



FURG

Dissertação de Mestrado

Determinação de Nitrogênio Inorgânico em Infusões de Ervas por HR-CS GF AAS: um estudo sobre a influência do cultivo na concentração de nitrogênio

João Batista dos Santos Espinelli Junior

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

Determinação de Nitrogênio Inorgânico em Infusões de Ervas por HR-CS GF AAS: um estudo sobre a influência do cultivo na concentração de nitrogênio

por

João Batista dos Santos Espinelli Junior

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.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

Determinação de Nitrogênio Inorgânico em Infusões de Ervas por HR-CS GFAAS: um estudo sobre a influência do cultivo na concentração de nitrogênio

Elaborada por

JOÃO BATISTA DOS SANTOS ESPINELLI JUNIOR

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodolfo Carapelli (Orientador, FURG - RS)

Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG - RS)

Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro (UFPel – RS)

Rio Grande, 03 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao Laboratório de Eletro Espectro Analítica e ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande, por permitir a oportunidade de executar as aprendizagens aqui construídas e demonstradas neste trabalho.

Ao professor Dr. Rodolfo Carapelli, agradeço pela orientação e apoio demonstrado durante a execução deste mestrado, assim como pela coragem em aceitar orientar um aluno sem nenhuma prática de laboratório até o momento de mestrado, e pelo apoio financeiro em certos momentos da pesquisa, assim como pela ideia do trabalho, além do constante fornecimento de amostras de alimentos orgânicos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior pela bolsa de estudo concedida durante o período de execução do mestrado.

Ao professor Dr. Bruno Meira pela ajuda em entender alguns pontos da fonte contínua, e por aceitar participar nas bancas de qualificação e dissertação.

A professora Dra. Eliana Badiale Furlong, pela ajuda ao sanar os questionamentos que surgiam durante a execução do trabalho e pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao professor Dr. Anderson Schwingel por aceitar participar na banca de defesa da dissertação.

Aos meus pais os quais dedico essa dissertação pelos momentos de apoio e paciência comigo, assim como aqueles suportes financeiros com algumas amostras.

Ao técnico da Polimate, Renato, pela manutenção realizada no equipamento possibilitando finalmente retornar a realizar as análises do forno de grafite e também nos comprimentos de onda abaixo de 248 nm além de ensinar que com shampoo Johnson e Johnson infantil é possível fazer a limpeza das janelas de quartzo quando necessário.

Aos alunos de iniciação científica Felipe, Ane, Kerol, Bruna e Cassiane pela coragem de aceitarem receber parte de sua orientação da minha pessoa o que me levou a formação de muitos conhecimentos. A Diana e ao Felipe agradeço também por

me acompanharem aos sábados durante as análises de chama e outros trabalhos paralelos.

A Nívia por ter tido a paciência de me ensinar a usar o ContrAA 700, o que não foi fácil apreender. Aos colegas do LEEA, por todo tempo que passamos juntos durante a execução deste processo de mestrado, com um destaque a Juliana Maciel pela sua interminável paciência quando eu ia tirar dúvidas com ela. Também agradeço pela convivência a professora Daiane por se mostrar uma boa professora desde as aulas da graduação sempre disposta a auxiliar na resolução de dúvidas que surgem e a todos seus alunos de LEEA Leandro, Mônica, Lainide, Ju Rocha, Cris, Milena e Monize.

Ao Alisson do LOU por ter a paciência de me ensinar a usar os moinhos de bolas e facas. Ao Nauro do laboratório de operações unitárias pelos momentos de discussão sobre os alimentos orgânicos que auxiliaram na construção deste trabalho. A técnica Maristela do LAMCA, por me ajudar nas análises de nitrogênio orgânico nos trabalhos paralelos. A Sergi, do LACOM que sempre incomodava quando ia pedir o vortex e a micropipeta de 5 mL.

A todos os professores do PPG QTA, pelas aprendizagens desenvolvidas durante o decorrer do curso, das quais muitos executo neste trabalho e a secretária do PPG QTA Rosane. Não posso esquecer também das tias da limpeza Marli, a Dona Ana, a Romilda e a Dona Lúcia da limpeza que passaram pelo laboratório e pelos corredores da EQA mantendo tudo limpo e que propiciaram muitas conversas ao longo do curso de mestrado.

Aos professores do curso de Química Licenciatura que me auxiliaram na construção dos conhecimentos iniciais que permitiram a formação dos alicerces que agora sustentam as aprendizagens construídas durante o decorrer deste curso de pós-graduação.

Aos Laboratórios de Operações Unitárias, do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais e do Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade pela ajuda concedida nos momentos que os procurei. A todos os técnicos que me ajudaram quando ia pedir algum reagente, material ou equipamento para execução do trabalho. Também um grande agradecimento a todos os quais não cito aqui, mas participaram deste processo de mestrado.

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus amados pais, João Batista dos Santos Espinelli e Vera Regina Esperança Espinelli, que estiveram sempre me fornecendo exemplo de moral e ética os quais pretendo seguir, também agradeço o apoio nos maus momentos que tive em minha vida, pai e mãe muito obrigado isso é para vocês. Não posso esquecer de dedicar nem que seja uma pequena parte deste trabalho, também a todos os meus familiares que demonstravam paciência quando explicava o que eu fazia no mestrado e que pelos mostravam algum interesse na minha frente enquanto eu explicava.

Epígrafe

Lembraí-vos, aqueles momentos ruins em suas origens hoje forjam seu futuro como o fogo forja o ferro, ou seja, nunca renegue suas origens e seu passado, pois por mais difíceis que possam ser são eles que tornaram o que és hoje.

João Batista dos Santos Espinelli Junior

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. Produção e Cultivo de Alimentos	6
3.2. Determinação de Nitrato e Nitrito	7
3.3. Espectroscopia de Alta Resolução com Fonte Contínua	16
3.4. Chás e Ervas	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Instrumentação	24
4.2. Reagentes	25
4.3. Vidrarias	25
4.4. Amostragem	25
4.5. Preparo de Amostra	26
4.6. Pirólise e Vaporização	27
4.7. Efeito de Matriz	27
4.7.1. Determinação do Efeito de Matriz	27
4.7.2. Avaliação dos Interferentes	28
4.7.3. Quantificação da Matéria Orgânica	28
4.8. Redução do Efeito de Matriz	29
4.8.1. Avaliação do Tempo de Pirólise	29
4.8.2. Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado	29
4.8.3. Precipitação da Matéria Orgânica	30
4.8.4. Oxidação da Matéria Orgânica	30
4.9. Validação	30
4.9.1. Faixa Linear	30
4.9.2. Limites de Detecção e Quantificação	30
4.9.3. Exatidão	31
4.9.4. Precisão	31

4.10. Análise das Amostras	31
5. Resultados e Discussão	32
5.1. Curvas de Pirólise e Vaporização	33
5.2. Efeito de Matriz	36
5.2.1. Avaliação dos Interferentes	37
5.2.2. Estudo de Interferência da Matéria Orgânica	40
5.3. Estudos para Redução do Efeito de Matriz	46
5.3.1. Estudo do Tempo de Pirólise	47
5.3.2. Estudo de Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado	50
5.3.3. Precipitação da Matéria Orgânica com Ácidos	51
5.3.4. Oxidação da Matéria Orgânica com Peróxido de Hidrogênio	52
5.4. Condições para Determinação de N-NO	54
5.5. Desempenho Analítico	54
5.5.1. Faixa Linear	55
5.5.2. Limites de Detecção e Quantificação	55
5.5.3. Exatidão	56
5.5.4. Precisão	56
5.6. Aplicação do Método para Determinação de N-NO em Infusões de Ervas Orgânicas e Convencionas	57
6. Considerações Finais	63
7. Referências de Pesquisa	65
8. Apêndice I – Preparo de reagentes e soluções	79
8.1. Solução Padrão	79
8.2. Modificadores Químicos	79
8.3. Soluções do Estudo de Interferentes	79
8.4. Soluções Utilizadas no Teste de Precipitação	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Selo de Identificação dos Alimentos Orgânicos no Brasil _____ 7
- Figura 2 – Configuração de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua _____ 17
- Figura 3 – Espectro de absorbância, na vizinhança de Sb 217,581 nm, para (a) amostra sem correção, (b) sinal de SiO obtido de SiO₂ e (c) amostra após correção com método dos mínimos quadrados. _____ 20
- Figura 4 – Procedimento de Preparo da Infusão _____ 27
- Figura 5 – Procedimento de Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado _____ 29
- Figura 6 – Curvas de Pirólise e Vaporização Construídas em Meio Aquoso Confeccionadas com 10 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻ (•) Sem Modificador, (□•) 1 % (m v⁻¹) de Ca²⁺, (•) 1% (m v⁻¹) de Sr²⁺ e (•) 1% (m v⁻¹) de Ba²⁺. As condições utilizadas foram 20s de pirólise, vaporização fixada na pirólise foi de 1300°C, pirólise fixada para atomização 300°C em todas as curvas de pirólise. _____ 33
- Figura 7 – Sinal de Absorbância para 10 mg L⁻¹ de N-NO nas temperaturas de pirólise e vaporização otimizadas nas condições (•) Sem Modificador; (□•) 5 µL de 1 % (m v⁻¹) de Ca²⁺, 300°C de Pirólise por 20s e 900°C de Vaporização por 8s; (•) 5 µL de 1% (m v⁻¹) de Sr²⁺; (•) 5 µL de 1% (m v⁻¹) de Ba²⁺ 300°C de Pirólise por 20s e 800°C de Vaporização por 8s. 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 35
- Figura 8 – Curvas de (a) Pirólise e (b) Vaporização construídas em (•) solução aquosa de 10 mg L⁻¹ de N-NO (•) Infusão de Camellia sinensis (chá preto) fortificada com 10 mg L⁻¹ de N-NO com 5 µL de Ca 1% (m v⁻¹). Condições: 20s de pirólise; Temperatura fixa de vaporização na otimização da pirólise 900°C e temperatura fixa de pirólise na otimização da vaporização foi de 200°C, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 36
- Figura 9 – Interferência de (•) P-H₂PO₄⁻, (•) S-SO₄²⁻, (•) Si-SiO₃²⁻ e (•) C-CO₃²⁻ no Sinal de 10 mg L⁻¹ de N-NO. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 38

Figura 10 – Curvas de calibração em meio aquoso construídas (•) com adição de 5 μL de 1% (m v^{-1}) de Ca^{2+} e (•) sem adição de modificador químico. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 39

Figura 11 – Efeito do Carbono Orgânico no Sinal de 10 mg L^{-1} de N-NO. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. 40

Figura 12 – Efeito da Concentração de C-Glicose no Espectro de 10 mg L^{-1} de N-NO: (•) Sem correção, (•) Empregando o método dos mínimos quadrados. Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, Vaporização de 700° por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 40

Figura 13 – Espectros dos Interferentes sem Fortificação na Concentração de 1,50% de (a) C-Glicose, (b) C-CO_3^{2-} , (c) $\text{P-H}_2\text{PO}_4^-$, (d) S-SO_4^{2-} e (e) Si-SiO_3^{2-} . Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 43

Figura 14 – Flavonóis Encontrados no Chá Preto e Chá Verde, (a) Epigallocatequina, (b) Theaflavina e (c) Therubiginas _____ 46

Figura 15 – Curvas de Calibração Construídas com (•) 20s de Pirólise, (•) 40s de Pirólise, (•) 60s de Pirólise e (•) 80s de Pirólise (a) no Solvente e (b) na Amostra, Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 48

Figura 16 – Sinal de Absorbância Integrada de 20 mg L^{-1} de N-NO (•) Solvente e (•) Amostra para (a) 20s de Pirólise, (b) 40s de Pirólise, (c) 60s de Pirólise, (d) 80s de Pirólise. Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 50

Figura 17 – Resultado da Adição de (a) Ácido Clorídrico e (b) Ácido Bórico. _____ 52

Figura 18 – Estudo com Adição de Peróxido de Hidrogênio (•) Sem Ultrassom, (•) Aplicação de Ultrassom Durante 5 min com 50% de Amplitude. Condições: 10 mg L^{-1} de N-NO, 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 53

Figura 19 – Estudo da Aplicação de (•) 50% de Amplitude, (•) 60% de Amplitude e (•) 70% de Amplitude Durante 5 min com 50% de Amplitude. Condições: 10 mg L^{-1} de N-

NO, 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 54

Figura 20 – Faixa Linear Estuda, até 180 mg L^{-1} , Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador, Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 55

Figura 21 – Concentração de N-Inorgânico Determinado nas Infusões de Ervas. Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____ 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos para determinação de nitrato em vegetais _____	9
Tabela 3 – Trabalhos que fazem a determinação de nitrato e nitrito através de HR-CS GF MAS _____	16
Tabela 3 – Moléculas Observadas em Determinações Moleculares por HR-CS MAS_	18
Tabela 4 – Condições para Determinação de N-Inorgânico em Infusões por HR – CS GF MAS _____	24
Tabela 5 – Amostras Utilizadas no Estudo _____	26
Tabela 6 – Ponto e Fusão e Energia de Rede dos Sais de Nitrato _____	34
Tabela 7 – Temperaturas de Pirólise e Vaporização Definidas em Água _____	34
Tabela 8 – Efeito de Matriz para Variações da Camellia Sinensis na Determinação de N-NO. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s utilizando 5 µL de Ca ²⁺ 1% (mv ⁻¹). _____	37
Tabela 9 – Relação da atenuação do sinal provocada por 0.10% do interferente com a solubilidade dos sais formados entre o modificador e o interferente _____	39
Tabela 10 – Concentração de Carbono Orgânico e Efeito de Matriz nas Infusões ____	45
Tabela 11 – Efeito de Matriz nos Tempos de Pirólise Avaliados. Condições: 5 µL de Ca ²⁺ 1% (m v ⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____	47
Tabela 12 – Recuperações e Inclinações Obtidas no Estudo com Tempos de Pirólise por Calibração Externa e Adição de Padrão. Condições: 5 µL de Ca ²⁺ 1% (m v ⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500° de Limpeza por 5s. _____	49
Tabela 13 – Efeito de Matriz e Recuperações de 10 mg L ⁻¹ de N-NO para 40 e 60s de Pirólise Utilizando Carvão Ativado como Adsorvente para Remoção da Matéria Orgânica. Condições: 5 µL de Ca ²⁺ 1% (m v ⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5. _____	51
Tabela 14 – Resultados de Adição Recuperação para as Amostras de Camellia sinensis, Foeniculum vulgare e Matricaria recutita. Condições: 5 µL de Ca ²⁺ 1% (m v ⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____	56

Tabela 15 – Comparação da Recuperação Obtida com Dados da Literatura _____	56
Tabela 16 – Concentração de N-NO_3^- Determinada nas Amostras Orgânicas e Convencionais: Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s. _____	57
Tabela 17 – Concentração de N-NO estimada para uma infusão preparada pela por um Sachê em 200mL de água e valores de ingestão diária aceitável para N-NO inorgânico calculados com base um valor de 3.24 mg Kg^{-1} de massa corporal _____	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AAS: Espectrometria de absorção atômica (do inglês *atomic absorption spectrometry*).
2. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
3. HG AAS: espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês *Hydride generation atomic absorption spectrometry*)
4. HR – CS AAS: Espectrometria de absorção atômica de fonte contínua com alta resolução (do inglês, *high resolution continuum source atomic absorption spectrometry*).
5. HR-CS FAAS: Espectrometria de absorção atômica de fonte contínua com alta resolução em chama (do inglês, *high resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*).
6. HR-CS GFAAS: Espectrometria de absorção atômica de fonte contínua com alta resolução em forno de grafite (do inglês, *high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*).
7. HR-CS MAS: Espectrometria de absorção molecular de fonte contínua com alta resolução (do inglês, *high resolution continuum source molecular absorption spectrometry*).
8. GF: forno de grafite (do inglês, *graphite furnace*).
9. LS: Fonte de linhas (do inglês *line source*).
10. MAS: Espectrometria de Absorção Molecular (do inglês *Molecular absorption spectrometry*).
11. N-NO: nitrogênio oxidado, válido para descrever a soma da concentração de nitrato e nitrito (NO_3^- e NO_2^-)
12. UV-Vis: Ultravioleta visível

RESUMO

Título: Determinação de Nitrogênio Inorgânico em Infusões de Ervas por HR-CS GFAAS: um estudo sobre a influência do cultivo na concentração de nitrogênio

Autor: João Batista dos Santos Espinelli Junior

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Carapelli

Este trabalho propõe o desenvolvimento de um método para a determinação de nitrogênio inorgânico através da análise direta de infusões de carqueja, *Camellia sinensis* (chás preto, branco e verde), capim-cidreira, funcho, camomila, melissa, hortelã e *Ilex paraguariensis* de origem orgânica e convencional por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua. Durante o desenvolvimento do método foram avaliadas quatro diferentes estratégias para eliminação do efeito da matriz produzida pela matéria orgânica residual resultado da queima incompleta na temperatura 200°C da pirólise, foram avaliadas separadamente o tempo de pirólise, adsorção da matéria orgânica, precipitação da matéria orgânica e oxidação do carbono orgânico. Todavia sendo a alternativa do tempo de pirólise com melhores resultados foi elencada para ser trabalhada junto das demais estratégias avaliando o efeito sinérgico desta com as demais na determinação do N-NO. Além do mais foi determinado que diferentes compostos orgânicos podem ser potenciais interferentes na determinação de N-NO, provocando a indisponibilização do modificador químico. Tendo observado a forte interferência de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos para determinação do N-NO nas amostras se escolheu como método de calibração adição de padrão. Desta forma foram determinados os limites de detecção e quantificação em 0.29 e 0.96 mg L⁻¹ respectivamente, a faixa linear entre 0,96 e 120 mg L⁻¹, a exatidão através de ensaios de adição recuperação ficou na faixa de 81 a 107% e a precisão determinada através do cálculo do desvio padrão relativo em 8.4%. A determinação de N-NO nas amostras permitiu observar a relação entre a concentração de N-NO e o cultivo das ervas, visto que as amostras orgânicas em sua grande parte apresentam suas concentrações abaixo do limite de detecção de 0,29 mg L⁻¹. Após a quantificação de N-NO nas amostras foi observada a relação entre a concentração de nitrogênio inorgânico e o cultivo das ervas. Visto que as todas as apresentam sua concentração

abaixo do limite de detecção de $0,29 \text{ mg L}^{-1}$. Outra característica observada é que nem uma das amostras apresenta valores de ingestão diária que ofereça risco de consumo ao ser humano já que o volume necessário para que ela ofereça algum risco em alguns é superior a 7 L de infusão por quilograma de massa corporal.

Palavras chave: Alimentos Orgânicos, Chás, Infusões, HR-CS GF AAS

ABSTRACT

Title: Determination of Inorganic Nitrogen in Infusions by HR-CS GF AAS: Study on the cultivation influence in concentration inorganic nitrogen

Author: João Batista dos Santos Espinelli Junior

Advisor: Prof. Dr. Rodolfo Carapelli

This work proposes the development of a method for the determination of inorganic nitrogen through the direct analysis of infusions organic and conventional herbal by HR-CS GF AAS. During the development of the method were evaluated different four strategies to eliminate the matrix effect originated from residual organic matter, of incomplete burning due to low pyrolysis temperature (200 °C), being evaluated time of pyrolysis, adsorption, precipitation and oxidation of the organic matter. However, none of the four strategies presented good results to the point of being possible the inorganic nitrogen determination by external calibration, being necessary the use of addition of standard as a calibration method for the correct quantification of inorganic nitrogen. Moreover, it was detected that different inorganic compounds may be potential interferers in the determination of inorganic nitrogen, because they act without the chemical modifier that is directly related to the sensitivity of the method. After the quantification of inorganic nitrogen in the samples, the relationship between the inorganic nitrogen concentration and the herb culture was observed. Since the organic samples for the most part show their concentration below the limit of detection of 0.23 mg L⁻¹. After the quantification of inorganic nitrogen in the samples, the relationship between the inorganic nitrogen concentration and the herb culture was observed. Since all of them present their concentration below the limit of detection of 0.23 mg L⁻¹. Another characteristic is that not one of the samples presents daily intake values that offer consumption risk, since the volume necessary for it to offer some risk in some is higher than 7 L of infusion per kilogram of body mass.

Keywords: Organic food, tea, infusions, HR-CS GF AAS

1. INTRODUÇÃO

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo, com relatos orais de lendas chinesas que remontam seu consumo desde o ano de 2737 a.C. assim como relatos escritos de seu consumo desde o ano de 200 a.C. (BRAIBANTE *et al.* (2014), seu consumo se dá principalmente pelos seus potenciais benefícios antimutagenicos, hipo e hiperglicêmicos dentre outras propriedades (ZIELINSKI *et al.* 2014). Na tradição familiar brasileira o consumo de chás e produtos naturais é considerado uma prática familiar generalizada sendo empregado para administração de princípios ativos presentes em plantas medicinais e conseqüentemente o tratamento e prevenção de enfermidades (BRASILEIRO *et al.* 2008). Entre estas enfermidades estão a redução de colesterol sérico, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, tratamento de doenças cardiovasculares e câncer. A prevenção e tratamento destas doenças é atribuída a presença de compostos orgânicos naturais benéficos ao ser humana como polifenóis, antioxidantes, flúor, cafeína e minerais essenciais (KARAK, BHAGAT, 2010).

Por outro lado, infusões preparadas a partir de ervas medicinais também podem apresentar elementos e compostos tóxicos ao ser humano, que quando absorvidos pelo organismo através da alimentação, podem causar alterações na composição do sangue, prejudicar o desenvolvimento mental e as funções do sistema nervoso central e órgãos como rins, pulmão e fígado (FIAMEGOS *et al.* 2016). Estes compostos podem ser elementos metálicos como Cd, Cr, Pb (KARAK, BAGHAT, 2010) e resíduos de agrotóxicos utilizados no combate de pragas (FERNÁNDEZ-RAMOS *et al.* 2014).

A contaminação por estes compostos pode ser decorrente do combate de pragas, do próprio solo em que é feito o cultivo, dos fertilizantes utilizados na manutenção dos nutrientes do solo, entre outras (NUNES *et al.* 2014). Alguns fertilizantes, por exemplo, segundo alguns trabalhos apresentam influência na presença de certos minerais tóxicos ao ser humano, já que podem provocar a exposição dos vegetais a elementos como As, Cd, Cr, Pb entre outros elementos (LIMA *et al.* 2015), no entanto, vem se destacando um grande crescimento no seu consumo no Brasil, o período entre 2009 e 2014 observou-se um crescimento de 32% no consumo de fertilizantes segundo dados do Banco Mundial (FAO, 2016). Isso ocorre devido os

fertilizantes serem combinações de nutrientes, destacando-se nitrato, fosfato e potássio, necessários para o desenvolvimento das plantas, dessa forma, visam promover a fertilidade do solo quando este não apresenta as características necessárias para o correto desenvolvimento das plantas. Em sistemas convencionais, são utilizados fertilizantes minerais sintéticos preparados a partir de rochas e outros compostos inorgânicos (Worthington, 2001).

O nitrato, um dos principais substratos visado pelo processo de adubação, é de fácil assimilação pelas raízes das plantas devido sua alta solubilidade. No organismo dos vegetais é armazenado nos vacúolos das células da folha para posteriormente ser metabolizado a nitrito, amônio e então ser utilizado na síntese de biomoléculas como clorofila, aminoácidos e proteínas (TISCHNER e KAISER, 2007). Ao ser assimilado no organismo humano pode manifestar diferentes efeitos agudos ou crônicos, que resultam da redução do nitrato a nitrito tanto por enzimas como por microorganismos naturais do corpo humano, este nitrito pode vir a oxidar a hemoglobina para metehemoglobina o que impede o correto transporte de oxigênio no sangue. Esse comportamento é essencialmente preocupante em recém-nascidos, visto que seu organismo não tem capacidade para reduzir novamente a metehemoglobina a hemoglobina, o que pode vir a acarretar males como a síndrome do bebe azul que resulta no sufocamento da criança por não conseguir transportar o oxigênio dos pulmões ao sangue (FERNÍCOLA e AZEVEDO, 1981). O nitrito também pode sofrer reações que levam a formação de nitrosaminas e nitrosamidas, as quais apresentam efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (MELO-FILHO, BISCONTINI, ANDRADE, 2004).

Os vegetais não deveriam apresentar grandes concentrações de nitrato, já que este deveria ser consumido quase na sua totalidade para o desenvolvimento das plantas. No entanto, quando a planta é exposta a grandes quantidades de fertilizante tenderia a acumular-lo em quantidades além do necessário para seu desenvolvimento. Isso poderia indicar um risco a saúde alimentar de pessoas que fazem uso de alimentos de fonte convencional pelas altas doses de fertilizantes. Em comparação, alimentos de cultivo orgânico apresentariam comportamento inverso por não utilizarem fertilizantes minerais, o que os levaria a ter uma menor exposição, desta forma oferecendo riscos muito menores em relação aos de cultivo orgânico.

Alimentos e outros produtos oriundos de cultivos orgânicos vem recebendo grande destaque da mídia que constantemente produz novas informações sobre as características sanitárias e nutricionais destes produtos. Desta forma, a demanda por alimentos orgânicos como vegetais, frutas e café tem aumentado significativamente nos últimos anos, movimentando um montante de 57,5 bilhões de dólares no mercado global em 2010 e 104,7 bilhões de dólares em 2015, sendo esperado um crescimento de 16% até 2020 (YOU; HSIEH, 2017).

A diferença entre os teores de nitrato em alimentos orgânicos e convencionais é destacada em dois trabalhos de revisão que fazem a análise de diferentes trabalhos em um longo período de tempo avaliando quais os principais compostos que se destacam na diferenciação do cultivo orgânico do convencional (WINTER e DAVIS, 2008 & WORTHINGTON, 2001).

Constatada a importância da determinação do íon nitrato por diferentes pesquisadores a sua determinação vem sendo realizada em diversas matrizes ambientais, biológicas e alimentícias através de técnicas cromatográficas, eletroquímicas e espectroscópicas (MOORCROFT, DAVIS & COMPTON, 2001). Entre as técnicas espectrométricas recentemente veio o desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, que permite a determinação elementos não metálicos como halogênios, enxofre, fósforo e nitrogênio (BUTCHER, 2013). O que não era possível anteriormente por estes elementos apresentarem suas linhas de ressonância em faixas abaixo do vácuo do ultravioleta (HUANG *et al.* 2010).

A determinação direta de diferentes elementos em amostras complexas é uma valiosa ferramenta analítica por reduzir o preparo de amostras, dentre as técnicas que capacitam essa possibilidade a espectrometria de absorção atômica por forno de grafite de alta resolução com fonte contínua é considerada a mais adequada para este tipo de determinação (ANDRADE *et al.* 2016). Contudo, para se alcançar uma análise confiável, é necessário que o comportamento do padrão de referência do analito seja semelhante ao do analito na amostra, o que comumente é alcançado devido o passo da pirólise, que permite a eliminação da matéria orgânica e possíveis interferentes presentes. Para esse fim, em geral são necessárias altas temperaturas de pirólise para máxima eliminação da matéria orgânica e interferentes, assim sendo possível a quantificação adequada de minerais como Mn, Ni Rb, Co, Cr entre outros (ANDRADE

et al. 2016 & ÁVILA *et al.* 2017). No caso da determinação de N-NO, todavia, não é possível trabalhar com altas temperaturas de pirólise, em função da volatilidade do analito, sendo a mais elevada relatada na literatura 300°C, o que torna a determinação de espécies de nitrogênio em matrizes complexas um grande desafio analítico (HUANG *et al.* 2010, BÜCKER e AKERS, 2012, BRANDÃO *et al.* 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

No contexto discutido até o momento, o objetivo deste trabalho é a proposição de um método que será aplicado na determinação direta de N-NO em infusões preparadas com ervas de cultivo orgânico e convencional por HR-CS-GF AAS, visando avaliar o efeito do cultivo na concentração de nitrogênio inorgânico.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as temperaturas de pirólise e vaporização para determinação de N-NO nas infusões.
- Avaliar as estratégias para redução da interferência do carbono residual a pirólise.
- Avaliar o desempenho analítico do método através da:
 - Faixa linear;
 - Limites de detecção e quantificação;
 - Precisão;
 - Exatidão;
- Aplicar o método desenvolvido em infusões de carqueja, *Camellia sinensis* (chás preto, branco e verde), capim-cidreira, funcho, camomila, melissa, hortelã e *Ilex paraguariensis*;
- Estimar a diferença do teor de N-NO em infusões de ervas orgânicas e convencionais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Produção e Cultivo de Alimentos

Com o crescimento populacional nas últimas décadas houve também o crescimento da demanda por alimentos, entretanto o ritmo de crescimento de zonas cultiváveis é mais lento que sua demanda, levando a uma busca cada vez maior de aumento da produtividade por meio da utilização de insumos agrícolas, destacando-se os fertilizantes, utilizados para suprir carências nutricionais das plantas assim como intensificar a produção destas (SOUZA *et al.* 2015). Os fertilizantes podem ser produzidos de fontes naturais ou produzidos industrialmente e podem atuar das seguintes maneiras: (I) complementar a disponibilidade natural de minerais a fim de satisfazer a demanda por culturas com alto potencial de produtividade e resultado em uma produção mais economicamente viável; (II) compensar a perda de nutrientes resultante da remoção de culturas ou lixiviação do solo; (III) melhorar as condições caso não sejam favoráveis à produção agrícola (BORGES *et al.* 2011). Os nutrientes primários são nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) que precisam ser aplicados em grandes quantidades, por serem os nutrientes com maior importância para o desenvolvimento dos vegetais (BORGES *et al.* 2011).

Na contramão à busca por maiores produtividades, atualmente vem se popularizando a produção de alimentos em sistemas de produção orgânica, onde se busca trabalhar com a natureza sem utilização em excesso dos recursos naturais (PÉREZ-LÓPEZ; LÓPEZ-NICOLÁS; CARBONELL-BARRACHINA, 2006). Nesses sistemas, a manutenção da fertilidade do solo faz uso de fertilizantes naturais como resíduos de animais como esterco bovino e esterco de galinha (PACHECO *et al.* 2017), outros fertilizantes também aplicados são rochas moídas por apresentarem uma baixa lixiviação diferente dos fertilizantes convencionais que são de alta solubilidade (STERTZ *et al.*, 2009).

A agricultura orgânica é normatizada no território brasileiro pelo ministério da agricultura e abastecimento, que define a produção orgânica como aquela que adota práticas que contemplem o uso saudável do solo, da água e do ar, de modo a reduzir desperdícios dos elementos naturais. (BRASIL, Decreto 6323). Para esse fim, além da utilização de fertilizantes sintéticos são proibidas a utilização de insumos como

pesticidas e sementes de origem transgênicas, cabendo ao produto o manejo natural das pragas e aplicação de estratégias como a rotação de cultura para como forma de manutenção da fertilidade. A adoção de tais princípios garantem ao produtor a utilização do selo de produto orgânico (figura 1).

Figura 1 – Selo de Identificação dos Alimentos Orgânicos no Brasil

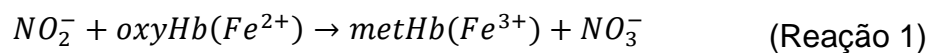


Fonte: <http://www.organicnet.com.br/certificacao/manual-certificacao/>

Na literatura se encontram diversas discussões sobre a influência das práticas agrícolas na produção de alimentos orgânicos, uma das quais é proposta por Worthington (2001), relaciona que a grande exposição a fertilizantes nitrogenados levaria ao acúmulo de espécies de nitrogênio oxidadas como NO_3^- e NO_2^- . Estes compostos além dos fertilizantes podem ser encontrados naturalmente no solo, na água e nos alimentos sendo que a devido sua presença de origem tanto natural como antrópica dificulta determinar uma única fonte para este composto na alimentação humana e animal (DAS *et al.* 2017).

3.2. Determinação de Nitrato e Nitrito

A concentração de nitrato é considerada um importante indicador da qualidade dos alimentos já que ao ser absorvido pelo ser humano pode sofrer redução a nitrito, ponto no qual pode sofrer inúmeras reações, para produção de nitrosaminas e nitrosamidas que são considerados compostos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (LIMA *et al.* 2008). Além disso, se o nitrito chega ao trato gastrointestinal é rapidamente levado para corrente sanguínea, podendo então reagir com a hemoglobina formando metahemoglobina causadora da síndrome de metahemoglobinemia, esta síndrome impede o transporte de oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos o que pode levar a morte da criança (CHETTY e PRASAD, 2016).



Devido a importância do nitrato como nutriente para as plantas e sua toxicidade para os humanos, diferentes métodos para sua determinação em alimentos se encontram disponíveis nas mais diferentes técnicas analíticas, tais como espectrometria, cromatografia e técnicas eletroanalíticas (tabela 1) (MOORCROF, DAVIS e COMPTON, 2001).

Tabela 1 – Métodos para determinação de nitrato em vegetais

Matriz	Concentração (mg Kg⁻¹)	Técnica	Redução a Nitrito com:	Derivatização	Referência
Beterraba	964	HPLC - UV	---	---	Merceddy <i>et al.</i> (2017)
Espinafre	2820	Eletroforese capilar	---	---	Öztekin, Nutku e Erim (2002)
Salsinha	1204				
Endro	2243				
Alho poró	130				
Repolho	41 - 939	UV – Vis	Coluna de Cd	Sim	Correia <i>et al.</i> 2010
Brotos de Nabo	54 – 1447				
Espinafre	797 – 1427				
Alface	1156				
Salsa	9 - 2441.				
Nabo	234 – 654				

Continuação da tabela 1

Matriz	Concentração (mg Kg⁻¹)	Técnica	Redução a Nitrito com:	Derivatização	Referência
Espinafre fresco (folhas)	1272	Eletroforese capilar	---	---	Merusi <i>et al.</i> (2010)
Espinafre fresco (caule)	8557				
Espinafre cozido	812				
Espinafre congelado	812 - 2970				
Acelga fresca (folhas)	2380				
Acelga fresca (caule)	9090				
Acelga congelada	4380				
Cenoura fresca	243				
Cenoura cozida	77				
Brócolis fresco	48.9 - 97.0	UV-Vis	Coluna de Cd	Sim	Huarte-mendicoa, Astiasarán e Bello (1997)
Brócolis congelado	141.6 - 231.2				

Continuação da tabela 1

Matriz	Concentração (mg Kg-1)	Técnica	Redução a Nitrito com:	Derivatização	Referência
Espinafre	5830				
Acelga	2180				
Salsinha	1840				
Aipo	540				
Alface	430				
Repolho	190				
Feijão	600				
Ervilha	30	UV – Vis	Coluna de Cd	Sim	Bakr, El-iraqui e Huissen (1986)
Rabanete vermelho	3400				
Rabanete branco	3260				
Cenoura	430				
Batata	160				
Abóbora	1380				
Tomate	130				

Continuação da tabela 1

Matriz	Concentração (mg Kg-1)	Técnica	Redução a Nitrato com:	Derivatização	Referência
Chicória	1990				
Alface	1127				
Alface cordeiro	618				
Mostarda chinesa	2405	UV-Vis	Coluna de Cd	Sim	Colonna <i>et al.</i> (2016)
Alcelga vermelha	919				
Alface vermelha	1072				
Espinafre	1122				
Acelga	1022				
Repolho	1425				
Alface	1297	UV-Vis com FIA	Coluna de Cd	Sim	Prasad e Chetty (2008)
Aipo	4706				
Repolho	5658				
Espinafre	4849				
Repolho	236	HPLC - UV	---	---	Hsu, Arcot e Lee (2009)
Alface	48				

Continuação da Tabela 1

Matriz	Concentração (mg Kg⁻¹)	Técnica	Redução a Nitrito com:	Derivatização	Referência
Brócolis	277	UV-Vis	Não é apresentado	Sim	Leszczyńska <i>et al.</i> (2009)
Couve-flor branca	171				
Couve-flor verde	61				
Couve de bruxelas	37				
Aipo	118 - 817	UV-Vis com FIA	Coluna de Cd	Sim	Chetty e Prasad (2009)
Batata	102 - 119				
Cenoura	81 - 100				
Batata doce	41 - 62				
Chá gelado	142 µg L ⁻¹	UV-Vis	Cloreto de Vanádio III	Sim	Gürkan e Altunay (2015)
Chá gelado, sabor pêssego	136 µg L ⁻¹				
Chá verde	85 µg L ⁻¹				
Vinagre de uva	120 µg L ⁻¹				
Vinagre de maçã	126 µg L ⁻¹				
Vinho tinto	106 µg L ⁻¹				

Continuação da tabela 1

Matriz	Concentração (mg Kg-1)	Técnica	Redução a Nitrito com:	Derivatização	Referência
Chá preto	0.18 $\mu\text{g L}^{-1}$	Cromatografia Iônica	- - -	- - -	Kumar <i>et al.</i> (2008)
Mel multifloral	1.1 a 2.4	Cromatografia Iônica	- - -	- - -	Nozal <i>et al.</i> (2000)
Mel de lavanda	1.4 a 7.3				
Mel de alecrim	2.0 a 3.4				
Mel de tomilho	1.2 a 1.4				

Como observado na tabela 2, as técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para determinação de nitrato, não se restringindo apenas a cromatografia iônica (CI) sendo encontrado trabalhos que fazem a determinação de nitrato por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês high performance liquid chromatography), como o trabalho de Hsu, Arcot e Lee (2009) que determinaram nitrato em vegetais e carnes curadas. Quando as concentrações de nitrato se encontram em valores muito inferiores aos comumente determinados por HPLC e CI pode ser feita a utilização de técnicas como cromatografia acoplada a espectrometria de massas como o trabalho de Pagliano *et al.* (2009) que fez a determinação de nitrato em água do mar.

A cromatografia iônica apesar de ser uma técnica bastante empregada para determinação de nitrato em diferentes amostras alimentícias, pode sofrer efeitos indesejados em determinadas matrizes como descrito por Kumar *et al.* (2008), na análise direta de infusões de chá preto foi necessário a combinação de duas colunas guarda para remoção dos compostos orgânicos que poderiam ou eluir junto do nitrato ou se depositar sobre a coluna.

Na revisão dos procedimentos analíticos utilizados na determinação de nitrato em amostras vegetais (tabela 2) não foram encontrados trabalhos que façam a utilização de técnicas eletroquímicas, contudo técnicas como voltametria e potenciometria também podem ser utilizadas para determinação de nitrato em amostras de origem animal como o trabalho de Pérez-Olmos *et al.* (1997) que determinou nitrato por potenciometria ou em matrizes ambientais como no trabalho de Solak *et al.* (2000) que utilizou um eletrodo de carbono vítreo com filme de cobre para determinação de nitrato em águas de consumo.

A maioria dos métodos espectrométricos para determinação de nitrato necessita de etapas de derivatização para formação de compostos cromóforos, alguns ainda se baseiam na redução preliminar do nitrato a nitrito. Quanto a isso, três alternativas são frequentemente relatadas para a etapa de redução: percolação do extrato contendo nitrato através de uma coluna de Cd esponjoso, agitação do extrato com Zn em pó e utilização de cloreto de vanádio III. Todavia, segundo os autores estes procedimentos acabam por se tornar morosos e lentos, por serem necessárias várias etapas para reação de formação do cromóforo que as vezes exigem que toda água seja evaporada

para então ser feita a formação do composto cromóforo com diferentes reagentes orgânicos, por exemplo, o ácido salicílico (BAHADORAN *et al.* 2016).

Uma alternativa que veio a surgir a partir de 2010 com o trabalho de Huang *et al.* (2010) é a de determinação de N-NO através de espectrometria de absorção molecular de fonte contínua com alta resolução. Após o trabalho de Huang *et al.* (2010) surgiram mais trabalhos que fazem a determinação de nitrato em forno de grafite, chama ou formação de vapor químico, sumarizados na tabela 3.

Tabela 2 – Trabalhos que fazem a determinação de nitrato e nitrito através de HR-CS GF MAS

Analito	Matriz	Vaporização	Referência
NO_3^-	Água, fertilizante	Eletrotérmica	Huang <i>et al.</i> (2010)
NO_2^-	Água mineral	Vapor Químico	Brandão <i>et al.</i> (2012)
HNO_3	Resíduo de produção de células fotovoltaicas	Eletrotérmica	Bücker e Akers (2012)
NO_3^-	Fertilizantes	Chama Ar-Acetileno	Bechlin <i>et al.</i> (2014)
$\text{NO}_3^-, \text{NO}_2^-$	Água subterrânea	Eletrotérmica	Brandão <i>et al.</i> (2014)

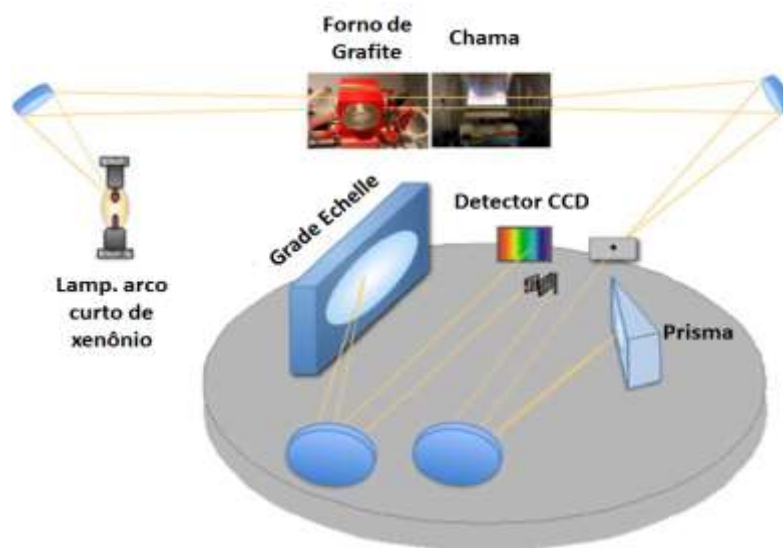
3.3. Espectroscopia de Alta Resolução com Fonte Contínua

Inicialmente a determinação de não metais como o nitrogênio e enxofre em equipamentos de absorção atômica convencionais não era possível devido estes elementos apresentarem suas linhas de ressonância em pontos abaixo de 180 nm, o que dificulta a análise por exigir sistemas de alto vácuo para eliminação da interferência da própria atmosfera. Outro fator seria a produção de lâmpadas de catodo oco para estes elementos pela dificuldade de sua deposição sobre o catodo e a construção de uma fonte de radiação (WELZ *et al.* 2005). Contudo algumas barreiras foram quebradas com o passar do tempo e a determinação destes elementos, através de métodos instrumentais que faziam a aplicação de absorção molecular em equipamentos de fonte de linha e baixa resolução, utilizando-se de linhas secundárias de alguns elementos como Fe e Pt para determinação de não metais como enxofre e halogênios (HUANG *et al.* 2006). No entanto, estes equipamentos apresentavam alguns problemas como a baixa resolução, indisponibilidade de comprimentos de onda

excitáveis e presença de interferências espectrais (BUTCHER, 2013). A introdução dos espectrômetros de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR CS AAS) representa um grande avanço para a técnica em várias décadas, com a instrumentação se tornando comercialmente disponível em 2003 equipada apenas com um atomizador de chama, enquanto que em 2007 um espectrômetro equipado com forno de grafite e atomizador de chama é lançado (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

O dispositivo baseia-se em (1) uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão operando em temperaturas de aproximadamente 10000 °C, capaz de fornecer radiação uma alta intensidade na região do UV-Visível, (2) no sistema ótico um monocromador echelle de duas etapas (utilizando primeiro um prisma e depois uma grande echelle) e (3) uma matriz CCD linear para detecção da radiação, tendo esta configuração (figura 2) se mostrado bem sucedida e aplicada aos espectrômetros atualmente produzidos pela Analytik Jena (RESANO; FLÓREZ; GARCÍA-RUIZ, 2013).

Figura 2 – Configuração de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua



Adaptado de: Resano; Flórez; García-Ruiz (2013)

A técnica de HR-CS MAS diferente das técnicas atômicas que envolvem puramente transições eletrônicas, envolve energias como a atração Coulombica entre o núcleo e os elétrons de valência, transições vibracionais relacionada a vibrações nucleares e transições rotacionais relacionadas a rotação molecular (WELZ *et al.*

2005). A energia total (E_{TOTAL}) é aproximadamente a soma da energia eletrônica ($E_{ELETRONICA}$), a energia vibracional ($E_{VIBRACIONAL}$) e a energia de rotação ($E_{ROTACIONAL}$). Como resultado os espectros de moléculas diatômicas são semelhantes ao de espectros atômicos, porém com maiores números de linhas disponíveis sendo possível a observação de diferentes linhas em janelas espectrais estreitas como no caso da janela espectral do NO que possui 0.2 nm de extensão. Análises moleculares podem ser divididas segundo Butcher (2013) em dois tipos, o primeiro trata de moléculas (tabela 3) que são produzidas naturalmente a partir da matriz como análises que envolvem a determinação de enxofre, nitrogênio e fósforo com CS, NO e PO e o segundo tipo corresponde as moléculas que se é necessário o uso de um reagente para formação da molécula alvo utilizada na determinação do analito como no caso dos halogênios e algumas moléculas de enxofre.

Tabela 2 – Moléculas Observadas em Determinações Moleculares por HR-CS MAS

Analito	Molécula alvo	λ (nm)	Meio de Vaporização	Referência
S	CS ^A	258.033	Eletrotérmica	Mior <i>et al.</i> (2013)
S	SnS ^B	271.624	Eletrotérmica	Cadorim <i>et al.</i> (2016)
F	CaF ^B	606.400	Eletrotérmica	Machado <i>et al.</i> (2015)
Cl	SrCl ^B	635.862	Eletrotérmica	Pereira <i>et al.</i> (2014)
Br	CaBr ^B	625.315	Eletrotérmica	Pereira <i>et al.</i> (2014)
F	GaF ^B	211.248	Eletrotérmica	Heitemann <i>et al.</i>
Cl	AlCl ^B	261.420	Eletrotérmica	(2006)
S	CS ^A	258.056	Eletrotérmica	
P	PO ^A	246.400	Eletrotérmica	
NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	NO ^A	215.360	Eletrotérmica	Brandão <i>et al.</i> (2014)
NO ₃ ⁻	NO ^A	215.360	Chama de Ar-Acetileno	Bechlin <i>et al.</i> (2014)
NO ₂ ⁻	NO ^A	215.360	Geração de Vapor	Brandão <i>et al.</i> (2012)
HNO ₂	NO ^A	214.803	Eletrotérmica	Bücker e Acker (2012)

Continuação da tabela 3

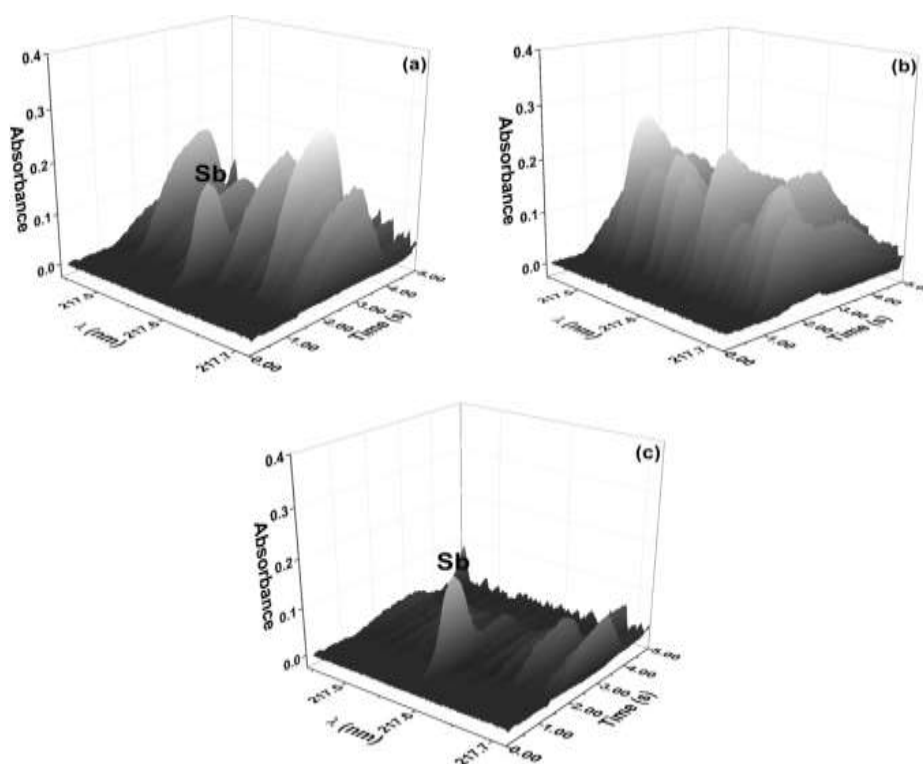
Analito	Molécula alvo	λ (nm)	Meio de Vaporização	Referência
S	CS ^A	258.056	Chama de Ar- Acetileno	Andrade-carpente, Peña-vázquez e Bermejo-barrera (2016)
F	BaF ^B	495.088 495.263	Eletrotérmica	Ozbek e Akman (2014)
F	AlF ^B	227.4613	F MAS	Ozbek e Akman (2012)
F	GaF ^B	211.248	GF MAS	Gleisner, Welz e Einax (2010)
Br	AlBr ^B	278.914	GF MAS	Huang <i>et al.</i> (2008)
	CaBr ^B	625.315		
P	PO ^A	246.400	F MAS	Bechlin, Gomes Neto e Nóbrega (2013)
		247.620		
		247.720		
S	CS ^A	257.595 257.958	F MAS	
Br	SrBr ^B	651.0581	GF MAS	Gunduz e Akman (2014)

A: moléculas produzidas naturalmente

B: moléculas produzidas pela adição de um reagente

Cabe destacar que apesar de serem grandemente vantajosas para determinação de S, N e P, estas moléculas naturalmente produzidas podem ser consideradas um empecilho na determinação de outros elementos como Sb e Pb que podem vir a sofrer a interferência destas moléculas, visto que o sinal analítico de alguns elementos pode vir a ser mascarado pelo sinal das moléculas. Para correção de problemas como este a técnica de alta resolução com fonte contínua com um sistema de correção dos mínimos quadrados é aplicada sempre que ocorra interferências espectrais, no entanto para este tipo de correção é necessário a obtenção de um espectro livre do elemento de interesse para que seja feita a subtração do sinal do interferente pelo software do equipamento o que vem a tornar um método muito eficiente para correção de interferências espectrais como observado na figura 3 (RAPOSO et al. 2008 & BARROS et. a. 2016).

Figura 3 – Espectro de absorvância, na vizinhança de Sb 217,581 nm, para (a) amostra sem correção, (b) sinal de SiO obtido de SiO₂ e (c) amostra após correção com método dos mínimos quadrados.



Adaptado de: Barros et al. (2016).

3.4. Chás e Ervas

O chá de ervas, infusão de ervas são todos nomes dados a bebida produzida com ervas que ficam imersas por algum tempo em água quente, sendo utilizadas para prevenção de doenças a milhares de anos (ZHAO *et al.* 2013). Sendo a segunda bebida não alcoólica mais consumida depois da água no mundo, suas propriedades benéficas a saúde como ação anti mutagênica, anti carcinogênica, hipoglicêmica, anti hiperglicêmica, antioxidante antimicrobiana entre tantas outras, todas se correlacionando as características bioquímicas das plantas, como ácidos graxos, polifenóis e flavonoides (ZIELINSKI *et al.* 2014). O consumo de infusões de ervas pela sua importância nutricional, o torna alvo de diferentes pesquisas para determinação dos seus componentes minerais e orgânicos, como o nitrato que já foi determinado em infusões de chá preto como realizado por Kumar *et al.* (2008). O autor também relatou que a alta concentração de matéria orgânica como os compostos fenólicos presentes na infusão podem produzir severas interferências na determinação de nitrato e nitrito. Özcan e Akbulut (2008) também realizaram a determinação de N-NO_3^- em diferentes de ervas entre elas *Camelia sinensis*, *Mentha piperita* e *Matricaria chamomila*, contudo não detectaram quantidades apreciáveis de nitrato na maioria das ervas avaliadas. Cabe salientar que em ambos os trabalhos não foi feito o controle do cultivo nas amostras.

Diferentes ervas são utilizadas ao redor do mundo para produção de bebidas aromáticas, condimentos e infusões terapêuticas, por exemplo, a camomila por ser usada como medicamento a muitos anos em diferentes países como o Brasil (SOTBART, 2009).

A carqueja (*Bacharis trimera*) tem sido extensivamente estudada desde o século XX, sendo que atualmente se têm notícia de 150 compostos isolados a partir da erva. No Brasil o uso desta erva se relaciona ao tratamento de diversos males do fígado e problemas digestivos, existindo registros escritos de sua aplicação desde 1931 (KARAM *et al.* 2013).

Os chás preto, branco e verde, são todos produzidos a partir da mesma planta a *Camellia sinensis* ou como é chamada no oriente chazeiro, contudo estas são apenas três variações dentre as muitas que existem (DATNER, 2011). A produção dos chás preto, branco e verde se diferencia pelo tratamento das folhas, sendo o chá verde

obtido a partir das folhas colhidas de diferentes partes do chazeiro, que então são expostas a vapor de água em alta temperatura para inibição da atividade enzimática, sendo considerado um chá totalmente não fermentado. O chá branco é produzido a partir de folhas jovens retiradas antes do desabrochar das flores, nesse processo consiste em secar, selecionar, aquecer as folhas, cortar e misturar. O chá preto é considerado totalmente fermentado, suas folhas passam por fermentação em um ambiente frio para que ocorra a oxidação enzimática em que epigalocatequinas sofrem um processo de polimerização para formação de theaflavinas e thearubiginas (SILVA, OLIVEIRA E NAGEM, 2010).

O capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) é uma erva originária da Índia, também conhecido por capim-limão e capim santo, seu cultivo é feito em ambiente não protegido podendo ser cultivado em todos os países tropicais. No Brasil a produção desta planta se destaca nas regiões Sul e Sudeste. Seu cultivo se dá principalmente para fins medicinais na forma de infusão com aplicação na indústria farmacêutica, de alimentos, de cosméticos e de perfumaria e para obtenção de citral do óleo essencial (PINTO *et al.*, 2014).

O funcho (*Foeniculum vulgare*) é uma erva aromática anual, conhecida desde a antiguidade na Europa e na Ásia Menor, alguns autores a descrevem como originária da Índia, tendo vindo originalmente para o Brasil com os colonos portugueses. É conhecido por apresentar atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antioxidantes do fruto da erva doce, seu óleo essencial apresenta atividade antibacteriana. Os extratos desta erva apresentam diversos fitoquímicos com conhecidas propriedades antimicrobianas de grande importância terapêutica e infecções (ARAÚJO *et al.*, 2013).

A camomila (*Matricaria recutita*) é uma erva com diversas aplicações medicinais comumente consumida na forma de infusão para uso como sedativo e ansiolítico, sua aplicação é normalmente realizada em crianças que apresentem distúrbios gastrointestinais, ou na forma compressas de algodão embebido na infusão, para o auxílio na cicatrização de feridas e cortes (PRESIBELLA *et al.*, 2006).

A melissa (*Melissa officinalis*) é uma erva de origem asiática e europeia introduzida no Brasil há mais de um século, sendo atualmente cultivada em todo o país. A planta exala um odor semelhante ao limão que se torna mais intenso depois de seca,

popularmente é utilizada no controle de crises nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade.

A hortelã (*Mentha piperita*) no Brasil é conhecida por ser utilizada para diversos fins medicinais como analgésicos, estomacal e intestinal, estimulante de funções cardíacas, controle de azia, gastrite, cólicas e gases, (DESCHAMPS et al., 2013). É muito utilizada na forma de especiaria em diferentes partes do mundo apresenta aplicações culinárias para diversos países com uso mais intenso no oriente médio e Índia onde é considerada um tempero de uso comum na culinária. (STOBART, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

A determinação de N-inorgânico utilizando HR-CS GF MAS foi feita em um espectrômetro de absorção atômica modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Alemanha). O espectrômetro foi operado com tubos de grafite revestidos com grafite pirolítico, com sistema de plataforma integrada. Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de arco curto de xenônio (Analytik Jena), a qual permite a emissão de radiação dentro da faixa espectral entre 185 e 900 nm. No sistema ótico do espectrômetro, foi utilizado um duplo monocromador de alta resolução composto por um prisma para pré separação de ordens espectrais e uma grade *Echelle*. O sistema ótico permite a obtenção de uma resolução espectral de gama/delta gama = 145.000, o que corresponde a uma banda espectral inferior a 2 pm por pixel em 200 nm. Como gás de purga foi utilizado argônio comercial (White Martins, Brasil) com fluxo de 2,0 L min⁻¹. As condições otimizadas para determinação de N-NO diretamente na infusão se encontram sumarizadas na tabela 4, os tempos e as temperaturas de secagem, as rampas de pirólise e vaporização como o tempo de vaporização e limpeza seguem o descrito por Brandão *et al.* (2014), todos os experimentos foram realizados no comprimento de onda de 215.37 nm.

Tabela 3 – Condições para Determinação de N-Inorgânico em Infusões por HR – CS GF MAS

Etapa	Condição (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem 1	90	5	20
Secagem 2	110	10	30
Pirólise	200	50	60
Auto Zero	200	0	5
Vaporização	700	1500	8
Limpeza	2500	500	5

Para os estudos de adsorção com carvão ativado foi utilizada um agitador orbital Nova Ética (Brasil) e uma centrífuga Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil). Os

estudos com oxidação da matéria orgânica assistido com ultrassom foram realizados com uma sonda de ultrassom UP200s (Hielscher, Estados Unidos da América) equipada com uma ponteira de ultrassom Sonotrode H3 (Hielscher, Estados Unidos da América). A água ultrapura utilizada no preparo de soluções e lavagem de vidrarias foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Direct-Q UV3® (Millipore, Alemanha).

4.2 Reagentes

O a solução padrão de 1000 mg L⁻¹ de N-inorgânico foi preparado pela dissolução de nitrato de sódio PA, (Dinâmica, Brasil). Os modificadores químicos foram preparados pela dissolução de massas apropriadas de cloreto de cálcio anidro PA (VETEC, Brasil), cloreto de bário dihidratado PA (Dinâmica, Brasil) e cloreto de estrôncio PA, hexahidratado (Synth, Brasil). O estudo de interferentes foi realizado utilizando soluções preparadas pela dissolução de glicose PA (VETEC, Brasil), carbonato de sódio anidro PA (Synth, Brasil), dihidrogenofosfato de sódio PA (VETEC, Brasil), metasilicato de sódio PA (Reagen, Brasil), sulfato de sódio PA (Merck, Brasil). O estudo de adsorção da matéria orgânica foi realizado com carvão ativado comercial. E os estudos de precipitação da matéria orgânica foram realizados utilizando ácido clorídrico 37% (m m⁻¹) PA, (Synth, Brasil) e ácido bórico PA (Synth, Brasil). A determinação da matéria orgânica foi realizada utilizando dicromato de potássio PA (VETEC, Brasil), ácido sulfúrico 98% (m m⁻¹) PA (Neon, Brasil) e sulfato de ferro II amoniacal (Synth, Brasil).

4.3. Vidrarias

As vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente neutro, enxaguadas com água corrente em abundâncias, lavadas com água destilada, imersas durante a noite em ácido clorídrico 10% (m m⁻¹) e lavadas com água ultrapura suficiente para remoção de ácido clorídrico.

4.4. Amostragem

As amostras foram obtidas no comércio local, sendo utilizadas amostras dentro da data de validade e provenientes de nove marcas comerciais originárias dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Na tabela 5 estão sumarizadas as

amostras utilizadas no estudo. O número de amostras totalizou oito amostras orgânicas, e dezenove amostras convencionais.

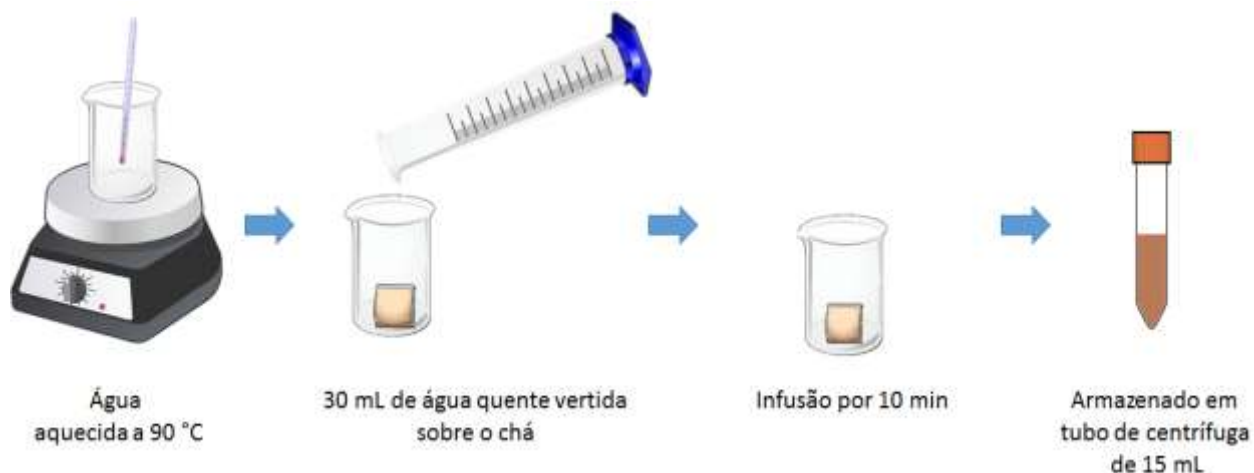
Tabela 4 – Amostras Utilizadas no Estudo

Amostras		Amostras Convencionais			Amostras Orgânicas	
Nome Científico	Nome Vulgar	Total	Quantidade	Origem	Quantidade	Origem
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja	2	1	RS	1	RS
<i>Camelia sinensis</i>	Chás Preto, Branco e Verde	7	6	RS, SC, SP	1	RS
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-cidreira	4	2	RS, SP	2	RS, SP
<i>Foeniculum vulgare</i>	Funcho	3	1	RS	2	RS, SC
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	2	1	SP	1	RS
<i>Melissa Officinalis</i>	Melissa	3	2	RS	1	RS, SC
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã	6	5	RS	2	RS

4.5. Preparo de Amostra

O preparo da infusão consistiu em verter 30 mL de água quente sobre um sachê da erva selecionada acondicionado no interior de um béquer de 50 mL. Após adição da água se aguardou 10 min para infusão e então o sachê foi removido e o béquer agitado suavemente para homogeneização da solução e suspensão de qualquer material particulado que possa ter se formado. Após pronta, a solução foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL e armazenada até o momento de análise. O processo se encontra esquematizado na figura 4.

Figura 4 – Procedimento de Preparo da Infusão



4.6. Pirólise e Vaporização

As curvas de pirólise e vaporização em meio aquoso foram confeccionadas inicialmente em água, para avaliação das condições sem modificador químico e com modificadores de 1% de Ca^{2+} , 1% de Ba^{2+} e 1% de Sr^{2+} . Nessa etapa se partiu de valores apresentados na literatura (Brandão *et al.* 2014), sendo avaliadas as temperaturas de pirólise de 150 a 500 °C com uma vaporização fixa de 1300 °C e após fixada a temperatura de pirólise se iniciou o estudo com a vaporização de 600 a 1500 °C. As curvas de pirólise e vaporização em infusão foram confeccionadas utilizando a melhor condição (Seção 5, Resultados e Discussão) observada em água, sendo confeccionadas em meio de uma infusão de *Camellia sinensis* (chá preto) preparada conforme descrito na figura 4.

4.7. Efeito de Matriz

4.7.1. Determinação do Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi determinado seguindo o procedimento descrito por Economou *et al.* (2009), o procedimento consistiu na construção de uma curva de calibração em água e uma curva de calibração na infusão, após avaliar a diferença entre elas utilizando a inclinação da curva em solvente com a curva na amostra (equação 1).

$$EM (\%) = 100 * \left(1 - \left(\frac{S_m}{S_s} \right) \right) \quad \text{Equação 1}$$

Na equação utilizada para determinação Sm corresponde a inclinação de uma curva de calibração construída no meio da amostra e Ss corresponde a inclinação de uma curva construída em água.

4.7.2. Avaliação dos Interferentes

O estudo de interferência foi organizado em duas partes, uma utilizando carbono orgânico obtido de uma solução de glicose. A segunda parte foi realizada com íons inorgânicos de fósforo, enxofre, silício e carbono, sendo avaliada a faixa de 0 a 1,50% de C-glicose, P-H₂PO₄⁻, S-SO₄²⁻, Si-SiO₃²⁻, C-CO₃²⁻.

4.7.3. Quantificação da Matéria Orgânica

A matéria orgânica nas infusões de *Camellia sinensis* (chá preto, chá branco e chá verde) foi determinada utilizando a metodologia de Walkley-Black descrita por Gelman, Binstock e Halicz (2012).

O procedimento utilizado na determinação da matéria orgânica consistiu em adicionar 0,5 mL da infusão de *Camellia sinensis* (chá preto, chá branco e chá verde) a um Erlenmeyer de 250 mL, adicionar 5 mL de uma solução de dicromato de potássio 0,8 mol L⁻¹, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, 100 mL de água destilada, aguardar um período de 16 h para total oxidação da matéria orgânica. Após este tempo foi feita a titulação do excesso de dicromato com uma solução de sulfato de ferro (II) amoniacal 0,4 mol L⁻¹ e por meio da equação 2 foi determinado a concentração de carbono orgânico no meio.

$$CO(\%) = \left(\frac{A - T * \left(\frac{A}{S}\right) * 0,006}{v} \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Na equação 2, CO significa a concentração de carbono orgânico, T corresponde ao volume de solução de sulfato de ferro II amoniacal utilizado na titulação da amostra, S corresponde ao volume de solução de sulfato de ferro II amoniacal utilizado na titulação da amostra e v ao volume de amostra utilizado.

4.8. Redução do Efeito de Matriz

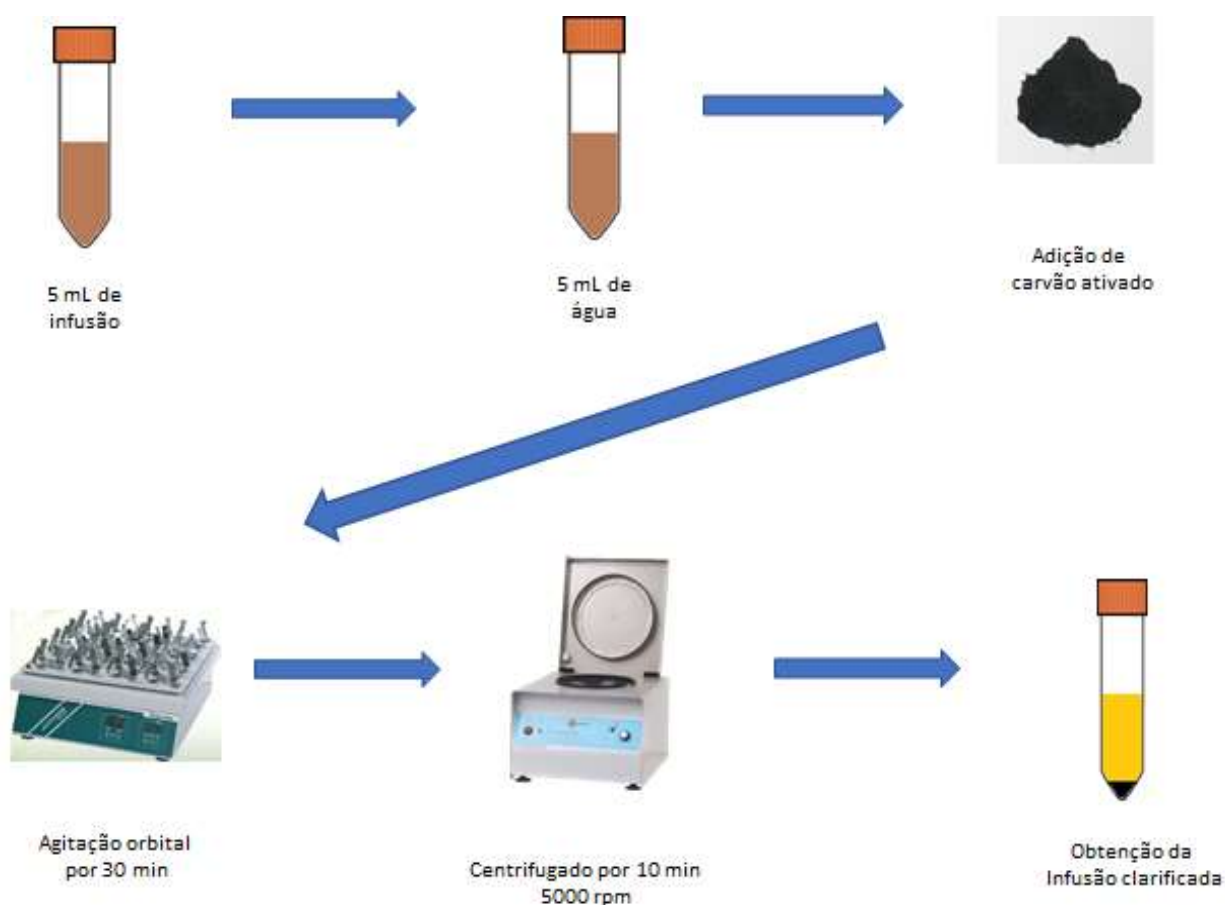
4.8.1. Avaliação do Tempo de Pirólise

A avaliação do tempo de pirólise foi realizada através da construção de curvas de calibração em água e no meio da amostra. Neste estudo foram avaliados os tempos de 20 a 80s com incrementos de 20s. Para cada tempo estudado foi calculado o efeito de matriz e também obtido o sinal de absorvância integrada.

4.8.2. Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado

O estudo de adsorção da matéria orgânica com carvão ativado foi realizado através da construção de curvas de calibração em solvente e amostra e depois sua comparação das curvas através da equação 1. O procedimento (figura 5) foi realizado através da adição de carvão ativado (0,10, 0,25 e 0,50g) seguido de agitação orbital durante 30 min para então ser analisado.

Figura 5 – Procedimento de Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado



4.8.3. Precipitação da Matéria Orgânica

A precipitação da matéria orgânica foi realizada através da acidificação do meio com ácido clorídrico ou ácido bórico. O procedimento consistiu em adicionar 1 mL de solução de ácido a 5 mL de infusão fortificada com posterior centrifugação da matéria orgânica floculada. A eficiência dos experimentos foi avaliada por ensaio de adição e recuperação, sendo utilizada para isso amostra de *Camelia sinensis* (Chá preto), fortificadas com 10 mg L⁻¹ de N-inorgânico.

4.8.4. Oxidação da Matéria Orgânica

Ensaio de oxidação da matéria orgânica foram realizados com peróxido de hidrogênio 29% (m v⁻¹). Este estudo consistiu em duas etapas, a primeira em avaliar sistematicamente o volume de peróxido no intervalo de 0 a 4 mL com incrementos de 1 mL, o segundo em reproduzir o primeiro experimento, potencializando a eficiência por meio de sonicação com ultrassom por 5 min em amplitudes de 50%, 60 e 70%. A eficiência dos experimentos foi avaliada por ensaio de adição e recuperação, sendo utilizada para isso amostra de *Camelia sinensis* (Chá preto), fortificadas com 10 mg L⁻¹ de N-inorgânico.

4.9. Validação

4.9.1. Faixa Linear

A faixa linear foi avaliada utilizando uma infusão de *Camellia sinensis* (chá preto) com adições crescentes de 10 mg L⁻¹ de N-NO.

4.9.2. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram determinados de acordo com o descrito por Ribani et al. (2004), sendo utilizados parâmetros da curva de calibração construída no meio da amostra para os pontos de 0, 10, 30 e 40 mg L⁻¹. No método foram construídas três curvas de calibração em meio da amostra (infusão) e determinado o desvio padrão para as inclinações das curvas (SD), para serem calculados os limites de detecção de acordo com as equações 3a e 3b.

$$LD = \frac{3 * SD}{Inclinação} \quad LQ = \frac{10 * SD}{Inclinação} \quad \text{Equação 3}$$

A B

4.9.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada realizando-se um estudo de adição recuperação em infusões preparadas a partir de três ervas distintas, que poderiam produzir infusões com diferentes características, sendo escolhidas, *Camelia sinensis* (chá preto), *Foeniculum vulgare* (chá de funcho) e *Matricaria recutita* (chá de camomila). O estudo consistiu em fortificar com 10 mg L⁻¹ de N-NO as infusões e posteriormente analisar uma infusão sem fortificação e um com e por diferença determinar a recuperação obtida.

4.9.4. Precisão

A precisão foi determinada seguindo o guia de validação da ANVISA, utilizando-se o número mínimo de replicatas (n = 5) (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas por meio de padronização por adição de padrão, obtendo-se um valor de concentração do qual foi determinado o desvio padrão (SD) e então determinada a precisão através do desvio padrão relativo para as cinco determinações utilizando-se a equação 4.

$$RSD = \left(\frac{SD}{Média} \right) * 100 \quad \text{Equação 4}$$

4.10. Análise das Amostras

A determinação de N-NO₃⁻ nas amostras foi feita utilizando-se curvas de adição de padrão, com três adições na amostra de 10, 30 e 40 mg L⁻¹ de N-NO. Para cada amostra foram calculadas coeficiente angular e a coeficiente linear e estes valores utilizados para quantificação de N-NO na amostra.

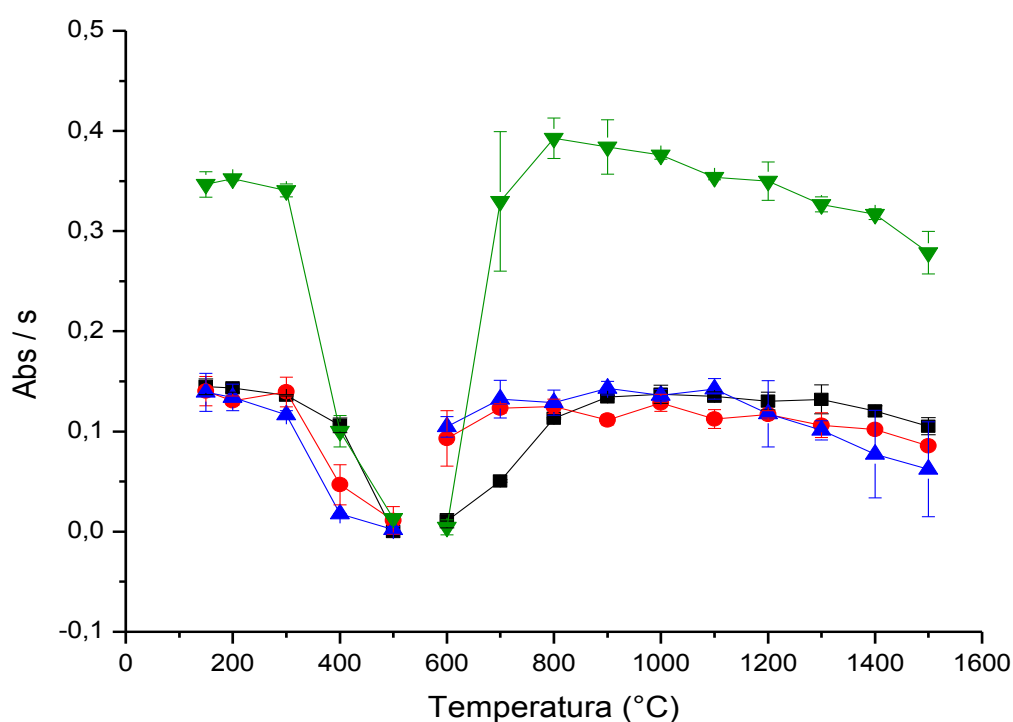
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a execução do trabalho foram organizados em otimização dos parâmetros instrumentais, com a elaboração das curvas de pirólise e vaporização. Avaliação de interferentes para determinação de N-NO. Estudos para redução da interferência de matriz, com elevação do tempo de pirólise, adsorção da matéria orgânica, precipitação da matéria orgânica e oxidação da matéria orgânica. Aplicação do método para determinação de N-NO nas infusões de ervas orgânicas e convencionais.

5.1. Curvas de Pirólise e Vaporização

As curvas de pirólise e vaporização, inicialmente foram confeccionadas no meio do solvente (água) (figura 6), seguindo quatro condições, sem modificador químico, solução 1% de Ca^{2+} (CaCl_2) (m v^{-1}), 1% de Sr^{2+} (SrCl_2) (m v^{-1}) e 1% de Ba^{2+} (BaCl_2) (m v^{-1}), essas quatro condições foram avaliadas a fim de obter as condições necessárias para análise em meio da amostra, visto que antes da construção das curvas na amostra é necessário se ter ideia do comportamento térmico do analito.

Figura 6 – Curvas de Pirólise e Vaporização Construídas em Meio Aquoso Confeccionadas com 10 mg L^{-1} de N-NO_3^- (•) Sem Modificador, (◻•) 1 % (m v^{-1}) de Ca^{2+} , (•) 1% (m v^{-1}) de Sr^{2+} e (•) 1% (m v^{-1}) de Ba^{2+} . As condições utilizadas foram 20s de pirólise, vaporização fixada na pirólise foi de 1300°C , pirólise fixada para atomização 300°C em todas as curvas de pirólise.



A utilização do modificador de Ca^{2+} foi realizada baseando-se em dados do trabalho de Brandão *et al.* (2014) que sugere a utilização de metais alcalino terrosos como modificador químico para determinação de N-inorgânico baseando-se na formação de sais de nitrato dos respectivos elementos, o que, em função do ponto de

fusão do sal formado entre o nitrato e o elemento alcalino terroso aumentaria a estabilidade térmica para etapa de pirólise. Essa proposta, contudo, não está de acordo com algumas observações feitas nesse trabalho. Analisando-se a figura 6, observa-se que a intensidade do sinal obtido quando se utiliza o Ca^{2+} como modificador é bem superior aos demais, em contrapartida, a utilização de Sr^{2+} ou Ba^{2+} não apresenta incremento significativo, quando comparado com o sinal sem a utilização de modificador químico. Relacionando-se essa observação aos pontos de fusão teórico de cada sal de nitrato (tabela 6) esperava-se comportamento inverso. Uma possibilidade para explicar esse comportamento pode ser proposta em função da energia de rede dos sais (tabela 6), onde observa-se um valor mais elevado para o rompimento do retículo cristalino do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, em comparação com os demais sais de nitrato.

Tabela 5 – Ponto e Fusão e Energia de Rede dos Sais de Nitrato

Sal	Temperatura de Fusão	Energia de Rede
	(°C)	(KJ mol ⁻¹)
NaNO₃	308	755
Ca(NO₃)₂	560	2268
Ba(NO₃)₂	570	2184
Sr(NO₃)₂	592	2035

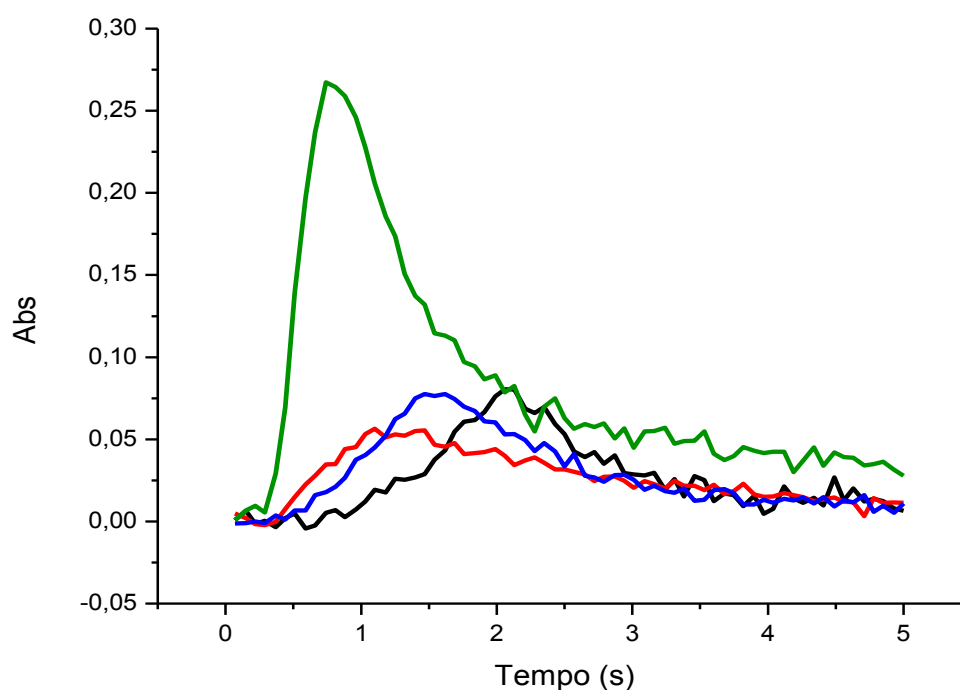
Apesar da diferença na intensidade do sinal obtido quando utilizado Ca^{2+} como modificador químico, não foi observada diferença em função das temperaturas de pirólise e vaporização para determinação de N-NO, esses resultados estão sumarizados na tabela 7.

Tabela 6 – Temperaturas de Pirólise e Vaporização Definidas em Água

Condição Avaliada	Temperaturas (°C)	
	Pirólise	Vaporização
Sem modificador	300	900
5 µL de 1% de Ca²⁺	300	900
5 µL de 1% de Sr²⁺	300	800
5 µL de 1% de Ba²⁺	300	800

A teoria formulada em função da energia de rede, se torna mais provável para explicar a utilização do Ca^{2+} como modificador químico em determinações de nitrato, visto que ele promoveria uma maior estabilidade térmica garantindo que a nuvem molecular seja mais intensa durante a etapa de vaporização garantindo o melhor sinal resultado da menor perda de nitrato na pirólise pela decomposição térmica do nitrato, como observado no sinal de absorbância integrada do N-NO para as diferentes condições apresentado na figura 7.

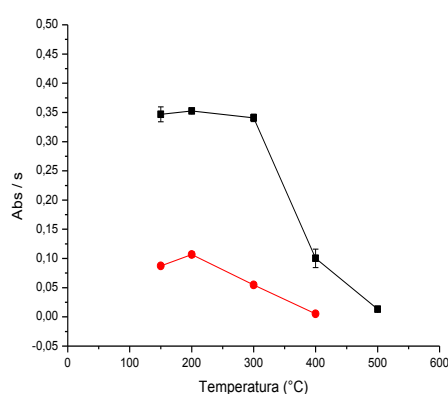
Figura 7 – Sinal de Absorbância para 10 mg L^{-1} de N-NO nas temperaturas de pirólise e vaporização otimizadas nas condições (•) Sem Modificador; (◻•) $5 \mu\text{L}$ de 1% (m v^{-1}) de Ca^{2+} , 300°C de Pirólise por 20s e 900°C de Vaporização por 8s; (◐•) $5 \mu\text{L}$ de 1% (m v^{-1}) de Sr^{2+} ; (◑•) $5 \mu\text{L}$ de 1% (m v^{-1}) de Ba^{2+} 300°C de Pirólise por 20s e 800°C de Vaporização por 8s. 2500°C de Limpeza por 5s.



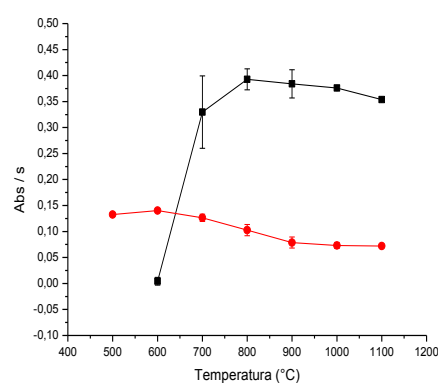
Visando a análise direta de N-NO em infusões de ervas, foram construídas curvas de pirólise e vaporização na amostra para avaliar a influência da matriz no processo de vaporização do analito. Como as melhores condições em meio aquoso foram obtidas com o modificador Ca^{2+} , duas condições foram avaliadas; 1- sem a

utilização de modificador químico; 2- empregando Ca^{2+} como modificador químico, contudo, não foi possível a obtenção de sinal analítico para a infusão fortificada com 10 mg L^{-1} de N-inorgânico sem a utilização do modificador químico. Desta forma somente curvas de pirólise e vaporização com modificador químico foram obtidas (figura 8).

Figura 8 – Curvas de (a) Pirólise e (b) Vaporização construídas em (●) solução aquosa de 10 mg L^{-1} de N-NO (●) Infusão de *Camellia sinensis* (chá preto) fortificada com 10 mg L^{-1} de N-NO com $5 \mu\text{L}$ de Ca 1% (m v^{-1}). Condições: 20s de pirólise; Temperatura fixa de vaporização na otimização da pirólise 900°C e temperatura fixa de pirólise na otimização da vaporização foi de 200°C , 2500°C de Limpeza por 5s.



(a)



(b)

Como condição de compromisso se fixou a temperatura de pirólise em 200°C e vaporização 700°C , para obtenção de uma condição de compromisso visto que, a partir de 300°C de pirólise na curva em meio de infusão ocorre um decréscimo acentuado do sinal analítico e em contrapartida, a partir de 800°C de atomização ocorre um decréscimo de sinal analítico em meio aquoso. Pode-se observar ainda na figura 9 que a intensidade do sinal é bastante inferior nas curvas obtidas no meio da amostra, esse efeito sugere que durante a análise a matriz pode exercer interferência no processo de formação do vapor molecular de nitrato durante a etapa da vaporização.

5.2. Efeito de Matriz

Devido a atenuação do sinal analítico para solução 10 mg L^{-1} de N-NO observada nas curvas de pirólise e vaporização construídas no meio da infusão, a etapa seguinte do estudo foi a do efeito de matriz através do procedimento descrito por

Economou *et al.* (2009) que relaciona a inclinação de uma curva de calibração construída no meio do solvente (água) e outra no meio da amostra (infusão). Para o estudo em questão foram preparadas curvas de calibração em três tipos de infusões todas preparadas a partir de variações produzidas da *Camellia sinensis* (chá preto, chá branco e chá verde), sendo determinado o efeito de matriz (tabela 8) para cada variação da *Camellia sinensis*.

Tabela 7 – Efeito de Matriz para Variações da *Camellia Sinensis* na Determinação de N-NO. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s utilizando 5 µL de Ca²⁺ 1% (mv⁻¹).

<i>Amostra</i>	<i>Efeito de Matriz (%)</i>
Chá Preto	68,4
Chá Branco	28,3
Chá Verde	3,1

Através dos resultados obtidos pôde-se inferir que a matriz pode influenciar significativamente na análise e que a interferência varia de acordo com a sua composição. Contudo, devido à complexidade das amostras estudadas, fez-se necessário um estudo sistemático de possíveis interferentes para determinação de N-NO₃⁻ nas infusões.

5.2.1. Avaliação dos Interferentes

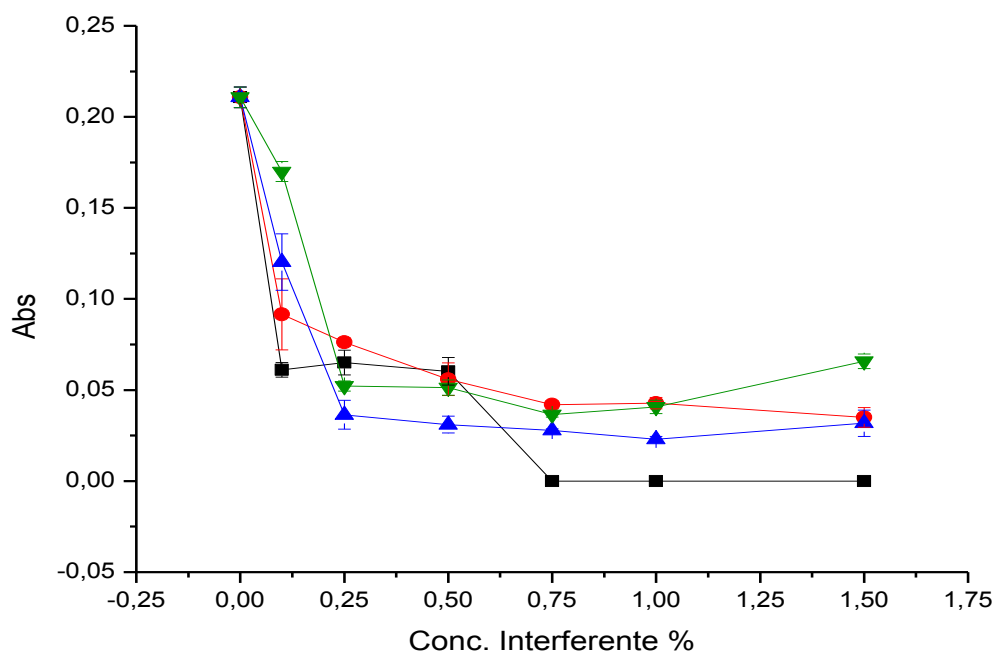
Para o estudo de interferentes, duas hipóteses foram testadas. A primeira fundamentou-se nas observações apresentadas anteriormente sobre a influência do modificador de Ca²⁺ no sinal analítico que se encontra de acordo com o apresentado no trabalho de Fischer e Rademeyer (1999), onde mostraram que algumas matrizes, mesmo passando por processos de mineralização, podem conter compostos capazes de indisponibilizar os modificadores químicos em análises por forno de grafite através de precipitação do modificador. Desta forma, a precipitação de Ca²⁺ na forma de sais insolúveis poderia ser uma possível explicação para a perda de sinal analítico observada no meio da amostra. Essa hipótese pode ser corroborada ainda com dados da literatura, Kumar *et al.* (2008) detectaram derivados de ânions fosfóricos (KPS

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 = 1 \times 10^{-3}$) e ânions sulfurados ($\text{KPS CaSO}_4 = 2,4 \times 10^{-5}$) em amostras de chá preto (Kumar *et al.*, 2008).

Desta forma, para avaliar essa hipótese, foram selecionados ânions que formem sais de baixa solubilidade com cálcio, para isso tendo elencados além dos ânions descritos por Kumar *et al.* (2008) dihidrogenofosfato e sulfato, os íons metassilicato ($\text{CaSiO}_3 = 2,51 \times 10^{-8}$) e carbonato ($\text{Kps CaCO}_3 = 3,8 \times 10^{-9}$).

A interferência destes ânions pode ser observada na figura 9, com a atenuação do sinal na primeira concentração avaliada se intensificando conforme ocorre o aumento da concentração do interferente até a estabilização do valor de absorbância. Com algumas variações, pode-se observar que a interferência dos ânions na análise é muito semelhante, com uma queda elevada na primeira concentração de interferente seguida da estabilização a partir da segunda. Essa semelhança pode ser um indício que todos os ânions interferiram da mesma forma na análise, o que suporta a hipótese proposta.

Figura 9 – Interferência de (•) $\text{P-H}_2\text{PO}_4^-$, (◐) S-SO_4^{2-} , (◑) Si-SiO_3^{2-} e (◒) C-CO_3^{2-} no Sinal de 10 mg L^{-1} de N-NO. Condições: $5 \mu\text{L}$ de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



Para complementar o estudo foram comparadas curvas de calibração em meio aquoso com e sem modificador químico, evidenciando uma perda de sensibilidade significativa sem a utilização de Ca^{2+} (figura 10). Por fim, é notória a relação entre a intensidade de diminuição de sinal analítico e o decréscimo da solubilidade dos sais de Ca^{2+} , como pode ser observado na tabela 9. Todos os experimentos realizados levam a considerar então a presença de ânions como potencial interferente na análise de N inorgânico.

Figura 10 – Curvas de calibração em meio aquoso construídas (•) com adição de 5 μL de 1% (m v^{-1}) de Ca^{2+} e (◼) sem adição de modificador químico. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.

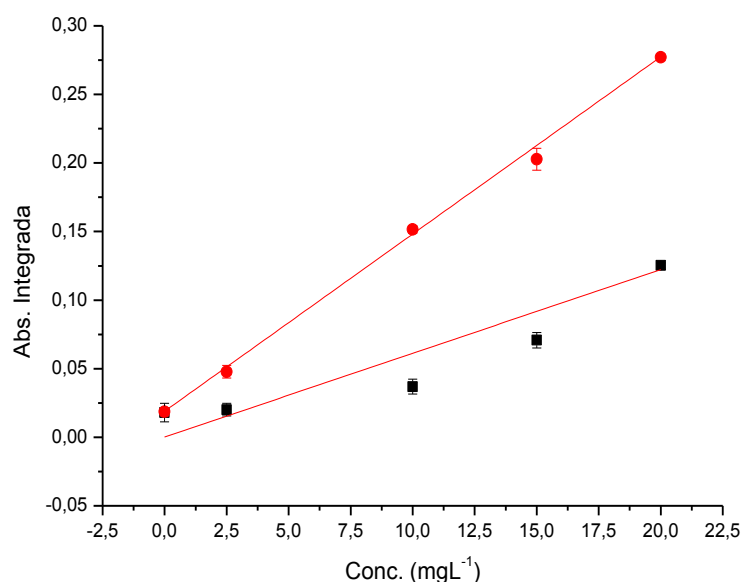


Tabela 8 – Relação da atenuação do sinal provocada por 0.10% do interferente com a solubilidade dos sais formados entre o modificador e o interferente

Interferente (Conc. 0.10%)	Atenuação do Sinal Analítico (%)	Sal Formado com Modificador	Solubilidade do Sal (mol L^{-1})
C- CO_3^{2-}	71,0	CaCO_3	$6,10 \times 10^{-5}$
Si- SiO_3^{2-}	56,6	CaSiO_3	$1,58 \times 10^{-4}$
S- SO_4^{2-}	43,0	CaSO_4	$5,00 \times 10^{-3}$
P- H_2PO_4^-	19,4	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	$6,20 \times 10^{-2}$

5.2.2. Estudo de Interferência da Matéria Orgânica

Em função da análise direta da infusão, a matéria orgânica também pode ser um potencial interferente, por isso, efetuou-se um estudo com concentrações de carbono orgânico na mesma faixa de concentrações realizada para os outros interferentes inorgânicos (figura 12). O carbono orgânico apresentou dois efeitos distintos na análise de N-NO. Nas concentrações de 0,10 a 0,25%, como observado nas figuras 11 e 12 (a, b e c), um efeito similar ao apresentando pela interferência aniônica parece ocorrer, com valores de atenuação do sinal de 49,8, 73,9 e 81,54% respectivamente. Em concentrações mais elevadas não foi possível estimar a atenuação do sinal devido a presença de um ruído muito intenso. Cabe salientar que a interferência foi tão intensa que mesmo utilizando correção do sinal de fundo por meio da correção matemática do método dos mínimos quadrados não foi possível elimina-la (figura 12•).

Figura 11 – Efeito do Carbono Orgânico no Sinal de 10 mg L⁻¹ de N-NO. Condições: 200°C de Pirólise por 20s, 700°C de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.

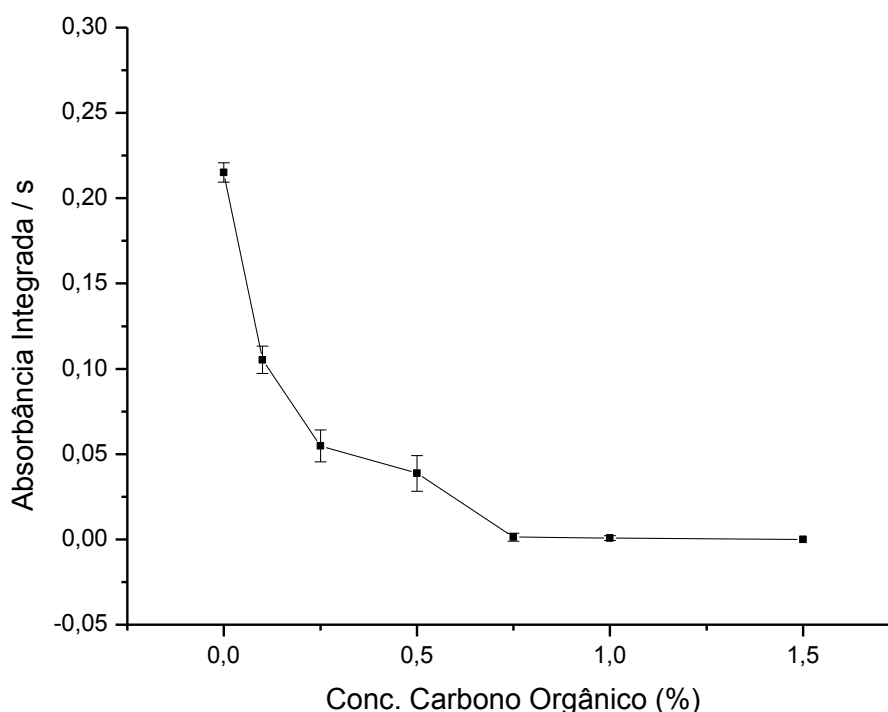
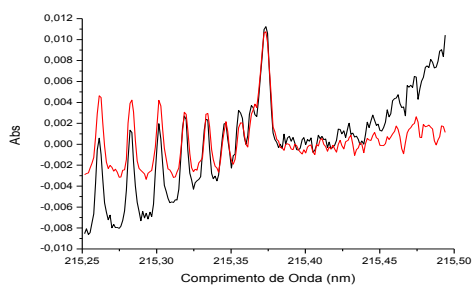
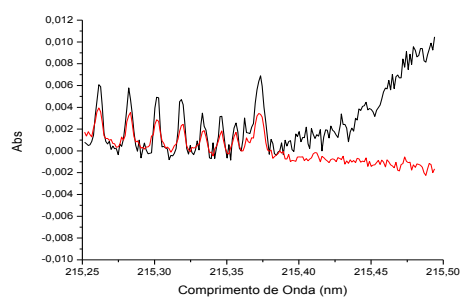


Figura 12 – Efeito da Concentração de C-Glicose no Espectro de 10 mg L⁻¹ de N-NO: (•) Sem correção, (•) Empregando o método dos mínimos quadrados. Condições: 5 µL

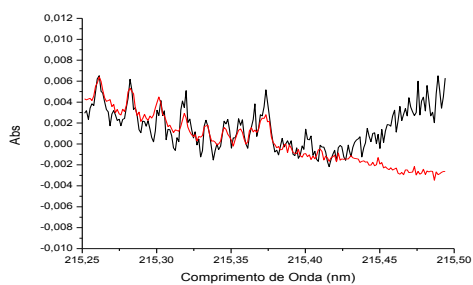
de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, Vaporização de 700° por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



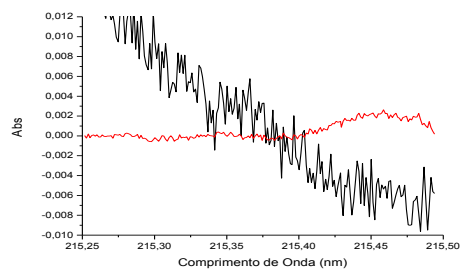
(a)



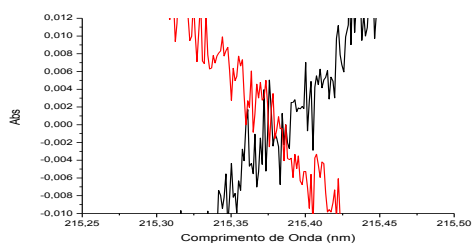
(b)



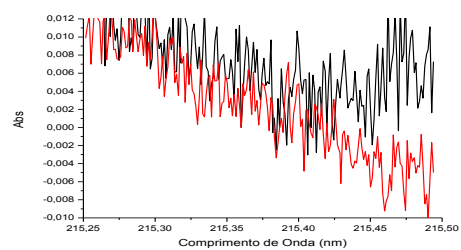
(c)



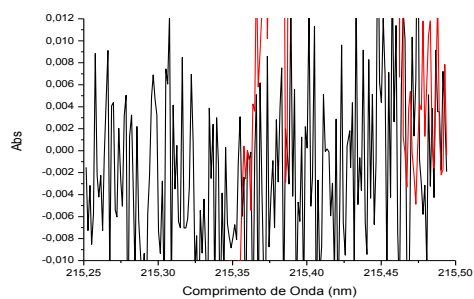
(d)



(e)



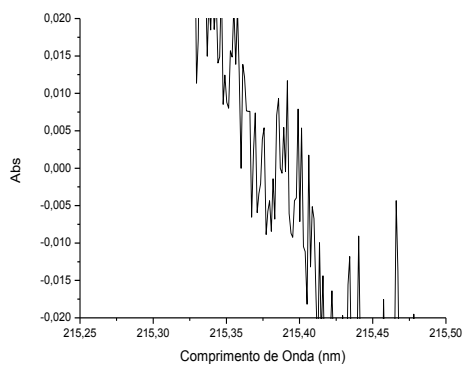
(f)



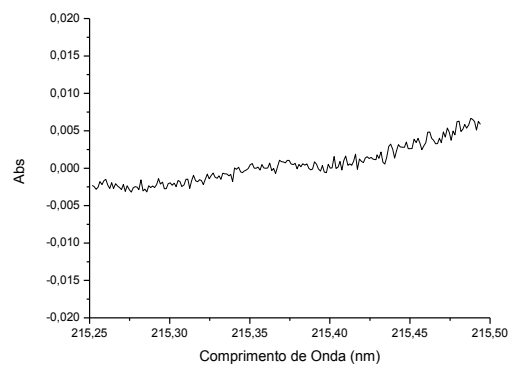
(g)

Além disso é importante ressaltar que essa interferência espectral só foi observada para os estudos feitos com o C-orgânico como observado na figura 13. Evidenciando, com isso, uma interferência mais severa desse interferente em relação aos ânions inorgânicos.

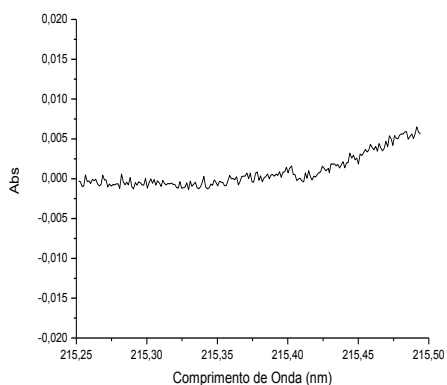
Figura 13 – Espectros dos Interferentes sem Fortificação na Concentração de 1,50% de (a) C-Glicose, (b) C-CO₃²⁻, (c) P-H₂PO₄⁻, (d) S-SO₄²⁻ e (e) Si-SiO₃²⁻. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v-1) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



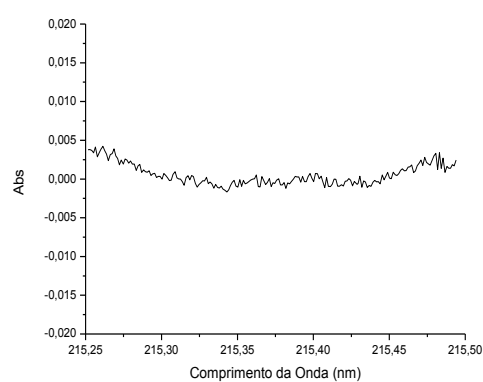
(a)



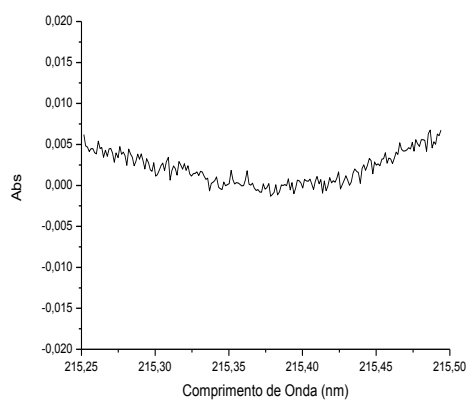
(b)



(c)

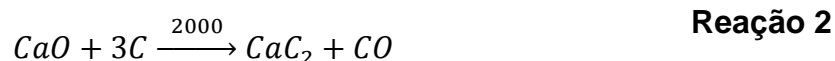
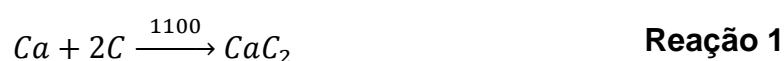


(d)



(e)

A observações desses experimentos leva a duas situações distintas, primeiro a perda de sinal observada em baixas concentrações de C-Glicose, devido a semelhança entre o perfil de perda do sinal com o ensaio anterior, leva-se a inferir que também nesse caso se deve há indisponibilização do Ca^{2+} . Duas explicações podem ser propostas para isso, uma delas, a formação de carbeto de cálcio, gerado pela queima da matéria orgânica em ambiente redutor durante a pirólise, sendo esta menos provável em função dos fatores termodinâmicos da análise, a temperatura necessária para formação de carbeto de cálcio a partir da reação entre carbono e cálcio na forma elementar seria de $1100^{\circ}C$ (reação 1), ou de $2000^{\circ}C$ para reação de carbono elementar e óxido de cálcio (reação 2), temperaturas não alcançadas nos momentos críticos da análise como a pirólise e vaporização que utilizam temperaturas de 200 e $700^{\circ}C$ (LEE, 2000).



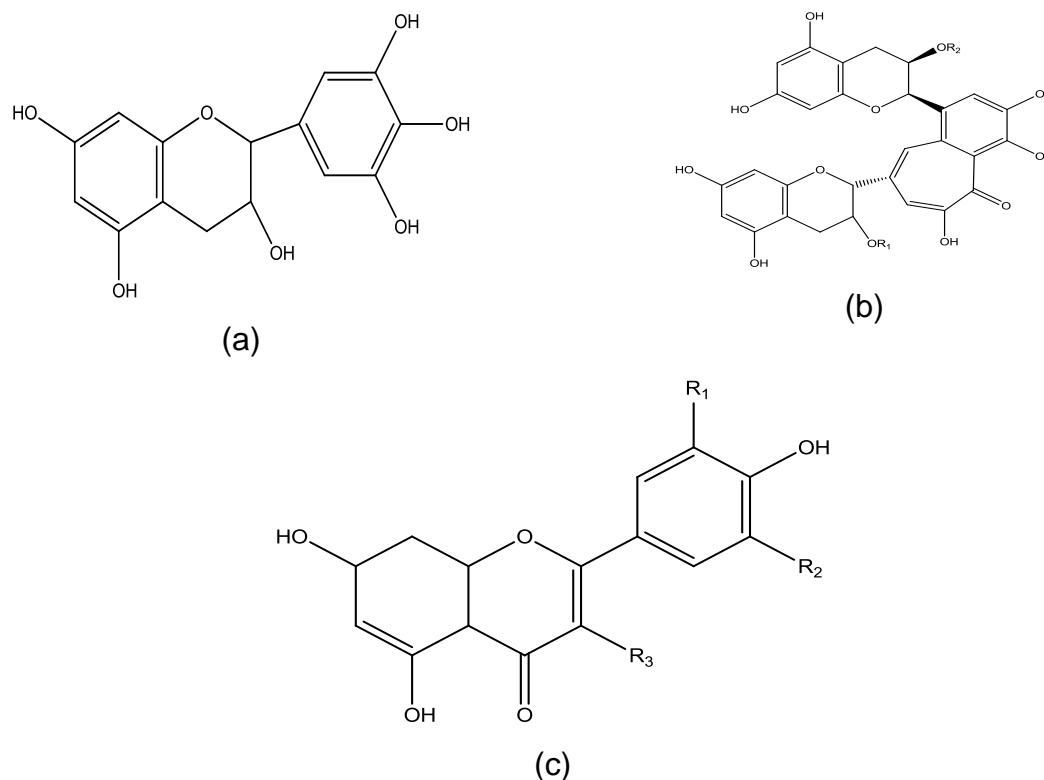
A baixa temperatura de vaporização também corrobora o fato de os ânions de fósforo, enxofre e silício não provocarem a interferência espectral, as moléculas de fósforo, por exemplo, em forno de grafite necessitam de temperaturas de $2300^{\circ}C$ para volatilização (PIRES; BRANDÃO; TEIXEIRA, 2017). A segunda explicação seria a volatilização do nitrato após reduzido pela matéria orgânica presente na infusão durante o processo de pirólise, teoricamente essa seria a hipótese mais plausível pelo fato dos elementos do grupo do nitrogênio serem suscetíveis, segundo Ortner et al. (2002), a formação de compostos voláteis entre o carbono e o nitrogênio. Em função da interferência mais acentuada da matéria orgânica na determinação de $N-NO_3^-$ e da maior quantidade nas infusões que os demais componentes inorgânicos buscou-se relacionar a concentração da matéria orgânica nas três infusões derivadas da *Camellia sinensis* (chá preto, chá branco e chá verde) já estudadas anteriormente com o efeito de matriz (tabela 8). Os resultados estão descritos na tabela 10.

Tabela 9 – Concentração de Carbono Orgânico e Efeito de Matriz nas Infusões

<i>Amostra</i>	<i>Matéria Orgânica (%C m v⁻¹)</i>	<i>Efeito de Matriz (%)</i>
Chá Preto	0,9 ± 0,06	68,4
Chá Branco	0,4 ± 0,03	28,3
Chá Verde	1,4 ± 0,03	3,1

Como pode ser observado, não há relação observável entre a concentração da matéria orgânica nas infusões e o efeito da matriz na determinação de N-inorgânico, contudo ao considerar processo de fabricação dos chás preto, branco e verde, derivados da *Camellia sinensis* utilizados nesse estudo, é possível observar que quanto maior a etapa de fermentação na produção, maior o efeito de matriz. O chá preto passa por um processo de fermentação completa e apresenta maior efeito de matriz, enquanto o chá branco, efeito de matriz intermediário, sofre uma semi-fermentação de folhas ainda não maduras e por fim no chá verde, menor efeito de matriz, as folhas somente são esquentadas ou são expostas a vapor de água em alta temperatura o que leva a inativação das enzimas responsáveis pela fermentação no chá preto (SILVA, OLIVEIRA E NAGEM, 2010). Durante a fermentação ocorrem reações de condensação entre as epigalocatequinas (figura 14a), presentes em concentrações de 35 a 40% no chá verde, para produção de flavonoides poliméricos que apresentam alta estabilidade térmica como as theaflavinas (figura 14b), concentração de 3 a 6% e thearubiginas (figura 14c) com concentrações de 12 a 18% no chá preto, levando a uma maior complexidade dos compostos orgânicos presentes na infusão (SILVA, OLIVEIRA e NAGEM, 2010). Com isso, uma possível explicação para as observações feitas seria que o efeito da matriz está mais relacionado com a complexidade da matéria orgânica do que com concentração da matéria orgânica.

Figura 14 – Flavonóis Encontrados no Chá Preto e Chá Verde, (a) Epigalocatequina, (b) Theaflavina e (c) Therubiginas



De acordo com o conteúdo discutido, ainda visando a análise direta de infusões de chá, os experimentos subsequentes tiveram como objetivo a minimização da interferência da matriz por meio da eliminação da matéria orgânica, para isso foram elaboradas quatro estratégias na tentativa de eliminar a matéria orgânica presente na amostra a fim de determinar N-NO na matriz.

5.3. Estudos para Redução do Efeito de Matriz

Considerando a complexidade da matéria orgânica contida na infusão de chá preto em relação às demais, esta amostra foi escolhida para realização dos estudos de redução do efeito de matriz, sendo os experimentos propostos para esse fim: 1- Aumento do tempo de pirólise; 2- Utilização de adsorvente carvão ativado; 3- Precipitação da matéria orgânica; 4- Oxidação da matéria orgânica. Cabe ressaltar que os experimentos 2, 3 e 4 foram realizados de forma independente não sequencial.

5.3.1. Estudo do Tempo de Pirólise

Soares *et al.* (2016) descreve que a matéria orgânica residual efeito de uma queima incompleta durante a etapa de pirólise, é capaz produzir interferência na determinação de Fe e Ni por SS-HR-CS GF AAS em fluoropolímeros, o que torna necessário estratégias para eliminação da matéria orgânica, como o aumento da temperatura de pirólise ou o aumento do tempo de pirólise. Considerando que na determinação de N-inorgânico não é possível aumentar a temperatura de pirólise, já que a partir de 300°C ocorre uma forte queda do sinal analítico, como observado nas curvas de pirólise (figura 9), a proposição deste experimento se baseia em uma maior exposição da matriz à pirólise através do prolongamento do tempo de queima e desta forma eliminação da interferência da matéria orgânica. Para avaliação do tempo de pirólise foram construídas curvas de calibração em água e a infusão (chá preto) em cada um dos quatro tempos avaliados de 20, 40, 60 e 80s. A infusão foi fortificada com 2,5 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻ para certificar-se da obtenção de sinal de absorvância proveniente da amostra. Além do cálculo do efeito de matriz, nesta etapa foram feitos ensaios de adição e recuperação por calibração externa e adição de padrão. Observou-se a redução do efeito de matriz para determinação de N-NO₃⁻ com o prolongamento do tempo de pirólise (tabela 11).

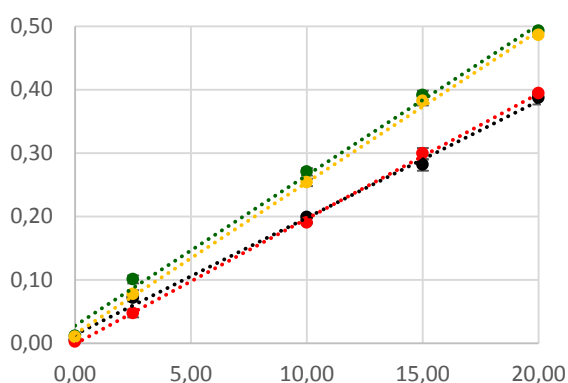
Tabela 10 – Efeito de Matriz nos Tempos de Pirólise Avaliados. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.

<i>Tempo de Pirólise</i>	<i>Efeito de Matriz</i>
20s	69%
40s	45%
60s	52%
80s	56%

O decréscimo mais acentuado da interferência da matriz foi observado para o tempo de 40s. Para os tempos de 60 e 80s foram observados incrementos de sensibilidade das curvas em meio aquoso (figura 15a) que não foram acompanhados

no meio da amostra (figura 15b) o que se refletiu na menor redução do efeito de matriz quando comparado com o tempo de 40s.

Figura 15 – Curvas de Calibração Construídas com (•) 20s de Pirólise, (◐) 40s de Pirólise, (◑) 60s de Pirólise e (◒) 80s de Pirólise (a) no Solvente e (b) na Amostra, Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



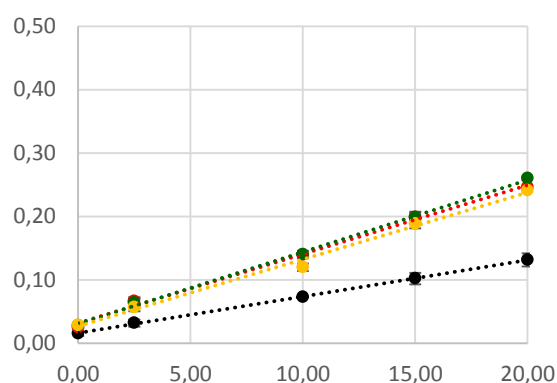
(a)

$$20\text{s}, Y = 0,0184x + 0,0136$$

$$40\text{s}, Y = 0,0197x + 0,0010$$

$$60\text{s}, Y = 0,0237x + 0,0278$$

$$80\text{s}, Y = 0,0239x + 0,0147$$



(b)

$$20\text{s}, Y = 0,0057x + 0,0162$$

$$40\text{s}, Y = 0,0109x + 0,320$$

$$60\text{s}, Y = 0,0114x + 0,0303$$

$$80\text{s}, Y = 0,0106x + 0,0266$$

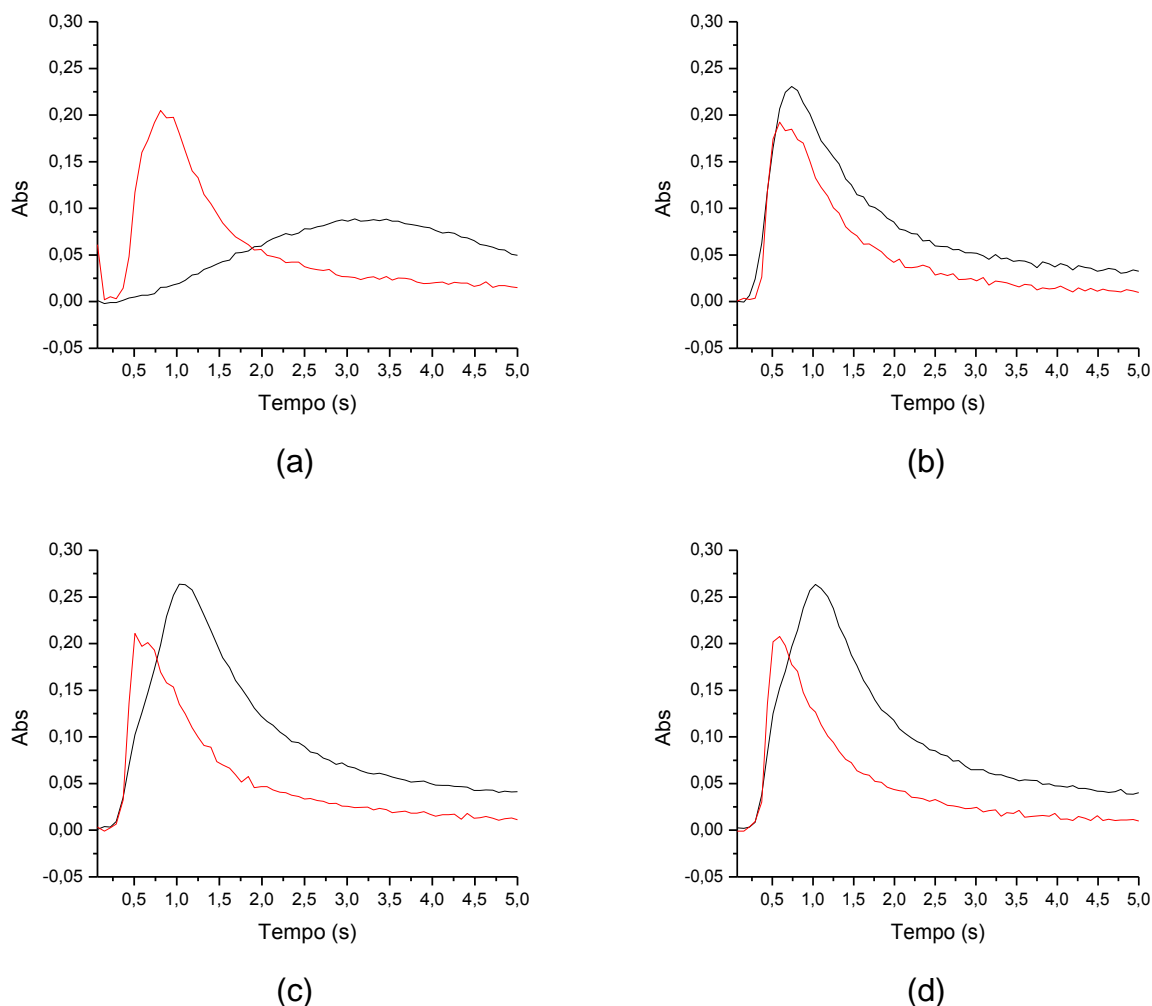
Como fica claro, comparando-se as inclinações das curvas de calibração a total eliminação da interferência de matriz não foi possível, isso é corroborado pelos resultados obtidos no ensaio de adição e recuperação (tabela 12), onde os resultados foram satisfatórios quando aplicado o método de calibração por adição de padrão (101 - 118%), contudo bem pouco eficiente com a calibração externa (2,5 - 53%).

Tabela 11 – Recuperações e Inclinações Obtidas no Estudo com Tempos de Pirólise por Calibração Externa e Adição de Padrão. Condições: 5 μL de Ca^{2+} 1% (m v^{-1}) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500° de Limpeza por 5s.

<i>Tempo de Pirólise</i>	<i>Recuperação (%)</i>	
	Calibração Externa	Adição de Padrão
20s	3,7 \pm 2,2	112,9 \pm 5,7
40s	53,0 \pm 1,0	118,0 \pm 10,7
60s	2,5 \pm 1,5	107,0 \pm 9,0
80s	23,3 \pm 9,2	101,0 \pm 24,4

Para prosseguir a otimização foi selecionado o tempo de pirólise de 60s, em função do incremento de sensibilidade observado. Todavia, ao analisar o perfil de sobreposição dos sinais de absorvância integrada do padrão em solvente (água) e amostra (infusão) observou-se um melhor perfil de sobreposição para os experimentos realizados com tempo de pirolise de 40s (figura 16b), por isso, esse tempo também foi selecionado para posteriores experimentos.

Figura 16 – Sinal de Absorbância Integrada de 20 mg L⁻¹ de N-NO (•) Solvente e (•) Amostra para (a) 20s de Pirólise, (b) 40s de Pirólise, (c) 60s de Pirólise, (d) 80s de Pirólise. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 20s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



5.3.2. Estudo de Adsorção da Matéria Orgânica com Carvão Ativado

Outra alternativa para eliminar a matéria orgânica avaliada foi a utilização de carvão ativado (PRASAD e CHETTY, 2008, MANTOVANI *et al.* 2004). Através do procedimento descrito no item 4.8.2 foram avaliadas as massas de carvão ativado (0,10, 0,25 e 0,50g) descritas por Prasad e Chetty (2008) e Mantovani *et al.* (2004). No procedimento a amostra foi fortificada com 2,5 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻ como garantia da obtenção de sinal proveniente da amostra. Foi observada a redução do efeito de matriz (tabela 13) para as massas de 0,10 e 0,50 g de carvão ativado para ambas condições

de pirólise, contudo, a exatidão da análise ainda não foi adequada utilizando padronização externa. Para dar prosseguimento aos experimentos a temperatura de pirólise de 60s foi selecionada em função dos melhores resultados apresentados no ensaio de adição e recuperação.

Tabela 12 – Efeito de Matriz e Recuperações de 10 mg L⁻¹ de N-NO para 40 e 60s de Pirólise Utilizando Carvão Ativado como Adsorvente para Remoção da Matéria Orgânica. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5.¹

Massa de Carvão Ativado (g)	40s de Pirólise			60s de Pirólise		
	EM (%)	Recuperação (%)		EM (%)	Recuperação (%)	
		AP	CE		AP	CE
Sem	45	118 ± 10,7	53,0 ± 1,0	52	107,0 ± 1,5	2,5 ± 0,9
0,10	37	104,4 ± 12,5	30,5 ± 0,5	40	103,6 ± 22,7	43,4 ± 1,7
0,25	43	89,1 ± 16,6	30,6 ± 7,5	52	188,3 ± 19,9	54,0 ± 4,7
0,50	33	79,5 ± 8,5	33,8 ± 1,1	41	114,1 ± 5,3	52,3 ± 3,2

5.3.3. Precipitação da Matéria Orgânica com Ácidos

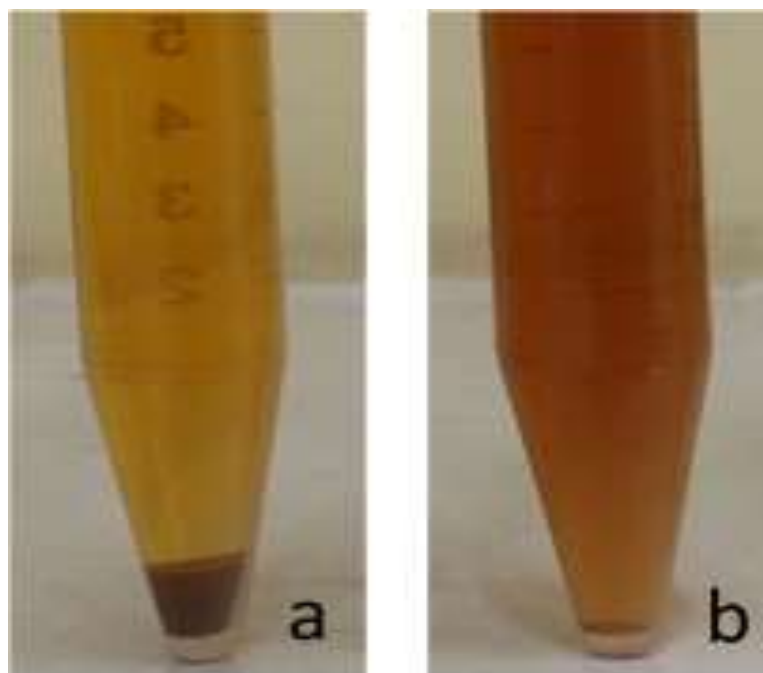
A precipitação da matéria orgânica foi proposta em função da possibilidade de precipitação de compostos orgânicos através do ajuste do pH (CARREIRA *et al.* 2003). Dois ácidos foram avaliados neste experimento, ácido bórico e ácido clorídrico, já que os ácidos fosfórico e sulfúrico poderiam precipitar o modificador químico e a adição de ácidos orgânicos poderia incrementar a concentração de matéria orgânica. O experimento consistiu em adicionar 1 mL de uma solução 1% do ácido escolhido a 5 mL de uma infusão fortificada com 10 mg L⁻¹ de N-NO e na sequência aferir o volume a 10 mL com água ultrapura, neste experimento a eficiência foi avaliada somente por meio de ensaios de adição-recuperação.

A recuperação calculada para a precipitação com ácido clorídrico foi de 33 ± 0,3%. Essa baixa recuperação pode ser por dois motivos, a volatilização de nitrato na forma de ácido nítrico em função da grande redução do pH (BRANDÃO *et al.* 2014) ou a perda do analito durante a floculação da matéria orgânica, o que é corroborado pela

¹ AP = Adição de Padrão, CE = Calibração Externa, EM = Efeito de Matriz

elevada massa de precipitado formado no experimento (figura 17). Com a adição de ácido bórico foram obtidos melhores resultados com uma recuperação de $61,67 \pm 3,25$. Em função dos melhores resultados obtidos nesta etapa, foi levada a frente a otimização do experimento, aumentando-se a concentração da solução ácida, mas não foram observadas melhoras significativas.

Figura 17 – Resultado da Adição de (a) Ácido Clorídrico e (b) Ácido Bórico.



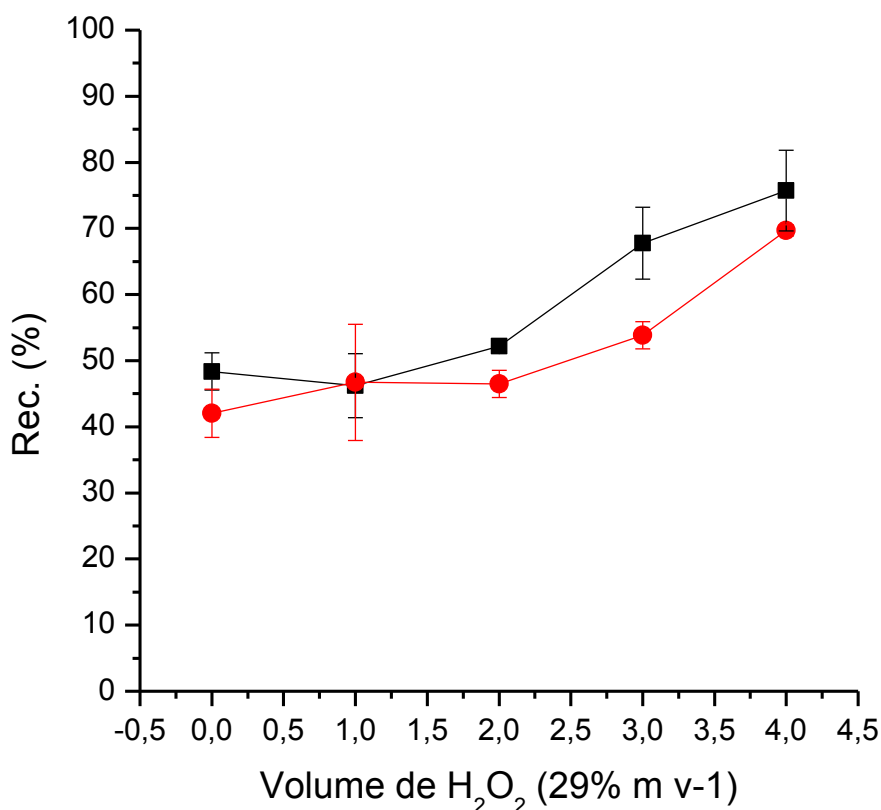
5.3.4. Oxidação da Matéria Orgânica com Peróxido de Hidrogênio

A oxidação da matéria orgânica consistiu em dois experimentos nos quais foi feita a avaliação sistemática do volume adicionado do agente oxidante, peróxido de hidrogênio. Foram avaliados volumes de 1 a 4 mL (com incrementos de 1 mL). O primeiro estudo consistiu em realizar as adições de peróxido de hidrogênio a infusão fortificada com 10 mg L^{-1} , o estudo foi monitorado por meio de ensaios de adição e recuperação. As recuperações não ultrapassaram 75% (figura 18).

Em vista dos melhores resultados em comparação às alternativas anteriores, avaliou-se a possibilidade de empregar ultrassom como intensificador do processo de oxidação. Esta proposta se baseia na teoria de que o ultrassom tem a capacidade de intensificar a produção dos radicais HO^\bullet , tanto a partir da água como do peróxido e hidrogênio (EXPÓSITO *et al.*, 2017). Contudo, a oxidação assistida com ultrassom não

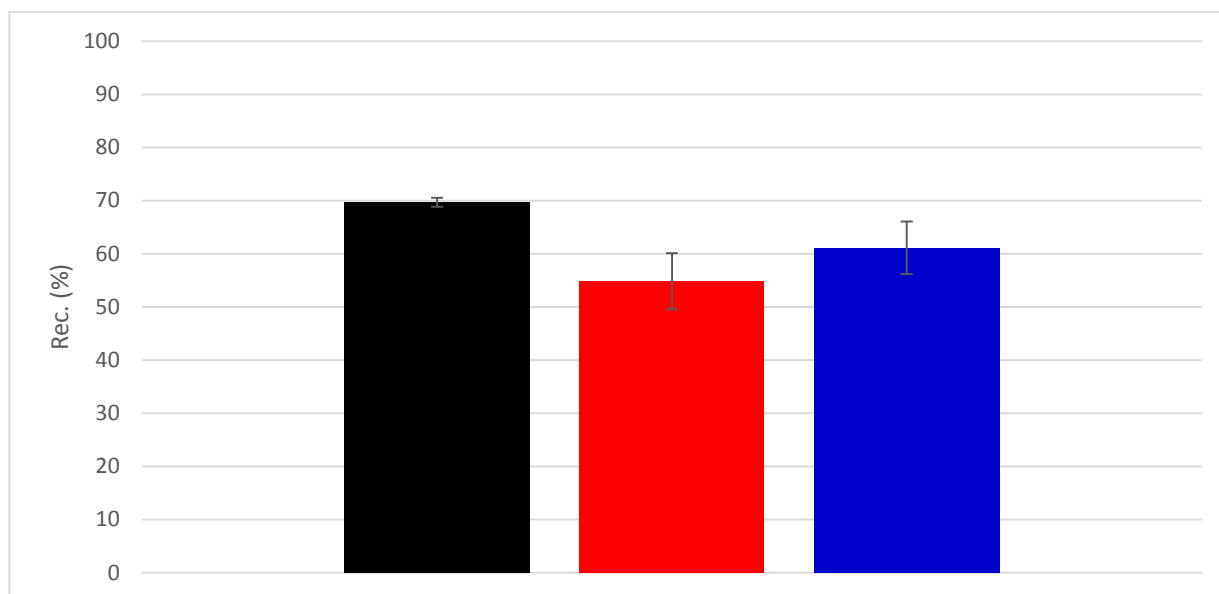
foi capaz de promover melhora na recuperação de nitrogênio -inorgânico como pode ser observado em vermelho na figura 18.

Figura 18 – Estudo com Adição de Peróxido de Hidrogênio (•) Sem Ultrassom, (•) Aplicação de Ultrassom Durante 5 min com 50% de Amplitude. Condições: 10 mg L⁻¹ de N-NO, 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



Por fim, foi avaliado o aumento da amplitude de onda do ultrassom. Inicialmente realizaram-se os experimentos com 50% de amplitude, e ao fim do estudo foram avaliadas amplitudes superiores de 60 e 70% (limite imposto pelo fabricante). Observa-se na figura 19 que os resultados não foram melhores, com queda da recuperação de N-NO o que pode ter ocorrido em função da decomposição do peróxido de hidrogênio.

Figura 19 – Estudo da Aplicação de (•) 50% de Amplitude, (•) 60% de Amplitude e (•) 70% de Amplitude Durante 5 min com 50% de Amplitude. Condições: 10 mg L⁻¹ de N-NO, 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



5.4. Condições para Determinação de N-NO

Após os estudos realizados conclui-se que as alternativas avaliadas não foram eficientes na completa eliminação do efeito de matriz para determinação de N-inorgânico. Devido a variabilidade da matriz não se torna viável a compatibilização da curva de calibração. Contudo a determinação direta de N-NO nas infusões é possível utilizando padronização por adição de padrão.

Os parâmetros experimentais otimizados foram: Temperaturas de pirólise e vaporização 200°C e 700°C, com 60s de pirólise. O procedimento para análise das amostras consistiu em preparar uma curva de calibração com adições de 10, 30 40 mg L⁻¹ de N-NO a 1 mL de amostra em um tubo de polipropileno de 2 mL, após, aferição do volume a 2 mL e este tomado como volume de amostra.

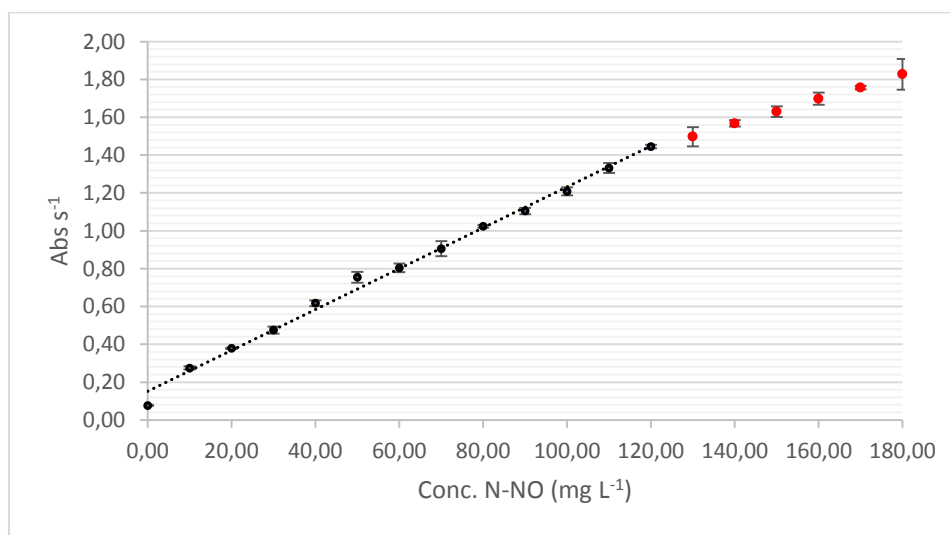
5.5. Desempenho Analítico

Nessa seção serão apresentadas as figuras de mérito (linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão) avaliadas para o método desenvolvido.

5.5.1. Faixa Linear

A faixa linear de trabalho foi avaliada no meio da infusão de *Camellia sinensis* (chá preto) que ofereceu a maior interferência de matriz. A sua determinação foi feita através de adições sucessivas de 10 mg L⁻¹ de N-NO na amostra (infusão), até o primeiro ponto que a correlação linear fosse inferior a 0.990 o que se concretizou na concentração de 120 mg L⁻¹ de N-NO, como observado na figura 20. Sendo que a partir de 130 mg L⁻¹ de N-NO observa-se mudança na inclinação.

Figura 20 – Faixa Linear Estuda, até (●) 120 mg L⁻¹, Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador, Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



5.5.2. Limites de Detecção e Quantificação¹

Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo Ribani *et al.* (2004), utilizando os parâmetros da curva de calibração construída no meio da amostra com valores obtidos de 0,29 mg L⁻¹ e 0,96 mg L⁻¹, respectivamente. Comparando aos demais trabalhos apresentados na literatura que fazem a determinação de N-NO HR-CS GF AAS, os valores se encontram semelhantes ao trabalho de Brandão *et al.* (2014) que possui um limite de detecção 0,10 mg L⁻¹ para determinação de N-NO em água subterrânea, uma matriz com uma concentração menor de matéria orgânica presente.

5.5.3. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de um estudo de adição recuperação realizado em três infusões preparadas a partir de ervas diferentes. A primeira infusão utilizada foi preparada a partir da *Camellia sinensis* (chá preto) utilizado durante toda a otimização do método. As demais ervas foram escolhidas por serem utilizadas na produção de infusões com diferentes partes das plantas.

As três infusões foram analisadas sem fortificação para então serem fortificadas com 10 mg L⁻¹ de N-NO e analisadas novamente, e por diferença foi calculada a recuperação do analito (tabela 14).

Tabela 13 – Resultados de Adição Recuperação para as Amostras de *Camellia sinensis*, *Foeniculum vulgare* e *Matricaria recutita*. Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.

Amostra	Recuperação (%)
<i>Camellia sinensis</i> (Chá Preto)	85,0 ± 5,3
<i>Foeniculum vulgare</i> (Funcho)	81,6 ± 3,0
<i>Matricaria recutita</i> (Camomila)	107,9 ± 5,8

Os valores obtidos para recuperação nas três amostras de infusão se encontram de acordo com outros trabalhos (tabela 15) que fazem a determinação de N-NO₃⁻ em vegetais.

Tabela 14 – Comparação da Recuperação Obtida com Dados da Literatura

Amostra	Faixa de Recuperação (%)	Técnica Utilizada	Referência
Infusões	81 – 108	HR-CS GF MAS	Este trabalho
Vegetais	74 a 110	HPLC – UV	Hsu, Arcot e Lee (2009)
Vegetais	90 a 112	FIA	Prasad e Chetty (2008)

5.5.4. Precisão

Para determinação da precisão do método foi utilizada novamente a mesma amostra de *Camellia sinensis* (chá preto) empregada na otimização do método. A

determinação foi feita seguindo a recomendação recomendada pelo guia de validação da ANVISA, (n = 5). A precisão foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD), obtendo-se um RSD igual a 8,4%, valor que entra de acordo com o guia de validação da ANVISA que recomenda valores abaixo de 15% (BRASIL, 2003).

5.6. Aplicação do Método para Determinação de N-NO em Infusões de Ervas Orgânicas e Convencionas

As amostras obtidas comercialmente para o estudo foram adquiridas sempre na condição de que para cada erva tivesse pelo menos uma amostra de origem orgânica. Inicialmente se observou que a concentração de nitrato se relaciona com a parte da erva utilizada para confecção do sachê de chá, como observado na tabela 16, as maiores concentrações de N-inorgânico foram encontradas em infusões preparadas a partir de folhas.

Tabela 15 – Concentração de N-NO₃⁻ Determinada nas Amostras Orgânicas e Convencionais: Condições: 5 µL de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.

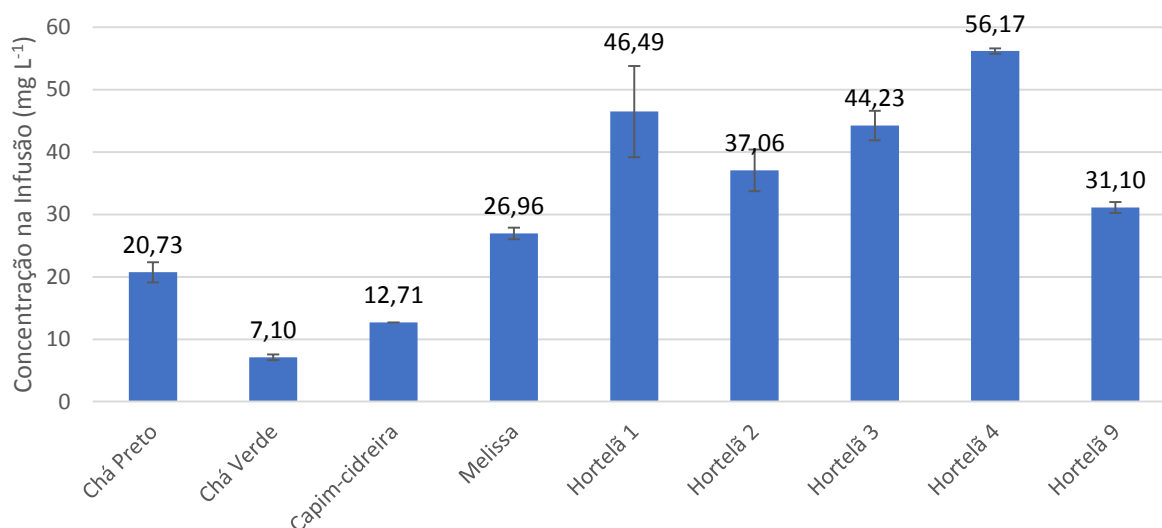
Erva Utilizada	Parte da Erva	Marca	Cultivo	Estado	Concentração (mg L ⁻¹)
Carqueja (<i>Baccharis</i>)	Folhas	4	Conv,	RS	1,93 ± 0,14
	Folhas	8	Org.	RS	<LD
Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i>)	Folhas	5	Conv.	SP	3,46 ± 0,34
	Folhas	8	Org.	SP	<LD ±
	Folhas	9	Conv.	SC	7,10 ± 0,44
	Folhas	9	Conv.	SC	1,19 ± 0,12
Chá Preto (<i>Camellia sinensis</i>)	Folhas	6	Conv.	RS	20,73 ± 1,62
	Folhas	9	Conv.	RS	3,74 ± 0,09
Chá Branco (<i>Camellia sinensis</i>)	Folhas	9	Conv.	SP	3,44 ± 0,39

Continuação da tabela 16.

Erva Utilizada	Parte da Erva	Marca	Cultivo	Estado	Concentração (mg L⁻¹)
Capim-cidreira <i>(Cymbopogon citratus)</i>	Folhas	1	Conv.	RS	12,71 ± 1,21
	Folhas	3	Conv.	SP	1,32 ± 0,09
	Folhas	7	Org.	RS	<LD
	Folhas	8	Org.	SP	<LD
Funcho <i>(Foeniculum vulgare)</i>	Frutos	1	Conv.	RS	2,24 ± 0,45
	Folhas	7	Org.	RS	2,10 ± 0,09
	Folhas/Frutos/Talos	9	Conv.	SC	1,22 ± 0,07
Camomila <i>(Matricaria recutita)</i>	Flores	8	Org.	SP	2,67 ± 0,39
	Flores	9	Conv.	SC	<LD
Melissa <i>(Melissa officinalis)</i>	Folhas	4	Conv.	RS	26,96 ± 0,91
	Folhas	7	Org.	RS	<LD
	Folhas	9	Conv.	SC	3,38 ± 0,24
Hortelã <i>(Mentha)</i>	Folhas	1	Conv.	RS	46,49 ± 7,31
	Folhas	3	Conv.	SP	44,23 ± 2,35
	Folhas	4	Conv.	RS	56,17 ± 0,42
	Folhas	7	Org.	RS	3,43 ± 0,72
	Folhas	9	Conv.	SC	31,10 ± 0,87
	Folhas	2	Conv.	SP	37,06 ± 3,34

Os resultados sumarizados na figura 21 mostram que as ervas que apresentaram concentrações acima de 7,10 mg L⁻¹ foram todas preparadas com folhas, enquanto que infusões preparadas com flores ou apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção ou não ultrapassaram 2,67 mg L⁻¹ de N-inorgânico.

Figura 21 – Concentração de N-Inorgânico Determinado nas Infusões de Ervas. Condições: 5 μ L de Ca²⁺ 1% (m v⁻¹) de Modificador Pirólise de 200°C por 60s, 700° de Vaporização por 8s, 2500°C de Limpeza por 5s.



Nas infusões preparadas a partir de folhas era esperado o comportamento observado, já que as folhas são os órgãos responsáveis pelo armazenamento e metabolismo do nitrogênio inorgânico (nitrato e nitrito) nas plantas (TISCHNER e KAISER, 2007). Isso pode justificar o fato de nas infusões de funcho e camomila serem encontradas concentrações baixas de N-NO. No entanto é plausível a presença de nitrato nestas ervas visto que trabalhos na literatura encontraram nitrato em bebidas como chá gelado de pêsego, vinho tinto e vinagres de uva e maçã, os quais são produzidos a partir do fruto (GÜRKAN e ALTUNAY, 2015).

As demais ervas analisadas, *Camellia sinensis* (chá preto, branco e verde), melissa e capim-cidreira apresentaram níveis diferenciados nas concentrações de N-NO nas infusões, por exemplo, as infusões de *Camellia sinensis* (chá verde) apresentou concentrações de 1,10, 3,46 e 7,10 mg L⁻¹ de N-NO que podem ser consideradas pequenas variações se comparada com as infusões de ervas convencionais da melissa se encontra entre 3,38 a 26,96 mg L⁻¹. Este comportamento se mostra para outros vegetais apresentados na literatura, os quais apresentam variações muito mais bruscas na concentração de N-NO como no trabalho de Correa *et al.* (2010) que apresenta variações na concentração de N-NO para amostras de salsa

entre 9 e 2441 mg L⁻¹ e para repolho entre 54 e 939 mg L⁻¹, embora os trabalhos que observam estas variações grandes na concentração de nitrato não explorem uma teoria, é possível que seja decorrido da disponibilidade de N-NO presente no solo seja diferente para os vegetais.

A segunda observação sobre as amostras se refere as diferenças entre a concentração de N-NO nas infusões de origem orgânica e convencional, neste caso, das oito amostras de origem orgânica analisadas, cinco apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção, uma amostra apresentou concentração de nitrogênio acima do limite de quantificação, caso da hortelã orgânica com uma concentração de 3,46 mg L⁻¹ de N-NO que se encontra muito inferior as concentrações determinadas nas infusões de hortelã convencional. Esse comportamento pode se justificar pelo fato do produtor estar em uma fase de transição entre a produção de alimentos convencionais e orgânicos o que segundo Worthington (2001) pode ocorrer pelo acúmulo de N-NO no solo o que levariam a uma concentração mais alta de nitrato neste caso. A variação da concentração nas amostras de funcho foi muito pequena independente se a infusão é feita com mistura dos talos, frutos e folhas ou apenas com os frutos da parte da erva, ou se é de cultivo orgânico ou de cultivo convencional. A camomila apresentou comportamento inverso, ou seja, não tinha nitrato na amostra convencional e na amostra orgânica foi possível a determinação de N-NO.

As infusões preparadas com ervas de origem orgânica se enquadram no comportamento descrito por Winters e Davis (2006), ou seja, a concentração de nitrogênio inorgânico nas amostras orgânicas seria menor que a concentração nas amostras convencionais. A menor concentração de N-NO nas infusões de ervas orgânica pode ser decorrida da rápida metabolização do nitrogênio assimilado impedindo o acúmulo de grandes concentrações de nitrogênio nas folhas. Desta forma ao invés do nitrogênio oriundo do solo ser acumulado nas folhas ele acaba por ser convertido a compostos orgânicos necessários ao desenvolvido do vegetal como clorofila, aminoácidos além de metabólitos secundários utilizados como mecanismo de defesa (DAS, BORUA e BAGHAT, 2003). Esta concentração inferior pode ser também devido o uso de fertilizantes orgânicos que não apresentam o nitrogênio na forma de nitrato mas sim como compostos de nitrogênio que seriam assimilados e metabolizados por outras vias metabólicas. Pode ser o fato também de o fertilizante “alternativo”

empregado nestas ervas de cultivo orgânico não conter nitrogênio, sendo aplicadas rochas moídas sem nenhum tratamento prévio ao solo das plantas para manutenção de fertilidade (STERTZ *et al.*, 2009).

A ingestão diária aceitável de nitrato também foi considerada para as infusões analisadas, porém devido ao preparo adotado nesse trabalho utilizar um volume menor do que o indicado pelos fabricantes das ervas, foi feita a estimativa da concentração de N-NO que estaria presente no volume sugerido na embalagem que corresponde a um volume de 200 mL de infusão. A estimativa do volume de ingestão foi determinada com base em 3,24 mg de N-NO₃⁻ por quilograma de massa corporal com o volume de infusão (PORTO *et al.* 2012).

Tabela 16 – Concentração de N-NO estimada para uma infusão preparada pela por um Sachê em 200mL de água e valores de ingestão diária aceitável para N-NO inorgânico calculados com base um valor de 3.24 mg Kg⁻¹ de massa corporal

Erva	Concentração em 200 mL (mg L⁻¹)	Litros de Infusão por Kg de Massa Corporal
Carqueja (<i>Baccharis</i>)	0,16	4,60
Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i>)	0,29	2,57
	0,10	7,46
	0,59	1,25
Chá Preto (<i>Camellia sinensis</i>)	1,73	0,43
	0,31	2,37
Chá Branco (<i>Camellia sinensis</i>)	0,29	2,58
Capim-cidreira (<i>Cymbopogon citratus</i>)	1,06	0,70
	0,11	6,73
Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i>)	0,19	3,96
	0,18	4,23
	0,10	7,28

Continuação da tabela 17

Erva	Concentração em 200 mL (mg L ⁻¹)	Litros de Infusão por Kg de Massa Corporal
Camomila (<i>Matricaria recutita</i>)	0,22	3,33
Melissa	2,25	0,33
(<i>Melissa officinalis</i>)	0,28	2,63
	3,87	0,19
	3,69	0,20
Hortelã	4,68	0,16
(<i>Mentha</i>)	0,29	2,59
	2,59	0,29
	3,09	0,24

A partir dos dados observado na tabela 17 pode ser considerado que a concentração de N-NO presente nas infusões não oferece um grande risco para aqueles que as consumirem independente do volume de infusão ingerido, visto que algumas das ervas seria necessário ingerir um volume demasiadamente grande para surtir um efeito negativo. Além das amostras determinadas se buscou fazer a determinação de N-NO em infusões de erva mate (*Ilex paraguariensis*), contudo devido à grande quantidade de carbono orgânico presente não foi possível a determinação pela ocorrência de interferência espectral.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um novo método para determinação direta de N-NO em infusões de ervas foi desenvolvido. O método se baseia na utilização das bandas moleculares da molécula diatômica de NO que podem ser determinadas por meio de espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua. O método desenvolvido consiste na injeção direta da infusão de ervas no forno de grafite do instrumento de absorção molecular, para determinação ser feita diretamente no que seria disponível para consumo humano.

O método apresentou certas limitações em função do efeito de matriz determinado o que se relaciona a presença de carbono orgânico nas infusões. As limitações se relacionam a características próprias da determinação de N-NO como a temperatura de pirólise que não pode ultrapassar 200°C em virtude da perda do analito e concomitante queda do sinal de N-NO. No entanto a temperatura de vaporização mais baixa pode ser considerada uma vantagem para determinação de NO, visto que esta não permite a vaporização de compostos capazes de produzir interferência espectral para fonte contínua como fósforo e silício que produzem as moléculas diatômicas de PO e SiO. No entanto compostos que fossem capazes de gerar interferência espectral de PO e SiO também podem vir a indisponibilizar o modificador químico o que provoca a queda do sinal. A interferência da matéria orgânica também pode ser detectada sendo está a mais provável pela interferência no método por ser aquela com maior concentração nas amostras.

Apesar terem sido estudadas estratégias para eliminar a interferência da matéria orgânica não foi possível a sua eliminação o que dificulta a determinação de N-NO utilizando calibração externa em que o que mais se aproxima seria o aumento do tempo de pirólise. Desta forma se buscou outro método que fosse possível a determinação de forma que fosse levado em consideração o efeito de matriz o que foi realizado utilizando adição de padrão para correta determinação, além de existirem outros procedimentos possíveis tanto para eliminação da interferência como a utilização de sulfato de zinco como clarificante já que este já é utilizado em outros trabalhos para determinação de nitrato, ou a utilização da curva construída no meio da amostra e esta ser aplicada a todas as demais amostras. Outra possibilidade que se poderia estudar

futuramente é a não utilização da pirólise partindo diretamente para atomização logo após a secagem como em outros trabalhos que fazem a determinação de mercúrio.

O método após otimizado teve seu desempenho analítico avaliado através da faixa linear que se estende até 120 mg L^{-1} , limites de detecção e quantificação que se encontram em 0.29 mg L^{-1} e 0.96 mg L^{-1} . A exatidão avaliada por meio de ensaios de adição recuperação foi feita e mostra que o método apresenta boas recuperações que se encontram na faixa de 81 a 107% de recuperação. Além da precisão determinada pelo desvio padrão relativo que apresenta o valor de 8,4%.

A concentração de nitrogênio inorgânico pode ser considerada um parâmetro a fim de comparar produtos de origem orgânica e convencional visto que a grande maioria das amostras orgânicas apresenta níveis nitrogênio inorgânico abaixo do limite de detecção de $0,29 \text{ mg L}^{-1}$ enquanto que uma das amostras orgânicas apresenta um valor muito inferior a menor concentração das de origem convencional. A ingestão diária aceitável de nitrogênio inorgânico também foi determinada obtendo-se valores de 0,2 a 7,4 L por quilograma o que pode tornar segura a ingestão destas infusões tanto se forem de origem convencional como as de origem orgânica, visto que seriam necessários volumes muito grandes de infusão a ser ingerida.

7. REFERÊNCIAS DE PESQUISA

1. ANDRADE, Rodolpho M. de et al. Direct Determination of Trace Elements in Meat Samples via High-Resolution Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.1209-1215, 12 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0659-3>.
2. ANDRADE-CARPENTE, Eva; PEÑA-VÁZQUEZ, Elena; BERMEJO-BARRERA, Pilar. Determination of sulfur in bovine serum albumin and l-cysteine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 122, p.188-191, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2016.07.002>.
3. ARAUJO, R. O. et al. Avaliação biológica de *Foeniculum vulgare* (Mill.) (Umbelliferae/Apiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.257-263, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000200014>.
4. ÁVILA, Dayara Virgínia Lino et al. Determination of Co and Cr in wet animal feeds using direct solid sample analysis by HR-CS GF AAS. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 133, p.524-529, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.028>.
5. BAKR, Taisser M. Abo; EL-IRAQUI, S.m.; HUISSEN, Mona H.. Nitrate and nitrite contents of some fresh and processed Egyptian vegetables. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.265-275, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(86\)90050-6](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(86)90050-6).
6. BARROS, Ariane Isis et al. Effect of different precursors on generation of reference spectra for structural molecular background correction by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Determination of antimony in cosmetics. **Talanta**, [s.l.], v. 161, p.547-553, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.017>.
7. BATTNER, Christine. **Chá: Rituais e Benefícios**. São Paulo: Senac, 2011.

8. BECHLIN, Marcos André *et al.* A simple and fast method for assessment of the nitrogen–phosphorus–potassium rating of fertilizers using high-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 101, p.240-244, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.012>.
9. BECHLIN, Marcos André; GOMES NETO, José Anchieta; NÓBREGA, Joaquim Araújo. Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 109, p.134-138, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.013>.
10. BORGES, Aline R. *et al.* Method development for the determination of cadmium in fertilizer samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 66, n. 7, p.529-535, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2011.04.004>.
11. BORGES, Daniel L. Gallindo *et al.* Fundamentos de Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua. **Revista Analytica**, [s.i.], v. , n. 18, p.58-67, ago. 2005.
12. BRAIBANTE, Mara Elisa Fortes *et al.* A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.168-175, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10,5935/0104-8899.20140019>.
13. BRANDAO, Geovani C. *et al.* Development of a simple method for the determination of nitrite and nitrate in groundwater by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 806, p.101-106, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.031>.
14. BRANDAO, Geovani C.; LIMA, Daniel C.; FERREIRA, Sergio L.C.. The chemical generation of NO for the determination of nitrite by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 98, p.231-235, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.080>.

15. BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília
16. BRASIL. Constituição (2007). Decreto nº 6323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Decreto Nº 6.323, de 27 de Dezembro de 2007.. Brasília, 27 dez. 2007.
17. BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves *et al.* Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.629-636, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322008000400009>.
18. BÜCKER, Stefan; ACKER, Jörg. Spectrometric analysis of process etching solutions of the photovoltaic industry—Determination of HNO₃, HF, and H₂SiF₆ using high-resolution continuum source absorption spectrometry of diatomic molecules and atoms. **Talanta**, [s.l.], v. 94, p.335-341, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.052>.
19. BUTCHER, David J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 804, p.1-15, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.056>.
20. CADORIM, Heloisa R. *et al.* Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace. **Talanta**, [s.l.], v. 146, p.203-208, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.088>.
21. CHETTY, Adrian Avinesh; PRASAD, Surendra. Flow injection analysis of nitrate-N determination in root vegetables: Study of the effects of cooking. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.561-566, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.006>.

22. COLONNA, Emma *et al.* Nutritional quality of ten leafy vegetables harvested at two light intensities. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 199, p.702-710, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.068>.
23. CORREIA, Manuela *et al.* Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 120, n. 4, p.960-966, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.030>.
24. DAS, Anup *et al.* Impact of seven years of organic farming on soil and produce quality and crop yields in eastern Himalayas, India. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 236, p.142-153, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.007>.
25. DAS, Sangeeta; BORUA, Prodeep Kumar; BHAGAT, Rajib Mohan. Soil nitrogen and tea leaf properties in organic and conventional farming systems under humid subtropical conditions. **Organic Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.119-132, 2 maio 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s13165-015-0116-4>.
26. DESCHAMPS, Cícero *et al.* Avaliação de genótipos de mentha arvensis, Mentha x piperita e Mentha spp. para a produção de mentol. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.178-183, jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362013000200002>.
27. ECONOMOU, Anastasios *et al.* Determination multi-class pesticides in wines by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1216, n. 31, p. 5856 – 5867, jul. 2009, Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>.
28. EXPÓSITO, A.J. *et al.* Dynamic behavior of hydroxyl radical in sono-photo-Fenton mineralization of synthetic municipal wastewater effluent containing antipyrine. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 35, p.185-195, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.017>.
29. FERNÁNDEZ-RAMOS, Carolina *et al.* Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in

column-switching liquid chromatography. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 62, p.69-85, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.008>.

30. FERNÍCOLA, Nilda Gallego Gándara de; AZEVEDO, Fausto Antonio de. Metemoglobinemia e nitrato nas águas. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.242-248, abr. 1981. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101981000200009>.

31. FIAMEGOS, Yiannis *et al.* Determination of toxic trace elements in canned vegetables. The importance of sample preparation. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, p.57-66, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.004>.

32. GAMBOA, Juan C. M. *et al.* A renewable copper electrode as an amperometric flow detector for nitrate determination in mineral water and soft drink samples. **Talanta**, [s.l.], v. 80, n. 2, p.581-585, 15 dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.028>.

33. GELMAN, Faina; BINSTOCK, Ruth; HALICZ, Ludwik. Application of the Walkley–Black titration for the organic carbon quantification in organic rich sedimentary rocks. **Fuel**, [s.l.], v. 96, p.608-610, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.053>.

34. GLEISNER, Heike; WELZ, Bernhard; EINAX, Jürgen W.. Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 65, n. 9-10, p.864-869, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2010.08.003>.

35. GUNDUZ, Sema; AKMAN, Suleyman. Determination of bromine by high resolution molecular absorption of strontium mono bromide generated in a graphite furnace. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 116, p.1-6, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.03.012>.

36. GÜRKAN, Ramazan; ALTUNAY, Nail. Preconcentration and indirect quantification of trace nitrite, nitrate and total nitrite in selected beverage and milk samples using ion-pairing cloud-point extraction with acridine orange. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], p.1-12, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.009>.
37. HEITMANN, Uwe *et al.* Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], v. 21, n. 11, p.1314-1320, 2006. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b607384k>.
38. HSU, James; ARCOT, Jayashree; LEE, N. Alice. Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 115, n. 1, p.334-339, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.081>.
39. HSU, James; ARCOT, Jayashree; LEE, N. Alice. Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 115, n. 1, p.334-339, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.081>.
40. HUANG, Mao Dong *et al.* Determination of phosphorus using high-resolution diphosphorus molecular absorption spectra produced in the graphite furnace. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 115, p.23-30, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2015.10.007>.
41. HUANG, Mao Dong *et al.* Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.181-188, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2006.01.001>.
42. HUANG, Mao Dong *et al.* High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, [s.l.], v. 63, n. 5, p.566-570, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.02.005>.

43. HUANG, Mao-dong *et al.* High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of nitrogen monoxide and its application for the determination of nitrate. **J. Anal. At. Spectrom.**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.163-168, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b916732c>.

44. HUARTE-MENDICOA, J.c.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J.. Nitrate and nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 1-2, p.39-42, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(96\)00193-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(96)00193-8).

45. KARAK, Tanmoy; BHAGAT, R.m.. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.2234-2252, nov. 2010, Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.010>.

46. KARAM, T.K. *et al.* Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.280-286, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000200017>.

47. KUMAR, Sangita D.; NARAYAN, G.; HASSARAJANI, S.. Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.784-788, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.012>.

48. LAPÔRTO, Mônica *et al.* Doses de nitrogênio no acúmulo de nitrato e na produção da alface hidropônica. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.539-543, set. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362012000300030>.

49. LEE, John D. **Química Inorgânica não tão Concisa**. São Paulo: Blucher, 1999. 544 p.

50. LESZCZYŃSKA, Teresa *et al.* Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. **Journal Of Food Composition And**

Analysis, [s.l.], v. 22, n. 4, p.315-321, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.025>.

51. LIMA, Juliana Domingues *et al.* Acúmulo de Compostos Nitrogenados e Atividade da Redutase no Nitrato em Alface produzida sob Diferentes Sistemas de Cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 3, p.180-187, jul. 2008. Trimestral.

52. LIMBURG, Tobias; EINAX, Jürgen W.. Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 107, p.31-36, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.016>.

53. MACHADO, Patrícia M. *et al.* Fluorine determination in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 105, p.18-24, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.08.001>.

54. MAZON, E. M. A. *et al.* Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.) [online]. 2005, vol.64, n.1, pp. 110-116. ISSN 0073-9855.

55. MELO FILHO, Artur Bibiano de; BISCONTINI, Telma Maria Barreto; ANDRADE, Sâmara Alvachian Cardoso. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.390-392, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612004000300015>.

56. MEREDDY, Ram *et al.* Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 215, p.311-317, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.132>.

57. MERUSI, Cristiana *et al.* Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal.

Food Chemistry, [s.l.], v. 120, n. 2, p.615-620, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.035>.

58. MIOR, Renata et al. Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace. **Talanta**, [s.l.], v. 106, p.368-374, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.004>

59. MOORCROFT, M; DAVIS, J; COMPTON, R.G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, [s.l.], v. 54, n. 5, p.785-803, 21 jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140\(01\)00323-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140(01)00323-x).

60. NOZAL, M.^{aj} del et al. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 881, n. 1-2, p.629-638, jun. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00271-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00271-5).

61. NUNES, Lidiane Cristina *et al.* Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 97, p.42-48, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.04.011>.

62. ORTNER, H. M *et al.* Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review). **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 57, n. 12, p.1835-1853, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0584-8547\(02\)00140-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0584-8547(02)00140-4).

63. OZBEK, Nil; AKMAN, Suleyman. Determination of fluorine in milk and water via molecular absorption of barium monofluoride by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 117, p.111-115, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.013>.

64. OZBEK, Nil; AKMAN, Suleyman. Determination of total sulfur concentrations in different types of vinegars using high resolution flame molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 213, p.529-533, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.007>.

65. OZBEK, Nil; AKMAN, Suleyman. Method development for the determination of fluorine in toothpaste via molecular absorption of aluminum mono fluoride using a high-resolution continuum source nitrous oxide/acetylene flame atomic absorption spectrophotometer. **Talanta**, [s.l.], v. 94, p.246-250, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.034.7>
66. ÖZTEKIN, Nevin; NUTKU, M.said; ERIM, F.bedia. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.103-106, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(01\)00287-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(01)00287-4).
67. ÖZCAN, M.M.; AKBULUT, M.. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.852-858, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.045>
68. PACHECO, Anália Lúcia Vieira *et al.* Mineral composition of pulp and production of the yellow passion fruit with organic and conventional fertilizers. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 217, p.425-430, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.068>.
69. PAGLIANO, E. *et al.* Quantification of nitrite and nitrate in seawater by triethyloxonium tetrafluoroborate derivatization—Headspace SPME GC–MS. **Talanta**, [s.l.], v. 85, n. 5, p.2511-2516, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.098>.
70. PEREIRA, Éderson R. *et al.* Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 96, p.33-39, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.04.001>.
71. PEREIRA, Éderson R. *et al.* Strontium mono-chloride — A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic**

Spectroscopy, [s.l.], v. 102, p.1-6, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.018>.

72. PÉREZ-LÓPEZ, Antonio J.; LÓPEZ-NICOLÁS, José Manuel; CARBONELL-BARRACHINA, Angel A.. Effects of organic farming on minerals contents and aroma composition of Clemenules mandarin juice. **European Food Research And Technology**, [s.l.], v. 225, n. 2, p.255-260, 18 jul. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0412-z>.

73. PÉREZ-OLMOS, R. *et al.* Sequential potentiometric determination of chloride and nitrate in meat products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.305-311, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(96\)00263-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(96)00263-4).

74. PINTO, D.A. *et al.* Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [s.l.], v. 16, n. 1, p.54-61, mar. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722014000100008>.

75. PIRES, Laís N.; BRANDÃO, Geovani C.; TEIXEIRA, Leonardo S.g.. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 225, p.162-166, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.019>.

76. PÔRTO, Mônica L. A. *et al.* Doses de nitrogênio no acúmulo de nitrato e na produção da alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, [s.i.], v. 30, n. 3, p.539-543, jul. 2012.

77. PRASAD, Surendra; CHETTY, Adrian Avinesh. Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.772-780, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.005>.

78. PRESIBELLA, Mayra Marinho *et al.* Comparison of chemical constituents of *Chamomilla recutita* (L.) rauschert essential oil and its anti-chemotactic activity.

Brazilian Archives Of Biology And Technology, [s.l.], v. 49, n. 5, p.717-724, set. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132006000600005>.

79. RAPOSO, Jorge L. et al. Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 63, n. 9, p.992-995, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.05.003>.

80. RESANO, M.; FLÓREZ, M.R.; GARCÍA-RUIZ, E.. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 88, p.85-97, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2013.06.004>.

81. SANTAMARIA, Pietro. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.10-17, 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2351>.

82. SANTINI, Alberto Oppermann; PEZZA, Helena Redigolo; PEZZA, Leonardo. Development of a sensitive potentiometric sensor for determination of fumaric acid in powdered food products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 134, n. 1, p.483-487, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.104>.

83. SILVA, S. R. S. e; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes mellitus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 3, n.3, p.13-142, 2010, Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1362/979>.

84. SOLAK, Ali Osman *et al.* A New Differential Pulse Voltammetric Method for the Determination of Nitrate at a Copper Plated Glassy Carbon Electrode. **Microchimica Acta**, [s.l.], v. 134, n. 1-2, p.77-82, 26 jun. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s006040070057>.

85. SOARES, Bruno M. *et al.* Simultaneous determination of iron and nickel in fluoropolymers by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 160, p.454-460, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.040>.
86. SOUZA, Sidnei de Oliveira *et al.* Determination of copper and mercury in phosphate fertilizers employing direct solid sampling analysis and high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 114, p.58-64, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2015.10.003>.
87. STERTZ, Sônia C. *et al.* Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na Região Metropolitana de Curitiba. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, p.200-207, jun. 2009.
88. STOBART, Tom. **Ervas, Temperos e Condimentos de A a Z**. Rio de Janeiro: Zahar, 2009.
89. RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.
90. TISCHNER, Rudolf; KAISER, Werner. Nitrate Assimilation in Plants. In: BOTHE, Hermann; FERGUSON, Stuart J.; NEWTON, William E. **Biology of the Nitrogen Cycle**. Oxford: Elsevier, 2007. Cap. 18. p. 283-301.
91. WELZ, Bernhard *et al.* **High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry**. Alemanha: Wiley-vch Verlag Gmbh & Co. Kga, 2005. 310 p.
92. WINTER, Carl K.; DAVIS, Sarah F. Organic Foods. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v. 71, n. 9, p.117-124, nov. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x>.
93. WORTHINGTON, Virginia. Nutritional Quality of Organic Versus Conventional Fruits, Vegetables, and Grains. **The Journal Of Alternative And Complementary**

Medicine, [s.l.], v. 7, n. 2, p.161-173, abr. 2001. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10,1089/107555301750164244>.

94. YOU, Peng-sheng; HSIEH, Yi-chih. A computational approach for crop production of organic vegetables. **Computers And Electronics In Agriculture**, [s.l.], v. 134, p.33-42, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2016.11.003>.

95. ZIELINSKI, Acácio Antonio Ferreira *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, [s.l.], v. 60, p.246-254, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09>.

96. ZHAO, J. et al. Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1313, p.2-23, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.039>.

8. APENDICE I – PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

Nesta seção estão organizados os procedimentos utilizados para o preparo dos padrões, modificadores químicos e reagentes empregados nos experimentos desenvolvidos durante a execução do trabalho.

8.1. Solução Padrão

- Padrão de $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$: foi pesado 0,303g de NaNO_3 e solubilizado no mínimo de água destilada para então ser transferido para balão volumétrico e avolumado para 50mL.

8.2. Modificadores Químicos

- Modificador de Ca^{2+} 1% (mv^{-1}): foi pesado 0,692g de CaCl_2 anidro, transferiu-se para balão volumétrico e solubilizado no mínimo de água necessária, então seu volume foi completo a 25mL.
- Modificador de Sr^{2+} 1% (mv^{-1}): pesado 0,760g de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, transferiu-se para balão volumétrico e foi solubilizado no mínimo de água necessária, então seu volume foi completo a 25mL.
- Modificador de Ba^{2+} 1% (mv^{-1}): foi pesado 0,444g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, transferiu-se para balão volumétrico e foi solubilizado no mínimo de água necessária, então seu volume foi completo a 25mL.

8.3. Soluções do Estudo de Interferentes

- Solução de 5% de carbono orgânico: foi pesado 2.50 de Glicose transferiu-se para balão volumétrico e foi solubilizado no mínimo de água necessária, então seu volume com completo a 50mL.
- Soluções de Carbono Inorgânico: para cada concentração estudada foi pesada a massa correspondente de Na_2CO_3 e solubilizado com água e seu volume aferido a 10mL.
- Solução 5% de $\text{P-H}_2\text{PO}_4^-$: foi pesado 7.74g de NaH_2PO_4 diretamente em tubo falcon de 50mL, solubilizado no mínimo de água necessário e então o volume foi aferido a 40mL.

- Solução 5% de S-SO₄²⁻: foi pesado 8.86g de Na₂SO₄ diretamente em tubo falcon de 50mL, solubilizado no mínimo de água necessário e então o volume foi aferido a 40mL.
- Solução 5% de Si-SiO₃³⁻: foi pesado 8.69g de Na₂O₃Si diretamente em tubo falcon de 50mL, solubilizado no mínimo de água necessário e então o volume foi aferido a 40mL.

8.4. Soluções Utilizadas no Teste de Precipitação

- Ácido Bórico 1% (mv⁻¹): foi pesado 0,4 g de ácido bórico em béquer com agitador magnético, solubilizado a quente, depois de esfriar a temperatura ambiente foi transferido quantitativamente para tubo falcon de 50mL e seu volume aferido a 40mL com água destilada.
- Ácido Clorídrico 1% (mv⁻¹): foi transferido 1.08 mL de ácido clorídrico 37% para tubo falcon de 50mL contendo 10mL de água destilada e depois seu volume foi aferido a 40mL com água destilada.