7 MIT: 9,1 DIT: 16,7	CAO <i>et al.</i> , 2016
Peixe	CH ₃ Hg ⁺ e Hg ²⁺	MSPD (1 mg de amostra, 2 mg de MWCTNs, 100 μL de 2% HCl (v/v) e 1,5% L-cisteína (m/v))	LC-ICP-MS	(ng g^{-1}) Hg ²⁺ : 0,00099 CH ₃ Hg ⁺ : 0,0084	DENG <i>et al.</i> , 2015

Peixe	CH ₃ Hg ⁺ e Hg ²⁺	MSPD (0,2 g de peixe, 0,5 g SiO ₂ , HCl 4,2 mol L ⁻¹ , NaCl 0,5 mol L ⁻¹)	GC-MS	(μg g ⁻¹) Hg ²⁺ 0,06 CH ₃ Hg ⁺ 0,12	DUARTE <i>et al.</i> , 2013
Frutos do mar	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB e AsC	MSPD (0,25 g de amostra, 1,75 g de terra diatomácea, 2 mL metanol e 3 mL de água)	ICP-MS	(μg g ⁻¹) As(III): 0,0064 As(V): 0,0233 MMA: 0,0174 DMA 0,0135 ASC 0,0097	MOREDA- PIÑEIRO <i>et al.</i> , 2012
Sedimento	Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Sr e Zn	MSPD (0,5 g de sedimento, 1 g de areia do mar, 10 mL de CH ₃ COOH 0,11 mol L ⁻¹)	ICP-MS	(ng g ⁻¹) Cd: 0,0057 Co: 0,133 Cr: 2,99 Sr: 1,22 Mn: 1,71 Ni: 0,498 Zn: 39,8	MARTÍNEZ- FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2011

Malinowski *et al.* (2022) empregaram a MSPD modificada para a determinação de halogênios (Cl, F, Br e I) em algas comestíveis (Nori, Hijiki, Wakame e Kombu) por cromatografia de íons (IC). Neste trabalho, uma areia coletada na Praia de Bojuru no município de São José do Norte - RS foi utilizada como suporte sólido e uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L⁻¹ foi empregada como solução extratora. Luckow (2023) empregou a MSPD modificada para a extração de espécies de As (arsenito, As(III); arseniato, As(V); ácido monometilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsônico, DMA) em algas comestíveis para posterior determinação por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). Neste trabalho, foi utilizada a mesma areia do trabalho supracitado (como suporte sólido) e apenas água foi utilizada como solvente extrator. Wang *et al.* (2018) empregaram a MSPD original para determinação de Cd em amostras de frutos do mar (lula e surumi) através das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura/análise de energia dispersiva de raios X (SEM/EDAX) e difração de raios X (DRX). Neste estudo, foi empregado uma modificação da atapulgita com a polietilenoimina (PEI) como suporte sólido, com uma solução de 8 mL HNO₃ e H₂O₂ 1:1 (v/v), aquecido a 95 °C e diluído a 25 mL. Cao *et al.* (2016) empregaram a MSPD para determinação de iodeto de potássio (KI), monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) em algas marinhas, utilizando como suporte sólido Santa Bárbara Amorfo-15, para posterior determinação por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (UV-HPLC).

Guimarães *et al.* (2023) empregaram a UA-MSPD para determinação de As em amostras de ervas medicinais por ICP-MS. Deng *et al.*, (2015) empregaram a MSPD para determinação de espécies de mercúrio (CH_3Hg^+ e Hg^{2+}) em tecidos de peixe, utilizando MWCNTs como suporte sólido. Para eluição, foi utilizado 100 µL de HCl 2% (v/v) e L-cisteína (m/v) 1,5%, com posterior determinação por LC-ICP-MS. Duarte *et al.* (2013), empregaram a MSPD (modificada através do uso de vórtex), para a extração de espécies de mercúrio (CH_3Hg^+ e Hg^{2+}) em tecidos de peixe, utilizando SiO₂ como suporte sólido, solução contendo HCl 4,2 mol L⁻¹ e NaCl 0,5 mol L⁻¹ como solução extratora e determinação por GC-MS. Moreda-Piñeiro *et al.* (2012) empregaram a MSPD como método de preparo de amostra para determinação de As(III), As(V), MMA, DMA, arsenobetaína (AB) e arsenocolina (AC) em amostra de frutos do mar (peixe branco, peixes de água fria e moluscos), utilizando terra

diatomácea como suporte sólido na MSPD, as espécies de arsênio foram eluídas com 10 mL metanol/água ultrapura (50/50) e a determinação por ICP-MS. Martínez-Fernández *et al.* (2011) determinaram Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Sr e Zn por ICP-MS em amostras de sedimentos, utilizando areia do mar como suporte sólido verde.

Estes foram os trabalhos encontrados na literatura até o momento que investigaram a MSPD para a extração de elementos ou espécies químicas. Em comparação com a aplicação da MSPD como método de preparo de amostra para análise orgânica, verifica-se poucos trabalhos na literatura e, até o presente momento, não foi encontrado nenhum trabalho aplicando a MSPD para extração de Cu em alimentos infantis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

As determinações de Cu foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), modelo ContraAA 700 (Analytik Jena, Alemanha) equipado com atomizadores por forno de grafite e por chama. O equipamento conta com uma lâmpada de arco curto de Xenônio (Analytik Jena), cuja emissão de radiação compreende a faixa contínua de 185 a 900 nm. O monocromador de alta resolução (DEMON, do inglês *double-echelle* monochromator) é constituído por um prisma para pré-seleção de ordens espectrais, seguido de uma fenda intermediária ajustável e uma rede *Echelle*. Nas determinações de Cu por HR-CS FAAS (empregada no método proposto) e HR-CS GF AAS (empregada no método comparativo), foi utilizada a linha de ressonância principal em 324,754 nm. Todas as medições de Cu por HR-CS AAS foram feitas monitorando o pixel central (CP) ± 1 . Nas Tabelas 6 e 7, estão apresentadas as condições instrumentais utilizadas nas determinações de Cu por HR-CS GF AAS e por HR-CS FAAS, respectivamente.

Tabela 6 - Programa de temperatura empregado nas determinações de Cu por HR-CS GF AAS.

Nome	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Permanência (s)	Tempo (s)	Vazão de Ar (L min ⁻¹)
Secagem 1	80	6	20	29,2	2,0
Secagem 2	90	3	20	23,3	2,0
Secagem 3	110	5	10	14,0	2,0
Pirólise 1	350	50	20	24,8	2,0
Pirólise 2	1100	300	10	12,5	2,0
Auto zero	1100	0	5	5,0	0
Atomização	2000	1500	4	4,6	0
Limpeza	2450	500	4	4,0	2,0

Tabela 7 - Condições instrumentais empregadas nas determinações de Cu por HR-CS FAAS.

Comprimento de onda (nm)	Vazão de C ₂ H ₂ -Ar (L h ⁻¹)	Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	Altura da leitura (nm)
324,754	50	5	6

Para a decomposição das amostras, foi utilizado um forno micro-ondas modelo Mars Xpress Technology Inside (CEM, USA), com capacidade para 40 tubos de Teflon[®]. Para as determinações de carbono orgânico total (TOC) nos extratos da MSPD foi utilizado um analisador de TOC modelo TOC-L-CPN (Shimadzu, Japão). Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica modelo AG220A (Gehaka, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Para a filtração dos extratos da MSPD foram utilizadas seringas de polipropileno, com capacidade de 5 mL (Luer Lock DESCARPACK, Brasil) e filtros de Nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (Unichros, China). Os extratos da MSPD foram submetidos a agitação em agitador vórtex modelo K45-2810 (KASVI, Brasil) e centrifugação em centrífuga modelo Q222T (QUIMIS, Brasil) com capacidade para 12 tubos de 15 mL e velocidade máxima de 4000 rpm. Para a secagem de vidrarias (após descontaminação) e suportes sólidos (após descontaminação) foi utilizada uma estufa modelo EASY (Solidsteel, Brasil). Para as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos suportes sólidos e amostra, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo SM 6610 LV (Jeol, Japão) acoplado com microsonda de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Para a determinação de lipídeos pelo Método de Geber, foi utilizada uma centrífuga modelo 8BTF (ITR, Brasil) com capacidade para 8 tubos de butirômetro e um sistema de aquecimento em banho-maria modelo NI 1248 (NOVA, Brasil). Para determinação de proteínas fez se o uso do Método de Kjeldahl e a decomposição das amostras foi feita em um bloco digestor com 40 provas modelo LUCA 23/02 (Lucadema, Brasil) e um destilador de nitrogênio modelo TE - 036/1 (Tecnal, Brasil).

3.2 Reagentes

As soluções de referência foram preparadas com água ultrapura purificada em um sistema de purificação (resistividade 18,2 M Ω cm) modelo Direct-Q UV3® (Millipore, USA). As soluções extratoras da MSPD foram preparadas a partir de HNO₃ 65% (Merck, Alemanha), o qual foi destilado em um destilador de ácidos *sub-boiling* modelo DuoPUR® (Milestone, Itália). O mesmo reagente destilado também foi empregado nas digestões assistidas por micro-ondas. Para o preparo das soluções de calibração, foram feitas diluições a partir de soluções estoque de Cu 1000 mg L⁻¹ (SpecSol, Brasil). Os suportes sólidos avaliados foram alumina (Sigma Aldrich), C18 (Sigma Aldrich), florisil 100-200 mesh (Sigma Aldrich), sílica (Sigma Aldrich), terra diatomácea (Sigma Aldrich) e areia (coletada na Praia do Bojuru, localizada na cidade de São José do Norte-RS, Brasil). Para descontaminação e limpeza das vidrarias utilizadas durante o trabalho, foram utilizados uma solução de HNO₃ 20% (v/v) e detergente Extran® neutro (Merck). Para o método de Gerber foram preparadas soluções a partir H₂SO₄ (Alphatec, Brasil) 88% (v/v) e álcool isoamílico (Synth, Brasil). Para o método de Kjeldahl, foi utilizado H₂SO₄ 98% (Isofar, Brasil) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 35% (Êxodo Científica, Brasil) para a decomposição das amostras. Ainda no método de Kjeldahl, fenolftaleína P.A. (Êxodo Científica), vermelho de metila 0,1% (Êxodo Científica) e verde de bromocresol P.A. 0,1% (Êxodo Científica) (indicador misto) foram empregados como indicadores, além de solução de NaOH 40% preparada a partir de NaOH (Sigma Aldrich), solução de H₃BO₃ 4% preparada a partir de H₃BO₃ (Êxodo Científica) e solução de HCl 0,11 mol L⁻¹ preparado a partir de HCl 37% (Synth).

3.3 Amostras

As amostras de alimentos infantis foram obtidas no comércio local da cidade de Rio Grande - RS. A escolha foi feita considerando alimentos enlatados industrializados como fórmulas infantis para alimentação de lactentes (0 a 12 meses) e crianças de primeira infância (12 a 36 meses), além de alimentos enlatados para crianças com idades superiores como leite em pó e composto lácteo. Na Tabela 8, estão apresentadas as amostras utilizadas neste trabalho.

Tabela 8 - Amostras de alimentos infantis utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

Amostra	Tipo	Indicação/composição
Amostra 1	Fórmula infantil de partida	Para crianças de 0 a 6 meses
Amostra 2	Fórmula infantil de seguimento	Para crianças de 6 a 12 meses
Amostra 3	Fórmula infantil de seguimento	Para crianças de 12 a 36 meses
Amostra 4	Leite em pó	Integral
Amostra 5	Leite em pó	Semidesnatado
Amostra 6	Composto lácteo	Zero lactose

3.4 Determinação da composição centesimal das amostras

3.4.1 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi feita através de secagem em estufa, utilizando 3 g de amostra (pesadas em cápsula platina), a qual foi submetida a aquecimento a 105 °C por 3 h. Após, as amostras foram resfriadas em dessecador (até atingir a temperatura ambiente), pesadas e submetidas novamente a aquecimento e resfriamento até atingir massa constante (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

3.4.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas nas amostras foi feita com base no método oficial (AOAC 945.46, 1995) da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), descrito para leites e derivados, utilizando 3 g de amostra, pesadas em cadinhos de porcelana, os quais foram colocados no interior de um forno tipo mufla a 550 °C por 4 h. Após, os cadinhos foram colocados em dessecador para resfriamento (até a temperatura ambiente), pesadas e submetidas novamente a aquecimento e resfriamento até atingir massa constante.

3.4.3 Determinação do teor de proteínas pelo método de Kjeldahl

A determinação do teor de proteínas nas amostras foi feita com base no método oficial (AOAC 991.20, 1995) da AOAC, descrito para fórmulas infantis a base de leite, utilizando o método de determinação de nitrogênio total por Kjeldahl. Para a decomposição das amostras, foi preparado o catalisador contendo 3 g de K_2SO_4 e 0,03 g de Se metálico. Após, 0,2 g de amostra foram pesadas e 0,7 g da mistura catalítica, os quais foram adicionados nos tubos de digestão juntamente com 7 mL de H_2SO_4 98% e 3 mL de H_2O_2 35%. O programa de aquecimento utilizado foi: *i*) 100 °C por 10 min; *ii*) 200 °C por 10 min; *iii*) 250 °C por 30 min e *iv*) 350 °C por 1 h. Em seguida, os tubos e foram resfriados a temperatura ambiente. A segunda etapa foi a destilação. Após a decomposição, foram transferidas as soluções dos tubos digestores para os tubos de destilação e foram adicionadas de 3 a 4 gotas de fenolftaleína. O tubo de destilação foi posicionado com a amostra e foram adicionados 40 mL de NaOH 40% no recipiente superior do destilador. Em seguida, foi aberto lentamente o recipiente contendo o NaOH e 50 mL de água destilada foram adicionados. Na saída do destilador, utilizou-se um erlenmeyer contendo 10 mL de H_3BO_3 4% e 4 gotas de indicador misto. Após, foi iniciado o aquecimento, recolhendo 125 mL de amostra, a qual foi titulada com HCl 0,11 mol L⁻¹. Na última etapa da titulação, após a destilação, foi utilizada uma solução de H_3BO_4 4% e com uma solução de HCl 0,11 mol L⁻¹. Os cálculos para determinação de nitrogênio total e a quantificação de proteína utilizou as seguintes Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\% NT = \frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,014 \times 100}{P_1} \quad (1)$$

onde, *NT*: teor de nitrogênio total na amostra (em %); V_a : volume da solução de HCl 0,11 mol L⁻¹ gasto na titulação (em mililitros); V_b volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (em mililitros); *F* fator de correção do ácido clorídrico 0,11 mol L⁻¹; P_1 massa de amostra (em gramas).

$$\% Proteína = \% NT \times FN \quad (2)$$

onde, % Proteína teor de proteína bruta na amostra (percentagem); %NT teor de nitrogênio total na amostra (percentagem) e FN fator de conversão. A Tabela 9

apresenta uma lista de alimentos e o fator de conversão do nitrogênio total em proteínas (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

Tabela 9 – Fator de conversão de nitrogênio total em proteínas em diferentes amostras de alimentos.

Alimento	Fator
Leite e produtos lácteos	6,38
Trigo e derivados	5,70
Gelatina	5,55
Ovos	6,68
Arroz	5,95
Soja	5,71
Aveia, cevada, centeio	5,83
Nozes	5,46

Fonte: adaptado Instituto Adolf Lutz (2008).

3.4.4 Método de Gerber

Para a determinação de lipídeos nas amostras foi utilizado o Método de Gerber, o qual se baseia na emulsão do óleo e água pela adição de H_2SO_4 e álcool isoamílico, em uma vidraria denominada Butirômetro (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). O método de Gerber consistiu na adição de 11 mL de amostra homogeneizada, 10 mL de H_2SO_4 88% (v/v) e 1 mL de álcool isoamílico no Butirômetro. Após a adição dos reagentes e amostra, o Butirômetro foi fechado com uma rolha e envolvido com um pano, o qual foi submetido a agitação manual, a fim de promover a mistura completa dos reagentes e amostra. Em seguida, as misturas foram centrifugadas por 5 min a 1200 rpm e, após, as misturas foram submetidas a aquecimento em banho-maria a 65 °C por 3 min. Posteriormente, os tubos foram deixados na posição vertical, para a leitura do menisco. A densidade das amostras foi determinada utilizando um lactodencímetro (em graus Quevenne), com escala graduada de 15 a 40 °Q, compreendendo a densidade entre 1,015 a 1,040 g cm⁻³. A transformação de unidades foi feita empregando a Equação 3.

$$^{\circ}\text{Quevenne} = (\text{densidade} - 1) \times 1000 \quad (3)$$

3.4.5. Determinação do teor de carboidratos

A determinação de carboidratos nas amostras foi baseada no método oficial (AOAC 986.25, 1995) da AOAC descrito para fórmulas infantis a base de leite, a partir da Equação 4.

$$\text{Carboidrato} = \text{sólidos totais} - (\text{proteínas} + \text{gorduras} + \text{cinzas}) \quad (4)$$

3.5 Descontaminação das vidrarias

Os materiais utilizados no desenvolvimento do trabalho foram enxaguados inicialmente com água ultrapura e, posteriormente, imersos em banho de HNO₃ 20% (v/v), por no mínimo 24 h. Após, foram retirados, lavados com água ultrapura e posteriormente secos em estufa antes do uso novamente, exceto balões volumétricos, pipetas graduadas e volumétricas, além de tubos de polipropileno que foram secos a temperatura ambiente.

3.6 Descontaminação dos suportes sólidos

Durante a avaliação do tipo de suporte sólido na MSPD, os suportes sólidos naturais avaliados nesse estudo foram descontaminados a fim de reduzir os valores dos brancos analíticos. Inicialmente, pesou-se 5 g de terra diatomácea e 8 g de areia de praia em tubos de PP de 50 mL e adicionou-se 20 mL de água ultrapura. Logo após, agitou-se em vórtex por 3 min e centrifugou-se por 5 min a 6000 rpm. O procedimento foi repetido 3 vezes. Repetiu-se o procedimento de limpeza com HNO₃ 2 mol L⁻¹. Os suportes sólidos foram colocados em placa de Petri e secos em estufa a 50 °C por 24 h.

3.7 Procedimento da MSPD

Para a avaliação da MSPD, utilizou-se como referência os trabalhos desenvolvidos por Malinowski *et al.* (2022) e Luckow (2023), com algumas adaptações. O procedimento MSPD foi realizado através da mistura da amostra (0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,25 g) com 0,25 g de suporte sólido (alumina, C18, terra de

diatomáceas, florissil, areia do mar ou sílica). Após, a mistura foi macerada usando um almofariz e pistilo de vidro (por 1, 3 ou 5 min) para obter uma mistura homogênea, a qual foi então transferida para um tubo de polipropileno (PP) de 15 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de uma solução de extração (água ultrapura, HNO₃ 0,1, 0,5, 1 ou 2 mol L⁻¹). O volume desta solução extratora foi dividido em duas partes: i) 2,5 mL foram adicionados diretamente ao tubo de PP, e ii) 2,5 mL foram usados para lavar a superfície do almofariz para remover qualquer resíduo de amostra. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 1 min e centrifugada 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e transferido para outro tubo de PP de 15 mL. Por fim, os extratos foram filtrados utilizando filtração simples e, posteriormente, filtrados novamente com filtros de seringa de Nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro para posterior determinação de Cu por HR-CS FAAS.

3.8 Determinação do teor de carbono orgânico total

A determinação do teor de carbono orgânico total (TOC) foi feita nos extratos da MSPD, após a avaliação do tipo de suporte sólido. O analisador de TOC utiliza o método de oxidação por combustão catalítica na temperatura de 680 °C. Todo carbono presente na amostra líquida passa a ser oxidado a dióxido de carbono (CO₂), que é detectado no detector de infravermelho não dispersivo (NDIR). A área do pico de CO₂ detectada é proporcional à concentração de carbono total na amostra. Para as análises, foi utilizado um amostrador automático. Para a calibração do instrumento, foi preparada uma curva de calibração de 20 a 1000 mg L⁻¹ de C orgânico. Durante as análises dos extratos, foram utilizados 4 mL de amostra, com um fator de diluição de 12,5 vezes.

3.9 Procedimento de decomposição por MAD

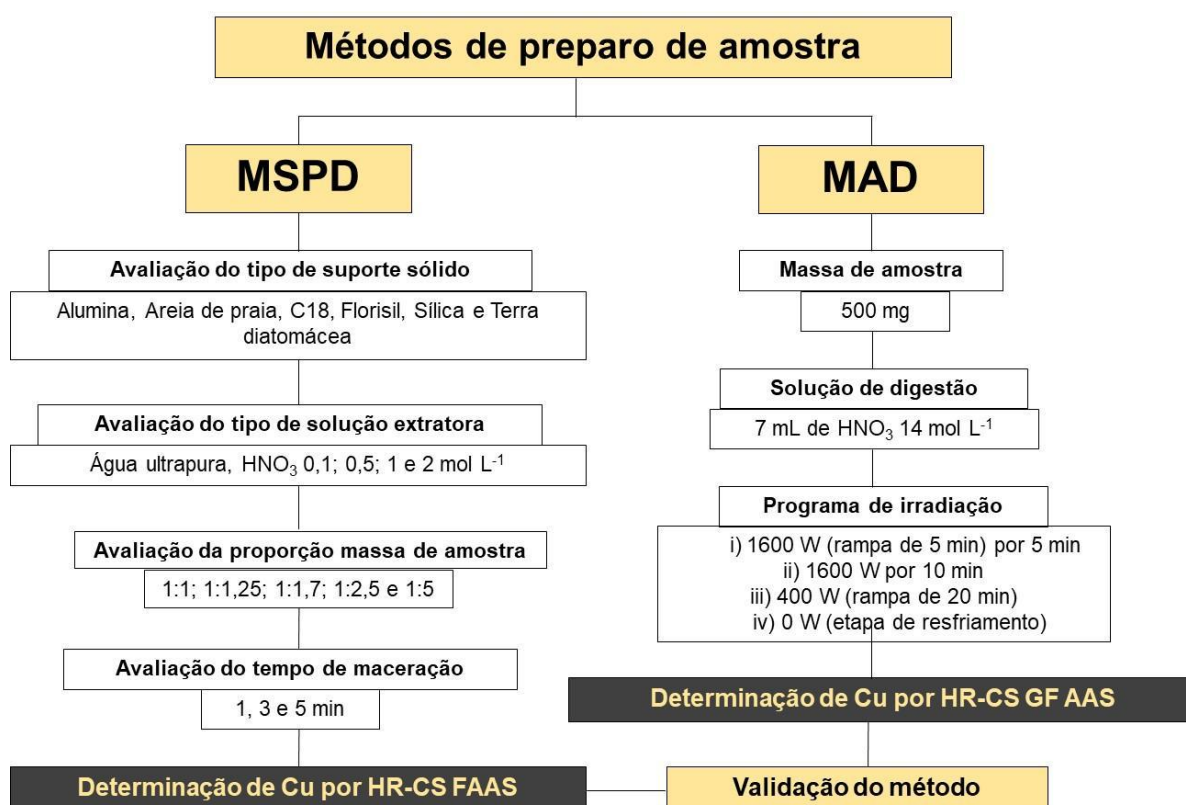
Com a finalidade de comparar os resultados obtidos pelo método proposto, foi feita a decomposição das amostras por MAD e a determinação de Cu por HR-CS GF AAS. O método de decomposição foi adaptado a partir do trabalho de Bizzi *et al.* (2011), ao qual foram pesados 500 mg de amostra e transferidos para os tubos de Teflon® com a adição de 7 mL de HNO₃ concentrado. Logo após, as amostras foram submetidas ao seguinte programa de irradiação: i) 1600 W (rampa de 5 min) por 5 min; ii) 1600 W por 10 min; iii) 400 W (rampa de 20 min); e iv) 0 W por 20 min (etapa

de resfriamento). Após o resfriamento, os digeridos foram aferidos a 35 mL com água ultrapura para posterior determinação de Cu por HR-CS GF AAS.

3.10 Fluxograma dos procedimentos empregados

Na figura 5, está apresentado um fluxograma contendo as etapas de desenvolvimento do trabalho.

Figura 5 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento deste estudo.



3.11 Análise estatística

O tratamento dos dados relativos à avaliação dos parâmetros da MSPD e durante a validação do método analítico foram executados com auxílio do *software* Microsoft Excel 2016. Ao longo da otimização da MSPD e na comparação dos resultados obtidos na validação do método, foi feito o teste *Tukey-Kramer*, com nível de confiança de 95%. Para a comparação entre 2 ou mais médias, utilizou o teste *t*. Os testes de comparação de médias foram realizados com auxílio do *software InStat GraphPad* versão 3.1.

3.12 Validação do método analítico

Segundo a ANVISA, a validação dos métodos analíticos por uma série de estudos experimentais, em que o método utilizado esteja dentro das exigências das aplicações analíticas, fornecem confiabilidade aos resultados obtidos (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). Dessa forma, nesse trabalho foram avaliados os parâmetros de LOD, LOQ, linearidade, exatidão e precisão.

3.12.1 Limite de detecção e quantificação

O valor de LOD é a menor concentração do analito na amostra que se consegue detectar durante uma análise, mas não necessariamente quantificar sobre o experimento proposto (ANVISA, 2017). O LOD pode ser determinado pelo método visual, da razão sinal ruído, através dos parâmetros da curva de calibração ou determinação do branco. Já o valor de LOQ representa a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). Os valores de LOD e LOQ foram estabelecidos pelos parâmetros da curva de calibração, considerando 3σ ($n = 10$) e 10σ ($n = 10$) para 10 leituras do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração, conforme a equação 5.

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

onde, s : é a estimativa do desvio padrão das leituras do branco analítico e S : o coeficiente angular da curva de calibração.

3.12.2 Linearidade

A linearidade é um procedimento analítico que avalia se as respostas analíticas são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A curva analítica, foi construída a partir das análises de soluções com concentrações conhecidas, normalmente diferentes diluições de uma solução padrão, podendo ser avaliada e a relação linear e toda a faixa estabelecida para o método (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). A linearidade do método foi avaliada através de curva de calibração

na faixa de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹. A partir dos dados da curva, foi estimado o coeficiente de determinação (R²).

3.12.3 Exatidão e precisão

A exatidão do método proposto foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com os obtidos por HR-CS GF AAS após a decomposição das amostras por MAD. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e avaliadas as concordâncias entre os valores obtidos pelo método aplicado com os valores de referência. A precisão foi avaliada através da repetibilidade das concentrações obtidas nas análises supracitadas.

3.13 Tratamento de resíduos

Os resíduos gerados durante a elaboração desse trabalho foram armazenados em frascos devidamente rotulados de acordo com as normas definidas pela Comissão de Resíduos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sendo posteriormente guardados em local adequado para o recolhimento pela Instituição e enviados para uma empresa responsável que fará o recolhimento e o tratamento.

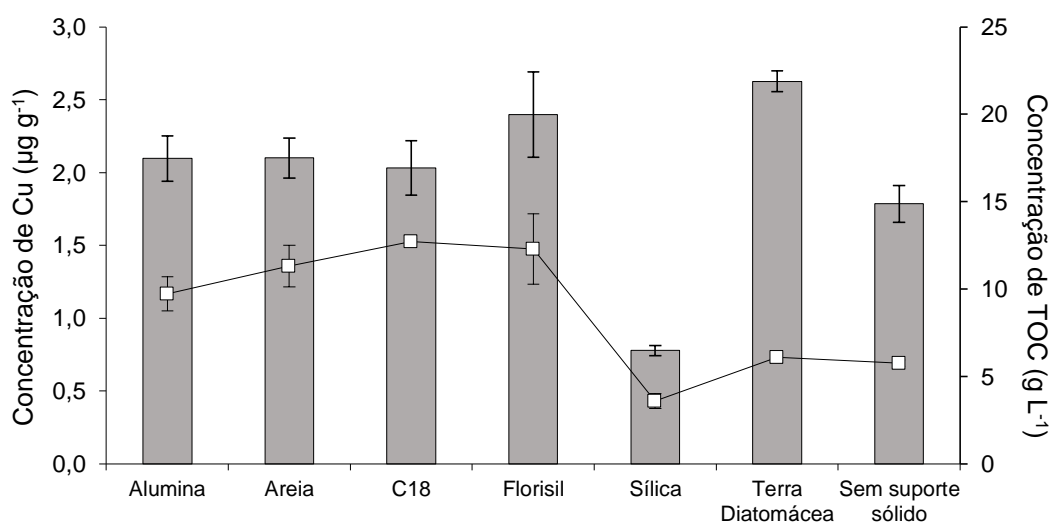
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Avaliação dos parâmetros da MSPD

4.1.1 Efeito do tipo de suporte sólido

Para a avaliação do tipo de suporte sólido e em todos os experimentos envolvendo a otimização da MSPD, a concentração de Cu foi determinada por HR-CS FAAS em amostras de fórmula infantil de seguimento (para crianças de 12 a 36 meses). Os suportes sólidos avaliados foram alumina, areia, C18, florisil, sílica e terra diatomácea, com o objetivo de avaliar o efeito do suporte sólido na extração de Cu. Também foi avaliada a não utilização de suporte sólido durante a maceração. Inicialmente, foi feita a descontaminação dos suportes sólidos terra diatomácea e areia. Na Figura 6, estão apresentados os resultados obtidos.

Figura 6 - Influência do tipo de suporte sólido na extração de Cu em amostras de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$), os marcadores (quadrados brancos) representam a concentração de TOC (g L^{-1}) e as barras de erros representam os desvios padrão.



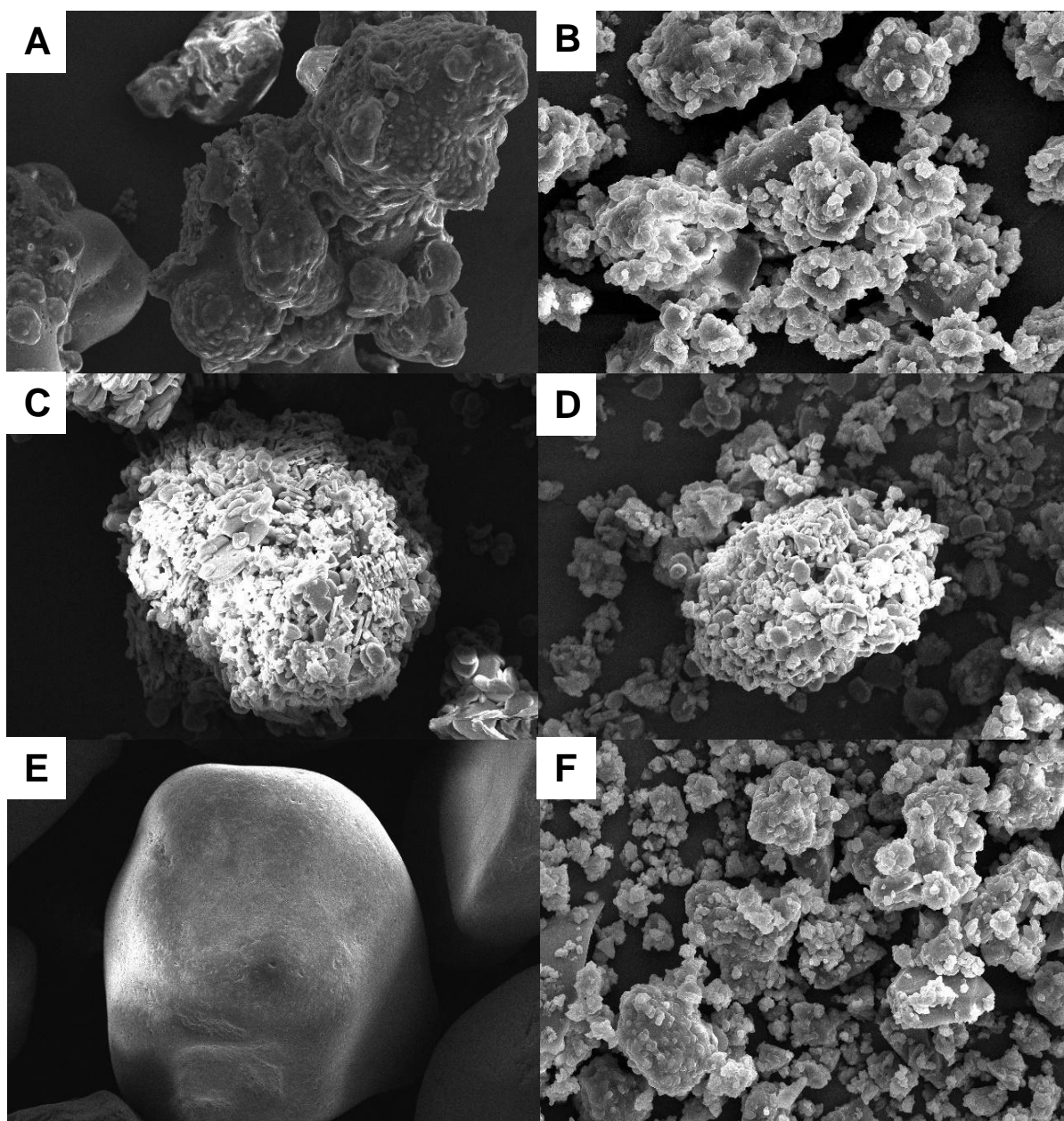
Condições: 0,25 g de amostra; 0,25 g de suporte sólido; maceração por 5 min; 5 mL de HNO_3 2 mol L^{-1} ; agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

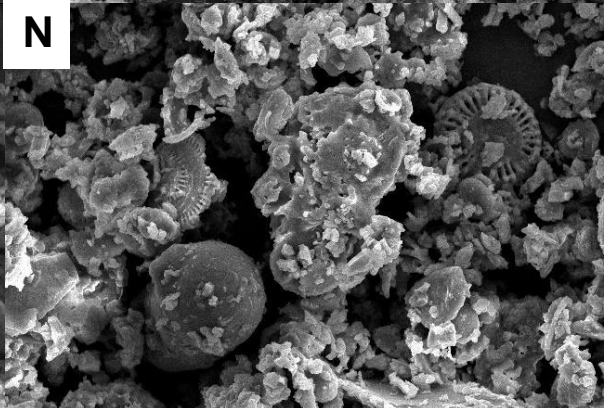
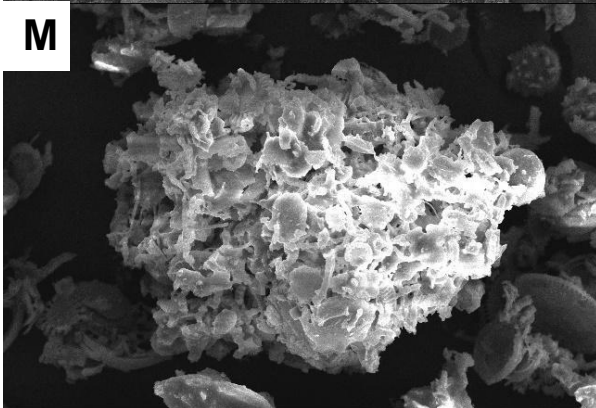
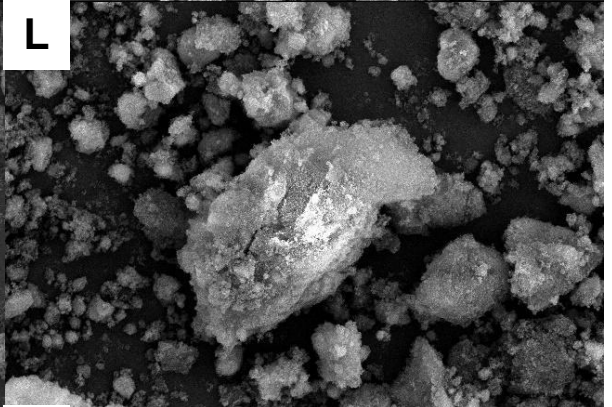
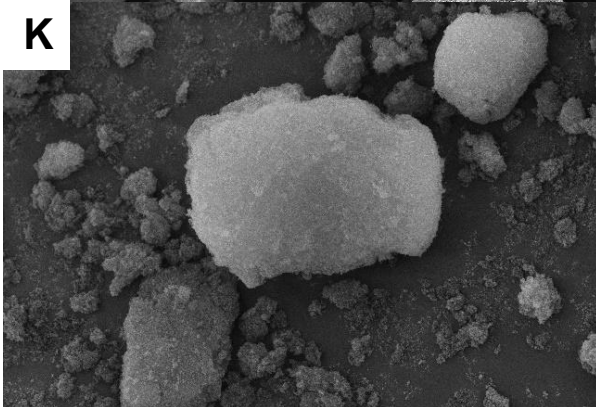
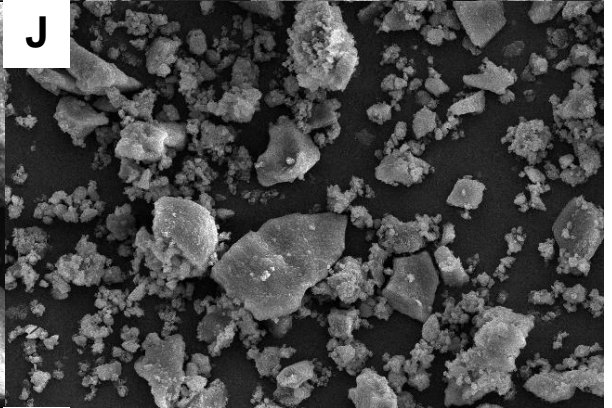
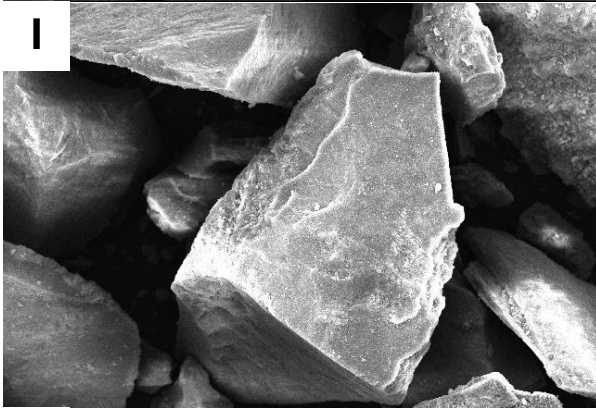
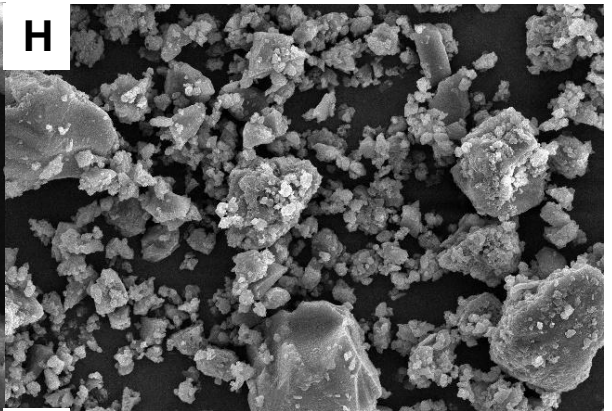
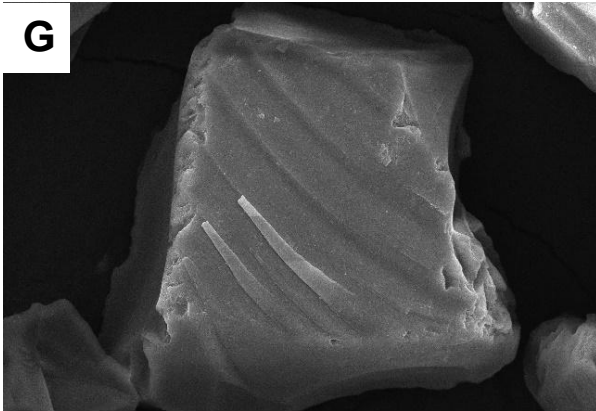
Inicialmente, para a avaliação do tipo de suporte sólido foi utilizada a proporção de 1:1 entre massa de amostra (0,25 g) e massa de suporte sólido (0,25 g), pois conforme descrito por Barker (2007), na MSPD esta proporção pode variar de 1:1 a 1:4, dependendo do tipo de amostra e do tipo de suporte sólido empregado. A solução extratora empregada nos experimentos iniciais foi HNO_3 2 mol L^{-1} e o tempo de maceração foi fixado em 5 min. A escolha do tipo de suporte sólido foi realizada com base no cálculo da concordância (em %) entre a concentração de Cu obtida nos extratos da MSPD por HR-CS FAAS e a concentração de Cu obtida na mesma amostra digerida após a MAD, por HR-CS GF AAS. A concentração de Cu obtida pelo método de referência foi $2,91 \pm 0,097 \mu\text{g g}^{-1}$.

A partir da Figura 6, pode-se verificar que os valores de concordância variaram de 27 a 90%, com relação ao valor de referência de MAD por HR-CS GFAAS. Para a alumina, areia e C18, os valores de concordância (70 a 72%) foram proporcionais, não apresentando diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$). Para a sílica, foi obtida uma concordância de 27%, demonstrando a menor extração de Cu entre os suportes avaliados. O emprego da terra diatomácea e florissil mostrou os resultados mais promissores, com valores de concordância de 90 e 82%, respectivamente. Na avaliação feita sem a presença do suporte sólido na maceração obteve-se o valor de 61% de concordância, mostrando que a presença de suporte sólido influencia na extração de Cu em fórmulas infantis empregando a MSPD.

A ruptura e dispersão da amostra na MSPD podem ser melhor demonstradas por micrografias eletrônicas de varredura (MEV) (Figuras 7a-l). Todas as imagens estão ampliadas em x1000, exceto as Figuras 7a (apenas amostra) e 7i (florissil), que estão ampliadas em x350. De acordo com Barker (2000), suportes sólidos com arestas afiadas e superfícies rugosas podem aumentar o cisalhamento durante a mistura mecânica de uma amostra. Isso é corroborado pelos resultados obtidos, uma vez que as partículas de florissil (Figura 7i) possuem arestas mais afiadas, enquanto as partículas de terra diatomácea (Figura 7m) são bastante rugosas. A sílica, que apresentou a menor eficiência de extração de Cu, é uma partícula que não possui as características mencionadas anteriormente. As Figuras 7b, 7d, 7f, 7h, 7j, 7l e 7n demonstram os aspectos físicos das amostras após a mistura, e é possível observar os suportes sólidos e amostras fragmentadas e a ruptura da arquitetura da amostra, como observado pelos aglomerados de amostras distribuídos na superfície dos suportes sólidos (exceto na Figura 7b, que não contém suporte sólido).

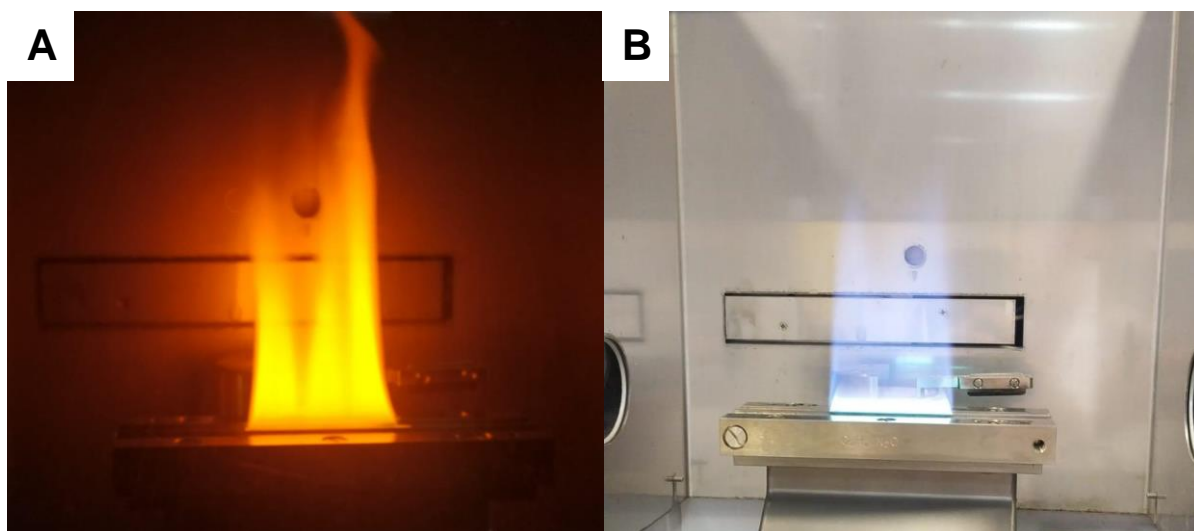
Figura 7 - Imagens obtidas por MEV representando a etapa de dispersão do MSPD, empregando amostra de fórmula infantil: (a) apenas amostra; (b) apenas amostra (após mistura); (c) alumina; (d) alumina + amostra (após mistura); (e) areia; (f) areia + amostra (após mistura); (g) C18; (f) C18 + amostra (após mistura); (i) florissil; (j) florissil + amostra (após mistura); (k) sílica; (l) sílica + amostra (após mistura); (m) terra diatomácea; e (n) terra diatomácea + amostra (após mistura).





Outro parâmetro que foi usado para escolher o tipo de suporte sólido foi a determinação do TOC nos extratos com o objetivo de avaliar os extratos com menor teor orgânico nas amostras. Como pode ser visualizado na Figura 6, os extratos com menor teor de carbono foram os oriundos da maceração da amostra com sílica ($3,6 \pm 0,42 \text{ g L}^{-1}$), terra diatomácea ($6,1 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$) e sem suporte sólido ($5,7 \pm 0,187 \text{ g L}^{-1}$). Os demais suportes sólidos, alumina ($9,7 \pm 0,98 \text{ g L}^{-1}$), areia ($11,3 \pm 1,20 \text{ g L}^{-1}$), C18 ($12,7 \pm 0,140 \text{ g L}^{-1}$) e florisil ($12,3 \pm 2,02 \text{ g L}^{-1}$), apresentaram concentrações de carbono mais elevadas. Na comparação entre florisil ($2,4 \pm 0,29 \mu\text{g g}^{-1}$) e terra diatomácea ($2,6 \pm 0,071 \mu\text{g g}^{-1}$), não foi observada diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) nas concentrações de Cu. No entanto, o florisil apresentou valores de TOC mais altos que a terra diatomácea, além de fornecer maiores RSDs (12% para florisil e 3% para terra diatomácea). É importante destacar, que durante os experimentos envolvendo a escolha do tipo de suporte sólido, os extratos foram inicialmente filtrados usando apenas filtração simples e foram observados problemas com o entupimento do sistema de nebulização e falhas de chama, como pode ser visualizado na Figura 8.

Figura 8 - Imagens demonstrando o aspecto de uma chama $\text{C}_2\text{H}_2\text{-Ar}$ em um HR-CS FAAS no momento da aspiração de extratos da MSPD (oriundos de amostras de fórmula infantil) (a) apenas com filtração simples e (b) com filtração simples + filtros de seringa com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$.



Na Figura 8a, está demonstrada a imagem de uma chama C_2H_2 -ar em um HR-CS GF AAS no momento da aspiração de extratos da MSPD (oriundos de amostra de fórmula infantil) e é possível visualizar falhas na chama, possivelmente ocasionadas por partículas ou conteúdo orgânico presente nos extratos. No entanto, quando os extratos passaram a ser filtrados usando filtros de seringa com diâmetro de poro de $0,45\ \mu m$ (com duas filtrações consecutivas: filtração simples e após filtro de seringa), os problemas associados ao entupimento e falhas na chama foram resolvidos.

Também é importante salientar, que foi observado um efeito de *clean up* simultâneo com a quebra da estrutura física da amostra empregando a sílica e terra diatomácea, pois os extratos provenientes da MSPD forneceram valores de TOC ($3,6\ g\ L^{-1}$ e $6,1\ g\ L^{-1}$, respectivamente) inferiores em comparação com os demais suportes sólidos (de $9,7\ g\ L^{-1}$ a $12,7\ g\ L^{-1}$) avaliados. Em uma solução aquosa de $HNO_3\ 2,0\ mol\ L^{-1}$, espera-se a extração não apenas de íons metálicos, mas também de compostos polares como proteínas e carboidratos. A fórmula infantil de acompanhamento utilizada neste estudo foi caracterizada (ver Tabela 10) quanto à sua composição centesimal, contendo 55% de carboidratos, 13% de proteínas, 17% de lipídios, 5,9% de umidade e 3,0% de cinzas. A terra diatomácea é um sedimento amorfo, formado a partir de rocha sedimentar biogênica de algas aquáticas, marinhas e lacustres. Na sua composição, tem-se majoritariamente SiO_2 (aproximadamente 66%) e óxidos (especialmente Al_2O_3 e Fe_2O_3) (aproximadamente 19%), além de matéria orgânica, hidróxidos e carbonatos de cálcio e magnésio presentes em menor proporção (SOUZA *et al.*, 2003). Portanto, o seu emprego na MSPD como material abrasivo está associado à sua composição química contendo óxidos e o efeito de *clean up* observado na MSPD (juntamente com a sílica) pode estar associado à presença de SiO_2 na sua composição, retendo compostos polares como carboidratos e proteínas, o que não ocorre quando os demais suportes sólidos florisil ($MgSiO_3$), alumina (Al_2O_3), C18 (SiO_2 -octadecila) e a areia empregada nesse trabalho (CaO , TiO_2 e Fe_2O_3) caracterizada no estudo de Salcedo *et al.* (2020) foram utilizados.

Portanto, com base nas observações supracitadas, a terra diatomácea foi selecionada como suporte sólido para os experimentos posteriores. A terra diatomácea também foi reportada na MSPD para a extração de pesticidas em frutas (RADIŠIĆ *et al.*, 2013). Da mesma forma, para a extração das As(III), As(V), MMA, DMA, AsB e AsC em frutos do mar (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2012).

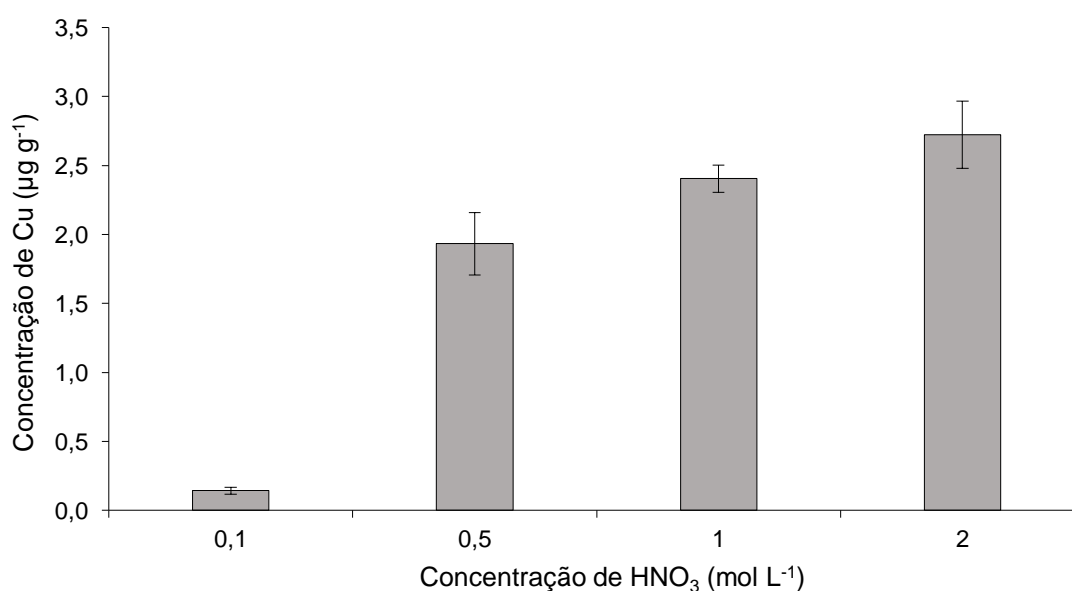
Tabela 10 - Composição centesimal (g/100g) das amostras de alimentos lácteos infantis.

Amostra	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
Fórmula infantil (0 a 6 meses)	3,8	2,7	11	24	55
Fórmula infantil (6 a 12 meses)	3,9	3,6	11	22	56
Fórmula infantil (12 a 36 meses)	5,9	3,0	13	17	55
Leite em pó (integral)	2,7	7,4	25	25	40
Leite em pó (semidesnatado)	4,2	8,5	31	13	43
Composto lácteo (zero lactose)	6,9	7,2	18	18	54

4.1.2 Efeito da solução extratora

Para a avaliação do tipo de solução extratora, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 (0,1; 0,5; 1 e 2 mol L^{-1}) e apenas água ultrapura, de acordo com a Figura 9.

Figura 9 - Influência da solução extratora na extração de Cu em amostras de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e as barras de erros representam os desvios padrão.



Condições: 0,25 g de amostra; 0,25 g de terra diatomácea; maceração por 5 min; agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

Quando foi avaliada apenas água ultrapura como solução extratora, observou-se a formação de uma solução turva, e durante as etapas de filtração simples, não houve alteração na aparência da solução. Além disso, ao utilizar filtros de seringa com uma membrana de 0,45 μm , a filtração não pôde ser realizada devido ao entupimento do meio filtrante. Portanto, os extratos com água ultrapura não foram analisados para evitar o entupimento do sistema de nebulização do HR-CS FAAS.

Na avaliação das demais condições (soluções de HNO_3 0,1; 0,5; 1 e 2 mol L^{-1}), os valores de concordância variaram entre 5 e 94%. Na Figura 9, observa-se que a concentração de HNO_3 0,1 mol L^{-1} apresentou uma concordância de 5% ($0,14 \mu\text{g g}^{-1}$), sendo observada uma tendência de aumento da concordância com o aumento da concentração de HNO_3 . A concentração de HNO_3 0,5 mol L^{-1} apresentou uma concordância de 66% ($1,9 \mu\text{g g}^{-1}$) sendo diferente estatisticamente (ANOVA, $p < 0,05$) na comparação com as concentrações de HNO_3 1 e 2 mol L^{-1} , as quais apresentaram as maiores concordâncias com valores de 83% ($2,4 \mu\text{g g}^{-1}$) e 94% ($2,7 \mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente. Na comparação entre HNO_3 1 e 2 mol L^{-1} não houve diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$). Portanto, para dar seguimento na otimização da MSPD, optou-se pela solução de HNO_3 1 mol L^{-1} como solução extratora, optando-se pela escolha de menores concentrações de ácido, seguindo os princípios da GAC.

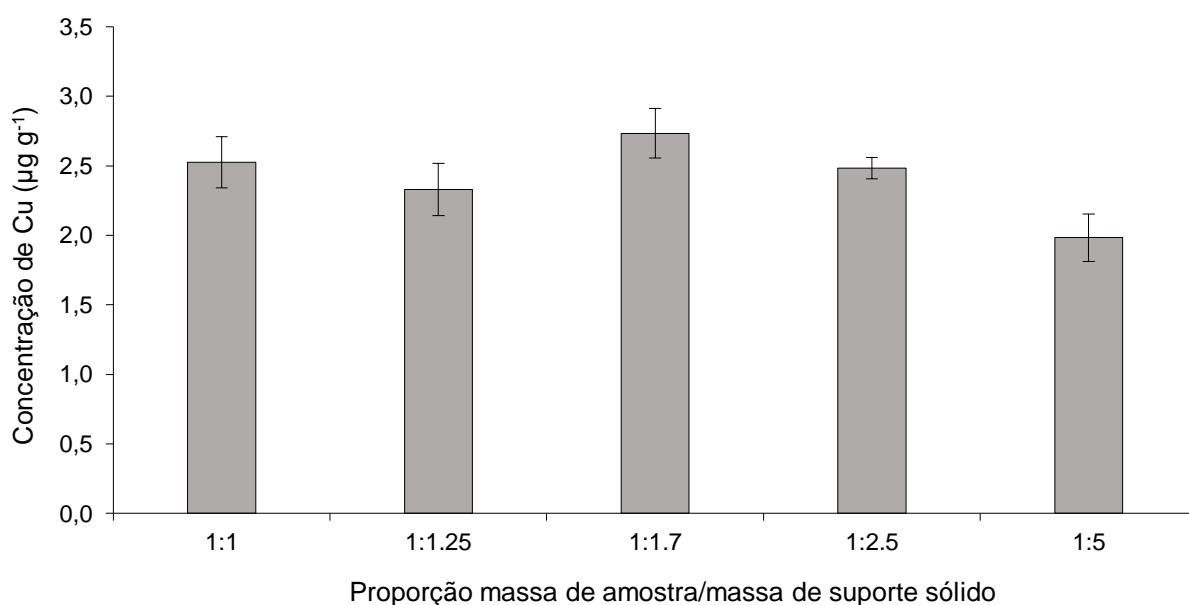
No trabalho de Luckow (2023), também foi avaliada a extração de espécies de As em algas comestíveis empregando a MSPD, onde foram avaliadas soluções de HNO_3 (0,01 a 1,0 mol L^{-1}), além do uso de água ultrapura como soluções extradoras. No entanto, a melhor eficiência de extração foi obtida com água ultrapura (utilizando um volume de 10 mL). No estudo de Vecchia (2022), também foi avaliada a MSPD em moinho de bolas para extração de espécies de As em arroz, onde também foram avaliadas soluções de HNO_3 (0,035 a 1,12 mol L^{-1}), água ultrapura e solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L^{-1} como soluções extradoras e o melhor resultado foi obtido para a solução de HNO_3 0,14 mol L^{-1} (utilizando um volume de 20 mL).

4.1.3 Efeito da proporção massa de amostra/suporte sólido

A proporção entre a massa da amostra e a massa do suporte sólido é um parâmetro importante na MSPD, pois é necessário estabelecer a proporção ideal para uma dispersão eficiente da amostra. Para avaliar a razão entre a massa da amostra e a massa do suporte sólido, a massa de terra diatomácea foi fixada em 0,25 g e as

massas de amostra de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 g foram avaliadas, com razões variando de 1:1 a 1:5 entre a massa da amostra e a massa do suporte sólido, como mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Influência da proporção entre massa de amostra e suporte sólido na extração de Cu em amostra de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e as barras de erros representam os desvios padrão.



Condições: 0,25 g de terra diatomácea; maceração por 5 min; 5 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} , agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

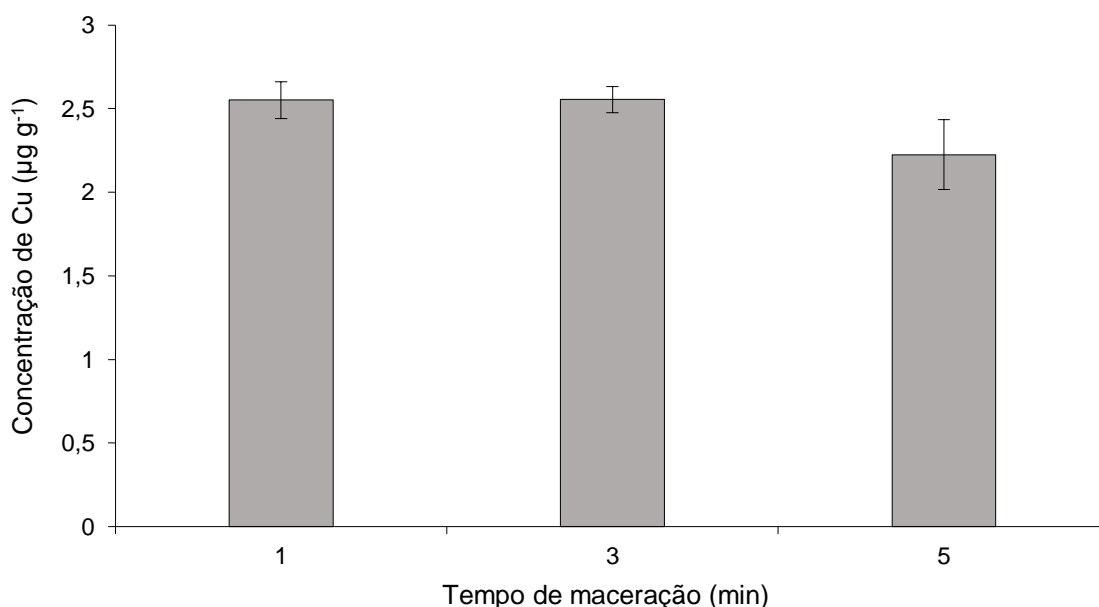
Os valores de concordância variaram entre 68 e 94%. Ao comparar as médias, a razão 1:5 mostrou uma diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$) em relação às outras, enquanto não houve diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre as razões 1:1 e 1:2,5. Essa diferença pode ser explicada por 0,05 g ser uma massa de amostra muito baixa, o que torna as perdas de amostra inerentes ao processo de transferência da mistura (após a mistura) para recipientes de PP de 15 mL mais significativas. Além disso, os sinais de absorvância para a amostra de 0,05 g estavam muito próximos dos sinais do branco analítico, o que também aumenta o erro durante a quantificação. Ao avaliar a faixa de 1:1 a 1:2,5, foi escolhida a massa de amostra de 0,25 g (razão 1:1) para garantir a aplicabilidade do método proposto em amostras com diferentes concentrações de Cu. Barker (2007) recomenda uma razão de 1:4 entre a massa da

amostra e a massa do suporte sólido no MSPD. No entanto, diferentes razões têm sido relatadas na literatura. No trabalho de Malinowski *et al.* (2022), uma razão de 1:10 foi empregada para a determinação de halogênios por cromatografia de íons (IC), após extração por MSPD em algas comestíveis. Duarte *et al.* (2013), aplicaram a MSPD para a determinação de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em tecidos de peixes por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), usando uma razão de 1:2,5.

4.1.4 Avaliação do tempo de maceração

O tempo de maceração pode ser um parâmetro significativo na MSPD, dependendo da natureza da matriz, suporte sólido e analito. Portanto, foram avaliados os tempos de maceração de 1, 3 e 5 min, de acordo com a Figura 11.

Figura 11 - Influência do tempo de maceração na extração de Cu em amostra de fórmula infantil empregando a MSPD. As barras representam a concentração de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) e as barras de erros representam os desvios padrão.



Condições: 0,25 g de amostra; 0,25 g de terra diatomácea; 5 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} , agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

Na comparação entre os tempos de maceração avaliados, não foi observada diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) nas concentrações de Cu e as

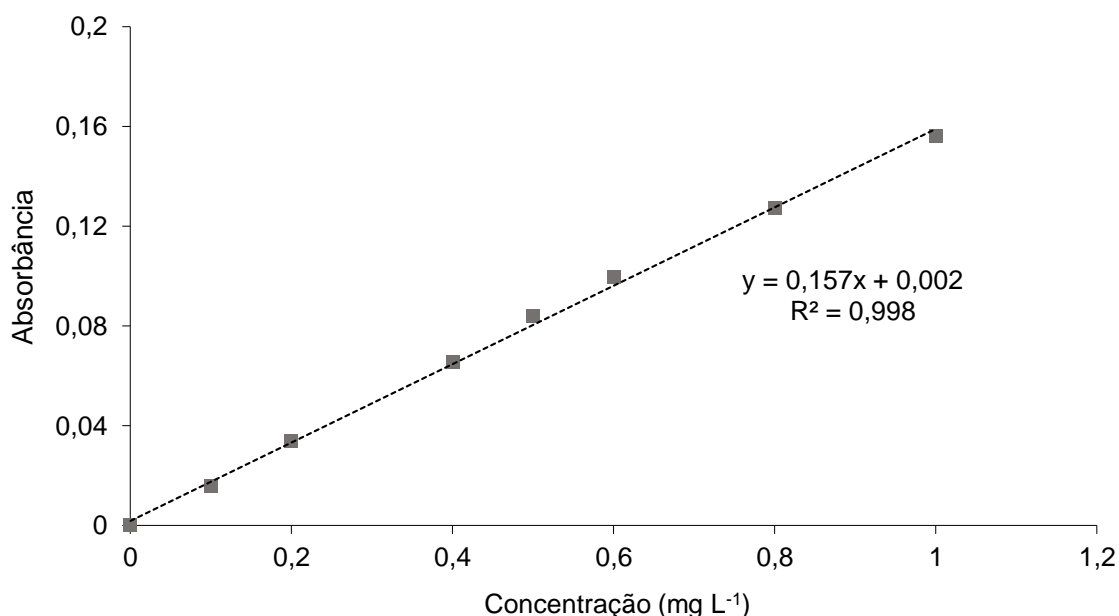
concordâncias estiveram entre 76 e 88% com o método de referência. Portanto, foi escolhido o tempo de maceração de 1 min para aplicação nos experimentos posteriores, visando um menor tempo durante o preparo da amostra e, assim, contribuindo com os princípios da GAC.

Após a otimização da MSPD, as condições otimizadas foram 0,25 g de amostra, 0,25 g de terra diatomácea como suporte sólido, 5 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} como solução extratora, 1 min de maceração, agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

4.2 Performance analítica do método

A linearidade do método foi avaliada utilizando uma curva de calibração externa na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mg L^{-1} de Cu utilizando solução de referência de Cu aquosa. Na Figura 12, está apresentada a curva de calibração externa e os parâmetros de regressão.

Figura 12 - Curva de calibração externa para a avaliação da linearidade.



A faixa de concentração avaliada no estudo da linearidade foi escolhida considerando a concentração de Cu que geralmente encontra-se presente em alimentos infantis enlatados. O método se mostrou linear na faixa avaliada, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,998.

A exatidão e precisão do método foram avaliadas por meio de uma comparação de métodos em amostras de fórmulas infantis, leite em pó e compostos lácteos. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Determinação de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) por HR-CS FAAS (após MSPD) e por HR-CS GF AAS (após MSPD e MAD) (resultados expressos como média \pm desvio padrão, n = 3).

Amostra	MSPD/HR-CS FAAS	MSPD/HR-CS GF AAS	MAD/HR-CS GF AAS
Fórmula infantil (0 a 6 meses)	3,6 \pm 0,079	3,4 \pm 0,29	3,8 \pm 0,143
Fórmula infantil (6 a 12 meses)	3,8 \pm 0,124	3,3 \pm 0,093	3,7 \pm 0,24
Fórmula infantil (12 a 36 meses)	2,8 \pm 0,156	3,1 \pm 0,29	2,9 \pm 0,097
Leite em pó (integral)	< 0,35	0,16 \pm 0,009	0,20 \pm 0,019
Leite em pó (semidesnatado)	0,40 \pm 0,041	0,43 \pm 0,010	0,39 \pm 0,028
Composto lácteo (zero lactose)	< 0,35	0,28 \pm 0,016	0,25 \pm 0,019

As concentrações de Cu variaram de 0,40 a 3,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ usando o método proposto, com concordância variando de 95 a 103%, com RSDs inferiores a 10%. No entanto, para amostras de leite em pó integral e de compostos lácteos sem lactose, as determinações pelo método proposto foram abaixo do LOD. Portanto, também foi feita a quantificação nas amostras por HR-CS GF AAS (após MSPD) e as concentrações de Cu foram de 0,16 e 0,28 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as amostras de leite em pó integral e de composto lácteo sem lactose, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as médias (ANOVA, $p > 0,05$) para todos os métodos.

Os valores de LOD e LOQ foram estabelecidos considerando 3σ e 10σ (σ sendo o desvio padrão do branco analítico, n = 10), respectivamente, ambas divididas pelo *slope* da curva de calibração. Os valores de LOD e LOQ dos métodos empregados neste trabalho estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores de LOD e LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) para MSPD/HR-CS FAAS (método proposto), MSPD/HR-CS GF AAS e MAS/HR-CS FAAS.

Parâmetro	MSPD/HR-CS FAAS	MSPD/HR-CS GF AAS	MAD/HR-CS GF AAS
LOD	0,35	0,041	0,071
LOQ	1,14	0,14	0,24

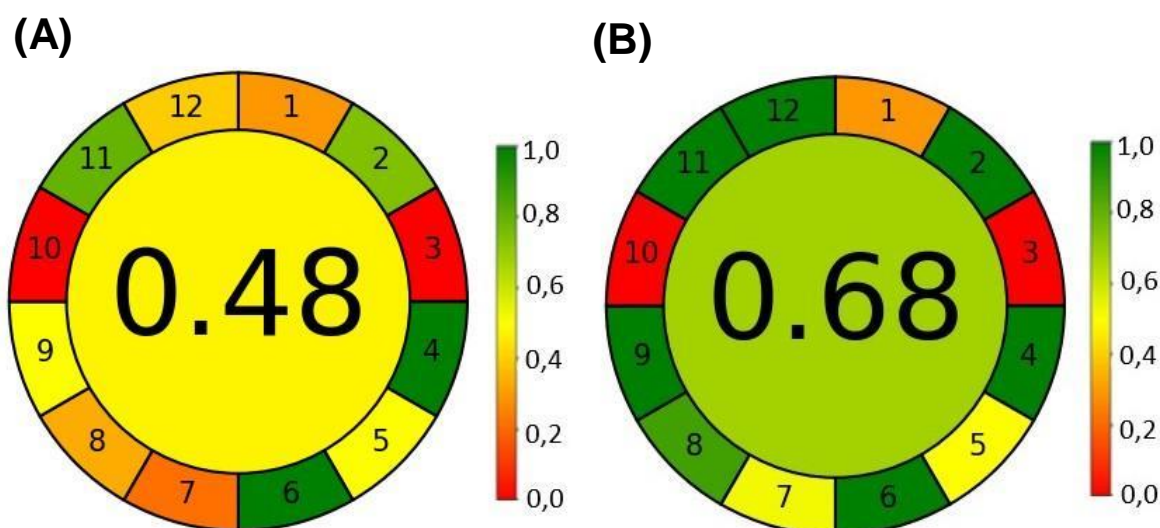
Para o cálculo do LOD e LOQ do método, foram consideradas a diluição e massa de amostra para ambos os métodos, o método proposto (MSPD/HR-CS FAAS) e método comparativo (MAD/HR-CS GF AAS). Os LODs e LOQs estão mostrados na Tabela 12. O LOD e o LOQ do método proposto (MSPD/HR-CS FAAS) foram de 0,35 e 1,14 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. O LOD e o LOQ do método MSPD/HR-CS GF AAS foram de 0,041 e 0,14 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para esses cálculos, a massa da amostra e o volume do extrato foram de 250 mg e 5 mL, respectivamente. O LOD e o LOQ do método comparativo (MAD/HR-CS GF AAS) foram de 0,071 e 0,24 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para esses cálculos, a massa da amostra e o volume final do digestato foram de 500 mg e 35 mL, respectivamente. O LOD e o LOQ do método proposto foram os mais altos entre os métodos empregados neste estudo. Isso está relacionado à sensibilidade da técnica HR-CS FAAS em comparação com a técnica HR-CS GF AAS. No entanto, o LOD e o LOQ do método proposto são adequados para a detecção de Cu na maioria dos alimentos infantis à base de leite, especialmente fórmulas infantis de partida e seguimento, que são os únicos regulamentados em relação ao IDR (200 μg - 0 a 6 meses; 220 μg - 7 a 11 meses e 340 μg - 12 a 36 meses), conforme estabelecido pela ANVISA (ANVISA, 2005).

4.3 Métrica AGREE

A métrica AGREE (Analytical GREENness) fornece uma avaliação do quão verde são os métodos analíticos. A calculadora AGREE produz uma pontuação final variando de 0 a 1 por meio de um software, que gera uma representação visual na forma de um pictograma dividido em doze seções. Cada seção do pictograma é codificada por cores de acordo com uma escala verde-amarelo-vermelho, indicando o desempenho de cada princípio da Química Analítica Verde (GAC). A pontuação geral

do AGREE é exibida no centro do pictograma (PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI e TOBISZEWSKI, 2020). O software permite ao usuário atribuir pesos a cada princípio. No entanto, nesta avaliação, todos os princípios foram ponderados igualmente e a métrica AGREE foi aplicada tanto ao método proposto (MSPD/HR-CS FAAS) quanto ao método de referência (MAD/HR-CS GF AAS), como pode ser visto na Figura 13.

Figura 13 - Pictograma obtido pelo *software* AGREE representando o (A) MAD/HR CS GF AAS (método comparativo) e (B) MSPD/HR CS FAAS (método proposto).



O método proposto (0,68) apresentou uma pontuação mais alta em comparação com o método comparativo (0,48), indicando ser um método mais verde. Essa diferença pode ser atribuída a vários fatores alinhados com os princípios da GAC: *i*) tamanho mínimo da amostra (princípio 2): o método proposto requer apenas 250 mg de massa de amostra em comparação com 500 mg no método comparativo (MAD); *ii*) quantidade de resíduos gerados (princípio 7): no método comparativo, o volume do digerido final por amostra é de 35 mL, enquanto no método proposto (MSPD), o volume do extrato é reduzido para 5 mL por amostra, reduzindo significativamente a geração de resíduos; *iii*) minimização do uso de energia (princípio 9): o método comparativo (HR-CS GF AAS) consome mais energia devido ao pico de corrente em cada atomização no forno de grafite; *iv*) reagentes obtidos de fontes renováveis (princípio 10): o método proposto utiliza terra de diatomácea, composta de

diatomáceas fossilizadas, alinhando-se com o uso de reagentes derivados de fontes renováveis; e v) toxicidade dos reagentes e segurança do operador (princípios 11 e 12, respectivamente): no método comparativo, HNO_3 concentrado é utilizado para digestão, representando potenciais riscos para o operador e o meio ambiente. Em contraste, o método proposto utiliza uma solução diluída de HNO_3 1 mol L^{-1} para extração, melhorando a segurança do operador e reduzindo o impacto ambiental.

5. CONCLUSÕES

Uma alternativa ecologicamente sustentável empregando MSPD e HR-CS FAAS foi proposta com sucesso (pela primeira vez) para a extração e determinação de Cu em amostras de alimentos lácteos infantis. Os principais parâmetros do MSPD foram avaliados e valores em concordância com o método de referência foram obtidos utilizando 0,25 g de amostra, 0,25 g de terra diatomácea como suporte sólido, 5 mL de HNO₃ 1 mol L⁻¹ como solução extratora e 1 min de maceração. A MSPD apresentou uma série de vantagens, incluindo o uso de terra diatomácea como suporte sólido verde, uma solução aquosa diluída como solução extratora e tempo reduzido de maceração. Comparado aos métodos de preparo de amostras assistidos por radiação micro-ondas e/ou aquecimento convencional em sistemas abertos, a MSPD mostrou vantagens como rapidez, simplicidade, baixo custo, baixo consumo de energia, redução na geração de resíduos, diminuição da exposição do analista e um número reduzido de etapas, contribuindo para os princípios da Química Analítica Verde. Além disso, o estudo contribui para o desenvolvimento de métodos visando a garantia de qualidade de alimentos lácteos industrializados voltados para o consumo infantil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. C. de., BAIÃO, D. dos S., RODRIGUES, P. de A., SAINTPIERRE, T. D., HAUSER-DAVIS, R. A., LEANDRO, K. C., PASCHOALIN, V. M. F., COSTA, M. P. da. & CONTE-JÚNIOR, C. A. Toxic Metals and Metalloids in Infant Formulas Marketed in Brazil, and Child Health Risks According to the Target Hazard Quotients and Target Cancer Risk. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, p. 1-14, 2022.

ALMEIDA, L. S., STREIT, N., COSTA, D., SEUS, E. R., ANDRADE, C. F.F., PEREIRA, C. M. P., COEPICOLO, P. & DIAS, D. Systematic evaluation of sample preparation method for simultaneous voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, and Cu in macroalgae. **Jornal of applied phycology**, v. 29, p. 595-605, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa – IN Nº 28 - Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada – RDC Nº 193 - Estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) dos contaminantes arsênio inorgânico, cádmio total, chumbo total e estanho inorgânico em alimentos infantis, e dá outras providências. 2017.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 43. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. 2011.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 44. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. 2011.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 45. Dispõe sobre o 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. 2011.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 269. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. 2005.

BARGELLINI, A., VENTURELLI, F., CASALI, E., FERRAI, A., MARCHESI, I. & BORELLA, P. Trace elements in starter infant formula: dietary intake and safety assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 2035–2044, 2018.

BARIN, J. S., BIZZI, C. A., FLORES, É. M. M., NÓBREGA, J. A. & FRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química. 2a. ed., 2019. cap. 9.1, p. 265-272.

BARKER, S. A., LONG & A. R., SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, p. 353-361, 1989.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, p. 151-162, 2007.

BAŞARAN, B. An assessment of heavy metal level in infant formula on the market in Turkey and the hazard index. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 105, p 1-9, 2022.

BIZZI, C. A., BARIN, J. S., GARCIA, E. E., NÓBREGA, J. A., DRESSLER, V. L. & FLORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 394 - 398, 2011.

BORGES, D. L. G., CURTIUS, A. J., WELZ, B. & HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58-67, 2005.

BRANDÃO, M. Fórmulas infantis: quando e como elas devem ser usadas. *Bebê Abril*, 2015. Disponível em: <https://bebe.abril.com.br/amamentacao/formulas-infantis-quando-e-como-elas-devem-se-r-usadas/>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; MENEZES, E. J. D.; ESCARRONE, A. L. V.; MARTINS, C. D. M. G.; BIANCHINI, A.; PRIMEL, E. G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopâncreas with determination by GC–MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013.

CALDAS, S.S., ROMBALDI, C., CERQUEIRA, M. B. R., SOARES, B. M. & PRIMEL, E. G. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 190-213, 2013.

CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., FOGLIA, P., SAMPERI, R., STAMPACHIACCHIERE, S. VENTURA, S. & LAGANÀ, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186-193, 2015.

CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., GIANANTI, P., GUBBIOTTI, R., SAMPERI, R. & LAGANÀ, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of chromatography A**, v. 1217, p. 2521-2532, 2010.

CARMO, D. L. do. & SILVA, C. A. Métodos de quantificação de carbono e matéria orgânica em resíduos orgânicos. **Revista brasileira de ciência do solo**, v.36, p. 1211-1220, 2012.

CASTRO, Clarissa S. P de et al. Toxic Metals (Pb and Cd) and Their Respective Antagonists (Ca and Zn) in Infant Formulas and Milk Marketed in Brasília, Brazil. **International Journal Environmente Research an Public Health**, v 7, p. 7, 4062-4077, 2010.

CORDERO, C., PRADO, F. & BRAVO, P. Atualização sobre gerenciamento de alergia à proteína do leite de vaca: fórmulas disponíveis e outras misturas. **Revista chilena de pediatria**, v. 89, p. 310-317, 2018.

COSTA, V. C., PICOLOTO, R. S., HARTWIG, C. A., MELLO, P. A., FLORES, E. M. & MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, p. 7957-7964, 2015.

COSTA, L. A. & MENEZES, M. A. B. C. Determinação de manganês em presença de ferro: análise de solo por ativação neutrônica instrumental. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 36, p. 775-785, 2012.

DABEKA, R., FOUQUET, A., BELISLE, S. & TURCOTTE, S. Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. **Food additives & containants: Part A**, v. 28, p. 744-753, 2011.

DENG, D., ZHANG, S., CHEN, H., YANG, L., YIN, H., HOU, X. & ZHENG, C. Online solid sampling platform using multi-wall carbon nanotube assisted matrix solid phase dispersion for mercury speciation in fish by HPLC-ICP-MS. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 30, p. 882-887, 2015.

DUARTE, F. A., SOARES, B. M., VIEIRA, A. A., PEREIRA, E. R., MACIEL, J. V., CALDAS, S. S. & PRIMEL, E. G. Assessment of Modified Matrix Solid-Phase Dispersion as Sample Preparation for the Determination of CH_3Hg^+ and Hg^{2+} in Fish. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 5015-5022, 2013.

FLORES, É. M. M., FLORES, É. L. M. PANIZ, J. N. G., BARIN, J. S., MESKO, M. F. & KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química. 2a. ed., 2019. cap. 11, p. 377-383.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand, 2001. Disponível em: < <https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf>>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

GAŁUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z. & NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GAMELA, R.R. BARRERA, E. G. DUARTE, Á. T., BOSCHETTI, W. SILVA, M. M., VALE, M. G. R. & DESSUY, M. B. Fast Sequential Determination of Zn, Fe, Mg, Ca, Na, and K in Infant Formulas by High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Ultrasound-Assisted Extraction. **Food analytical methods**, v. 12, p. 1420-1428, 2019.

GUIMARÃES, T. G.S., COSTA, F. S., MNEZES, I. M. N. R., SANTANA, A. P. R., ANDRADE, D. F., OLIVEIRA, A., AMARAL, C. D. B. & GONZALEZ, M. H. Green approaches with amino acids-based deep eutectic solvents (AADES) for determining As in medicinal herbs by ICP-MS. **Journal of molecular liquids**, v. 381, p. 1-11, 2023.

HEINEMAN, M. G., GONÇALVES, B L., VICENTI, J. R.M., & DIAS, D. Voltammetric Detection of Lead Using Chitosan-tripolyphosphate Crosslinked Electrode. **Analytical sciences**, v. 35, p. 1255-1261, 2019.

HERTZOG, G. I., SOARES, K. L., CALDAS, S. S. & PRIMEL, E. G. Study of vortexassisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4793-4803, 2015.

HOFF, R. B., FUTIGAMI, L. de S., PIEREZAN, M. D., DEOLINDO, C. T. P., MELO, A. P. Z. de, MOLOGNONI, L., PIMENTA, R., BURIN, V. M., FRANCISCO, A. de & DAGUER, H. Cassava-based materials for matrix solid phase dispersion: An alternative for sample preparation in food analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1201-1202, p. 1-9, 2022.

INMETRO. Instituto Nacional De Metrologia, Normalização E Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de métodos analíticos. Revisado: 8 - Abril de 2020.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. 27, p. 840-841.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press; 2000. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077263/>>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington (DC): National Academy Press, 2000. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057725/>>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

JANNAT, B., SADEGHI, N., OVEISE, M. R., B, M., HAJIMAHMOODI, M. & AGHAZADEH, F. Determination of Iron in Baby Weaning Food and Powder Milk. **Journal of biosciences and medicines**, v. 5, p. 1-9, 2017.

KAZI, T. G., JALBANI, N., BAIG, J. A., AFRIDI, H. I., GHULAM, A. K., ARAIN, M. B., JAMALI, M. K. & SHAH, A. Q. Determination of toxic elements in infant formulae by using electrothermal atomic absorption spectrometer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, 1425-1429, 2009.

KEMMERICH, M., DEMARCO, M., BERNARDI, G., PRESTES, O. D. ADAIME, M. B. & ZANELLA, R. Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. **Journal of Chromatography**, v. 1612, p. 1-8, 2020.

KIANI, A., ARABAMERI, M., MOAZZEN, M., SHARIATIFAR, N., AEENEHVAND, S., KHANIKI, G. J., WAHHAB, M. A.- & SHAHSAVARI, S. Probabilistic Health Risk Assessment of Trace Elements in Baby Food and Milk Powder Using ICP-OES Method Biol Trace Elem. **Biological Trace Element Research**, v. 200, p. 2486-2497, 2022.

KILIC, S., TONGUR, T., KILIC, M. & ERKAYMAZ, T. Determination of Some Endocrine-Disrupting Metals and Organochlorinated Pesticide Residues in Baby Food and Infant Formula in Turkish Markets. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 3352-3361, 2018.

KORN, M. G. A., MORTE, E. S. B., SANTOS, D. C. M. B., CASTRO, F. T., BARBOSA, J. T. P., TEIXEIRA, A. P., FERNANDES, A. P., WELS, B., SANTOS, W. P. C., SANOS, E. B. G. N. dos. & KOM M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67-92, 2008.

LUCKOW, A. C. B. Dispersão da matriz em fase sólida para análise de especiação de arsênio em algas comestíveis por LC-ICP-MS. 2023. f. 86. Trabalho de Dissertação (Mestrado). Química Analítica. Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2023.

MACIEL, J. V., SOUZA, M. M., SILVA, L. O. & DIAS, D. Direct determination of Zn, Cd, Pb and Cu in wine by differential pulse anodic stripping voltammetry. **Beverages**, v. 5, p. 1-7, 2019.

MALINOWSKI, M. H. de M., KONZGEN, P. M., CHAVES, M. S. de J., CALDAS, S. B., PRIMEL, E. G., DUARTE, F. A. & SOARES, B. M. Vortex-assisted matrix solid-phase dispersion: An eco-friendly alternative for the determination of halogens in edible seaweed. **Talanta**, v. 244, p. 1-9, 2022.

MANARINI, T. Fórmulas infantis: modo de usar. Veja Saúde. **Sociedade Brasileira de**
Pediatria, 2017. Disponível em: <<https://saude.abril.com.br/alimentacao/formulas-infantis-modo-de-usar/>>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa – IN – Nº 53. Regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade do leite em pó. 2018.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa – IN – Nº 28. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de composto lácteo. 2007.

MARTINNEZ- FERNÁNDEZ, M., BARCIELA-ALONSO, M. C., MOREDA-PIÑEIRO, A. & BERMEJO-BARRERA, P. Matrix solid phase dispersion-assisted BCR sequential extraction method for metal partitioning in surface estuarine sediments. **Talanta**, v. 83, p. 840-849, 2011.

MAYR, G. L. Um estudo em rádioquímica: análise por ativação neutrônica. 2021. f. 92. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial), Instituto de Ciências Ambientais, Química e Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Diadema, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis**, 2016. Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonose_s.pdf. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Saúde da criança: Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. 2ª edição Cadernos de Atenção Básica, nº 23, 2015. Brasília - DF. Disponível em:<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/saude-da-crianca/publicacoes/saude-da-crianca-aleitamento-materno-e-alimentacao-complementar/view>>. Acesso em: 2 de agosto de 2023.

MISIC, T. D. R., TOSIC, S. B., PAVLOVID, A. N., MARINKOVIK, E. T. P., MRMOSANIN, J. M., MITIC, S. S. & STOJANOVIC, G. S. Trace element content in commercial complementary food formulated for infants and toddlers: Health risk assessment. **Food Chemistry**, v. 378, p. 1-9, 2022.

MORAES, D. P., BIZZI, C. A., NÓBREGA, J. A., FLORES, E. M. M., NOGUEIRA, A. R. A., BARIN, J. S. & MESKO, M. F. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química. 2a. ed., 2019. cap. 10, p. 301-338.

MOREDA-PIÑEIRO, J., ALONSO-RODRIGUEZ, E., ROMARÍZ-HORTAS, V., MOREDA-PINEIRO, A., LÓPEZ-MAHIA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., PRADA-RODRIGUEZ, D. & BERMEJO-BARRERA, P. Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples. **Food chemistry**, v. 130, p. 552-560, 2012.

OLIVEIRA, C., MACIEL, J. V., CHRIST-RIBEIRO, A., GUARDA, A. & DIAS, D. A voltammetric approach for the simultaneous determination of Cd and Pb in water applying carbon paste electrode modified with bismuth film. **Jornal of analytical chemistry**, v. 77, p. 369-375, 2022.

PAIVA, E. L. de., MORGANO, M. A., BRAGOTTO, A. P. A.-. Occurrence and determination of inorganic contaminants in baby food and infant formula. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 60-66, 2019.

PARKER, G. H., GILIE, C. E., MILLER, J. V., BADGER, D. E. & KREIER, M. L. Human health risk assessment of arsenic, cadmium, lead, and mercury ingestion from baby foods. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 238-249, 2022.

PENA-PEREIRA, F., WOJNOWSKI, W. & TOBISZEWSKI, M. AGREE- Analytical greenness metric approach and software. *Analytical chemistry*, v. 92, p. 10076-10082, 2020.

PENNA, F. J., NORTON, R. C., CARVALHO, A. S. T., POMEPU, B. C. T., PENNA, G. C., FERREIRA, M. F., DUQUE, C. G., COUTO, J. MAIA, J. X., FLORES, P. & SOARES, J. F. Comparison between pre-thickened and home-thickened formulas in gastroesophageal reflux treatment. **Jornal de pediatria**, v. 79, p. 49-54, 2003.

RADIŠIĆ, M. M., VASILJEVIĆ, T. M., DUJAKOVIĆ, N. N. & LAUŠEVIĆ, M. D. Application of Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography–Ion Trap Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 648-657, 2013.

ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4805-4814, 2015.

SADEGHI, N., OVEISI, M. R., JANNAT, B., HAJIMAHOMOOD, M., BEHFAR, A., BEHFAR, A., BEHZAD, M., NOROUZI, N., OVEISI, M. & JANNAT, B. Simultaneous Measurement of Zinc, Copper, Lead and Cadmium in Baby Weaning Food and Powder Milk by DPASV. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 345-349, 2014.

SAGER, M., MCCULLOCH, C.R., SCHODER, D. Heavy metal content and element analysis of infant formula and milk powder samples purchased on the Tanzanian market: International branded versus black market products. **Food Chemistry**, v. 255, p. 365-371, 2018.

SALCEDO, G. M., KUPSKI, L., ARIAS, J. L. D. O., BARBOSA, S. C. & PRIMEL, E. G. Bojuru sand as a novel catalyst for refinery wastewater treatment and phenol degradation by heterogeneous photo catalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 85, p. 112796, 2020.

SARACOGLU, S., SAYGI, K. O., ULUOZLU, O. D., TUZEN, M. & SOULAK, M. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 280-285, 2007.

SEBASTIÀ, N.; SOLER, C.; SORIANO, J. M.; MANES, J. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2609-2612, 2010.

SILVA, M. C. B. do M. Aleitamento materno e uso de fórmulas infantis: um estudo comparativo acerca dos parâmetros antropométricos de bebês prematuros. 2019. f. 43. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Nutrição. Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2019.

SILVA, A. S. Aplicação e desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de minerais em fórmulas infantis a base de cereais empregando ICP OES e HR-CS ET AAS. 2015. f. 78. Trabalho de dissertação (Mestrado). Química Analítica. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

SILVA, S. V., MATTANNA, P., BIZZI, C. A., RICHARD, N. S. P. dos S. & BARIN, J. S. Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3498-3505, 2013.

SOUZA, G. P., FILGUEIRA, M., ROSENTHAL, R. & HOLANDA, J. N. Caracterização de material compósito diatomáceo natural. **Cerâmica**, v. 49, p. 40-43, 2003.

SBP. Sociedade Brasileira de Pediatria – Departamento de Nutrologia. Manual de Alimentação: orientações para alimentação do lactente ao adolescente, na escola, na

gestante, na prevenção de doenças e segurança alimentar / Sociedade Brasileira de Pediatria. **Departamento Científico de Nutrologia**. 4ª. ed. São Paulo: SBP, 2018.

TAVAKOLI, M., JAMALI, M. R., & NEZHADALI, A. Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction (DLLME) Based on Solidification of Floating Organic Drop Using a Deep Eutectic Solvent for Simultaneous Preconcentration and Determination of Nickel and Cobalt in Food and Water Samples. **Analytical Letters**, v. 52, p. 1-12, 2021.

VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V.; ARIAS, J. L. D. O.; PRIMEL, E. G. Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue. **Food chemistry**, v. 242, p. 475-480, 2018.

VIÑAS, P. M., MARTINEZ, M. P. & CÓRDOBA, M. H. 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.

WANG, T. CHEN, Y., MA, J., JIN, Z., CHAI, M., XIAO, X., ZHANG, L. & ZHANG, Y. A polyethyleneimine-modified attapulgite as a novel solid support in matrix solid-phase dispersion for the extraction of cadmium traces in seafood products. **Talanta**, v. 180, p. 254-259, 2018.

WELZ, B., VAE, M. G. R., PEREIRA, É. R., CASTILHO, I. N. B. & DESSUY, M. B. Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects - a critical review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 25, p. 799-821, 2014.

WELZ, B., BECKER-ROSS, H., FLOREK, S., HEITMANN, U. High resolution Continuum Source AAS. Weinheim: Wiley-VCH. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p. 220-229, 2003.

WIANOWSKA, D.; GIL, M. New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 29-51, 2019.

ZAND, N., CHOWDHRY, B. Z., WRAY, D. S., AMUNA, P., PULLEN, F. S. & SNOWDEN, M. J. Elemental content of commercial 'ready to-feed' poultry and fish based infant foods in the UK, **Food Chemistry**, v. 135, p. 2796-2801, 2012.

ZAND, N., CHOWDHRY, B. Z., ZOTOR, F. B., WRAY, D. S., AMUNA, P. & PULLEN, F. S. Essential and trace elements content of commercial infant foods in the UK. **Food Chemistry**, v. 128, p. 123-128, 2011.