



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM SUSPENSÕES DE CACAU EM PÓ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

RODRIGO CANARIN DE OLIVEIRA

Orientador: DANIEL LÁZARO GALLINDO BORGES

Coorientadora: RENATA NASCIMENTO CAETANO



Documento assinado digitalmente
Daniel Lázaro Gallindo Borges
Data: 19/06/2024 22:47:49-0300
CPF: ***.794.969-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>



Documento assinado digitalmente
Rodrigo Canarin de Oliveira
Data: 19/06/2024 23:52:54-0300
CPF: ***.007.489-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Florianópolis
Junho/2024

Rodrigo Canarin de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM SUSPENSÕES DE CACAU EM
PÓ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM
ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA**

Projeto de Estágio II (QMC 5511)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis
Junho/2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, minha mãe Silvana e minha irmã Beatriz, cujos suportes emocional e financeiro foram imprescindíveis para que o sonho de obter um diploma em uma universidade federal se tornasse possível.

À minha colega de moradia, Pamela, que também é minha melhor amiga, por me aconselhar e me ouvir nos momentos em que mais precisei, e também por me colocar de volta aos eixos de vez em quando.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Daniel L. G. Borges e Msc. Renata Nascimento Caetano, por serem compreensivos e não desistirem de mim nunca, até mesmo em momentos em que os decepcionei.

Aos meus colegas de graduação, pois alguns em especial se tornaram minha segunda família, dividindo a mesma dificuldade que é estar longe de casa. Sem eles eu não teria chego nesse momento.

Aos meus colegas de laboratório, os quais me ajudaram em situações que não poderia solucionar sozinho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e seus colaboradores, essenciais para meu desenvolvimento e aprendizado ao longo desses anos.

Ao CNPq, responsável pelo financiamento e por possibilitar a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1. Cacau e a presença de metais potencialmente tóxicos.....	9
2.2. Espectrometria de absorção atômica.....	10
2.2.1. Espectrometria de absorção de absorção atômica em forno de grafite.....	11
2.3. Análise de sólidos em suspensão.....	11
2.3.1. Análise de sólidos em suspensão como metodologia analítica verde (GAC).....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Instrumentação.....	15
4.2. Reagentes e amostras.....	16
4.3. Procedimento.....	16
4.4 Segurança no laboratório.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1. Curvas de pirólise e atomização.....	19
5.2. Estudos de extração.....	20
5.3. Análise das suspensões.....	23
5.4. Aplicação do software AGREE para atribuição do grau de verdura a metodologia.....	26
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS.....	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação geral de planejamento composto central com $k = 2$ e $\alpha = 1,414$. 17
- Figura 2** - Curvas de pirólise (-●-) e atomização (-■-) obtidas por GFAAS para Ni em suspensões de cacau. As barras verticais representam o desvio padrão relativo para cada ponto experimental. 19
- Figura 3** - Superfície de múltipla resposta obtida por planejamento composto central para avaliar a extração de Ni a partir de suspensões de cacau preparadas em meio de HNO_3 . 21
- Figura 4** - Curvas de calibração obtidas por GFAAS para Ni com padrões aquosos (-■-) ou por adição de analito (-●-) em suspensões de cacau preparadas em HNO_3 2,0% (as escalas nos eixos das abscissas estão ajustadas a cada curva de calibração), com intuito de comparação de sensibilidade entre as estratégias. 24
- Figura 5** - Pontuação obtida a partir do software AGREE baseado nos 12 princípios da química verde. 27

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u> - Os 12 princípios da química verde.	14
<u>Tabela 2</u> - Programa de aquecimento utilizado na digestão das amostras de cacau em pó.	17
<u>Tabela 3</u> - Planejamento composto central referente ao estudo de extração de Ni em amostras de cacau preparadas sob a forma de suspensão.	19
<u>Tabela 4</u> - Programa de temperaturas otimizado para a quantificação de Ni em suspensões de cacau por GFAAS.	21
<u>Tabela 5</u> - Dados de extração de Ni para a soluções com diferentes concentrações de HNO ₃ usadas para preparo das amostras de cacau em suspensão.	23
<u>Tabela 6</u> - Parâmetros de ajuste linear das funções de calibração externa e por adição de analito para a determinação de Ni em suspensões de cacau por GFAAS.	25
<u>Tabela 7</u> - Resultados de concentração e parâmetros estatísticos obtidos para diferentes estratégias de quantificação de Ni em amostra de cacau por GFAAS.	25
<u>Tabela 8</u> - Limites de detecção e de quantificação obtidos para a determinação de Ni em amostras de 6 cacau em suspensão por GFAAS, com diferentes estratégias de calibração.	26

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de método analítico simples e rápido, alternativo à clássica digestão ácida, visando à determinação de Ni em concentrações traço em amostra de cacau em pó utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. As amostras foram preparadas na forma de suspensões, com a adição de alíquotas de aproximadamente 50 mg de amostra para um volume final de 10 mL de solução aquosa de HNO_3 . Curvas de pirólise e atomização foram construídas e demonstraram a elevada estabilidade térmica do analito, prescindindo do uso de modificador químico para a pirólise em 1000 °C e atomização em 2600 °C. Para avaliar a extração de Ni das partículas sólidas para o meio aquoso, um estudo multivariado foi conduzido com planejamento composto central avaliando concentração de ácido e tempo de extração, possibilitando analisar a influência de diferentes variáveis com número reduzido de experimentos. Os resultados mostraram que cerca de 40-49% (m/m) do Ni é extraível para a fase aquosa em meio ácido, com concentrações de HNO_3 iguais ou maiores que 1,0% (v/v). Dessa forma, demonstrou-se que a análise de lixiviado seria insuficiente para determinar a concentração total e, portanto, procedeu-se com a análise das suspensões. Não foi observado fundo espectral significativo, o que sugere ausência de interferências espectrais. Curvas de calibração usando padrões aquosos e por adição de analito foram conduzidas a fim de avaliar a melhor estratégia de calibração e inferir sobre interferências. Uma amostra de cacau foi digerida e os resultados foram estatisticamente comparados aos obtidos com as diferentes estratégias de calibração, sendo observadas diferenças na exatidão de cada método de calibração. De modo geral, o método mostrou-se rápido, simples e de fácil preparo, representando uma alternativa interessante para a análise de amostras de cacau.

Palavras-chave: Análise elementar; Alimentos; Determinação de traços; Efeito matricial.

ABSTRACT

This work describes the development of a simple and rapid analytical method, as an alternative to the classical acid digestion, to determine Ni at trace concentrations in a cocoa powder samples using electrothermal atomic absorption spectrometry. The samples were prepared as suspensions, with the addition of aliquots of approximately 50 mg of sample to a final volume of 10 mL an aqueous HNO₃ solution. Pyrolysis and atomization curves were established and demonstrated the high thermal stability of the analyte, eliminating the need for chemical modifiers for pyrolysis at 1000 °C and atomization at 2600 °C. To evaluate the extraction of Ni from solid particles into the aqueous medium, a multivariate study was conducted with central composite design considering the HNO₃ concentration and the extraction time as variables, making it possible to analyze the influence of different parameters with a reduced number of experiments. The results showed that around 40-49% (m/m) of Ni is extractable into the aqueous phase in an acidic medium, with HNO₃ concentration equal or higher than 1.0% (v/v). These experiments demonstrated that the leachate analysis would be insufficient to determine the total concentration of the analyte and, therefore, the suspensions were analyzed. No significant background signal was observed, which suggests the absence of spectral interference. Calibration curves using aqueous standards and standard addition were established in order to evaluate the best calibration strategy. A cocoa powder sample was digested and the results were statistically compared to those obtained with the different calibration strategies, with differences being observed in the accuracy of each calibration strategy. In general, the method proved to be fast, simple and easy to prepare, representing an interesting alternative for the analysis of cocoa samples.

Keywords: Elemental analysis; Food; Trace determination; Matrix effect.

1. JUSTIFICATIVA

Os alimentos presentes no dia a dia possuem uma matriz orgânica ampla e complexa, estando presentes proteínas, gorduras e carboidratos, dentre outros. A presença de minerais essenciais presentes na alimentação humana, como potássio, cálcio e fósforo, é de extrema importância para o bom e correto funcionamento do organismo. Há também substâncias antinutricionais, por exemplo, metais potencialmente tóxicos, como cádmio (Cd), cromo (Cr) e níquel (Ni) que, se consumidos em excesso, podem ser responsáveis por uma variedade de efeitos patogênicos, colocando em risco a saúde dos consumidores, principalmente quando evidencia-se um comportamento acumulativo de certos metais.

A técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) torna-se viável para a análise desses metais potencialmente tóxicos, visto que se baseia na radiação absorvida por átomos livres, cuja magnitude de absorção varia de acordo com a concentração. Com isso, pode-se determinar a concentração de diferentes analitos mesmo em nível traço. O método de análise de suspensões por AAS (do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*), mais especificamente em forno de grafite (GFAAS – do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), surge como uma alternativa relativamente mais sustentável.

No contexto da química verde, fazem-se necessários métodos de preparo de amostras alternativos à clássica digestão ácida por via úmida, que utilizem menores quantidades de reagentes tóxicos e perigosos, e que sejam menos agressivos, resultando também em uma menor contaminação da amostra.

Uma alternativa é o preparo de suspensões aquosas, as quais utilizam apenas água ultrapura e uma pequena quantidade de ácido concentrado para estabilização iônica. Há economia de reagentes e energia, maior segurança para o analista, menor risco de contaminação e perda de analito. Por outro lado, enfrenta-se problemas de heterogeneidade amostral, decantação da fase sólida e maior efeito matricial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cacau e a presença de metais potencialmente tóxicos

O chocolate é o principal produto proveniente dos grãos de cacau, frutos da árvore do cacau (*Theobroma cacao*), sendo o Brasil um dos oito maiores produtores de cacau do mundo¹.

Sabe-se dos benefícios à saúde aos quais o cacau e o chocolate amargo estão associados, muitas vezes por conta de efeitos imunorreguladores e da presença de antioxidantes, como flavonóides, catequinas e polifenóis². Em contrapartida, é necessário considerar a presença de metais potencialmente tóxicos, mesmo que a nível traço, visto que metais como chumbo e níquel possuem a característica de serem lentamente excretados pelo corpo, havendo maior possibilidade de acumulação e futura contaminação, principalmente em crianças, que são mais sensíveis à presença desses metais³. Especificamente, a exposição e o acúmulo de níquel no corpo humano podem ser responsáveis por uma variedade de efeitos patogênicos, como fibrose pulmonar, doenças renais e cardiovasculares, assim como câncer no trato respiratório⁴.

A composição química e presença de metais potencialmente tóxicos pode variar de acordo com as regiões em que foram realizadas as amostragens, podendo sofrer influência das condições naturais do ambiente, como composição do solo, umidade, altitude, etc., e de ações antropogênicas, como índices de poluição e utilização de fertilizantes e agrotóxicos^{5,6}.

Arévalo-Gardini *et. al.*⁵ destacaram as variações de concentração de diferentes metais de acordo com a região de amostragem e amostra (folha e grão de cacau) utilizando AAS, destacando-se o Ni, com a maior concentração média relatada. Os autores correlacionaram diferentes analitos e interações entre a planta e os metais, possibilitando uma visão geral para aperfeiçoamento da eficiência da gestão de metais nas regiões produtoras de cacau.

2.2. Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) baseia-se em interações entre átomos livres com fótons em frequência específica. A quantidade de radiação absorvida por átomos no estado gasoso é utilizada para, por meio de uma referência externa (curva de calibração), determinar a concentração de analito presente na amostra. A radiação pode ser gerada de diferentes maneiras, como em lâmpadas de cátodo oco (HCL – hollow cathode lamp), lâmpada de descarga sem eletrodos e, mais recentemente, lâmpadas de emissão contínua. A absorção de energia pelos átomos

está relacionada com as transições eletrônicas de um ou mais elétrons do estado fundamental (tipicamente) a estados energéticos mais altos (estado excitado). De acordo com a mecânica quântica, algumas transições são mais possíveis e/ou prováveis do que outras⁷.

A absorção em comprimentos de onda específicos gera espectros de linhas, que são característicos para cada elemento da tabela periódica^{8,9}.

2.2.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Depois da consolidação da técnica de AAS, Boris Vladimirovich L'vov, em 1959, após dez anos de pesquisas, desenvolveu um atomizador constituído de grafite com um suporte do mesmo material¹⁰. Surgiu o primeiro sistema de atomização eletrotérmica, no qual os átomos em fase gasosa ficavam confinados em um ambiente restrito, resultando em maior tempo de residência e maior sensibilidade analítica. A atomização eletrotérmica foi desenvolvida por L'vov e aperfeiçoada por outros cientistas, até se tornar comercialmente disponível na década de 1970. Algumas características da técnica, como o baixo consumo de amostra, com alíquotas na ordem de grandeza de μL , e a elevada sensibilidade, possibilitando a detecção de analitos presentes em ppb (parte por bilhão), se comparada à atomização em chama, fizeram com que a popularidade da técnica crescesse.

Na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), as amostras são submetidas a programas de temperatura com etapas de secagem, pirólise e atomização. A primeira tem o intuito de eliminar o solvente, a segunda com o objetivo de eliminar a matriz sem que haja perda de analito e a última visa a conversão do analito em átomos gasosos, capazes de interagir com a radiação eletromagnética³. Com o advento de fornos de grafite com aquecimento transversal e de corretores de fundo eficientes, o interesse em análises diretas de sólidos por GFAAS cresceu. Atualmente, há dispositivos que permitem a inserção direta de pequenas quantidades de amostras sólidas no forno de grafite, utilizando plataformas de grafite pirolítico¹¹.

2.3. Análise de sólidos em suspensão

Diversas técnicas de análise elementar são capazes de identificar e/ou quantificar a presença de elementos potencialmente tóxicos em produtos comerciais.

A forma tradicional envolve decomposição da amostra por meio de digestão em meio ácido.

A análise de suspensões, assim como a análise direta de sólidos, pela técnica de GFAAS é de grande interesse na área da química analítica, visto que possui características que a tornam vantajosa frente aos processos de digestão de amostras. Dentre as vantagens, cita-se a redução no risco de contaminação e perda de analito, principalmente quando se trata de espécies voláteis, a redução no tempo de preparo e a possibilidade de utilizar os sistemas para introdução de amostras líquidas¹². Por outro lado, os problemas enfrentados nesse tipo de procedimento envolvem a heterogeneidade amostral, a decantação da fase sólida e possíveis sinais elevados de fundo¹³.

A suspensão deve ser homogeneizada imediatamente e anteriormente ao início da análise, visando garantir uma boa representatividade da amostra, reduzindo os valores de desvio padrão e garantindo uma boa precisão. Há estudos envolvendo a presença de agentes tixotrópicos, que retardam a decantação dos sólidos em suspensão, além do uso de dispositivos, como uma sonda ultrassônica, para facilitar a homogeneização da suspensão. O pré-tratamento da suspensão, como oxidação e digestão parcial, ambos por via úmida, podem ser utilizados, pois se apresentam menos invasivos se comparados à digestão total da amostra. Dependendo da amostra, a simples acidificação da suspensão, visando estabilidade iônica no meio aquoso também pode ser empregada¹⁴.

Alguns autores, como Bastiaans e colaboradores¹⁵, demonstram a influência do tamanho da partícula na exatidão das análises, principalmente quando se trata da atomização em chama (FAAS – do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*). O uso de modificadores químicos está bastante presente em estudos envolvendo análise de suspensões, principalmente quando o objetivo é a quantificação de analitos voláteis, visto que aumentam sua estabilidade térmica. Um problema associado é a formação de resíduos sólidos no interior do tubo de grafite, o que pode ser resolvido com pirólise assistida com O₂¹⁴. Autores como Viñas *et. al.*¹⁶ relataram o uso de agentes e/ou modificadores com propriedades oxidativas que realizam um efeito similar à presença de O₂ na etapa de pirólise.

Silva *et. al.*¹⁷ obtiveram resultados promissores na determinação de elementos traço em carvão mineral a partir da análise de suspensões por GFAAS. Drobowolski *et. al.*¹⁸ relataram certa precisão e exatidão na quantificação de TI em solos e

sedimentos. Oreste *et. al.*¹⁹ avaliaram as vantagens da análise de suspensões para determinação de Cd, Cr e Pb por GFAAS. Hu *et. al.*²⁰ determinaram Cd em laticínios e destacaram a utilização de modificadores químicos para redução de interferência durante as análises, havendo comparação com a amostra digerida em meio ácido. Kriegerová *et. al.*²¹ estudaram a determinação de Pb em placenta humana, explorando o método de análise de suspensões, influência de modificadores químicos e uma diversidade de pré-tratamentos, como secagem e pulverização, obtendo bons resultados de precisão e exatidão. Tokman²² relatou sucesso na determinação de Mn e Cu em amostras de solo, carvão e suplementos multivitamínicos em forma de suspensão, considerando condições ótimas de preparo. Bustos *et al.*²³ relataram a determinação simultânea de Cd e Ni em suspensões de chocolate em pó utilizando uma rampa de atomização lenta, dando ênfase na presença de interferentes como fosfatos e silicatos e possíveis correções.

Por fim, pode-se dizer que avanços vêm sendo estudados para que as aplicações da técnica de análise de suspensões ou de sólidos ganhem confiabilidade analítica para que sejam uma alternativa à digestão ácida e/ou procedimentos quimicamente agressivos, e que essa técnica se torna uma alternativa válida para as análises propostas nesse trabalho.

2.3.1. Análise de sólidos em suspensão como metodologia analítica verde (GAC)

Dentre os 12 princípios da química verde, explícitos na Tabela 1 a seguir, a ausência de um pré-tratamento mais elaborado da amostra se encontra de acordo com os princípios 1, 4 e 12, visto que reduz geração de resíduos, utiliza apenas a sonicação das amostras e diminui o risco de acidentes químicos por parte do analista, respectivamente²⁴.

A utilização de ultrassom se mostra útil em diferentes âmbitos da química, auxiliando desde processos de limpeza até em extrações e homogeneização de soluções e/ou suspensões., evitando assim o consumo de solventes e a produção de substâncias com maior potencial tóxico²⁵. Autores como Minami *et al.*²⁶ reportaram o auxílio do banho ultrassônico na extração de Cd, Cu, Mn e Pb em diversos materiais biológicos, assim como Rezić²⁷ que relatou que a extração ultrassônica é eficiente para diferentes elementos presentes no algodão.

Há diversos estudos que abordam os impactos de diferentes variáveis envolvendo o banho ultrassônico, como posição dos frascos, quantidade de água e

de detergente, conforme relatado por Santos *et al.*²⁸, que identificaram diferentes quantidades de As entre as replicatas analisadas.

Tabela 1. Os 12 princípios da química verde.

Parâmetro	Descrição
1	Técnicas analíticas diretas devem ser utilizadas a fim de evitar o tratamento da amostra.
2	Minimizar o tamanho e a quantidade de amostras.
3	Análises <i>in situ</i> devem ser priorizadas
4	Integração de processos e operações analíticas a fim de economizar energia e reduzir o uso de reagentes.
5	Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados.
6	Derivatizações devem ser evitadas.
7	Geração de grande volume de resíduos deve ser evitada, assim como o gerenciamento adequado desses resíduos deve ser providenciado.
8	Métodos multianalitos ou multiparâmetros devem ser priorizados a métodos capazes de analisar um analito por vez.
9	O uso de energia deve ser minimizado.
10	Reagentes provenientes de fontes renováveis devem ser priorizados.
11	Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.
12	A segurança do operador deve ser maximizada.

Fonte: Pena-Pereira *et al.* (2020)²⁴

Pena-Pereira *et al.*²⁴ buscaram quantificar de forma simples, a partir do

software AGREE, o quão verde é uma metodologia científica, dentro de uma escala 0 – 1. Os autores reconhecem a dificuldade em quantificar algo relativo e complexo, explicitando a possibilidade de atribuição de pesos diferentes a depender do objetivo do método analítico em questão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de método simples e eficiente para a determinação de Ni em amostras comerciais de cacau em pó, utilizando análise de sólidos em suspensão por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, assim como propor um método mais verde, alternativo à abordagem clássica, a qual envolve decomposição da amostra

3.2. Objetivos Específicos

Para o cumprimento do objetivo geral, o trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- avaliar a extração do analito para a fase líquida, investigando o efeito de parâmetros de preparo da suspensão.
- investigar o comportamento térmico do analito por meio das curvas de pirólise e atomização.
- avaliar eficiência de calibração utilizando padrões aquosos e pela técnica de adição de analito.
- quantificar Ni por GFAAS.
- analisar a exatidão do método por meio da comparação com resultados obtidos pela digestão das amostras.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

As análises foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite, utilizando lâmpadas de cátodo oco (Perkin Elmer, EUA) como fonte de radiação, do modelo AAnalyst 100 (Perkin Elmer, EUA) e tubos de grafite sem plataforma e com recobrimento pirolítico, aquecidos longitudinalmente. Também foi

utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua ContrAA 700 (Analytik Jena, Alemanha) para análises específicas e por condições laboratoriais. As análises foram conduzidas no comprimento de onda de 232 nm, com uma fenda espectral, no caso das análises no AAnalyst, de 0,2 nm, obtendo-se os resultados em função da absorvância integrada, com tempo de integração de 10 segundos. Alíquotas de 20 µL de suspensões e soluções aquosas foram pipetadas automaticamente nos tubos de grafite, a partir de um autoamostrador AS 72 (Perkin Elmer). Para preparo das suspensões aquosas, foi utilizada água ultra pura obtida em um purificador Elga Purelab Ultra (Veolia, Reino Unido), e acidificadas com ácido nítrico (HNO₃) bidestilado abaixo do ponto de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Alemanha). Na digestão das amostras para utilização como valor referência, utilizou-se um microondas DGT – 100 (Provecto Analítica, São Paulo, Brasil). Para sonicação das suspensões precedente às análises, utilizou-se um banho de ultrassom (Thornton Eletrônica Ltda., São Paulo, Brasil). Para possível análise isolada do sobrenadante das suspensões, foi utilizada uma centrífuga microprocessada para tubos (Quimis®, São Paulo, Brasil).

4.2. Reagentes e amostras

Amostras de cacau em pó foram adquiridas em lojas de produtos naturais em Florianópolis-SC.

Ácido nítrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para o preparo das suspensões. Peróxido de hidrogênio (Vetec) foi utilizado para a digestão de amostras. Padrão aquoso de Ni 1000 mg L⁻¹ (Merck, Alemanha) foi utilizado para o preparo das soluções aquosas das curvas analíticas.

4.3. Procedimento

Alíquotas contendo tipicamente 50 mg de amostra de cacau foram pesadas diretamente em tubos de centrífuga de polipropileno. Soluções de HNO₃ de concentrações variadas foram, então, adicionadas aos tubos contendo as amostras até o volume final de 10 mL. Posteriormente, as suspensões foram colocadas por 20 minutos em banho de ultrassom. Alíquotas contendo 20 µL das suspensões foram analisadas a cada ciclo, inseridas com auxílio de amostrador automático. Imediatamente antes da pipetagem, as amostras foram aspiradas e liberadas pelo menos quatro vezes com uma ponteira de micropipeta conectada a borracha de

pipetagem, de modo a assegurar a coleta de porção homogênea do material sólido suspenso. Algumas das amostras de alimentos foram digeridas para fins de verificação de exatidão. Na digestão assistida por micro-ondas, foi utilizado em torno de 0,50 g de amostra, preparadas em triplicata, adicionando 3 mL de HNO_3 bidestilado e 0,5 mL de H_2O_2 30% (v/v), diretamente em vasos de perfluoralcóxi (PFA). O programa de aquecimento utilizado no microondas está apresentado na Tabela 2.

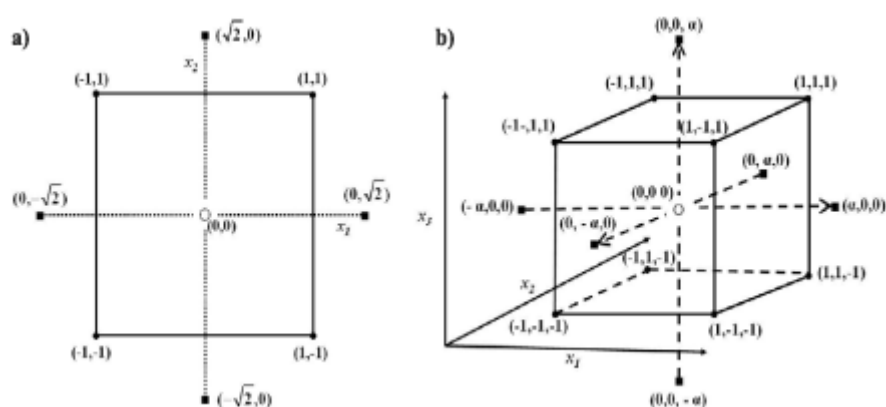
Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado na digestão das amostras de cacau em pó.

Etapa	Tempo / min	Potência / W
1	1	400
2	1	0
3	5	790
4	3	0

Fonte: Autoria própria (2024).

A extração de Ni para a fase aquosa foi avaliada considerando como variáveis a concentração de HNO_3 nas suspensões e o tempo em que ficaram em repouso (todas as suspensões foram preparadas com cerca de 50 mg de amostra). Para isso, foi realizado um planejamento composto central (CCD) 2^k , sendo k o número de variáveis, acrescido de pontos axiais e ponto central conforme Figura 1a)²⁹. O intuito foi reduzir o número de experimentos necessários para encontrar as condições ótimas de extração e avaliar a possível interação entre os parâmetros de preparo.

Figura 1. Representação geral de planejamento composto central com (a) $k = 2$ e $\alpha = 1,414$ e (b) $k = 3$ e $\alpha = 1,682$.



Fonte: Teófilo (2005)²⁹.

Considerando-se $k = 2$, foram realizados 10 experimentos com duplicata de ponto central. Para $k = 2$, a função que representa o modelo genérico da superfície gerada segue a Equação 1, que relaciona os termos lineares, quadráticos e os termos de interação de segunda ordem.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{1_1} x_1^2 + \beta_{2_2} x_2^2 + \beta_{1_2} x_1 x_2 \quad (1)$$

O planejamento foi construído considerando-se como variáveis a concentração de HNO_3 e o tempo de repouso entre o preparo da suspensão e a análise (em dias). A Tabela 3 contempla as informações inerentes ao planejamento CCD para a extração. Os experimentos de 1 a 4 se referem aos pontos do planejamento fatorial, de 5 a 8 aos pontos axiais e os experimentos 9 e 10 equivalem aos pontos centrais. Tal planejamento gerará uma superfície de resposta, possibilitando a identificação das condições ótimas. As respostas experimentais foram obtidas pela centrifugação das suspensões e pela análise individual de sobrenadante e da suspensão integral, de modo a avaliar a extração dos metais para a fase aquosa. A função múltipla resposta (MR) foi aplicada a fim de combinar a melhor resposta para a suspensão e sobrenadante, maximizando a condição de preparo de amostra para determinação de Ni. Foi calculada conforme a Equação 2 abaixo.

$$\text{MR} = \sum \left(\frac{(\text{Abs.Ni})_i}{(\text{Maior Abs.Ni})_{\text{Susp.}}} \right) + \left(\frac{(\text{Abs.Ni})_i}{(\text{Maior Abs.Ni})_{\text{Sobren.}}} \right) \quad (2)$$

Tabela 3. Planejamento composto central referente ao estudo de extração de Ni em amostras de cacau preparadas sob a forma de suspensão.

Exp.	Tempo	[HNO ₃]	Tempo / Dias	[HNO ₃] / % (v/v)
1	-1,000	-1,000	4	1,057
2	-1,000	1,000	4	2,562
3	1,000	-1,000	12	1,057
4	1,000	1,000	12	2,562
5	-1,414	0,000	0	1,505
6	1,414	0,000	16	1,505
7	0,000	-1,414	8	0,010
8	0,000	1,414	8	3,000
9	0,000	0,000	8	1,505
10	0,000	0,000	8	1,505

Fonte: Autoria própria (2023).

4.4. Segurança no laboratório

O procedimento se torna livre de reagentes tóxicos e corrosivos uma vez que visa simplificar o pré-tratamento das amostras, resumindo-o a preparação de suspensões aquosas acidificadas com HNO₃ bidestilado.

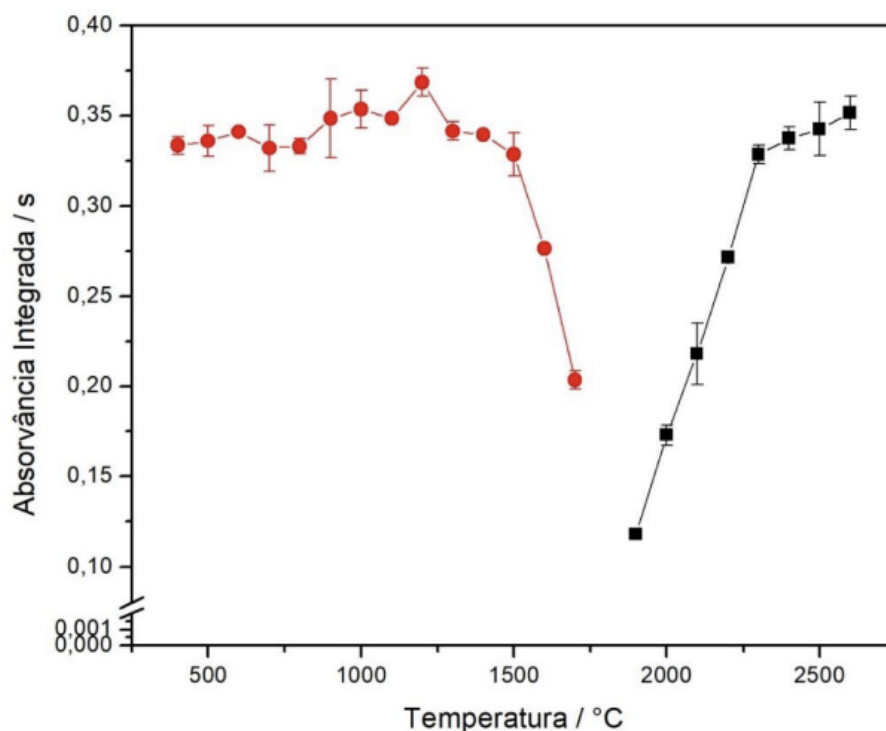
Os resíduos ácidos gerados foram depositados em bombonas específicas, rotulados e entregues à empresa contratada pela UFSC para que sejam corretamente tratados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curvas de pirólise e atomização

Com análises em triplicata, foram realizadas curvas de pirólise e atomização do analito para determinar o programa de temperatura ótimo para a análise. Variou-se a temperatura de pirólise enquanto a temperatura de atomização estava fixada em 2550 °C. Logo após, fixou-se a temperatura de pirólise em 1000 °C, variando-se a temperatura de atomização. As curvas de pirólise e atomização estão mostradas na Figura 2.

Figura 2. Curvas de pirólise (●) e atomização (■) obtidas por GFAAS para Ni em suspensão de cacau. As barras verticais representam o desvio padrão para cada ponto experimental.



Fonte: Autoria própria (2024).

A curva de pirólise permitiu atestar a elevada estabilidade térmica para Ni. O sinal de absorvância integrada manteve-se estável até 1500 °C, indicando que o analito não foi volatilizado na etapa de pré-tratamento térmico. Todavia, optou-se por fixar a temperatura de pirólise em 1000 °C, visto que não há vantagem quanto à eliminação da matriz para temperaturas superiores e o uso de temperaturas mais baixas auxiliaria no aumento de tempo de vida útil do tubo de grafite. A elevada estabilidade térmica para Ni refletiu também na curva de atomização, já que foram obtidos sinais crescentes com o aumento da temperatura. A sensibilidade máxima aliada a um perfil curto de sinal transiente foram observados com o uso de 2600 °C para atomização, condição essa adotada para as análises subsequentes. Ajustes nas temperaturas e tempo das etapas de secagem foram também conduzidos e resultaram no programa de temperaturas mostrado na Tabela 4, que foi adotado para todas as análises. Ressalta-se que, dada a elevada estabilidade térmica do analito, não foi necessário o uso de modificador químico, o que corrobora para simplificar o método de análise.

Tabela 4. Programa de temperaturas otimizado para a quantificação de Ni em suspensões de cacau por GFAAS.

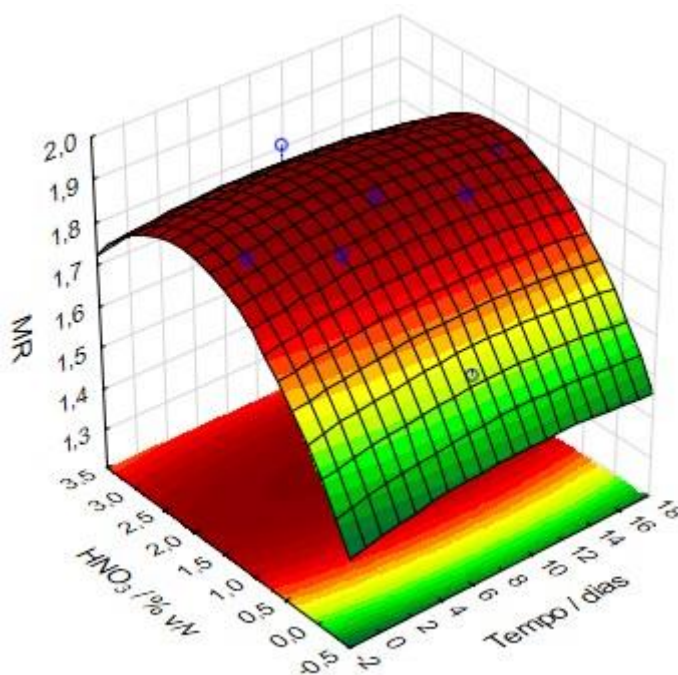
Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanência / s	Vazão de Ar / mL min⁻¹
Secagem I	90	10	5	250
Secagem II	120	10	20	250
Pirólise	1000	1	20	250
Adaptação do gás	20	1	5	250
Atomização	2600	0	5	0
Limpeza	2601	1	10	250

Fonte: Autoria própria (2024).

5.2. Estudos de extração

A análise de suspensões é tipicamente dependente da boa repetitividade da coleta das alíquotas em medições sequenciais. Isso implica na necessidade de assegurar uma distribuição relativamente homogênea das partículas sólidas no meio líquido, de modo que a concentração de partículas sólidas em cada alíquota injetada no forno de grafite possa ser replicada. A falta de homogeneidade, nesse caso, implica em baixa previsão, ocasionada pela injeção de alíquotas com representatividades distintas da suspensão total. Nesse sentido, a extração do analito para a fase aquosa é um parâmetro de interesse. Se a extração for efetiva, ainda que parcial, as medições passam a se tornar menos dependentes da concentração de partículas sólidas na alíquota mensurada, com impacto positivo na precisão. Com o intuito de avaliar o efeito das condições de preparo sobre a extração de Ni para a fase aquosa das suspensões, um estudo com planejamento multivariado foi conduzido. Foram avaliados como parâmetros a concentração de HNO₃ nas suspensões e o tempo de repouso decorrido desde o preparo da suspensão até a análise. Um planejamento composto central foi conduzido de acordo com os dados constantes da Tabela 2. Uma superfície com múltipla resposta foi gerada e é mostrada na Figura 3.

Figura 3. Superfície de múltipla resposta obtida por planejamento composto central para avaliar a extração de Ni a partir de suspensões de cacau preparadas em meio de HNO_3 .



Fonte: Autoria própria (2024).

A superfície de múltipla resposta considerou resposta combinada de percentual de extração e concentração na suspensão. O percentual de extração foi obtido comparando-se a concentração de Ni determinada do sobrenadante, obtido após centrifugação, com a concentração de Ni na suspensão antes da centrifugação. Para todos os casos, a efetividade da extração de Ni para a fase aquosa situou-se na faixa de 40 a 49% (m/m) para concentrações de HNO_3 superiores a 1,0% (v/v). Para a concentração mínima avaliada (0,01% v/v), o percentual médio de extração obtido foi de 27% (m/m). Tal constatação é coerente com a expectativa de que a migração dos íons para a fase aquosa seria estimulada pela presença do ácido, que atuaria na estabilização do analito e na degradação parcial da matriz da amostra de cacau. A superfície mostrada na Figura 3 evidencia a dependência da resposta múltipla com a concentração de HNO_3 e demonstra que o tempo entre o preparo da suspensão e a análise não é um fator preponderante para definir a eficiência de extração. Aparentemente, o percentual extraível de Ni, mesmo com baixa concentração de HNO_3 , migra imediatamente para a fase aquosa. Este é um efeito benéfico, já que é possível usufruir do benefício do aumento da precisão oriundo da extração do analito imediatamente após o preparo, o que simplifica o processo. A Figura 3 sugere ainda uma faixa ótima de 1,5 a 2,5% (v/v) para a concentração de HNO_3 . Apesar de haver

uma variação evidente na múltipla resposta em função da concentração de HNO_3 , ressalta-se que o impacto é relativamente pequeno, o que confere robustez ao método frente a essa variável. A Tabela 5 contém os dados completos obtidos experimentalmente para a avaliação multivariada dos parâmetros de extração.

Tabela 5. Dados de extração de Ni para a soluções com diferentes concentrações de HNO_3 usadas para preparo das amostras de cacau em suspensão.

Cacau A				Cacau B		
	Suspensão / $\mu\text{g g}^{-1}$	Sobrenadante / $\mu\text{g g}^{-1}$	% (m/m)	Suspensão / $\mu\text{g g}^{-1}$	Sobrenadante / $\mu\text{g g}^{-1}$	% (m/m)
1	9,25	4,10	44,35	9,11	4,02	44,10
2	9,16	4,01	43,80	8,10	3,97	49,00
3	9,37	4,11	43,90	10,07	4,16	41,26
4	9,30	3,95	42,52	9,48	4,11	43,40
5	9,50	4,05	42,63	9,81	4,19	42,76
6	9,79	4,15	42,42	9,56	4,06	42,50
7	9,84	2,93	29,79	10,40	2,86	27,48
8	9,93	3,97	39,95	9,92	4,29	43,24
9	9,83	4,13	42,01	10,17	4,12	40,47
10	9,67	4,23	43,68	9,78	4,17	42,66

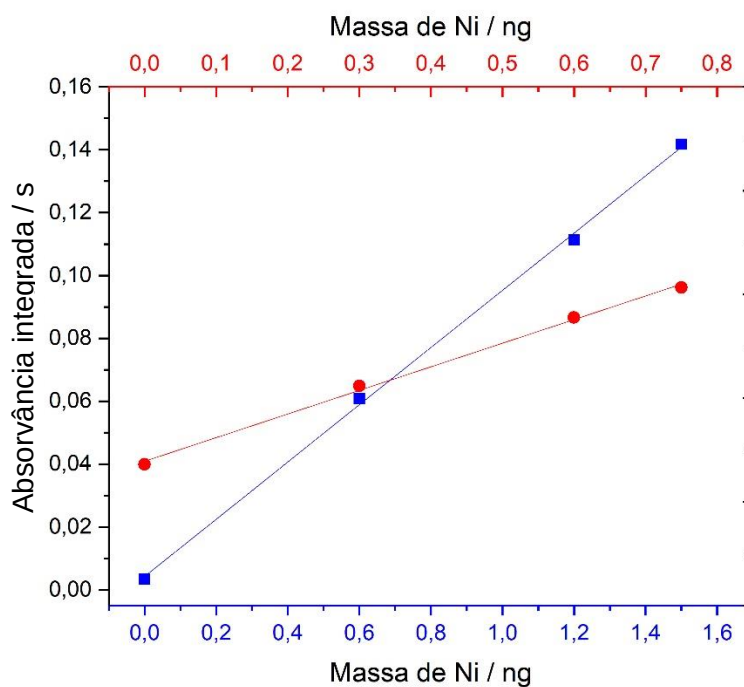
Fonte: Autoria própria (2024).

5.3. Análise das suspensões

Com o programa de temperatura já otimizado, as estratégias de calibração para a quantificação foram avaliadas. Como não houve influência significativa do tempo de repouso da suspensão e a resposta foi levemente superior para suspensões preparadas em HNO_3 2,0% (v/v), optou-se por adotar essas condições para a quantificação. Procedeu-se com a calibração utilizando duas estratégias distintas, que foram comparadas: a calibração usando soluções aquosas preparadas por diluição de uma solução estoque e a calibração por adição de padrão. Para a calibração por adição de padrão, alíquotas de 10 μL da suspensão foram pipetadas juntamente com 10 μL de soluções aquosas contendo concentrações crescentes de Ni. As curvas de calibração estão mostradas na Figura 4 e os parâmetros obtidos a partir do ajuste

linear para ambas as curvas estão dispostos na Tabela 6. As curvas de calibração e os dados da Tabela 6 evidenciam um bom ajuste linear inerente às funções de calibração. Todavia, o resultado mais notório referiu-se às inclinações, que se mostraram distintas. A inclinação obtida na calibração por adição de padrão foi inferior em cerca de 16% à inclinação obtida com calibração externa. Isso sugere que a atomização a partir da matriz de cacau é menos eficaz, indicando uma interação significativa do analito com a matriz. A maior sensibilidade obtida para calibração com soluções aquosas é provavelmente oriunda do fato de que o analito encontra-se livre e depositado na superfície de grafite antes da atomização. As diferenças de inclinação demonstram que a calibração com soluções aquosas não proverá os resultados mais exatos, considerando-se que há um efeito de matriz significativo.

Figura 4. Curvas de calibração obtidas por GFAAS para Ni com padrões aquosos (-■-) ou por adição de analito (-●-) em suspensões de cacau preparadas em HNO_3 2,0% (v/v) (as escalas nos eixos das abscissas estão ajustadas a cada curva de calibração), com intuito de comparação de sensibilidade entre as estratégias.



Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 6. Parâmetros de ajuste linear das funções de calibração externa e por adição de analito para a determinação de Ni em suspensões de cacau por GFAAS.

Parâmetro	Calibração externa	Adição de analito
R^2	0,9987	0,9963
Intercepto / s	0,0043	0,0410
Inclinação / s ng ⁻¹	0,0910	0,0751

Fonte: Autoria própria (2024).

Como referência para as quantificações, foi realizada uma digestão por via úmida, com auxílio de um micro-ondas, de uma das amostras de cacau. As análises da amostra digerida foram conduzidas por GFAAS com calibração externa com padrões aquosos. Os dados quantitativos e os parâmetros estatísticos utilizados para avaliação dos dados encontram-se dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados de concentração e parâmetros estatísticos obtidos para diferentes estratégias de quantificação de Ni em amostra de cacau por GFAAS.

Amostra / Estratégia de calibração	Ni / $\mu\text{g g}^{-1}$	F calculado*	t calculado*
Amostra digerida / Calibração externa	$9,77 \pm 0,35$	--	--
Suspensão / Calibração externa	$8,80 \pm 0,05$	43,55	33,6018
Suspensão / Adição de analito	$9,99 \pm 0,74$	4,46	0,5149

* Os parâmetros estatísticos foram calculados relativos ao resultado obtido para a amostra digerida.

Pode-se notar um maior desvio padrão para a calibração por adição de padrão, demonstrando a menor precisão deste método de calibração, se comparado a calibração externa. Entre as diversas causas, pode-se ressaltar o efeito de matriz e o impacto da homogeneidade da suspensão, visto que a extração do analito para a fase aquosa não é quantitativo e, portanto, o sinal depende da quantidade de partículas sólidas efetivamente injetadas no forno.

O valor de F calculado, considerando-se a quantificação obtida para amostra digerida como referência, mostrou-se superior ao F crítico (igual a 19,00 para 95% de confiança) para o resultado obtido por calibração externa. Em contrapartida, com a calibração por adição de padrão, o F calculado foi inferior ao F crítico, o que sugere que a precisão é comparável à obtida com a digestão da amostra.

O valor de t calculado para a calibração externa mostrou-se superior ao valor crítico de 4,3127 para 95% de confiança, demonstrando diferença estatística significativa em relação ao valor de referência, estabelecido pela digestão da amostra. Por outro lado, o valor de t calculado para o método de adição de padrão mostrou-se inferior ao valor crítico, o que sugere ausência de discrepância estatística entre os resultados. Essa diferença já era esperada quando se compara o resultado obtido com calibração externa ao resultado obtido por adição de padrão.

Na Tabela 8 a seguir estão expressos os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), explicitando as menores quantidades de analito presente na amostra que podem ser detectadas e quantificadas, respectivamente, pelo método em questão³⁰.

Tabela 8. Limites de detecção e de quantificação obtidos para a determinação de Ni em amostras de 6 cacau em suspensão por GFAAS, com diferentes estratégias de calibração.

Figura de mérito	Calibração externa	Adição de analito
LD / $\mu\text{g g}^{-1}$	0,6	0,7
LQ / $\mu\text{g g}^{-1}$	2,0	2,5

Fonte: Autoria própria (2024).

Como esperado, os limites de detecção e quantificação foram maiores, devido à menor precisão e inclinação da curva de calibração pela estratégia de adição de padrão.

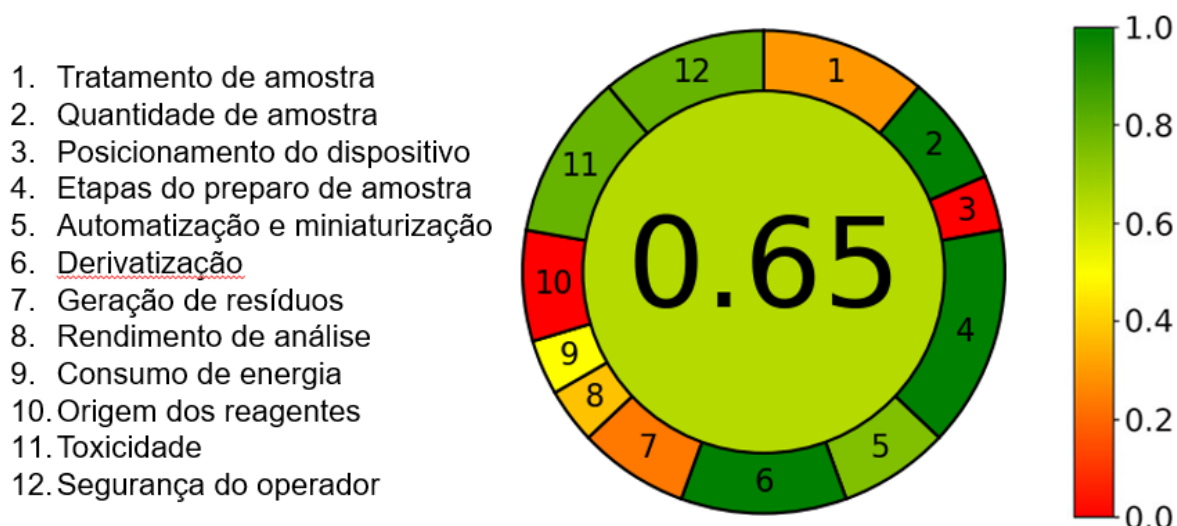
5.4. Aplicação do software AGREE para atribuição do grau de sustentabilidade ao método

Os parâmetros inerentes à técnica utilizada, como a determinação de apenas um analito por análise, referente ao número 8 na Figura 5, receberam peso menor, visto a impossibilidade de aprimoramento. Antagonicamente, sendo a redução de

processos no preparo de amostras o principal objetivo da análise de sólidos em suspensão, parâmetros como o 1, 4, 6 e 12 receberam pesos maiores.

Em escala de 1 a 4, onde 1 é o menor peso e 4 o maior, os parâmetros 3, 9, e 8 receberam peso 1, os parâmetros 2, 5, 7 e 10 receberam peso 2, os parâmetros 1, 6, 11 e 12 receberam peso 3 e o parâmetro 4 recebeu peso 4.

Figura 5. Pontuação obtida a partir do software AGREE baseado nos 12 princípios da química verde.



Fonte: Pena-Pereira *et. al.* (2020)²⁴.

Nota-se uma pontuação mediana atribuída ao método, obtendo-se as menores pontuações nos parâmetros 3, 7, 8 e 10, visto que a técnica não possibilita análise *in situ*, a análise em triplicata gera cerca de 30 mL de resíduo ácido, não há, teoricamente, possibilidade de determinação multielementar em apenas uma análise e não há a utilização de reagentes com origem em fontes renováveis, respectivamente.

Comparativamente ao método tradicional de análises em GFAAS, o método proposto se apresenta mais verde, visto a não utilização de processos de digestão de amostras, a qual gera maior volume de resíduos, assim com a ausência de qualquer espécie de derivatização, e contando apenas com a utilização de água acidificada como solvente.

6. Conclusão

O método de determinação de Ni baseado na análise de suspensões por GFAAS mostrou-se simples, rápido e suficientemente preciso e com boa pontuação

no software AGREE, que leva em consideração os 12 princípios da química verde. Observou-se pouca influência do tempo e da concentração de HNO_3 usado para preparo da suspensão no processo de extração, podendo-se realizar as análises das suspensões logo após o preparo, o que atribui robustez ao processo. Como esperado, as inclinações das curvas de calibração estabelecidas por diferentes estratégias apresentaram diferentes resultados, indicando o efeito da matriz na atomização do Ni em suspensão. Observou-se diferenças na exatidão entre diferentes estratégias de calibração e em relação ao resultado obtido por digestão. Apesar da boa exatidão do método de adição de padrão, faz-se necessário um estudo mais aprofundado para a avaliação da exatidão, considerando a possibilidade do uso de materiais certificados.

7. Referências

¹MUSSELLI, Irene. Cocoa Study: Industry Structures and Competition. **United Nations Conference on Trade and Development**, [s. l.], 2008.

²VISIOLI, Francisco; BORSANI, Luisa; GALLI, Claudio. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovascular Research**, [s. l.], 14 fev. 2000.

³TRIPATHI, Ravi *et al.* Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. **The Science of the Total Environment**, Mumbai, India, 15 jan. 1999.

⁴GENCHI, Giuseppe *et al.* Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], 21 jan. 2020.

⁵ARÉVALO-GARDINI, Enrique *et al.* Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. **Science of the Total Environment**, [s. l.], 15 jun. 2017.

⁶REHMAN, Sohaila; HUSNAIN, Syed. Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Trace Element Analysis**, [s. l.], 13 out. 2012.

⁷VINADÉ, Maria Elisabeth do Canto; VINADÉ, Elsa Regina do Canto. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**. 1. ed. [S. l.]: Editora UFSM, 2005. v. 1.

⁸WILLARD, H.; MERRITT, L.; DEAN, J. **Análise Instrumental**. 5. ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbekian, 1974.

⁹WELZ, Bernhard; SPERLING, Michael. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH, 1998.

- ¹⁰[Anônimo]. Boris Vladimirovich L'vov (On his 75th birthday). **Journal Of Analytical Chemistry**, [s. l.], 2006
- ¹¹NOMURA, C. S.; DA SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, [s. l.], 19 dez. 2007.
- ¹²MILLER-IHLI, N. J. Slurry sampling for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Beltsville, Estados Unidos, 1990.
- ¹³CAL-PRIETO, M. J. *et al.* Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, Coruna, Espanha, 7 ago. 2001.
- ¹⁴MAGALHÃES, C. E. de C.; ARRUDA, M. A. Z.. Amostragem de suspensões: Emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**. Campinas, São Paulo, 21 jan. 1998.
- ¹⁵BASTIAANS, G. J.; HIEFTJE, G. M.. Vaporization of individual solute particles in flame spectrometry. **Analytical Chemistry**. Bloomington, Estados Unidos, 7 jun. 1974.
- ¹⁶VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; GARCÍA, I. L.; CÓRDOBA, M. H.. Slurry–electrothermal atomic absorption spectrometric methods for the determination of copper, lead, zinc, iron and chromium in sweets and chewing gum after partial dry ashing. **Analyst**, Murcia, Espanha, 1994.
- ¹⁷SILVA, M. M.; VALE M. G. R.; CARAMÃO E. B. Slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry: determination of trace metals in mineral coal, **Talanta**, Porto Alegre, Brasil, 29 jun. 1999.
- ¹⁸DOBROWOLSKI, R.. Slurry sampling for the determination of thallium in soils and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], 1 nov. 2002.
- ¹⁹ORESTE, E. Q. *et. al.*. Evaluation of sample preparation methods for the determination of Cd, Cr and Pb in ceramic tableware by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Letters**, [s. l.], 2020.
- ²⁰HU, Y. *et. al.* Using Chemical Modifiers and Increasing the Pyrolysis Temperature for High-Sensitivity Spectrometric Determination of Cadmium in Dairy Products. **Journal of Applied Spectroscopy**, [s. l.], 2020.

²¹KRIEGEROVÁ, K. *et. al.*. Determination of lead in human placenta tissue employing slurry sampling and detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**. [s. l.], 2020.

²²TOKMAN, N..The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**. Maslak, Turquia, 1 set. 2006.

²³BUSTOS, D. E.; TORO, J. A.; BRICENÕ, M..; RIVAS, R. E.. Use of slow atomization ramp in high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of Cd and Ni in slurry powdered chocolate samples. **Talanta**, [s. l.], 14 mai. 2022.

²⁴PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, [s. l.], 15 jun. 2020.

²⁵BENDICHO, C. *et. al.*. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], 2012.

²⁶MINAMI, H.; HONJYO, T.; ATSUYA I.. A new solid-liquid extraction sampling technique for direct determination of trace elements in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Kitami, Japão, 11 abr. 1995.

²⁷REZIC, I.. Optimization of ultrasonic extraction of 23 elements from cotton. **Ultrasonics Sonochemistry**, Zagreb, Croácia, 29 abr. 2008.

²⁸SANTOS, C. *et. al.*. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Vigo, Espanha, 19 jul. 2000.

²⁹TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, Campinas, São Paulo, 8 dez. 2005.

³⁰CASSIANO, N. M. *et. al.*. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Carlos, Brasil, 2 fev. 2009.