

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DE  
AMOSTRAS AGRONÔMICAS VISANDO DETERMINAÇÃO  
MULTIELEMENTAR POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA  
COM PLASMA INDUZIDO**

Fernando Vitorino da Silva\*

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração Química  
Analítica

Orientadora: Dra Ana Rita de Araujo Nogueira

\*Bolsista FAPESP

São Carlos

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586ap

Silva, Fernando Vitorino da.

Avaliação de procedimentos para preparo de amostras agronômicas visando determinação multielementar por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido / Fernando Vitorino da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2004. 115 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Preparação de amostra (Química analítica). 2. ICP-OES. 3. Determinação multielementar. 4. Figuras de mérito. 5. Amostras agronômicas. I. Título.

CDD: 543.02 (20<sup>a</sup>)

*“O único homem que não erra  
é aquele que nunca faz nada”*

*Roosevelt*

*Dedico este trabalho,*

*Aos meus amados pais  
pela vida, amor, sacrifícios  
e oportunidades*

*À Roberta,  
grande amor e companheira de minha vida que  
com carinho, amor e muita paciência contribuiu  
para que este trabalho fosse concluído*

---

## AGRADECIMENTOS

---

- Agradeço à Ana Rita pela orientação, incentivo, paciência, amizade e pronta disponibilidade dedicada ao longo do desenvolvimento deste trabalho e durante minha formação e permanência na Embrapa Pecuária Sudeste;
- Ao professor e amigo “Joca” pelos ensinamentos, sugestões e amizade;
- Aos grandes amigos que passaram pela “Família Gaia”: Barrinha, Cíntia, Cristina, Dani, Edivaldo, Elma, Gisele, Júlio, Letícia, Poliana, Sandro, Sílvia;
- Aos amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada: Andréa, Caio, Carla (cumadre), Carla, Cláudia, Clésia, Edilene, Edivan, Eveline, Flávia, Geórgia, Kelly, Lílian, Marcos, Mário, Sherlan, e Vladiana;
- Aos amigos Edivan e Marcos, pelas sugestões e preciosa ajuda na revisão desse manuscrito;
- Aos amigos de graduação Fabiana, Fábio e Samantha, pelo companheirismo e momentos de alegria em São Carlos;
- Aos amigos Nilson, Eduardo, Simone e Cristiane;
- Aos amigos do Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, Gilberto, Lourdes, Gilbertinho, Cristina e Carlos;
- Ao amigo Luiz Matteo da Embrapa Instrumentação Agropecuária;
- À Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio institucional e oportunidades oferecidas;
- Aos professores e amigos do Departamento de Química da UFSCar, pela formação e apoio institucional;
- Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação do PPG-DQ UFSCar, Ariane, Cristina e Luciani, pela atenção dada nos serviços burocráticos;

- Às funcionárias dos SRH da Embrapa Pecuária Sudeste, Silvia e Cássia pela atenção dada nos serviços burocráticos;
- Aos novos amigos da Varian Industria e Comércio Ltda;
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Científico pela bolsa concedido no início desse trabalho;
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida e apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho;
- A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Sinceramente

Muito Obrigado !!!

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>BEC</b>	Concentração equivalente ao sinal de fundo
<b>CCD</b>	“Charge-coupled device”
<b>ddp</b>	Diferença de potencial
<b>d.e.</b>	Diâmetro externo
<b>d.i.</b>	Diâmetro interno
<b>dpr</b>	Desvio padrão relativo
<b>FAAS</b>	Espectrofotometria de absorção atômica com chama
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido
<b>IR</b>	Infravermelho
<b>LOD</b>	Limite de detecção
<b>MW</b>	Microondas
<b>PEEK</b>	Poli-éter-éter-cetona
<b>PEP</b>	Pepsina
<b>PFA<sup>®</sup></b>	Teflon perfluoralcóxi
<b>TMAH</b>	Hidróxido de tetrametilamônio
<b>RCC</b>	Teor de carbono residual
<b>RF</b>	Rádio frequência
<b>SBR</b>	Razão sinal fundo
<b>SCD</b>	“Segmented-coupled device”
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>UHT</b>	“Ultra high temperature”
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIS</b>	Visível

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>TABELA 2.1</b> – Resumo do procedimento recomendado por MERMET para diagnóstico de um ICP OES.....	15
<b>TABELA 2.2</b> – Composição média do leite bovino (SILVA, 1997).....	17
<b>TABELA 3.3</b> – Características dos ICP OES VISTA PRO Radial e Axial. ....	34
<b>TABELA 3.4</b> – Parâmetros operacionais utilizados nos ICP OES avaliados....	34
<b>TABELA 3.5</b> – Resumo do procedimento de diagnóstico empregado para avaliação dos ICP OES axial e radial.....	37
<b>TABELA 3.6</b> – Programa de aquecimento empregado para realizar as digestões ácidas assistidas por microondas dos materiais de referência certificados em sistema pressurizado.....	38
<b>TABELA 3.7</b> – Parâmetros operacionais empregados no ICP OES axial para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn. ....	39
<b>TABELA 3.8</b> – Programa de aquecimento empregado para realizar as digestões ácidas assistidas por microondas em sistema pressurizado das amostras de leite. ....	40
<b>TABELA 3.9</b> – Condições operacionais empregadas no ICP OES com configuração radial para a determinação do teor de RCC nos digeridos obtidos. ....	45
<b>TABELA 3.10</b> – Programa de moagem utilizado. ....	46
<b>TABELA 3.11</b> – Condições operacionais empregadas no ICP OES axial para determinação de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn nas amostras de tecido vegetal moídas criogenicamente. ....	47
<b>TABELA 3.12</b> – Condições operacionais empregadas no ICP OES radial para determinação de Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn nas amostras de sucos de frutas digeridas em sistema de MW e através do sistema em fluxo avaliado.	48
<b>TABELA 3.13</b> – Compostos orgânicos utilizados na avaliação da eficiência de decomposição do sistema em fluxo.....	49
<b>TABELA 3.14</b> – Descrição dos sucos de frutas avaliados conforme rótulos dos produtos. ....	51

<b>TABELA 4.15</b> – Intensidade de emissão e razão Mg II/Mg I observada para os ICP OES com configurações axial e radial. ....	59
<b>TABELA 4.16.</b> Limites de detecção (LOD) e concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) para a linha de emissão Ni II 231,608 nm em meio de HNO <sub>3</sub> 0,14 mol L <sup>-1</sup> e em 1,000 mg L <sup>-1</sup> de Cr nas configurações axial e radial .....	62
<b>TABELA 4.17</b> – Valores de LOD e BEC para Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn em soluções contendo diferentes teores de C para configuração axial. Concentração expressa em µg L <sup>-1</sup> . ....	63
<b>TABELA 4.19</b> – Resultados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn baseados na matéria seca, usando os ICP OES com configurações axial e radial. ....	66
<b>TABELA 4.20</b> – Recuperação de Ca, Fe, Mg e Zn em solução de PEP 50 g L <sup>-1</sup> e TCA 100 g L <sup>-1</sup> . ....	68
<b>TABELA 4.22</b> – Teores de Ca, Fe, Mg e Zn para as amostras de leite in natura e leite integral UHT preparadas através dos procedimentos de precipitação ácida, hidrólise enzimática e digestão assistida por MW. ....	73
<b>TABELA 4.23</b> – Teores de Ca, Fe, Mg e Zn para a amostra de leite suplementada com Fe preparada através dos procedimentos de precipitação ácida, hidrólise enzimática e digestão assistida por MW. ....	75
<b>TABELA 4.24</b> – Recuperação dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn no precipitado obtido para o tratamento por precipitação ácida da amostra de leite enriquecida com Fe. ....	76
<b>TABELA 4.25</b> – Pressão gerada em linha no sistema em fluxo em função do diâmetro interno do capilar de sílica fundida e da vazão da solução transportadora. ....	78
<b>TABELA 4.26</b> – Teor de carbono residual para digeridos de uréia. ....	85
<b>TABELA 4.27</b> – Eficiência de decomposição para diferentes compostos orgânicos em meio HNO <sub>3</sub> 1,4 mol L <sup>-1</sup> . ....	90
<b>TABELA 4.28</b> – Eficiência de decomposição para diferentes compostos orgânicos em meio HNO <sub>3</sub> 1,4 mol L <sup>-1</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3,0 % v v <sup>-1</sup> . ....	90
<b>TABELA 4.29</b> – Eficiência de decomposição para as amostras de sucos de fruta. ....	91
<b>TABELA 4.30</b> – Efeito da temperatura na eficiência de decomposição de amostra de suco de abacaxi. ....	92

**TABELA 4.32** – Teores de Ca, K, Mg e Na determinados para os digeridos das amostras de sucos obtidos através do processamento no sistema em fluxo desenvolvido e através do uso de forno de MW. .... 95

**TABELA 4.33** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinados para as diferentes frações da amostra de folha de amora moída criogenicamente..... 97

**TABELA 4.34** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinados para as diferentes frações da amostra de folha de laranja moída criogenicamente..... 97

**TABELA 4.35** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinado para as diferentes frações da amostra de folha de goiaba moída criogenicamente..... 98

**TABELA 5.36.** Figuras de mérito dos ICP-OES com configurações axial e radial avaliados..... 104

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1** – Sistema ótico de ICP OES baseados na montagem utilizando círculo de Rowland e monocromador Czerny-Turner. (a) Leitura simultânea e (b) Leitura seqüencial..... 9
- FIGURA 2.2** – Representação esquemática do arranjo multicanal de um detector de estado sólido. .... 10
- FIGURA 2.3** – Monocromador com montagem Littrow/Echelle. Difração da luz monocromática nos elementos dispersores do monocromador. .... 11
- FIGURA 2.4** – Representação do ponto de vista do detector para o mapeamento da radiação dispersa em um sistema monocromador com montagem Littrow/Echelle..... 12
- FIGURA 2.7** – Interfaces plasma/sistema ótico em espectrômetros de emissão ótica com plasma induzido. (a) Interface “End-on gas” e (b) Interface “Shear-gas”..... 13
- FIGURA 2.6** – Modelos propostos para a micela da caseína do leite (CREAMER & MACGIBBON, 1996). (a) Modelo baseado no conceito de submicelas independentes ligadas por fosfato de cálcio e com  $\kappa$ -caseína orientada na superfície (b) Modelo baseado em um sistema dinâmico de moléculas de caseína interagindo com oclusões de complexos de fosfato de cálcio..... 20
- FIGURA 2.7** – Acoplamento do forno de microondas a sistemas em fluxo para preparo automatizado/mecanizado de amostras. A, amostra; F, fluxo transportador; B, bobina de digestão..... 25
- FIGURA 3.8** – Detector de estado sólido CCD empregado nos ICP OES avaliados. (a) arranjo bidimensional do CCD; (b) montagem do detector na câmara Peltier. .... 31
- FIGURA 3.9** – Representação esquemática do monocromador com montagem Littrow/Echelle utilizado nos ICP OES investigados. .... 33
- FIGURA 3.10** – Interfaces plasma/monocromador dos ICP OES investigados. (a) Configuração axial; (b) Configuração radial. .... 33
- FIGURA 3.11** – (a) Forno de microondas Milestone ETHOS 1600; (b) Arranjo dos frascos de digestão no rotor do forno de cavidade. .... 35

- FIGURA 3.12** – (a) Nebulizador com ranhura em V (V-Groove). 1 – Amostra e 2 – Gás de nebulização; (b) Câmara de nebulização Sturman Masters. 1 – Tubo de transferência da amostra; 2 – Suporte da câmara; 3 – Nebulizador V-Groove, e 4 - Dreno..... 39
- FIGURA 3.14** – Representação esquemática da conexão do capilar restritor de sílica fundida à saída do sistema em fluxo..... 45
- FIGURA 3.15** – Moinho criogênico e frascos de moagem empregados para pulverização das amostras de tecido vegetal..... 46
- FIGURA 3.16** – Diagrama do sistema em fluxo para decomposição de amostras sob altas temperatura e pressão. A, amostra; C, fluxo transportador ( $\text{H}_2\text{O} - 0,20 \text{ mL min}^{-1}$ ) e L, alça de amostragem ( $500 \mu\text{L}$ ). ..... 53
- FIGURA 3.17** – (a) Sistema em fluxo para decomposição de amostras orgânicas sob altas temperatura e pressão; (b) Válvula de amostragem; (c) Bobina digestora e capilares de resfriamento e restritor..... 54
- FIGURA 4.18.** Intensidade de emissão relativa observada para os ICP OES com configuração axial e radial. (a) Configuração axial; (b) Configuração radial. Valores monitorados a partir da ignição do plasma. .... 57
- FIGURA 4.19** – Perfis dos sinais de emissão das linhas Ba II 230,424 e 405,423 nm obtidos no ICP OES com configuração axial. (a) Resolução espectral na região UV; (b) Resolução espectral na região do VIS..... 60
- FIGURA 4.20** – Perfis dos sinais de emissão das linhas Ba II 230,424 e 405,423 nm obtidos no ICP OES com configuração radial. (a) Resolução espectral na região UV; (b) Resolução espectral na região do VIS..... 61
- FIGURA 4.21** – Superfície de resposta para avaliação das condições operacionais do ICP OES com configuração axial. Razão sinal ruído para (a) Ca e (b) Fe..... 69
- FIGURA 4.22** – Superfície de resposta para avaliação das condições operacionais do ICP OES com configuração axial. Razão sinal ruído para (a) Mg e (b) Zn. .... 70
- FIGURA 4.23** – Pressão imposta ao sistema em fluxo em função da vazão da solução transportadora e do comprimento do capilar restritor..... 79
- FIGURA 4.25** – Perfil de temperatura em função da diferença de potencial. Aplicação da ddp sobre a resistência de Fe/Cu. Vazão da solução transportadora =  $0,20 \text{ mL min}^{-1}$  ..... 81

- FIGURA 4.26** – Efeito do tempo de aquecimento a 100°C das soluções ácidas com CO<sub>2</sub> dissolvido sobre as intensidades dos sinais de emissão medidos para C. .... 84
- FIGURA 4.27** – Efeito do tempo de sonicação das soluções ácidas com CO<sub>2</sub> dissolvido sobre as intensidades dos sinais de emissão medidos para C..... 84
- FIGURA 4.28** – Sinal de emissão para linha C I 193,027 nm durante processamento das soluções contendo 0,20 % m v<sup>-1</sup> de C em meio aquoso e em meio de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>. .... 87
- FIGURA 4.29** – Concentração recuperada para solução de uréia processada no sistema em fluxo operando a 60 bar em diferentes temperaturas. Valor teórico = 1000 mg L<sup>-1</sup>. .... 88
- FIGURA 4.30** – Comparação entre as intensidades de emissão dos digeridos obtidos para solução de 5,0 % m v<sup>-1</sup> C em meio 0,014; 0,14 e 1,4 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> com o valor observado para solução 1000 mg L<sup>-1</sup> C em meio aquoso. .... 89
- FIGURA 4.32** – Sinal de emissão monitorado na linha Fe II 238,204 nm após o processamento da solução de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>. .... 93

## RESUMO

### **Avaliação de Procedimentos para Preparo de Amostras Agronômicas Visando Determinação Multielementar por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido**

A etapa de preparo da amostra sempre foi considerada um fator limitante a produtividade dentro da seqüência analítica devido ao elevado tempo demandado e a grande probabilidade da introdução de erros no resultado analítico. Propostas que venham representar economia em tempo e simplificação da manipulação da amostra são desejáveis. Foram investigados dois procedimentos para preparo de amostras agronômicas (leite bovino e sucos de fruta) visando determinação multielementar por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido. O procedimento para preparo do leite bovino baseou-se no emprego de enzima proteolítica (pepsina) e de agente precipitador de proteínas (ácido tricloroacético), para extração dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn. A aplicação dos reagentes avaliados proporcionou verificar a complexa interação do elemento Fe com as proteínas do leite. Determinação quantitativa a partir da simples precipitação das proteínas mostrou-se viável para Ca, Mg e Zn. Resultados obtidos para Fe, utilizando a precipitação das proteínas, confirmaram a forte ligação desse elemento com a micela de caseína. Em geral, a recuperação de Fe no precipitado de proteínas desnaturadas apresentou-se ao redor de 100 %. Para tratamento das amostras de sucos de frutas foi desenvolvido um sistema em fluxo que opera sob altas temperatura e pressão. Esse sistema mostrou eficiência de decomposição de aproximadamente 99 %, para diferentes fontes de carbono, quando as condições de 300 °C e 60 atm foram utilizadas. A utilização de ácido nítrico diluído ( $\text{HNO}_3$  1,4 mol L<sup>-1</sup>), associada ao uso de peróxido de hidrogênio como agente oxidante auxiliar ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3,0 % v v<sup>-1</sup>), não comprometeu a eficiência de decomposição quando temperatura de 300°C foi empregada. Os teores de Ca, K, Mg e Na encontrados nos digeridos das amostras de sucos foram concordantes às concentrações observadas para digestão em forno de MW com frascos pressurizados. O comportamento do sistema em fluxo frente a suspensões de tecido vegetal também foi investigado. Ao mesmo tempo foi avaliada a performance dos espectrômetros utilizados nas determinações. Foram comparadas as figuras de mérito, “warm-up time”, estabilidades em curto e longo períodos, resolução espectral, robustez e limite de detecção para as configurações axial e radial. Os experimentos realizados mostraram desempenho similar para ambas as configurações, sendo observadas diferenças apenas no “warm up time” e limite de detecção. Os resultados obtidos possibilitam concluir que a maioria das aplicações realizadas com a configuração radial pode ser implementada em um ICP OES com visão axial sem degradação do desempenho analítico.

## ABSTRACT

### **Evaluation of Procedures for Agricultural Samples Preparation for Multielemental Determination by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**

Sample preparation was always considered a limiting factor for sample throughput in the analytical sequence due to its high time consumption and great probability for error insertion in the results. Therefore, purposes to generate lower analysis time and, mainly, to make sample handling a feasible process are readily wished. Two procedures for preparation of agricultural samples (bovine milk and fruit juices) for multielemental determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry have been investigated. A procedure for bovine milk treatment based on use of proteolytic enzymes (pepsin) and protein precipitator agent (trichloroacetic acid) for extraction of Ca, Fe, Mg, and Zn was investigated. Application of these reagents allowed to check the complex interaction between Fe and milk proteins. Quantitative determinations from simple protein precipitation in solution showed good results for Ca, Mg, and Zn. Results obtained for Fe, using protein precipitation, confirmed the strong bound of this element with the casein micelle. In general, the recovery of Fe on protein precipitate was around 100 %. Taking into account the procedure for fruit juices treatment, a flow system operating at high temperature and high pressure was developed. This system presented decomposition efficiency around 99 % for different carbon sources when 300 °C and 60 bar was applied. As result, it can be suggested that the use of diluted nitric acid ( $\text{HNO}_3$  1.4 mol L<sup>-1</sup>) associated to hydrogen peroxide as auxiliary oxidant agent ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3.0 % v v<sup>-1</sup>), does not compromise the decomposition efficiency if high temperature is applied. Recoveries of Ca, K, Mg, and Na in the digestates obtained by the flow system were in agreement with those found in the closed vessel-MW assisted acid decomposition. The flow system behavior for vegetal tissues slurries decomposition was also evaluated. At the same time the spectrometers performance was evaluated. Figures of merit, warm up time, long and short term stability, spectral resolution, and limit of detection were compared for axially- and radially-viewed configurations. The performed experiments showed similar performance for both configurations, differing only on the warm up time and limit of detection. Taking into account the obtained results it is possible to infer that most of the applications performed with the radially-viewed configuration could be carried out in axially-viewed ICP OES's with no analytical performance degradation.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>8</b>
2.1. Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido – Figuras de Mérito.....	8
2.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína .....	16
2.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em Fluxo sob Altas Temperatura e Pressão .....	21
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>31</b>
3.1. Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido – Figuras de Mérito... 31	
3.1.1. Instrumentação.....	31
3.1.2. Soluções.....	35
3.1.3 Procedimento .....	36
3.1.4. Preparo da amostra .....	37
3.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína .....	38
3.2.1. Instrumentação.....	38
3.2.2. Soluções.....	40
3.2.3. Tratamento das amostras de leite.....	41
3.2.4 Amostras de leite .....	42
3.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em Fluxo sob Altas Temperatura e Pressão .....	43
3.3.1. Instrumentação.....	43
3.3.2. Soluções.....	48
3.3.3. Amostras de sucos de frutas e tecido vegetal .....	50
3.3.4. Diagrama de fluxo do sistema investigado.....	51
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>56</b>
4.1. Avaliação das figuras de mérito de ICP OES com configurações axial e radial	56
4.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína .....	67
4.2.1. Avaliação dos parâmetros instrumentais e efeitos de matriz no ICP OES... 67	
4.2.2. Análise do leite bovino – Uso dos reagentes TCA e PEP para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn .....	71
4.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em fluxo sob altas temperatura e pressão.....	77
4.3.1. Avaliação da configuração do sistema em fluxo .....	77
4.3.2. Eficiência de decomposição .....	83

<b>5. Conclusão.....</b>	<b>101</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>106</b>

# *INTRODUÇÃO*



## 1. Introdução

Freqüentemente, a etapa de preparo da amostra torna-se indispensável dentro da seqüência analítica envolvida em uma determinação instrumental. A escolha do procedimento a ser adotado para realização dessa tarefa está baseada principalmente na complexidade da matriz em análise e no comportamento químico do analito a ser determinado (KRUG, 2000). Analisando a seqüência analítica envolvida em uma determinação química, pode-se observar também que a etapa de preparo da amostra demanda grande parte do tempo total de análise, além de se apresentar como uma fonte para inserção de erros no resultado analítico (MAJORS, 1991). Para contornar essa característica desfavorável da etapa de preparo de amostra, procura-se adotar procedimentos nos quais a manipulação da amostra seja reduzida. Desse modo, são minimizadas a perda do analito e a contaminação da amostra.

Determinações elementares em amostras de natureza orgânica ou biológica requerem a transformação dos elementos de interesse da matriz em uma forma inorgânica simples. Nesse processo ocorre a oxidação da matriz, convertendo-se o carbono em  $\text{CO}_2$ , o hidrogênio em  $\text{H}_2\text{O}$ , e os compostos nitrogenados em  $\text{N}_2/\text{NO}_x$ . Os outros elementos permanecem em formas inorgânicas convenientes para análise (KRUG, 2000). Normalmente, são empregados diferentes agentes oxidantes combinados a diferentes fontes de aquecimento para promover a conversão da amostra em uma solução representativa (GOUVEIA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2001; FLORIAN & KNAPP, 2001). No entanto, associada a essa etapa da análise, normalmente observa-se a incompleta oxidação dos compostos orgânicos originais da amostra que, em função da técnica analítica a ser adotada, pode apresentar-se como um parâmetro que deterioram a exatidão e/ou precisão da determinação (LEVINE *et*

*al.*, 1999; MADER *et al.*, 1996; ADELOJU, 1989; WÜRFLES *et al.*, 1989a; WÜRFLES *et al.*, 1989b).

Procedimentos que envolvem o uso de ácidos concentrados têm sido preteridos para preparação da amostra em função dos aspectos relacionados a segurança do analista, consumo de reagentes, diluições extensivas e geração de resíduos (ARAÚJO *et al.*, 2002). Como atraente alternativa para contornar essa característica indesejável, propostas empregando reagentes diluídos e soluções extratoras para decomposição da amostra e extração dos analitos vêm sendo investigadas (TREVIZAN *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2002; STURUP & BUCHERT, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2002), respectivamente. Entretanto, a eficiência dessa estratégia está diretamente associada à natureza do analito e da amostra, às condições operacionais de temperatura e pressão e à técnica de detecção utilizada. O uso de ácidos diluídos proporciona diminuição significativa dos compostos orgânicos originais da amostra somente quando elevadas pressão e temperatura são empregadas. Essas condições potencializam a ação oxidante dos reagentes. Procedimentos visando a extração dos analitos ou determinação direta, sem extensiva manipulação da amostra, têm mostrado resultados exatos em situações nas quais o analito não se apresenta fortemente ligado à matriz da amostra. Para elementos trivalentes como Al e Fe, normalmente associados à fração de silicatos da amostra, essa estratégia não gera recuperações quantitativas.

Considerando-se o objetivo de alcançar uma economia no tempo demandado na análise, o desenvolvimento de procedimentos que possibilitem o tratamento automatizado/mecanizado da amostra também é relevante (ARRUDA & SANTELLI, 1997 e BURGUERA & BURGUERA, 1998). A utilização de sistemas em fluxo como uma ferramenta para minimizar a ação do operador no preparo da amostra, tem sido amplamente discutida e empregada

em trabalhos que se dedicam à automação do tratamento de amostras. Freqüentemente, a radiação microondas é utilizada para promover o aquecimento da amostra (ARRUDA & SANTELLI, 1997 e BURGUERA & BURGUERA, 1998). Entretanto outras fontes de energia, tais como ultravioleta (UV), infravermelho (IR), ultrassom e aquecimento condutivo, podem ser utilizadas para a mesma finalidade (GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996; GRÄBER & BERNDT, 1998; SWEILEH, 2000 e JACOB & BERNDT, 2002). A escolha da estratégia a ser utilizada dependerá da aplicação considerada. Baixo consumo de amostra e reagente(s), minimização de perdas por volatilização e contaminação das amostras, e a possibilidade de determinações em linha, podem ser citadas como as principais vantagens da utilização de sistemas em fluxo para o tratamento de amostras.

Considerando os métodos espectroanalíticos, particularmente a análise por emissão ótica com plasma induzido (ICP OES), pode-se observar que a exatidão e precisão da determinação analítica não são criticamente afetadas por compostos orgânicos remanescentes em solução (ALLAIN *et al.*, 1991). Entretanto, ao serem introduzidos no plasma, esses compostos orgânicos podem produzir emissões não-específicas ao analito de interesse, alterando a radiação de fundo medida em cada comprimento de onda (THOMPSON & BARNES, 1992). Conseqüentemente a sensibilidade do método em consideração é afetada (THOMSEN *et al.*, 2000).

Normalmente as emissões indesejáveis decorrentes da presença de compostos orgânicos residuais ou elementos concomitantes da amostra ocorrem nas proximidades da região mais fria do plasma, na qual processos de recombinação são favorecidos (THOMPSON & BARNES, 1992). Para equipamentos que possuem a tocha posicionada verticalmente ao sistema ótico (configuração radial), o adequado ajuste da potência do sistema de

radiofrequência, da vazão de nebulização e da altura de observação pode ser suficiente para eliminar ou minimizar o efeito negativo dessas emissões não-específicas sobre o sinal analítico (THOMPSON & BARNES, 1992; BRENNER & ZANDER, 2000). Em equipamentos com configuração axial, a eficiência da interface utilizada para remover a zona indesejável do plasma deve ser considerada (BRENNER & ZANDER, 2000). Baseando-se nesses argumentos pode-se inferir que o desempenho da determinação analítica por ICP OES está diretamente associado às condições operacionais e características do equipamento utilizado. Desse modo, para que sejam elucidadas possíveis interferências matriciais observadas na análise de amostras de diferentes naturezas, torna-se necessário realizar uma avaliação do desempenho do equipamento empregado (MERMET & POUSSEL, 1995).

Considerando esses aspectos, foram avaliadas as principais figuras de mérito que possibilitam avaliar o desempenho dos espectrômetros de emissão óptica com plasma induzido utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Os experimentos conduzidos tiveram por objetivo comparar o “warm-up time”, a estabilidade por curto e longo período, a resolução espectral, a robustez e o limite de detecção para as configurações axial e radial. Dessa forma foram obtidos subsídios para o entendimento de eventuais interferências matriciais ou espectrais sobre as intensidades dos sinais de emissão dos analitos.

Em relação aos procedimentos para preparo de amostra abordados neste trabalho, são descritos os resultados obtidos para duas estratégias que visam o tratamento de amostras de origem agrônômica (leite bovino e sucos de frutas) para posterior determinação multielementar por ICP OES. Para investigação das amostras de leite, solução enzimática e agente precipitador de proteínas foram empregados para extração dos analitos presentes na matriz em estudo. Através do uso desses reagentes extratores foi possível investigar a interação dos

analitos Ca, Fe, Mg e Zn com as proteínas do leite bovino. O procedimento para as amostras de sucos de fruta envolveu a utilização de um sistema em fluxo mecanizado/automatizado operando sob alta temperatura e alta pressão. A eficiência de decomposição apresentada pelo sistema desenvolvido foi avaliada em função dos teores de carbono residual nos digeridos obtidos. A aplicação do sistema em fluxo as suspensões de tecido vegetal preparadas em meio ácido também foi avaliada. As soluções resultantes da aplicação de ambos procedimentos foram analisadas empregando ICP OES como técnica analítica.

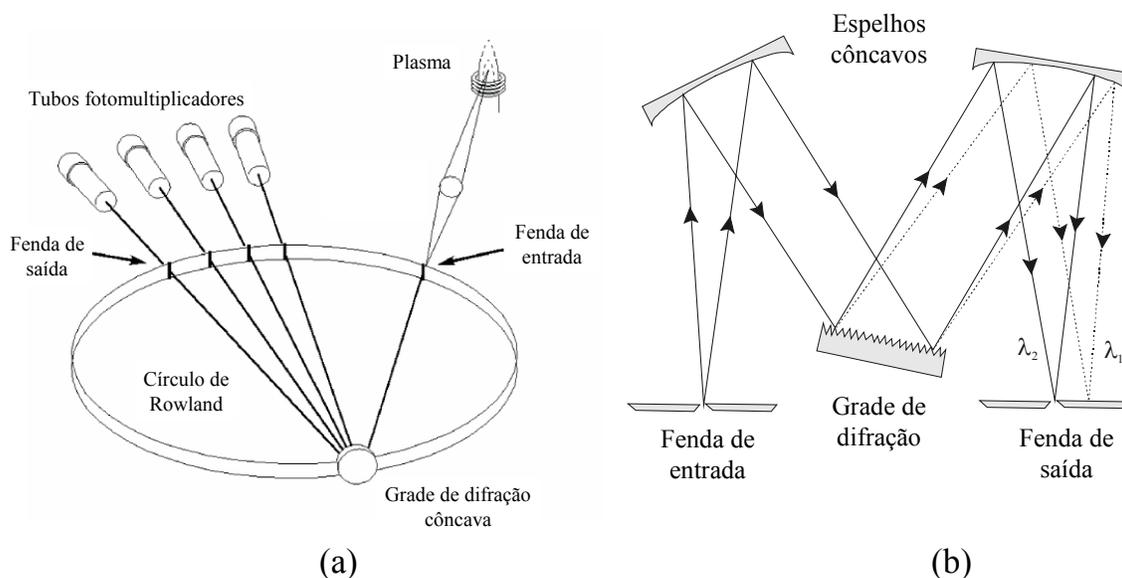
# *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

---

## 2. Revisão Bibliográfica

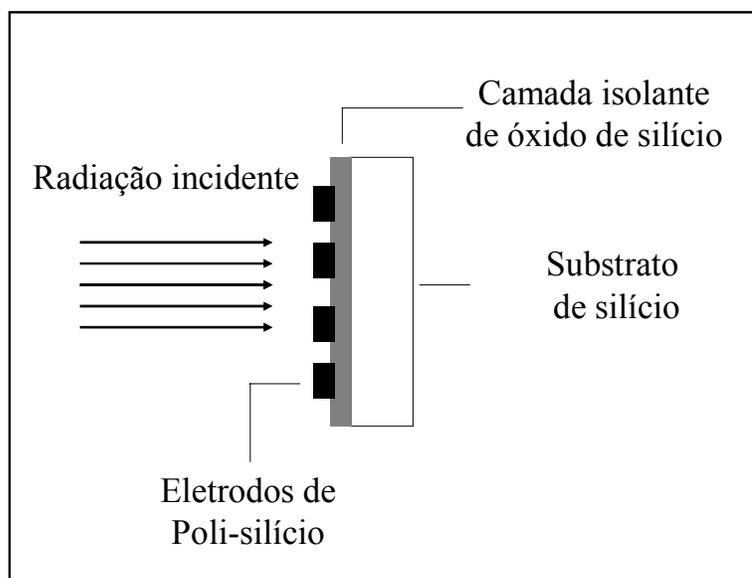
### 2.1. Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido – Figuras de Mérito

A espectrometria de emissão ótica com plasma induzido, desde sua proposta (GREENFIELD *et al.*, 1964; WENDT & FASSEL, 1965) tem mostrado grande potencial para análise multielementar nas mais diferentes áreas de pesquisa. Essa importante técnica analítica teve seu renascimento marcado na última década pelo desenvolvimento e utilização dos detectores de estado sólido e equipamentos com configuração axial que propiciaram uma maior flexibilidade e sensibilidade à determinação analítica (BARNARD *et al.*, 1993; DE GOY *et al.*, 1998; BRENNER e ZANDER, 2000). Os primeiros espectrômetros de emissão ótica com plasma induzido utilizavam tubos fotomultiplicadores para detectar a radiação emitida pelo plasma e pelos analitos. Múltiplos detectores poderiam ser dispostos em um arranjo denominado círculo de Rowland, possibilitando assim determinações simultâneas, ou estarem acoplados a um monocromador com varredura seqüencial do tipo Czerny-Turner para determinações seqüenciais (FIGURA 2.1). Como principais desvantagens advindas da utilização desses arranjos podemos citar a falta de flexibilidade para escolha de comprimentos de onda, uma vez que a disposição dos tubos fotomultiplicadores se encontrava estabelecida (configuração com círculo de Rowland), e o elevado tempo requerido em análises nas quais um grande número de elementos deveria ser determinado (monocromador Czerny-Turner) (MONTASER & GOLIGHTLY, 2002).



**FIGURA 2.1** – Sistema óptico de ICP OES baseados na montagem utilizando círculo de Rowland e monocromador Czerny-Turner. (a) Leitura simultânea e (b) Leitura seqüencial.

No início da década de 90, com o avanço da eletrônica e desenvolvimento de novos materiais na tecnologia de semicondutores, foi possível incorporar a um ICP OES um dispositivo multicanal para leitura simultânea das radiações eletromagnéticas emitidas por um plasma (BARNARD *et al.*, 1993). Essa tecnologia, denominada detector de estado sólido, se baseia na utilização de dispositivos de carga acoplada onde são observados arranjos multicanal de silício (Charged Coupled Device – CCD, ou Segmented Coupled Device – SCD) (DE GOY *et al.*, 1998). Esses arranjos consistem de “pixels” individuais definidos como seções de eletrodos onde são aplicados potenciais variados. Os eletrodos empilhados verticalmente, e dopados de poli-silício, sobrepõem o silício semiconductor fotossensível. Adicionalmente, esses eletrodos encontram-se separados da superfície de silício por uma camada isolante de óxido de silício (FIGURA 2.2) (DE GOY *et al.*, 1998).

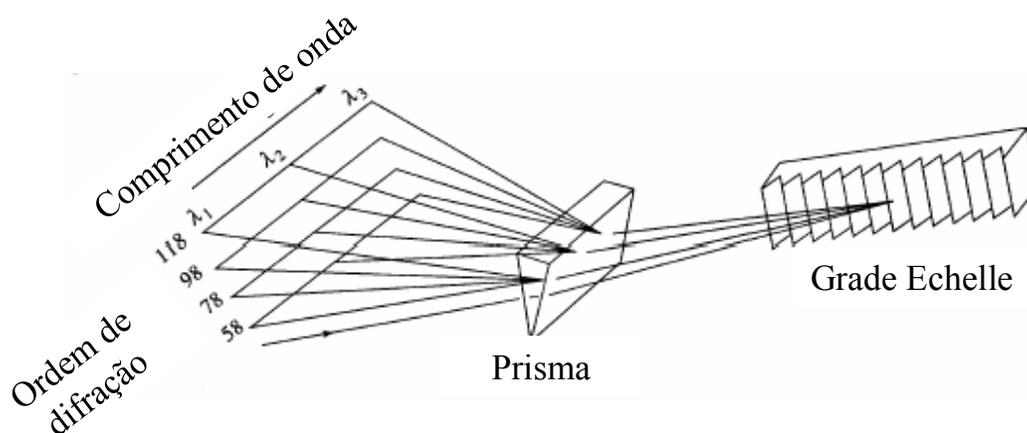


**FIGURA 2.2** – Representação esquemática do arranjo multicanal de um detector de estado sólido.

Quando uma diferença de potencial apropriada é aplicada nos diferentes eletrodos, o potencial eletrostático no silício se altera, produzindo zonas de potenciais negativos em sua vizinhança. Dessa forma, os fotoelétrons gerados pela radiação incidente podem ser coletados e armazenados nessas regiões pontuais da superfície do detector. O processo de medição da energia luminosa pode então ser resumido em quatro etapas: 1) absorção da energia do fóton incidente nos “pixels” individuais do detector para produção de elétrons; 2) transferência do pacote de cargas resultante; 3) conversão da carga gerada em um sinal de voltagem e, 4) amplificação do sinal gerado. Para redução do ruído eletrônico nesses dispositivos, de forma geral, temperatura de operação de aproximadamente  $-35^{\circ}\text{C}$  deve ser empregada (BARNARD *et al.*, 19993; DE GOY *et al.*, 1998).

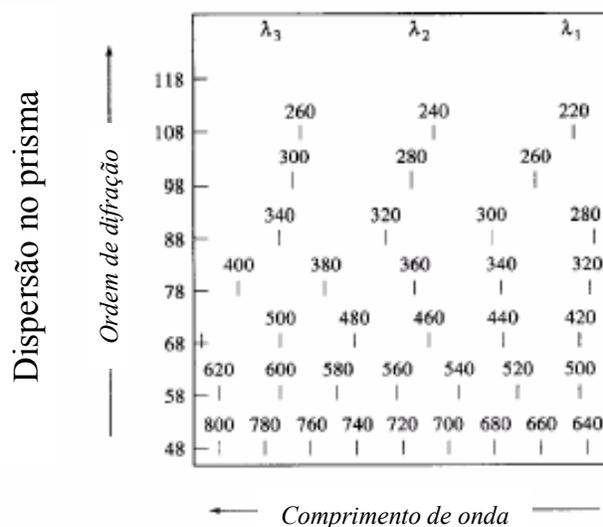
Incorporados com sucesso aos novos ICP OES, os detectores de estado sólido possibilitaram alcançar a faixa linear de resposta e a leitura simultânea de um amplo intervalo do espectro eletromagnético (BARNARD *et al.*, 1993; DE

GOY *et al.*, 1998). Devido ao caráter multicanal do detector de estado sólido, normalmente sua aplicação se encontra associada ao uso de monocromadores com montagem Littrow/Echelle (FIGURA 2.5).



**FIGURA 2.3** – Monocromador com montagem Littrow/Echelle. Difração da luz monocromática nos elementos dispersores do monocromador.

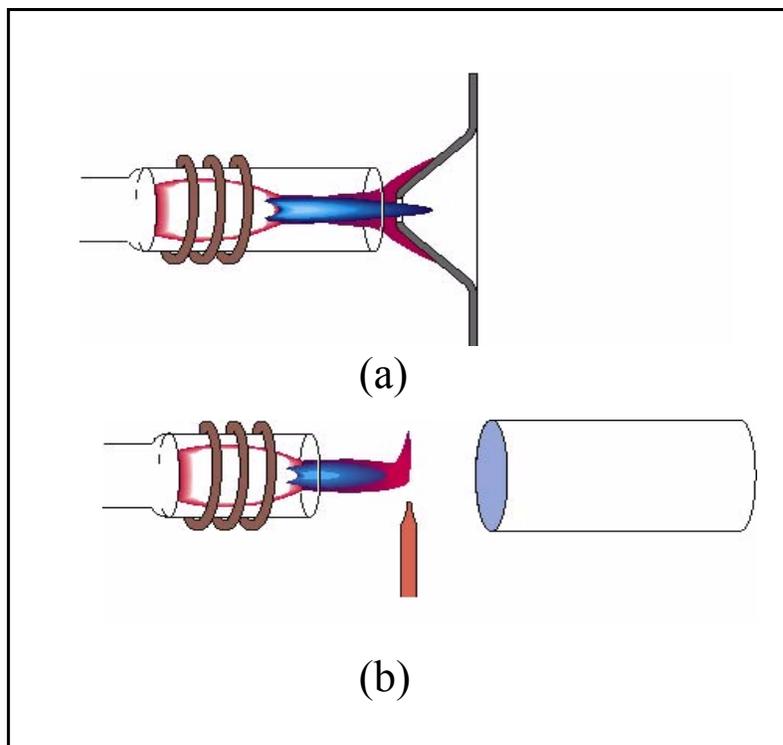
Na montagem Littrow/Echelle, pode ser observada a formação de um espectro bidimensional a partir da radiação eletromagnética emitida pelo plasma e pelos analitos. A radiação monocromática é separada em seus respectivos comprimentos de onda, assim como em suas ordens de difração, formando uma série de “linhas de radiações”. O posicionamento exato de uma superfície fotossensível formada por “pixels” individuais possibilita realizar o mapeamento bidimensional do “echellograma” gerado (KNOWLES, 2004) (FIGURA 2.4). Para a aquisição do sinal das linhas de emissão da região do UV-VIS em uma ampla faixa de comprimento de onda, assim como para regiões pontuais dessa faixa do espectro eletromagnético, encontram-se propostas na literatura diferentes configurações para o dispositivo de leitura (detector de estado sólido) (BARNARD *et al.*, 1993; DE GOY *et al.*, 1998; KNOWLES, 2004).



### Dispersão na grade Echelle

**FIGURA 2.4** – Representação do ponto de vista do detector para o mapeamento da radiação dispersa em um sistema monocromador com montagem Littrow/Echelle.

A realização de medidas empregando a configuração axial foi proposta na década de 70 (ABDALLAH *et al.*, 1976). Apesar do significativo ganho em sensibilidade alcançado, essa idéia apresentou baixa aceitação devido ao comprometimento do desempenho do equipamento com o agravamento das interferências espectrais. Sua disseminação ocorreu somente após o desenvolvimento de interfaces adequadas (“Shear-gas” e “End-on-gas”) que possibilitaram a eliminação das interferências associadas à região mais fria do plasma, onde predominam os processos de recombinação (FIGURA 2.5). Apesar desse desenvolvimento instrumental, pode-se dizer que o senso comum nessa área recomenda a configuração axial para aplicações nas quais a sensibilidade é crítica e a complexidade matricial é baixa. Nesse contexto, a melhor opção para amostras complexas é a utilização de ICP OES com configuração radial, porém esse ponto de vista geral necessita ser criticamente avaliado.



**FIGURA 2.7** – Interfaces plasma/sistema ótico em espectrômetros de emissão ótica com plasma induzido. (a) Interface “End-on gas” e (b) Interface “Shear-gas”.

IVALDI & TYSON (1995) mostraram que os efeitos causados por elementos facilmente ionizáveis nas medidas por ICP OES com configurações axial e radial podem ser minimizados à mesma extensão quando condições robustas são empregadas (elevada potência de RF e baixa vazão de nebulização). Os autores destacaram que a configuração axial associada a um eficiente sistema de introdução da amostra possibilita gerar baixos limites de detecção (LOD). Entretanto, afirmaram que a operação do plasma em condição não-robusta pode prejudicar a exatidão das medidas. DUBUISSON *et al.* (1997) apresentaram conclusões similares sobre o efeito de Na nas medidas realizadas por ICP OES com configurações axial e radial. Nesse trabalho, três espectrômetros que possuíam diferentes configurações foram investigados pelos autores.

Em trabalho apresentado por BRENNER *et al.* (1997) foi investigada a interferência de Ca e Na sobre a emissão de linhas iônicas e atômicas que possuíam diferentes energias de excitação. Os efeitos matriciais observados foram semelhantes em ambos arranjos axial e radial, sendo encontrada uma maior interferência causada por Ca comparativamente ao Na. Esse fato foi atribuído a maior energia necessária para dissociar a matriz da solução contendo elevada concentração de Ca.

GARCIA *et al.* (2001) mostraram que a determinação de Dy, Eu e Yb em digeridos de fezes de carneiro por ICP OES com configurações radial e axial não foi significativamente afetada por interferências matriciais quando o plasma é operado em condições robustas. A partir dos experimentos realizados, os autores puderam constatar que os efeitos de matriz foram minimizados com maior eficiência na configuração axial. Esse comportamento foi atribuído ao maior tempo de residência da partícula no plasma axial proporcionado pela utilização de uma tocha com tubo injetor de maior diâmetro interno do que o apresentado pela tocha do equipamento com configuração radial.

Analisando os trabalhos que investigam o desempenho da determinação com ICP OES com configurações axial e radial, pode-se perceber que a operação do plasma em condições robustas soluciona uma variada gama de problemas encontrados em diferentes aplicações analíticas (BRENNER & ZANDER, 2000). Portanto, pode-se dizer que o desafio do desenvolvimento de novos métodos por ICP OES se encontra na minimização dos efeitos matriciais sem que ocorra uma diminuição da sensibilidade. Para que esse objetivo seja alcançado, é necessário que se avalie o desempenho do espectrômetro a ser utilizado.

Uma seqüência de experimentos simples foi proposta por POUSSEL *et al.* (1993) para diagnosticar o desempenho de um ICP OES. Nesses experimentos foram empregadas determinadas linhas de emissão do espectro eletromagnético e soluções analíticas contendo os elementos Ba, Mg e Ni com a finalidade de

verificar a resolução espectral, eficiências de ionização e de excitação (robustez), estabilidade e limite de detecção apresentados pelo espectrômetro em avaliação. A escolha das linhas de emissão e elementos utilizados no procedimento de diagnóstico foi detalhadamente discutida pelos autores em diferentes trabalhos (MERMET, 1991; POUSSEL *et al.*, 1993; MERMET e POUSSEL, 1995) e pode ser resumidamente observada na TABELA 2.1.

**TABELA 2.1** – Resumo do procedimento recomendado por MERMET para diagnóstico de um ICP OES.

<i>Elemento</i>	<i>Figura de mérito</i>	<i>Teste</i>	<i>Característica da escolha do elemento</i>
Ba	Resolução UV	Perfil da linha Ba II 233 nm	Região do espectro eletromagnético onde se
	Resolução VIS	Perfil da linha Ba II 455 nm	localizam a maioria das linhas de emissões úteis
Mg	Eficiência de ionização/excitação (robustez)	Razão de intensidade das linhas Mg II 280 nm /Mg I 285 nm	Energias de excitação ( $E_{exc}$ ) das duas linhas são semelhantes (4,42 e 4,34 eV, respectivamente*)
	Estabilidade por curto período	dpr do sinal da linha Mg I 285 nm (n = 15)	A soma das energias de ionização ( $E_{ion}$ ) e $E_{exc}$ é igual a 12,0 eV (elementos cuja soma $11 <$
	Estabilidade por longo período	dpr do sinal da linha Mg I 285 nm (2 horas)	$E_{exc} + E_{ion} < 13$ eV, são suscetíveis a alterações na transferência de energia do plasma)
Ni	Sensibilidade	LOD para a linha Ni II 231 nm	Representa o comportamento da maioria das linhas iônicas
Qualquer elemento	Warm-up time	dpr do sinal analítico em função do tempo	Intensidade de emissão superior ao sinal de fundo

\*Os valores das energias de excitação das linhas Mg II e Mg I não levam em consideração os potenciais de ionização e de atomização, respectivamente.

Utilizando esse procedimento, diferentes equipamentos podem ser avaliados e comparados no que se refere ao desempenho analítico. A partir dos resultados obtidos pode ser feita uma classificação por notas entre 1 e 5, que representam as características do sistema: 1) necessita melhoramento; 2) satisfatória; 3) bom; 4) ótimo e 5) excelentes figuras de mérito (MERMET & POUSSEL, 1995).

Baseado nessa estratégia foram executados experimentos que visavam avaliar o desempenho de dois espectrômetros de emissão ótica com plasma induzido com configuração radial e axial, respectivamente. Essa avaliação crítica foi executada tendo em vista a obtenção de subsídios para o entendimento de potenciais interferências que poderiam surgir quando da execução das determinações multielementares propostas. Adicionalmente também foi avaliado o efeito da concentração de composto orgânico sobre a sensibilidade da determinação em cada configuração em estudo. Foram determinados os limites de detecção (LOD) e as concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) para diferentes teores de compostos orgânicos residuais (RCC).

## **2.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína**

A amostra de leite pode ser definida como um fluido biológico que contém todos os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de recém nascidos. Todos os tipos de leite são compostos por proteínas específicas, gorduras designadas para serem prontamente digeríveis, minerais, vitaminas e outros componentes que possuem papel importante no metabolismo animal (NEVILLE *et al.*, 1995). A biossíntese do leite ocorre na glândula mamária sob controle hormonal. Muitos dos constituintes são sintetizados nas células secretoras, porém alguns são agregados ao leite diretamente a partir do sangue e do epitélio glandular. Estima-se que o leite possua em torno de 100.000 constituintes distintos, embora a maioria deles não tenha ainda sido identificada

(SILVA, 1997). A composição genérica e aproximada do leite bovino é apresentada na TABELA 2.1.

**TABELA 2.2** – Composição média do leite bovino (SILVA, 1997).

	<i>Teor (g kg<sup>-1</sup>)</i>	<i>Varição (g kg<sup>-1</sup>)</i>
Água	873	855 – 887
Lactose	46	38 – 53
Gordura	39	24 – 55
Proteínas	32,5	23 – 44
Substâncias minerais	6,5	5,3 – 8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3 – 2,2
Outros	1,4	

Todos os componentes do leite encontram-se dissolvidos, dispersos ou emulsionados em água, formando um complexo equilíbrio em solução. A compartimentalização do leite influencia a absorção mineral pelo trato gastrointestinal. Diversos procedimentos empregando métodos para digestão, extração ou solubilização foram propostos para determinação do teor total das espécies inorgânicas presentes nas amostras de leite (BASSON & VAN STADEN, 1979; CAMPILLO *et al.*, 1998; NÓBREGA *et al.*, 1997; LA FUENTE *et al.*, 1997; LAMEIRAS *et al.*, 1998; RIVERO *et al.*, 2000). Entretanto, para aumento do conhecimento da atividade fisiológica dos minerais presentes no leite, a determinação do teor total não é suficiente (NEGRETTI DE BRÄTTER *et al.*, 1995; MICHALKE & SCHRAMMEL, 1998; BRÄTTER *et al.*, 1998). O estabelecimento das distintas interações químicas entre os componentes do leite deve ser considerado (NEVILLE *et al.*, 1995).

Espécies iônicas monovalentes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> estão presentes no leite principalmente na forma não complexada. Outras espécies, como Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, íons carbonatos, citratos e fosfatos, estão distribuídas entre os compartimentos estruturais do leite em uma forma altamente específica, gerando

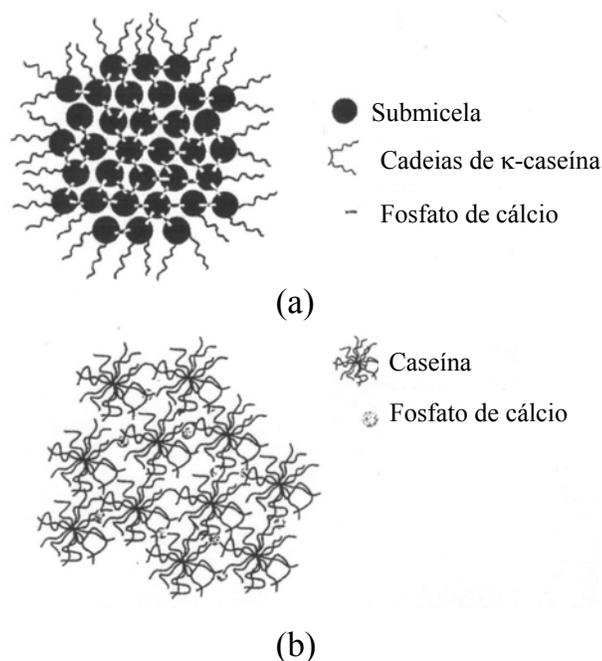
um complexo equilíbrio químico (NEVILLE *et al.*, 1995). O estudo da distribuição iônica nos compartimentos estruturais do leite normalmente é acompanhado pela utilização de métodos baseados em processos de separação física, como ultracentrifugação ou diálise empregando agentes quelantes apropriados (NEVILLE *et al.*, 1995; ZHANG & ALLEN, 1995; ROIG *et al.*, 1999). O uso de extração em fase sólida para estudos de especiação em amostras de leite também tem sido reportado (ABOLLINO *et al.*, 1998). Utilizando-se esses procedimentos, diferentes frações do leite podem ser isoladas e seu teor mineral quantificado empregando técnica analítica apropriada.

Recentemente, um procedimento empregando hidrólise enzimática foi proposto para extração de elementos menores e traços em matrizes de origem biológica (BERNEJO-BARRERA *et al.*, 1999). Através da utilização desse procedimento foi possível realizar a extração seletiva dos elementos associados com as proteínas que eram hidrolizadas pelas enzimas proteolíticas. A maior vantagem da hidrólise enzimática como procedimento alternativo, é a sua seletividade (BERNEJO-BARRERA *et al.*, 1999).

Entre os procedimentos que envolvem a determinação direta, podem ser citados os trabalhos empregando reagentes alcalinos (bases orgânicas) ou solução de aminas terciárias como meio para solubilização das amostras de leite (NÓBREGA *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2002). O preparo de suspensões de amostras biológicas em meio alcalino (hidróxido de tetrametilamônio, TMAH) tem apresentado características atraentes como a mínima manipulação da amostra, o baixo consumo de reagente e a possibilidade de obtenção de um meio relativamente não agressivo aos atomizadores eletrotérmicos, tais como tubos de grafite (MARTINS *et al.*, 2002). Associada à espectrometria de emissão óptica com plasma induzido, o emprego de TMAH também tem demonstrado resultados concordantes com processos de tratamento da amostra convencionais (RIBEIRO *et al.*, 2003). Soluções à base de aminas terciárias possibilitaram a

implementação da nebulização pneumática em técnicas espectroanalíticas como ICP OES, minimizando entupimentos do tubo injetor da tocha de quartzo, normalmente observados na introdução direta de amostras de leite ao plasma (SANTOS *et al.*, 2003). Perdas do analito por precipitação ou volatilização também não foram observadas na utilização desse reagente (NÓBREGA *et al.*, 1997).

A caseína é a principal proteína em leites de várias espécies. No leite bovino, a caseína ocorre como um complexo coloidal de proteínas e sais, principalmente sais de cálcio. Quando o Ca coloidal é removido, as submicelas  $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína são produzidas (FIGURA 2.6). Essas submicelas possuem diferentes números de íons fosfatos (CREAMER & MACGIBBON, 1996). O aglomerado das sub-unidades de caseína, fosfato de cálcio e algumas outras espécies iônicas na forma de micelas, conferem ao leite sua aparência branca. As micelas de caseína são susceptíveis à ação da maioria das enzimas proteolíticas (proteases) (OSTOA-SALOMA *et al.*, 1989). Suas ligações peptídicas podem ser quebradas pela ação específica de uma enzima proteolítica, gerando como produtos cadeias de peptídeos ou amino-ácidos solúveis, em função da extensão da hidrólise. Soluções ácidas em condições brandas também podem produzir alterações na estrutura secundária, terciária ou quaternária da caseína. Porém deve-se ressaltar que as ligações covalentes do esqueleto da cadeia polipeptídica não são clivadas. A maior consequência visual desse efeito está no decréscimo da solubilidade da caseína (formação de precipitados) (LEHNINGER, 1975).



**FIGURA 2.6** – Modelos propostos para a micela da caseína do leite (CREAMER & MACGIBBON, 1996). (a) Modelo baseado no conceito de submicelas independentes ligadas por fosfato de cálcio e com  $\kappa$ -caseína orientada na superfície (b) Modelo baseado em um sistema dinâmico de moléculas de caseína interagindo com oclusões de complexos de fosfato de cálcio.

Considerando os aspectos descritos nos parágrafos anteriores, o uso de reações de hidrólise enzimática e de precipitação em meio ácido foram escolhidos para investigar a associação do Ca, Fe, Mg e Zn com as proteínas de leite bovino. A enzima proteolítica empregada foi a pepsina (PEP), uma das proteases encontrada em maior quantidade no estômago. Essa enzima preferencialmente cliva ligações peptídicas que envolvem resíduos de aminoácidos aromáticos como metionina ou leucina, produzindo peptídeos e alguns aminoácidos livres (LEHNINGER, 1975). Dentre as enzimas, a pepsina possui comportamento distinto devido a seu baixo ponto isoelétrico e baixo valor de pH ótimo. O ácido tricloroacético (TCA), por outro lado, não apresenta

especificidade para quebra de ligações na proteína. Em solução, o ânion tricloroacetato ( $\text{Cl}_3\text{COO}^-$ ) interage com os grupos positivos da proteína ( $\text{R-NH}_3^+$ ), produzindo um precipitado branco de proteínas desnaturadas. Levando em consideração os distintos efeitos desses reagentes na proteína do leite bovino, as interações entre Ca, Fe, Mg, Zn e os compostos protéicos foram investigadas, monitorando-se o teor mineral na solução da amostra de leite após tratamento com os reagentes PEP e TCA.

### **2.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em Fluxo sob Altas Temperatura e Pressão**

A utilização de sistemas em fluxo possibilita a automação do preparo da amostra envolvido em uma análise química. Em procedimentos dessa natureza, a solução da amostra é inserida em um fluxo transportador (gás ou líquido) que a direciona a uma bobina reacional, na qual ocorrem os processos de decomposição ou extração, promovidos pela ação de agentes oxidantes e de uma fonte externa de energia (ARRUDA & SANTELLI, 1997 e BURGUERA & BURGUERA, 1998). Frequentemente são empregados ácidos minerais para destruir a fração orgânica da amostra e disponibilizar o analito em solução (KINGSTON & HASWELL, 1997 e KRUG, 2000). Na literatura encontram-se propostos trabalhos onde diferentes fontes de energia (ultravioleta, infravermelho, microondas e ondas ultrassônicas) são utilizadas na estratégia para preparo da amostra.

A região ultravioleta do espectro foi descoberta em 1801 pelo físico alemão John Ritter durante o desenvolvimento de experimentos fotoquímicos com cloreto de prata (DARWIN ON LINE, 2003 e BIBLIOTECA VIRTUAL, 2003). Na ocasião, foi observado que a velocidade da reação de escurecimento do cloreto de prata após exposição à luz visível violeta era superior à velocidade observada na exposição às demais luzes visíveis. Concluiu-se então, que um tipo de luz “quimicamente mais poderosa”, invisível aos olhos humanos, devia

situar-se além do extremo violeta do espectro eletromagnético (DARWIN ON LINE, 2003). A radiação ultravioleta é criada através dos mesmos processos que geram a luz visível, ou seja, pela transição de elétrons excitados que passam de níveis orbitais mais energéticos para níveis menos energéticos (GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996 e ACHTERBERG *et al.*, 2001). Lâmpadas fluorescentes de vapor de mercúrio e de arco elétrico geralmente originam grandes quantidades de radiação ultravioleta durante as descargas elétricas. Quando essas lâmpadas são usadas para fins puramente óticos, a radiação ultravioleta é devidamente filtrada (DARWIN ON LINE, 2003). Há muito tempo a radiação UV vem sendo empregada no desenvolvimento de sistemas de purificação de água e na obtenção de materiais e ambientes esterilizados (GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996). A ação da energia ultravioleta sobre compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos resulta na formação de um grande número de espécies intermediárias altamente reativas: radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), íon superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical organoperóxido e elétron hidratado ( $e^-_{\text{hid}}$ ) (GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996 e CAMPOS *et al.*, 2001). Essas espécies podem se auto-oxidar, assim como atuar sobre os demais compostos orgânicos presentes em solução. Portanto, a exposição de uma solução a uma fonte contínua e intensa de radiação ultravioleta, pode resultar em um atrativo processo de fotodegradação da matéria orgânica (ACHTERBERG *et al.*, 2001). A eficiência e a velocidade do processo de foto-oxidação estão diretamente relacionadas com a quantidade de espécies reativas geradas. Frequentemente, reagentes como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  são empregados como catalisadores da reação fotoquímica, facilitando o processo de oxidação da matéria orgânica da amostra (BENSON *et al.*, 1996; GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996; PEAT *et al.*, 1997; ACHTERBERG *et al.*, 2001 e CAVICHIOLLI & GUTZ, 2002).

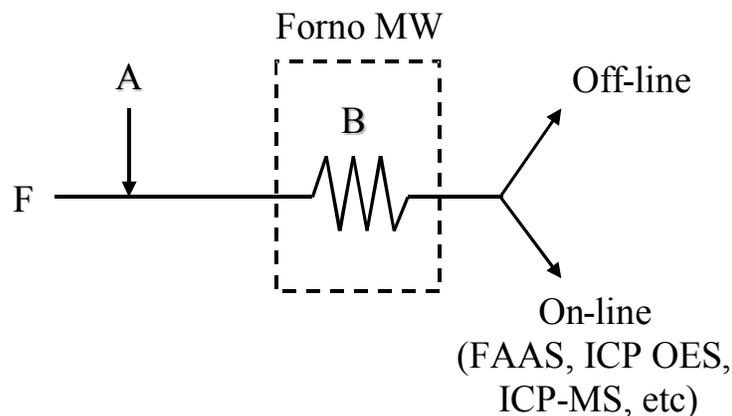
Diferentes autores têm empregado a radiação ultravioleta para o desenvolvimento de procedimentos em fluxo para o tratamento

automatizado/mecanizado de amostras de interesse ambiental (BENSON *et al.*, 1996; GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996; PEAT *et al.*, 1997; BRONK *et al.*, 2000; ACHTERBERG *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2001, AMINOT & KÉROUEL, 2001; CAVICHIOLLI & GUTZ, 2002) . Como resultado, nos procedimentos propostos, se observa a redução do teor de compostos orgânicos dissolvidos nas amostras e a disponibilização do analito para determinação. Através desses procedimentos, analitos como nitrogênio, fósforo e cobre podem ser quantificados com adequadas precisão e exatidão em amostras de água natural, em água de mar, em efluentes e em lixiviados de solo (BENSON *et al.*, 1996; GOLIMOWSKI & GOLIMOWSKA, 1996; PEAT *et al.*, 1997; BRONK *et al.*, 2000; ACHTERBERG *et al.*, 2001; AMINOT & KÉROUEL, 2001 e CAVICHIOLLI & GUTZ, 2002). Comparando-se a oxidação fotoquímica da matéria orgânica com procedimentos convencionais de decomposição ácida por via úmida, observa-se a diminuição no consumo de reagentes, minimizando a contaminação da amostra analisada. Entretanto, devido à baixa agressividade da condição experimental promovida pelo processo foto-oxidativo, decomposições incompletas podem ser observadas para soluções com elevado teor de compostos orgânicos dissolvidos (ACHTERBERG *et al.*, 2001). Desse modo, a aplicação da radiação ultravioleta fica limitada ao tratamento de amostras nas quais o teor de matéria orgânica não é tão elevado (aproximadamente 1,5 %) (CAVICHIOLLI & GUTZ, 2002). Adicionalmente, deve ser citado que o tempo demandado pelos processos foto-oxidativo são relativamente longos (~ 24 h), o que se torna um fator inconveniente no desenvolvimento de um procedimento analítico.

Ondas ultrassônicas e radiação infravermelha têm sido convenientemente empregadas no preparo de amostras em batelada (NASCENTES *et al.*, 2001; KORN, 2003; GOUVEIA *et al.*, 2000). Na literatura, as propostas que empregam ondas mecânicas para automação do processo de preparo da amostra em sua grande maioria envolvem técnicas de detecção que não são criticamente

afetadas pelos compostos orgânicos residuais (YEBRA *et al.*, 2004). A utilização da radiação IR para automação do preparo de amostras em sistemas em fluxo se encontra limitada devido à dificuldade de acoplamento da fonte energética à configuração de sistemas em fluxo.

De maneira geral, o forno de microondas pode ser incorporado ao sistema em fluxo de modo que a amostra possa ser coletada em frascos adequados para sua subsequente análise (determinação “off line”), ou conduzida diretamente ao detector acoplado em linha com a unidade de decomposição (determinação “on line”) (FIGURA 2.7). Técnicas instrumentais que utilizam amostragem contínua, como por exemplo, espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS) ou espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES), apresentam-se prontamente adequadas para o desenvolvimento dos procedimentos descritos na literatura (BURGUERA *et al.*, 1986; BURGUERA *et al.*, 1998; CARBONELL *et al.*, 1990; HASWELL & BARCLAY, 1992; DE LA GUARDIA, 1993; PICHLER *et al.*, 1999; FILI *et al.*, 2003). Sistemas de decomposição em fluxo acoplados a técnicas analíticas que utilizam amostragem discreta também foram propostos (ARRUDA *et al.*, 1997; BURGUERA J.L & BURGUERA M., 1998). O ponto chave desses trabalhos encontra-se na correta sincronização entre as etapas de preparo da amostra e da determinação analítica. Além do acoplamento da unidade de decomposição a detectores de emissão ótica ou de absorção atômica, o desenvolvimento de procedimentos de decomposição em fluxo com determinação em linha utilizando espectrofotômetros de absorção molecular também têm sido realizado com sucesso (PEREIRA FILHO *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000).



**FIGURA 2.7** – Acoplamento do forno de microondas a sistemas em fluxo para preparo automatizado/mecanizado de amostras. A, amostra; F, fluxo transportador; B, bobina de digestão.

Um dos trabalhos pioneiros na área de automação do preparo da amostra utilizando energia das microondas (MW) como fonte de aquecimento, foi proposto por BURGUERA *et al.* (1986). Nesse trabalho, foi avaliada a decomposição de amostras de sangue em um sistema em fluxo de zonas coalescentes simétrico, para determinação de cobre, ferro e zinco. Alíquotas da amostra de sangue “*in natura*” e de uma solução de ácidos diluídos eram simultaneamente inseridas na configuração proposta através de um injetor comutador. Amostra e solução ácida coalesciam em um ponto de confluência previamente à bobina de digestão, que estava localizada no interior da cavidade de um forno de microondas doméstico, na qual incidia uma potência de 700 W. A passagem da zona de amostra pela bobina de digestão, durante aproximadamente 1 min, promoveu a mineralização da matéria orgânica presente na amostra, que ao sair do reator podia ser diretamente nebulizada em FAAS para determinação dos elementos de interesse. Com esse procedimento, os autores minimizaram o tempo normalmente requerido para o preparo da amostra, bem como evitaram o emprego de ácidos concentrados no processo de decomposição. Entretanto, devido a esse último fator, a utilização do

procedimento proposto ficou limitada a amostras que não necessitavam de condições extremas de pressão/temperatura e concentração ácida para sua decomposição.

Para resolver essa limitação, os mesmos autores propuseram um sistema semi-automatizado para decomposição de amostras de fígado e rim humanos (BURGUERA *et al.*, 1988). Nesse sistema, seis amostras eram simultaneamente decompostas após adição manual de 1,0 g da amostra e 10 mL de ácido nítrico  $10 \text{ mol L}^{-1}$  em seis tubos de vidro posicionados em um frasco vedado localizado no interior da cavidade de um forno de microondas doméstico. Esse frasco vedado, por sua vez, estava conectado a uma trompa d'água responsável pela remoção dos vapores ácidos formados durante a incidência das microondas (8 min, 200 W). Decorrida a decomposição ácida, um sistema de válvulas coletava seqüencialmente alíquotas do digerido presente em cada tubo de vidro e as direcionava individualmente ao FAAS para a determinação de zinco ou cádmio. Resultados concordantes aos teores certificados foram obtidos para os materiais de referência fígado bovino e tecido de ostra, decompostos através do procedimento proposto. Como inconveniente, o presente sistema apresentava a necessidade da adição manual da amostra e do reagente oxidante após o término do tratamento das seis amostras presentes na cavidade do forno de microondas.

Para agilização do processo de amostragem na decomposição de amostras sólidas empregando sistemas em fluxo, trabalhos posteriores passaram a utilizar a introdução da amostra na forma de suspensão (CARBONELL *et al.*, 1990; HASWELL & BARCLAY, 1992; DE LA GUARDIA *et al.*, 1993; ARRUDA *et al.*, 1997; PEREIRA FILHO *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Considerando o aumento da complexidade da amostra a ser decomposta, para tornar possível a implementação da mineralização em fluxo, tornou-se necessário o emprego de solução ácida concentrada associada a sistemas nos quais era utilizada longa bobina de digestão ou etapa de parada de fluxos no interior da cavidade do forno de microondas. A utilização de soluções

ácidas concentradas gera como inconveniente uma excessiva pressão de vapor na bobina digestora. Isso ocorre devido aos produtos gasosos da decomposição da matéria orgânica presente na amostra. Para eliminar esse problema, reguladores de pressão (HASWELL & BARCLAY, 1992), fluxo transportador gasoso (PEREIRA FILHO *et al.*, 1998), válvulas de escape (OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000) e dispositivos de separação gás-líquido associados a banhos de resfriamento (CARBONELL *et al.*, 1990; DE LA GUARDIA *et al.*, 1993; ARRUDA *et al.*, 1997), têm sido incorporados à configuração dos sistemas propostos, possibilitando a adequada desgaseificação do fluxo que contém a amostra, e desse modo, a operacionalização da decomposição ácida em sistemas que operam à pressão ambiente.

Na maioria dos trabalhos, ácido nítrico tem sido empregado como agente oxidante devido ao seu alto grau de pureza e pequena interferência na maioria das técnicas instrumentais de medida (KRUG, 2000). Investigações conduzidas por WÜRFLES *et al.* (1989a e 1989b), comprovaram que efetiva oxidação da matriz orgânica pelo ácido nítrico é atingida utilizando-se frascos pressurizados e temperaturas superiores a 200°C. A partir dessa argumentação, pode-se observar que a eficiência da decomposição em sistemas em fluxo que utilizam a energia das microondas é limitada. Isso se deve ao fato da impossibilidade do emprego de condições extremas de temperatura e de pressão devido às baixas resistências térmica e mecânica apresentada pelo material que é utilizado para confeccionar as bobinas de decomposição. Normalmente são utilizados polímeros transparentes à energia das microondas que possuem baixa resistência quando elevados valores de temperatura e pressão são utilizados.

PICHLER *et al.*, (1999) propuseram uma alternativa para superar a limitação mecânica do polímero utilizado para confeccionar a bobina de decomposição. No sistema proposto, a bobina digestora encontrava-se no interior de um frasco pressurizado a 35 atm, que estava posicionado na direção de um guia de ondas. Desse modo, observava-se um equilíbrio de pressão entre

as paredes interior e exterior do polímero, durante a incidência da energia das microondas, evitando dessa forma o rompimento da bobina digestora pela evolução dos gases produzidos na oxidação da matéria orgânica. Utilizando esse arranjo, os autores puderam realizar decomposições de diferentes compostos orgânicos a 250°C e 35 atm, com eficiência superior a 75 %.

GRÄBER & BERNDT (1999), também investigaram a decomposição em fluxo sob altas temperatura e pressão. Um sistema derivado do nebulizador hidráulico de alta eficiência e de alta temperatura HT-HHPN (BERNDT & YANEZ, 1996) foi utilizado pelos autores. Nesse sistema uma bomba de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi utilizada para transportar, sob alta pressão, suspensões da amostra através de um capilar aquecido resistivamente e de um restritor posicionado no final do percurso analítico. Devido à elevada pressão imposta pelo restritor, o aquecimento da solução ácida acima da temperatura de ebulição observada para pressão ambiente, não provocou a formação de vapores dentro do capilar, sendo observado somente uma fase líquida. Os autores testaram diferentes materiais para confecção da bobina digestora, através do qual puderam comprovar o melhor desempenho para liga metálica composta por Pt/Ir. As potencialidades da aplicação desse procedimento às amostras orgânicas de diferentes naturezas foram descritas por GRÄBER & BERNDT (1999). Como principal vantagem dessa configuração, podem ser destacadas a ausência das limitações decorrentes da utilização de materiais transparentes à energia das microondas. Nesse sistema, o aquecimento é realizado de forma resistiva, possibilitando a utilização de ligas metálicas que possuem resistência mecânica superior àquela apresentada por materiais poliméricos. A reatividade química da liga em meio ácido, assim como sua pureza, são os fatores que devem ser considerados na escolha do material para confecção da bobina digestora. Empregando esse método, os autores efetuaram decomposições em fluxo em condições de temperatura e de pressão de 360°C e 296 atm, respectivamente, obtendo uma eficiência de decomposição próxima a

100 %. Em trabalho posterior foi proposta a digestão on-line acoplada ao ICP OES como técnica analítica (JACOB & BERNDT, 2002). Nesse trabalho foi utilizada a nebulização ultrassônica para remover os vapores gerados na decomposição da matéria orgânica, que poderiam extinguir o plasma.

Levando em consideração a discussão apresentada até o momento, foi investigado o desempenho de um sistema em fluxo que opera sob altas temperatura e pressão para decomposição de amostras de sucos de frutas. Nos experimentos realizados foi avaliada a possibilidade de empregar capilar metálico de aço inoxidável como material alternativo à liga de Pt/Ir, em dimensão física inferior à proposta original de GRÄBER & BERNDT (1999). A eficiência do sistema foi testada avaliando-se os teores de carbono residual após processamento de soluções preparadas a partir de diferentes fontes de carbono e das amostras diluídas em diferentes proporções no meio oxidante. Os efeitos sobre a eficiência de decomposição decorrentes da natureza e concentração do reagente oxidante utilizado foram avaliados. A eficiência do sistema em fluxo para decomposição de suspensões de amostras de tecido vegetal, preparadas em meio ácido também foi investigada. Previamente ao preparo dessas suspensões, foi implementada moagem criogênica do material vegetal com a finalidade de reduzir o tamanho de partícula da amostra. Experimentos visando investigar a segregação dos constituintes inorgânicos no material pulverizado também foram executados.

## *PARTE EXPERIMENTAL*

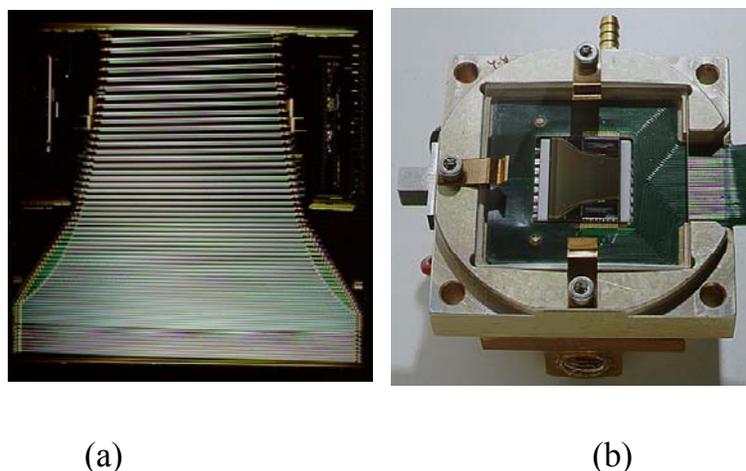


### 3. Parte Experimental

#### 3.1. Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido – Figuras de Mérito

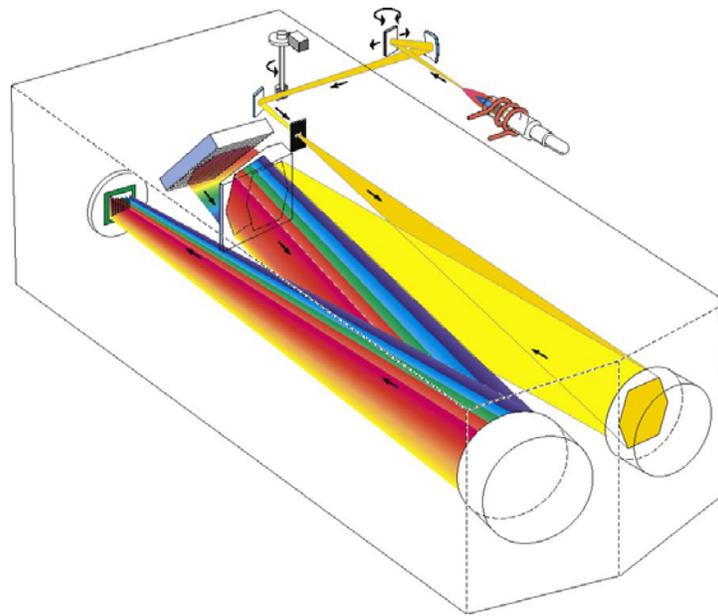
##### 3.1.1. Instrumentação

Todas as determinações multielementares realizadas neste trabalho foram executadas empregando dois espectrômetros de emissão ótica simultâneos com configurações axial e radial, VISTA PRO Axial e Radial (Varian, Mulgrave, Austrália). Os sistemas investigados estavam equipados com um detector de estado sólido do tipo CCD que permitia leituras no intervalo de comprimento de onda compreendido entre 167 e 785 nm. Nesse detector, aproximadamente 70.000 pixels encontravam-se arranjados de forma a promover completa cobertura das linhas de emissão compreendidas na faixa espectral citada. Dessa forma, aproximadamente 96 % das linhas de emissão analiticamente úteis poderiam ser monitoradas através dos sistemas avaliados (KNOWLES, 2004). O detector empregado e sua montagem na câmara Peltier podem ser observados na FIGURA 3.8.

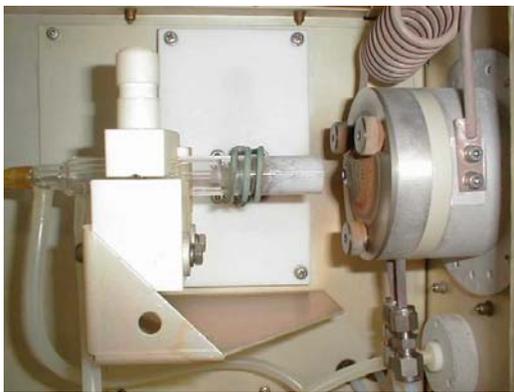


**FIGURA 3.8** – Detector de estado sólido CCD empregado nos ICP OES avaliados. (a) arranjo bidimensional do CCD; (b) montagem do detector na câmara Peltier.

Ambos equipamentos possuíam o sistema pré-ótico purgado com argônio a uma vazão de  $0,2 \text{ L min}^{-1}$ , para possibilitar leituras abaixo de  $190 \text{ nm}$ . O monocromador com montagem Littrow/Echelle de ambos equipamentos estava termostaticado à  $\sim 35^\circ\text{C}$  e purgado com argônio (FIGURA 3.9). O sistema axial empregou uma interface “End-on-gas” para eliminar a região mais fria do plasma, enquanto no sistema radial um dispositivo sob a forma de um bocal foi utilizado para purgar com Ar o ambiente ao redor do plasma (FIGURA 3.10). O mesmo sistema de introdução da amostra (nebulizador concêntrico do tipo K e câmara ciclônica) foi empregado em ambos equipamentos para que pudessem ser obtidos resultados comparáveis. Entretanto, o diâmetro interno do tubo injetor da tocha empregada no equipamento axial era de  $2,3 \text{ mm}$ , enquanto a tocha do equipamento radial apresentava tubo injetor com d.i. de  $1,4 \text{ mm}$ . A altura de observação usada na configuração radial foi ajustada de modo a se alcançar a maior razão sinal/fundo (SBR) para a maioria dos elementos avaliados. A zona de observação na configuração axial foi automaticamente selecionada pelo software de controle do equipamento usando como parâmetro de monitoramento da intensidade de emissão para o comprimento de onda Mn II  $257,610 \text{ nm}$ . A descrição detalhada de ambos espectrômetros e os parâmetros operacionais empregados são listados nas TABELAS 3.3 e 3.4, respectivamente. Todas os sinais de emissão foram integrados usando a tecnologia “automated adaptative integration time”, que se encontra implementada nos equipamentos Varian VISTA PRO. Nessa forma de aquisição dos dados é considerada a intensidade de emissão do comprimento de onda para o correto estabelecimento do tempo de integração. Todas as medidas foram realizadas empregando 2 “pixels” para cada comprimento de onda.



**FIGURA 3.9** – Representação esquemática do monocromador com montagem Littrow/Echelle utilizado nos ICP OES investigados.



(a)



(b)

**FIGURA 3.10** – Interfaces plasma/monocromador dos ICP OES investigados. (a) Configuração axial; (b) Configuração radial.

**TABELA 3.3** – Características dos ICP OES VISTA PRO Radial e Axial.

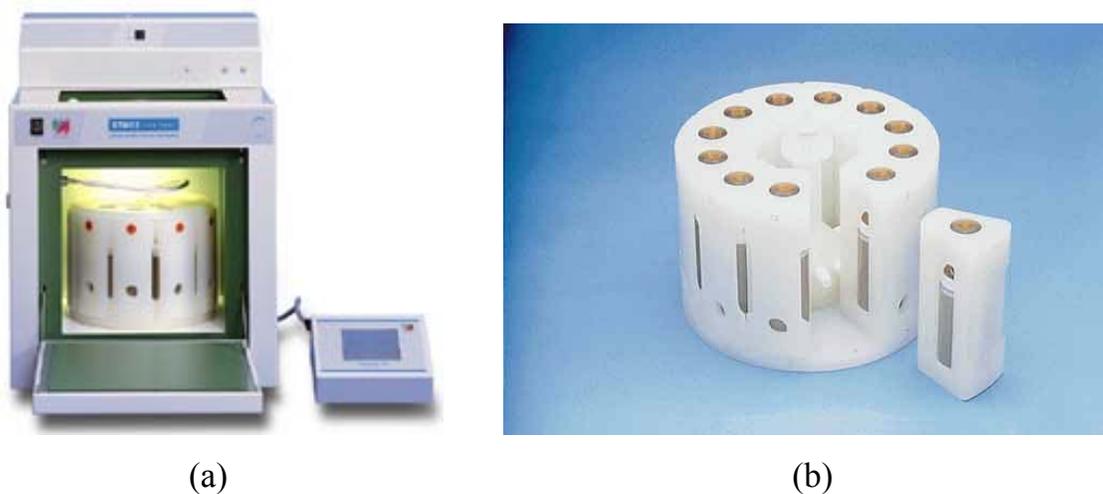
<i>Característica</i>	<i>VISTA PRO Axial e Radial</i>
Gerador de radiofrequência	40 MHz, Free running
<i>Sistema ótico</i>	
Monocromador	Grade Echelle + prisma dispersão cruzada de CaF <sub>2</sub>
Densidade de ranhuras da grade	95 ranhuras mm <sup>-1</sup>
Plano focal	400 mm
Fenda de entrada	Altura = 29 µm e comprimento = 51 µm
<i>Sistema de introdução da amostra</i>	
Nebulizador	Concêntrico do tipo K
Câmara de nebulização	Ciclônica de simples passo
Detector	CCD refrigerado a -35°C por sistema Peltier ~ 70.000 pixels arranjados de forma não linear intervalo espectral de leitura ~ 167-785 nm
Diâmetro interno do tubo injetor da tocha	2,3 mm (axial) e 1,4 mm (radial)

**TABELA 3.4** – Parâmetros operacionais utilizados nos ICP OES avaliados.

<i>Parâmetro operacional</i>			
Potência RF (kW)		1,2	
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )		15	
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )		1,5	
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )		0,8	
Amostra (mL min <sup>-1</sup> )		0,8	
Altura de observação (mm)*		13	
Linhas de emissão (nm)	Al I 396,152	Ca II 317,937	Mg II 280,264
	Ar I 404,442	Cd II 226,502	Mg I 285,208
	Ar I 404,597	Co II 228,619	Mn II 257,610
	As I 188,980	Cr II 267,716	Ni II 231,604
	Ba II 230,424	Cu I 324,760	Se I 196,026
	Ba II 455,403	Fe II 238,204	Zn II 206,204

\*Somente para configuração radial; I e II– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

Digestão ácida assistida por radiação microondas dos materiais de referência certificados foi realizada empregando um forno do tipo cavidade (ETHOS 1600, Milestone, Sorisole, Itália) (FIGURA 3.11), equipado com 10 frascos fechados de teflon PFA<sup>®</sup> (perfluoralcóxi) que possuía um mecanismo calibrado para alívio de pressão e re-vedação (pressão máxima de operação de 110 atm). Os frascos ficavam posicionados sobre um rotor que realizava movimentos alternados no interior da cavidade do forno de MW, durante a execução do programa de aquecimento. Antes do uso, todos os frascos de PFA<sup>®</sup> foram desmineralizados em banho HNO<sub>3</sub> 10 % v v<sup>-1</sup> e lavados com água desionizada. A potência aplicada durante execução do programa de aquecimento foi controlada monitorando-se a temperatura em um único frasco através de um sensor de fibra ótica.



**FIGURA 3.11** – (a) Forno de microondas Milestone ETHOS 1600; (b) Arranjo dos frascos de digestão no rotor do forno de cavidade.

### 3.1.2. Soluções

Solução multielementar contendo 5,0 mg L<sup>-1</sup> de Ba e Mg, e 10 mg L<sup>-1</sup> de Ni em meio de HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup> foi utilizada para avaliar as figuras de mérito warm-up time, estabilidade por longo e curto período, robustez, resolução

espectral e limite de detecção (LOD) para Ni II 231 nm, apresentadas por cada configuração. Para avaliar o efeito de matriz na sensibilidade e seletividade foram empregadas: solução contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de Ni em meio de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cr e soluções multielementares contendo 20 mg L<sup>-1</sup> de Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn na presença de 10, 100, 1000 ou 10.000 mg L<sup>-1</sup> C sob forma de uréia, respectivamente. Todas as soluções analíticas foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque contendo 1.000 ou 5.000 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento (Spex Sample Preparation, Metuchen, NJ, EUA) utilizando água destilada e desionizada em sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA) e HNO<sub>3</sub> destilado abaixo do ponto de ebulição (Milestone, Sorisole, Itália) como solventes. Uréia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, Reagen, Brasil) foi empregada como fonte de carbono para investigação dos efeitos do carbono residual sobre a sensibilidade (GOUVEIA *et al.*, 2001).

A curva analítica: Branco analítico – HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>; Solução de referência 1 – 2,00 mg L<sup>-1</sup> Cu, Fe, Mn e Zn + 20,0 mg L<sup>-1</sup> Mg + 50,0 mg L<sup>-1</sup> Ca; e Solução de referência 2 – 4,00 mg L<sup>-1</sup> Cu, Fe, Mn e Zn + 40,0 mg L<sup>-1</sup> Mg + 100 mg L<sup>-1</sup> Ca, foi empregada para determinar a precisão e exatidão das medidas executadas em ambas as configurações axial e radial.

### 3.1.3 Procedimento

Os testes executados para diagnóstico foram baseados em experimentos proposto por MERMET (1991), POUSSSEL *et al.* (1993) e MERMET & POUSSSEL (1995). Esses experimentos são resumidamente apresentados na TABELA 3.5.

**TABELA 3.5** – Resumo do procedimento de diagnóstico empregado para avaliação dos ICP OES axial e radial.

<i>Figura de mérito</i>	<i>Parâmetro</i>
Resolução espectral na região do UV	Perfil da linha de emissão Ba II 230 nm
Resolução espectral na região do VIS	Perfil da linha de emissão Ba II 455 nm
Robustez	Razão Mg II 280 nm/Mg I 285 nm
Estabilidade em curto período	dpr para sinal de emissão da linha Mg I 285 nm (n = 15)
Estabilidade em longo período	dpr para sinal de emissão da linha Mg I 285 nm (n = 8; t = 2 h)
Sensibilidade	LOD para a linha de emissão Ni II 231 nm
Tempo de “warm-up”	drp para os sinais de emissão para Ar, Ba e Mg

A concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e o limite de detecção (LOD) foram calculados conforme sugerido pela IUPAC (1978) e THOMSEN et al. (2000):

$$\text{BEC} = C_{sr}/\text{SBR} \quad \text{SBR} = (I_{sr} - I_{bco})/I_{bco}$$

$$\text{LOD} = (3 \times \text{BEC} \times \text{dpr})/100$$

Onde :  $C_{sr}$  – concentração da solução de referência multielementar (20 mg L<sup>-1</sup>); SBR – razão sinal fundo;  $I_{sr}$  e  $I_{bco}$  – intensidade de emissão para solução de referência multielementar e solução do branco (HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>), respectivamente, e dpr – desvio padrão relativo de 10 medidas da solução do branco.

#### 3.1.4. Preparo da amostra

Massas de 250 mg de dois materiais de referência certificados, NIST 1577b – Bovine Liver, e NIST 1515 – Apple Leaves (National Institute of Technology, Gaithersburg, MD), foram digeridas empregando 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e destilado abaixo do ponto de ebulição, e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %

v v<sup>-1</sup>. Os digeridos foram diluídos conforme concentração da curva analítica descrita na Seção 3.1.2. O programa de aquecimento implementado está mostrado na TABELA 3.6.

**TABELA 3.6** – Programa de aquecimento empregado para realizar as digestões ácidas assistidas por microondas dos materiais de referência certificados em sistema pressurizado.

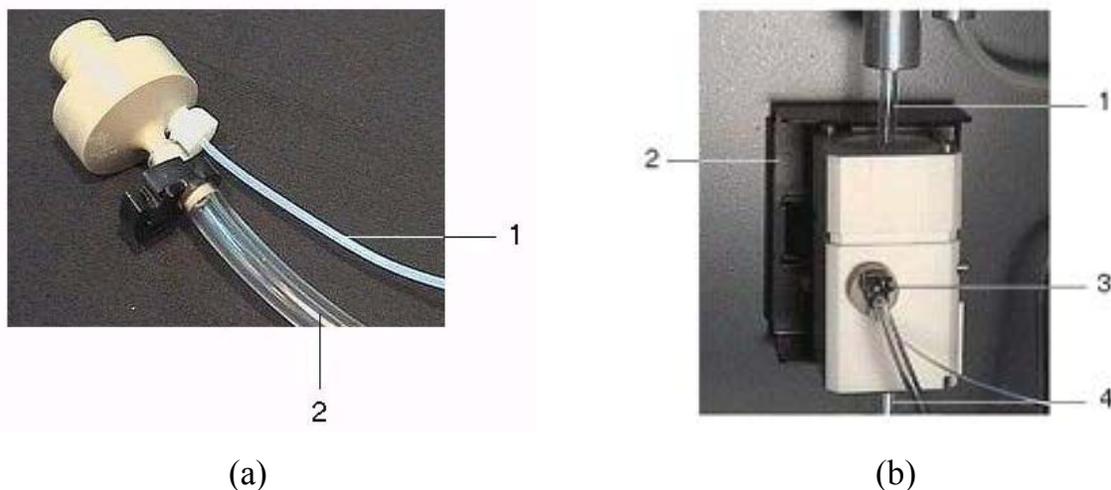
<i>Etapa</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Potência (W)</i>	<i>T (°C)</i>
1	2,0	250	100
2	2,0	0	100
3	5,0	250	120
4	4,5	400	180
5	4,5	650	220
6*	5,0	0	-

\*Etapa de ventilação.

## 3.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína

### 3.2.1. Instrumentação

O espectrômetro de emissão ótica com configuração axial descrito na Seção 3.1.1 foi empregado para realização das medidas de Ca, Fe, Mg e Zn nas diferentes soluções resultantes da amostra de leite. Cabe ressaltar que para execução das determinações propostas, tornou-se necessário trocar o sistema de introdução da amostra composto por câmara ciclônica e nebulizador concêntrico, devido à inerente baixa tolerância desse sistema à presença de materiais particulados na amostra. Dessa forma, visando evitar entupimento do nebulizador, e por conseqüência constantes paradas para limpeza do sistema de introdução da amostra, optou-se por utilizar o nebulizador com ranhura em V (“V-Groove”) e câmara de nebulização Sturman Master (FIGURA 3.12). As condições operacionais empregadas podem ser visualizadas na TABELA 3.7.



**FIGURA 3.12** – (a) Nebulizador com ranhura em V (V-Groove). 1 – Amostra e 2 – Gás de nebulização; (b) Câmara de nebulização Sturman Masters. 1 – Tubo de transferência da amostra; 2 – Suporte da câmara; 3 – Nebulizador V-Groove, e 4 - Dreno.

**TABELA 3.7** – Parâmetros operacionais empregados no ICP OES axial para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn.

<i>Parâmetro operacional</i>	
Potência RF (kW)	1,1
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,8
Amostra (mL min <sup>-1</sup> )	0,8
Câmara de nebulização	Sturman Masters
Nebulizador	V-Groove
Linhas de emissão (nm)	Ca II 315,882
	Fe II 238,204
	Mg I 285,208
	Zn II 206,204
	Y II 371,029

I e II– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente

As digestões ácidas das amostras de leite e do material de referência certificado (NIST 8435 – Whole Milk Powder), assistidas por radiação microondas, também foram executadas empregando o forno Milestone ETHOS 1600, descrito na Seção 3.1.1. O programa de aquecimento implementado é mostrado na TABELA 3.10.

**TABELA 3.8** – Programa de aquecimento empregado para realizar as digestões ácidas assistidas por microondas em sistema pressurizado das amostras de leite.

<i>Etapa</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Potência (W)</i>	<i>T (°C)</i>
1	1,0	250	100
2	1,0	0	100
3	3,0	250	120
4	5,0	400	180
5	5,0	600	220
6*	5,0	0	-

\*Etapa de ventilação.

Ultracentrifuga refrigerada (Beckman J2-21, EUA), equipada com rotor para 8 frascos foi utilizada para separar os precipitados de proteína desnaturada gerados nos tratamentos por precipitação ácida e hidrólise enzimática. Temperatura de 10°C foi empregada durante as centrifugações de modo a evitar que o aquecimento do rotor pudesse afetar os resultados analíticos. Banho termostaticado (FANEN, Brasil) também foi empregado no procedimento de hidrólise enzimática.

### 3.2.2. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água desionizada purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> como solvente (resistividade 18 MΩ cm). Três procedimentos (precipitação ácida, hidrólise enzimática e digestão ácida assistida por radiação MW) foram empregados para investigar as interações químicas dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn com as

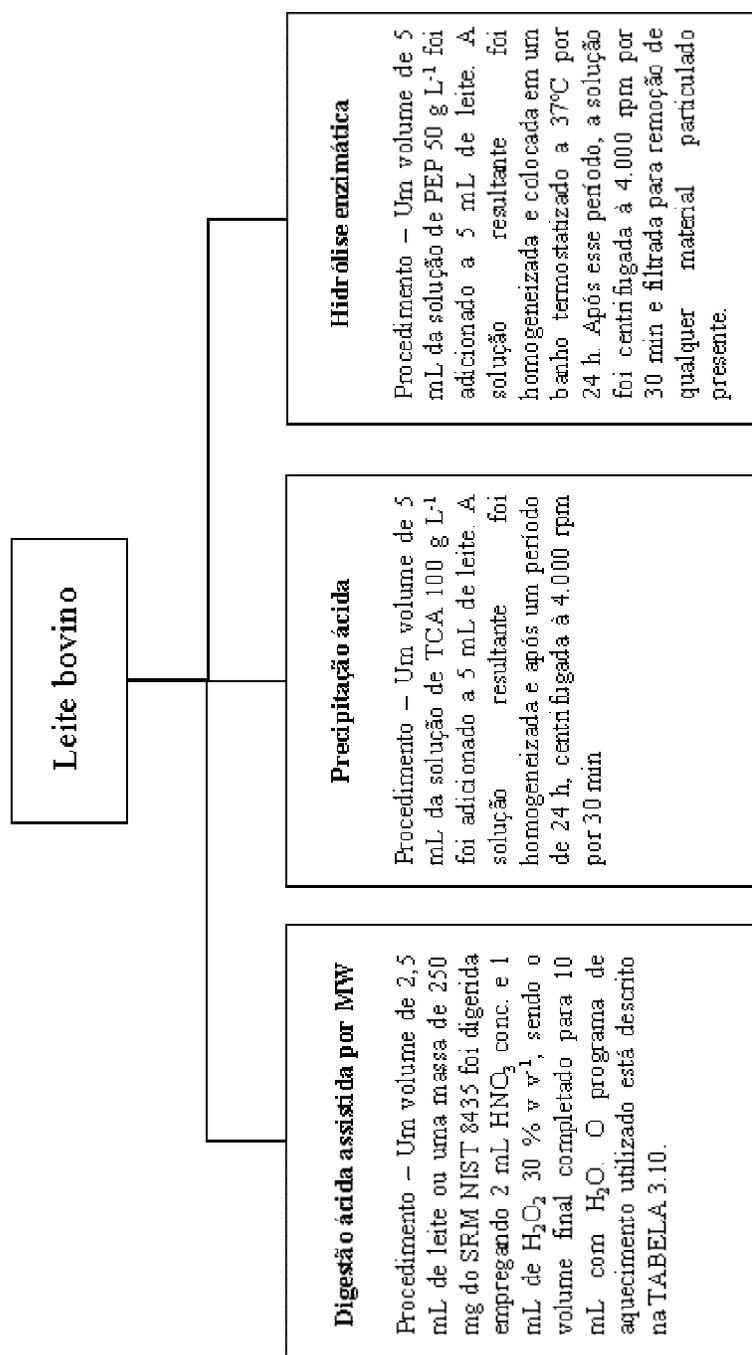
proteínas do leite bovino. Nos procedimentos que envolviam a precipitação ácida e a hidrólise enzimática, foram empregadas solução de ácido tricloroacético (TCA) 100 g L<sup>-1</sup> (Nuclear, Brasil) e solução de pepsina (PEP) (Nuclear, Brasil) 50 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. A solução enzimática foi preparada em meio de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Para o procedimento de hidrólise enzimática, foi também avaliado o efeito da enzima proteolítica papaína sobre as amostras de leite. Uma mistura contendo 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e destilado abaixo do ponto de ebulição, e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % v v<sup>-1</sup>, foi empregada como solução oxidante na digestão assistida por MW.

Para os testes de adição e recuperação de Ca, Fe, Mg e Zn no meio dos reagentes em estudo foram preparadas as soluções: 1) 5,00 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 0,500 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn em meio de TCA 100 g L<sup>-1</sup>; 2) 20,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 2,00 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn em meio de TCA 100 g L<sup>-1</sup>; 3) 5,00 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 0,500 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn em meio de PEP 50 g L<sup>-1</sup>; 4) 20,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 2,00 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn em meio de PEP 50 g L<sup>-1</sup>. Todas as soluções acima continham 1,00 mg L<sup>-1</sup> Y como padrão interno.

A curva analítica utilizada foi preparada após diluição adequada de soluções estoque contendo 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento (Spex Sample Preparation, Metuchen, NJ, EUA) em meio de HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>: Branco analítico – HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>; Solução de referência 1 – 10,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 1,00 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn; e Solução de referência 2 – 20,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg + 2,00 mg L<sup>-1</sup> Fe e Zn. As amostras foram diluídas de acordo com esse intervalo de concentração. Previamente às leituras no ICP OES, o elemento Y foi adicionado como padrão interno às soluções preparadas e às amostras em concentração final igual a 1,00 mg L<sup>-1</sup> Y.

### 3.2.3. Tratamento das amostras de leite

Os três procedimentos empregados para avaliar a fração de Ca, Fe, Mg e Zn ligada à proteína do leite bovino são resumidos no esquema apresentado na FIGURA 3.13.



**FIGURA 3.13** – Esquema para os procedimentos empregados para avaliar as interações químicas entre Ca, Fe, Mg e Zn com as proteínas do leite bovino.

### 3.2.4 Amostras de leite

As amostras de leite integral UHT e de leite suplementado com Fe UHT foram adquiridas no mercado local. Todas as amostras de leite *in natura* foram

coletadas a partir de vacas no estágio final de lactação em um sistema intensivo de produção de leite (Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos SP). Para que fosse eliminada qualquer influência do processo de armazenamento nos resultados analíticos, o leite *in natura* coletado foi analisado imediatamente após sua coleta. De acordo com informações constantes no rótulo do produto, a amostra de leite enriquecida com Fe UHT continha um teor de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  Fe sob a forma de um amino-quelato. Cabe ressaltar que o material de referência certificado NIST 8455 – Whole Milk Powder, não foi reconstituído previamente a digestão ácida assistida por MW.

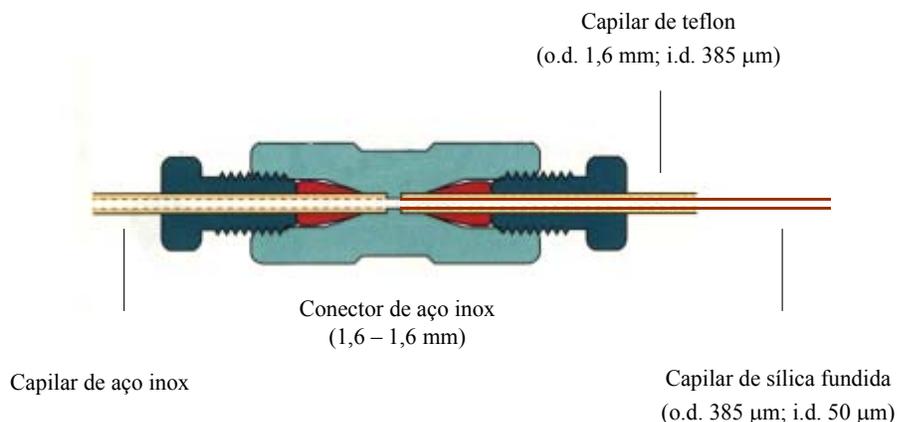
### **3.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em Fluxo sob Altas Temperatura e Pressão**

#### *3.3.1. Instrumentação*

O sistema desenvolvido para decomposição de amostras em fluxo sob altas temperatura e pressão empregou uma bomba de HPLC (ProStar LC System 210, Varian, EUA) equipada com um cabeçote feito de PEEK (poli-éter-éter-cetona) e módulo de pressão 4000 psi ( $\sim 270 \text{ atm}$ ) para impulsionar as soluções através do capilar restritor. Para injeção das soluções no diagrama em estudo foi empregada uma válvula de 6 vias confeccionada com PEEK (Rheodyne 9725, EUA) e equipada com alça de amostragem de  $500 \mu\text{L}$ . Todas as conexões foram feitas empregando-se capilares PEEK (d.i.  $500 \mu\text{m}$  e d.e.  $1,6 \text{ mm}$ , respectivamente) e conectores de aço inoxidável ( $1,6 \text{ mm} - 1,6 \text{ mm}$ ) resistentes à alta pressão. Para promover o aumento da pressão no sistema em fluxo foram empregados capilares de sílica fundida de 45 e de 30 cm de comprimento com d.i. de 75 ou  $50 \mu\text{m}$ , e capilar de PEEK com 30 cm de comprimento e  $250 \mu\text{m}$  de diâmetro interno. Os capilares de sílica fundida foram conectados à saída do sistema em fluxo conforme observado na FIGURA 3.14. Para o capilar de PEEK não houve necessidade de adaptação adicional pelo fato do diâmetro externo desse capilar coincidir com o diâmetro interno do conector de aço inoxidável.

A bobina digestora consistiu de um capilar de aço inoxidável de 45 cm de comprimento com d.i. 500  $\mu\text{m}$  e d.e. 1,6 mm, o que proporcionava um volume aproximado de 90  $\mu\text{L}$ . O sistema de aquecimento empregou um transformador com tensões de saídas de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 V. A diferença de potencial necessária para atingir a temperatura desejada era dependente da tensão de entrada do transformador, regulada através de um controlador de tensão. Sua aplicação no sistema em desenvolvimento foi conduzida através de uma resistência de Fe/Cu enrolada em um tubo de alumina que envolvia a bobina digestora ou conectando diretamente os terminais do transformador na superfície do tubo de aço inoxidável. Em ambos os casos o conjunto formado pela bobina digestora, pelo tubo de alumina e pela resistência elétrica, se encontrava isolado termicamente por um revestimento de lã de vidro, sendo a temperatura monitorada na superfície do capilar de aço inoxidável utilizando um termo-par tipo K. Nesse processo de medição foi assumido que a temperatura na região central do tubo de aço inoxidável representaria um valor médio para as temperaturas observadas na entrada e na saída da bobina digestora.

Para avaliar a eficiência da decomposição em fluxo foi monitorado o teor de carbono residual (RCC) nas soluções processadas no sistema em desenvolvimento. O procedimento de determinação empregado baseou-se no estudo desenvolvido por GOUVEIA *et al.* (2001). As condições operacionais empregadas no ICP OES com configuração radial utilizado para determinação de RCC são apresentadas na TABELA 3.9. Cabe ressaltar que as soluções dos digeridos obtidos foram degaseificadas empregando aquecimento em banho com temperatura controlada a 100°C por aproximadamente 20 min previamente à determinação de RCC.



**FIGURA 3.14** – Representação esquemática da conexão do capilar restritor de sílica fundida à saída do sistema em fluxo.

**TABELA 3.9** – Condições operacionais empregadas no ICP OES com configuração radial para a determinação do teor de RCC nos digeridos obtidos.

<i>Parâmetro operacional</i>	
Potência RF (kW)	1,0
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,9
Amostra (mL min <sup>-1</sup> )	0,8
Altura de observação (mm)	8
Câmara de nebulização	Ciclônica simples passo
Nebulizador	Concêntrico tipo K
Linhas de emissão (nm)	C I 193,025
	C II 247,857
	Y II 371,022

I e II– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

As amostras de tecido vegetal avaliadas foram moídas empregando um moinho criogênico Spex CertiPrep 6750 (Metuchen, EUA) operando à temperatura do nitrogênio líquido (-200 °C) (FIGURA 3.15). No processo de

moagem, a amostra (~ 1,5 g) foi colocada em frascos de policarbonato fechados com dois conectores de aço inoxidável, e imersa no banho de nitrogênio líquido do moinho. Após o término da etapa de pré-resfriamento, o movimento em alta frequência de uma barra de impacto de aço inoxidável, localizado no interior do frasco de policarbonato, proporcionou a pulverização da amostra. Etapa de pré-resfriamento de 3 min e tempo de moagem 2 min foram empregados no programa avaliado. Três ciclos de moagem, intercalados com uma etapa de recongelamento de 1 min, foram implementados no programa utilizado. Os parâmetros usados no programa de moagem são listados na TABELA 3.10.



**FIGURA 3.15** – Moinho criogênico e frascos de moagem empregados para pulverização das amostras de tecido vegetal.

**TABELA 3.10** – Programa de moagem utilizado.

<i>Etapa</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Tempo (min)</i>
Pré-resfriamento	1	3
Moagem	3	2
Recongelamento	2	1

Para verificar o efeito de tamanho de partícula no perfil de distribuição dos constituintes inorgânicos nas amostras de folhas de planta moídas criogenicamente, o material pulverizado foi fracionado em um conjunto de

peneiras poliméricas dispostas em ordem decrescente de tamanho de malha: 74, 47 e 37  $\mu\text{m}$ . Cada fração individual da amostra foi coletada e analisada separadamente. Os elementos determinados assim como os parâmetros operacionais empregados para o ICP OES Axial são descritos na TABELA 3.11.

O forno de microondas com frasco pressurizado e programa de aquecimento descritos na Seção 3.1.1, foram empregados para decomposição das amostras de sucos de frutas e dos tecidos vegetais pulverizados criogenicamente. Para decomposição de 250 mg da amostra de tecido vegetal foram empregados 2 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % v v<sup>-1</sup>. A mesma mistura oxidante foi utilizada para decompor 2,5 mL dos sucos de frutas avaliados. Para determinação multielementar dos digeridos de sucos de frutas foram empregadas as condições operacionais descritas na TABELA 3.12.

**TABELA 3.11** – Condições operacionais empregadas no ICP OES axial para determinação de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn nas amostras de tecido vegetal moídas criogenicamente.

<i>Parâmetro operacional</i>		
Potência RF (kW)		1,1
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )		15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )		1,5
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )		0,7
Amostra (mL min <sup>-1</sup> )		0,8
Câmara de nebulização		Ciclônica simples passo
Nebulizador		Concêntrico tipo K
Linhas de emissão (nm)	Al I 396,152	Mg II 280,270
	Ca II 396,847	Mn II 257,610
	Cu I 324,754	P I 213,618
	Fe II 238,204	Zn II 206,204
	K I 766,491	

I e II– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

**TABELA 3.12** – Condições operacionais empregadas no ICP OES radial para determinação de Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn nas amostras de sucos de frutas digeridas em sistema de MW e através do sistema em fluxo avaliado.

<i>Parâmetro operacional</i>		
Potência RF (Kw)		1,1
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )		15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )		1,5
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )		0,8
Amostra (mL min <sup>-1</sup> )		0,8
Altura de observação (mm)		10
Câmara de nebulização		Ciclônica simples passo
Nebulizador		Concêntrico tipo K
Linhas de emissão (nm)	Ca II 317,937	Mg II 280,270
	Cu I 324,760	Mn II 257,610
	Cr II 267,716	Na I 589,592
	Fe II 238,204	Ni II 231,604
	K I 766,491	Zn II 206,204

I e II– linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

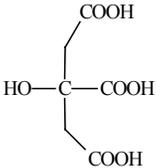
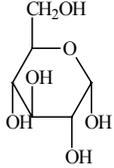
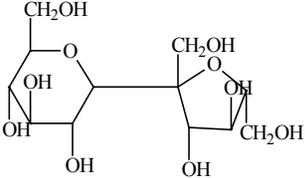
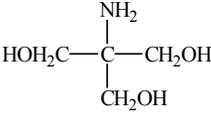
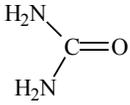
### 3.3.2. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água desionizada purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> como solvente (18 MΩ cm). Soluções contendo 1,0 % m v<sup>-1</sup> de C em meio de HNO<sub>3</sub> 0,014; 0,14 ou 1,4 mol L<sup>-1</sup> foram preparadas a partir da diluição de soluções estoque 5,0 % m v<sup>-1</sup> C em H<sub>2</sub>O. Os compostos orgânicos avaliados são apresentados na TABELA 3.15. O emprego de peróxido de hidrogênio 3 % v v<sup>-1</sup>, como agente oxidante auxiliar também foi investigado.

Para avaliar a eficiência de degaseificação dos digeridos, foram preparadas soluções com CO<sub>2</sub> dissolvido a partir do seu borbulhamento em solução ácida a uma vazão de 7,5 L min<sup>-1</sup> durante 20 s. Esse procedimento foi

repetido somando um total de 5 replicatas para duas concentrações ácidas 0,14 e 1,4 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>. Essas soluções foram expostas à ação de ondas ultrassônicas e aquecidas em banho com temperatura controlada a 100°C. Posteriormente, monitorou-se a intensidade de emissão das soluções resultantes sendo os valores observados comparados com os valores obtidos para a solução original que não sofreu nenhum processo de desgaseificação.

**TABELA 3.13** – Compostos orgânicos utilizados na avaliação da eficiência de decomposição do sistema em fluxo.

<i>Composto orgânico</i>	<i>Fórmula molecular</i>	<i>Fórmula estrutural</i>
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	
Glicose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
Sacarose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
Tris(hidróximetil)aminometano	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	
Uréia	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	

Para quantificação dos teores de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas amostras de tecido vegetal pulverizadas criogenicamente, preparou-se curva analítica a partir de diluição de soluções estoque individuais contendo 1.000

mg L<sup>-1</sup> de cada metal (Spex Samplepreparation, Metuchen, EUA): Branco analítico – HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>; Solução de referência 1: 2,00 mg L<sup>-1</sup> Al, Cu, Fe, Mn e Zn + 20,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg; Solução de referência 2 – 4,00 mg L<sup>-1</sup> Al, Cu, Fe, Mn e Zn + 40,0 mg L<sup>-1</sup> Ca e Mg. Para determinação dos teores de RCC foram preparadas soluções analíticas contendo 100, 400 e 1.000 mg L<sup>-1</sup> de C, sob a forma de uréia.

Na quantificação dos teores de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn nos digeridos de suco obtidos através da utilização de forno de MW e pelo processamento no sistema em fluxo em desenvolvimento, foi preparada curva analítica a partir de diluição de soluções estoque individuais contendo 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cada metal (Spex Sample Preparation, Metuchen, EUA): Branco analítico – HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup>; Solução de referência 1: 1,25 mg L<sup>-1</sup> Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn + 2,50 mg L<sup>-1</sup> Ca, K, Mg e Na; Solução de referência 2: 2,50 mg L<sup>-1</sup> Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn + 5,00 mg L<sup>-1</sup> Ca, K, Mg e Na; Solução de referência 3: 5,00 mg L<sup>-1</sup> Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn + 10,0 mg L<sup>-1</sup> Ca, K, Mg e Na.

As suspensões das amostras de tecido vegetal foram preparadas após pesagem de massa igual a 500 mg da amostra, e transferência dessa para frasco volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com solução composta por HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,0 % v v<sup>-1</sup>.

### 3.3.3. Amostras de sucos de frutas e tecido vegetal

Para avaliação da eficiência do sistema frente a amostras reais, foi testada a decomposição de sucos de frutas comerciais (uva, laranja e abacaxi). Essas amostras foram diluídas nas misturas oxidantes nas proporções 0,5:10; 1:10 e 5:10 v v<sup>-1</sup>, previamente a introdução no sistema de digestão em fluxo. O teor RCC dos digeridos obtidos foi comparado à concentração de carbono original das respectivas soluções diluídas. A composição rotulada das amostras avaliadas está descrita na TABELA 3.14.

**TABELA 3.14** – Descrição dos sucos de frutas avaliados conforme rótulos dos produtos.

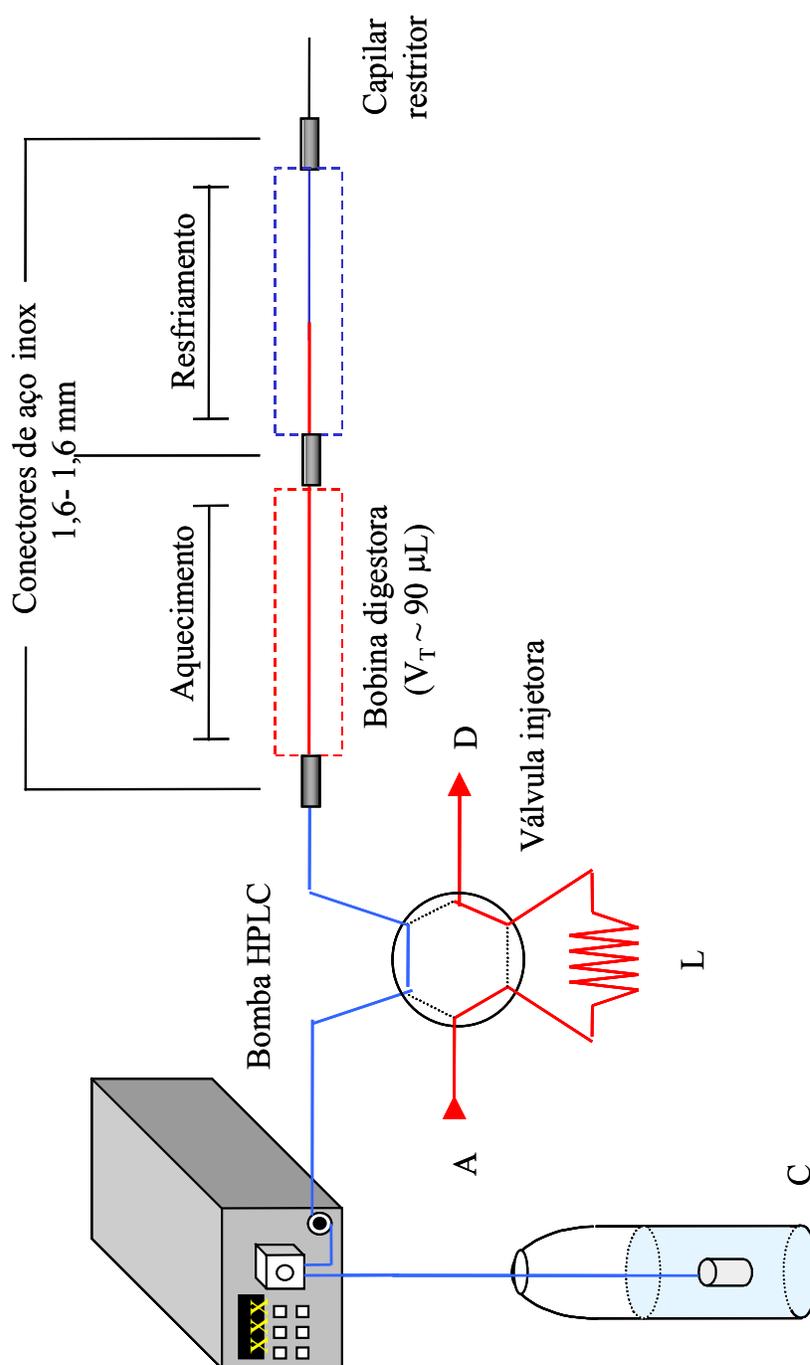
<i>Amostra</i>	<i>Descrição</i>
Suco de abacaxi	Mistura de sucos de maçã, maracujá, abacaxi, laranja e uva, água, aroma sintético de abacaxi, acidulantes, regulador de acidez, estabilizantes, corantes artificiais e vitaminas C, B <sub>6</sub> e B <sub>1</sub>
Suco de laranja	Concentrado de laranja, açúcar, ácido cítrico antioxidante vitamina C
Suco de uva	Concentrado de uva, açúcar, ácido cítrico antioxidante vitamina C

As amostras de tecido vegetal (folhas de laranja, de café, de goiaba e de amora) foram coletadas no pomar da Fazenda Canchim (São Carlos, Brasil). Previamente a moagem, cabe ressaltar que todas as amostras foram lavadas com água destilada e desionizada, para remoção do material particulado depositado sobre as folhas, e secas em uma estufa operando a 65 °C durante 24 h.

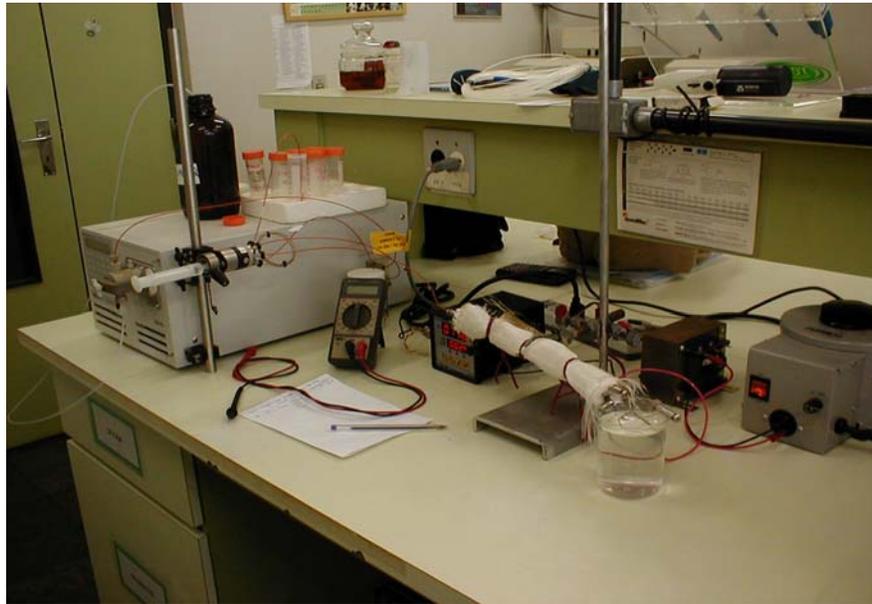
#### 3.3.4. Diagrama de fluxo do sistema investigado

No sistema em fluxo representado esquematicamente na FIGURA 3.16, pode ser observado que após a inserção da amostra (500 µL) no fluxo transportador C ( $H_2O - 0,20 \text{ mL min}^{-1}$ ), essa foi aquecida na bobina digestora de aço inoxidável e posteriormente resfriada em um capilar de 15 cm (d.i. 500 µm e d.e. 1,6 mm), imerso em um banho de água, previamente à sua saída através do capilar restritor de sílica fundida de 50 µm de d.i e 30 cm de comprimento. Na configuração avaliada foi empregada uma bobina digestora que possui um volume total de aproximadamente 90 µL. O tempo de residência da amostra no sistema é diretamente dependente desse volume e da vazão utilizada no fluxo transportador. Considerando a vazão empregada para o fluxo transportador, estima-se um tempo de residência de aproximadamente 3 min. As condições

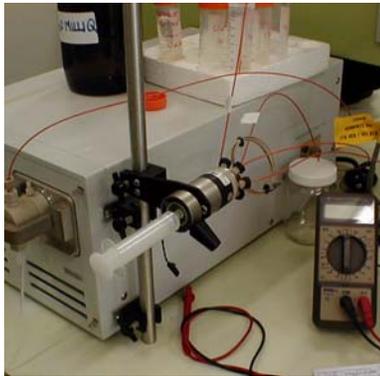
operacionais empregadas para realizar a decomposição de 500  $\mu\text{L}$  da amostra de suco foram 300  $^{\circ}\text{C}$  e 60 atm, sob uma vazão de fluxo transportador igual a 0,20  $\text{mL min}^{-1}$ . Após o término das digestões, procedimento de limpeza com água desionizada foi implementado para evitar redução na vida útil dos componentes do sistema em fluxo (válvula de amostragem, tubulações metálicas e conectores). Detalhes da montagem do sistema podem ser visualizados na FIGURA 3.17.



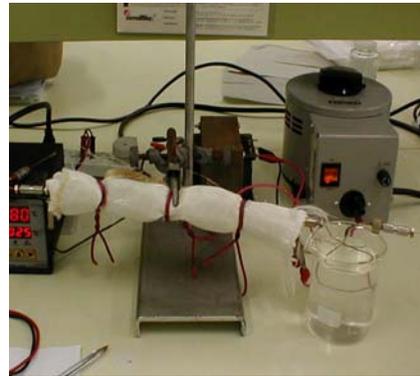
**FIGURA 3.16** – Diagrama do sistema em fluxo para decomposição de amostras sob altas temperatura e pressão. A, amostra; C, fluxo transportador ( $\text{H}_2\text{O} - 0,20 \text{ mL min}^{-1}$ ) e L, alça de amostragem ( $500 \mu\text{L}$ ).



(a)



(b)



(c)

**FIGURA 3.17** – (a) Sistema em fluxo para decomposição de amostras orgânicas sob altas temperatura e pressão; (b) Válvula de amostragem; (c) Bobina digestora e capilares de resfriamento e restritor.

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

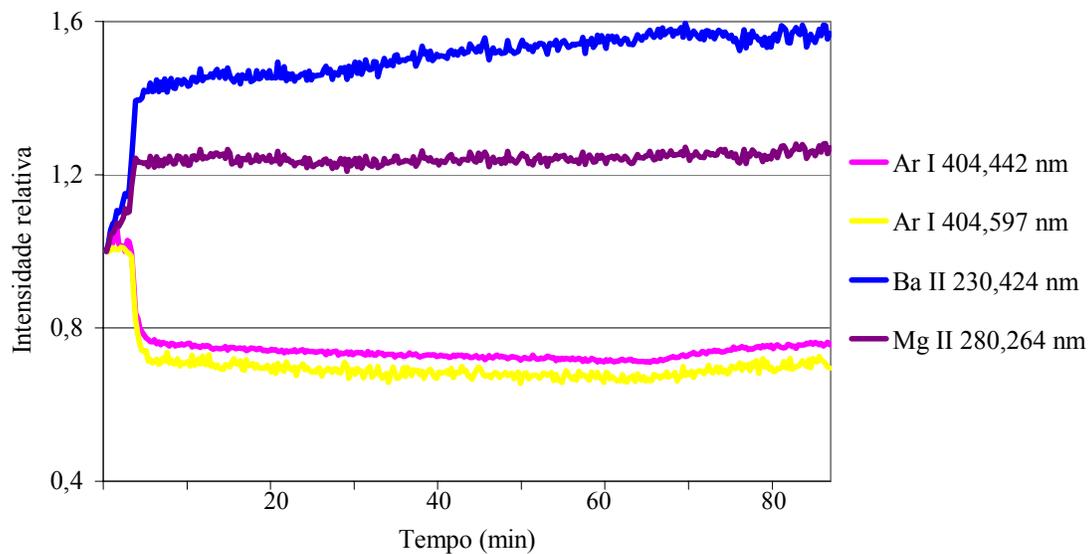
---

## 4. Resultados e Discussão

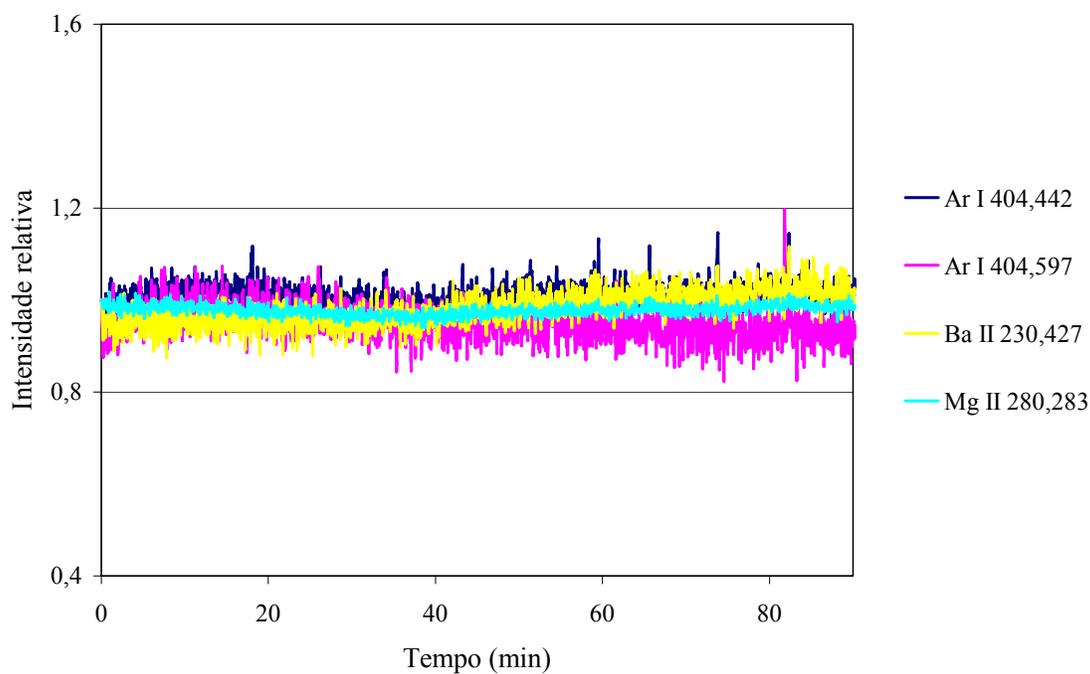
### 4.1. Avaliação das figuras de mérito de ICP OES com configurações axial e radial

Todas as medidas foram realizadas observando os parâmetros instrumentais descritos na TABELA 3.6 da Seção 3.1.1. O desempenho dos ICP OES com configurações axial e radial foi avaliado empregando uma seqüência de experimentos simples propostos por MERMET & POUSSSEL (1995) As linhas de emissões Ar I 404,442 e 404,597 nm, Ba II 230,424 nm e Mg II 280,264 nm foram empregadas para avaliação do tempo de “warm-up”. A intensidade relativa observada para ambos equipamentos pode ser observada na FIGURA 4.18.

Para o ICP OES com configuração axial foi observada uma variação significativa no sinal de emissão de todas as linhas analisadas durante os 5 min iniciais do experimento. Provavelmente o processo de transferência de energia do gerador de radiofrequência para o plasma, e conseqüentemente para os analitos, necessitou de um maior tempo de estabilização devido a menor eficiência de acoplamento relatada para essa configuração. Como pode ser observado através da FIGURA 4.18, à medida que a intensidade de emissão das linhas Ar I decresciam, o comportamento oposto era observado para as linhas Ba II e Mg II. Esse fato não foi observado para a configuração radial, no qual as intensidades de emissão se mantiveram praticamente constantes ao longo de todo experimento (~ 90 min). Considerando os dados da FIGURA 4.18 podemos assumir que o tempo de “warm-up” para as configurações axial e radial foram 20 e 10 min, respectivamente. Esses valores foram estabelecidos considerando variações inferiores a 5 % para os sinais de emissão.



(a)



(b)

**FIGURA 4.18.** Intensidade de emissão relativa observada para os ICP OES com configuração axial e radial. (a) Configuração axial; (b) Configuração radial. Valores monitorados a partir da ignição do plasma.

A estabilidade em curto período foi determinada realizando 15 leituras consecutivas do sinal de emissão para Mg I 285,208 nm. Os resultados desse experimento mostraram dpr de 0,7 e 0,6 % para as configurações axial e radial, respectivamente. Monitorando-se o sinal de emissão dessa linha durante um período de 2 h ( $n = 8$ , isto é, medidas em intervalos de 15 min), os valores de dpr dos arranjos axial e radial para 8 medidas realizadas em intervalos de 15 min foram de 1,5 e 1,4 %, respectivamente.

A razão Mg II/Mg I é um critério prático para avaliar a robustez do plasma e desempenho analítico da determinação por ICP OES. O termo robustez foi proposto para representar a eficiência de transferência de energia e resposta do plasma a mudanças nas condições de atomização e excitação decorrentes da alteração na composição química de uma solução aspirada (MERMET, 1991). Esse experimento foi realizado fixando-se o valor da potência do sistema de radiofrequência em 1,3 kW para ambos equipamentos. Em seguida, a vazão do gás de nebulização foi alterada univariadamente de modo a alcançar as maiores razões para Mg II/Mg I. As vazões de nebulização empregadas para as configurações axial e radial foram 0,90 e 0,70 L min<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de 1,8, levando-se em conta que a ótica e o sistema de detecção das configurações avaliadas empregavam detector de estado sólido CCD que apresentam diferentes eficiências quânticas em função da região do detector. A investigação desse fator havia sido previamente executada em trabalho publicado por DENNAUD *et al.* (2001), onde os autores também utilizaram o ICP OES VISTA PRO. Valores entre 1,5 e 1,8 foram relatados pelos autores. Como esperado, os resultados mostraram maior razão Mg II/Mg I para a configuração radial (TABELA 4.15). As razões Mg II/Mg I observadas foram superiores a 10, indicando que ambos ICP OES estavam operando sob condições robustas. Nesse ponto da discussão, deve-se ressaltar que a operação do equipamento sob condições robustas leva a minimização de efeitos de matriz observados, porém pode reduzir a sensibilidade da

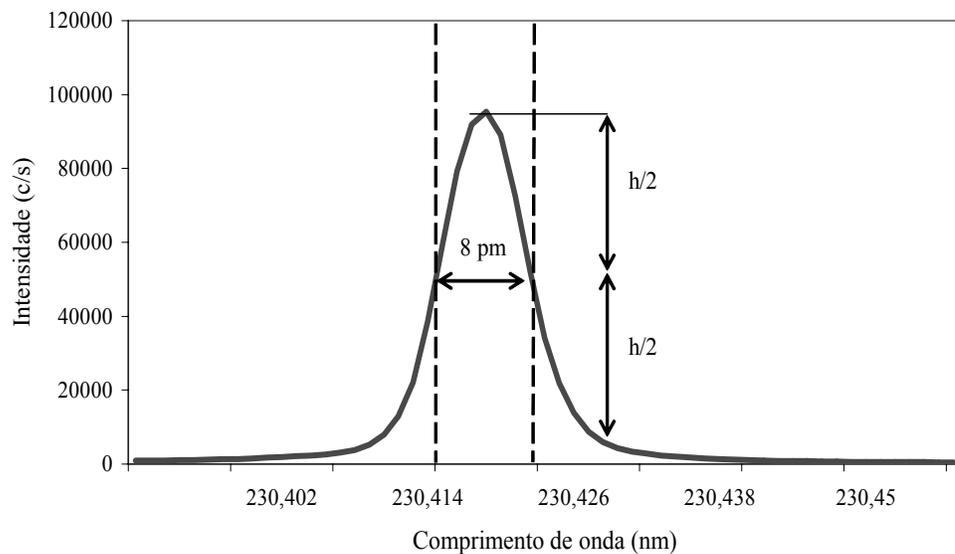
determinação e ao intervalo linear dinâmico de resposta (IVALDI & TYSON, 1995).

**TABELA 4.15** – Intensidade de emissão e razão Mg II/Mg I observada para os ICP OES com configurações axial e radial.

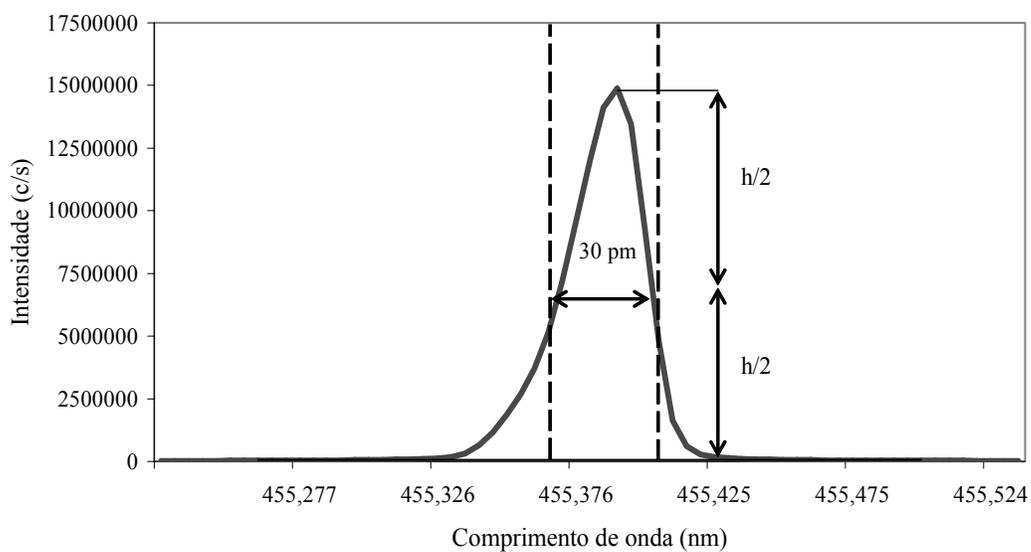
<i>Configuração</i>	<i>Mg I 285 (c s<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mg II 280 (c s<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mg II/ Mg I*</i>
Axial	151.075	890.419	10,6
Radial	2.643	20.139	13,7

\*Valor multiplicado por 1,8 conforme sugerido por DENNAUD *et al.* (2001)

Valores semelhantes foram observados para a resolução espectral de ambos monocromadores Littrow/Echelle avaliados. Como pode ser observado através dos perfis de emissão das linhas Ba II 230,424 e 405,423 nm apresentados na FIGURAS 4.19 e 4.20, os valores de resolução espectral nas regiões do UV e VIS para os ICP OES com configuração axial e radial foram de 8 e 30 pm, e 9 e 32 pm, respectivamente. Deve-se mencionar que as linhas para Ba selecionadas estão posicionadas no centro do plano referente às ordens de difração do detector CCD, região caracterizada por melhor resolução espectral.

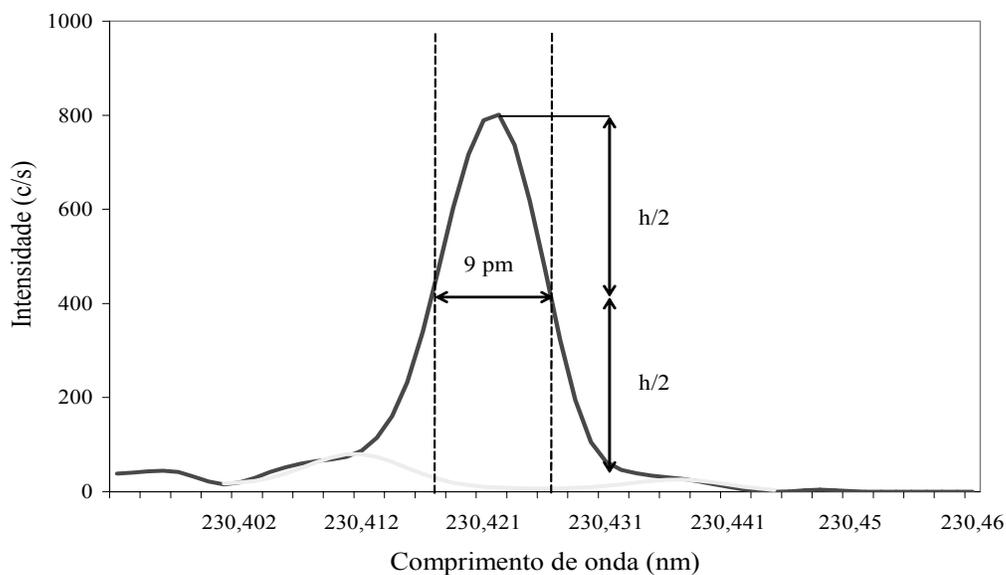


(a)

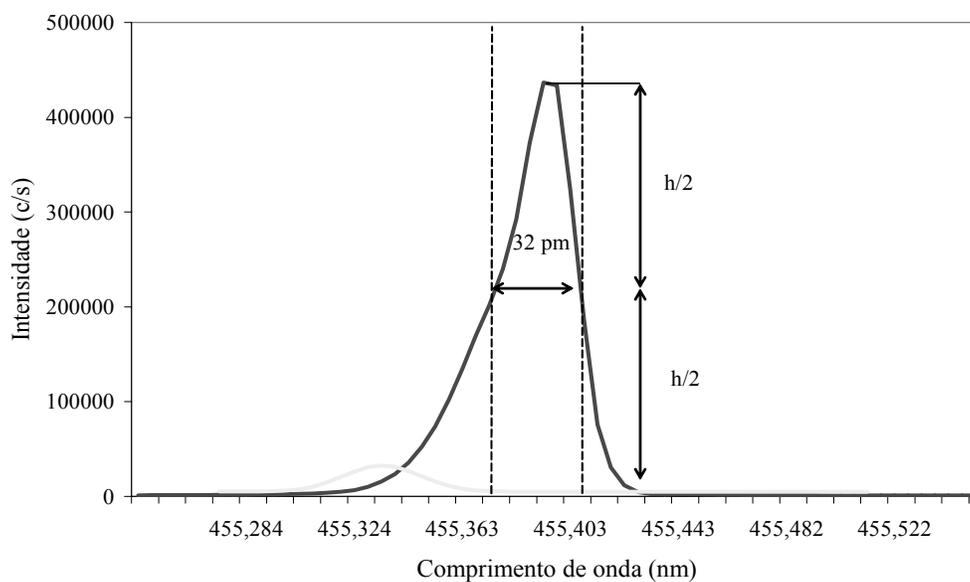


(b)

**FIGURA 4.19** – Perfis dos sinais de emissão das linhas Ba II 230,424 e 405,423 nm obtidos no ICP OES com configuração axial. (a) Resolução espectral na região UV; (b) Resolução espectral na região do VIS.



(a)



(b)

**FIGURA 4.20** – Perfis dos sinais de emissão das linhas Ba II 230,424 e 405,423 nm obtidos no ICP OES com configuração radial. (a) Resolução espectral na região UV; (b) Resolução espectral na região do VIS.

Os valores de limite de detecção (LOD) para cada configuração foram avaliados empregando a linha de emissão Ni II 231,208 nm. A concentração

equivalente ao sinal de fundo (BEC) foi considerada para o cálculo dos LOD's (THOMSEN *et al.*, 2000). O efeito de matriz na sensibilidade foi avaliado determinando-se os valores de LOD nos meios de  $\text{HNO}_3$   $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  e solução contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr. Os resultados são apresentados na TABELA 4.16.

**TABELA 4.16.** Limites de detecção (LOD) e concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) para a linha de emissão Ni II 231,608 nm em meio de  $\text{HNO}_3$   $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  e em  $1,000 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr nas configurações axial e radial

	<i>Axial</i>		<i>Radial</i>	
	<i>BEC (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>LOD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>BEC (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>LOD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>
$\text{HNO}_3$ $0,14 \text{ mol l}^{-1}$	11	0,23	301	3,8
$1000 \text{ mg l}^{-1}$ Cr	4	0,31	741	7,6

Os limites de detecção apresentados pela configuração axial foram em média 20 vezes inferiores aos encontrados para a configuração radial. Esses dados estão de acordo com a discussão feita por BRENNER & ZANDER (2000), na qual são apresentados valores de ganhos em sensibilidade que variam de 2 a 20 vezes, empregando nebulização pneumática convencional, quando a configuração axial é comparada com a radial. O poder de detecção de ambos ICP OES não foi significativamente afetado pela presença de Cr em solução. Esses resultados indicam que a interface “end-on-gas”, utilizada na configuração axial para eliminar a zona de recombinação da região mais fria do plasma atuou eficientemente. Conjuntamente ao emprego da tocha com maior diâmetro interno do tubo injetor, a interface pode proporcionar menor interferência da matriz no sistema axial quando comparado às interferências observadas para o sistema radial, como demonstrado para determinação de Dy, Eu e Yb em fezes de carneiro (GARCIA *et al.*, 2001). Resultados obtidos para influência do carbono em solução sobre a sensibilidade das medidas também confirmam essa observação (TABELAS 4.17 e 4.18).

**TABELA 4.17** – Valores de LOD e BEC para Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn em soluções contendo diferentes teores de C para configuração axial. Concentração expressa em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Elemento	Concentração de Carbono ( $\text{mg L}^{-1}$ )											
	HNO <sub>3</sub> 0,14 mol L <sup>-1</sup>		10		100		1.000		10.000			
	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD
Al I 369,152	0,11	0,072	0,12	0,077	0,11	0,073	0,11	0,074	0,13	0,086		
As I 188,980	2,2	2,4	2,4	2,6	2,3	2,5	2,3	2,5	2,5	2,7		
Ca II 317,937	0,091	0,067	0,097	0,071	0,091	0,067	0,092	0,067	0,097	0,071		
Cd II 226,502	0,34	0,40	0,36	0,44	0,34	0,41	0,35	0,42	0,38	0,46		
Co II 228,619	0,73	0,84	0,78	0,90	0,74	0,85	0,74	0,86	0,79	0,91		
Cr II 267,716	0,18	0,28	0,19	0,30	0,18	0,29	0,18	0,29	0,19	0,30		
Cu I 324,760	0,064	0,048	0,069	0,051	0,065	0,048	0,064	0,048	0,068	0,051		
Fe II 238,204	0,45	0,54	0,48	0,59	0,46	0,56	0,46	0,56	0,49	0,60		
Mg II 280,264	0,022	0,039	0,024	0,041	0,023	0,039	0,023	0,039	0,024	0,042		
Mn II 257,610	0,038	0,082	0,040	0,087	0,038	0,082	0,038	0,083	0,040	0,087		
Se I 196,026	4,8	4,2	5,3	4,7	5,0	4,5	5,2	4,6	5,6	5,0		
Zn II 206,204	0,42	0,22	0,45	0,24	0,42	0,22	0,43	0,23	0,47	0,25		

**TABELA 4.18** – Valores de LOD e BEC para Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn em soluções contendo diferentes teores de C para configuração radial. Concentração expressa em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Elemento	Concentração de Carbono ( $\text{mg L}^{-1}$ )											
	HNO <sub>3</sub> 0,14 mol L <sup>-1</sup>		10		100		1.000		10.000		10.000	
	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD	BEC	LOD
Al I 369,152	8,6	5,2	8,9	5,4	8,4	5,1	8,3	5,0	9,5	5,7	9,5	5,7
As I 188,980	40	98	40	98	37	92	37	89	37	90	37	90
Ca II 317,937	10	9,8	11	10	10	9,5	9,9	9,5	11	10	11	10
Cd II 226,502	19	26	18	23	17	22	16	21	18	23	18	23
Co II 228,619	27	34	26	32	25	31	24	30	26	32	26	32
Cr II 267,716	34	30	31	28	29	26	29	25	29	26	29	26
Cu I 324,760	4,3	1,9	4,4	2,0	4,2	1,9	4,2	1,8	4,3	1,9	4,3	1,9
Fe II 238,204	16	14	14	13	13	12	13	12	14	13	14	13
Mg II 280,264	0,50	0,79	0,50	0,80	0,47	0,75	0,47	0,75	0,48	0,77	0,48	0,77
Mn II 257,610	4,2	2,8	4,2	2,8	3,9	2,7	3,9	2,6	4,0	2,7	4,0	2,7
Se I 196,026	66	148	63	142	60	135	57	127	49	111	49	111
Zn II 206,204	17	37	17	37	16	35	16	35	17	38	17	38

Alterações significativas nos valores de LOD e BEC não foram observadas para a configuração axial quando a concentração de carbono na solução multielementar foi variada entre 10 e 10.000 mg L<sup>-1</sup>. Em geral, os desvios padrão relativos observados para os resultados foram inferiores a 15 %. O adequado desempenho apresentado por essa configuração pode estar associado à eficiência da interface “end-on-gas” para eliminar a região do plasma onde prevalecem os processos de recombinação. O incremento na concentração de carbono poderia produzir emissões não específicas no plasma e deteriorar a sensibilidade devido ao aumento da radiação de fundo monitorada (BEC). Dessa forma, era esperado que essa limitação fosse fortemente pronunciada na configuração axial. Entretanto, esse indesejável comportamento não foi observado para o intervalo de concentração de carbono avaliado, quando considerado o ICP OES com configuração axial (TABELA 4.17). Comportamento semelhante foi observado para configuração radial quando o ICP OES estava sendo operado em condições robustas (potência de 1,3 kW e vazão de nebulização 0,7 L min<sup>-1</sup>). Nesse caso, a presença de carbono na solução multielementar afetou somente os valores de BEC e LOD para Se I 196,025 nm, para os quais a máxima variação observada foi de aproximadamente 30 %, quando considerado o intervalo de concentração de carbono investigado (TABELA 4.18). Os resultados obtidos foram concordantes com o efeito da matriz causado por compostos orgânicos residuais nas medidas de Se por ICP OES previamente descrito por KNAPP *et al.* (1998). Também vale ressaltar que a determinação de Se empregando a técnica de espectrometria de massas com plasma induzido (ICP MS) também está sujeita a interferências decorrentes de compostos orgânicos residuais em solução (ALLAIN *et al.*, 1991; LARSEN & STÜRUP, 1994). Análise de materiais de referência certificados (NIST 1577b – Bovine Liver, e NIST 1515 – Apple Leaves) foi executada em ambos equipamentos para determinar a precisão e exatidão das medidas. Os resultados para essa análise podem ser observados na TABELA 4.19.

**TABELA 4.19** – Resultados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn baseados na matéria seca, usando os ICP OES com configurações axial e radial.

Amostra	Ca (% m m <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
<i>NIST 1577b Bovine Liver</i>						
Axial	146 <sup>a</sup> ± 12	142 ± 1	164 ± 4	546 ± 5	7,20 ± 0,58	114 ± 1
Radial	107 ± 5	148 ± 1	156 ± 4	523 ± 4	9,14 ± 0,75	110 ± 3
Valor certificado	116 ± 4	160 ± 8	184 ± 15	601 ± 28	10,5 ± 0,17	127 ± 6
<i>NIST 1577b Apple Leaves</i>						
Axial	1,32 ± 0,06	4,98 ± 0,23	61,9 ± 1,4	0,241 <sup>a</sup> ± 0,010	44,5 ± 1,1	10,9 ± 0,3
Radial	1,46 ± 0,03	6,14 ± 0,06	66,5 ± 4,3	0,247 ± 0,003	48,5 ± 2,5	19,6 ± 2,7
Valor certificado	1,526 ± 0,015	5,64 ± 0,24	(80) <sup>b</sup>	0,271 ± 0,008	54 ± 3	12,5 ± 0,3

(a) Concentração expressa em mg kg<sup>-1</sup> para Ca e em % m m<sup>-1</sup> para Mg; (b) Valor estimado.

Conforme observado na TABELA 4.19, as concentrações determinadas para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, estiveram em concordância com os teores certificados em um nível de confiança de 95 % de acordo com teste estatístico *t*-Student pareado aplicado. Os outros elementos, como Al, As, Cd, Co, Cr e Se, não foram quantificados devido aos teores presente nos digeridos estarem abaixo do LOD, mesmo considerando a sensibilidade proporcionada pela configuração axial.

## **4.2. Leite bovino – Avaliação das interações metal-proteína**

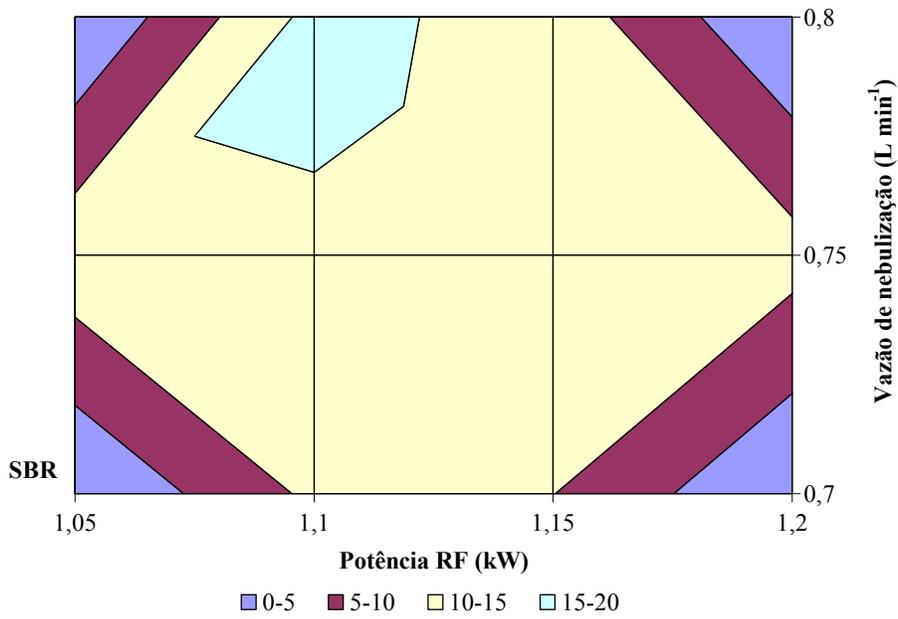
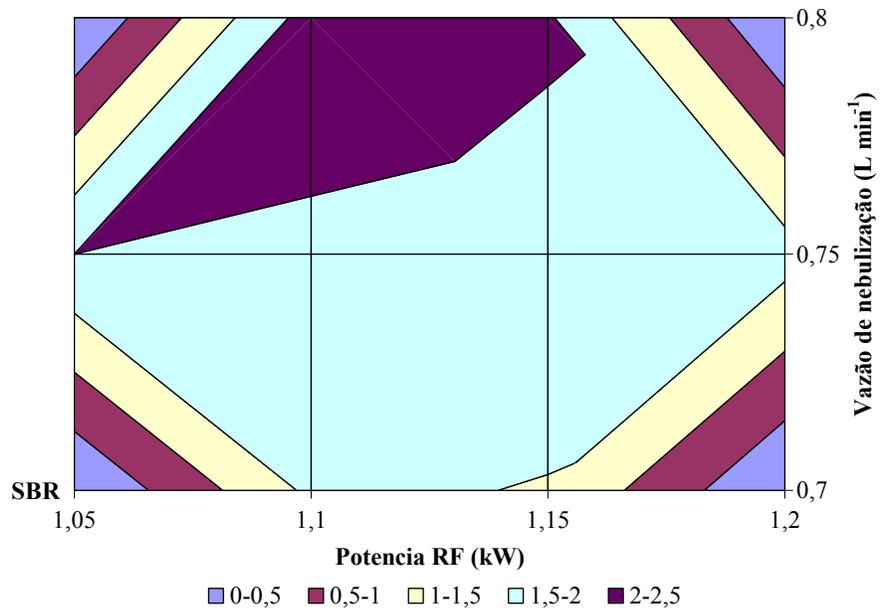
### *4.2.1. Avaliação dos parâmetros instrumentais e efeitos de matriz no ICP OES*

Previamente a avaliação das condições operacionais do ICP OES com configuração axial, conforme constatado em experimento descrito na Seção 4.1, já era de conhecimento que condições robustas seriam alcançadas caso 1,3 kW e 0,90 L min<sup>-1</sup> fossem empregados para a potência da radiofrequência e para a vazão de nebulização, respectivamente. Entretanto, optou-se por realizar as leituras em condições operacionais diferentes a esses valores, tendo em vista o critério sensibilidade. Dessa forma, para estabelecimento dos parâmetros operacionais do ICP OES axial, descritos na TABELA 3.7 da Seção 3.2.1, foi empregada solução multielementar contendo 1,00 mg L<sup>-1</sup> de Ca, Fe, Mg e Zn em meio de HNO<sub>3</sub> 0,14 mol L<sup>-1</sup> e o aplicativo de auto-otimização fornecido junto com o software de controle do equipamento ICP Expert<sup>®</sup> v.4.0. Nesse aplicativo a potência aplicada na radiofrequência e a vazão do gás de nebulização foram sistematicamente alterados de forma a se alcançar os maiores valores de SBR para maioria dos comprimentos de onda utilizados. O intervalo considerado nessa investigação para potência da RF foi de 1,0 – 1,2 kW e para vazão do gás de nebulização de 0,70 – 0,80 L min<sup>-1</sup>. Através da superfície de resposta construída automaticamente pelo equipamento, foi verificado que a melhor sensibilidade, para a maioria dos elementos analisados, seria alcançada caso fossem empregados os valores de potência de RF igual a 1,1 kW e do fluxo do

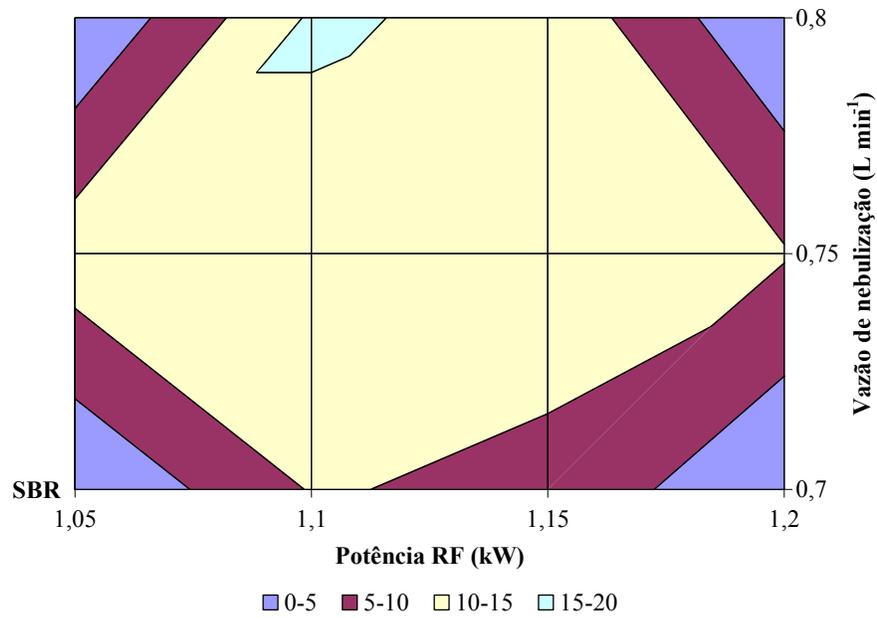
gás de nebulização igual a  $0,80 \text{ L min}^{-1}$  (FIGURA 4.21 e 4.22). Nessas condições, foram executados testes de adição e recuperação para todos os analitos visando verificar possíveis efeitos dos reagentes em estudo, TCA  $100 \text{ g L}^{-1}$  e PEP  $50 \text{ g L}^{-1}$ , sobre o sinal analítico. Os resultados para esse experimento estão resumidos na TABELA 4.20.

**TABELA 4.20** – Recuperação de Ca, Fe, Mg e Zn em solução de PEP  $50 \text{ g L}^{-1}$  e TCA  $100 \text{ g L}^{-1}$ .

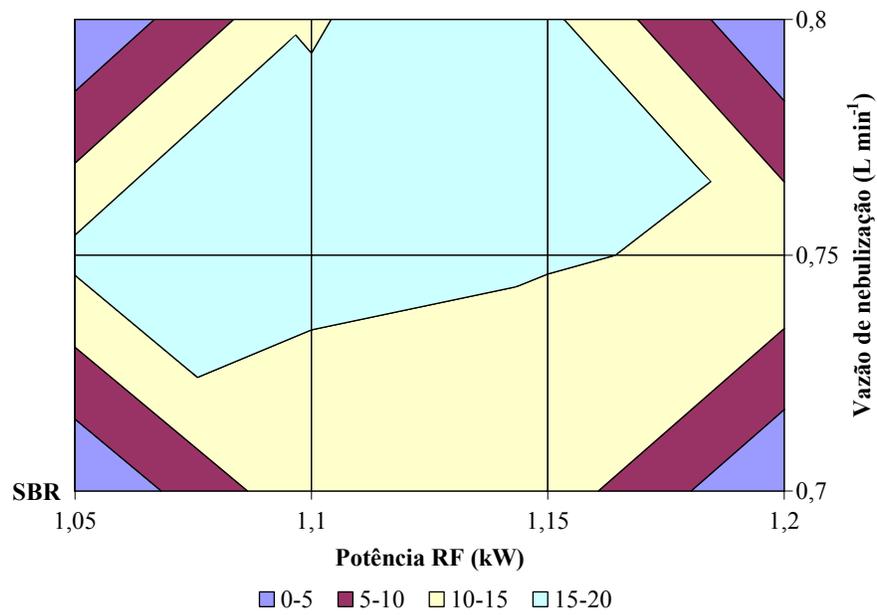
<i>Analito</i>	<i>TCA</i>			<i>PEP</i>		
	<i>Adicionado</i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperado</i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>%</i>	<i>Adicionado</i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperado</i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>%</i>
Ca	5,00	5,00	100	5,00	4,50	90,0
	20,0	20,2	101	20,0	17,9	89,2
Fe	0,500	0,465	93,0	0,500	0,451	90,3
	1,00	0,980	98,0	1,00	0,920	92,0
Mg	5,00	4,85	97,0	5,00	4,58	91,5
	20,0	19,6	98,0	20,0	18,5	92,5
Zn	0,500	0,495	99,0	0,500	0,459	91,8
	1,00	1,00	100	1,00	0,901	90,1



**FIGURA 4.21** – Superfície de resposta para avaliação das condições operacionais do ICP OES com configuração axial. Razão sinal ruído para (a) Ca e (b) Fe.



(a)



(b)

**FIGURA 4.22** – Superfície de resposta para avaliação das condições operacionais do ICP OES com configuração axial. Razão sinal ruído para (a) Mg e (b) Zn.

Os resultados apresentados na TABELA 4.20 demonstram que a determinação por ICP OES em amostras de leite preparadas no meio dos reagentes TCA e PEP poderia ser conduzida sem decréscimo da exatidão analítica. O emprego de Y como padrão interno compensou potenciais interferências decorrentes do transporte das soluções dos diferentes reagentes avaliados ( $\text{HNO}_3$  0,14 mol L<sup>-1</sup>, TCA 100 g L<sup>-1</sup> e PEP 50 g L<sup>-1</sup>) para o plasma. As concentrações recuperadas baseiam-se na emissão dos padrões de calibração preparados em meio de  $\text{HNO}_3$  0,14 mol L<sup>-1</sup>. Dessa forma, através dos resultados obtidos, pode-se concluir que somente uma curva analítica (preparada em meio  $\text{HNO}_3$  0,14 mol L<sup>-1</sup>) seria necessária para determinação dos teores de Ca, Fe, Mg e Zn nas soluções de amostra obtidas nos procedimentos de digestão ácida assistida por MW, de precipitação ácida (TCA) e de hidrólise enzimática (PEP).

Nesse ponto da discussão, cabe comentar que a possibilidade de se empregar a enzima papaína no processo de hidrólise enzimática foi também avaliada. Essa opção foi investigada tendo em vista que essa enzima poderia ser obtida em farmácias de manipulação, agregando dessa forma um custo inferior ao procedimento de hidrólise enzimática. Porém os teores de Ca, Fe, Mg e Zn encontrados para a solução do branco desse reagente inviabilizou o emprego desse procedimento. Reagente de grau analítico para essa enzima também foi testado. Entretanto esse material apresentou baixa solubilidade, não sendo possível a obtenção de uma solução enzimática com concentração adequada.

#### 4.2.2. Análise do leite bovino – Uso dos reagentes TCA e PEP para determinação de Ca, Fe, Mg e Zn

Previamente à análise das amostras de leite *in natura*, leite integral UHT, e leite enriquecido com Fe UHT, foi avaliada a exatidão e a precisão da determinação empregando material de referência certificado NIST 8435 – Whole Milk Powder, digerido em sistema de microondas. Os resultados são apresentados na TABELA 4.21

**TABELA 4.21** – Teores de Ca, Fe, Mg e Zn baseados na matéria seca para amostra de material de referência certificado NIST 8435 – Whole Milk Powder.

<i>Elemento</i>	<i>Valor determinado</i>	<i>Valor Certificado</i>
Ca ( % m m <sup>-1</sup> )	0,968 ± 0,040*	0,922 ± 0,049
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	1,60 ± 0,08	1,8 ± 1,1
Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	798 ± 20	814 ± 76
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	24,3 ± 1,0	28,0 ± 3,1

\*Desvio padrão relativo baseado na amostra em triplicata (n = 3)

Conforme pode ser observado pelos dados da TABELA 4.21, os resultados obtidos foram concordantes com os teores certificados. Após isso, as soluções obtidas para as amostras de leite *in natura* e leite integral UHT foram analisadas conforme procedimento descrito na FIGURA 3.13. Os teores de Ca, Fe, Mg e Zn são apresentados na TABELA 4.22.

**TABELA 4.22** – Teores de Ca, Fe, Mg e Zn para as amostras de leite *in natura* e leite integral UHT preparadas através dos procedimentos de precipitação ácida, hidrólise enzimática e digestão assistida por MW.

Elemento	Ca (g L <sup>-1</sup> )		Fe (mg L <sup>-1</sup> )		Mg (mg L <sup>-1</sup> )		Zn (mg L <sup>-1</sup> )	
	<i>In-natura</i>	UHT	<i>In-natura</i>	UHT	<i>In-natura</i>	UHT	<i>In-natura</i>	UHT
Precipitação ácida	0,920 <sup>*</sup>	1,13	< 0,13	< 0,13	101	109	2,16	3,02
	± 0,020	± 0,04			± 4	± 6	± 0,02	± 0,33
Hidrólise enzimática	0,930	1,14	< 0,13	< 0,13	109	113	2,30	3,10
	± 0,030	± 0,02			± 3	± 4	± 0,07	± 0,04
Digestão assistida por MW	0,910	1,14	< 0,13	< 0,13	104	115	2,42	3,68
	± 0,050	± 0,02			± 6	± 2	± 0,08	± 0,27

\*Resultados estão expressos baseados na média e desvio padrão da amostra em triplicata (n = 3).

A recuperação quantitativa de Ca, Mg e Zn empregando os reagentes TCA e PEP sugerem que esses elementos estão presentes no leite bovino preferencialmente ionizados em solução ou associados ao fosfato de cálcio coloidal, que é responsável pela estabilização dos agregados de micelas de caseína. Os reagentes TCA e PEP atuam sobre a micela de caseína do leite bovino através de diferentes mecanismos. O precipitado produzido durante tratamento das amostras de leite com o reagente TCA corresponde a precipitação da caseína em seu ponto isoelétrico, não sendo promovidas clivagens das ligações peptídicas da seqüência de aminoácidos da micela de caseína. A enzima PEP desestabiliza a micela de caseína através da quebra de ligações peptídicas envolvendo resíduos de aminoácidos aromáticos (LEHNINGER, 1975). Essa modificação na estrutura primária da caseína foi responsável pela sua solubilização parcial em meio de PEP. Conseqüentemente, as espécies iônicas associadas com o fosfato de cálcio coloidal da caseína podem ser liberadas para solução após o tratamento das amostras de leite com TCA ou PEP.

Para essas amostras, a determinação de Fe não foi possível devido aos baixos teores encontrados nos digeridos. Considerando a diluição do preparo e o teor na amostra original, a concentração final de Fe encontrava-se abaixo do LOD apresentado pelo ICP OES. Para superar essa limitação, amostras de leite suplementadas com Fe foram empregadas para investigar o comportamento desse analito no complexo equilíbrio formado entre os componentes do leite. Recuperação de aproximadamente 100 % foi observada para Fe quando o procedimento de hidrólise enzimática foi implementado (TABELA 4.23). Esse resultado sugere que a enzima PEP é capaz de solubilizar o Fe presente no leite, diferentemente do comportamento observado para o reagente TCA. Portanto, é possível inferir que o Fe não se encontra associado ao fosfato de cálcio coloidal da micela de caseína (GAUCHERON *et al.*, 1997).

**TABELA 4.23** – Teores de Ca, Fe, Mg e Zn para a amostra de leite suplementada com Fe preparada através dos procedimentos de precipitação ácida, hidrólise enzimática e digestão assistida por MW.

<i>Elemento</i>	<i>Ca (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Fe (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mg (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Zn (mg L<sup>-1</sup>)</i>
Hidrólise enzimática	1,13 ± 0,05	13,5 ± 0,6	108 ± 5	6,28 ± 0,30
Precipitação ácida	1,19 ± 0,04	0,464 ± 0,027	103 ± 6	7,10 ± 0,30
Digestão assistida por MW	1,15 ± 0,05	13,8 ± 0,5	116 ± 5	7,20 ± 0,42

\* Resultados baseados na média e desvio padrão da amostra em triplicata (n = 3).

O reagente TCA causa a precipitação do Fe e a liberação quantitativa dos íons Ca, Mg e Zn. Para confirmar essa afirmação, o precipitado produzido a partir da amostra de leite suplementado com Fe, foi digerido empregando o programa de aquecimento descrito na Seção 3.2.1. O percentual de recuperação dos elementos presentes no precipitado produzido no tratamento com TCA, foi determinado considerando-se a massa de 2,29 g de proteína desnaturada, produzida a partir de 20 mL da amostra de leite enriquecido com Fe. A partir dos teores de Ca, Fe, Mg e Zn, determinados para o digerido do precipitado, foi estimada a concentração desses elementos na solução de leite, conforme demonstrado a seguir para o elemento Ca:

$$\begin{array}{r}
 0,472 \text{ g Ca} \quad \frac{\quad}{\quad} \quad 1000 \text{ g precipitado} \\
 \times \quad \frac{\quad}{\quad} \quad 2,29 \text{ g precipitado} \\
 \hline
 x = 1,08 \times 10^{-3} \text{ g Ca}
 \end{array}$$

Estimativa em solução =  $1,08 \times 10^{-3}$  g Ca/20 mL de amostra =  $0,054 \text{ g L}^{-1}$  Ca

**TABELA 4.24** – Recuperação dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn no precipitado obtido para o tratamento por precipitação ácida da amostra de leite enriquecida com Fe.

	Ca (g L <sup>-1</sup> )	Fe (mg L <sup>-1</sup> )	Mg (mg L <sup>-1</sup> )	Zn (mg L <sup>-1</sup> )
Precipitado <sup>a</sup>	0,472	118	61,8	2,64
Estimativa em solução <sup>b</sup>	0,0540	13,5	7,08	0,302
Concentração em solução	1,15	13,8	116	7,20
% Recuperação	4,7	98	6,1	4,2

<sup>a</sup>Concentração baseada na matéria seca: Ca – g kg<sup>-1</sup>; Fe, Mg e Zn – mg kg<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Concentração estimada considerando massa de precipitado igual a 2,29 g produzida a partir de 20 mL de leite.

Os teores encontrados revelaram que aproximadamente 98 % do Fe se encontrava no precipitado produzido. Para os elementos Ca, Mg e Zn, a taxa de recuperação apresentou-se próxima a 5 %. Vale ressaltar que previamente à digestão do precipitado, esse havia sido lavado com água desionizada e seco em estufa a 60°C durante 24 h.

A forte afinidade do elemento Fe pela micela de caseína é atribuída aos agrupamentos de resíduos fosforilados da seqüência de amino ácidos dessa proteína do leite (GAUCHERON *et al.*, 1997). As distintas frações de caseína possuem diferentes graus de fosforalização. A enzima PEP quebra as ligações peptídicas da proteína produzindo peptídeos ou cadeias polipeptídicas nos quais o Fe ainda se encontra associado ao resíduo fosforilado. O teor total de Fe recuperado com a enzima PEP sugere que este elemento se encontra associado com os peptídeos ou cadeias de peptídeos produzidos na hidrólise enzimática.

As concentrações aproximadas apresentadas pelas amostras de leite *in natura*, leite integral UHT e leite suplementado com Fe UHT, sugerem que o tratamento térmico utilizado para preservação da amostra ou o processo de fortificação do leite com Fe não afeta a distribuição mineral ao longo dos diferentes compartimentos do leite, contrariamente ao observado para a distribuição de massas moleculares das proteínas (CONI *et al.*, 1996).

### 4.3. Preparo automatizado da amostra – Sistema em fluxo sob altas temperatura e pressão

#### 4.3.1. Avaliação da configuração do sistema em fluxo

A avaliação do sistema em fluxo para decomposição das amostras de sucos de frutas sob altas temperatura e pressão foi iniciada investigando-se as condições operacionais para aquecimento e pressurização do sistema. Para promover o aumento de pressão em linha foram investigados três capilares restritores: 1) capilar PEEK (l = 30 cm e d.i. = 250 μm); 2) capilar de sílica fundida (l = 45 cm e 75 μm d.i.), e 3) capilar de sílica fundida (l = 45 cm e 50 μm d.i.). Baseando-se na Lei de Hagen-Poiseuille, proposta para descrever o escoamento laminar de fluídos, sabia-se que a pressão gerada seria diretamente proporcional à vazão da solução transportadora e ao comprimento do capilar restritor, e inversamente proporcional ao diâmetro interno do capilar restritor, conforme observado através da expressão a seguir que correlaciona a vazão com essas variáveis:

$$\Phi = (\pi r^4 / 8 \eta) \times (\Delta p / \Delta x)$$

Onde:  $\Phi$  – vazão; r – raio do capilar restritor;  $\eta$  - viscosidade da solução;  $\Delta p$  – pressão imposta e  $\Delta x$  – comprimento do capilar restritor.

O capilar restritor de PEEK proporcionou pressão inferior a 5 atm quando a vazão do fluxo transportador se situava entre 0,50 e 0,10 mL min<sup>-1</sup>. Apesar desse capilar apresentar-se como o mais adequado para o acoplamento no sistema em fluxo, devido a seu diâmetro externo coincidir com o diâmetro interno da anilha do conector, sua utilização foi abandonada. Para se alcançar a pressão de trabalho desejada com esse capilar (acima de 50 atm) seria necessário empregar uma vazão do fluxo transportador superior ao intervalo em estudo, fato

que reduziria significativamente o tempo de residência da amostra no sistema em fluxo, comprometendo assim a eficiência de decomposição. As pressões obtidas para os capilares restritores de sílica fundida (d.i. = 75 ou 50  $\mu\text{m}$ ), no intervalo de vazão do fluxo transportador 0,10 – 0,50  $\text{mL min}^{-1}$ , podem ser observadas na TABELA 4.25.

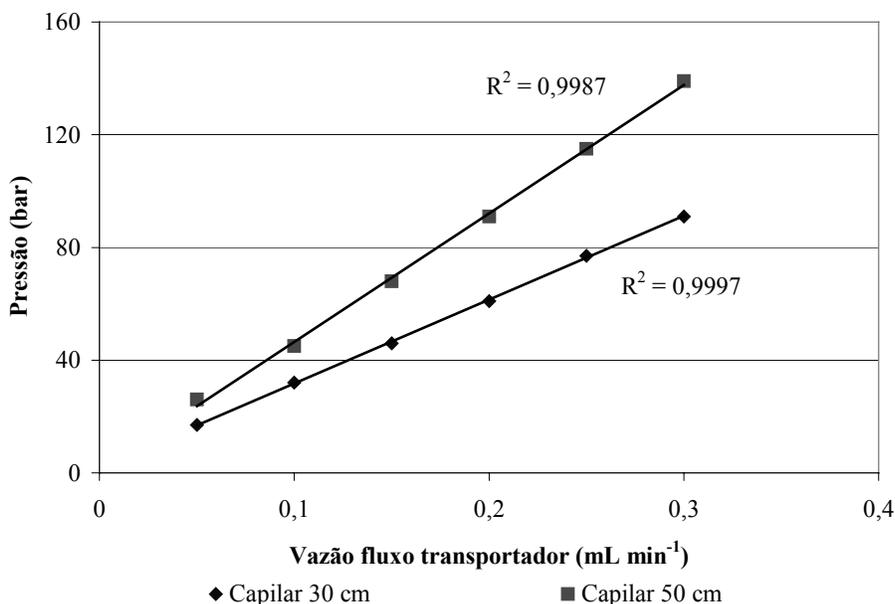
**TABELA 4.25** – Pressão gerada em linha no sistema em fluxo em função do diâmetro interno do capilar de sílica fundida e da vazão da solução transportadora.

<i>Vazão da solução transportadora (<math>\text{mL min}^{-1}</math>)</i>	<i>Pressão (atm)</i>	
	<i>d.i. = 75 <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>d.i. = 50 <math>\mu\text{m}</math></i>
0,10	9	44
0,20	16	84
0,30	23	125
0,40	32	148
0,50	40	-*

\*Pressão acima do valor de segurança programado para o cabeçote da bomba de HPLC (160 atm).

A partir dos resultados apresentados na TABELA 4.25, optou-se em trabalhar com o capilar de sílica fundida com d.i. = 50  $\mu\text{m}$  em função da maior pressão imposta ao sistema. Visando não sacrificar a eficiência da digestão pelo decréscimo do tempo de residência da amostra no sistema em fluxo, procurou-se realizar todos os ensaios de decomposição empregando vazão para solução transportadora inferior a 0,50  $\text{mL min}^{-1}$ . No sistema desenvolvido foi empregada uma bobina digestora que possuía comprimento de 45 cm e d.i. 500  $\mu\text{m}$ . Com essas dimensões, era observado um volume interno de  $\sim 90 \mu\text{L}$  para a bobina digestora, o que proporcionava para cada fração da amostra igual a esse volume, um tempo de aquecimento de 54, 27 e 18 s, quando as vazões de 0,10; 0,20 e 0,30  $\text{mL min}^{-1}$  eram empregadas, respectivamente. Dessa forma, ao ser injetado no percurso analítico do sistema em fluxo um volume de amostra igual a 500

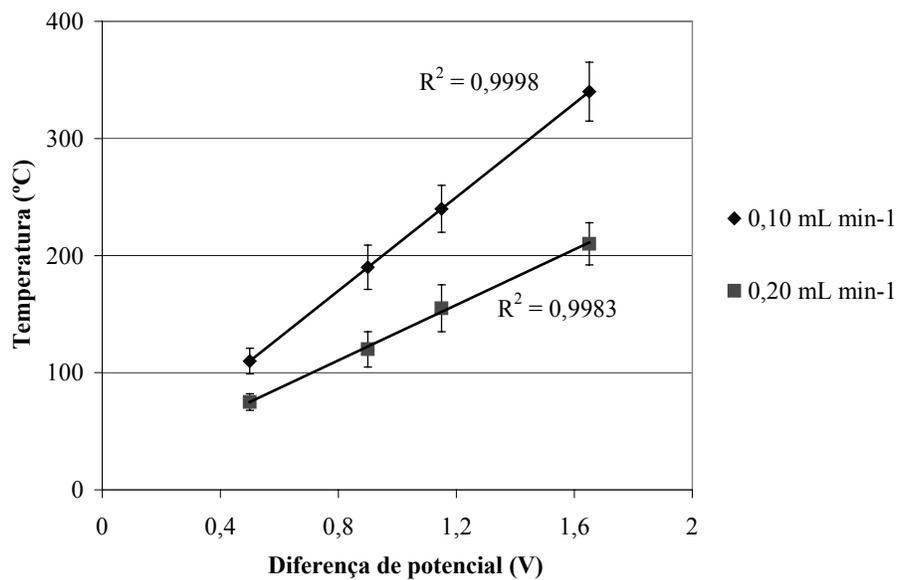
$\mu\text{L}$ , era observado um tempo de residência de aproximadamente 150 s para vazão de  $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ . Para esse intervalo de vazão também foi investigado o efeito do comprimento do capilar restritor de sílica fundida sobre a pressão imposta no sistema em fluxo (FIGURA 4.23).



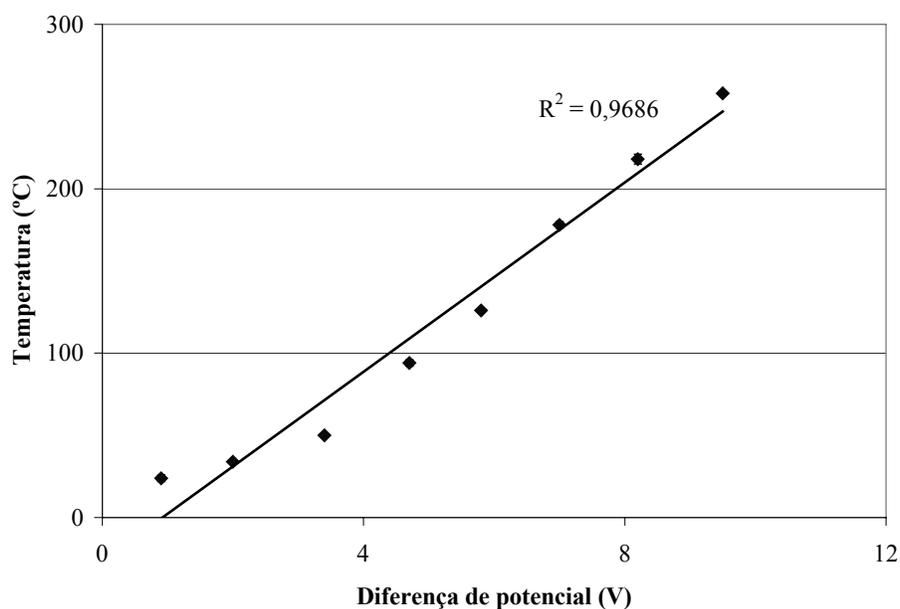
**FIGURA 4.23** – Pressão imposta ao sistema em fluxo em função da vazão da solução transportadora e do comprimento do capilar restritor.

Após a escolha do capilar restritor e do intervalo de vazões que seriam empregados, iniciou-se a avaliação do aquecimento resistivo do fluxo transportador. Para isso, o capilar de aço inoxidável foi inserido no interior de um tubo de alumina no qual se encontrava enrolada uma resistência elétrica de Fe/Cu. A diferença de potencial foi aplicada ao sistema conectando-se os terminais do transformador diretamente à superfície do capilar metálico ou através da resistência que envolvia o tubo de alumina. Em ambos os casos o fluxo transportador da amostra foi aquecido condutivamente. As FIGURAS 4.24

e 4.25 demonstram a relação entre a temperatura observada e a diferença de potencial aplicada para as duas configurações de sistema avaliadas.



**FIGURA 4.24** – Perfil de temperatura em função da diferença de potencial. Aplicação direta da ddp sobre o capilar de aço inoxidável.



**FIGURA 4.25** – Perfil de temperatura em função da diferença de potencial. Aplicação da ddp sobre a resistência de Fe/Cu. Vazão da solução transportadora =  $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ .

A aplicação direta da ddp ao capilar de aço inoxidável gerou um aquecimento do fluxo transportador à temperaturas compreendidas entre 80 e 350°C. Através do perfil apresentado na FIGURA 4.24, pode-se observar que o valor de temperatura monitorado para o sistema é dependente da vazão da solução transportadora. À medida que se aumenta a vazão da solução transportadora, e por conseqüência diminui o tempo de residência da amostra no percurso analítico, é necessário aumentar a ddp aplicada ao capilar metálico para se manter a mesma temperatura de trabalho. Além dessa observação, a FIGURA 4.24 apresenta uma variação ao redor de 10 % para todas as temperaturas monitoradas. Isso ocorreu em função do não isolamento eletrostático do termopar que se encontrava acoplado ao centro do tubo capilar de aço inoxidável. Comparando-se as escalas de ddp dos gráficos apresentados nas FIGURAS 4.24 e 4.25, também é possível observar que maiores valores de

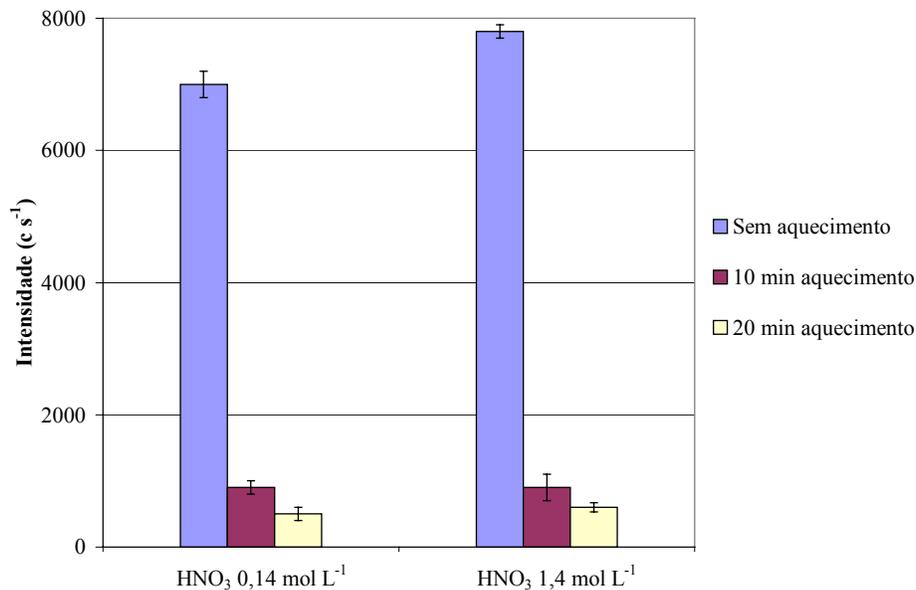
voltagem deveriam ser aplicados para atingir a mesma temperatura quando a utilização da resistência de Fe/Cu foi considerada. Isso se deve à diferente resistividade apresentada pelo capilar de aço inoxidável e pela resistência de Fe/Cu. Levando em consideração a instabilidade das medidas de temperatura observada com a aplicação direta da ddp ao capilar metálico, optou-se por trabalhar com a resistência de Fe/Cu, isolando eletrostaticamente o termopar para que as medidas não sofressem influência da ddp aplicada ao sistema.

Nesse ponto da discussão, cabe ressaltar que para a medição de temperatura foi estabelecido que o valor monitorado no centro do capilar de aço inoxidável representaria uma média das temperaturas de entrada e saída do fluxo transportador na bobina digestora. Isso ocorreu em função da inviabilidade do monitoramento pontual do percurso compreendido pelos 45 cm da bobina digestora. Além disso, foi constatada a importância do resfriamento do fluxo transportador após passagem da zona de amostra pela bobina digestora. Quando esse resfriamento não se encontrava implementado, à medida que a temperatura da bobina digestora era aumentada, observava-se a formação de vapores da solução do fluxo transportador na saída do sistema, gerando assim um aerossol térmico. Isso acarretava em uma redução da pressão imposta ao sistema, que estava sendo monitorada através do visor da bomba de HPLC. Esse comportamento é justificado pela maior facilidade encontrada em transportar os vapores da solução do fluxo transportador através do capilar restritor em relação ao líquido da mesma solução. Para resolver essa limitação foi empregado um segundo capilar de aço inoxidável imerso em um béquer contendo água. Esse arranjo foi eficiente para promover a troca de calor entre o fluxo transportador e o ambiente, tendo em vista a vazão empregada ( $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ ) e as dimensões do sistema, que conjuntamente proporcionavam rápida dissipação do calor gerado. Ao longo de um período de 1-h de operação do sistema em fluxo não foi observado aquecimento da água presente no béquer. Em função dessa rápida dissipação de calor inerente ao sistema desenvolvido, foi tomado o cuidado de se

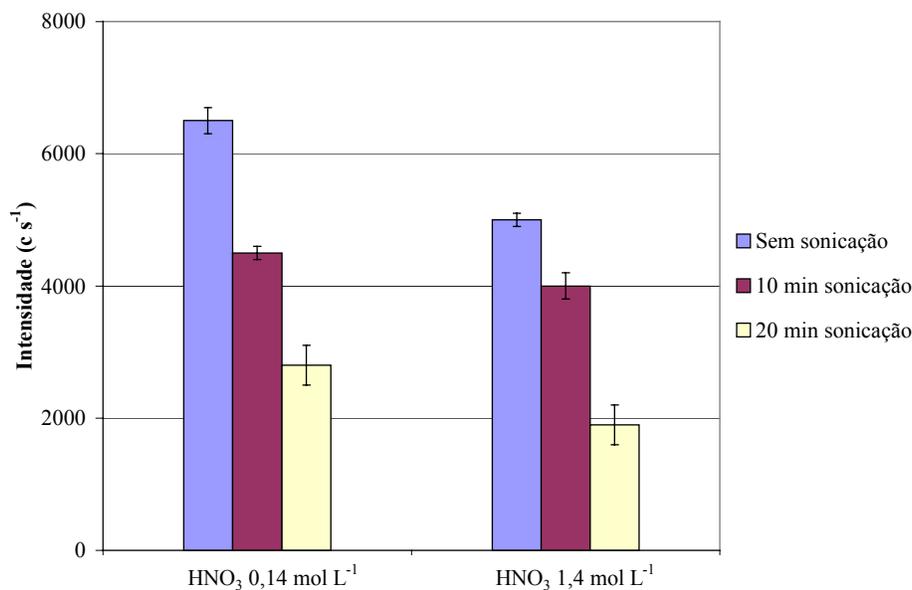
isolar termicamente a bobina digestora com um revestimento de lã de vidro. Dessa forma a temperatura manteve-se constante ao longo dos experimentos. Inicialmente foram fixados como parâmetros de partida a vazão da solução transportadora igual  $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ , o que gerava pressão no sistema igual a 60 atm, quando empregado capilar de sílica fundida de 30 cm, e temperatura igual a  $200^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.2. Eficiência de decomposição

A avaliação da eficiência de decomposição do sistema em fluxo (FIGURA 3.16) envolveu a determinação dos teores de RCC nos digeridos obtidos. Para correta determinação desses valores desgaseificação dos digerido foi implementado. Isso decorreu do fato do sistema em fluxo ser considerado um sistema fechado, o que levava ao aumento da tendência dos gases gerados na oxidação da matéria orgânica permanecerem dissolvidos no digerido. Para execução dessa tarefa foram avaliados dois procedimentos: sonicação e aquecimento do digerido em banho com temperatura controlada. Para isso, foram preparadas soluções ácidas com  $\text{CO}_2$  dissolvido, sendo essas soluções posteriormente submetidas a sonicação e aquecimento em banho com temperatura controlada a  $100^\circ\text{C}$ , para eliminação do gás dissolvido. A solução original e as soluções resultantes dos processos de desgaseificação avaliados foram analisadas quanto aos teores de C, empregando um ICP OES com configuração radial. A eficiência de cada processo pode ser visualizada nas FIGURA 4.26 e 4.27.



**FIGURA 4.26** – Efeito do tempo de aquecimento a 100°C das soluções ácidas com  $\text{CO}_2$  dissolvido sobre as intensidades dos sinais de emissão medidos para C.



**FIGURA 4.27** – Efeito do tempo de sonicação das soluções ácidas com  $\text{CO}_2$  dissolvido sobre as intensidades dos sinais de emissão medidos para C.

Como pode ser observado na FIGURA 4.27, o processo de sonicação foi relativamente ineficiente para desgaseificar a solução contendo  $\text{CO}_2$  adsorvido.

Dessa forma, para todas as decomposições executadas posteriormente, foi implementado o processo de desgaseificação baseado no aquecimento em banho com temperatura controlada a 100°C.

Para confirmar a importância da desgaseificação na determinação da eficiência de decomposição, foi também analisado o teor de RCC em um digerido obtido após processamento das soluções contendo 5,0 % m v<sup>-1</sup> C, sob a forma de uréia, preparadas em meio aquoso e em HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Uréia foi escolhida como o primeiro composto orgânico a ser empregado para avaliar o desempenho do sistema em fluxo, em função desse reagente possuir um único átomo de C e apresentar-se como um composto de menor complexidade frente às demais fontes de carbono avaliadas. Caso o sistema de decomposição fosse ineficiente, o processamento de 500 µL dessas soluções através da configuração proposta e posterior coleta em um frasco volumétrico de 5 mL, resultaria em uma solução com teor de carbono dissolvido igual a 1.000 mg L<sup>-1</sup>. A diferença em relação a esse valor indicaria a eficiência de decomposição do sistema em fluxo em desenvolvimento. Os resultados observados para esse experimento conduzido a 60 atm e 200 °C, são apresentados na TABELA 4.26. Para efeito comparativo, a análise foi executada no digerido original e na solução resultante do processo de desgaseificação.

**TABELA 4.26** – Teor de carbono residual para digeridos de uréia.

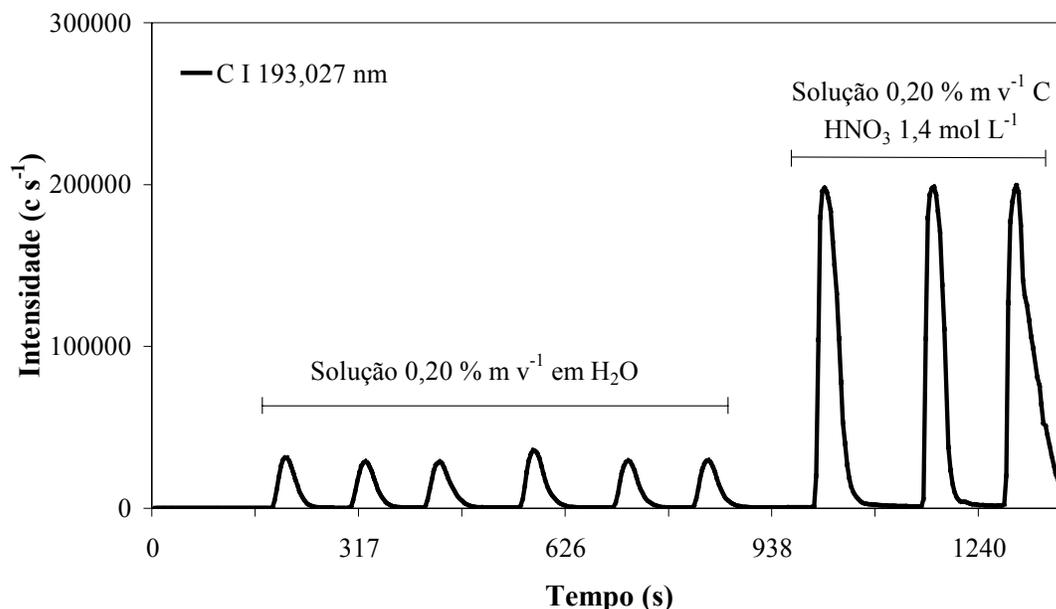
<i>Meio reacional</i>	<i>RCC (mg L<sup>-1</sup>)</i>	
	<i>Sem desgaseificação</i>	<i>Com desgaseificação</i>
H <sub>2</sub> O	1855 ± 18	749 ± 19
HNO <sub>3</sub> 1,4 mol L <sup>-1</sup>	1318 ± 35	35,0 ± 7,5

Resultados baseados na amostra em triplicata (n = 3)

Através dos resultados apresentados na TABELA 4.26, pode-se inferir que a eficiência de decomposição do sistema em fluxo para uréia, quando empregado o HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>, apresentou-se ao redor de 97 %. Ligeira redução no teor de

carbono dissolvido no digerido de uréia em meio aquoso também pode ser observada. Esse fato veio confirmar a hipótese inicial, de que a uréia seria um composto orgânico de fácil decomposição, pois somente o emprego de elevadas temperatura e pressão (200 °C e 60 bar) foi suficiente para que fosse observada redução de aproximadamente 25 % no teor de carbono em solução. Os resultados encontrados também confirmaram a necessidade do emprego da etapa de desgaseificação, previamente à determinação do teor de RCC. Os valores de RCC observados para os digeridos em meio aquoso, não submetidos à desgaseificação, apresentaram-se superiores aos teores esperados. Provavelmente, isso se deveu a formação de CO<sub>2</sub> durante a decomposição parcial da uréia, que posteriormente ficou solubilizado no digerido. Esse CO<sub>2</sub> dissolvido, comparativamente à uréia, apresentaria maior facilidade para introdução no plasma durante a nebulização pneumática. Dessa forma seriam encontradas distintas eficiências para a introdução de compostos contendo C no plasma quando comparada a nebulização dos digeridos (uréia + CO<sub>2</sub>) e dos padrões de calibração utilizados na determinação de RCC (uréia). O mesmo comportamento foi observado para os digeridos em meio de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>.

A distinta eficiência de introdução dos compostos de C do digerido em meio aquoso e dos obtidos em meio ácido, foi também confirmada através do monitoramento em linha da emissão para C, durante o processamento das soluções de uréia contendo 0,20 % m v<sup>-1</sup> C em meio aquoso e em HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> (FIGURA 4.28). Para isso, o capilar restritor foi conectado diretamente ao nebulizador concêntrico do ICP OES.

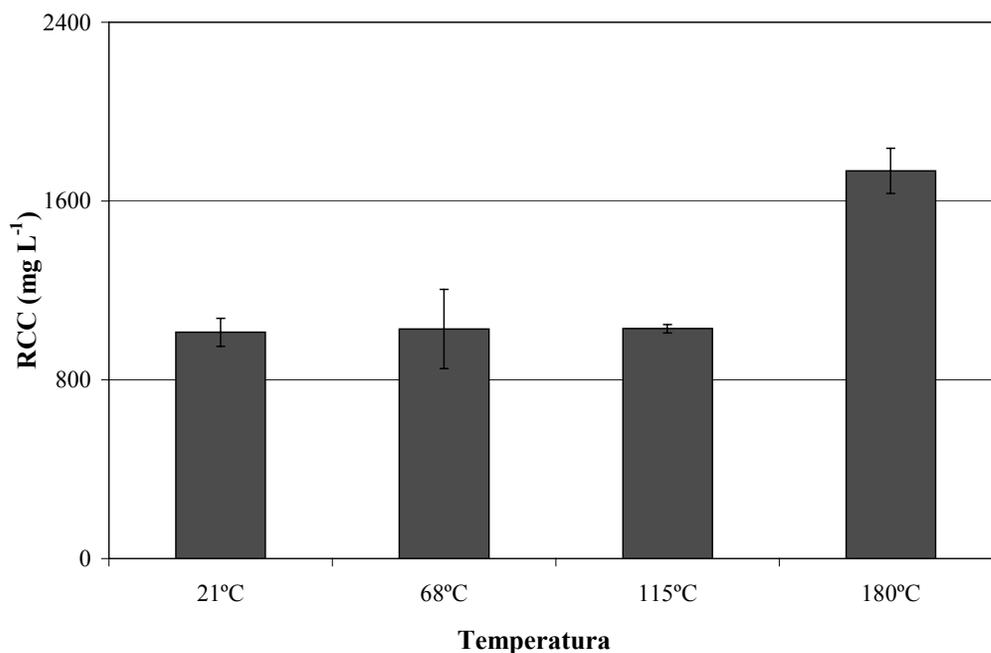


**FIGURA 4.28** – Sinal de emissão para linha C I 193,027 nm durante processamento das soluções contendo 0,20 % m v<sup>-1</sup> de C em meio aquoso e em meio de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>.

Apesar do plasma não ser extinto pelos vapores gerados na decomposição, a implementação da digestão e posterior análise em linha das amostras não seria possível de se realizar em face dos vapores gerados na decomposição poderem interferir no processo de nebulização pneumática. Os vapores deveriam ser previamente removidos da solução transportadora empregando interface adequada ou nebulização ultrassônica, conforme descrito por JACOB & BERNDT (2002). Desborbulhador e câmara de difusão gasosa foram avaliados para remover os vapores da decomposição, entretanto ambos procedimentos não atuaram eficientemente uma vez que a intensidade de emissão para C dos digeridos se manteve constante com o uso ou na ausência destes dispositivos no sistema em fluxo. Em face da indisponibilidade do nebulizador ultrassônico, optou-se pela realização das medidas no modo “off-line”.

Para complementar essa discussão a respeito da possibilidade da uréia estar sendo degradada em meio aquoso, quando o sistema estava operando a 60

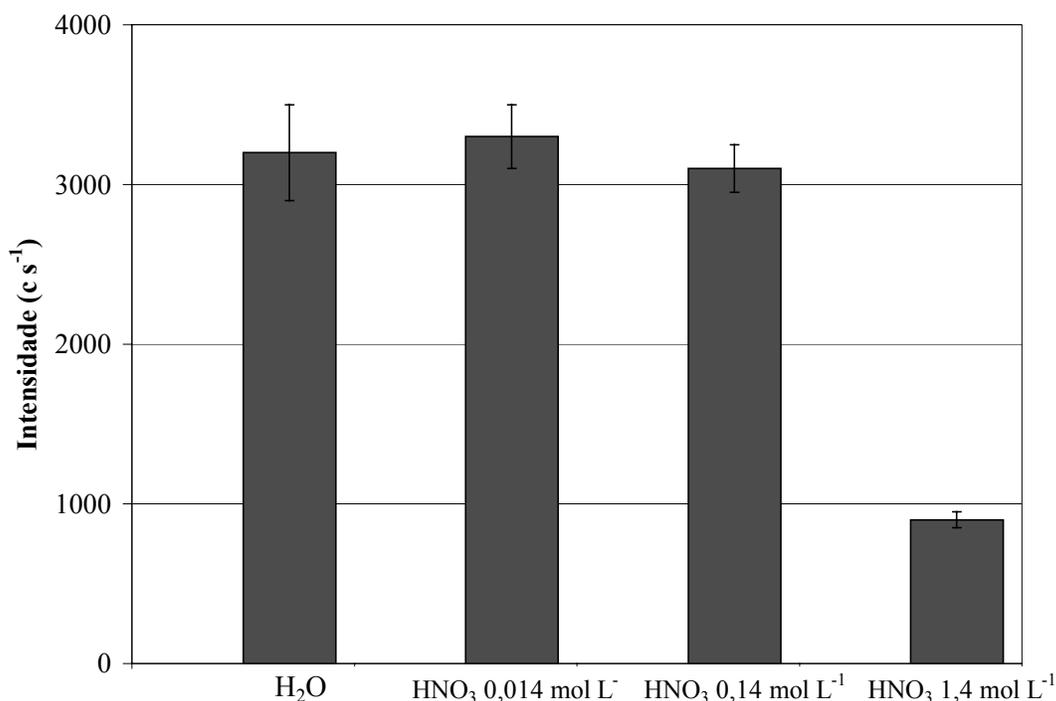
bar e 200°C, foi realizado experimento no qual a temperatura de digestão foi variada gradativamente. Em seguida o teor de C foi determinado nos digeridos em meio aquoso, previamente ao processo de desgaseificação. Os resultados para esse experimento podem ser observados na FIGURA 4.29.



**FIGURA 4.29** – Concentração recuperada para solução de uréia processada no sistema em fluxo operando a 60 bar em diferentes temperaturas. Valor teórico = 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Como observado através da FIGURA 4.29, apesar da fonte de carbono ser preparada em meio aquoso, temperaturas acima de 180°C proporcionaram alterações na composição dos compostos presentes em solução. Essa alteração para o composto orgânico dissolvido em solução, observada para os extratos de uréia em meio aquoso, trouxe dúvidas à respeito da concentração mínima de ácido que poderia ser utilizada para produzir o decréscimo do teor de RCC nos digeridos. Foram então preparadas soluções de uréia em meio de HNO<sub>3</sub> 0,014; 0,14 e 1,4 mol L<sup>-1</sup>, sendo essas soluções posteriormente processadas no sistema

em fluxo e desgaseificadas previamente as determinações de C por ICP OES. Os resultados para esse experimento podem ser observados na FIGURA 4.30.



**FIGURA 4.30** – Comparação entre as intensidades de emissão dos digeridos obtidos para solução de 5,0 % m v<sup>-1</sup> C em meio 0,014; 0,14 e 1,4 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> com o valor observado para solução 1000 mg L<sup>-1</sup> C em meio aquoso.

Comparando-se os resultados obtidos para as diferentes concentrações ácidas com o valor de RCC obtido para a solução de uréia em meio aquoso, observa-se que somente a concentração 1,4 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> promoveu um decréscimo significativo no teor de RCC dos digeridos. Para as outras concentrações ácidas os valores de RCC praticamente permaneceram constantes. Desse modo, nos experimentos posteriores foi utilizada a concentração de HNO<sub>3</sub> de 1,4 mol L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos para a decomposição das soluções de sacarose, glicose, ácido cítrico e TRIS, todas apresentando concentração igual a 5,0 % m v<sup>-1</sup> e preparadas em meio de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> são mostrados na TABELA

4.27. Todos os experimentos foram realizados a 200 °C e 60 atm. Vale também lembrar que as soluções preparadas em meio aquoso não foram processadas no sistema em fluxo, sendo sua intensidade utilizada como valor de referência.

**TABELA 4.27** – Eficiência de decomposição para diferentes compostos orgânicos em meio  $\text{HNO}_3$  1,4 mol  $\text{L}^{-1}$ .

<i>Composto orgânico</i>	<i>Carbono original</i> ( <i>mg L<sup>-1</sup></i> )	<i>RCC Digerido</i> ( <i>mg Ls<sup>-1</sup></i> )	<i>Eficiência</i> (%)
Sacarose	1.000	121	88
Glicose	1.000	105	89
Ácido cítrico	1.000	199	80
TRIS	1.000	190	81

Em geral, a eficiência de decomposição para as fontes de carbono testadas apresentou-se ao redor de 85 %. Para aumentar a extensão da decomposição foi avaliado o uso do agente oxidante auxiliar  $\text{H}_2\text{O}_2$  em uma concentração 3,0 % ( $\text{v v}^{-1}$ ). Os resultados são descritos na TABELA 4.28.

**TABELA 4.28** – Eficiência de decomposição para diferentes compostos orgânicos em meio  $\text{HNO}_3$  1,4 mol  $\text{L}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,0 %  $\text{v v}^{-1}$ .

<i>Composto orgânico</i>	<i>Carbono original</i> ( <i>mg L<sup>-1</sup></i> )	<i>RCC digerido</i> ( <i>mg L<sup>-1</sup></i> )	<i>Eficiência</i> (%)
Sacarose	1.000	29,0	97
Glicose	1.000	35,3	96
Uréia	1.000	2,28	100
TRIS	1.000	128	87

O uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentou a eficiência de decomposição das fontes de carbono avaliadas para aproximadamente 95 %. Outras classes de compostos, como aminoácidos, proteínas de alto peso molecular, gorduras, e etc, deveriam ser avaliadas para testar o desempenho do sistema em fluxo. Entretanto devido à

indisponibilidade desses reagentes no laboratório, optou-se por avaliar o desempenho do sistema em fluxo empregando amostras orgânicas reais. Essa avaliação foi iniciada empregando amostras de sucos de frutas preparadas em meio de  $\text{HNO}_3$   $1,4 \text{ mol L}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,0 % (v v<sup>-1</sup>) em diferentes percentagens de diluição. Os resultados para esse experimento podem ser observados na TABELA 4.29.

**TABELA 4.29** – Eficiência de decomposição para as amostras de sucos de fruta.

<i>Amostra</i>	<i>Carbono original (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>RCC digerido (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Eficiência (%)</i>
Suco de uva			
Diluição 0,5:10	3.253	15	100
Diluição 1:10	7.326	514	93
Diluição 5:10	30.573	11.269	63
Suco de laranja			
Diluição 0,5:10	2.662	121	95
Diluição 1:10	4.946	272	94
Diluição 5:10	23.205	6.042	74

Através dos resultados da TABELA 4.29 pode-se observar que o aumento no teor de carbono original presente na amostra acarreta em um decréscimo da eficiência de decomposição. Além disso, os digeridos de suco de uva apresentaram maiores teores de RCC em relação à amostra de suco de laranja. Provavelmente esse comportamento está associado à presença de compostos flavonóides de difícil decomposição em maiores teores no suco de uva.

De modo a possibilitar a utilização de menores fatores de diluição da amostra (5:10), sem que a eficiência de decomposição fosse comprometida, foi avaliado o efeito da temperatura de digestão sobre o teor de RCC recuperado para digeridos de suco de abacaxi. Os resultados podem ser observados na TABELA 4.30.

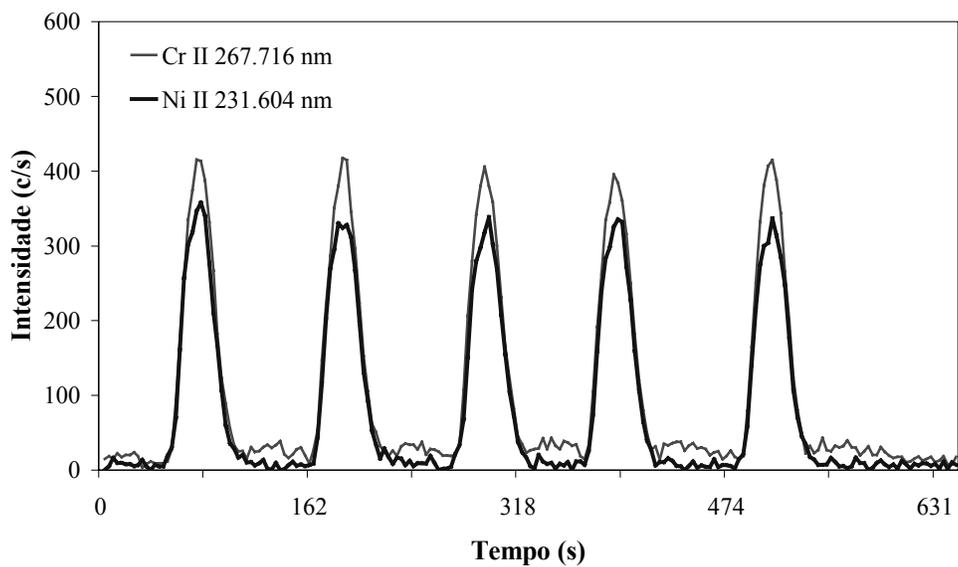
**TABELA 4.30** – Efeito da temperatura na eficiência de decomposição de amostra de suco de abacaxi.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Carbono original (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>RCC digerido (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Eficiência (%)</i>
200	9.325	1709 ± 120	82
250	9.325	758 ± 68	92
300	9.325	171 ± 9	98

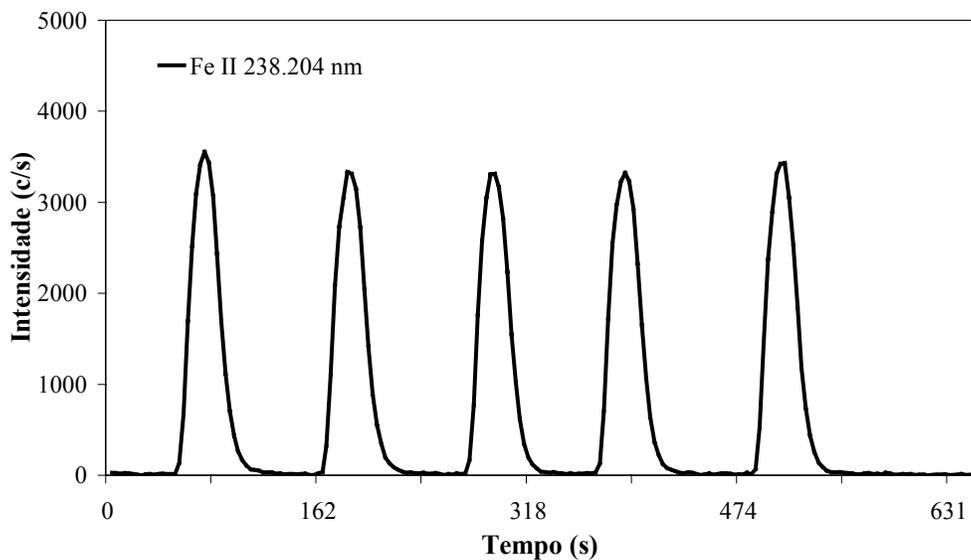
Aumentando-se a temperatura de decomposição pode-se verificar que o teor de RCC decaiu significativamente. Cabe ressaltar que esses resultados foram obtidos para a amostra de suco de abacaxi, que possui menor teor de C original. Entretanto, a tendência em melhora na eficiência de decomposição deve ser observada para as demais amostras em analogia ao observado para trabalhos nos quais energia MW foi empregada para promover o aquecimento (PICHLER *et al.*, 1999; WASILEWSKA *et al.*, 2002).

Durante a decomposição das amostras de suco, foi observado aumento da pressão ao longo do processamento da amostra devido aos gases gerados no interior da bobina digestora. Após a passagem da zona de amostra pela configuração do sistema em fluxo, a pressão do sistema retornou ao valor observado para a condição experimental na qual a amostra não se encontrava presente no percurso analítico (60 atm). Cabe ressaltar que o sistema de aquecimento empregado possibilita somente o monitoramento dos valores de temperatura, não interagindo no controle desse parâmetro operacional.

Paralelamente a avaliação do sistema quanto a eficiência de decomposição, foi também verificada a contaminação das amostras por elementos que poderiam ser corroídos a partir da bobina digestora de aço inoxidável. Para isso foi monitorada em linha a emissão dos elementos majoritários do aço inoxidável (Cr, Fe e Ni), durante o processamento da solução de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>. O perfil obtido para esse experimento pode ser observado na FIGURAS 4.31 e 4.32.



**FIGURA 4.31** – Sinal de emissão monitorado nas linhas Cr II 267,716 e Ni II 231,604 nm após o processamento da solução de  $\text{HNO}_3$  1,4 mol  $\text{L}^{-1}$ .



**FIGURA 4.32** – Sinal de emissão monitorado na linha Fe II 238,204 nm após o processamento da solução de  $\text{HNO}_3$  1,4 mol  $\text{L}^{-1}$ .

O monitoramento revelou contaminação da solução do branco para os elementos Cr, Fe e Ni. Essa lixiviação foi confirmada pela análise dos digeridos obtidos após processamento de 500  $\mu\text{L}$  de solução oxidante composta por  $\text{HNO}_3$  1,4  $\text{mol L}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,0 % v v<sup>-1</sup>. Esse resultado é apresentado na TABELA 4.31.

**TABELA 4.31** – Teores de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn no branco analítico obtido após processamento no sistema em fluxo de 500  $\mu\text{L}$  de solução composta por  $\text{HNO}_3$  1,4  $\text{mol L}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,0 % v v<sup>-1</sup>.

<i>Elemento</i>	<i>Replicatas (mg L<sup>-1</sup>)</i>			<i>Média ± desvio padrão</i>
Ca	< 9,8	< 9,8	< 9,8	-*
Cr	1,57	1,54	1,32	1,47 ± 0,13
Cu	< 1,9	< 1,9	< 1,9	-
Fe	1,96	1,68	1,75	1,80 ± 0,14
K	0,51	0,50	0,53	0,51 ± 0,01
Mg	< 0,79	< 0,79	< 0,79	-
Mn	< 2,8	< 2,8	< 2,8	-
Na	0,12	0,14	0,10	0,12 ± 0,02
Ni	1,47	1,48	1,62	1,52 ± 0,08
Zn	< 37	< 37	< 37	-

\*Concentração inferior ao LOD em  $\mu\text{g L}^{-1}$

Conforme observado na FIGURAS 4.31 e 4.32, e na TABELA 4.31, o processo de corrosão demonstra-se constante durante o processamento das alíquotas das amostras no sistema em fluxo. Dessa forma, torna-se possível subtrair essa contaminação daquela determinada para a amostra. Para que resultados confiáveis sejam obtidos, a concentração desses elementos na amostra original deve ser considerada, ou seja, caso o teor de Cr, Fe e Ni na amostra seja inferior à contaminação decorrente de seu processamento no sistema em fluxo, a quantificação desses elementos se torna comprometida. Os teores de Na e K determinados na solução do branco podem refletir contaminação proveniente do capilar de sílica fundida. Entretanto essa contaminação foi baixa, não

comprometendo a quantificação desses elementos, conforme pode ser visualizado na TABELA 4.32, na qual são apresentados os resultados obtidos na análise dos digeridos das amostras de sucos de abacaxi, de laranja e de uva, obtidos após utilização do sistema em fluxo e de forno de MW, respectivamente. Cabe ressaltar que no sistema em fluxo foram empregadas temperatura igual a 300°C e pressão de 60 atm.

**TABELA 4.32** – Teores de Ca, K, Mg e Na determinados para os digeridos das amostras de sucos obtidos através do processamento no sistema em fluxo desenvolvido e através do uso de forno de MW.

<i>Amostra</i>	<i>Ca (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>K (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mg (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Na (mg L<sup>-1</sup>)</i>
Suco de laranja				
Sistema em fluxo	7,90 ± 0,10	55,9 ± 1,0	5,45 ± 0,80	148 ± 3
Forno MW	8,20 ± 0,01	56,8 ± 0,8	5,00 ± 0,40	142 ± 1
Suco de abacaxi				
Sistema em fluxo	8,20 ± 0,05	56,0 ± 2,0	4,50 ± 0,50	97,9 ± 1,0
Forno MW	8,12 ± 0,01	58,0 ± 0,4	4,76 ± 0,04	98,5 ± 2,2
Suco de uva				
Sistema em fluxo	33,2 ± 0,5	87,1 ± 3,0	21,0 ± 0,1	11,8 ± 0,5
Forno MW	32,6 ± 0,2	89,4 ± 4,4	21,2 ± 0,3	10,7 ± 0,3

Através da TABELA 4.32 pode ser observada uma concordância entre os valores determinados para Ca, K, Mg e Na para os digeridos de sucos obtidos na decomposição no sistema em fluxo e para aquela realizada em forno de MW equipado com frascos pressurizados. A quantificação dos elementos Cu, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn não possível de ser realizada tendo em vista a fato da concentração final desses elementos em solução se encontrar abaixo do LOD apresentado pelo ICP OES radial.

Além da contaminação do digerido, o processo de corrosão dos constituintes da liga de aço inoxidável, ou eventual carbonização dos compostos orgânicos da amostra, implicava no parcial entupimento do capilar restritor.

Quando a pressão da linha de fluxo não retornava para o valor original após passagem da amostra pelo sistema, o capilar restritor era desmontado sendo removida sua ponta na qual se encontrava o material particulado, ou então, invertia-se a posição desse capilar para que a solução em contra-fluxo removesse o sólido que estava obstruindo a passagem das soluções. Em geral esse procedimento era executado a cada 15 processamentos das amostras de sucos de frutas. Para as soluções de diferentes compostos orgânicos esse problema não foi observado.

Outra característica do sistema em fluxo que pode ser explorada encontra-se na possibilidade da promoção in-situ da reação Fenton no capilar digestor. O processo de corrosão dos constituintes da liga de aço inoxidável pela solução digestora  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  induz a liberação de Fe para a solução da amostra, que na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode gerar radicais altamente reativos (WALLING, 1975). Essas reações radicalares podem também estar contribuindo para o aumento da elevada eficiência de decomposição observada para o sistema desenvolvido.

A avaliação da aplicação do sistema em fluxo para digestão de amostras sólidas envolveu a execução de experimentos que visavam identificar a possível segregação dos constituintes inorgânicos em amostras de tecido vegetal em função da distribuição do tamanho de partícula gerado no processo de moagem. Esses experimentos foram realizados de forma a obter subsídios para o correto preparo das suspensões de tecidos vegetais, previamente ao processamento no sistema em fluxo. Para avaliar o efeito da distribuição do tamanho de partícula na segregação dos constituintes inorgânicos em amostras de folhas de amora, laranja e goiaba, moídas criogenicamente, o material pulverizado foi fracionado em um conjunto de peneiras dispostas em ordem decrescente de tamanho de malha para que cada fração resultante fosse individualmente analisada. A partir de cada fração foi tomada uma massa de 250 mg, que posteriormente foi digerida empregando o forno de MW com frascos pressurizados e as condições operacionais descritas na Seção 3.1.1. Com exceção à última fração da amostra

( $\phi < 37 \mu\text{m}$ ), todas as decomposições foram executadas em triplicatas. A massa gerada no processo de peneiramento não foi suficiente para realização das replicatas das decomposições. Os resultados podem ser observados nas TABELAS 4.33 – 4.35.

**TABELA 4.33** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinados para as diferentes frações da amostra de folha de amora moída criogenicamente.

<i>Fração da amostra</i>	<i>Al</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Ca</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Fe</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>K</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mg</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>P</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Zn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>
Sem peneira	214 ± 1 <sup>a</sup>	16,6 ± 0,2	232 ± 13	20,8 ± 0,2	3,87	59,5 ± 2,3	908 ± 7	27,0 ± 0,7
$\phi > 74 \mu\text{m}$	191 ± 4,2	15,5	214 ± 6	21,5 ± 0,1	4,24	55,4 ± 1,2	930 ± 13	29,9 ± 0,6
$74 > \phi > 44 \mu\text{m}$	204 ± 15	18,0 ± 0,1	226 ± 22	19,4 ± 0,2	3,64	72,8 ± 0,6	920 ± 11	22,0 ± 0,6
$44 > \phi > 37 \mu\text{m}$	283 ± 9	13,3 ± 0,2	303 ± 2	19,5 ± 0,1	3,24	46,9 ± 0,1	939 ± 53	24,5 ± 1,5

<sup>a</sup>d.p.r. baseado numa amostra em triplicata (n = 3)

**TABELA 4.34** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinados para as diferentes frações da amostra de folha de laranja moída criogenicamente.

<i>Fração da amostra</i>	<i>Al</i> <i>Mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Ca</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Fe</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>K</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mg</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>P</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Zn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>
Sem peneira	74,7 ± 3,6 <sup>a</sup>	15,5 ± 0,2	95,5 ± 6,4	11,1 ± 0,3	2,76 ± 0,02	16,4 ± 1,6	650 ± 6	15,7 ± 1,1
$\phi > 74 \mu\text{m}$	56,8 ± 0,7	14,8 ± 0,5	73,6 ± 1,1	11,1 ± 0,5	2,53 ± 0,11	15,4 ± 0,7	640 ± 25	13,7 ± 1,3
$74 > \phi > 44 \mu\text{m}$	88,8 ± 19,3	16,9 ± 1,7	113 ± 22	12,9 ± 1,8	3,21 ± 0,53	20,2 ± 5,0	763 ± 160	13,4 ± 0,9
$44 > \phi > 37 \mu\text{m}$	110 ± 5	17,1 ± 0,9	124 ± 16	10,5 ± 0,9	2,76 ± 0,21	16,9 ± 2,4	660 ± 27	13,1 ± 1,2
$\phi < 37 \mu\text{m}^b$	117	17,9	138	10,3	2,75	20,6	688	14,2

<sup>a</sup>d.p.r. baseado numa amostra em triplicata (n = 3); <sup>b</sup>concentração baseada em uma replica (n = 1).

**TABELA 4.35** – Teores de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn determinado para as diferentes frações da amostra de folha de goiaba moída criogenicamente.

<i>Fração da amostra</i>	<i>Al</i> <i>Mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Ca</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Fe</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>K</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mg</i> <i>g kg<sup>-1</sup></i>	<i>Mn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>P</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>	<i>Zn</i> <i>mg kg<sup>-1</sup></i>
Sem peneira	94,6 ± 6,5 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,04	84,6 ± 0,2	13,8 ± 0,5	1,83 ± 0,03	36,9 ± 1,3	608 ± 16	17,4 ± 1,8
φ > 74 μm	62,5 ± 2	4,49 ± 0,33	61,1 ± 4,7	15,8 ± 1,3	1,84 ± 0,14	34,8 ± 1,0	648	24,2 ± 5,0
74 > φ > 44 μm	104 ± 2	4,56 ± 0,04	82,7 ± 1,8	13,3	1,85 ± 0,02	36,1 ± 0,8	595 ± 11	18,1 ± 0,1
44 > φ > 37 μm	166 ± 7	5,24 ± 0,01	132 ± 3	12,9	1,80	40,0 ± 0,9	633 ± 21	17,7 ± 0,1
φ < 37 μm <sup>b</sup>	208	6,30	145	13,0	1,83	45,4	615	17,2

<sup>a</sup>d.p.r. baseado numa amostra em triplicata (n = 3); <sup>b</sup>concentração baseada em uma replica (n = 1).

Comparando-se os teores das frações individuais com os teores encontrados para o material sem peneiramento, observa-se que para todas as amostras ocorreu um enriquecimento de Fe e Al nas frações com menor tamanho de partícula. Provavelmente esse comportamento está associado ao maior teor de sílica nessas frações. Para os outros elementos diferenças estatisticamente significativas não foram observadas. Dessa forma, caso pretenda-se preparar suspensões da amostra com tamanho de partícula inferior a 44 μm, provavelmente os resultados para Fe e Al não serão exatos.

Para minimizar o efeito de partículas sólidas sobre o processo de entupimento do sistema em fluxo, optou-se por realizar os testes de decomposição das suspensões, utilizando a fração de amostra com tamanho de partícula inferior a 44 μm. Massa igual a 500 mg foi pesada e transferida para um frasco volumétrico de 10 mL. Posteriormente o volume desse frasco foi completado com solução HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,0 % v v<sup>-1</sup>, produzindo uma suspensão do material vegetal, que por sua vez foi homogeneizada por agitação mecânica. Dessa suspensão, foram tomados 500 μL através da válvula de

amostragem do sistema em fluxo, sendo esse volume introduzido no diagrama apresentado na FIGURA 3.16. Para todos os tecidos vegetais avaliados, foi observado o pronto entupimento do sistema, com escape do capilar restritor devido ao aumento da pressão na linha de fluxo. Provavelmente as dimensões empregadas para a bobina digestora, combinada à concentração dos reagentes oxidantes, não proporcionaram condições adequadas para eficiente decomposição da fração orgânica da amostra de tecido vegetal, contrariamente ao observado para as amostras de sucos de frutas. Adicionalmente, o teor de sílica presente nas amostras, que não seria decomposto pela ação dos reagentes oxidantes, pode ter contribuído para o entupimento do capilar restritor. Nas condições operacionais de 300°C e 60 bar, não foi possível implementar a decomposição das amostras de tecido vegetal, mesmo considerando suspensões preparadas a partir da fração da amostra com tamanhos de partículas inferiores a 44 µm.

# *CONCLUSÃO*

---

## 5. Conclusão

Os procedimentos investigados para o preparo das amostras de leite bovino e sucos de frutas apresentaram características atraentes no que diz respeito à simplificação dessa crítica etapa envolvida na determinação química. De modo geral, a manipulação da amostra foi reduzida, em ambos procedimentos, evitando assim a introdução de erros no resultado final. As particularidades de cada procedimento são listadas a seguir:

### *a) Precipitação de proteína e hidrólise enzimática – leite bovino*

A implementação dos procedimentos de precipitação de proteína como o reagente TCA, e de hidrólise enzimática, empregando a enzima pepsina, mostraram resultados que descrevem o comportamento dos elementos Ca, Fe, Mg e Zn no leite bovino. Foi possível verificar a associação do Fe à fração protéica do leite. Essa afirmação pode ser feita considerando a recuperação de 98 % do Fe no precipitado de proteínas desnaturadas gerado durante o tratamento com TCA. Essa fato inviabiliza emprego do TCA caso o objetivo da análise seja a determinação dos teores totais dos elementos na amostra de leite. Por outro lado, caso não seja interesse a determinação de Fe, este procedimento poderia vir a ser utilizado para a determinação dos teores totais de Ca, Mg e Zn.

A hidrólise enzimática promoveu recuperação quantitativa para todos os analitos investigados. A enzima pepsina possui a propriedade de clivar ligações peptídicas da caseína que envolvem aminoácidos com resíduos aromáticos. Como consequência dessa alteração da estrutura primária da caseína são gerados precipitados e alguns aminoácidos solúveis, nas quais o Fe se encontra associado.

Os resultados indicam a viabilidade desses procedimentos serem parte de uma estratégia para especiação química em amostras de leite. Neste caso, resultados conclusivos só puderam ser obtidos para a interação Fe com a

proteína do leite. Para os demais elementos avaliados (Ca, Mg e Zn), que se apresentaram solúveis no tratamento com TCA, existe a possibilidade desses estarem ligados ao fosfato de cálcio coloidal, que é responsável pela estabilidade da micela da caseína, ou ionizados em solução. Os resultados não foram conclusivos para esses elementos face à baixa especificidade do TCA frente a fração protéica do leite. Neste caso, necessitam-se estudos complementares enfocando a separação das frações através de ultracentrifugação ou ultrafiltração da amostra de leite.

*b) Decomposição automatizada de amostras – sistema em fluxo*

Mesmo considerando a reduzida dimensão da bobina digestora, o sistema em fluxo desenvolvido apresentou elevada eficiência de decomposição para a oxidação da matéria orgânica de diferentes compostos orgânicos e das amostras de sucos de frutas quando este operava à 300°C e 60 atm. As mesmas condições operacionais não foram adequadas para o tratamento das suspensões de tecido vegetal. Isso se deveu ao fato do material sólido necessitar de um tempo maior para a sua decomposição em linha, o que dificilmente seria alcançado para o intervalo de vazões investigado. O aumento do tempo de residência da amostra no sistema em fluxo poderia ser obtido com uma drástica diminuição da vazão da solução transportadora. Entretanto, isso acarretaria uma redução da pressão imposta pelo capilar restritor utilizado.

Apesar de não totalmente inerte ao meio oxidante empregado, o capilar de aço inoxidável apresentou-se como material alternativo às ligas à base de platina. No entanto, para determinação multielementar nos digeridos obtido após o processamento da amostra no sistema desenvolvido, o processo de corrosão dos metais constituintes do aço inoxidável deve ser considerado. A operacionalidade do sistema para decomposição das amostras de sucos não se encontrou comprometida quando implementado procedimento de limpeza do capilar restritor após o não retorno da pressão da linha de fluxo para o valor

original, observado para a situação em que a solução da amostra não se encontrava no percurso analítico.

Para quantificação dos constituintes inorgânicos nas amostras de suco empregando o ICP OES com configuração radial, o fator de diluição apresentado pelo sistema em fluxo (1:20) mostrou-se adequado para os elementos presentes em maiores concentrações (Ca, K, Mg e Na). Os demais elementos encontravam-se no digerido final em teores abaixo do LOD apresentado pela configuração radial..

Outro fator que todo contribuído para a elevada eficiência de decomposição dos compostos orgânicos e dos sucos de frutas se refere à possibilitada da ocorrência “*in situ*” da reação Fenton na bobina digestora. Essa possibilidade pode ser sugerida em função da temperatura de trabalho, do emprego de peróxido e da corrosão de ferro a partir da parede do capilar.

Para experimentos que envolviam a investigação de processos de segregação dos constituintes inorgânicos em função do tamanho de partícula para amostras de tecido vegetal, constatou-se que a concentração dos elementos Fe e Al aumentava à medida que o tamanho da partícula era diminuída. Esse comportamento foi atribuído ao provável enriquecimento das frações de menor tamanho com sílica, na qual Fe e Al poderiam estar associados.

Considerando os espectrômetros de emissão ótica com plasma induzido utilizados nesse trabalho, podemos inferir que os equipamentos possuem figuras de mérito similares (TABELA 5.36).

**TABELA 5.36.** Figuras de mérito dos ICP-OES com configurações axial e radial avaliados

<i>Figura de mérito</i>	<i>Axial</i>	<i>Radial</i>
Warm-up time (min)	20	10
Estabilidade por curto período (dpr %; n = 15)	0,7	0,6
Estabilidade por longo período (dpr %; 2 horas, n = 8)	1,5	1,4
Resolução espectral UV (pm)	8	9
Resolução espectral VIS (pm)	30	32
LOD Ni II 231 HNO <sub>3</sub> 0,14 mol l <sup>-1</sup> (µg L <sup>-1</sup> )	0,23	3,8
Mg II/Mg I	10,6	13,7

Apesar da diferença no “warm up time” e nos limites de detecção”, o desempenho de ambas configurações não é significativamente comprometido. Determinações quantitativas podem ser conduzidas com adequadas precisão e exatidão em ambas configurações. A partir dos resultados obtidos pode-se ainda afirmar que a configuração axial apresenta maior poder de detecção do que o apresentado pelo sistema radial, independente da complexidade do meio em consideração. Mesmo apresentando um “warm up time” maior, os resultados obtidos no sistema axial indicam que a eficiência da interface “End-on-gas” associada à utilização de uma tocha com maior diâmetro interno promovem condições favoráveis para análises em que a sensibilidade é crítica e a complexidade da matriz é elevada. Em concordância com a discussão realizada por BRENNER & ZANder (2000), os resultados obtidos mostram que a utilização da configuração axial em aplicações dessa natureza deve ser considerada.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## 6. Referências Bibliográficas

ABDALLAH, M. H.; DIEMIASZONEK, R.; JAROSZ, J.; MERMET, J. M.; ROBIN, J. & TRASSY, C. "Spectrometric study on radiofrequency induced plasma. 1. Analytical performance". *Anal. Chim. Acta*, **84**: 271, 1976.

ABOLLINO, O.; ACETO, M.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E. & SARZANINI, C. "Speciation of copper and manganese in milk by solid-phase extraction/inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **375**: 299, 1998.

ACHTERBERG, E.P.; BRAUNGARDT, C.B.; SANDFORD, R.C. & WORSFOLD, P.J. "UV digestion of seawater samples prior to the determination of copper using flow injection with chemiluminescence detection". *Anal. Chim. Acta*, **440**: 27, 2001.

ADELOJU, S.B. "Comparison of some wet digestion and dry ashing methods for voltammetric trace-element analysis". *Analyst*, **114**: 455, 1989.

ALLAIN, P.; JAUNALT, L.; MAURAS, Y.; MERMET, J.M. & DELAPORTE, T. "Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled mass-spectrometers". *Anal. Chem.*, **63**: 1497, 1993.

AMINOT, A. & KÉROUEL, R. "An automated photo-oxidation method for the determination of dissolved organic phosphorus in marine and fresh water". *Marine Chem.*, **76**: 113, 2001.

ARAÚJO, G.C.L.; GONZALEZ, M.H.; FERREIRA, A.G.; NOGUEIRA, A.R.A & NÓBREGA, J.A. "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials". *Spectrochim. Acta B*, **57**: 2121, 2002.

ARRUDA, M.A.Z. & SANTELLI, R.E. "Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte". *Quim. Nova*, **20**: 638, 1997.

ARRUDA, M.A.Z.; FOSTIER, A.H. & KRUG, F.J. "On-line microwave-assisted sample decomposition for lead determination in fish slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry". *J. Braz. Chem. Soc.*, **8**: 39, 1997.

BARNARD, T.W.; CROCKETT, M.I.; IVALDI, J.C.; LUNDBERG, P.L.; YATES, D.A.; LEVINE, P.A. & SAUER, D.J. "Solid-state detector for ICP-OES". *Anal. Chem.*, **65**: 1231, 1993.

BASSON, W.D. & VAN STADEN, J.F. "Direct determination of calcium in milk on a non-segmented continuous-flow system". *Analyst*, **104**: 419, 1979.

BENSON, R.L.; McKELVIE, I.D.; HART, B.T.; TRUONG, Y.B. & HAMILTON, I.C. "Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line UV/thermal induced digestion and flow injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **326**: 29, 1996.

BERNEJO-BARRERA, P.; FERNÁNDEZ-NOCELO S.; MORED-PIÑERO, A. & BERNJEIO-BARRERA, A., "Usefulness of enzymatic hydrolysis procedures based on the use of pronase E as sample pre-treatment for multi-element determination in biological materials". *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**: 1893, 1999.

BIBLIOTECA VIRTUAL, "Luz ultravioleta", [www.bvby.hpg.ig.com.br/acervo/une/une20.html](http://www.bvby.hpg.ig.com.br/acervo/une/une20.html). Acessado em 08 de fevereiro, 2003.

BRÄTTER, P.; BLASCO, I.N.; NEGRETTI DE BRÄTTER, V.E. & RAAB, A., "Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition". *Analyst*, **123**: 821, 1998.

BRENNER, I.B. & ZANDER, A.T. "Axially and radially viewed inductively coupled plasmas - A critical review". *Spectrochim. Acta B*, **55**: 1195, 2000.

BRENNER, I.B.; ZANDER, A.T.; COLE, M. & WISEMAN, A. "Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasmas for multi-element analysis: Effect of sodium and calcium". *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 897, 1997.

BRONK, D.A.; LOMA, L.W.; GLIBERT, P.M.; SCHUKERT, K.J. & SANDERSON, M.P. "Total dissolved nitrogen analysis: Comparisons between the persulfate, UV and high temperature oxidations methods". *Marine Chem.*, **69**: 163, 2000.

BURGUERA, J.L. & BURGUERA, M. "On-line sample pre-treatment systems interfaced to electrothermal atomic absorption spectrometry". *Analyst*, **123**: 561, 1998.

BURGUERA, J.L. & BURGUERA, M. "Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **366**: 63, 1998.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. & ALARCÓN, O.M. “Flow injection and microwave-oven sample decomposition for determination of copper, zinc and iron in whole blood by atomic absorption spectrometry”. *Anal. Chim. Acta*, **179**: 351, 1986.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. & ALARCÓN, O.M. “Determination of zinc and cadmium in small amounts of biological tissues by microwave-assisted digestion and flow injection atomic absorption spectrometry”. *Anal. Chim. Acta*, **214**: 421, 1988.

CAMPILLO, N.; VINÃS, P.; LÓPEZ-GARCIA, I. & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. “Direct determination of copper and zinc in cow milk, human milk and infant formula samples using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry”. *Talanta*, **46**: 615, 1998.

CAMPOS, M.L.A.M.; MELLO, L.C.; ZANETTE, D.R.; SIERRA, M.M.S. & BENDO, A. “Construção e otimização de um reator de baixo custo para fotodegradação da matéria orgânica em água naturais e sua aplicação no estudo de especiação de cobre por voltametria”. *Quim. Nova*, **24**: 257, 2001.

CARBONELL, V.; DE LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A.; BURGUERA, J.L. & BURGUERA, M. “On-line microwave oven digestion flame atomic absorption analysis of solid samples”. *Anal. Chim. Acta*, **238**: 417, 1990.

CAVICCHIOLI, A. & GUTZ, I.G.R. “Effects of scavengers on photocatalytic digestion of organic matter in water samples assisted by TiO<sub>2</sub> in suspension for the voltammetric determination of heavy metals”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**: 441, 2002.

COIN, E.; ALIMONTI, A.; BOCCA, F.; LA TORRES, F.; PIZZUTI, D.; CAROLI, S. “Speciation of trace elements in milk by high performance liquid chromatography combined with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry” in: CAROLI, S. ed “Element Speciation in bioinorganic chemistry”, John Wiley & Sons, New York, 255-285p., 1996.

COSTA, L.M.; GOUVEIA, S.T. & NÓBREGA, J.A. “Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg and Mn in tea samples”. *Anal. Sci.*, **18**: 313, 2002.

COSTA, L.M.; SILVA, F.V.; GOUVEIA, S.T.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. “Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation on the residual carbon content”. *Spectrochim. Acta B*, **56**: 1981, 2001.

CREAMER, L.K. & MACGIBBON, A.K.H., “Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids”. *Int. Dairy Journal*, **6**: 539, 1996.

DARWIN ON LINE “Ultravioleta”, [http://www.darwin.com.br/sala\\_estudo/fisica/ultravioleta.doc](http://www.darwin.com.br/sala_estudo/fisica/ultravioleta.doc). Acessado em 08 de fevereiro, 2003.

DE GOY, S.; LANZISERA, D.; LOPEZ, K.; NOONAN, J. & REBELLO, J. “Which CCD detector is right for you?”. *Spectrosc.*, **13**: 36, 1998.

DE LA FUENTE, M.A.; CARAZO, B. & JUÁREZ, M. “Determination of major minerals in dairy products digested in closed vessels using microwave heating”. *J. Dairy Sci.*, **80**: 806, 1997.

DE LA GUARDIA, M.; CARBONELL, V.; MORALES-RUBIO, A. & SALVADOR, A. “On-line microwave-assisted digestion of solid samples for their flame atomic spectrometric analysis”. *Talanta*, **40**: 1609, 1993.

DENNAUD, J; HOWES, A; POUSSEL, E. & MERMET, J.M. “Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers”, *Spectrochim. Acta B*, **56**: 101, 2001.

DUBUISSON, C.; POUSSEL, E & MERMET, J. M. “Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in terms of signal-to-background ratio and matrix effects”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 281, 1997.

FILI, S.P.; OLIVEIRA, E. & OLIVEIRA, P.V. “On-line digestion in a focused microwave-assisted oven for elements determination in orange juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry”, *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 435, 2003.

FLORIAN, D. & KNAPP, G. “High temperature, microwave-assisted UV digestion: A promising sample preparation technique for trace element analysis”. *Anal. Chem.*, **73**: 1515, 2001.

GARCIA, E. E.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. “Matrix effects on the determination of dysprosium, europium and ytterbium used as animal faecal markers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially- and radially-viewed configurations”. *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**: 825, 2001.

GAUCHERON, F.; LE GRAET, Y.; RAOULT, K. & PIOT, M. "Physicochemical characterization of iron-supplemented skim milk". *Int. Dairy J.*, **7**: 141, 1997.

GOLIMOWSKI, J. & GOLIMOWSKA, K. "UV photo-oxidation as pre-treatment step in inorganic analysis of environmental samples". *Anal. Chim. Acta*, **325**: 111, 1996.

GOUVEIA, S.T.; SILVA, F.V.; COSTA, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations". *Anal. Chim. Acta*, **445**: 269, 2001.

GOUVEIA, S.T.; FATIBELLO-FILHO, O. & NÓBREGA, J.A. "Infra-red heating as an alternative technique for fast sample preparation". *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**: 261, 2000.

GRÄBER, C. & BERNDT, H. "Development of a new high temperature/high pressure flow system for the continuous digestion of biological samples". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 683, 1999.

GREENFIELD, S.; JONES, I. L. I.; BERRY, C. T. "High-pressure plasmas as spectroscopic emission sources". *Analyst*, **89**: 713, 1964.

HASWELL, S.J. & BARCLAY, D. "On-line microwave digestion of slurry samples with direct flame atomic absorption spectrometric elemental determination". *Analyst*, **117**: 117, 1992.

IUPAC, Analytical Chemistry Division, Commission on Spectrochemical and Optical Procedures for Analysis, "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation". *Spectrochim. Acta B*, **33**: 242, 1978.

IVALDI, J.C. & TYSON, J.F. "Performance evaluation of an axially-viewed horizontal inductively coupled plasma for optical emission spectrometry". *Spectrochim. Acta B*, **50**: 1207, 1995.

JACOB, P. & BERNDT, H. "Online element determination in biological and environmental samples by flame AAS coupled with a high-temperature/high-pressure flow digestion system". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1615, 2002.

KNOWLES, M.B. "The latest advance in axially-viewed simultaneous ICP OES for elemental analysis". *Technical Topic*, [www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/spectr/icpoes/articles/icpes-01.pdf](http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/spectr/icpoes/articles/icpes-01.pdf). Acessado em 12 abril, 2004.

KINGSTON, H.M. & HASWELL, S.J., *Microwave-enhanced chemistry. Fundamentals, sample preparation and applications*, American Chemical Society, Washington USA, 772p, 1997.

KNAPP, G; MAICHIN, B. & BAUMGARTNER, U. "Interferences in ICP-OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion". *At. Spectrosc.*, **19**: 220, 1998.

KORN, M. "Aplicações de ultra-sons no tratamento de amostras", <http://www.dq.ufscar.br/Labs/gaia/infoprep>, Acessado em 08 de fevereiro, 2003.

KRUG, F.J. *Métodos de Decomposição de Amostras*. III Workshop sobre preparo de amostras, 149p., 2000.

LAMEIRAS, J.; SOARES, M.E.; BASTOS, M.I. & FERREIRA, M. "Quantification of total chromium and hexavalent chromium in UHT milk by ETAAS". *Analyst*, **123**: 2091, 1998.

LARSEN, E.H. & STÜRUP, S. "Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation". *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**: 1099, 1994.

LEHNINGER, A.L., *Biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 1975.

LEVINE, K.E.; BATCHELOR, J.D.; RHOADES Jr, C.B. & JONES, B.T. "Evaluation of a high-pressure, high-temperature microwave digestion system". *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**: 49, 1999.

MAJORS, R.E., "An overview of sample preparation", *LC GC Mag.*, **9**: 16-&, 1991.

MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V.I.; KEMIECIKI, G.A. "Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation". *Anal. Chim. Acta*, **470**: 195, 2002.

MERMET, J.M. & POUSSSEL, E. "ICP emission spectrometers: 1995 Analytical figures of merit". *Appl. Spectrosc.*, **49**: 12, 1995.

MERMET, J.M. "Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics". *Anal. Chim. Acta*, **250**: 85, 1991.

MICHALKE, B. & SCHARAMEL, P., "Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing-inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation". *J. Chromatogr. A*, **807**: 71, 1998.

MONTASER, A. & GOLIGHTLY, D.W. "*Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry*". 2a ed., John Wiley & Sons, 2002, p. 1017.

NASCENTES, C.C.; KORN, M. & ARRUDA, M.A.Z. "A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg and Zn from vegetables". *Microchem. J.*, **69**: 37, 2001.

NEGRETTI DE BRÄTTER, V.E.; RECKNAGEL, S. & GAWLIK, D. "Speciation of Se, Fe, and Zn in human milk whey: The use of instrumental neutron activation analysis (INAA) to corroborate element profiles measured with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES)". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **353**: 137, 1995.

NEVILLE, M.C.; ZHANG, P. & ALLEN, J.C., *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, Londres. 1995.

NÓBREGA, J.A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A. & BARNES, R.M. "Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 1243, 1997.

OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R.P. & ZAGATTO, E.A.G. "Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food". *Anal. Chim. Acta*, **413**: 41, 2000.

OLIVEIRA, C.C.; ZAGATTO, E.A.G.; ARAÚJO, A.N. & LIMA, J.L.F.C. "Sample preparation in sequential injection analysis. Spectrophotometric determination of total phosphorus in food samples". *Anal. Chim. Acta*, **371**: 57, 1998.

OSTOA-SALOMA, P.; RAMÍREZ, J. & PEREZ-MONTFORT, R., "Measurement of casein digestion by a fluorometric method". *Anal. Biochem.*, **176**: 239, 1989.

PEAT, D.M.W.; McKELVIE, I.D.; MATTHEWS, G.P.; HAYGARTH, P.M. & WORSFOLD, P.J. "Rapid determination of dissolved organic phosphorus in soil leachates and runoff waters by flow injection analysis with on-line photo-oxidation". *Talanta*, **45**: 47, 1997.

PEREIRA FILHO, E.; ROHWEDDER, J. & ARRUDA, M.A.Z. "On-line microwave slurry sample digestion using flow systems for the spectrophotometric determination of iron in seafood". *Analyst*, **123**: 1023, 1998.

PICHLER, U; HAASE, A.; KNAPP, G. "Microwave-enhanced flow system for high-temperature digestion of resistant organic materials". *Anal. Chem.*, **71**: 4050, 1999.

POUSSEL, E.; MERMET, J. M. & SAMUEL, O. "Simple experiments for the control, the evaluation and the diagnosis of inductively coupled plasma sequential systems". *Spectrochim. Acta B*, **67**: 743, 1993.

RIBEIRO, A.S.; MORETTO, A.L.; ARRUDA, M.A.Z. & CADORE, S. "Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide". *Microchim. Acta*, **141**: 149, 2003.

RIVERO MARTINO, F.A.; FERNANDEZ SÁNCHEZ, M.L. & SANZ-MEDEL, A. "Total determination of essential and toxic elements in milk whey by double focusing ICP-MS". *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**: 163, 2000.

ROIG, M.J.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. & LAGARDA, M.J., "Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk and infant formulas". *Food Chem.*, **64**: 403, 1999.

SANTOS, D.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NEVES, E.F.A.; CAVALHEIRO, E.T.G. & NÓBREGA, J.A. "Análise química inorgânica de leite e simulação do reagente CFA-C". *Eclét. Quim.*, **27 Spc.**: 61, 2003.

SILVA, F.V.; TREVIZAN, L.C.; SILVA, C.S.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations". *Spectrochim. Acta B*, **57**: 1905, 2002.

SILVA, P.H.F., "Leite: Aspectos de composição e propriedades". *Quim. Nova Escola*, **6**: 1997.

SPEX SAMPLE PREPARATION "Handbook of sample preparation & handling", Spex Sample Preparation, Metuchen EUA: 152p, 1994.

SUTURP, S. & BUCHERT, A. "Direct determination of copper and iodine in milk and milk powder in alkaline solution by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**: 323, 1996.

SWEILEH, J. "On-line flow injection solid sample introduction digestion and analysis: spectrophotometric and atomic absorption determination of iron, copper and zinc in multi-vitamin tablets". *Microchem. J.*, **65**: 87, 2000.

THOMPSON, M. & BARNES, R.M. "Analytical performance of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", IN: *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*. MONTASER, A.; GOLIGHTLY & D. W. (Eds). New York, VCH Publishers Inc., p.249-293, 1992.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G. & BURGESS, K. "The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry". *Spectrosc.*, **15**: 33, 2000.

TREVIZAN, L.C.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Single vessel procedure for acid vapor partial digestion of bovine liver in a focused microwave: multielement determinations by ICP-OES". *Talanta*, **61**: 81, 2003.

WALLING, C., "Fenton's reagent revisited", *Accounts of Chemical Research*, **8**: 125, 1975.

WASILEWSKA, M.; GOESSLER, W.; ZIACHKA, M. MAICHIM, B.; KNAPP, G. "Efficiency of oxidation in wet digestion procedure and influence from the residual organic carbon content on select techniques for determination of trace elements". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1121, 2002.

WENDT, R.H.; FASSEL, V.A. "Induction-coupled plasma spectrometric excitation source". *Anal. Chem.*, **37**: 920, 1965.

WÜRFLES, M.; JACKWERTH, E. & STOEPLER, M. "Residues from biological material after pressure decomposition with nitric acid. Part 1. Carbon conversion during sample decomposition". *Anal. Chim. Acta*, **226**: 1, 1989a.

WÜRFLES, M.; JACKWERTH, E. & STOPPLER, M. "Residues from biological material after pressure decomposition with nitric acid. Part 3. Influence of reaction products on inverse voltammetric element determination". *Anal. Chim. Acta*, **226**: 31, 1989b.

YEBRA, M.C.; MORENO-CID, A.; CESPÓN, R. & CANCELA, S. "Preparation of a soluble solid sample by a continuous ultrasound assisted dissolution system for the flow-injection atomic absorption spectrometric

determination of iron in milk powder and infant formula”. *Talanta*, **62**: 403, 2004.

ZHANG, P. & ALLEN, J.C., “A novel dialysis procedure measuring free Zn<sup>2+</sup> in bovine milk and plasma”. *J. Nutr.*, **125**: 1904, 1995

