

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE PREPARO
DE AMOSTRAS USANDO SISTEMAS EM FLUXO**

Thiago Linhares Marques*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

*** Bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2017**




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

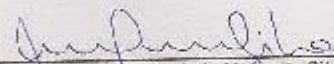
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

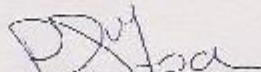
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Thiago Linhares Marques, realizada em 22/03/2017:


Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nobrega
UFSCar


Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa


Profa. Dra. Marcia Andreia Mesquita Gilve da Veiga
FFCLRP/UGP


Profa. Dra. Wanesa Melchert Mattos
ESALQ-USP


Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini
UFSCar

É importante reconhecer que grandes projetos de vida não são construídos sozinhos. Há sempre a colaboração e ajuda de amigos e parceiros no processo.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Josair e Eleuza, meus irmãos
Thamiris e Marcus Vinicius e a minha
finada avó Maria pelo apoio, incentivo,
ensinamentos, orações e esforços
imensuráveis para minha formação!*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela oportunidade concedida e bênçãos derramadas sobre mim.

Ao Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega pela atenção, paciência, carinho e amizade. Por ser um ótimo pai científico, que sempre soube impulsionar minha evolução acadêmica. Sua orientação, conselhos e confiança permitiram o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao Prof. Helmar Wiltsche pela supervisão, receptividade, companheirismo e amizade durante o doutorado sanduíche na Universidade Tecnológica de Graz (TUGraz) na Áustria.

Ao Prof. Prof. Günter Knapp pela orientação, hospitalidade, atenção, cuidado e amizade durante o intercâmbio na Áustria.

À Prof.^a Ana Rita de Araujo Nogueira pela parceria que possibilitou a realização de parte do projeto na EMBRAPA Pecuária Sudeste.

Ao Prof. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela sugestões, colaboração e atenção, que me possibilitaram um maior entendimento sobre estatística e quimiometria.

À Dr.^a Elaine Inácio Pereira pela realização das análises elementares por analisador elementar CHNS/O na EMBRAPA Instrumentação.

Ao Dr. Márcio Arruda Bacchi pela realização da análise de distribuição do tamanho de partícula no CENA.

À doutoranda Monika Winkler e ao técnico Herbert Motter por acompanharem os experimentos e as manutenções do sistema de digestão em fluxo.

À Prof.^a Nívia Maria Melo Coelho e Prof.^a Luciana Melo Coelho, que como orientadoras de mestrado e iniciação científica, respectivamente, me ajudaram a construir a base do meu conhecimento científico e profissional.

Aos meus professores e professoras de graduação, mestrado e doutorado por compartilharem seus conhecimentos para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos do grupo GAIA que tive o prazer de conviver durante esse período. A troca de conhecimento foi importante para meu desenvolvimento profissional e a amizade para suporte emocional.

Aos amigos do grupo ACFC, do alojamento estudantil e universitários de Graz que foram companheiros incríveis durante meu doutorado sanduíche. Minha

experiência de intercâmbio foi muito alegre, prazerosa, contagiante e construtiva devido à grande hospitalidade do povo austríaco.

Aos meus amigos de São Carlos por tornarem meus dias mais interessantes, descontraídos e alegres. Os meus finais de semana foram menos solitários e monótonos devido ao grande zelo e carinho que tiveram comigo.

Aos meus pais por todo incentivo, suporte, apoio e orações. Seus esforços imensuráveis são responsáveis por tudo que conquistei até hoje.

Aos meus irmãos, Thamiris e Marcus Vinicius, por serem meus companheiros e confidentes que sempre me ajudaram a superar os obstáculos da vida.

Aos meus avós, João e Margarida por todo apoio, carinho, amor, cuidado e compreensão.

À minha finada avó Maria, que perdi durante meu doutorado sanduíche. Sem suas orações, fé, suporte e compreensão não haveria chegado tão longe.

Ao meu finado avó Miguel, que perdi na adolescência, mas sempre estive no meu coração e mente, sendo um modelo de vida que tenho seguido.

Aos tios, tias, primos e primas por serem grandes incentivadores.

Aos amigos que conquistei em Catalão, Uberlândia e Belo Horizonte durante minha graduação e mestrado, que apesar da distância, sempre me aconselharam, incentivaram e apoiaram minhas escolhas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e a todos os funcionários do Departamento de Química por serem sempre solícitos e prestativos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas de doutorado (processo 140474/2013-7) e doutorado sanduíche (processo 249068/2013-3).

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade, atenção, sugestões e correções.

Muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo (<i>Background equivalent concentration</i>)
CBR	Coluna em bobina rotativa
CFA	Câmara de fluxo com agitação
CFA-C	Aminas terciárias solúveis em água
CGC	Coluna de grande calibre
CRM	Materiais de referência certificados (<i>Certified reference material</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica por chama (<i>Flame atomic absorption spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LOD	Limites de detecção (<i>Limit of detection</i>)
MCC	Minicoluna cilíndrica
MLLE	Micro extração líquido-líquido (<i>Micro liquid-liquid extraction</i>)
PE	Polietileno (<i>Polyethylene</i>)
PEEK	Polieteretercetona (<i>Polyether ether ketone</i>)
PFA	Perfluoralcóxi alcano (<i>Perfluoroalkoxy alkanes</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno (<i>Polytetrafluoroethylene</i>)
ROC	Carbono orgânico residual (<i>Residual organic carbon</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
SBR	Razão do sinal analítico pelo sinal de fundo (<i>Signal-to-background ratio</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (<i>Tetramethylammonium hydroxide</i>)
TNT	Tecido não tecido
TOC	Carbono orgânico total (<i>Total organic carbon</i>)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.2.2.2.1 - Sistemas de digestão em fluxo operados sob média e alta pressão reportados na literatura.....	9
TABELA 1.2.3.2.1 - Sistemas de extração em fluxo para avaliação de bioacessibilidade ou determinação total de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras orgânicas e inorgânicas.	14
TABELA 3.3.3.1 - Condições utilizadas na moagem das amostras sólidas de tecido animal e vegetal.	28
TABELA 3.4.1.1 - Teor de umidade das amostras sólidas selecionadas para aplicação no sistema de digestão em fluxo e extração fluxo-batelada.	30
TABELA 3.4.1.2 - Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras sólidas.	34
TABELA 3.4.1.3 - Teores de macro e micronutrientes em amostras de tecido vegetal e animal determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	35
TABELA 3.4.1.4 - Teores de macro e micronutrientes em CRMs determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	36
TABELA 3.4.2.1 - Teores de macro e micronutrientes em sucos de frutas e leites determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	37
TABELA 4.4.1.1 - Porcentagem da fase de vapor (média \pm desvio padrão, n = 3) em diferentes vazões e potências aplicadas.	54
TABELA 4.4.2.1 - Efeito da vazão e da potência aplicada na eficiência de digestão da glicose (Gli), glicina (Gly), fenilalanina (Phe) e ácido nicotínico (Ac Nic) no teor de ROC, média \pm desvio padrão e n = 5.	57
TABELA 4.4.3.1 - Acidez residual e do teor de ácido consumido durante a digestão de glicose, fenilalanina e leite em pó, média \pm desvio padrão e n = 3.	60
TABELA 4.4.4.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras sólidas do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).	62
TABELA 4.4.4.2 - Avaliação da digestão em fluxo com CRMs, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	63
TABELA 4.4.4.3 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras sólidas de tecido animal e vegetal.	67

TABELA 4.4.4.4 - Digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão em diferentes soluções ácidas, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.....	68
TABELA 4.4.4.5 - Digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	69
TABELA 4.4.4.6 - Comparação da precisão da digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão usando diferentes soluções ácidas aplicando-se teste F, n = 5 e P = 95%.....	70
TABELA 4.4.4.7 - Comparação da precisão da digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas aplicando-se teste F, n = 5 e intervalo de confiança de 95 %.	71
TABELA 4.4.4.8 - Comparação dos teores determinados por digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão em diferentes soluções ácidas aplicando-se o teste t, n = 5 e P = 95 %.....	72
TABELA 4.4.4.9 - Comparação dos teores determinados por digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas aplicando-se o teste t, n = 5 e intervalo de confiança de 95 %.....	74
TABELA 4.4.4.10 - Comparação das soluções ácidas aplicadas na digestão das amostras de tecidos animal e vegetal aplicando-se o teste t pareado para múltiplos analitos e P = 95 %.....	75
TABELA 5.4.2.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras de sucos de frutas do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).	87
TABELA 5.4.2.2 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras líquidas de sucos de frutas.	88
TABELA 5.4.2.3 - Análise elementar de sucos de maçã e manga: comparação da digestão em fluxo e da digestão em batelada com diferentes misturas ácidas, média \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	89
TABELA 5.4.2.4 - Comparação da precisão da digestão em fluxo em diferentes soluções ácidas (A, B e C) e da precisão da análise direta (D) com a precisão digestão em batelada do suco de maçã e suco de manga aplicando-se o teste F, n = 5 e P = 95%.	90
TABELA 5.4.2.5 - Comparação da exatidão da digestão em fluxo em diferentes soluções ácidas (A, B e C) e da exatidão análise direta (D) com os teores de macro e micronutrientes determinado pela digestão em batelada do suco de maçã e suco de manga aplicando-se o teste t pareado, n = 5 e P = 95%.....	91
TABELA 5.4.2.6 - Análise elementar de sucos de maçã e manga: comparação da análise direta e da digestão em batelada, média \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	93

TABELA 5.4.3.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras de leite do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).....	98
TABELA 5.4.3.2 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras líquidas de leite.....	99
TABELA 5.4.3.3 - Comparação dos teores de macro e micronutrientes determinados na digestão em fluxo e da digestão em batelada do leite semidesnatado e leite integral em diferentes concentrações de ácido nítrico, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	99
TABELA 5.4.3.4 - Comparação da precisão da digestão em fluxo em diferentes concentrações de ácido nítrico (A e B) e da precisão análise direta (C) com a precisão da digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral através do teste F, n = 5 e P = 95%.	100
TABELA 5.4.3.5 - Comparação da exatidão da digestão em fluxo em diferentes concentrações de ácido nítrico (A e B) e da exatidão da análise direta (C) com a os teores de macro e micronutrientes determinados pela digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral através do teste t pareado, n = 5, P = 95%.	101
TABELA 5.4.3.6 - Comparação dos teores de macro e micronutrientes determinados pela análise direta e pela da digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral, média \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.	103
TABELA 6.4.3.1 - Características analíticas da extração fluxo-batelada e em batelada no preparo de amostras sólidas de tecido foliar.	123
TABELA 6.4.3.2 - Avaliação da extração fluxo-batelada com CRMs de tecidos vegetais usando determinação off-line por ICP OES, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	124
TABELA 6.4.3.3 - Avaliação da extração fluxo-batelada com CRMs de tecidos animais usando determinação off-line por ICP OES, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	126
TABELA 6.4.3.4 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	127
TABELA 6.4.3.5 - Teores determinados de macro e micronutrientes por extração fluxo-batelada e digestão assistida por radiação micro-ondas para fígado bovino, músculo bovino e camarão, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	128
TABELA 6.4.4.1 - Avaliação da extração fluxo-batelada com determinação de macro e micronutrientes em CRMs por ICP OES, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	131
TABELA 6.4.4.2 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.	132

TABELA 6.4.4.3 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão, valor médio \pm incerteza, $n = 3$ e intervalo de confiança de 95%..... 133

TABELA 6.4.4.4 - Comparação da precisão e exatidão da extração fluxo-batelada com a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro aplicando-se o teste F e o teste t pareado, respectivamente, $n_1 = 3$ (extração), $n_2 = 5$ (digestão) e intervalo de confiança de 95%.
..... 134

TABELA 6.4.4.5 - Comparação da precisão e exatidão da extração fluxo-batelada com a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados para fígado bovino, músculo bovino e camarão aplicando-se o teste F e o teste t pareado, respectivamente, $n_1 = 3$ (extração), $n_2 = 5$ (digestão) e intervalo de confiança de 95%.
..... 136

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.2.3.2.1 - Dispositivos e equipamentos utilizados em sistema de extração em fluxo: reatores contendo a amostra (a) ¹⁰ (Nº da licença: 4033101084367 - Elsevier) e sistemas de propulsão (b).	15
FIGURA 3.4.1.1 - Amostras de tecido vegetal após etapa de secagem.....	31
FIGURA 3.4.1.2 - Amostras de tecido animal após etapa de liofilização.....	31
FIGURA 3.4.1.3 - Amostras sólidas de tecidos vegetais e animais moídas, a: folhas de espinafre, b: folhas de tomateiro, c: folhas de laranjeira, d: camarão, e: fígado bovino e f: músculo bovino.	32
FIGURA 3.4.1.4 - Distribuição do tamanho de partícula das amostras sólidas em escala logarítmica, a: amostras de tecido animal e b: amostras de tecido animal ...	33
FIGURA 4.3.4.1 - Diagrama esquemático do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura. A: bomba de alta pressão, B: alça de amostragem e válvula rotatória de alta pressão com 6 vias, C: controlador de vazão de N ₂ , D e N: tubos de aço inoxidável de conexão com região não pressurizada, E: reator helicoidal de PFA, F e L: tampas do reator, G: haste de sustentação de PEEK, H: parafusos de sustentação de PEEK, I e J: bases de sustentação de PEEK, K: tubo de vidro borossilicato com parede espessa, M: tubos de aço inoxidável de conexão com reator pressurizado, O: sistema de refrigeração, P: separador gás-líquido, Q: restritor de vazão.....	47
FIGURA 4.3.4.2 - Reatores utilizados no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas sob alta temperatura e pressão, (a) reator inicial de baixo volume e (b) reator desenvolvido e avaliado de grande volume.....	49
FIGURA 4.3.5.1 - Interface aplicada para avaliação do sinal transiente nas determinações on-line por ICP OES.....	51
FIGURA 4.4.1.1 - Sinais transientes para Ca, Cu, Fe, Zn, Sc, B, K e Hg na detecção on-line de uma solução padrão introduzida no sistema de digestão em fluxo por ICP OES.....	56
FIGURA 4.4.2.1 - Eficiência de digestão de fenilalanina com HNO ₃ 32% V V ⁻¹ combinado com HCl ou H ₂ O ₂ ou HClO ₄ (1,5; 3,0; 6,0 % (V V ⁻¹)), n = 5.....	59
FIGURA 4.4.4.1 - Eficiências de digestão das amostras de tecido animal e vegetal utilizando diferentes ácidos e/ou misturas ácidas, n = 5.....	65
FIGURA 5.4.2.1 - Eficiência de digestão das amostras de suco de maçã e suco de manga em diferentes ácidos e/ou misturas ácidas, n = 5.....	86
FIGURA 5.4.3.1 - Otimização do preparo das emulsões de leite e avaliação do uso de estabilizantes químicos, ultrassom e aquecimento na estabilização das emulsões, a: após preparo das misturas e agitação manual, b: 4 min após agitação manual, c: imediatamente após 1 min de sonicação, d: 20 min após sonicação durante 1 min, e:	

44 min após sonicação durante 1 min e f: após 20 min de aquecimento. Tubos da esquerda para a direita: 1º tubo sem estabilizantes, 2º tubo com EDTA, 3º tubo com Triton X-100 e 4º com EDTA e Triton X-100. 94

Figura 5.4.3.2 - Eficiência de digestão das amostras de leite semidesnatado e de leite integral em diferentes concentrações de ácido nítrico, n = 5..... 97

FIGURA 6.3.7.1 - Diagrama do sistema de extração fluxo-batelada com determinação on-line por ICP OES. A: Etapa de extração, limpeza do filtro e leitura do branco, B: Etapa de filtração e leitura do extrato, I: Etapa de troca de filtro ou frasco reacional, BP: bomba peristáltica, SE: solução extratora, AM: agitador magnético, ON: ligado e OFF: desligado. 112

FIGURA 6.4.1.1 - Eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino com diferentes técnicas de agitação. 115

FIGURA 6.4.2.1 - Cinética de extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre com diferentes soluções ácidas, A: HCl 8% (V V⁻¹), B: HNO₃ 8% (V V⁻¹) e C: Água Régia 8% (V V⁻¹). 117

FIGURA 6.4.2.2 - Cinética de extração de macro e micronutrientes em fígado bovino com diferentes soluções ácidas, A: HCl 1% (V V⁻¹), B: HNO₃ 1% (V V⁻¹) e C: HCl 1% (V V⁻¹) + Triton X-100 0,1% (m V⁻¹). 119

FIGURA 6.4.2.3 - Efeito da massa de amostra na eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino..... 120

FIGURA 6.4.2.4 - Efeito da concentração do HCl na eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino..... 121

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS USANDO SISTEMAS EM FLUXO

Nesta tese avaliou-se o uso de sistemas de fluxo e fluxo-batelada no preparo de amostras. Inicialmente, foi avaliado um sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob alta pressão e temperatura no preparo de amostras sólidas de tecidos animais e vegetais (fígado bovino, músculo bovino, camarão e folhas de espinafre, tomateiro e laranja) e líquidas de alimentos (suco de maçã, suco de manga, leite integral e semidesnatado) para a determinação de macro e micronutrientes por ICP OES. As eficiências de digestão de soluções de glicose, glicina, fenilalanina e ácido nicotínico, que são compostos modelo de fácil, intermediária, difícil e muito difícil digestão, respectivamente, foram 98, 63, 22 e 4% nas condições selecionadas (500 W e 5 mL min⁻¹). O sistema apresentou eficiências de digestão similares ou superiores aos sistemas descritos na literatura sobre digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas. A maioria dos elementos determinados nos CRMs de fígado bovino (NIST 1577b) e folhas de macieira (NIST 1515) digeridos com HNO₃ 6 mol L⁻¹ estão concordantes com os teores certificados. As melhores eficiências de digestão das amostras sólidas (ca. 90%) foram obtidas quando foi utilizada a mistura de HNO₃ 6 mol L⁻¹ com HCl 0,4 mol L⁻¹. Usando a mistura de HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + HCl 0,3 mol L⁻¹ foram obtidas as melhores eficiências de digestão para sucos de frutas (ca. 77%), enquanto que para leite foi o HNO₃ 10,5 mol L⁻¹ (ca. 76%). Os teores de macro e micronutrientes determinados nessas amostras com essas misturas apresentaram boa concordância com os teores determinados por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados de acordo com teste *t* pareado para múltiplos elementos (P 95%). Alternativamente, foi avaliado um sistema de extração fluxo-batelada para a determinação em linha de macro e micronutrientes por ICP OES nas amostras sólidas mencionadas anteriormente. As condições ótimas foram 50 mg de amostra, 4 min de extração com 10 mL de HCl 8 e 4 % (V V⁻¹) para tecidos vegetais e animais, respectivamente. Vale destacar que extrações quantitativas de Cu, Mg, Mn, Na e K podem ser alcançadas em 30 s em folhas de espinafre, enquanto que 4 min são necessários para Ca, Ba e Sr nessa amostra e para todos os analitos em fígado bovino. Extrações nas condições supracitadas foram aplicadas para as demais amostras de tecidos vegetais e animais e CRMs mencionadas acima e as eficiências de extração alcançadas variaram de 80 a 117% para a maioria dos analitos. De acordo com teste *t* pareado (P 95%) não houve diferenças significativas para a maioria dos analitos determinados por extração fluxo-batelada e digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. A exceção foi o Fe em todas as condições avaliadas para todas amostras, pois este se encontra fortemente ligado à matriz. Ambos os sistemas foram promissores para o preparo de amostras, mas ainda precisam ser aperfeiçoados para serem aplicados em análises de rotina. O sistema de digestão em fluxo possibilita a determinação de mais elementos, porém depende de dispositivos sofisticados. Enquanto que o sistema de extração fluxo-batelada apresenta alta simplicidade, porém não possibilita a determinação de elementos fortemente ligados à matriz.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SAMPLE PREPARATION PROCEDURES USING FLOW SYSTEMS

Sample preparation using flow and flow-batch systems were here studied. Initially, it was evaluated a microwave-assisted flow digestion system operated under high pressure and high temperature for sample preparation of solid samples of animal and plant tissues (bovine liver, bovine muscle, shrimp, spinach, tomato and orange leaves) and liquid samples of foods (apple juice, mango juice, whole and partially skimmed milk) for macro and micronutrients determination by ICP OES. The digestion efficiencies of glucose, glycine, phenylalanine and nicotinic acid solutions, which are compounds considered easy, medium, difficult and hard to digest, were 98, 63, 22 and 4%, respectively, in the selected conditions (500 W and 5 mL min⁻¹). The developed microwave-assisted flow digestion system showed similar or better digestion efficiencies than other systems described in the literature. Most concentrations of elements determined in CRMs of bovine liver (NIST 1577b) and apple leaves (NIST 1515), which were digested with 6 mol L⁻¹ HNO₃, were in good agreement with certified values. Best digestion efficiencies of solid samples (ca. 90%) were reached when using a mixture of 6 mol L⁻¹ HNO₃ with 0.4 mol L⁻¹ HCl. Using the digestion mixture composed by 3.7 mol L⁻¹ HNO₃ plus 0.3 mol L⁻¹ HCl best digestion efficiencies were reached for fruit juices (ca. 77%), while for milk digestion was more effective (ca. 76%) using 10.5 mol L⁻¹ HNO₃. Macro and micronutrient concentrations determined in these samples agreed well with the contents determined by microwave-assisted acid digestion on closed vessels according to a paired *t* test for multiple samples (*P* = 95%). Alternatively, it was evaluated a flow-batch extraction system for online determination of macro and micronutrients by ICP OES. The best extraction conditions were reached using 50 mg of sample, 4 min of extraction time with 10 mL of 8 and 4 % (V V⁻¹) HCl for plant and animal tissues, respectively. Quantitative extractions of Cu, Mg, Mn, Na and K were reached in 30 s for spinach leaves, while 4 min were needed for Ca, Ba and Sr. Bovine liver required 4 min of extraction time for all these analytes. These extraction conditions were applied for samples of plant and animal tissues and CRMs previously mentioned and the extraction efficiencies ranged from 80 to 117% for most analytes. According to a paired *t* test at a 95% confidence level there was no significant differences for most elements determined by flow-batch extraction and microwave-assisted digestion in closed vessels. The exception was Fe in all evaluated conditions for all samples since it is strongly linked to the sample matrix. Both flow systems were promising for sample preparation, but they still need to be improved for routine analysis applications. The microwave-assisted flow digestion system was effective for determination of a large number of elements, but it required sophisticated devices. On the other hand, the developed flow-batch extraction system is simple, but it is not applicable for quantitative determination of elements strongly linked to sample matrices.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1.1 - INTRODUÇÃO	2
1.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.2.1 - PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISES POR ICP OES	4
1.2.2 - PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO	5
1.2.2.1 - Digestão ácida em batelada	6
1.2.2.2 - Sistemas em fluxo para digestão ácida.....	7
1.2.3 - PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	10
1.2.3.1 - Extração em batelada.....	11
1.2.3.2 - Extração em fluxo e fluxo-batelada.....	13
1.2.4 - TIPOS DE DETERMINAÇÕES EM SISTEMAS EM FLUXO.....	17
Capítulo 2	21
2.1 - OBJETIVOS GERAIS	22
Capítulo 3	23
3.1 - INTRODUÇÃO	24
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.3 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.3.1 - EQUIPAMENTOS	25
3.3.2 - REAGENTES E AMOSTRAS	26
3.3.3 - PREPARO DE AMOSTRAS	27
3.3.4 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS SÓLIDAS E LÍQUIDAS	28
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
3.4.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS SÓLIDAS	30
3.4.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS LÍQUIDAS.....	36
3.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	37
Capítulo 4	39
4.1 - INTRODUÇÃO	40

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4.3 - MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.3.1 - EQUIPAMENTOS E APARATOS.....	44
4.3.2 - REAGENTES E AMOSTRAS	45
4.3.3 - PREPARO DAS AMOSTRAS	46
4.3.4 - SISTEMA DE DIGESTÃO EM FLUXO ASSISTIDO POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	46
4.3.5 - CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO	50
4.3.6 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DIGESTÃO	52
4.3.7 - AVALIAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO	52
4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO	53
4.4.2 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DIGESTÃO	57
4.4.3 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SISTEMA	59
4.4.4 - APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DIGESTÃO EM FLUXO NO PREPARO DAS AMOSTRAS DE TECIDO ANIMAL E VEGETAL	61
4.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	75
 Capítulo 5.....	 77
5.1 - INTRODUÇÃO	78
5.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
5.3 - MATERIAIS E MÉTODOS	80
5.3.1 - EQUIPAMENTOS	80
5.3.2 - REAGENTES E AMOSTRAS	81
5.3.3 - SISTEMA EM FLUXO	81
5.3.4 - PREPARO DAS AMOSTRAS	81
5.3.5 - AVALIAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO	84
5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	84
5.4.1 - DESEMPENHO DO SISTEMA DE DIGESTÃO EM FLUXO	84
5.4.2 - APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DIGESTÃO EM FLUXO NO PREPARO DE AMOSTRAS DE SUCOS DE FRUTAS.....	85
5.4.3 - APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DIGESTÃO EM FLUXO NO PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE.....	93
5.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	103

Capítulo 6.....	105
6.1 - INTRODUÇÃO	106
6.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	108
6.3 - MATERIAIS E MÉTODOS	108
6.3.1 - EQUIPAMENTOS E APARATOS.....	108
6.3.2 - REAGENTES E AMOSTRAS	109
6.3.3 - PREPARO DAS AMOSTRAS	110
6.3.4 - AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE AGITAÇÃO	110
6.3.5 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO	110
6.3.6 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO FLUXO-BATELADA.....	111
6.3.7 - DETERMINAÇÕES ON-LINE POR ICP OES	112
6.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	114
6.4.1 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE AGITAÇÃO.....	114
6.4.2 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO	115
6.4.3 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO FLUXO-BATELADA.....	122
6.4.4 - DETERMINAÇÃO ON-LINE POR ICP OES	129
6.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	136
Capítulo 7.....	139
7.1 - CONCLUSÕES FINAIS.....	140
Capítulo 8.....	143
8.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

Capítulo 1

Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das técnicas espectroanalíticas possibilita a determinação de diversos elementos em baixas concentrações (mg/kg a µg/kg), porém a maioria dessas técnicas é limitada ao uso de amostras líquidas para a execução das medidas analíticas. Isso exige que amostras sólidas e líquidas complexas sejam convertidas a uma solução representativa antes de quantificar os analitos. Porém, apesar dos progressos nas últimas décadas, isso nem sempre é algo simples e frequentemente é requerido o uso de reagentes agressivos e um tratamento drástico a fim de realizar tal conversão^{1,2}.

A etapa de preparo da amostra é uma etapa crítica na sequência analítica, uma vez que consome elevado tempo de análise e está sujeita a diversas fontes de erros analíticos, tais como contaminação e perdas do analito durante a manipulação das amostras. No caso de amostras orgânicas, os procedimentos que têm sido adotados para a disponibilização dos analitos são a extração, a extração assistida por ultrassom, a digestão ácida e digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, entre outros^{1,3}.

Normalmente, as amostras biológicas ou orgânicas são decompostas por via úmida com uso de um ácido mineral oxidante, mistura de ácidos oxidantes e complexantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio, no qual a amostra e os reagentes são mantidos sob aquecimento até completa digestão. Blocos digestores ou placas de aquecimento são utilizados para promover o aquecimento da amostra durante a digestão, porém nos últimos anos o uso de fornos micro-ondas vem sendo ampliado para a digestão de amostras sólidas. A radiação micro-ondas vem sendo aplicada no preparo de amostra em diversos procedimentos, tais como digestão, extração e combustão. Assim, diversos trabalhos são encontrados na literatura com uso da radiação micro-ondas no preparo de amostra, tanto na dissolução de minerais, bem como na digestão de amostras biológicas ou orgânicas^{1,2}.

Extração é um método de preparo de amostra baseado na separação de espécies alvo da matriz. Procedimentos de extração são uma alternativa interessante aos métodos de digestão, uma vez que os processos de extração são, em geral, mais rápidos e utilizam soluções diluídas de ácidos. Porém, para obtenção de resultados exatos alguns cuidados devem ser tomados, pois uma fração do analito pode permanecer retida na matriz²⁻⁶.

Apesar disso, diversos trabalhos têm sido encontrados na literatura utilizando a extração parcial do analito no intuito de realizar um estudo da bioacessibilidade de um dado nutriente e/ou contaminante em amostras alimentícias e também no fracionamento de metais no solo e em sedimentos. Por outro lado, alguns procedimentos têm sido desenvolvidos baseados em uma extração total de algumas espécies alvo que, posteriormente, podem ser submetidas a métodos de separação e quantificação a fim de realizar a especiação de tais analitos. Em muitos casos a extração é escolhida como etapa de preparo de amostra em estudo de especiação, pois sendo uma estratégia menos agressiva pode evitar a conversão das espécies do analito em outras espécies, o que levaria a erros de análise^{3,4,6}.

Entretanto, métodos de preparo de amostra por extração ou digestão normalmente são conduzidos em batelada, o que implica em algumas desvantagens, tais como a possibilidade de contaminação e perdas do analito durante a manipulação da amostra, particularmente quando trabalhando com frascos abertos. Além disso, requerem uma grande quantidade de frascos, que devem ser cuidadosamente descontaminados⁷⁻⁹.

O uso de sistemas de preparo de amostra em fluxo pode sanar algumas dessas desvantagens, mas para isso, alguns cuidados devem ser tomados e alguns desafios devem ser superados. Na extração em fluxo, a principal dificuldade enfrentada é o aumento de pressão dentro da coluna de extração, que pode causar vazamentos e baixa precisão. Já na digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas, os problemas decorrem da baixa eficiência de digestão causada pelo baixo tempo de residência da amostra na região irradiada, difícil introdução de matrizes sólidas na forma de suspensões contendo partículas diminutas e dificuldades causadas pela heterogeneidade do material. Apesar desses inconvenientes, vários trabalhos têm sido desenvolvidos visando superar esses obstáculos e tornar os sistemas de preparo de amostra em fluxo aplicáveis em análises de rotina com a devida rapidez, simplicidade, confiabilidade e robustez¹⁰⁻¹². Nesse contexto foram desenvolvidos e avaliados sistemas de preparo de amostra em fluxo para determinação de macro e micronutrientes em amostras de tecido animal, vegetal e alimentos por ICP OES, buscando alcançar as características supracitadas.

1.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 - Preparo de amostra para análises por ICP OES

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) tem sido intensamente utilizada na determinação de macro, micronutrientes e contaminantes em diversos tipos de amostras alimentícias e agropecuárias, entre elas: solos, fertilizantes, plantas, rações para animais, alimentos, tecidos animais e fluídos corporais¹³. Essa técnica se tornou amplamente disseminada devido alguns de seus atributos, tais como: baixos limites de detecção (LODs), ampla faixa linear de trabalho e alta precisão¹⁴. Apesar dessas vantagens, alguns cuidados devem ser tomados para garantir a obtenção de resultados confiáveis, como realizar um preparo de amostra adequado¹³.

Apesar de alguns sistemas de introdução de amostra possibilitarem a introdução de sólidos na forma de suspensões, os sistemas convencionalmente utilizados no ICP OES são compatíveis com a introdução de amostras líquidas^{1,13,15,16}. Isso exige que essas amostras sólidas sejam convertidas a uma solução aquosa representativa antes da introdução no equipamento¹. Nas amostras orgânicas ricas em carbono, tais como plantas, alimentos e tecidos animais, outro problema recorrente é o efeito de matriz causado pelo carbono, que deve ser eliminado da amostra antes da determinação por ICP OES¹⁷. Isso exige que mesmo amostra líquidas que são ricas em carbono passem por um preparo de amostra a fim de garantir análises confiáveis e evitar danos ao equipamento^{18,19}.

Entre as principais abordagens aplicadas no preparo de amostras sólidas e líquidas para análises elementares por técnicas espectroanalíticas encontra-se a digestão ácida, que pode ser classificada pelo tipo de aquecimento envolvido. Enquanto a digestão por condução térmica é efetuada usando placas de aquecimento ou blocos digestores, a digestão assistida por radiação micro-ondas utiliza fornos de micro-ondas^{1,20,21}. Um método alternativo aplicado no preparo de amostras sólidas é a extração dos analitos de interesse com uso de diversos tipos de soluções extratoras, o que possibilita a realização de estudos de bioacessibilidade de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras ambientais ou alimentícias e determinação de teores totais de alguns analitos^{1,22}. Diversos métodos de digestão e extração têm sido reportados na literatura para preparo de amostras orgânicas para análise elementar por ICP OES e serão detalhadamente descritos em tópicos subsequentes.

1.2.2 - Procedimentos de digestão

Na literatura são encontrados diversos procedimentos de digestão para o preparo de amostras orgânicas voltadas a análise elementar por ICP OES; dentre as abordagens encontradas na literatura temos a digestão ácida, a digestão alcalina e, ainda, a digestão ácida-alcalina^{1,20,23,24}. A digestão ácida é realizada usando um ácido mineral oxidante, mistura de ácidos oxidantes e complexantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio, enquanto que na digestão alcalina há o uso de bases inorgânicas ou orgânicas fortes na dissolução da amostra^{1,23}. Por fim, a digestão ácida-alcalina normalmente combina os reagentes mencionados anteriormente, sendo inicialmente realizada uma digestão ácida, que é complementada por uma digestão alcalina²⁴.

Nas digestões ácidas o principal ácido oxidante empregado é o HNO₃, que pode ser utilizado isoladamente ou combinado com HCl, H₂SO₄ e H₂O₂, sendo que em alguns casos pode haver o uso do HF para promover a decomposição de silicatos presentes em amostras de tecido vegetal²⁵. Os reagentes oxidantes adicionados às amostras orgânicas promovem sua decomposição em H₂O, CO_x e NO_x, enquanto o HF promove a conversão de SiO₂ em H₂SiF₆^{1,8,26}. Apesar do H₂SO₄ ser um ácido altamente oxidante e permitir a digestão em maiores temperaturas quando conduzida em sistemas abertos, esse reagente gera sais insolúveis com Ca(II), Ba(II), Sr(II) e Pb(II), o que compromete a determinação desses analitos. Ademais, esse ácido causa interferências de transporte no sistema de nebulização do ICP OES devido à elevada viscosidade^{1,27}. Outro ácido com alta capacidade oxidante é o HClO₄, que é uma boa alternativa na oxidação de formas de fósforo a fosfato, porém esse é pouco utilizado pelo risco de explosões durante o procedimento^{1,20,21,28}. O HCl é um ácido complexante que forma complexos estáveis com alguns analitos (Au, Tl, Hg, Fe, Ga, In e Sn), o que auxilia a dissolução de algumas amostras e a disponibilização dos analitos¹. A combinação do HCl com HNO₃ na proporção de 3:1 é conhecida como água régia, uma mistura que apresenta reagentes intermediários mais oxidantes que o HNO₃, tais como Cl₂ e NOCl, permitindo a decomposição de matrizes complexas^{1,21}. O principal agente oxidante aplicado em combinação com o HNO₃ é o H₂O₂, que é um reagente com alto poder oxidante e que em sua decomposição libera água e oxigênio^{1,20,21}.

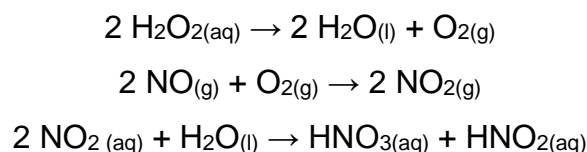
1.2.2.1 - Digestão ácida em batelada

A maioria dos métodos de digestão ácida reportados na literatura é aplicada ao modo batelada. Podem ser conduzidos em sistemas abertos e fechados, utilizando diversas fontes de energia para promover o aquecimento da amostra e dos reagentes. As principais fontes de aquecimento aplicadas são a térmica (condução) e por radiação micro-ondas. No aquecimento térmico os principais dispositivos aplicados nos procedimentos para fornecer energia ao sistema são as placas de aquecimento, blocos digestores, estufas e muflas. A maior desvantagem dessa abordagem é o lento aquecimento da amostra, que inicialmente ocorre pelo fenômeno de condução da energia térmica do equipamento para o frasco e desse para a mistura reacional e, em seguida, há o fenômeno de convecção no interior da solução para promover a distribuição do calor no sistema. O aquecimento por radiação micro-ondas tem a vantagem promover o aquecimento diretamente da solução, o que garante o rápido aquecimento do meio reacional e, conseqüentemente, pode aumentar a frequência analítica do procedimento. Isso popularizou o uso da digestão assistida por radiação micro-ondas no preparo de diversas amostras^{1,20}.

As digestões ácidas em batelada realizadas em sistemas abertos têm a vantagem de possibilitar o uso de maiores massas de amostras (> 1 g), entretanto, esses sistemas consomem maior quantidade de reagentes que são perdidos por evaporação. Os reagentes precisam ser repostos durante a digestão, o que causa aumento do teor de contaminantes nos brancos analíticos. Além disso, esses são mais susceptíveis a perdas dos analitos por evaporação e contaminação da amostra. Os sistemas de digestão ácida em batelada realizadas em sistemas fechados apresentam como maior risco as ocorrências de explosões de frascos devido ao aumento de pressão, o que limita a massa de amostra utilizados (< 0,5 g). Porém, isso possibilita reduzir o consumo de reagentes, diminuir os LODs dos brancos, aumentar a eficiência da digestão e evitar perdas dos analitos e contaminação^{1,20}.

A atual tendência nas pesquisas acadêmicas é a digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando reagentes diluídos, o que garante melhores brancos analíticos, menor consumo de reagentes e geração de resíduos, menor diluição do digeridos para ajustar as condições para introdução por nebulização pneumática^{24,29-31}. Um exemplo é a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas de amostras orgânicas utilizando ácido nítrico diluído com peróxido de hidrogênio ou oxigênio pressurizado. Nesse método há a regeneração do ácido nítrico consumido durante a

digestão pela reação do óxido de nitrogênio liberado na digestão com o oxigênio presente na fase de vapor, formando dióxido de nitrogênio, que é condensado e absorvido em solução e por uma reação de desproporcionamento que regenera o ácido nítrico^{29,31,32}. O mecanismo de reação é representado a seguir:



Uma vez que esses procedimentos são realizados em batelada algumas desvantagens são observadas, tais como etapas de carga e descarga de frascos e rotores, abertura e fechamento de frascos antes e depois da digestão. Além disso, tais frascos também são fontes potenciais de contaminação cruzada entre amostras assim, uma etapa cuidadosa de limpeza desses frascos é necessária, o que torna o processo global moroso. Ressalta-se que essas etapas podem ser minimizadas quando são utilizados sistemas de digestão em fluxo^{12,33}.

1.2.2.2 - Sistemas em fluxo para digestão ácida

Os sistemas de digestão em fluxo são equipados com um reator helicoidal enovelado em torno de uma bobina de aquecimento ou posicionado dentro da cavidade do forno micro-ondas. Uma câmara de pequeno volume interno localizada na cavidade do forno micro-ondas também pode ser utilizada como reator nos sistemas de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas. As amostras são transportadas através do reator, onde é submetida ao aquecimento por condução térmica ou por ação da radiação micro-ondas a fim de acelerar a cinética das reações de oxidação. O fluxo contínuo do carregador através do sistema em fluxo promove a limpeza do mesmo, eliminando a necessidade da etapa de limpeza de frascos realizada na digestões ácidas em batelada^{9,12}.

A digestão pode ser realizada de duas formas, no primeiro arranjo, uma solução com amostra e reagente é introduzida no reator em um fluxo contínuo. Como nesse modo a amostra é inserida continuamente no sistema, as variações na dispersão da amostra devido à liberação de gases não se tornam importantes, contudo tal sistema é pouco versátil e consome um grande volume de amostra. No segundo arranjo, uma alíquota da amostra é injetada no sistema e flui para o reator

juntamente com o reagente para ser digerida, sendo em seguida resfriada e desgaseificada antes de ser direcionada ao detector. Nos dois casos, as medidas podem ser realizadas tanto off-line quanto online^{8,9,11}.

Procedimentos de digestão em fluxo geralmente envolvem a introdução de suspensões preparadas a partir das amostras sólidas e emulsões ou soluções preparadas a partir das amostras líquidas complexas. Esses sistemas em fluxo exigem dispositivos mais sofisticados, como o uso de reatores apropriados para possibilitar o emprego de ácidos concentrados, altas temperaturas e pressões visando digerir rapidamente a amostra. Nesses sistemas é inviável utilizar as válvulas solenoides, pois essas são susceptíveis a bloqueio e a desgastes das partes móveis, causando vazamentos e eventuais fraturas dos dispositivos. A propulsão da amostra é outro obstáculo encontrado, pois o uso de bombas peristálticas dificulta a transferência completa da amostra, podendo ocorrer perda potencial nas paredes dos tubos de Tygon[®] e conectores, o que pode causar contaminação cruzada entre as amostras. Também há a formação de bolhas de gás durante a etapa de digestão, o que exige a colocação de uma unidade de desgaseificação antes do sistema de detecção e, eventualmente, um sistema de filtração do digerido a fim de remover sólidos residuais, quando a digestão é incompleta. Além disso, pode ser necessário a presença de um sistema de refrigeração, quando as medidas são realizadas on-line^{8,9,11}.

A promoção de digestão em fluxo de amostras sólidas e amostras líquidas complexas requer o emprego de sistemas de alta pressão e temperatura, que podem ser obtidos usando reatores adequados a suportarem tais condições e válvulas de controle de pressão na entrada e saída do sistema visando evitar a expulsão da amostra do reator. Contudo, o desenvolvimento de reatores adequados para serem aplicados em tais condições e que sejam transparentes à radiação micro-ondas para serem utilizados em sistemas de digestão assistida por radiação micro-ondas é complexo, pois os materiais comumente utilizados nos reatores como politetrafluoretileno (PTFE) ou perfluoralcóxi alceno (PFA) apresentam resistência mecânica limitada, podendo suportar no máximo 20 bar de pressão e temperaturas de até 180 °C. Por outro lado, tubos de quartzo inviabilizam o uso de HF, que é necessário para a decomposição de solos, sedimentos e tecidos vegetais que contenham sílica³⁴. Alguns trabalhos são encontrados na literatura utilizando sistemas em fluxo operados em média (< 25 bar) e alta (> 25 bar) pressão para digestão de

amostras sólidas e líquidas conforme apresentado na TABELA 1.2.2.2.1. Essa classificação do sistemas pela pressão de operação foi realizada por KNAPP e WILTSCHE³⁵.

TABELA 1.2.2.2.1 - Sistemas de digestão em fluxo operados sob média e alta pressão reportados na literatura.

Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Reator	Referência
Solo	15	116	PFA	12
Leite em pó e tecido animal	35	250	Autoclave de PTFE e Quartzo	34
Sedimento e tecido animal	24	120	PFA recoberto com Kevlar	36
Tecido vegetal, filtro de ar, urina liofilizada, lodo, poeira e tinta	24	150	PFA recoberto com Kevlar	37
Alimento, tecido animal, tecido vegetal e sucos de frutas	40	230	Autoclave de PFA e Quartzo	38
Tecido animal, tecido vegetal e alimentos	100 150/300 300	250 200/260 360	Quartzo TAIRV TAIRT	39
Lodo de esgoto	300	360	Pt/Ir (80/20)	40
Tecido animal, tecido vegetal e alimentos	300	360	Pt/Ir (80/20)	41
Tecido animal e tecido vegetal	300	360	Pt/Ir (80/20)	42

Siglas: TAIRV – tubo de aço inoxidável revestido com Vidro e TAIRT – tubo de aço inoxidável revestido com teflon

Os reatores utilizados em sistemas de digestão em fluxo operados sob médias pressões são de PFA recoberto com Kevlar^{36,37}, enquanto que os reatores de alta pressão e temperatura desenvolvidos por PICHLER et al.³⁴ e por WILTSCHE et al.³⁸ empregaram uma bobina de fluoropolímero colocada dentro da câmara pressurizada com N₂, o que evita a deformação do reator quando exposto a altas temperaturas e pressões. Esses dois últimos sistemas suportam altas pressões (ca. 35 bar) e podem atingir temperaturas superiores a 200 °C, que são necessárias para digestões rápidas e eficientes de matrizes orgânicas, enquanto que os demais

sistemas de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas não superam a temperatura de 180 °C, devido a menor pressão suportada pelos reatores^{12,34,36-38}.

Nos sistemas de digestão ácida por condução térmica alguns cuidados também devem ser tomados na escolha do reator, que deve apresentar alta resistência mecânica e boa condutividade térmica, além de serem quimicamente inertes. Os trabalhos descritos na TABELA 1.2.2.2.1 demonstram a aplicabilidade de alguns reatores nos sistemas de digestão em fluxo por condução térmica. Além, da desvantagem mencionada anteriormente para os reatores de quartzo, que inibem o uso de HF durante as digestões, esse material apresenta uma baixa condutividade térmica o que dificulta o rápido aquecimento da amostra e dos reagentes. Considerando-se a condutividade térmica e a resistência mecânica, os reatores metálicos, que não podem ser aplicados nos sistemas de digestão assistida por radiação micro-ondas por não serem transparentes à radiação, tornam-se materiais interessantes para a confecção de reatores em sistema de digestão em fluxo por condução térmica. Entretanto, alguns reatores metálicos apesar de apresentarem tais características, não são quimicamente inertes aos ácidos sofrendo corrosão, ou aos analitos, que podem ser adsorvidos na superfície do reator. Em contrapartida, esses reatores têm a capacidade de suportar pressões superiores àquelas permitidas nos reatores aplicados em sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas³⁹⁻⁴².

Apesar da descrição de tais sistemas de digestão em fluxo na literatura, novos tipos de reatores podem ser avaliados para melhorar o desempenho desses sistemas, seja pelo uso de materiais para confecção dos reatores ou pela avaliação de novos arranjos de reatores, que garantam os requisitos mencionados anteriormente, juntamente com a capacidade de aquecer rapidamente a amostra e os reagentes no intuito de acelerar a cinética de digestão.

1.2.3 - Procedimentos de Extração

A extração está baseada na remoção de espécies alvo a partir de uma matriz sólida. Tal procedimento é realizado com auxílio de uma solução extratora, que pode ser uma solução ácida ou básica ou ainda pode conter agentes redutores, oxidantes ou complexantes. Essa estratégia pode ser combinada com agitação mecânica, aquecimento por condução, uso de ultrassom ou radiação micro-ondas visando aumentar a eficiência e a velocidade da extração. Algumas medidas devem

ser tomadas em uma extração para se atingir bons resultados em uma análise quantitativa, pois uma fração do analito pode permanecer retida na matriz. Assim, os tamanhos de partículas da amostra e a escolha da solução extratora devem ser cuidadosamente avaliados^{1,4,7}.

Essa abordagem tem a vantagem da rapidez e do uso de reagentes diluídos sob condições brandas^{43,44}. Além disso, as extrações possibilitam maior seletividade, pois a eficiência da extração depende das condições aplicadas e do extrator utilizado. Nesse sentido, a avaliação da biodisponibilidade de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras orgânicas e inorgânicas se torna possível pelo uso de extratores apropriados, que mimetizam as condições fisiológicas ou ambientais avaliadas^{22,45}. Ademais, estudos de especiação têm utilizado esse método por possibilitar a mobilização do analito, com uma menor possibilidade de promover interconversões entre espécies, que é algo geralmente indesejável⁴⁶.

Por serem realizadas em condições brandas e com o uso de reagentes diluídos, esses procedimentos utilizam um menor volume de soluções, geram menos resíduos e diminuem os riscos de acidente com o analista⁴³. Entretanto, não permitem a determinação de elementos fortemente ligados à matriz, tais como: Al, Fe e P⁴⁷⁻⁴⁹. Nesse caso, abordagens mais drásticas, tais como a digestão, são requeridas para permitir a determinação desses analitos. De qualquer forma, a extração é uma alternativa interessante para a determinação de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras orgânicas e inorgânicas, devendo-se considerar o tipo de amostra e os resultados pretendidos.

1.2.3.1 - Extração em batelada

Nas extrações alcalinas há a avaliação de diversos extratores no preparo de amostras, sendo que as principais bases inorgânicas aplicadas são o NaOH, KOH e NH₃ e as bases orgânicas são o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e aminas terciárias solúveis em água (CFA-C)²³. A extração alcalina permite a disponibilização de determinados analitos que são incompatíveis com o uso de HNO₃, tais como Sn e Sb, permite a neutralização do HF utilizado durante o preparo de amostra a fim de evitar danos a tocha de quartzo do ICP OES, apresenta rápida velocidade de extração e pode ser realizadas em condição ambiente²³. Alguns autores propuseram a substituição do HF por bases inorgânicas, e.g. NaOH, para promover a solubilização de silicatos²⁴. Entretanto, esses reagentes precisam ser neutralizados antes da

introdução dos extratos no sistema de nebulização, para evitar danos a componentes de vidro e a tocha de quartzo do ICP OES. Além disso, alguns trabalhos têm reportado a substituição das aminas terciárias por reagentes menos tóxicos, pois apesar de haver limitada informação sobre a toxicidade desses reagentes sabe-se que liberam vapores irritantes aos olhos, nariz, garganta e sistema respiratório⁴⁹⁻⁵¹.

A extração ácida é outra abordagem bem explorada, sendo que o principal ácido aplicado em tais procedimentos é o ácido clorídrico devido às suas propriedades complexantes. Esses procedimentos têm sido aplicados para a extração de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras de tecido vegetal e animal, utilizando as seguintes condições de extração: concentração de HCl na faixa de 0,1 a 3 mol L⁻¹, tempo de extração de 5 a 65 min e temperaturas que variam de 25 a 80 °C^{43,44,47,52-54}.

Nos últimos anos têm se destacado o uso da extração assistida por ultrassom no preparo de amostra para análise elementar por técnicas espectroscópicas^{55,56}. A velocidade de extração pode ser aumentada devido ao efeito de cavitação, no qual há a formação de bolhas no meio reacional por ação do ultrassom. Essas bolhas aumentam de tamanho até implodirem devido às diferenças entre a pressão externa e interna da bolha. Nesse processo há uma grande liberação de energia, o que pode levar a uma fragmentação das partículas sólidas da amostra e, conseqüentemente, aumentando a área superficial da amostra e facilitando a mobilização dos analitos. Outro fenômeno envolvido no processo é a formação de radicais livres, que ocorrem dentro das bolhas. Esses reagentes intermediários são altamente reativos e podem reagir com a amostra, como é o caso da formação dos radicais hidroxila pela sonicação da água^{1,55,57,58}. Entretanto, cuidados devem ser tomados para evitar a decomposição e/ou transformação molecular durante a sonicação, o que pode comprometer análises de especiação devido à interconversão das espécies. Além disso, pode ocorrer baixa eficiência de extração de alguns elementos como mencionado anteriormente devido à não mobilização desses analitos da amostra^{55,59,60}.

A extração assistida por radiação micro-ondas também tem sido mais frequentemente utilizada, principalmente em estudos de análise de especiação química^{46,61,62}. De modo geral, esses procedimentos são mais rápidos que as extrações convencionais, devido ao rápido aquecimento do extrator pela ação da radiação micro-ondas. Quando efetuados em frascos fechados o procedimento

diminui o consumo de reagentes e a geração de resíduos, além de serem menos susceptíveis às contaminações^{46,63}. Os parâmetros mais críticos envolvidos no processo são o tipo de extrator, potência de radiação micro-ondas aplicada e o tempo de extração⁴⁶. Entretanto, esse método de extração e aqueles anteriormente mencionados são realizados em batelada, o que acarreta alguns inconvenientes. Normalmente são realizados em múltiplas etapas, o que aumenta o manuseio da amostra e, conseqüentemente, a possibilidade de erros durante o preparo da amostra. Além disso, a realização de todo o processo em múltiplas etapas torna o processo global demorado e laborioso apesar dos baixos tempos de extração alcançados em alguns métodos citados anteriormente. Tais problemas podem ser minimizados com o uso de sistemas, que são sistemas fechados e que envolvem menor manipulação das amostras^{9,64}. Porém, cuidados devem ser tomados a fim de evitar entupimento dos sistemas de extração em fluxo, formação de volumes mortos ou percolação do extrator por caminhos preferenciais nos reatores que podem comprometer o desempenho do sistema e a confiabilidade dos resultados¹⁰.

1.2.3.2 - Extração em fluxo e fluxo-batelada

Diversos sistemas de extração em fluxo têm sido aplicados em análise de traços baseadas na extração sequencial ou total dos analitos em amostras de tecido vegetal, tecido animal, alimentos e ambientais. Alguns desses trabalhos são apresentados na TABELA 1.2.3.2.1. Esses sistemas apresentam diferentes tipos de reatores contendo a amostra sólida, tais como: minicoluna cilíndrica (MCC), coluna em bobina rotativa (CBR), câmara de fluxo com agitação (CFA) e coluna de grande calibre (CGC), bem como diferentes sistemas de propulsão com bomba peristáltica ou bomba de alta pressão utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A detecção pode ser realizada on-line e/ou off-line. A FIGURA 1.2.3.2.1 apresenta esses dispositivos e equipamentos que têm sido utilizados na construção de sistemas de extração em fluxo¹⁰.

TABELA 1.2.3.2.1 - Sistemas de extração em fluxo para avaliação de bioacessibilidade ou determinação total de macro, micronutrientes e contaminantes em amostras orgânicas e inorgânicas.

Amostra	Analito	Reator	Tipo de Extração	Referência
Solo e Sedimento	Se	CGC e CBR	EPS	7
Frutos do mar	As(III), As(V), MMA, DMA e AsB	MCC (HPLC)	EPS	22
Arroz	As(III), As(V), MMA e DMA	MCC	EPS	45
Solo e Lodo	As e Sb	CGC e CBR	EPS	64
Solo	Ca, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	CGC	EPS	65
Frutos do mar	Al, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, V e Zn	MCC (HPLC)	EPS	66
Frutos do mar	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC e TMAO	MCC	EPS	67
Lodo	As, Fe, Mn, Pb e Zn	CGC	EPS	68
Folhas de faia e folhas de oliva	Cd e Pb	MCC	ETMW	69
Mexilhão	Cu	MCC	ETUS	70
Frutos do mar	Mn	MCC	ETUS	71
Mexilhão	Cd e Pb	MCC	ETUS	72
Frutas e legumes	Cd	MCC	ETUS	73
Carne	Zn	MCC	ETUS	74

Siglas: MMA - monometil arsênio, DMA - dimetil arsênio, AsB - arsenobetaina, AsC - arsenocolina, TMAO - óxido de trimetilarsina, CGC - coluna de grande calibre, CBR – coluna em bobina rotativa, MMC - minicoluna cilíndrica, EPS - extração parcial e sequencial, ETMW - extração total assistida por radiação micro-ondas e ETUS - extração total assistida por ultrassom.

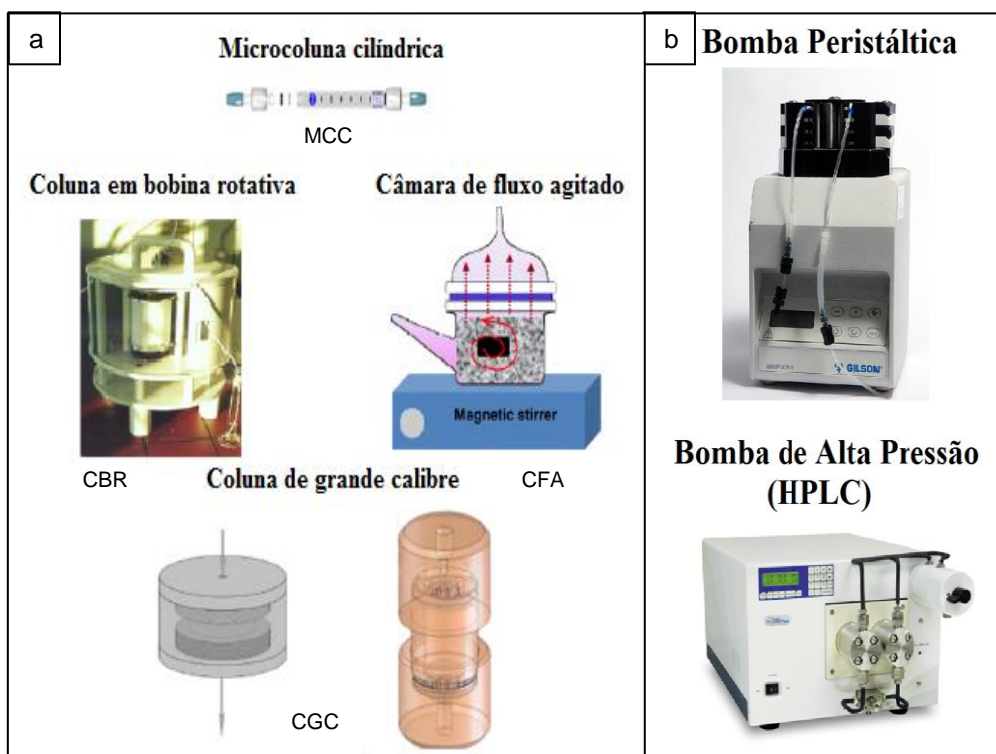


FIGURA 1.2.3.2.1 - Dispositivos e equipamentos utilizados em sistema de extração em fluxo: reatores contendo a amostra (a)¹⁰ (Nº da licença: 4033101084367 - Elsevier) e sistemas de propulsão (b).

A CFA foi um dos primeiros dispositivos projetados para uso em extração sequencial em fluxo, apresentando a vantagem de suportar grandes quantidades de amostra (*ca.* 1 g), sem causar pressurização significativa do sistema, além disso não há restrição quanto ao tamanho de partícula. Contudo, esse dispositivo apresenta um elevado volume morto, que pode resultar em erros em quantificações em linha e diminuir a precisão do sistema. Dentre os reatores apresentados a CBR é o mais notável dispositivo uma vez que não necessita de membranas e/ou filtros para reter a amostra, pois a mesma é condicionada dentro da coluna por ação da força centrífuga. Porém, esse reator é limitado a amostras homogêneas com partículas menores que o diâmetro da coluna do reator. Além disso, a CBR necessita instrumentação específica e complexa, o que limita a sua disseminação em laboratórios de rotina e de pesquisa¹⁰.

A MCC ainda é o reator mais escolhido para sistemas de extração em fluxo, sendo que para construção da MCC têm sido utilizados tubos de fluoropolímeros, cartuchos de extração em fase sólida (SPE) e até colunas de HPLC. Além disso, a MCC apresenta um Volume morto mínimo, o que resulta em extratos mais concentrados do que aqueles obtidos usando CFA e CBR e implica em menor consumo de solução extratora. Todavia, a aplicação da MCC é restrita a pequenas

massas de amostra (5 - 200 mg), pois o aumento do tamanho da coluna e quantidade de amostra empacotada causam o aumento da pressão do sistema, que pode originar vazamentos e/ou percolação da solução por caminhos preferenciais e, assim, limita a aplicabilidade do sistema para amostras com alta homogeneidade a fim de garantir uma boa repetibilidade. Além disso, há a necessidade de empacotar as amostras, o que diminui a frequência analítica do procedimento, uma vez que esse trabalho é feito manualmente e cuidadosamente para evitar formação de volumes mortos ou entupimentos devido ao denso empacotamento^{10,66,67,75}. Também foi desenvolvida a CGC, que pode ser aplicada em maiores quantidades de amostra, o que possibilita a análise de amostras que não são altamente homogêneas. Nesses dispositivos é necessário fluidizar a amostra usando altas vazões do extrator para garantir a homogeneidade da suspensão da amostra dentro do reator e evitar o isolamento de partículas individuais no meio da solução extratora. O uso da CGC possibilita trabalhar com até 2 g de amostra sem uma etapa prévia de homogeneização (moagem e classificação)^{10,45}.

A bomba peristáltica é o sistema de propulsão mais utilizado para transporte da solução extratora em sistemas de extração em fluxo, como consequência do seu custo adequado e fácil operação. Porém, o uso de uma bomba peristáltica é incompatível com o emprego de solventes corrosivos (ácidos fortes ou agentes oxidantes) e dificulta o emprego de reatores que possam trabalhar com maiores massas de amostras (CBR e CGC). Já as bombas de alta pressão de HPLC têm sido adaptadas para aplicação em sistemas de extração em fluxo com alta impedância no sistema de extração, porém, os sistemas que fazem uso dessa bomba continuam sendo afetados pela pressurização do sistema. Esse aspecto e o custo até sete vezes maior do que uma bomba peristáltica limitam a aplicabilidade de bombas de alta pressão em sistemas de extração em fluxo^{10,22,66,67}.

Apesar de não haver sistemas de extração fluxo-batelada para a determinação de macro e micronutrientes em tecido animal e vegetal, há a proposição na literatura de um sistema de extração fluxo-batelada para determinação de antroquinonas em plantas medicinais⁷⁵. Sistemas fluxo-batelada tem a vantagem de combinar características de sistemas em fluxo, multicomutado e batelada. Além da capacidade de ser acoplado com diversos equipamentos de preparo de amostra e quantificação dos analitos^{76,77}. Um exemplo da vantagem desses sistemas é a não necessidade de utilizar reatores fixos através dos quais flui a solução extratora, como

os reatores mencionados anteriormente: MCC, CBR, CFA e CGC. Esse aspecto facilita a etapa de quantificação, uma vez, que são obtidos extratos com concentrações homogêneas do analitos⁷⁵.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura faz determinações parciais dos analitos e os trabalhos que propuseram a determinação total dos analitos são geralmente aplicados para amostras de tecido vegetal. Além disso, não há a proposição de sistema de extração fluxo-batelada que possibilite a análise multielementar de macro e micronutrientes por ICP OES. Assim, torna-se atrativo o desenvolvimento de um sistema de extração fluxo-batelada para a determinação de macro e micronutrientes em amostras de tecidos animal e vegetal por ICP OES.

1.2.4 - Tipos de determinações em sistemas em fluxo

Os sistemas de preparo de amostra em fluxo ou fluxo-batelada têm como vantagem a versatilidade, que permite o acoplamento direto dos mesmos com diferentes tipos de sistemas de detecção. O modo de detecção aplicado no sistema em fluxo e fluxo-batelada pode ser classificado em quatro tipos: in-line, on-line, at-line e off-line^{11,78,79}.

O modo de detecção in-line ocorre quando há a determinação do analito de interesse diretamente do meio reacional e normalmente envolve o uso de sensores, que são inseridos ou posicionados no reator no qual ocorre o preparo da amostra. Esse modo de quantificação é pouco aplicado em sistemas em fluxo e fluxo-batelada, apesar de ser uma forma interessante de monitoramento e ser teoricamente aplicável. As aplicações mais frequentes de detectores in-line são as medidas de pH, eletrodos seletivos, temperatura, pressão, densidade e vazão⁷⁸⁻⁸¹. Esse tipo de abordagem não é possível de ser realizada por determinações espectrométricas, pois tais instrumentos são de grande porte quando comparados com os sistemas em fluxo e fluxo-batelada e a amostra deve ser direcionada ao instrumento a fim de passar pelos processos físicos e químicos que permitam a quantificação do analito.

O modo de detecção que permite o monitoramento mais rápido dos analitos de interesse por técnicas espectrométricas é a on-line. Nesse modo há uma conexão física entre os sistemas em fluxo e fluxo-batelada com o sistema de detecção, onde a transferência da amostra é realizada por meio de interfaces tais como: bombas peristálticas, injetores comutadores, válvulas e bombas solenoides, conectores em T ou interfaces de divisão de fluxo. Dessa forma, o processo é automatizado, podendo

ser controlado por dispositivos eletrônicos e os respectivos programas de controle. A grande vantagem desse modo de detecção é a pequena interferência do analista no processo por serem realizadas em sistemas fechados, o que diminui os erros analíticos e permite a limpeza da interface durante o procedimento^{78,79,81,82}. Apesar desse modo de detecção ser facilmente combinado com técnicas espectrométricas, a determinação on-line dos digeridos oriundos de sistemas de digestão em fluxo por ICP OES não é uma tarefa simples, pois nos digeridos há altas concentrações de gases gerados durante a digestão que podem extinguir o plasma de argônio, o que exige o uso de sistemas de nebulização apropriado para permitir tal modo de detecção^{39,40}.

Essas duas formas mencionadas anteriormente são as que possibilitam um rápido monitoramento dos analitos, sendo assim possível realizar estudos cinéticos de reações químicas e até mesmo o controle de processos industriais^{11,78,80}. Nos modos de detecção at-line e off-line não há o acoplamento direto entre o sistema em fluxo com o instrumento aplicado na quantificação dos analitos. No modo de detecção at-line a amostra é coletada no final do sistema em fluxo ou fluxo-batelada e, em seguida, a quantificação é realizada. Apesar do curto intervalo de tempo entre o preparo da amostra e a quantificação dos analitos, não há uma conexão física entre os dois sistemas, o que exige a atuação de um operador ou de um dispositivo automatizado ou robotizado. Um exemplo, é o uso de amostrador automático que realiza a introdução das amostras no espectrômetro logo após a coleta de mesma no final do sistema de preparo de amostra em fluxo ou fluxo-batelada⁷⁹⁻⁸¹.

Por fim, a detecção off-line ocorre quando há a coleta das amostras no final de um sistema em fluxo ou fluxo-batelada, que são armazenadas para posterior análise por equipamentos que nem sempre estão no mesmo espaço físico que se encontra o sistema em fluxo ou fluxo-batelada. Esse modo apresenta uma grande versatilidade, uma vez que a amostra pode ser analisada por diferentes técnicas instrumentais e pode ser quantificada por mais de uma vez visando confirmar os resultados. Ademais, são independentes do uso de interfaces apropriadas e sistemas automatizados, que podem aumentar os custos de operação e confecção do sistema. Porém, requer mais horas de trabalho do analista, diminui a frequência analítica do método e aumenta a susceptibilidade aos erros analíticos^{11,78,81,82}.

O importante na escolha do modo de detecção é avaliar o que é viável ao processo. Apesar dos modos de detecção in-line e on-line serem aparentemente a melhor opção, nem sempre podem ser realizados devido a dificuldades operacionais

ou devido ao custo envolvido na confecção e aquisição de tais dispositivos. Além disso, mais de um modo de detecção pode ser aplicado, assim enquanto variáveis como pressão e temperatura podem ser monitoradas in-line, uma fração da amostra pode ser direcionada para determinação on-line dos analitos e o restante da amostra pode ser coletada no final do sistema para análises adicionais pelo modo at-line ou off-line. É importante enfatizar que o ICP OES é um equipamento de custo elevado e com alto custo operacional, desse modo é viável a realização de monitoramento on-line dos analitos de interesse, quando a amostra obtida no final do processo possa ser diretamente introduzida no equipamento sem causar danos físicos ao mesmo ou afetar a qualidade dos dados obtidos. Ademais, quando a frequência analítica do sistema em fluxo é menor do que a frequência analítica do ICP OES há um maior consumo de argônio por amostra analisada, o que aumenta o custo do procedimento.

Capítulo 2

Objetivos Gerais

2.1 - OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desta tese de doutorado foi o desenvolvimento e a avaliação de sistemas em fluxo e fluxo-batelada de preparo de amostra para a determinação de macro e micronutrientes em amostras de tecidos vegetais, tecidos animais e alimentos por ICP OES. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Preparar e caracterizar as amostras sólidas e líquidas aplicadas na avaliação do desempenho dos sistemas de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas e sistema de extração fluxo-batelada;
- ✓ Avaliar o desempenho de um sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob alta pressão e temperatura no preparo de amostras sólidas de tecidos animais e tecidos vegetais e de amostras líquidas de sucos de frutas e leite para determinação de macro e micronutrientes por ICP OES durante estágio na Universidade Tecnológica de Graz, Áustria;
- ✓ Desenvolver e avaliar o desempenho de um sistema de extração fluxo-batelada operado sob condições ambientes para o preparo de amostras sólidas de tecidos animais e tecidos vegetais para determinação de macro e micronutrientes por ICP OES no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos;
- ✓ Comparar o desempenho dos procedimentos de preparo de amostra em fluxo com o procedimento de preparo de amostra em batelada baseado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.

Capítulo 3

Preparo e caracterização das amostras sólidas e líquidas

3.1 - INTRODUÇÃO

A caracterização das amostras é de fundamental importância para avaliar o desempenho de um método de preparo e entender os processos químicos e físicos envolvidos. Um parâmetro importante que afeta a eficiência de processos químicos envolvendo uma fase sólida e outra líquida é a distribuição do tamanho das partículas. A eficiência de extração de diversos compostos e elementos de amostras sólidas está diretamente relacionada com a distribuição do tamanho das partículas⁸³⁻⁸⁵. Geralmente, partículas menores possibilitam atingir maior eficiência de extração, porém essas também podem causar o entupimento de filtros ou reduzir a eficiência de extração devido à formação de aglomerados^{84,85}. Extrações quantitativas foram atingidas com partículas de amostra entre 150 e 300 μm conforme demonstrado por SARI e VELIOGLU⁸⁴ e WIJAYA et al.⁸⁵, mas houve entupimento de filtros quando essa faixa de tamanho de partículas foi utilizada por PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO⁸³, o que exigiu o uso de partículas maiores. O tamanho das partículas também afeta a estabilidade de emulsões, sendo que alguns trabalhos na literatura sugeriram o uso de amostras com tamanhos de partículas inferiores a 100 μm para o preparo de emulsões, que normalmente são os tamanhos de partículas de materiais de referência certificados (CRMs)^{16,86,87}.

Outro parâmetro importante para a avaliação do desempenho de um procedimento de digestão é o teor de carbono orgânico total (TOC) da amostra⁸⁸. Considerando-se esse valor e a concentração do carbono orgânico residual (ROC) após a digestão da amostra é possível avaliar a eficiência do procedimento de digestão⁸⁸⁻⁹⁰. Quando o teor de TOC da amostra é desconhecido, a avaliação da eficiência da digestão só pode ser qualitativa e baseada na concentração de ROC, que é dependente do tipo e quantidade de amostra utilizada no procedimento⁸⁸.

Assim, a caracterização física e química das amostras sólidas e líquidas aplicadas no desenvolvimento de um método de preparo de amostra é importante, especialmente em sistemas de digestão em fluxo e de extração fluxo-batelada quando se tornam primordiais para avaliação do desempenho dos mesmos.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- ✓ Coletar e preparar as amostras sólidas e líquidas que foram aplicadas no desenvolvimento e na avaliação dos sistemas de digestão em fluxo e extração fluxo-batelada;
- ✓ Caracterizar as amostras sólidas e líquidas, determinando-se o teor e a concentração de TOC, respectivamente, no intuito de avaliar a eficiência de digestão do sistema de digestão em fluxo e determinar os teores de macro e micronutrientes para avaliar a exatidão dos procedimentos desenvolvidos;
- ✓ Determinar o tamanho de partícula médio das amostras sólidas e a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partículas para avaliar a possibilidade de preparar emulsões homogêneas e possibilitar extrações rápidas e quantitativas dos constituintes inorgânicos dessas amostras.

3.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 - Equipamentos

As amostras de tecido vegetal foram secas em estufa de circulação de ar forçado (Modelo 330, Fanem, Brasil) e as amostras de tecido animal foram liofilizadas em um liofilizador comercial (MicroModulyo Freeze Dryer, Thermo Scientific, EUA). As digestões assistidas por radiação micro-ondas em batelada das amostras sólidas e líquidas foram realizadas em um forno micro-ondas de cavidade (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Áustria) em frascos de PFA (Modelo HF – 40 bar) suportados por capas cerâmicas. Destiladores de ácido foram utilizados para a purificação do HNO₃ e HCl destilação desses ácidos abaixo dos seus pontos de ebulição. A purificação do ácido nítrico foi realizada no sistema de destilação de ácidos Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha), enquanto o ácido clorídrico foi realizado no sistema de destilação de ácidos DUOPUR (Milestone, Sorisole, Itália).

As concentrações de TOC das amostras líquidas de sucos de frutas e leites foram determinadas usando um ICP OES com Visão axial (Ciros Vison EOP, Spectro, Alemanha) com nebulizador de fluxo cruzado, câmera de nebulização tipo Scott e uma tocha padrão de ICP com 2,5 mm de diâmetro interno do tubo injetor. Para as medidas foi utilizada a potência de radiofrequência de 1,4 kW, vazões de gás externo, intermediário e de nebulização de 12,5; 0,6 e 0,83 L min⁻¹, respectivamente,

e a linha de emissão atômica monitorada foi C 193,091 nm. Os teores de TOC das amostras sólidas de tecido vegetal e animal foram determinadas por um Analisador CHNS/O (2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer, Perkin Elmer, EUA), sendo que para essas análises as amostras foram pesadas em microbalança analítica (Modelo AD6, Perkin Elmer, EUA). A distribuição dos tamanhos de partículas das amostras sólidas de tecidos vegetal e animal foi medida por um analisador de tamanho de partícula por difração com laser (Fritsch Analysette 22 MicroTec plus, FRITSCH, Alemanha).

Os analitos foram quantificados nos digeridos usando o ICP OES descrito acima, sendo aplicadas as mesmas condições instrumentais com exceção da potência de radiofrequência que foi alterada para 1,35 kW. As seguintes linhas de emissão (nm) foram usadas para quantificação dos analitos: Al 167,078(II), As 189,042(I), B 249,773(I), Ba 455,404(II), Ca 317,933(II), Cu 324,754(I), Fe 238,204(II), K 766,491(I), Mg 280,270(II), Mn 257,611(II), Na 589,592(I), P 177,495(I), S 180,731(I), Sr 407,771(II), Sc 424,683(II) e Zn 213,856(I), sendo que (I) e (II) representam as linhas atômicas e iônicas, respectivamente. Dentre os elementos monitorados, Sc foi utilizado como padrão interno e adicionado aos digeridos antes das análises.

3.3.2 - Reagentes e amostras

Todas as soluções e suspensões foram preparadas com HNO₃ destilado abaixo do ponto de ebulição, HCl e HF de alta pureza (Suprapur, Merck, Alemanha) e água desionizada (18 MΩ cm⁻¹, Barnstead Nanopure, Thermo Fisher Scientific, EUA). As curvas de calibração foram preparadas a partir de uma solução padrão multielementar contendo 100 mg L⁻¹ de Al, As, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn (Roth, Alemanha) em HNO₃ 3% V V⁻¹ e soluções estoque 1000 mg L⁻¹ de enxofre e fósforo (SCP Science, Canada).

As amostras sólidas utilizadas foram compostas por músculo bovino, fígado bovino, camarão e folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro, sendo essas obtidas no comércio local de São Carlos (SP, Brasil). Enquanto que as amostras líquidas utilizadas nos estudos foram de leite integral (3,5% de gordura, Vollmich, Jeden Tag, Áustria), leite semidesnatado (0,9% de gordura, Österreichische Bio-Bergbauern-Leichtmilch, Naturapur SPAR, Áustria), suco de maçã (100% Apfel, SPAR, Áustria) e suco de manga (Happy day, RAUCH, Áustria). As amostras de leites

e sucos de frutas foram obtidas no mercado local de Graz (Áustria). Também foram utilizados dois CRMs: fígado bovino (NIST 1577b) e folhas de macieira (NIST 1515).

3.3.3 - Preparo de amostras

As amostras líquidas foram armazenadas até o momento do preparo, não passando por nenhum tratamento prévio. Essas amostras foram conservadas em um freezer a -18 °C em tubos de polietileno (PE) de 50 mL para conservação em longos prazos, sendo essas descongeladas durante a noite em uma geladeira comercial a 4 °C antes da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. As amostras de tecido vegetal foram lavadas antes de murcharem com água da torneira e, em seguida, com água desionizada, a fim de remover resíduos de solo e poeira, que poderiam estar aderidos à superfície das folhas e contaminar as amostras durante o preparo. Posteriormente, essas amostras foram secas com papel toalha, colocadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação de ar forçado a 60 °C por 72 h até atingir massa constante. Por sua vez, as amostras de tecido animal foram mantidas em congelador até o momento do preparo. Essas foram picadas em pequenos cubos usando uma faca de cerâmica (ZrO₂) e, em seguida, congeladas com uso de nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 h até atingir massa constante. As amostras foram pesadas antes e após secagem a fim de determinar o teor de umidade das amostras.

Após a etapa de desidratação, essas amostras foram moídas em um moinho criogênico, sendo que o programa de moagem foi otimizado de acordo com as características das amostras (condições apresentadas na TABELA 3.3.3.1.) As amostras de tecido animal precisaram de tempos maiores de pré-congelamento, uma vez que são mais macias e flexíveis que as amostras de tecido vegetal. Na maior parte das amostras foi utilizada somente uma bola grande de aço inoxidável que garante uma maior homogeneidade das amostras. Porém, para amostras mais fibrosas (músculo bovino e folhas de laranjeira) foram utilizadas três bolas pequenas de aço inoxidável, que favorecem o rompimento das fibras. As amostras moídas foram armazenadas em frascos de polietileno que foram armazenados em dessecadores, onde as amostras foram mantidas até o momento da análise.

TABELA 3.3.3.1 - Condições utilizadas na moagem das amostras sólidas de tecido animal e vegetal.

Amostra	t_{PC} (min)	F_{PC} (Hz)	t_M (min)	F_M (Hz)
Folhas de laranjeira	1,5	5	2,0	20
Folhas de tomateiro	1,5	5	2,0	20
Folhas de espinafre	0,5	5	2,5	20
Músculo bovino	4,0	5	4,0	25
Fígado bovino	1,5	5	2,0	25
Camarão	2,0	5	3,0	25

Siglas: t_{PC} - tempo de pré-congelamento, F_{PC} - frequência de agitação de pré-congelamento, t_M - tempo de moagem, F_M - frequência de agitação de moagem.

3.3.4 - Caracterização das amostras sólidas e líquidas

Inicialmente foi avaliado o teor de umidade das amostras sólidas pesando-se as mesmas antes e após o procedimento de desidratação. Em seguida, essas amostras sólidas de tecido animal e vegetal foram moídas como descrito anteriormente, sendo que a distribuição e o tamanho médio das partículas das amostras pulverizadas foram determinados por um analisador de tamanho de partícula por difração com laser. Cerca de 200 mg das amostras foram dispersas em água desionizada com auxílio de um banho ultrassônico para quebrar os aglomerados de partículas. As suspensões foram gradativamente adicionadas ao equipamento até promover o obscurecimento entre 10 a 15% do feixe do laser, sendo as medidas realizadas nessa condição, seguindo as recomendações do fabricante. As determinações foram efetuadas em triplicata, sendo o resultado final expresso como a média das medidas. Esses dados possibilitarão entender a estabilização das suspensões das amostras sólidas que foram digeridas no sistema de digestão em fluxo e a cinética de extração de macro e micronutrientes no sistema de extração fluxo-batelada.

As concentrações e teores de TOC das amostras líquidas e sólidas, respectivamente, foram determinados para avaliar a eficiência das digestões em fluxo. A concentração de TOC das amostras líquidas foi determinado diretamente por ICP OES, sendo que antes da introdução no equipamento as amostras de leite e suco de frutas foram diluídas 100 e 500 vezes com água desionizada para que as concentrações de carbono estivessem dentro da faixa linear de calibração do procedimento. Toda as medidas foram realizadas em triplicada e Sc foi adicionado às amostras como padrão interno. O teor de TOC das amostras sólidas de tecido vegetal e tecido animal foi determinado em um analisador CHNS/O. Nessa análise, cerca de 6 mg de amostra foi diretamente pesada em cápsulas de estanho com auxílio de uma

microbalança analítica diretamente conectada ao analisador elementar CHNS/O para aquisição direta das massas pesadas. Em seguida, as cápsulas foram manualmente introduzidas no forno do analisador e o padrão de referência utilizado na calibração do equipamento foi a acetanilida, que é um composto orgânico de composição elementar conhecida.

Os macros e micronutrientes nas amostras sólidas e líquidas foram determinados por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e medidas por ICP OES. Esses teores foram utilizados como valores de referência para avaliação da exatidão e precisão dos procedimentos desenvolvidos. Todas as digestões foram realizadas no forno micro-ondas descrito anteriormente. O programa de aquecimento utilizado para as amostras sólidas de tecido vegetal e animal foi uma rampa de 10 min até 1,4 kW, com um aquecimento por 20 min mantendo a potência de 1,4 kW e uma etapa de resfriamento de 15 min. Para as amostras líquidas de sucos de frutas e leite a rampa de aquecimento sob potência aplicada de 1,4 kW foi estendida a 15 min, para evitar aumento brusco de pressão dentro do frasco fechado e risco de explosão, uma vez que essas amostras são ricas em açúcares, que são altamente reativos, sendo que as demais condições da rampa de aquecimento foram as mesmas aplicadas para as demais amostras sólidas. Nas digestões foram utilizados 250 e 2000 mg de amostras sólidas e líquidas, respectivamente. Nas digestões das amostras de tecido animal foram utilizados 4 mL de HNO₃ e 1 mL de HCl, enquanto que na digestão das amostras de tecido vegetal foi utilizada a mesma mistura ácida com adição de 200 µL HF. Já na digestão das amostras líquidas de sucos de frutas e leite foram utilizados 5 mL de HNO₃ e 500 µL HCl. Após digestão, todos os digeridos foram transferidos para tubos Falcon®, diluídos com água deionizada ao volume de 50 mL para ajuste da acidez do meio e foi adicionado Sc como padrão interno. Todas as digestões foram realizadas em triplicata e os digeridos foram caracterizados por ICP OES nas condições anteriormente descritas.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas

Os teores de umidade das amostras preparadas para a avaliação do sistema de digestão em fluxo e do sistema de extração fluxo-batelada são apresentados na TABELA 3.4.1.1. Os maiores teores de umidade foram observados nas folhas de espinafre entre as amostras de tecido vegetal e camarão entre as amostras de tecido animal. Isso era esperado, pois folhas de espinafre e camarões são alimentos que apresentam altos teores de água.

TABELA 3.4.1.1 - Teor de umidade das amostras sólidas selecionadas para aplicação no sistema de digestão em fluxo e extração fluxo-batelada.

Amostra	Teor de umidade (%)
Folhas de espinafre	93
Folhas de tomateiro	87
Folhas de laranjeira	62
Camarão	87
Fígado bovino	70
Músculo bovino	75

Nas FIGURA 3.4.1.1 e FIGURA 3.4.1.2 são apresentadas, respectivamente, as amostras desidratadas de tecidos vegetal (folhas de espinafre, tomateiro e laranjeira) e animal (camarão, músculo bovino e fígado bovino). Já as amostras trituradas e prontas para uso são apresentadas na FIGURA 3.4.1.3.

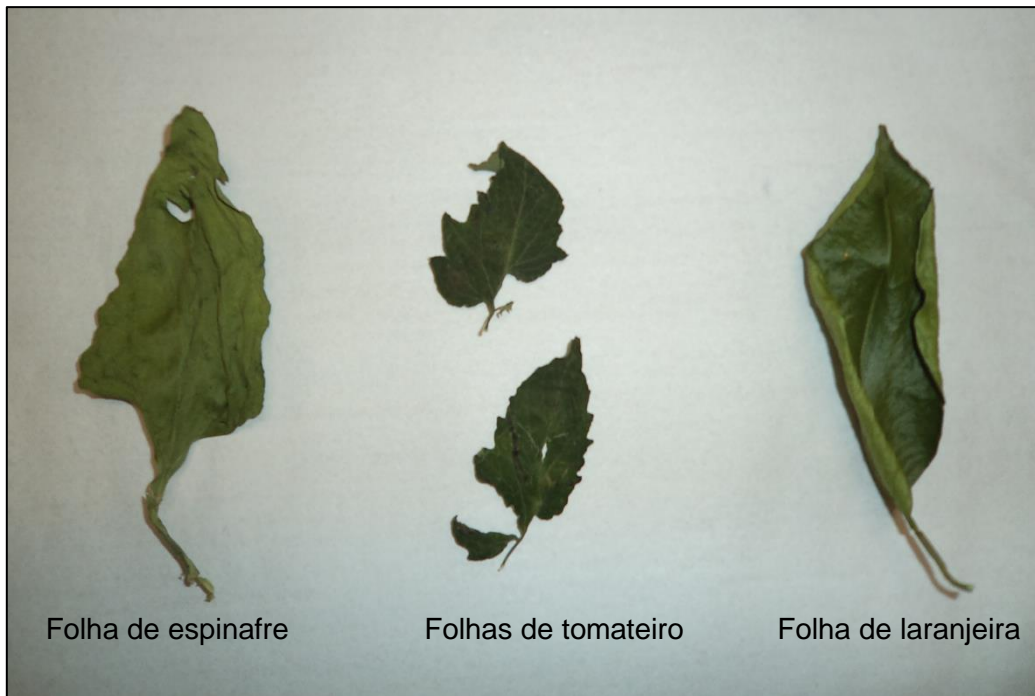


FIGURA 3.4.1.1 - Amostras de tecido vegetal após etapa de secagem.

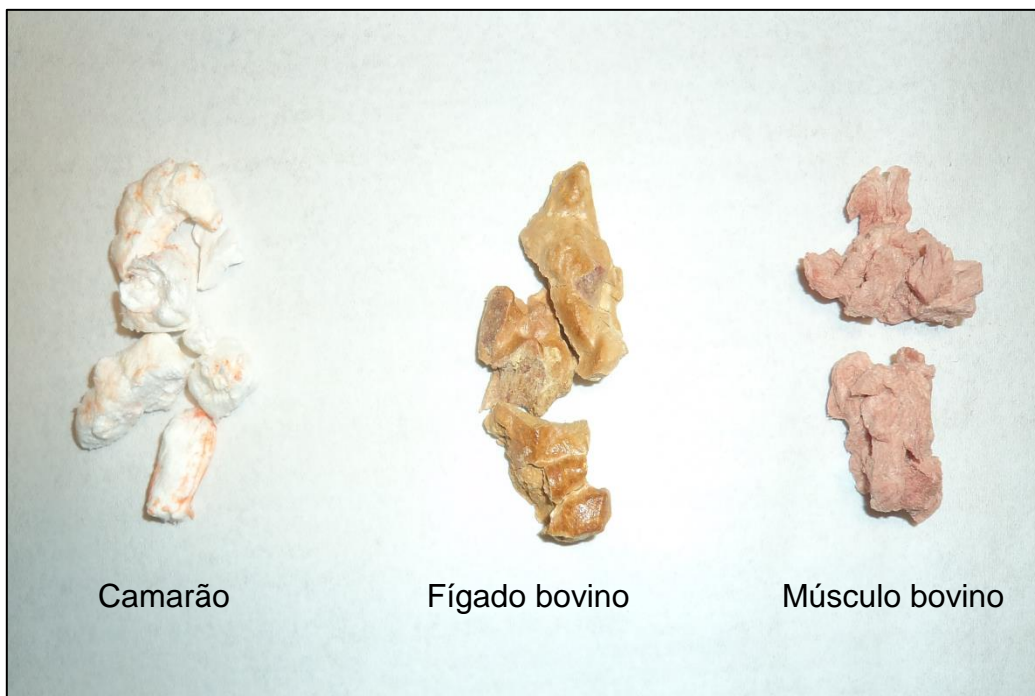


FIGURA 3.4.1.2 - Amostras de tecido animal após etapa de liofilização.

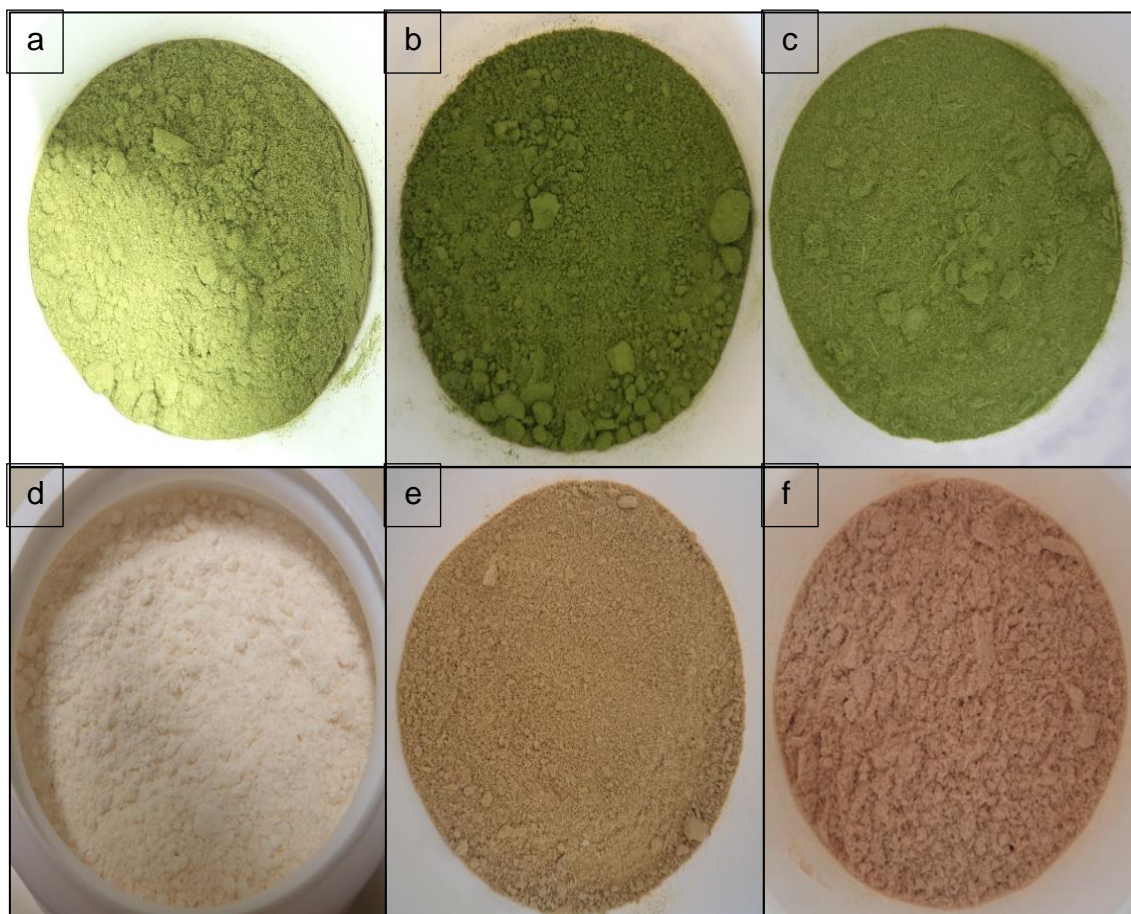


FIGURA 3.4.1.3 - Amostras sólidas de tecidos vegetais e animais moídas, a: folhas de espinafre, b: folhas de tomateiro, c: folhas de laranjeira, d: camarão, e: fígado bovino e f: músculo bovino.

As amostras de tecido vegetal de folhas de espinafre e tomateiro apresentaram-se visualmente mais finas dos que as amostras de tecido animal de camarão e fígado bovino. As amostras de folhas de laranjeira e músculo bovino foram moídas usando três pequenas esferas inox ao invés de uma esfera de inox grande e, mesmo nessa condição, ainda apresentaram fibras na amostra pulverizada mesmo após a etapa de moagem. Entretanto, uma avaliação visual não foi suficiente para avaliar a homogeneidade e verificar se as amostras apresentam tamanhos de partículas suficientemente pequenos para o preparo de emulsões para introdução no sistema de digestão em fluxo ou para garantir processos rápidos de extração no sistema de extração fluxo-batelada. Desse modo, foi determinada a distribuição do tamanho médio de partículas das amostras usando um analisador de tamanho de partícula por difração com laser, sendo os resultados apresentados na FIGURA 3.4.1.4.

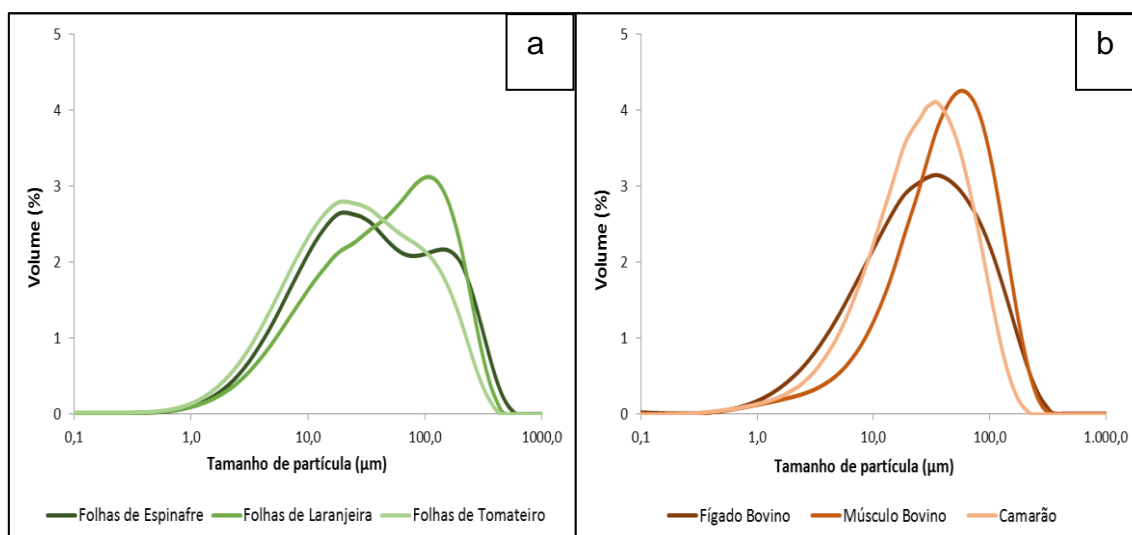


FIGURA 3.4.1.4 - Distribuição do tamanho de partícula das amostras sólidas em escala logarítmica, a: amostras de tecido vegetal e b: amostras de tecido animal

De acordo com a FIGURA 3.4.1.4, as amostras de tecido vegetal apresentaram um perfil mais heterogêneo do que as amostras de tecido animal, isso pode ser devido aos menores tempos de congelamento e moagem, a menor frequência de agitação de moagem e ainda características intrínsecas das amostras. Os tamanhos de partículas variaram de modo geral de 0,1 a 500 µm para amostras de tecido vegetal e de 0,1 a 340 µm para as amostras de tecido animal, sendo que as amostras que apresentaram maior proporção de partículas com maiores dimensões foram as amostras de folhas de laranja e músculo bovino, que são mais fibrosas e, conseqüentemente, mais difíceis de serem moídas. Apesar dessas diferenças os tamanhos médios de partículas foram 35, 48, 27, 29, 47 e 27 µm para as folhas de espinafre, folhas de laranja, folhas de tomateiro, fígado bovino, músculo bovino e camarão, respectivamente. De acordo com a literatura^{16,86,87}, esses tamanhos de partícula são suficientemente diminutos para o preparo de emulsões estáveis.

Os teores de TOC, hidrogênio e nitrogênio também foram determinados nas amostras sólidas (TABELA 3.4.1.2). De modo geral, os teores de TOC, hidrogênio e nitrogênio variaram respectivamente entre 33 e 47%, 4 e 6% e 3 a 13% m m⁻¹ para as amostras sólidas e os teores médios de TOC, hidrogênio e nitrogênio foram 40, 5 e 8 % m m⁻¹, respectivamente. Maiores concentrações de nitrogênio foram observadas nas amostras de tecido animal, o que era esperado devido ao maior teor proteico presente nessas amostras. Os teores de TOC e hidrogênio foram similares em todas as amostras avaliadas. Os teores de TOC foram utilizados na avaliação da eficiência de digestão do sistema de digestão em fluxo.

TABELA 3.4.1.2 - Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras sólidas.

Amostras	Concentração percentual (m m ⁻¹)		
	Carbono Org.	Hidrogênio	Nitrogênio
Folhas de Espinafre	32,7	4,1	6,1
Folhas de Laranjeira	41,4	4,6	2,7
Folhas de tomateiro	36,7	4,7	4,9
Fígado bovino	46,5	5,6	10,6
Músculo bovino	44,5	5,5	13,3
Camarão	38,8	5,1	12,0

Nessas amostras também foram determinados os teores de macro e micronutrientes após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, a fim de usar esses valores como referência na avaliação da precisão e exatidão dos sistemas de digestão em fluxo e extração fluxo-batelada. Os LODs foram calculados de acordo com trabalhos da literatura^{91,92}, onde os sinais da concentração equivalente ao sinal de fundo (BECs) e os desvios padrões relativos (RSDs) são considerados no cálculo dos LODs. As equações utilizadas nos cálculos são descritas abaixo:

$$SBR = \frac{I_{SR} - I_{SB}}{I_{SB}} \quad \text{EQUAÇÃO 3.4.1.1}$$

$$BEC = \frac{C_{SR}}{SBR} \quad \text{EQUAÇÃO 3.4.1.2}$$

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times RSD}{100} \quad \text{EQUAÇÃO 3.4.1.3}$$

Inicialmente foi calculada a razão do sinal analítico pelo sinal de fundo (SBR) como descrito na EQUAÇÃO 3.4.1.1, onde I_{SR} e I_{SB} são as intensidades de sinal para a solução de referência e solução do branco respectivamente. Na sequência foi determinado o valor do BEC de acordo com a EQUAÇÃO 3.4.1.2, onde C_{SR} é a concentração da solução de referência (mg L⁻¹). Por fim, é calculado o LOD pela EQUAÇÃO 3.4.1.3, sendo utilizado o RSD calculado por 10 brancos de procedimentos independentes. Os LODs da digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados para as amostras sólidas de tecido vegetal e animal foram 7; 4; 0,3; 20; 1; 2; 57; 2; 0,1; 3; 3; 19; 0,1 e 0,4 mg kg⁻¹ para Al, As, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn,

Na, P, S, Sr e Zn, respectivamente. Os teores de macro e micronutrientes nas amostras de tecido vegetal e animal são apresentados na TABELA 3.4.1.3.

TABELA 3.4.1.3 - Teores de macro e micronutrientes em amostras de tecido vegetal e animal determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Elemento	Amostra		
	Folhas de espinafre	Folhas de laranja	Folhas de tomateiro
Al (mg kg ⁻¹)	41 \pm 3	27,6 \pm 0,8	98 \pm 3
Ba (mg kg ⁻¹)	3,2 \pm 0,1	23,4 \pm 0,7	72 \pm 2
Ca (%)	1,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	3,8 \pm 0,3
Cu (mg kg ⁻¹)	7,6 \pm 0,2	5,8 \pm 0,2	11,7 \pm 0,4
Fe (mg kg ⁻¹)	92 \pm 7	67 \pm 1	206 \pm 13
K (%)	6,5 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	2,78 \pm 0,03
Mg (%)	1,2 \pm 0,1	0,29 \pm 0,01	0,45 \pm 0,03
Mn (mg kg ⁻¹)	129 \pm 4	15,3 \pm 0,2	70 \pm 2
Na (%)	0,37 \pm 0,02	105 \pm 16	480 \pm 14
P (%)	0,55 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
S (%)	0,52 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,97 \pm 0,03
Sr (mg kg ⁻¹)	105 \pm 3	58 \pm 2	173 \pm 7
Zn (mg kg ⁻¹)	51 \pm 2	15 \pm 1	16,9 \pm 0,5
Elemento	Fígado bovino	Músculo bovino	Camarão
Al (mg kg ⁻¹)	< LOD	< LOD	39 \pm 1
As (mg kg ⁻¹)	< LOD	< LOD	12,3 \pm 0,5
Ca (mg kg ⁻¹)	146 \pm 5	131 \pm 7	3830 \pm 34
Cu (mg kg ⁻¹)	253 \pm 8	2,1 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2
Fe (mg kg ⁻¹)	163 \pm 5	60 \pm 2	31 \pm 1
K (%)	0,98 \pm 0,04	1,34 \pm 0,03	0,28 \pm 0,01
Mg (mg kg ⁻¹)	550 \pm 20	820 \pm 30	1900 \pm 60
Mn (mg kg ⁻¹)	7,1 \pm 0,2	< LOD	7,7 \pm 0,2
Na (%)	0,19 \pm 0,1	0,190 \pm 0,004	1,9 \pm 0,1
P (%)	1,25 \pm 0,04	0,77 \pm 0,02	1,44 \pm 0,04
S (%)	0,70 \pm 0,02	0,75 \pm 0,02	1,09 \pm 0,03
Sr (mg kg ⁻¹)	< LOD	< LOD	57 \pm 2
Zn (mg kg ⁻¹)	109 \pm 3	141 \pm 4	48 \pm 1

A exatidão do método de digestão ácida assistido por radiação micro-ondas em batelada foi avaliada usando CRMs visando garantir que os teores determinados nas amostras possam ser utilizados como valores referenciais na avaliação dos procedimentos desenvolvidos neste projeto. Nesse sentido foram digeridas dois CRMs e os teores determinados foram comparados com os teores certificados. De modo geral, os teores de macro e micronutrientes determinados nos CRMs estão de acordo com os teores certificados (TABELA 3.4.1.4) de acordo com um teste *t* não pareado, pois os *t* calculados foram inferiores ao *t* crítico (4,303). As

exceções foram K em ambos CRMs e Fe em folhas de macieira (NIST 1515). Entretanto, não foi possível determinar o teor de Na nas folhas de macieira (NIST 1515), uma vez que a concentração está próxima ao LOD.

TABELA 3.4.1.4 - Teores de macro e micronutrientes em CRMs determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.

CRM	Elemento	Teores certificados	Digestão em batelada
Fígado bovino (NIST 1577b)	Ca (mg kg ⁻¹)	116 \pm 4	114 \pm 7
	Cu (mg kg ⁻¹)	160 \pm 8	156 \pm 9
	Fe (mg kg ⁻¹)	184 \pm 15	171 \pm 10
	K (%)	0,994 \pm 0,002	0,95 \pm 0,01
	Mg (mg kg ⁻¹)	601 \pm 28	555 \pm 33
	Mn (mg kg ⁻¹)	10,5 \pm 1,7	9,4 \pm 0,6
	Na (%)	0,242 \pm 0,006	0,24 \pm 0,01
	P (%)	1,1 \pm 0,03	1,1 \pm 0,1
	S (%)	0,785 \pm 0,006	0,80 \pm 0,06
	Zn (mg kg ⁻¹)	127 \pm 16	119 \pm 7
Folhas de macieira (NIST 1515)	Al (mg kg ⁻¹)	286 \pm 9	275 \pm 17
	Ba (mg kg ⁻¹)	49 \pm 2	44 \pm 3
	Ca (%)	1,526 \pm 0,015	1,5 \pm 0,1
	Cu (mg kg ⁻¹)	5,64 \pm 0,24	5,4 \pm 0,4
	Fe (mg kg ⁻¹)	83 \pm 5	69 \pm 4,1
	K (%)	1,61 \pm 0,02	1,66 \pm 0,02
	Mg (%)	0,271 \pm 0,008	0,24 \pm 0,01
	Mn (mg kg ⁻¹)	54 \pm 3	47 \pm 3
	Na (mg kg ⁻¹)	24,4 \pm 1,2	< LOD
	P (%)	0,159 \pm 0,011	0,14 \pm 0,01
	Sr (mg kg ⁻¹)	25 \pm 2	23 \pm 1
	Zn (mg kg ⁻¹)	12,5 \pm 0,3	12 \pm 1

3.4.2 - Caracterização das amostras líquidas

As amostras líquidas de sucos de frutas e leites também foram caracterizadas visando possibilitar posterior avaliação do desempenho do sistema de digestão em fluxo. Para essas amostras foram avaliadas as concentrações de TOC, macro e micronutrientes, sendo que todas as medidas foram efetuadas em um ICP OES. As concentrações de TOC foram determinadas nas amostras diluídas em água desionizada antes da digestão e os teores de macro e micronutrientes foram determinados nos digeridos. As concentrações de TOC determinados foram 45, 58, 42 e 60 g L⁻¹ para suco de maçã, suco de manga, leite semidesnatado e leite integral, respectivamente. As maiores concentrações de TOC estavam presentes nas amostras de suco de manga e leite integral, isso se deve à maior presença de partículas suspensas no suco de manga do que no suco de maçã e ao maior teor de

gordura no leite integral do que no leite semidesnatado. Os LODs para as amostras líquidas também foram usando as equações descritas no tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas (pag. 34). Os LODs foram 13; 29; 1; 26; 14; 3; 151; 8; 0,4; 14; 25; 80; 0,2 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr e Zn, respectivamente. Os teores de macro e micronutrientes foram determinados nas amostras, entretanto o método de digestão não foi avaliado com CRM, pois não haviam CRMs líquidos representativos para essas amostras. Os teores de macro e micronutrientes determinados nas amostras líquidas são apresentados na TABELA 3.4.2.1. Esses teores não foram comparados com informações fornecidas pelos fabricantes porque essas não estão disponíveis no rótulo.

TABELA 3.4.2.1 - Teores de macro e micronutrientes em sucos de frutas e leites determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Elemento (mg L^{-1})	Suco de maçã	Suco de manga	Leite semidesnatado	Leite integral
Al	0,4 \pm 0,1	0,16 \pm 0,04	< LOD	< LOD
B	1,86 \pm 0,06	0,13 \pm 0,02	< LOD	< LOD
Ba	0,11 \pm 0,01	92 \pm 3	< LOD	< LOD
Ca	123 \pm 4	0,15 \pm 0,02	1236 \pm 43	1232 \pm 42
Fe	0,85 \pm 0,03	0,48 \pm 0,05	0,14 \pm 0,03	0,19 \pm 0,06
K	670 \pm 20	325 \pm 10	1092 \pm 38	1067 \pm 37
Mg	53 \pm 2	44 \pm 2	104 \pm 4	106 \pm 4
Mn	0,38 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02	< LOD	< LOD
Na	15,0 \pm 0,4	9,8 \pm 0,3	318 \pm 11	309 \pm 11
P	63 \pm 2	37 \pm 1	945 \pm 33	991 \pm 34
S	27 \pm 2	30 \pm 2	332 \pm 21	356 \pm 29
Sr	0,79 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02
Zn	0,10 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	3,7 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2

3.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS

As caracterizações das amostras sólidas e líquidas possibilitarão a avaliação do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas temperaturas e pressões e do sistema de extração fluxo-batelada. Da mesma maneira, a determinação de TOC nas amostras serão importantes para a avaliação da eficiência de digestão no sistema de digestão em fluxo no preparo das amostras sólidas e líquidas. A distribuição dos tamanhos de partículas das amostras sólidas é apropriada para o preparo de suspensões que serão digeridas no sistema em fluxo e possibilitarão as extrações em fluxo sem entupimento dos filtros em linha. Além disso, os pequenos tamanhos de partículas das amostras possibilitarão

aumentar a velocidade de digestão das amostras e a eficiência da extração dos macros e micronutrientes no sistema de digestão em fluxo e de extração fluxo-batelada, respectivamente. A realização das digestões ácidas assistidas por radiação micro-ondas em frascos fechados possibilitará uma melhor comparação operacional entre os modos de preparo de amostra em fluxo, fluxo-batelada e batelada.

Capítulo 4

Avaliação de um sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura com reator de grande volume para o preparo de amostras de tecido vegetal e animal

4.1 - INTRODUÇÃO

A digestão em fluxo de amostras sólidas em suspensão requer o emprego de sistemas de alta pressão e temperatura que podem ser obtidos usando reatores adaptados a suportarem tais condições e válvulas de controle de pressão na entrada e saída do sistema visando evitar a expulsão da amostra do reator. Contudo, desenvolver reatores adequados a tais condições não é algo simples. Os materiais comumente utilizados nos reatores de sistemas de digestão em fluxo assistidos por radiação micro-ondas como PTFE ou PFA apresentam resistência mecânica limitada, podendo suportar no máximo 20 bar de pressão e temperatura de até 180 °C³⁴. Em sistemas de digestão em fluxo induzida por condução térmica podem ser utilizados reatores metálicos como a liga de Pt/Ir (80/20) que pode suportar pressões de até 400 bar, sendo resistente a diversos ácidos e/ou misturas ácidas, porém Vale ressaltar que o uso de ácido fluorídrico reduz drasticamente o tempo de vida desse reator⁴⁰⁻⁴². Tubos de quartzo espessos podem ser utilizados em ambos os tipos de sistemas, os quais suportam temperaturas e pressões superiores aos reatores poliméricos, porém inferiores aos reatores metálicos, entretanto, esses reatores inviabilizam o uso de ácido fluorídrico^{34,39}.

HAIBER e BERNDT⁴⁰ avaliaram o uso de um reator de Pt/Ir (80/20) em um sistema de digestão em fluxo induzido por condução térmica sob alta pressão e temperatura, sendo o reator uma coluna cromatográfica capilar enovelada em torno de um aquecedor cilíndrico de alumínio. O sistema foi operado sob menor pressão e temperatura (ca. 200 bar e 320 °C) do que as suportadas pelo reator (ca. 400 bar e 400 °C), a fim de evitar vazamentos devido ao rompimento dos conectores poliméricos de polietereetercetona (PEEK) presentes no sistema durante a digestão. O sistema foi aplicado na digestão de amostras ambientais de lodo de esgoto, sendo alcançado um teor de ROC de 5% quando suspensões com 0,5% (m m⁻¹) de amostras em HNO₃ 2,5 mol L⁻¹ foram digeridas sob vazão de 1,2 mL min⁻¹ e temperatura de 320 °C. Entupimentos no sistema ocorreram devido à deposição de silicatos em filtros de retenção de sólidos, sendo o problema resolvido pelo uso de HF diluído na mistura ácida. A exatidão do método otimizado foi avaliada pelo uso de dois CRMs de lodo de esgoto (RTC CRMPR 9472 e BCR CRM 145 R). Os teores determinados de Cd, Cr, Ni, Pb e Zn por ICP OES estão de acordo com os valores certificados, bem como as

concentrações determinadas em três amostras de lodo de esgoto estão de acordo com os valores determinados por diferentes laboratórios⁴⁰.

JACOB e BERNDT⁴¹ avaliaram a aplicabilidade do sistema descrito anteriormente na digestão de diversos CRMs para determinação de Cd, Cu, Mn, Pb e Zn por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). Foram utilizados CRMs de folhas de tomateiro (NIST 1573), folhas de espinafre (NIST 1570), folhas de pomar (NIST 1571), farinha de trigo (NIST 1577), fígado bovino (NIST 1577a), rim de porco (CRM 186), lodo de esgoto (CRM 14R e CRMPR 9472), cinzas leves (NIST 1633a) e duas amostras de lodo de esgoto. Os teores determinados estavam em concordância com os valores certificados ou determinados previamente nas amostras em laboratórios externos. O procedimento envolveu a digestão de suspensões com 2% (m m⁻¹) de amostra em 2,5 mol L⁻¹ HNO₃, e com adição de 1,0 mol L⁻¹ HF nas amostras silicatadas (cinzas e lodos de esgoto) a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura de 320 °C⁴¹. BIAN et al.⁴² também avaliaram a aplicabilidade desse sistema na digestão de CRMs na determinação de Al, B, Ba, Ca, Cr, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr e Zn por ICP OES. Todos os elementos determinados, com exceção do Fe, apresentaram Valores aceitáveis de acordo com os teores certificados nas amostras de fígado bovino (NIST 1577a e CRM185), folhas de tomateiro (NIST 1573), folhas de pomar (NIST 1571), acículas de pinheiro (NIST 1575) e folhas de espinafre (NIST 1570), quando digeridas suspensões com 1% (m m⁻¹) de amostra em 2,5 mol L⁻¹ de HNO₃, sob vazão de 1,2 ml min⁻¹ e temperatura de 320 °C. Os teores de ROC determinados estavam abaixo de 0,5% mesmo quando suspensões com 4% (m m⁻¹) de amostra foram submetidas à digestão nas condições descritas anteriormente. Houve perdas de Ag, Ga e Sb durante a digestão de uma solução padrão multielementar em etanol 10% (V V⁻¹) e 2,5 mol L⁻¹ de HNO₃, mesmo quando utilizadas baixas temperaturas (100 °C), devido a reação desses elementos com a superfície metálica do reator. Além disso, houve a lixiviação de Pt durante a digestão com HNO₃, sendo essa aumentada com adição de H₂O₂ à mistura ácida⁴².

A combinação de diferentes materiais é uma alternativa para aumentar a resistência mecânica e química dos reatores nas digestões em fluxo como avaliado por GRÄBER e BERNDT³⁹, que estudaram o uso de reatores de aço inoxidável recobertos com uma camada vítrea ou polimérica em sistema de digestão em fluxo induzido por condução térmica. PICHLER et al.³⁴ e WILTSCHE et al.³⁸ também avaliaram o uso de reatores poliméricos pressurizados dentro de autoclaves em

sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas. Em sistema de digestão em fluxo induzido por radiação térmica o aço inoxidável é um bom condutor térmico, que apresenta alta resistência mecânica, mas não química. O recobrimento da superfície interna do tubo de aço inoxidável com materiais inertes a diversos ácidos possibilita utilizar essa liga metálica mais barata que Pt/Ir no sistema de digestão em fluxo, como avaliado por GRÄBER e BERNDT³⁹. O uso de um tubo de aço inoxidável recoberto com Vidro não foi uma boa alternativa, uma vez que o recobrimento vítreo foi degradado e lixiviado durante as digestões, levando à exposição da superfície metálica, contaminação da amostra e entupimento do sistema. Já o recobrimento da superfície com PTFE, mostrou-se uma alternativa interessante, pois o recobrimento não foi degradado durante as digestões, apesar de ter sofrido uma contração térmica, diminuindo o comprimento e o diâmetro interno. Assim, após sequências sucessivas de aquecimento e resfriamento, houve a exposição do material metálico e, conseqüentemente, a contaminação da amostra, além do entupimento devido à restrição do diâmetro interno do tubo. A adição de camadas extras de PTFE nas duas extremidades evitou que o desgaste ocorresse e permitiu o uso deste reator no sistema desenvolvido por GRÄBER e BERNDT³⁹, no qual foi baseado o sistema de digestão em fluxo utilizado por HAIBER e BERNDT⁴⁰ previamente descrito.

O reator de aço inoxidável recoberto com PTFE permitiu o uso de temperatura e pressão de até 260 °C e 300 bar, respectivamente, sendo que em altas temperaturas houve perda do recobrimento. Soluções padrão de glicose, que é um composto de fácil digestão, foram utilizadas para avaliar a eficiência de digestão do sistema em fluxo. Eficiências superiores a 98% foram alcançadas quando soluções com 50 g L⁻¹ e 250 g L⁻¹ de glicose foram digeridas em HNO₃ 20% e 40% (V V⁻¹), respectivamente, sob temperatura de 250 °C e vazão de 1,0 mL min⁻¹. O sistema se mostrou eficiente na digestão de amostras líquidas de suco de uma mistura de vegetais e leite, e de suspensões de amostras sólidas de folhas de tomateiro, farinha de trigo, beterraba, fígado bovino, sangue seco de animal e chocolate em pó. Foram alcançadas eficiências na faixa de 90%, quando digeridas as amostras líquidas com diluição de 1:4 ou suspensões de 1% (m m⁻¹) das amostras sólidas em HNO₃ 20% (V V⁻¹) na vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura de 240 e 250 °C, respectivamente. A exatidão do método proposto no sistema em fluxo foi avaliada pela digestão de amostras sólidas de CRMs de folhas de tomateiro (NIST 1573), sangue seco de animal (LAEA-A2) e fígado bovino (NIST 1577) nas condições descritas anteriormente para

determinação de Cu, Mn, Fe e Zn por ICP OES. Todos os teores determinados estão de acordo com os teores certificados, com exceção de Fe para as amostras de sangue³⁹.

Dentre os sistemas de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura há o desenvolvido por PICHLER et al.³⁴. Nesse sistema foi utilizado um reator de PTFE colocado dentro de uma câmara pressurizada com N₂, o que preveniu a deformação do reator, quando esse foi exposto a altas temperaturas e pressões. Esse sistema pode suportar pressões elevadas (ca. 35 bar) e alcançar temperaturas superiores a 200 °C, que são características necessárias para digestões rápidas e eficientes de matrizes orgânicas usando ácido nítrico. A eficiência desse sistema foi avaliada pela digestão de glicose, glicina e fenilalanina, que representam compostos de fácil, moderada e difícil digestão, respectivamente. O sistema apresentou uma eficiência de digestão de 99%, 85% e 65% para glicose, glicina e fenilalanina, respectivamente, quando digeridas soluções com 9,0 g L⁻¹ de TOC em HNO₃ 32% (V V⁻¹) sob uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ e potência aplicada de 110 W. A exatidão do método foi avaliada utilizando CRMs: leite em pó (BCR 063 e BCR 151), fígado bovino (BCR 185) e rim de porco (BCR 186), sendo que os resultados obtidos estavam de acordo com os teores certificados para Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn³⁴.

Posteriormente, WILTSCHE et al.³⁸ modificaram o sistema desenvolvido por PICHLER et al.³⁴, substituindo o reator de PTFE por PFA, o qual foi colocado dentro um reator helicoidal de vidro borossilicato pressurizado com N₂, permitindo alcançar temperaturas de 230° C e pressões de 40 bar. A eficiência de digestão foi 86% para solução de glicose com 25 g L⁻¹ de TOC em HNO₃ 30% (V V⁻¹), quando aplicadas a potência de radiação de 800 W e vazão de 2,0 mL min⁻¹. Porém, sob as mesmas condições o sistema não foi eficiente para digerir glicina em solução contendo 28 g L⁻¹ de TOC, sendo que o teor de ROC do digerido foi de 96%. A eficiência foi menor nesse sistema devido ao pequeno volume do reator (6 mL). De acordo com os autores o tamanho do reator foi limitado pela extensão de tubo de PFA que pode ser introduzido na bobina de vidro, devido ao aumento progressivo do atrito entre os dois materiais. A exatidão foi avaliada com cinco diferentes CRMs: folhas de oliveira e macieira (BCR 62 e NIST 1515), músculo de peixe (DORM-2), farinhas de trigo e arroz (NIST 1567 e NIST 1568). Os resultados obtidos estão de acordo como os valores certificados para macro e micronutrientes (Al, B, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn,

Na, Ni, Pb e Zn). Além disso, os resultados obtidos para sucos e leite em pó digeridos no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas coincidem como os valores obtidos para as mesmas amostras digeridas em batelada³⁸.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- ✓ Avaliar a aplicabilidade do sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura com reator de grande volume (ca. 13,5 mL) no preparo de amostras sólidas de tecido vegetal e animal para determinação de macro e micronutrientes por ICP OES;
- ✓ Determinar a eficiência de digestão alcançada pelo reator desenvolvido para a digestão de compostos orgânicos em solução e amostras sólidas em suspensão caracterizadas no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pg.30);
- ✓ Otimizar as condições para o preparo das amostras no sistema de digestão em fluxo;
- ✓ Avaliar a precisão e exatidão do método otimizado comparando-se os teores determinados em fluxo com os teores obtidos por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pg.30);
- ✓ Aplicar e avaliar o método otimizado na digestão de amostras cominuídas com moinho criogênico, que apresentam uma maior heterogeneidade do que os CRMs normalmente aplicados na avaliação de sistemas de digestão em fluxo.

4.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 - Equipamentos e aparatos

Para o preparo das suspensões de tecido animal e folhas de laranja foi utilizado um homogeneizador mecânico (Kinematica Polytron PT 3100, Fisher Scientific, EUA) com haste de dispersão de titânio. Os analitos e o ROC foram quantificados em um ICP OES de visão axial (Ciros Vison EOP, Spectro, Alemanha) com nebulizador de fluxo cruzado, câmara de nebulização tipo Scott e tocha de quartzo padrão de ICP OES com 2,5 mm de diâmetro interno do tubo injetor. Para as medidas multielementares e ROC foram utilizadas, as potências de radiofrequências

de 1350 e 1400 W, respectivamente. As vazões de gás externo, intermediário e de nebulização utilizadas foram 12,5; 0,6 e 0,83 L min⁻¹. As seguintes linhas de emissão (nm) foram monitoradas para a quantificação dos analitos: Al 167,078(II), B 249,773(I), Ba 455,404(II), C 193,091(I), Ca 317,933(II), Cu 324,754(I), Fe 238,204(II), Hg 184,950(II), Mg 280,270(II), Mn 257,611(II), P 177,494(I), S 180,731(I), Sc 424,683(II), Sr 407,771(II), Ti 334,941(II) e Zn 213,856(I).

Antes da determinação de ROC os digeridos foram borbulhados com N₂ gasoso por 10 min, a fim de desprender os gases retidos em solução e assim evitar interferências de CO₂ durante as determinações. A acidez residual foi determinada por titulação manual com uma solução certificada de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Roth, Alemanha) usando como indicador uma solução alcoólica de fenolftaleína.

Análise multielementar dos brancos foi realizada por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para avaliar possíveis contaminações dos digeridos, que poderiam ser ocasionadas pela corrosão das partes metálicas do sistema por vapores ácidos que difundiam através das paredes do reator helicoidal de PFA durante o aquecimento do sistema. Nessa avaliação foi utilizado o ICP-MS Elan DRC+ (PerkinElmer, EUA) com nebulizador pneumático concêntrico, uma câmara de nebulização ciclônica e uma tocha de quartzo padrão de ICP-MS com 1,8 mm de diâmetro interno do tubo injetor. As condições utilizadas durante as medidas foram 1400 W de potência de rádio frequência e vazões de gás externo, intermediário e de nebulização utilizados foram 14,0; 0,9 e 0,99 mL min⁻¹, respectivamente. Os seguintes isótopos foram selecionados para a quantificação dos analitos: ²⁷Al⁺, ⁵⁹Co⁺, ⁵²Cr⁺, ⁶⁵Cu⁺, ⁵⁷Fe⁺, ⁵⁵Mn⁺, ⁹⁸Mo⁺, ⁶⁰Ni⁺, ⁶¹Ni⁺, ⁴⁷Ti⁺, ⁵¹V⁺, ⁶⁶Zn⁺ e ⁶⁷Zn⁺.

4.3.2 - Reagentes e amostras

As soluções e suspensões foram preparadas com ácidos HNO₃ destilado abaixo do ponto de ebulição, HCl, HF e HClO₄ de alta pureza (Suprapur, Merck, Alemanha) e água desionizada (18 MΩ cm⁻¹, Barnstead Nanopure, Thermo Fisher Scientific, EUA). As curvas de calibração foram preparadas a partir de uma solução padrão multielementar com 100 mg L⁻¹ de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, Ti e Zn (Roth, Alemanha) em HNO₃ 3% (V V⁻¹) e soluções padrão de enxofre e fósforo (SCP Science, Canada) de 1000 mg L⁻¹. Para as determinações de ROC foram utilizadas

soluções padrão de calibração preparadas a partir da dissolução de monohidrogenoftalato de potássio (PA, Merck, Alemanha).

As soluções de glicose, glicina, fenilalanina e ácido nicotínico foram preparadas a partir de seus respectivos compostos sólidos de grau analítico (Merck, Alemanha) e utilizadas como compostos modelo para avaliação das eficiências de digestão do sistema em diferentes vazões e potências aplicadas de radiação micro-ondas. As amostras sólidas utilizadas no trabalho foram leite em pó, músculo e fígado bovino, camarão, espinafre e folhas de laranjeira e tomateiro. A amostra de leite em pó foi obtida no mercado local de Graz (Áustria), enquanto as outras amostras foram obtidas no comércio local de São Carlos (SP, Brasil). Também foram utilizados dois CRMs, sendo esses: fígado bovino (NIST 1577b) e folhas de macieira (NIST 1515).

4.3.3 - Preparo das amostras

A amostra de leite em pó não passou por nenhum preparo prévio, sendo utilizada como obtida comercialmente, enquanto as amostras de tecido vegetal e animal foram preparadas conforme descrito no Capítulo 3 (tópico 3.3.3 - Preparo de amostras, pg. 27). O leite em pó foi armazenado na embalagem original e as outras amostras sólidas em frascos de polietileno previamente descontaminados, nos quais foram mantidas até o momento do preparo das suspensões.

As suspensões com 1% (m m^{-1}) de sólidos foram preparadas em água desionizada e diferentes ácidos ou misturas de ácidos concentrados (HNO_3 , HCl e HF). As suspensões de tecido animal e folhas de laranjeira foram preparadas em um homogeneizador a uma rotação de 1000 rpm por 1 min. As demais suspensões foram preparadas com adição dos reagentes e agitação manual. Em todas as soluções e suspensões foram adicionadas Sc como padrão interno, no intuito de se obter digeridos com as concentrações finais de Sc de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, e assim corrigir erros durante introdução da amostra ou diluição dos digeridos.

4.3.4 - Sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas

Na FIGURA 4.3.4.1 é apresentado o diagrama esquemático do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura.

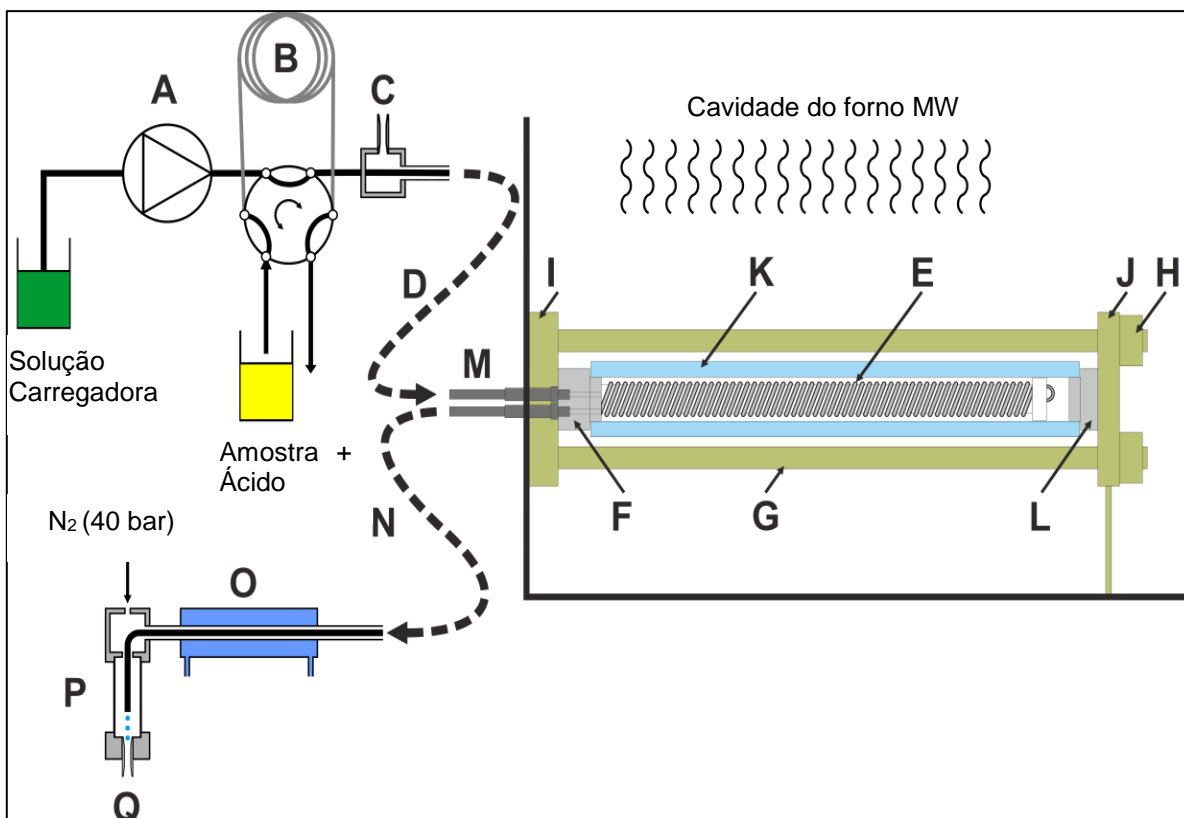


FIGURA 4.3.4.1 - Diagrama esquemático do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas sob alta pressão e temperatura. A: bomba de alta pressão, B: alça de amostragem e válvula rotatória de alta pressão com 6 vias, C: controlador de vazão de N₂, D e N: tubos de aço inoxidável de conexão com região não pressurizada, E: reator helicoidal de PFA, F e L: tampas do reator, G: haste de sustentação de PEEK, H: parafusos de sustentação de PEEK, I e J: bases de sustentação de PEEK, K: tubo de vidro borossilicato com parede espessa, M: tubos de aço inoxidável de conexão com reator pressurizado, O: sistema de refrigeração, P: separador gás-líquido, Q: restritor de vazão.

Ácido nítrico diluído ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) foi continuamente introduzido no sistema em fluxo usando uma bomba de alta pressão de HPLC resistente ao ataque químico (Knauer, Alemanha). Essa solução carregadora foi utilizada em todos os estudos realizados nesse trabalho. Um amostrador automático (ASX-1400, Cetac, EUA) foi utilizado na etapa de amostragem e coleta do digerido, esse apresenta um agitador mecânico de PEEK para homogeneização das amostras e sonda para etapa de amostragem, bem como uma sonda adicional para coleta do digerido. O agitador mecânico e a sonda de amostragem foram lavados após etapa de coleta da amostra, a fim de evitar contaminação cruzada durante processo de amostragem. As amostras foram introduzidas no sistema de digestão em fluxo por uma alça de amostragem (10 mL) conectada a uma válvula rotatória de 6 vias (Knauer, Alemanha), sendo que a alça de amostragem foi preenchida com uso de uma bomba seringa de alta precisão

(1-Channel Multidispenser, ProLiquid, Alemanha). O uso da bomba seringa de alta precisão possibilita a introdução de volumes precisos de amostra na faixa de 0,5 a 10 mL (volume máximo do circuito de amostra). Na etapa de amostragem a amostra foi succionada para dentro da alça de amostragem, o que evita a contaminação da bomba seringa durante esse processo. As amostras foram coletadas em meio a dois segmentos de ácido nítrico com a mesma concentração presente na amostra a fim de evitar a diluição durante a digestão da amostra. Após introdução da amostra no fluxo carregador, a sonda de amostragem foi lavada duas vezes com o uso da bomba seringa que injetou 10 mL de água desionizada através do tubo de PFA da sonda de amostragem, sendo o descarte coletado num frasco coletor de resíduos do amostrador automático.

Esse sistema foi baseado num sistema previamente desenvolvido³⁸, porém com um novo reator de maior volume ($\pm 13,5$ mL) apresentado na FIGURA 4.3.4.2b, que possibilita alcançar melhores eficiências de digestão do que sistema anterior de menor volume (± 6 mL) apresentado na FIGURA 4.3.4.2a. O aumento do volume do reator possibilita aumentar o tempo de residência da amostra na zona irradiada e, assim, a eficiência de digestão. As digestões foram realizadas em um reator pressurizado a 40 bar, colocado horizontalmente dentro da cavidade de um forno micro-ondas comercial (Multiwave 3000, Anton Paar, Áustria) utilizado em digestão em batelada sob alta pressão. Um tubo de PFA com 1,5 mm e 2,5 mm de diâmetros interno e externo, respectivamente, foi utilizado para introduzir a amostra dentro da zona irradiada e pressurizada. O tubo de PFA foi firmemente enrolado em torno de um tubo de PTFE de 300 mm, 8 mm e 18 mm de comprimento, diâmetros interno e externo, respectivamente. O reator helicoidal foi colocado dentro um tubo de vidro de borossilicato com respectivamente 340 mm, 28 mm e 9,8 mm de comprimento, diâmetro interno e espessura da parede. Esse tubo de vidro juntamente com duas tampas de PEEK forma uma autoclave pressurizada a 40 bar, mas que pode resistir a até 50 bar de pressão. Através da pressurização do tubo de vidro com nitrogênio (40 bar) é possível balancear a pressão interna e externa do tubo de PFA, diminuindo o estresse mecânico e permitindo trabalhar sob maiores temperaturas. Duas bases de PEEK com espessura de 20 mm e quatro hastes de PEEK de 430 mm de comprimento e 16,4 mm de diâmetro mantinham fixas as tampas quando o tubo de vidro era pressurizado. O tubo de PFA, que foi enrolado em torno do tubo de PTFE, retorna por dentro do orifício central do tubo de PTFE e deixa a região irradiada e de

alta pressão do reator através de um orifício na tampa PEEK de entrada do tubo de vidro pressurizado. Dois tubos de aço inoxidável foram utilizados para conectar a parte interna e externa da cavidade do micro-ondas, sendo uma utilizada como entrada e outra como saída do tubo de PFA no reator pressurizado. Gás nitrogênio era introduzido no sistema através do separador gás-líquido e deixava o sistema através do controlador de vazão e dos coletores de amostra ou resíduo do sistema de digestão em fluxo. O controlador de vazão de nitrogênio é constituído de um tubo de PTFE de 12 m de comprimento e diâmetro interno de 0,5 mm, que está conectado ao separador gás líquido. Baixa vazão de nitrogênio era introduzida no sistema em sentido contrário ao fluxo da amostra a fim de remover vapores ácidos originados da difusão do vapor através das paredes do tubo de PFA.

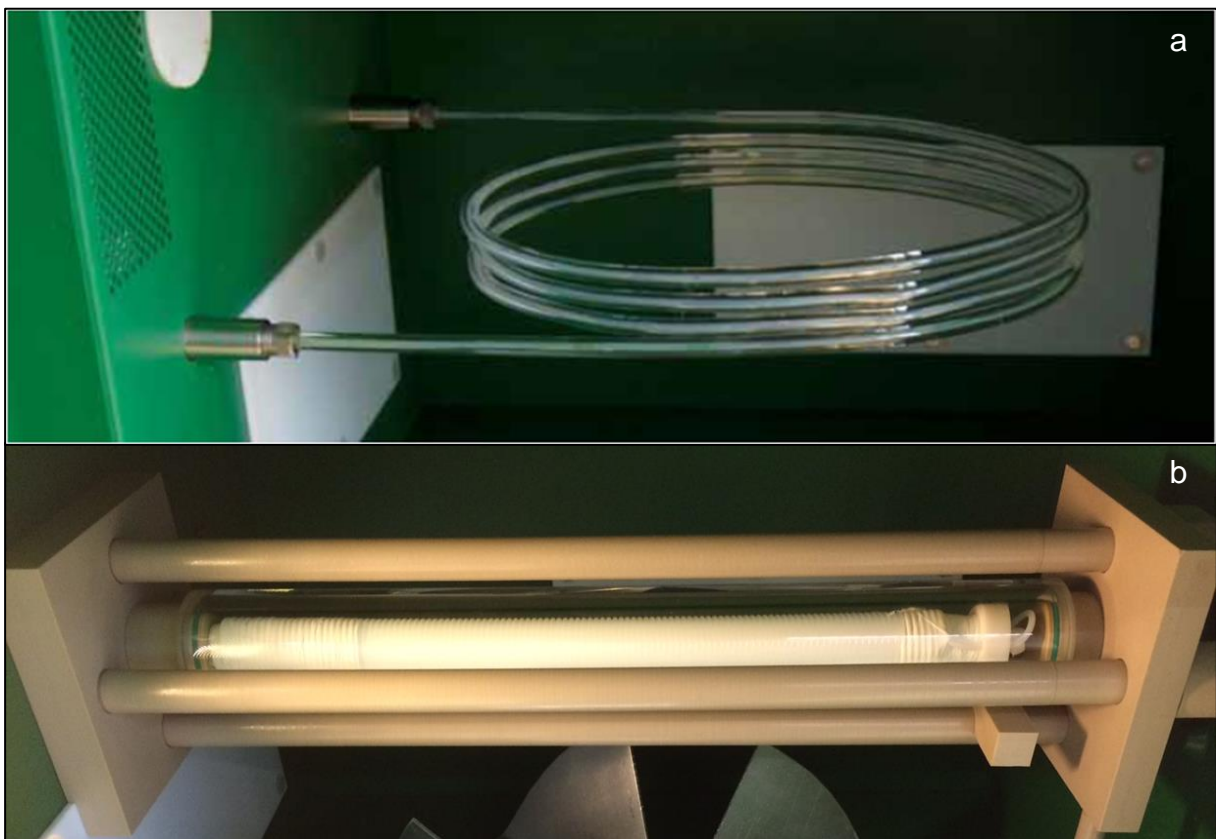


FIGURA 4.3.4.2 - Reatores utilizados no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas sob alta temperatura e pressão, (a) reator inicial de baixo volume e (b) reator desenvolvido e avaliado de grande volume.

Após deixar a zona irradiada, a amostra digerida era refrigerada e os gases gerados durante a digestão eram liberados no separador gás-líquido. O sistema de refrigeração é constituído por um tubo cilíndrico de aço inoxidável de 200 mm de comprimento e 40 mm de diâmetro, que circunda as hastes inoxidável de entrada e

saída de amostra, nesse tubo há um fluxo constante de água refrigerada sob baixa vazão. O separador gás-líquido é constituído de um tubo de quartzo de 80 mm, 12 mm e 20 mm de comprimento, diâmetros interno e externo, respectivamente, mantido por duas tampas de PEEK e duas barras de aço inoxidável. As barras de aço inoxidável estão fixadas na tampa superior e transpassam a tampa inferior, onde são fixadas com uso de duas arruelas e duas arruelas de aço inoxidável. A tampa superior tem finalidade de introduzir a amostra no sistema em fluxo, bem como introduzir e controlar a vazão de nitrogênio no sistema em fluxo. A tampa inferior tem a finalidade de coletar a amostra e manter a pressão do sistema, sendo essa peça um redutor de capilaridade. Após essa etapa o digerido era direcionado para uma válvula rotatória de 6 vias (Knauer, Alemanha), que direcionava o fluxo para o coletor de amostra ou para o descarte. Todos os dispositivos e parâmetros do sistema de digestão em fluxo incluindo o amostrador automático eram controlados por computador, possibilitando uma operação completamente automatizada.

4.3.5 - Caracterização do sistema em fluxo

Alguns experimentos foram realizados com o intuito de caracterizar o sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas. O volume do reator é definido pela região pressurizada do sistema no qual a amostra sofre o processo de aquecimento e refrigeração. Esse volume foi determinado pela introdução de uma solução colorida no sistema de digestão em fluxo e pelo controle do tempo necessário para fluir através do reator em uma vazão de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$, potência de radiação de 0 W e pressão de 10 bar.

Posteriormente, foi determinada a porcentagem da fase de vapor, que é a quantidade de vapor formado dentro do reator quando a solução carregadora foi aquecida sob diferentes vazões ($2,5$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$) e potências aplicadas (300, 400, 500 e 600 W), com a pressão mantida em 40 bar. Esse parâmetro é importante, pois a partir dele pode-se inferir sobre a eficiência de absorção de radiação na zona de aquecimento e, conseqüentemente, sobre a eficiência de digestão da amostra. A porcentagem de fase de vapor foi determinada pelo aquecimento da solução carregadora de HNO_3 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min até atingir o equilíbrio do sistema, então o forno de micro-ondas foi desligado e foi medido o tempo que a solução carregadora levava para gotejar novamente no separador gás-líquido. Considerando-se o tempo

medido, a vazão do carregador e o volume do reator, é possível determinar a porcentagem da fase de vapor.

O sinal transiente mostra o perfil de dispersão da solução, possibilita inferir sobre perdas de analito e contaminação dentro do reator e estabelecer o tempo de coleta dos digeridos quando a detecção é realizada off-line. Neste experimento 2 mL de uma solução padrão multielementar 10 mg L^{-1} em HNO_3 6 mol L^{-1} foi introduzida no sistema de digestão em fluxo sob 40 bar de pressão, utilizando potência aplicada de 500 W e sob diferentes vazões ($2,5$ e $5,0 \text{ ml min}^{-1}$). As medidas foram realizadas on-line em ICP OES, fazendo 60 medidas em 13 min após introdução da solução padrão no sistema de digestão em fluxo e usando as condições descritas anteriormente. A fim de evitar pulsos no sinal transiente devido à liberação de gases formados durante o aquecimento da solução padrão multielementar e que ocorre após o separador gás líquido, foi utilizada uma interface para liberação dos gases (FIGURA 4.3.5.1). A interface era constituída de um tubo cilíndrico de quartzo de 20 mm de comprimento e 10 mm de diâmetro interno com duas saídas nas extremidades, sendo uma para escape de gases e outra para introdução de amostra no ICP OES e uma entrada na parede lateral do tubo para coleta da solução padrão multielementar. Isso foi realizado a fim de remover gases residuais presentes na solução multielementar como N_2 , que poderia diminuir a estabilidade do plasma.

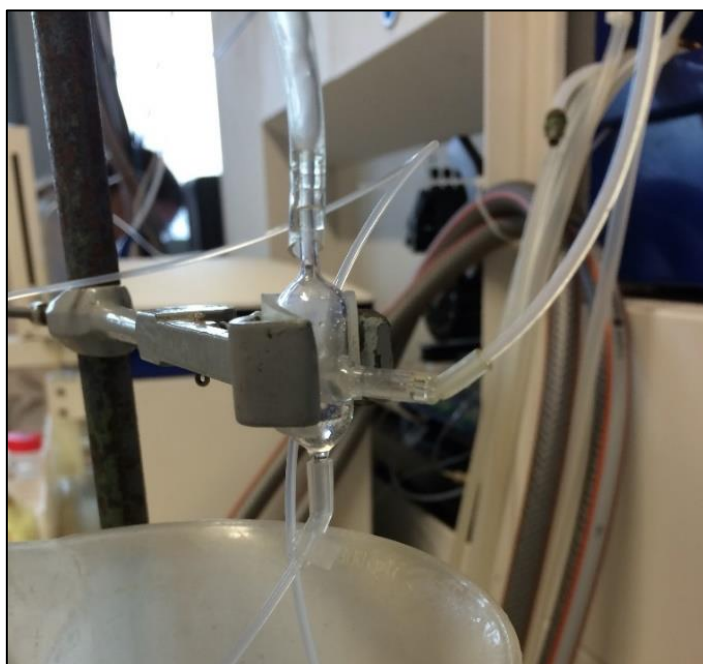


FIGURA 4.3.5.1 - Interface aplicada para avaliação do sinal transiente nas determinações on-line por ICP OES.

4.3.6 - Otimização dos parâmetros de digestão

A eficiência de digestão foi determinada pelo teor de ROC dos digeridos de diferentes compostos orgânicos. Os compostos avaliados foram glicose, glicina, fenilalanina e ácido nicotínico, que são conhecidos quanto ao grau de dificuldade de digestão, i.e. fácil, médio, difícil e altamente difícil, respectivamente. Para isso 2 mL de soluções de glicose, glicina, fenilalanina ou ácido nicotínico com as respectivas concentrações de TOC de 10, 9, 5 e 9 g L⁻¹ em HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ foram digeridos sob pressão de 40 bar em diferentes vazões (2,5 e 5,0 mL min⁻¹) e potências aplicadas (400, 500 e 600 W). A combinação de HCl, H₂O₂ e HClO₄ em diferentes concentrações com HNO₃ foi avaliado na eficiência de digestão de fenilalanina utilizando a potência e vazão otimizadas no experimento anterior. Assim, 2 mL de uma solução de fenilalanina foi digerida em meio de HNO₃ 6 mol L⁻¹ com HCl (0,5; 0,9 e 1,9 mol L⁻¹), ou HNO₃ 6 mol L⁻¹ com H₂O₂ (0,5; 1,0 e 2,0 mol L⁻¹) ou HNO₃ 6 mol L⁻¹ com HClO₄ (0,6; 1,2 e 2,4 mol L⁻¹), sendo que essas concentrações equivalem a concentrações de 1,5; 3,0 e 6,0% (V V⁻¹) para todos os reagentes complementares ao ácido nítrico. A fenilalanina foi utilizada em menor concentração, a fim de evitar o entupimento do sistema, uma vez que esse composto precipitou no interior do reator quando soluções contendo maiores concentrações foram introduzidas. As digestões foram realizadas off-line e os digeridos foram analisados por ICP OES.

4.3.7 - Avaliação do sistema em fluxo

A eficiência da digestão foi avaliada pela determinação da concentração de ROC nos digeridos e a comparação desses valores com as concentrações de TOC inicialmente introduzido no sistema, considerando-se teor de TOC determinado nas amostras sólidas por analisador elementar CHNS/O. Os LODs determinados nos brancos dos digeridos no sistema em fluxo foram comparados com os LODs da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, que são apresentados no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pg. 30). Ademais, foram comparadas as características de ambos os procedimentos no preparo das amostras sólidas de tecidos animal e vegetal. As amostras e CRMs foram utilizados para avaliar a precisão e a exatidão do método otimizado no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas aqui desenvolvido. Nesses experimentos, 2,0 mL das suspensões com 1% (m m⁻¹) de tecido animal em HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ ou HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ com HCl 0,4 mol L⁻¹ e de tecido vegetal em HNO₃

6,0 mol L⁻¹, ou HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ com HF 0,6 mol L⁻¹ ou HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ com HCl 0,4 mol L⁻¹ foram digeridas no sistema de digestão em fluxo usando a potência e vazão otimizadas em estudos anteriores. A digestão foi realizada off-line e os digeridos foram analisados por ICP OES. Os resultados obtidos foram comparados com os teores certificados dos CRMs e determinados nas amostras digeridas em batelada.

4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 - Caracterização do sistema em fluxo

O volume do reator foi determinado em quintuplicata, sendo que em média o tempo que a solução colorida levou para percorrer a região de aquecimento e refrigeração foi de 324 ± 3 s. Considerando-se que a vazão utilizada durante os experimentos foi de 2,5 mL min⁻¹ e que a vazão (v) é determinada pela razão entre o volume propulsionado (V_P) e o tempo (t) (EQUAÇÃO 4.4.1.1), temos que o volume do reator é de 13,5 ± 0,1 mL.

$$v = \frac{V_P}{t} \quad \text{EQUAÇÃO 4.4.1.1}$$

O novo reator apresenta um Volume 2,25 vezes maior do que o anteriormente utilizado no sistema em fluxo avaliado por WILTSHCE et al.³⁸, o qual possuía um Volume de aproximadamente 6,0 mL. O antigo reator (FIGURA 4.3.4.2a) era constituído de uma serpentina de quartzo, onde era introduzido o tubo de PFA, porém a fricção entre as paredes dos dois tubos impedia a introdução do tubo de PFA em mais do que três voltas por dentro do tubo de quartzo. É importante ressaltar que o volume do novo reator poderia ser aumentado ao sobrepor mais camadas de bobina helicoidal da bobina de PFA sobre si mesma, porém devido aos bons resultados iniciais obtidos com esse reator os estudos foram realizados com a camada de bobina helicoidal de bobina de PFA enovelada em torno do tubo de PTFE (FIGURA 4.3.4.2b).

A porcentagem da fase de vapor ($FV\%$) foi determinada pela razão entre o volume de vapor (V_v) dentro do reator e volume total (V_T) do reator como descrito na EQUAÇÃO 4.4.1.2. O volume de vapor (V_v) foi determinada de acordo com a (EQUAÇÃO 4.4.1.1), sendo que o tempo (t) utilizado nos cálculos foi o transcorrido para que a solução voltasse a gotejar no separador gás-líquido após o desligamento do magnetron do forno micro-ondas.

$$FV\% = \frac{V_v}{V_T} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 4.4.1.2}$$

Os cálculos da porcentagem da fase de vapor foram realizados considerando o volume de reator (13,5 mL) calculado anteriormente, sendo os resultados apresentados na TABELA 4.4.1.1.

TABELA 4.4.1.1 - Porcentagem da fase de vapor (média \pm desvio padrão, $n = 3$) em diferentes vazões e potências aplicadas.

Vazão (mL min ⁻¹)	Potência (W)	Fase de vapor (%)
2,5	300	SFV
	400	15,7 \pm 0,5
	500	8,6 \pm 0,8
	600	7,8 \pm 0,5
5,0	400	SFV
	500	16 \pm 1
	600	17,9 \pm 0,7

SFV: sem fase vapor

Na menor vazão (2,5 mL min⁻¹), o aumento da potência da radiação micro-ondas diminui a formação da fase de vapor devido à alta pressão dentro do reator que expulsa a solução carregadora do interior do reator e aumenta a impedância para introduzir mais solução carregadora no sistema. Entretanto, sob maior vazão (5,0 mL min⁻¹) é observado um efeito oposto, onde o aumento da pressão interna não é suficiente para aumentar a pressão dentro do reator e causar a expulsão da solução. Dessa maneira, o aumento da potência aplicado promove um ligeiro aumento na formação da fase de vapor. Esse fator é importante a ser considerado, pois quando maior a fase de vapor dentro do reator, menor será a absorção da radiação micro-ondas pela fase líquida contendo a amostra e, conseqüentemente, menor será a temperatura atingida na digestão. Dessa forma, é desejável uma pequena formação de fase de vapor no reator a fim de garantir melhores eficiências de digestão.

O sinal transiente apresenta um perfil similar para maioria dos analitos sem uma grande dispersão da amostra e formando um sinal típico de sistemas de análise por injeção em fluxo, quando utilizadas as vazões de 2,5 e 5,0 mL min⁻¹ e potência da radiação micro-ondas de 500 W. Isso pode ser observado nos sinais transientes para Ca, Cu, Fe, Zn e Sc apresentados na FIGURA 4.4.1.1. Para esses elementos, bem como para Al, As, Cd, Bi, Na, Co, Cr, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Sc, Se, Ti, Tl e V não houve contaminação ou perdas durante a digestão. Entretanto, B e K apresentaram elevados sinais de branco analítico (FIGURA 4.4.1.1), que diminuiriam em tempos longos, apesar dos perfis similares para os sinais da solução padrão obtidos para os outros elementos. Esses altos valores de branco podem ocorrer devido à contaminação durante o processo de digestão, especialmente do separador gás-líquido confeccionado com Vidro. Uma solução para isso seria a substituição do tubo de vidro por um polímero de alta resistência e parede espessa como o PEEK. Nesse caso, sensores de líquidos deveriam ser colocados no separador gás-líquidos a fim de evitar que houvesse acúmulo de solução nesse dispositivo em caso de entupimento. O mercúrio não apresentou um bom perfil de sinal transiente (FIGURA 4.4.1.1), isso se deve a perdas desse elemento durante a digestão, uma vez que esse apresenta uma alta volatilidade e pode difundir pelas paredes do tubo de PFA ou também pode aderir ao tubo de PFA causando o alargamento do sinal e contaminação cruzada entre as amostras.

As durações dos sinais transientes nas vazões de 2,5 e 5,0 mL min⁻¹ foram de cerca de 5 min (de 200 a 520 s) e 2 min (de 180 a 300 s), respectivamente. Baseado nesses valores foi definido os tempos de 9 e 5 min como período de coleta do digerido para as digestões realizadas nas vazões de 2,5 e 5,0 mL min⁻¹, respectivamente. Os tempos de coleta foram relativamente maiores que os tempos dos sinais transientes para garantir a coleta de toda zona de amostra digerida nas demais condições de potência da radiação micro-ondas que não foram avaliadas neste estudo (400 e 600 W).

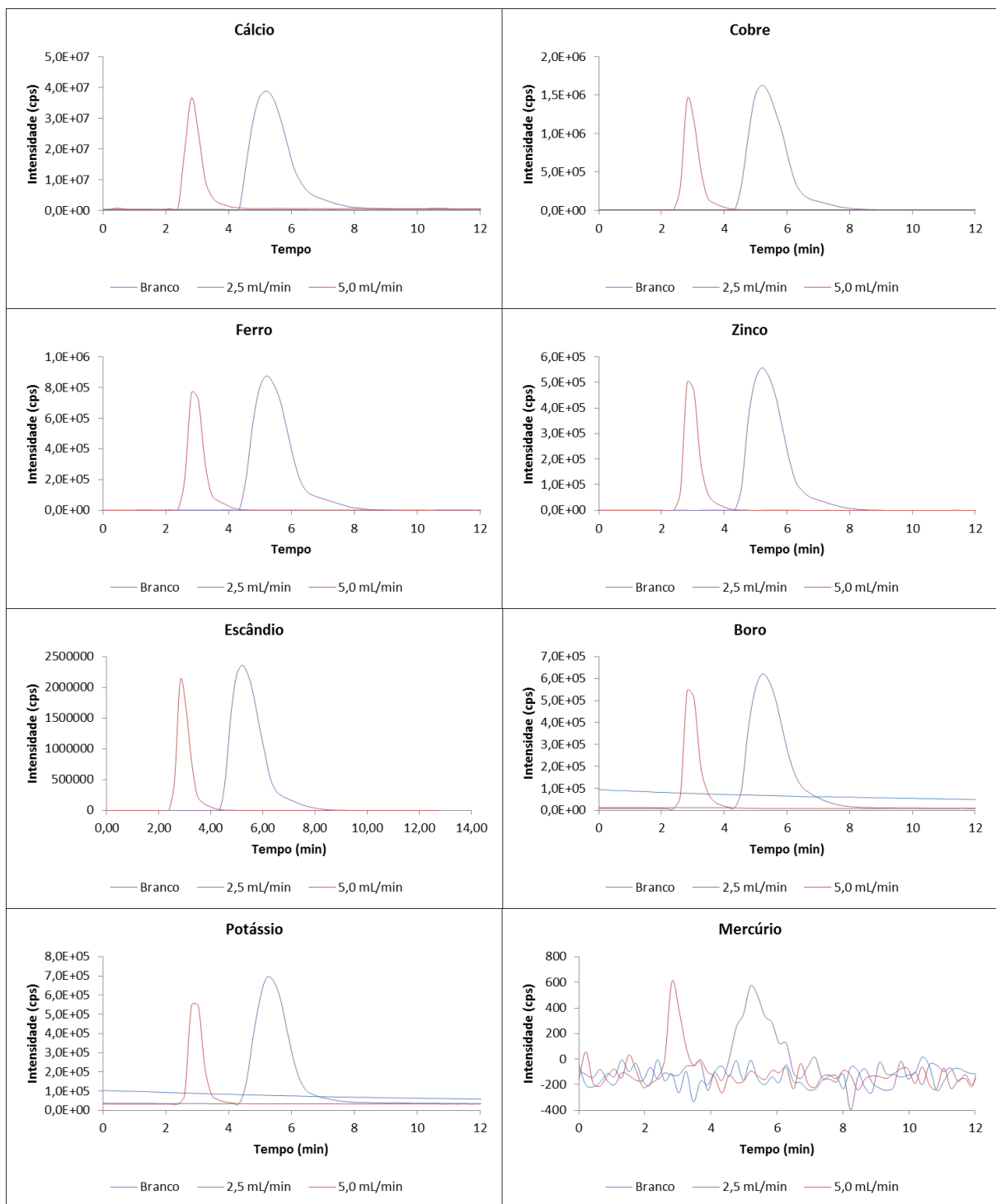


FIGURA 4.4.1.1 - Sinais transientes para Ca, Cu, Fe, Zn, Sc, B, K e Hg na detecção on-line de uma solução padrão introduzida no sistema de digestão em fluxo por ICP OES.

4.4.2 - Otimização dos parâmetros de digestão

A eficiência de digestão para todas as substâncias digeridas em diferentes condições está apresentada na TABELA 4.4.2.1. A ordem crescente da eficiência de digestão tal como esperado foi, glicose > glicina > fenilalanina > ácido nicotínico. O ácido nicotínico e a fenilalanina são substâncias de difícil digestão, uma vez que apresentam anéis aromáticos em suas estruturas que demandam condições severas para degradação^{93,94}. Enquanto, a glicose e a glicina são compostos com estruturas mais simples e fáceis de decompor.

TABELA 4.4.2.1 - Efeito da vazão e da potência aplicada na eficiência de digestão da glicose (Gli), glicina (Gly), fenilalanina (Phe) e ácido nicotínico (Ac Nic) no teor de ROC, média \pm desvio padrão e n = 5.

Vazão do carregador (mL min ⁻¹)	Potência (W)	Teor de ROC (%)			
		Gli	Gly	Phe	Ac Nic
2,5	400	< 1	18,5 \pm 0,6	78,6 \pm 0,4	94,4 \pm 0,5
	500	1,1 \pm 0,3	29 \pm 1	72,7 \pm 0,9	94 \pm 1
	600	1,6 \pm 0,2	27 \pm 1	71,8 \pm 0,5	94 \pm 2
5,0	400	3,6 \pm 0,6	94,2 \pm 0,8	76,3 \pm 0,7	95 \pm 2
	500	2,3 \pm 0,5	37 \pm 3	77,9 \pm 0,7	96 \pm 1
	600	1,9 \pm 0,5	24 \pm 1	80 \pm 1	97,2 \pm 0,6

A vazão do carregador e a potência aplicada da radiação micro-ondas influenciaram a eficiência da digestão de diferentes maneiras para as substâncias com diferentes tendências à oxidação quando utilizado o HNO₃ 6,0 mol L⁻¹. Sob menor vazão (2,5 mL min⁻¹) o aumento da potência aplicada diminuiu a eficiência da digestão da glicose e glicina. Por outro lado, sob alta vazão (5,0 mL min⁻¹) houve um efeito contrário quando se aumentou a potência aplicada. Isso está relacionado com a porcentagem formada da fase de vapor, nesse sentido, compostos reativos são facilmente decompostos e liberam uma grande quantidade de gases (CO₂ e NO_x) durante a digestão. Esse processo aumentou a pressão dentro do reator levando à expulsão da amostra, diminuindo a eficiência da digestão da glicose e glicina em maiores potências de radiação na vazão de 2,5 mL min⁻¹. Além disso, com o aumento da fase de vapor há uma diminuição na eficiência de absorção da radiação micro-ondas pela fase líquida dentro do reator. Entretanto, o aumento da pressão dentro do reator não foi suficiente para expulsar a amostra do reator e aumentar a fase de vapor presente no reator quando o sistema foi operado sob maior vazão, o que justifica as melhores eficiências de digestão sob maiores potências aplicadas em 5,0 mL min⁻¹.

Em contrapartida, fenilalanina e ácido nicotínico são substâncias menos reativas, que não liberam grande quantidade de gases durante a digestão e, assim, não são expelidas do sistema. Portanto, o aumento na potência aplicada aumentou a eficiência da digestão da fenilalanina sob baixas vazões ($2,5 \text{ mL min}^{-1}$) e quando se empregou uma vazão maior ($5,0 \text{ mL min}^{-1}$), o tempo de residência da amostra dentro do reator foi menor e a formação de vapor afetou a digestão da fenilalanina. Nenhum efeito significativo pode ser observado para o ácido nicotínico em todas as condições avaliadas. Nesse sentido, sob maior potência de radiação micro-ondas houve maior formação de fase de vapor, que expeliu esses compostos menos reativos e diminuiu a eficiência da digestão da fenilalanina e do ácido nicotínico em $5,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Considerando esses efeitos opostos da potência aplicada da radiação micro-ondas e da vazão para substâncias com diferentes reatividades, foi estabelecido o uso de uma condição intermediária de potência aplicada (500 W) a fim de garantir uma boa digestão desses diferentes grupos de compostos e o uso de uma maior vazão ($5,0 \text{ mL min}^{-1}$) para aumentar a frequência analítica e diminuir o consumo de N_2 por análise. Sendo que essas condições foram utilizadas nos experimentos posteriores.

No intuito de aumentar a eficiência de digestão da fenilalanina, em relação aos experimentos anteriores que utilizaram HNO_3 $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, foi utilizada a combinação de HCl, H_2O_2 e HClO_4 em diferentes concentrações molares que equivalem a diluições de 1,5; 3,0; 6,0 % (V V^{-1}) com HNO_3 6 mol L^{-1} (32% (V V^{-1})) utilizando as condições mencionadas anteriormente. Os teores de ROC obtidos nessas digestões são apresentados na FIGURA 4.4.2.1. O uso de HClO_4 nas três concentrações avaliadas não proporcionou aumento significativo da eficiência da digestão, enquanto, que o uso de HCl e H_2O_2 promoveu o aumento da eficiência de digestão. Em baixas concentrações o HCl apresentou melhor eficiência de digestão, observando-se um suave aumento na eficiência de digestão quando se aumentou a concentração. Já o H_2O_2 não foi tão eficiente em baixas concentrações, porém houve um aumento significativo na eficiência de digestão quando se aumentou a concentração. Como o aumento na concentração de H_2O_2 causou um aumento da fase de vapor formada durante a irradiação da amostra, o que ejetaria do reator as amostras que apresentem composto reativos como glicose, optou-se por utilizar HCl nos próximos experimentos. A concentração de HCl escolhida para os próximos experimentos foi a intermediária, que foi aquela que apresentou boa eficiência de

digestão (54%) e próxima ao valor da máxima concentração avaliada (51%), assim HCl 3,0 % (V V⁻¹) que equivale a uma concentração molar de 0,4 mol L⁻¹ foi utilizado nos experimentos subsequentes com as amostras de tecidos vegetal e animal.

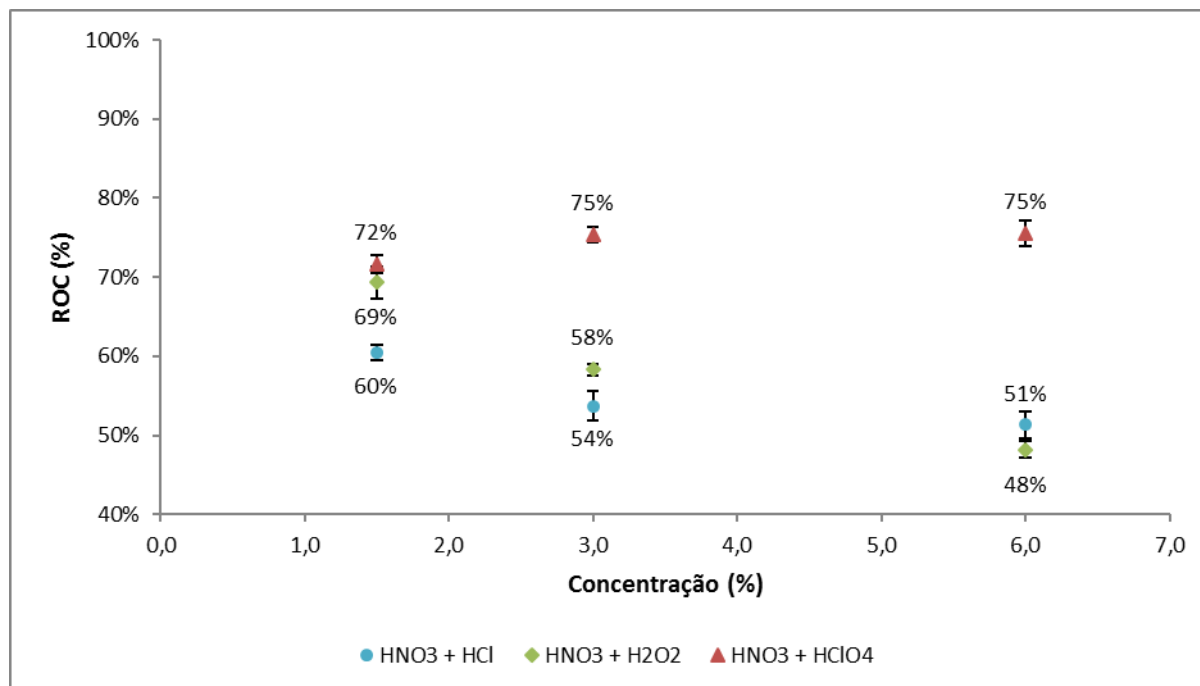


FIGURA 4.4.2.1 - Eficiência de digestão de fenilalanina com HNO₃ 32% V V⁻¹ combinado com HCl ou H₂O₂ ou HClO₄ (1,5; 3,0; 6,0 % (V V⁻¹)), n = 5.

4.4.3 - Avaliação do desempenho do sistema

Leite em pó foi usado para avaliar o sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas, pois é basicamente constituído por açúcares e gorduras. Açúcares são facilmente decompostos e liberam uma grande quantidade de CO₂ que permite avaliar a resistência do sistema sob condições drásticas. Por outro lado, a gordura é mais difícil de degradar, podendo ser usada para determinar a eficiência do sistema de digestão em fluxo para substâncias mais complexas. Nesse experimento foram adotadas as condições previamente otimizadas e uma suspensão de leite em pó 1% (m m⁻¹) em HNO₃ 6 mol L⁻¹. O sistema realizou bem o processo, sem danos estruturais, apesar da reação violenta inicializada pela decomposição dos açúcares. Além disso, a concentração de ROC presente nos digeridos foi de 36 ± 2 mg L⁻¹ que é um bom Valor quando comparado com os valores obtidos na etapa de otimização do método. Alguns elementos foram quantificados no digerido, sendo encontrados os teores de 4,1 ± 0,1 e 0,31 ± 0,1 mg g⁻¹ para Ca e Mg, respectivamente, que estão de acordo com os resultados obtidos em estudo anterior³⁸. Porém, os teores

encontrados para Fe e Zn foram de $0,034 \pm 0,001$ e $0,024 \pm 0,001$ mg g⁻¹, respectivamente, que são 53 e 29% menores que os encontrados no trabalho anterior³⁸. Assim, outros ácidos ou misturas de ácidos devem ser avaliados para melhorar a exatidão do método.

A acidez residual dos digeridos de glicose, fenilalanina e leite em pó utilizando HNO₃ 6 mol L⁻¹ foi em média de 6,0 % (V V⁻¹) (0,85 mol L⁻¹), sendo que não ocorreram diferenças significativas nos valores obtidos para cada uma das amostras (TABELA 4.4.3.1). Esse valor é menor do que encontrado no trabalho anterior (3.8 mol L⁻¹)³⁸. Vale ressaltar que parte dessa acidez residual é proveniente da solução carregadora e das alíquotas de solução ácida adicionada antes e depois da amostra, assim é interessante avaliar quanto do ácido presente na alíquota da amostra foi consumido durante a digestão. Para isso é necessário desconsiderar o ácido provenientes dessas outras frações e fazer a razão entre a concentração inicial e final do ácido presente na alíquota da amostra. Nos digeridos de glicose, fenilalanina e leite em pó em média 88 ± 7% do ácido nítrico foi consumido durante a digestão (TABELA 4.4.3.1). Nesse sentido, pode-se notar que a acidez residual pode ser reduzida usando-se menores volumes das alíquotas de ácido concentrado. Por outro lado, a acidez é suficientemente baixa (2 mmol L⁻¹) para permitir a análise on-line das amostras.

TABELA 4.4.3.1 - Acidez residual e do teor de ácido consumido durante a digestão de glicose, fenilalanina e leite em pó, média ± desvio padrão e n = 3.

Amostra	Acidez Residual (%)	Ácido consumido (%)
Glicose	5,83 ± 0,03	94 ± 1,5
Fenilalanina	5,90 ± 0,03	91 ± 1,6
Leite em pó	6,19 ± 0,03	78 ± 1,7

Os brancos dos digeridos das amostras de tecido animal e vegetal foram analisados por ICP-MS e apresentaram baixos teores de Al (< 1,7 µg L⁻¹), Cr (< 0,4 µg L⁻¹), Cu (< 0,8 µg L⁻¹), Ni (< 0,6 µg L⁻¹) e Zn (< 2,0 µg L⁻¹), enquanto que Co, Mn e Mo não foram detectados. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que não houve contaminação significativa durante o processo de digestão pela corrosão de partes metálicas presentes no sistema de digestão em fluxo. Entretanto, teores elevados de Ti foram encontrados nos brancos preparados com o homogeneizador (até 150 µg L⁻¹), enquanto que nos brancos em que não foi utilizado o homogeneizador esses teores foram menores que 15 µg L⁻¹. Assim, pode-se afirmar que há

contaminação de Ti nas suspensões preparadas com o homogeneizador, porém esse não é um problema relevante, uma vez que o Ti não é um elemento comumente avaliado nas amostras de estudo.

4.4.4 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo das amostras de tecido animal e vegetal

Os LODs da digestão em fluxo das amostras sólidas foram determinados como descrito no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pag. 34). Foram determinados os LODs médios para todas as condições avaliadas, pois não houveram diferenças significativas entre os LODs calculados nas diferentes misturas ácidas avaliadas e condições de preparo das amostras, ou seja, com ou sem o uso do homogeneizador mecânico. Os LODs dos brancos de procedimento para digestão assistida por radiação micro-ondas em fluxo e em frascos fechados são apresentadas na TABELA 4.4.4.1. De modo geral, os LODs alcançados pelo sistema de digestão em fluxo foram menores do que àqueles obtidos pela digestão em batelada, quando considerado a concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, sem considerar o fator de diluição. Esses melhores brancos analitos estão relacionados a automatização do sistema e menor interferência do analista no processo. Entretanto, quando o fator de diluição da amostra é considerado, os LODs se tornam maiores, pois o fator de diluição da digestão em fluxo e batelada foram 2500 e 200 vezes, respectivamente. Dessa forma, o fator de diluição empregado no sistema em fluxo foi 12,5 vezes maior do que na digestão ácida em batelada. Isso pode ser solucionado pela menor diluição do digerido ou pela introdução de uma maior massa de amostra no sistema. No segundo caso há duas alternativas, aumentar a concentração da suspensão, que pode levar a entupimentos, ou aumentar o volume de suspensão introduzida no sistema, o que é mais viável. Como estes LODs estão dentro da faixa linear de trabalho do ICP OES tal fator de diluição foi mantido.

TABELA 4.4.4.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras sólidas do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).

Analito	Digestão em batelada	Digestão em fluxo	Digestão em batelada	Digestão em fluxo
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)*		LOD (mg kg^{-1})**	
Al	33	10	7	22
As	19	14	4	33
Ba	1	1	0,3	2
Ca	100	52	20	106
Cu	6	5	1	12
Fe	9	6	2	15
K	285	29	57	59
Mg	10	9	2	17
Mn	1	5	0,1	11
Na	17	2	3	4
P	16	23	3	58
S	94	58	19	145
Sr	0,4	0,1	0,1	0,3
Zn	2	1	0,4	3

* LOD instrumental, ** LOD do método considerando os respectivos fatores de diluição da amostra.

Dois CRMs foram utilizados para avaliar a exatidão do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas. A maioria dos resultados listados na TABELA 4.4.4.2 para os elementos quantificados nos digeridos nos CRMs apresentam diferenças significativas com os teores certificados de acordo com um teste *t* não pareado, pois os *t* calculados são maiores que o *t* crítico (2,776). Entretanto, a maioria dos elementos que apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste *t* não pareado apresentaram recuperações que variaram de 90 a 110%. Essas diferenças destacadas pelo teste *t* não pareado, se deve aos baixos desvios padrões das determinações. Considerando-se as recuperações, a maioria dos elementos determinados pela digestão em fluxo apresentaram boa concordância com os valores certificados. É importante observar que o ácido ou a mistura ácida utilizada nas digestões podem afetar os resultados obtidos, mas esse efeito varia para cada elemento. Por exemplo, o uso de HNO_3 6 mol L^{-1} foi a melhor opção para a determinação de Ca em fígado bovino (NIST 1577b) garantindo uma melhor concordância do teor determinado com o valor certificado. Enquanto que para Fe no mesmo CRM a combinação de HNO_3 6 mol L^{-1} com HCl 0,4 mol L^{-1} foi a melhor opção, isso pode ser devido ao caráter complexante do HCl o que aumenta a estabilidade de íons Fe em solução. Entretanto, outros elementos não foram afetados pela solução ácida utilizada como Cu, Mn e P em fígado bovino (NIST 1577b) e Mg, Mn, P, Sr e Zn

em folhas de macieira (NIST 1515). A concentração de S determinado em fígado bovino (NIST 1577b) foi menor que o valor certificado, isso pode ter ocorrido devido à perda desse elemento durante a digestão. Os gases de SO_x podem difundir através do tubo de PFA e serem arrastados pelo fluxo de N₂. Outros elementos estão em baixa concentração, o que torna difícil a determinação, o que explicaria os baixos teores determinados para Mn em fígado bovino (NIST 1577b) e Cu em folhas de macieira (NIST 1515).

TABELA 4.4.4.2 - Avaliação da digestão em fluxo com CRMs, valor médio ± incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Teores certificados	Digestão em fluxo		
			A	B	C
Fígado bovino NIST 1577b	Ca (mg kg ⁻¹)	116 ± 4	117 ± 27	-	108 ± 3
	Cu (mg kg ⁻¹)	160 ± 8	160 ± 8	-	160 ± 5
	Fe (mg kg ⁻¹)	184 ± 15	168 ± 5	-	175 ± 5
	Mg (mg kg ⁻¹)	601 ± 28	585 ± 34	-	580 ± 17
	Mn (mg kg ⁻¹)	10,5 ± 1,7	8 ± 1	-	7,5 ± 0,2
	P (%)	1,1	1,054 ± 0,032	-	1,08 ± 0,032
	S (%)	0,8	0,59 ± 0,08	-	0,67 ± 0,02
	Zn (mg kg ⁻¹)	127 ± 16	120 ± 5	-	121 ± 4
Folhas de macieira NIST 1515	Al (mg kg ⁻¹)	286 ± 9	247 ± 12	253 ± 11	242 ± 7
	Ba (mg kg ⁻¹)	49 ± 2	46 ± 2	46 ± 1	51 ± 2
	Ca (%)	1,53 ± 0,02	1,49 ± 0,04	1,56 ± 0,05	1,58 ± 0,05
	Cu (mg kg ⁻¹)	5,6 ± 0,2	ND	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2
	Fe (mg kg ⁻¹)	83 ± 5	67 ± 2	67 ± 2	64 ± 3
	Mg (%)	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01
	Mn (mg kg ⁻¹)	54 ± 3	47 ± 1	50 ± 1	50 ± 2
	P (%)	0,16 ± 0,01	0,141 ± 0,004	0,136 ± 0,04	0,140 ± 0,004
	Sr (mg kg ⁻¹)	25 ± 2	22 ± 1	22 ± 1	23 ± 1
	Zn (mg kg ⁻¹)	12,5 ± 0,3	12,5 ± 0,4	10,3 ± 0,3	12,2 ± 1

ND: não determinado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HF 0,6 mol L⁻¹, C: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹.

A avaliação inicial do desempenho do sistema na digestão das amostras de tecido vegetal e animal foi realizada determinando-se o ROC nas amostras. A concentração de ROC nas suspensões digeridas com HCl foi menor entre todas as soluções ácidas avaliadas neste trabalho. Os valores determinados nas amostras de tecido animal digeridas com a mistura de HNO₃ e HCl foram 33 ± 1, 24 ± 2 e 33 ± 3 mg L⁻¹ para fígado bovino, músculo bovino e camarão, respectivamente. Enquanto, que as concentrações de ROC encontrados na mesma sequência de amostras digeridas somente com HNO₃ foram 61 ± 3, 54 ± 2 e 56 ± 3 mg L⁻¹. Para plantas, esses valores foram 5 ± 1 e 18 ± 1 mg L⁻¹ independentemente da amostra

digerida, quando se utilizou a mistura de HNO_3 e HCl ou HF , respectivamente. Esses valores diferenciaram entre as amostras de tecido animal quando foi utilizado somente HNO_3 nas digestões, sendo que as concentrações determinadas foram 19 ± 1 , 22 ± 5 e $12 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e laranjeira, respectivamente.

O teor de ROC é determinado através razão da concentração de ROC pela concentração de TOC na suspensão considerando o teor de TOC determinado nas amostras de tecidos animal e vegetal por analisador elementar CHNS/O e apresentadas no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pg.30). Esses valores foram utilizados na determinação da eficiência da digestão, que é calculada ao subtrair o teor de ROC percentual de 100%, sendo os resultados são apresentados na FIGURA 4.4.4.1. Pode-se confirmar que as melhores eficiências foram obtidas para a mistura ácida de HNO_3 e HCl . A eficiência da digestão foi em média de 83 ± 4 e 96 ± 1 para as amostras de tecidos animal e vegetal, respectivamente. Quando foi utilizado somente HNO_3 nas digestões das amostras de tecido animal essa eficiência foi em média de $67 \pm 3\%$ para todas as amostras. Para as amostras de tecido vegetal ela não se diferenciou muito quando utilizado HNO_3 ou HNO_3 e HF , sendo que a eficiência foi de 88 ± 3 .

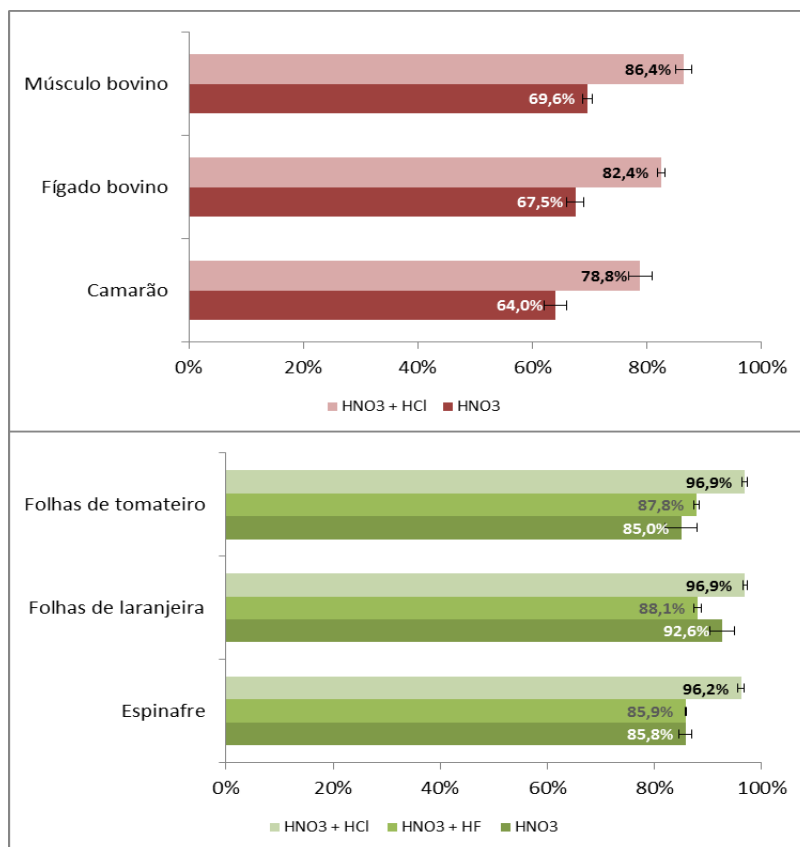


FIGURA 4.4.4.1 - Eficiências de digestão das amostras de tecido animal e vegetal utilizando diferentes ácidos e/ou misturas ácidas, n = 5.

As características analíticas do sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas foram comparadas com aquelas da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada). Como observado na TABELA 4.4.4.3 na digestão em fluxo há uma redução no consumo de amostra, reagentes e na geração de resíduos, o que está de acordo com os princípios da Química Analítica Verde. Na digestão em batelada são utilizados 13, 4, 10 e 4 vezes mais amostra, HNO₃, HCl e HF, respectivamente, do que no sistema de digestão em fluxo, o que influencia diretamente no volume de resíduo gerado. Nos cálculos de geração de resíduos foram considerados os ácidos utilizado durante a digestão de uma amostra e da limpeza do sistema ou dos frascos. Desse modo, os volumes dos resíduos de HCl e HF são idênticos aos utilizados na digestão, enquanto que no volume do resíduo de HNO₃ são consideradas as frações oriundas da solução carregadora e das soluções ácidas introduzidas antes e depois da amostra na digestão em fluxo e da solução de limpeza (HNO₃ 32% V V⁻¹) utilizada na digestão em batelada. Outro fator a ser avaliado são as frequências analíticas dos dois procedimentos. Nesses cálculos foram consideradas o tempo gasto na digestão da amostra e a limpeza do sistema. No sistema de digestão em fluxo o procedimento levou cerca de 10 min para a

introdução de amostra, coleta do digerido e limpeza do sistema, o que resulta em uma frequência analítica de 6 digestões por hora. No sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados utilizado neste trabalho foi empregado um rotor com 12 frascos e o programa de digestão levou 45 min e resfriamento dos frascos 30 min, o que totalizou 1,2 h. Entretanto, deve se considerar a etapa de limpeza que leva mais 45 min. Desse modo, a frequência analítica da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados foi de 6 digestões por hora. Apesar, da frequência analítica dos dois métodos serem iguais, é importante destacar que algumas etapas são omitidas no cálculo da frequência analítica da digestão em batelada, como por exemplo o tempo necessário para a secagem dos frascos.

TABELA 4.4.4.3 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras sólidas de tecido animal e vegetal.

Características	Digestão em fluxo	Digestão em batelada
Consumo de amostra (mg)	20	250
Consumo de HNO ₃ (mL)	1	4
Consumo de HCl (mL)	0,1	1
Consumo de HF (mL)	0,05	0,2
Resíduo de HNO ₃ (mL)	3,8	7,5
Resíduo de HCl (mL)	0,1	1
Resíduo de HF (mL)	0,05	0,2
Frequência analítica (h ⁻¹)	6	6

Nas TABELA 4.4.4.4 e TABELA 4.4.4.5 são apresentadas as concentrações elementares determinadas nas diferentes amostras de tecidos animal e vegetal digeridas no sistema de digestão em fluxo utilizando diferentes misturas ácidas, bem como das amostras digeridas em forno de micro-ondas com frascos fechados. Em geral, os teores determinados usando o sistema de digestão em fluxo estão de acordo com os teores determinados usando procedimento em batelada, apesar do curto tempo de residência da amostra no interior do reator. Nas amostras de tecido animal foi importante usar HCl no preparo das suspensões, uma vez que essas se apresentam mais estáveis e homogêneas do que aquelas preparadas somente com HNO₃. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado nas suspensões de tecido vegetal, nas quais os diferentes ácidos ou misturas ácidas não afetaram a homogeneidade ou estabilidade das mesmas.

TABELA 4.4.4.4 - Digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão em diferentes soluções ácidas, valor médio \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Digestão em fluxo		Digestão em batelada
		A	B	C
Fígado bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	149 \pm 26	137 \pm 4	146 \pm 5
	Cu (mg kg ⁻¹)	264 \pm 8	259 \pm 8	253 \pm 8
	Fe (mg kg ⁻¹)	194 \pm 6	171 \pm 5	163 \pm 5
	Mg (mg kg ⁻¹)	574 \pm 17	579 \pm 17	545 \pm 16
	Mn (mg kg ⁻¹)	7,5 \pm 0,2	7 \pm 1	7,1 \pm 0,2
	P (%)	1,18 \pm 0,04	1,18 \pm 0,04	1,25 \pm 0,04
	S (%)	0,71 \pm 0,02	0,73 \pm 0,02	0,70 \pm 0,02
	Zn (mg kg ⁻¹)	113 \pm 3	113 \pm 3	109 \pm 3
Músculo bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	115 \pm 28	124 \pm 19	131 \pm 7
	Fe (mg kg ⁻¹)	55 \pm 2	60 \pm 2	60 \pm 2
	Mg (mg kg ⁻¹)	865 \pm 26	859 \pm 26	824 \pm 25
	P (%)	0,73 \pm 0,02	0,72 \pm 0,02	0,77 \pm 0,02
	S (%)	0,73 \pm 0,02	0,74 \pm 0,02	0,75 \pm 0,02
	Zn (mg kg ⁻¹)	149 \pm 4	145 \pm 4	141 \pm 4
Camarão	Al (mg kg ⁻¹)	24 \pm 1	33 \pm 3	39 \pm 1
	Ca (%)	0,42 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,38 \pm 0,01
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	7 \pm 2	5,7 \pm 0,2
	Fe (mg kg ⁻¹)	47 \pm 1	30 \pm 1	31 \pm 1
	Mg (mg kg ⁻¹)	2024 \pm 61	2042 \pm 61	1923 \pm 58
	Mn (mg kg ⁻¹)	7,5 \pm 0,2	7,5 \pm 0,2	7,7 \pm 0,2
	P (%)	1,39 \pm 0,04	1,40 \pm 0,04	1,44 \pm 0,04
	S (%)	1,09 \pm 0,03	1,12 \pm 0,03	1,09 \pm 0,03
	Sr (mg kg ⁻¹)	60 \pm 0,2	63 \pm 3	57 \pm 2
	Zn (mg kg ⁻¹)	49 \pm 1	51 \pm 2	48 \pm 1

ND: não determinado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹, C: HNO₃ 10,0 mol L⁻¹ e HCl 1,6 mol L⁻¹.

TABELA 4.4.4.5 - Digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas, valor médio \pm incerteza, $n = 5$ e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Digestão no sistema em fluxo			Digestão em batelada
		A	B	C	D
Folhas de espinafre	Al (mg kg ⁻¹)	53 \pm 5	34 \pm 5	53 \pm 5	41 \pm 3
	Ba (mg kg ⁻¹)	2,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	5,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
	Ca (%)	1,66 \pm 0,05	1,73 \pm 0,05	1,73 \pm 0,05	1,6 \pm 0,1
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	6 \pm 2	7 \pm 2	7,6 \pm 0,2
	Fe (mg kg ⁻¹)	100 \pm 3	101 \pm 3	95 \pm 3	92 \pm 7
	Mg (%)	1,49 \pm 0,04	1,51 \pm 0,04	1,53 \pm 0,05	1,2 \pm 0,1
	Mn (mg kg ⁻¹)	136 \pm 4	135 \pm 4	134 \pm 4	129 \pm 4
	P (%)	0,55 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,55 \pm 0,03
	S (%)	0,46 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03	0,52 \pm 0,02
	Sr (mg kg ⁻¹)	112 \pm 3	108 \pm 3	109 \pm 3	105 \pm 3
	Zn (mg kg ⁻¹)	49 \pm 3	47 \pm 3	48 \pm 4	51 \pm 2
Folhas de Tomateiro	Al (mg kg ⁻¹)	88 \pm 7	71 \pm 7	79 \pm 8	98 \pm 3
	Ba (mg kg ⁻¹)	79 \pm 2	77 \pm 2	81 \pm 2	72 \pm 2
	Ca (%)	3,8 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1	3,8 \pm 0,3
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	10 \pm 2	12,3 \pm 0,4	11,7 \pm 0,4
	Fe (mg kg ⁻¹)	205 \pm 6	211 \pm 6	196 \pm 6	206 \pm 13
	Mg (%)	0,49 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	0,50 \pm 0,02	0,45 \pm 0,03
	Mn (mg kg ⁻¹)	73 \pm 2	75 \pm 2	75 \pm 2	70 \pm 2
	P (%)	0,29 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
	S (%)	1,00 \pm 0,07	1,03 \pm 0,08	1,00 \pm 0,08	0,97 \pm 0,03
	Sr (mg kg ⁻¹)	188 \pm 6	180 \pm 5	185 \pm 6	173 \pm 7
	Zn (mg kg ⁻¹)	16 \pm 1	15 \pm 1	16 \pm 1	16,9 \pm 0,5
Folhas de Laranjeira	Al (mg kg ⁻¹)	29 \pm 4	22 \pm 8	30 \pm 3	27,6 \pm 0,8
	Ba (mg kg ⁻¹)	26 \pm 1	26 \pm 2	25 \pm 2	23,4 \pm 0,7
	Ca (%)	1,75 \pm 0,05	1,9 \pm 0,1	1,83 \pm 0,05	1,77 \pm 0,08
	Fe (mg kg ⁻¹)	70 \pm 5	80 \pm 5	62 \pm 2	67, \pm 2
	Mg (%)	0,30 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
	Mn (mg kg ⁻¹)	15,0 \pm 0,4	17 \pm 1	15,0 \pm 0,5	15,3 \pm 0,5
	P (%)	0,19 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01
	S (%)	0,21 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
	Sr (mg kg ⁻¹)	60 \pm 2	63 \pm 3	60 \pm 2	58, \pm 2
Zn (mg kg ⁻¹)	14 \pm 1	13 \pm 2	15 \pm 2	15 \pm 1	

ND: não determinado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HF 0,4 mol L⁻¹, C: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹, D: HNO₃ 10,0 mol L⁻¹, HCl 1,6 mol L⁻¹ e HF 1,0 mol L⁻¹.

O teste *F* foi utilizado para comparar a precisão da digestão efetuada no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas e efetuada em forno de micro-ondas com cavidade e frascos fechados (batelada). De acordo com o teste *F*, para as amostras de tecido animal (TABELA 4.4.4.6) não houve diferenças significativas entre a precisão para a maioria dos elementos analisados em fluxo e em

batelada, com exceção para Ca em músculo bovino em ambas as soluções ácidas, Ca e Mn em fígado bovino usando HNO₃ e HNO₃ com HCl e Cu em camarão.

TABELA 4.4.4.6 - Comparação da precisão da digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão usando diferentes soluções ácidas aplicando-se teste *F*, n = 5 e P = 95%.

Amostra	Elemento	<i>F_{cal}</i>	
		A	B
Fígado bovino	Ca	24,83	1,66
	Cu	1,09	1,04
	Fe	1,43	1,11
	Mg	1,11	1,13
	Mn	1,12	44,18
	P	1,12	1,11
	S	1,04	1,09
	Zn	1,07	1,08
Músculo bovino	Ca	15,55	7,23
	Fe	0,85	1,02
	Mg	1,10	1,09
	P	1,11	1,15
	S	1,07	1,03
	Zn	1,12	1,07
Camarão	Al	1,01	4,99
	Ca	1,19	1,87
	Cu	ND	156,12
	Fe	2,06	1,21
	Mg	1,11	1,13
	Mn	0,95	0,96
	P	1,07	1,05
	S	1,00	1,06
	Sr	1,09	3,39
	Zn	1,04	1,54

ND: não determinado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹, *F_{crí}*: 6,63.

O mesmo foi observado para as amostras de tecido vegetal (TABELA 4.4.4.7) com algumas exceções como Zn, Al e S em folhas de tomateiro, de laranja e em ambas as amostras, respectivamente, em todas as soluções ácidas avaliadas. Além disso, houve diferenças significativas entre a precisão para Mg na amostra de folhas de espinafre digeridas com HNO₃ e HNO₃ + HF, para Cu na mesma amostra quando utilizado HNO₃ + HF ou HCl, para Cu e Al nas amostras de folhas de tomateiro digeridas com HNO₃ + HF e HCl, respectivamente, e para Ba na amostra de folhas de laranja quando utilizado HNO₃ + HCl.

TABELA 4.4.4.7 - Comparação da precisão da digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas aplicando-se teste *F*, *n* = 5 e intervalo de confiança de 95 %.

Amostra	Elemento	<i>F_{cal}</i>		
		A	B	C
Folhas de espinafre	Al	3,51	3,48	3,79
	Ba	1,68	1,68	2,38
	Ca	4,53	4,21	4,21
	Cu	-	44,24	54,91
	Fe	5,00	4,88	5,46
	Mg	8,69	8,59	8,28
	Mn	1,07	0,91	0,90
	P	2,74	2,71	2,80
	S	2,93	2,49	2,32
	Sr	1,14	1,06	1,08
	Zn	3,30	3,00	5,77
Folhas de tomateiro	Al	5,37	6,29	6,93
	Ba	1,18	1,14	1,25
	Ca	5,88	5,32	5,18
	Cu	-	27,18	1,09
	Fe	4,34	4,11	4,75
	Mg	4,84	4,91	3,54
	Mn	1,09	1,14	1,13
	P	1,01	1,01	1,05
	S	6,18	6,72	7,75
	Sr	1,45	1,58	1,50
	Zn	7,71	6,88	6,77
Folhas de laranjeira	Al	21,55	102,93	12,48
	Ba	4,45	4,63	9,28
	Ca	2,04	0,93	1,88
	Fe	5,17	5,77	1,19
	Mg	1,12	2,45	1,10
	Mn	1,04	3,93	1,03
	P	3,02	2,25	1,06
	S	1,02	9,78	10,30
	Sr	1,07	2,67	1,07
	Zn	1,50	1,33	2,72

ND: não determinado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HF 0,6 mol L⁻¹ e C: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹, *F_{crit}*: 6,63.

A comparação entre as concentrações elementares obtidas nos dois modos de análise foi feita aplicando-se o teste *t* pareado (TABELA 4.4.4.8). Houve diferenças significativas para a maioria dos teores determinados pelos dois métodos quando as digestões foram realizadas utilizando somente HNO₃. Não foram observadas diferenças significativas somente para Ca e Cu em fígado bovino, Ca e S em músculo bovino e Mn, P, S e Zn em camarão. Os resultados apresentaram melhor concordância com os teores determinados em batelada quando foi utilizada a mistura

ácida contendo HNO₃ + HCl. Nesse caso, não houve diferenças significativas entre os dois métodos para Cu, Mn e Zn em fígado bovino, Ca, Fe, Mn, S e Zn para músculo bovino e Cu, Fe, Mn, P e S em camarão. Essa melhor concordância, pode ser devido ao fato de ter sido aplicado a mesma mistura ácida nos dois métodos comparados, ou seja, a combinação de HNO₃ e HCl. Além disso, o ácido clorídrico aumenta a eficiência de digestão da ácido nítrico, como demonstrado nos estudos com de decomposição da fenilalanina em diferentes misturas ácidas, sendo que as melhores eficiências de digestão obtidas para todas as amostras foram alcançadas nessa mistura ácida.

TABELA 4.4.4.8 - Comparação dos teores determinados por digestão em fluxo e em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão em diferentes soluções ácidas aplicando-se o teste *t*, n = 5 e P = 95 %.

Amostra	Elemento	A		B	
		<i>t_{cal}</i>	<i>t_{crí}</i>	<i>t_{cal}</i>	<i>t_{crí}</i>
Fígado bovino	Ca	0,27	2,31	3,03	2,57
	Cu	2,17	2,31	1,15	2,31
	Fe	9,33	2,31	2,64	2,31
	Mg	2,73	2,31	3,18	2,31
	Mn	3,01	2,31	0,88	2,57
	P	2,94	2,31	2,75	2,31
	S	1,06	2,31	2,31	2,31
	Zn	1,71	2,31	2,01	2,31
Músculo bovino	Ca	1,16	2,78	0,75	2,78
	Fe	4,15	2,31	0,48	2,31
	Mg	2,56	2,31	2,20	2,31
	P	2,69	2,31	3,67	2,31
	S	1,73	2,31	0,86	2,31
	Zn	2,99	2,31	1,71	2,31
Camarão	Al	20,63	2,31	5,45	2,31
	Ca	4,61	2,31	5,01	2,31
	Cu	NC	2,31	0,79	2,31
	Fe	21,73	2,31	1,32	2,31
	Mg	2,71	2,31	3,19	2,31
	Mn	1,22	2,31	1,06	2,31
	P	1,82	2,31	1,33	2,31
	S	0,04	2,31	1,57	2,31
	Sr	2,32	2,31	3,90	2,31
Zn	1,22	2,31	3,36	2,31	

NC: não calculado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹.

De acordo com teste *t* pareado foram observadas diferenças significativas entre os dois métodos para a maioria dos elementos determinados nas amostras de folhas de espinafre digeridas com HNO₃ ou HNO₃ + HF e para folhas de laranja digeridas com HNO₃ + HF. Nesses casos somente não houve diferenças significativas para Ca, P e Zn em folhas de espinafre digeridas com HNO₃ e Ca, Cu, Mn, P e Sr em folhas de espinafre e Al, P, S e Zn em folhas de laranja digeridas com HNO₃ + HF. Nos demais casos há uma boa concordância para a maioria dos teores determinados pelos dois métodos. Não houve diferenças significativas para Ca, Fe, P, S e Zn determinados em folhas de tomateiro em todas as misturas ácidas avaliadas, além de Mn nos digeridos em HNO₃ e Cu nos digeridos em HNO₃ + HF e HNO₃ + Cl. Os melhores resultados foram obtidos para as amostras de folhas de espinafre e laranja digeridas com HNO₃ + HCl (TABELA 4.4.4.9). Observa-se boa concordância entre os dois métodos para Ca, Cu, Fe, Mn, P, Sr e Zn em folhas de espinafre e Al, Ba, Ca, Mn, P, S, Sr e Zn em folhas de laranja. Isso também pode ser justificado por ter sido utilizada a mesma mistura ácida nas digestões em fluxo e em batelada. Ademais, o uso do ácido clorídrico potencializa a capacidade oxidativa do ácido nítrico, o que contribui para obtenção de menores teores de ROC, que podem interferir na determinações de macro e micronutrientes por ICP OES¹⁷.

TABELA 4.4.4.9 - Comparação dos teores determinados por digestão em fluxo e em batelada para folhas de espinafre, folhas de tomateiro e folhas de laranjeira usando diferentes soluções ácidas aplicando-se o teste t , $n = 5$ e intervalo de confiança de 95 %.

Amostra	Elemento	A		B		C	
		t_{cal}	$t_{crí}$	t_{cal}	$t_{crí}$	t_{cal}	$t_{crí}$
Folhas de espinafre	Al	4,73	2,31	3,00	2,31	4,61	2,31
	Ba	13,58	2,31	13,60	2,31	22,53	2,31
	Ca	0,51	2,31	1,75	2,31	1,77	2,31
	Cu	NC	2,31	1,76	2,78	0,12	2,78
	Fe	2,60	2,31	2,98	2,31	1,23	2,31
	Mg	4,06	2,57	4,28	2,57	4,64	2,57
	Mn	2,64	2,31	1,96	2,31	1,71	2,31
	P	0,01	2,31	0,22	2,31	0,47	2,31
	S	3,51	2,31	2,40	2,31	3,35	2,31
	Sr	3,36	2,31	1,55	2,31	2,06	2,31
	Zn	1,72	2,31	3,53	2,31	1,92	2,31
	Folhas de tomateiro	Al	3,25	2,31	8,19	2,31	5,04
Ba		4,42	2,31	3,51	2,31	5,86	2,31
Ca		0,01	2,31	1,57	2,31	1,97	2,31
Cu		NC	2,31	1,75	2,78	2,26	2,31
Fe		0,17	2,31	0,77	2,31	1,68	2,31
Mg		2,90	2,31	2,68	2,31	3,52	2,31
Mn		2,21	2,31	3,40	2,31	3,23	2,31
P		0,26	2,31	0,17	2,31	1,29	2,31
S		1,17	2,31	1,72	2,57	0,75	2,57
Sr		3,76	2,31	1,79	2,31	3,03	2,31
Zn		1,50	2,78	3,07	2,78	1,88	2,78
Folhas de laranjeira		Al	0,93	2,78	1,55	2,78	1,88
	Ba	3,66	2,31	3,97	2,31	2,02	2,31
	Ca	0,40	2,31	3,51	2,31	1,48	2,31
	Fe	1,44	2,31	6,11	2,31	4,52	2,31
	Mg	2,82	2,31	4,23	2,31	2,45	2,31
	Mn	0,97	2,31	4,56	2,31	0,83	2,31
	P	1,16	2,31	0,92	2,31	1,54	2,31
	S	2,61	2,31	1,05	2,57	1,64	2,57
	Sr	1,77	2,31	3,08	2,31	1,68	2,31
	Zn	0,43	2,31	1,37	2,31	0,20	2,31

NC: não calculado, A: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HF 0,6 mol L⁻¹ e C: HNO₃ 6,0 mol L⁻¹ e HCl 0,4 mol L⁻¹.

Um teste t pareado para múltiplos analitos também foi realizado para comparar as misturas ácidas usadas na digestão das amostras de tecido vegetal e animal, os resultados são apresentados na TABELA 4.4.4.10. De acordo com o teste, os melhores resultados foram obtidos com a mistura de HNO₃ e HCl para as amostras de tecido animal. O t calculado para essa mistura foi 1,55, enquanto que para somente HNO₃ foi 1,85, sendo ambas menores que o t crítico (2,07). Para as amostras de tecido vegetal a melhor mistura ácida estudada foi HNO₃ e HF de acordo com teste t pareado

para múltiplos analitos. Os valores de t calculados foram 0,24; 0,59 e 1,99 para as soluções ácidas de $\text{HNO}_3 + \text{HF}$, $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ e HNO_3 , sendo todas menores que o t crítico (2,04).

TABELA 4.4.4.10 - Comparação das soluções ácidas aplicadas na digestão das amostras de tecidos animal e vegetal aplicando-se o teste t pareado para múltiplos analitos e $P = 95\%$.

Tipo de amostra	Conjunto avaliado	t_{cal}			$t_{\text{crí}}$
		A	B	C	
Tecido Animal	Global	1,85	-	1,55	2,07
	Fígado bovino	2,10	-	1,18	2,36
	Músculo bovino	0,62	-	0,90	2,57
	Camarão	1,02	-	1,02	2,26
Tecido Vegetal	Global	1,99	0,24	0,59	2,04
	Folhas de espinafre	1,97	0,19	1,70	2,23
	Folhas de tomeiro	0,59	0,30	0,17	2,23
	Folhas de laranja	1,95	0,96	0,003	2,26

NC: não calculado, A: HNO_3 6,0 mol L^{-1} , B: HNO_3 6,0 mol L^{-1} e HF 0,6 mol L^{-1} e C: HNO_3 6,0 mol L^{-1} e HCl 0,4 mol L^{-1} .

4.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS

O sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas se mostrou eficiente para a digestão de glicose e glicina, quando comparado com os trabalhos anteriores e isso se deve ao uso de um reator com maior volume e, portanto, um maior tempo de residência para promoção da reação. Isso também possibilitou trabalhar sob maiores vazões, do que as utilizadas anteriormente, assim aumentando a frequência analítica do método. O sistema de digestão em fluxo é aplicável para digerir amostras sólidas, sendo que não houve entupimento do sistema mesmo quando foram introduzidas amostras fibrosas. O sistema desenvolvido apresentou bons resultados, quando comparados aos valores das amostras de CRMs e aqueles obtidos por digestão em batelada. Além disso, foram obtidos brancos com baixas concentrações de potenciais contaminantes oriundos das partes metálicas constituintes do sistema, podendo-se inferir que não ocorreu severo desgaste de componentes metálicos e contaminação das amostras durante as digestões, mesmo quando utilizados ácidos altamente corrosivos (HCl e HF). O sistema se mostrou estável, hábil a operar por longos períodos sem problemas técnicos e de forma automatizada.

Capítulo 5

Avaliação de um sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas sob altas pressão e temperatura com reator de grande volume no preparo de amostras de sucos de frutas e leite

5.1 - INTRODUÇÃO

O leite é um importante alimento na dieta humana, atuando como fonte de gorduras, proteínas, carboidratos, minerais e outros elementos essenciais para promover o crescimento e a manutenção da vida humana, especialmente para crianças e idosos. Os macronutrientes presentes no leite são Ca, Mg, P e S, enquanto Fe e Zn são constituintes minoritários⁹⁵⁻⁹⁷. Sucos de frutas também são incluídos na dieta humana como boa fonte de nutrientes como carboidratos, proteínas, vitaminas, compostos antioxidantes e minerais. Os principais nutrientes presentes nesse alimento são Ca, K, P e Na como macronutrientes e Fe, Mg, Mn e Mo como micronutrientes^{98,99}. Nos últimos anos o consumo desses dois produtos têm crescido devido às propriedades nutricionais, o que torna importante o controle de qualidade desses alimentos^{95,99}.

Na literatura podem ser encontrados métodos que propõem a análise direta dessas amostras para determinação de macro e micronutrientes por técnicas espectrométricas. Entretanto, as quantificações devem ser cuidadosamente realizadas para evitar o entupimento do sistema de nebulização durante a análise e, conseqüentemente, etapas de limpeza do sistema de nebulização, bem como a filtração e/ou centrifugação das amostras podem ser requeridas^{50,100-104}. Além disso, os efeitos de matriz devem ser considerados quando uma grande quantidade de compostos de carbono é introduzida no plasma de argônio. WILTSCHE et al.¹⁷ reportaram que o efeito de matriz causado pelo carbono é um fenômeno multifatorial que é fortemente dependente do instrumento utilizado e das condições aplicadas durante as medidas.

Devido a esses inconvenientes, o preparo de amostra é usualmente requerido para determinação de macro e micronutrientes nessas amostras. A digestão ácida é o método de preparo de amostra mais aplicado em amostras alimentícias tanto em blocos digestores quanto em fornos micro-ondas, porém esses são normalmente realizados em batelada que pode levar a erros analíticos, tais como perdas de analitos ou contaminação das amostras^{35,95,103,105}. Sistemas de digestão em fluxo são alternativas atrativas para diminuir a manipulação da amostra pelo analista, o que evita contaminação e perdas de analitos uma vez que a introdução da amostra, a coleta e a diluição dos digeridos pode ser automatizada. Entretanto, essas amostras não são amostras facilmente digeridas nesses sistemas. As amostras de sucos de frutas são ricas em glicose, que é um composto altamente reativo levando a um

aumento rápido da pressão dentro do reator, e conseqüentemente, aumentando o risco de explosões no sistema. Em contrapartida, amostras de leite são ricas em gorduras que requerem altas temperaturas e condições drásticas para serem decompostas^{34,38,48}. Portanto, é necessário o uso de sistemas de digestão em fluxo robustos e estáveis que possam ser operados sob altas temperaturas e pressões para promover uma digestão rápida e eficiente.

A literatura atualmente reporta poucos trabalhos que utilizam sistemas de digestão em fluxo operados sob altas temperaturas e pressões em fluxo contínuo para o preparo de amostras líquidas complexas. No sistema proposto por PICHLER et al.³⁴ foi possível realizar digestões eficientes de materiais de referência certificado, entretanto a única amostra líquida investigada nesse sistema foi a digestão de suco de laranja para avaliar a perda de Hg durante o procedimento. Já no sistema desenvolvido por WILTSCHE et al.³⁸, além de boa eficiência no preparo de diversos materiais de referência certificado e leite em pó, o sistema se mostrou hábil na digestão de amostras de sucos de maçã e de laranja. Entretanto, as eficiências de digestão alcançadas no sistema avaliado por WILTSCHE et al.³⁸ foram menores que aquelas alcançadas por PICHLER et al.³⁴, devido ao baixo volume do reator utilizado.

No capítulo anterior (Capítulo 4, tópico 4.4.2 - Otimização dos parâmetros de digestão, pag. 57) demonstrou-se como foi possível aumentar a eficiência de digestão no sistema desenvolvido por PICHLER et al.³⁴ aumentando-se o volume do reator de 6,0 para 13,5 mL e, conseqüentemente, o tempo de residência da amostra na zona irradiada. As eficiências de digestão alcançadas com o novo reator foram similares às alcançadas por PICHLER et al.³⁴. Esse sistema foi utilizado no preparo de amostras sólidas em forma de suspensão, entretanto estudos adicionais foram necessários para avaliar o desempenho desse sistema no preparo de amostras líquidas de difícil digestão como sucos de frutas e leites. Vale ressaltar, que apesar das aplicações mencionadas anteriormente para sucos de frutas, não há nenhuma aplicação para digestão de leite fresco em sistemas de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operados sob altas temperatura e pressão. Foram relatados somente algumas aplicações em sistemas de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operados à pressão atmosférica e com uso de parada do fluxo durante a digestão^{106,107}.

5.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este capítulo da tese tem os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Avaliar métodos de preparo de emulsão de leite em meio ácido visando possibilitar a manipulação e digestão dessa amostra no sistema de digestão em fluxo;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do sistema descrito no Capítulo 4 (tópico 4.3.4 - Sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas, pag. 46) para o preparo de amostras líquidas de sucos de frutas e leite para a determinação de macro e micronutrientes por ICP OES;
- ✓ Determinar a eficiência de digestão de amostras líquidas e avaliar a precisão e exatidão do método otimizado comparando-se os teores determinados em fluxo com os teores obtidos por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (Capítulo 3, 3.4.2 - Caracterização das amostras líquidas, página 36);
- ✓ Avaliar procedimentos de análise direta de sucos de frutas e leite propostos na literatura e compará-los com a digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas e a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados.

5.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 - Equipamentos

Os analitos e o ROC foram quantificados em um ICP OES com Visão axial (Ciros Vison EOP, Spectro, Alemanha) nas condições descritas anteriormente no Capítulo 4 (tópico 4.3.1 - Equipamentos e aparatos, pag. 44). As seguintes linhas de emissão (nm) foram monitoradas para a quantificação dos analitos: Al 167,078(II), B 249,773(I), Ba 455,404(II), C 193,091(I), Ca 317,933(II), Cu 324,754(I), Fe 238,204(II), K 766,491(I), Mg 280,270(II), Mn 257,611(II), Na 589,592(I), P 177,495(I), S 180,731(I), Sc 424,683(II), Sr 407,771(II) e Zn 213,856(I), sendo que (I) e (II) representam linhas atômicas e iônicas, respectivamente. O ROC e a acidez residual foram determinadas nas mesmas condições descritas no Capítulo 4 (tópico 4.3.1 - Equipamentos e aparatos, pag. 44). Um banho ultrassônico e um agitador tipo vórtex foram utilizados no preparo das emulsões de leite antes da digestão no sistema em fluxo assistido por radiação micro-ondas sob altas temperatura e pressão ou análise direta por ICP OES, respectivamente.

5.3.2 - Reagentes e amostras

As soluções e suspensões foram preparadas com ácidos HNO₃ destilado abaixo do ponto de ebulição, HCl e H₂O₂ de alta pureza (Suprapur, Merck, Alemanha) e água desionizada (18 MΩ cm⁻¹, Barnstead Nanopure, Thermo Fisher Scientific, EUA). As curvas de calibração foram preparadas a partir de uma solução padrão estoque contendo 100 mg L⁻¹ de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn (Roth, Alemanha) em HNO₃ 3% (V V⁻¹) e soluções padrão de enxofre e fósforo (SCP Science, Canada) de 1000 mg L⁻¹. Para as determinações de ROC foram utilizadas soluções padrão de calibração preparadas a partir da dissolução de monohidrogenoftalato de potássio (PA, Merck, Alemanha). As amostras líquidas analisadas foram suco de maçã (100% Apfel, SPAR, Áustria), suco de manga (Happy day, RAUCH, Áustria), leite semidesnatado (0,9% de gordura, Österreichische Bio-Bergbauern-Leichtmilch, Naturapur SPAR, Áustria) e leite integral (3,5% de gordura, Vollmich, Jeden Tag, Áustria), sendo as amostras obtidas no mercado local de Graz na Áustria. Essas amostras não passaram por nenhum preparo prévio e foram armazenadas em tubos de PE de 50 mL a -18 °C em um freezer para conservação. Previamente à digestão em fluxo um tubo de cada amostra foi descongelado a 4 °C em uma geladeira durante a noite.

5.3.3 - Sistema em fluxo

O sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas temperatura e pressão com reator de grande volume (13,5 mL) aplicado na digestão das amostras de sucos de frutas e leite está descrito detalhadamente no Capítulo 4 (tópico 4.3.4 - Sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas, pag. 46). As condições utilizadas na digestão em fluxo foram as mesmas condições ótimas aplicadas na digestão de amostra sólidas, ou seja, vazão da solução carregadora de 5,0 mL min⁻¹ e potência aplicada de radiação micro-ondas de 500 W. A determinação da concentração de macro e micronutrientes nos digeridos, bem como a concentração de ROC foi efetuada off-line por ICP OES.

5.3.4 - Preparo das amostras

Amostras de sucos de frutas foram diluídas a 67% V V⁻¹ em diferentes meios ácidos, sendo esses: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹, HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + HCl 0,3 mol L⁻¹ e HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹. Posteriormente, 2,4 mL dessa dispersão foi introduzida

no sistema de digestão em fluxo empacotados entre duas frações de 1,8 mL de HNO_3 3,7 mol L^{-1} . Essa etapa foi realizada para evitar a diluição da amostra na solução carregadora (HNO_3 0,2 mol L^{-1}) por efeito de dispersão. O digerido coletado foi diluído em água desionizada a um Volume final de 40 mL, sendo que o fator de diluição final da amostra foi de 25 vezes. A análise direta dos sucos de frutas foi baseada no método proposto por CINDRIĆ et al.¹⁰⁴. De acordo com o procedimento, um Volume de 500 μL (ca. 500 mg) do suco de fruta foi diluído em 10 mL de HNO_3 2% V V^{-1} , sendo o fator de diluição final da amostra de 20 vezes. Escândio foi utilizado como padrão interno tanto na digestão quanto na análise direta, sendo que todas as soluções foram analisadas por ICP OES. O Sc foi utilizado como padrão interno para corrigir erros analíticos, que poderiam ser oriundos da introdução de volumes errados de amostra no sistema ou pela perda de amostra durante a digestão.

Diferentemente das amostras de sucos de frutas que são facilmente diluídas em meio ácido, as amostras de leite tendem a coagular nesse meio. Sendo assim foi necessário avaliar um método de preparo de emulsão estável que fosse possível introduzi-la no sistema de digestão em fluxo. Com isso, foi avaliado o efeito de estabilizantes químicos, sonicação e aquecimento no preparo das emulsões de leite em meio ácido. Nesse contexto, foram adicionados 0,8 mL de leite integral e 2,0 mL de HNO_3 em quatro tubos distintos de PE de 15 mL. No primeiro tubo não foi adicionado nenhuma substância como estabilizante químico, enquanto que no segundo, terceiro e quarto tubos foram adicionados 50 μL de EDTA 0,2 mol L^{-1} , 50 μL de Triton X-100 10% m V^{-1} e 50 μL de EDTA 0,2 mol L^{-1} + 50 μL de Triton X-100 10% m V^{-1} , respectivamente. Em seguida, as soluções foram avolumadas a 4 mL com água desionizada para que a concentração final fosse de 20% V V^{-1} de amostra. Todas as emulsões foram agitadas manualmente, entretanto essas não se mantiveram estáveis por mais que 4 min. Assim, todas as emulsões foram em seguida sonicadas por 1 min em um banho de ultrassom buscando gerar emulsões estáveis, que se mantiveram estáveis por um período de 40 min. Em seguida, essas emulsões foram aquecidas por 20 min a 60 °C em uma estufa visando avaliar o efeito da temperatura na estabilização das emulsões.

Após o estabelecimento da condição ótima para o preparo da emulsão em meio ácido, foi avaliado o efeito da solução de Sc na estabilidade das emulsões. Uma vez que a adição de Sc à emulsão em meio ácido causou separação de fases, uma segunda alternativa foi avaliada para viabilizar o uso de padrão interno durante a

digestão das amostras. Como a adição concomitante de água desionizada e o padrão interno promovem a desestabilização da emulsão devido ao efeito salting-out, uma vez que a concentração inicial de Sc nessa emulsão era 12 mg L^{-1} . Na segunda estratégia foi avaliada a diluição da emulsão somente com ácido nítrico concentrado. Nesse caso, a solução padrão de Sc 1000 mg L^{-1} foi adicionada em 1 mL de leite integral que foi diluído com ácido nítrico concentrado a um Volume final de 4 mL para que as concentrações finais da amostra e do padrão interno fossem $25\% \text{ V V}^{-1}$ e 10 mg L^{-1} , respectivamente. Essa mistura foi sonicada por 1 min em um banho de ultrassom, sendo a emulsão obtida estável como a preparada anteriormente sem padrão interno.

Esses dois procedimentos otimizados foram aplicados no preparo de emulsões de leite para serem digeridas no sistema em fluxo. Assim, as emulsões de leite foram preparadas nas concentrações de 20% e $25\% \text{ V V}^{-1}$ de amostra em HNO_3 $7,0$ e $10,5 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Após adição do ácido nítrico à amostra, essa mistura foi sonicada por 1 min em um banho de ultrassom para estabilização da emulsão. Dessa mistura foi introduzida no sistema de digestão em fluxo uma fração de 3 mL de amostra entre duas frações de 1 mL de HNO_3 com a mesma concentração ácida das amostras, ou seja, $7,0$ ou $10,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os digeridos coletados foram diluídos em água desionizada a um Volume final de 36 e 30 mL, gerando emulsões com 20 e $25\% \text{ V V}^{-1}$ de leite, respectivamente, sendo que os fatores de diluições finais das amostras foram de 60 e 40 vezes, respectivamente.

A análise direta de leite foi baseada no método proposto por MCKINSTRY et al.¹⁰⁰. Baseado nesse procedimento, $250 \mu\text{L}$ (ca. 250 mg) de leite foram diluídos em 6 mL de água desionizada aquecida a ca. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e misturada usando um agitador tipo vórtex. Posteriormente, a mistura foi deixada em repouso até a emulsão atingir a temperatura ambiente, sendo então adicionados $100 \mu\text{L}$ de Triton X-100 $10\% \text{ m V}^{-1}$ e a mistura foi avolumada com água desionizada a 10 mL. O fator de diluição final dessas emulsões foi de 40 vezes. Durante a determinação direta de leite em ICP OES, o sistema de nebulização foi limpo aspirando-se solução de Triton X-100 $1\% \text{ m V}^{-1}$ entre as amostras para evitar acúmulo de material no nebulizador e câmara de nebulização. Os analitos foram determinados em todas essas soluções por ICP OES, sendo que escândio foi adicionado como padrão interno em todas as soluções.

5.3.5 - Avaliação do sistema em fluxo

A eficiência de digestão do sistema de digestão em fluxo foi avaliada determinando-se o teor de ROC e a acidez residual das amostras. Os LODs determinados nos brancos dos digeridos no sistema em fluxo foram comparados com os LODs da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, que são apresentados no Capítulo 3 (tópico 3.4.2 - Caracterização das amostras líquidas, pg. 36). Ademais, foram comparadas as características de ambos os procedimentos no preparo das amostras líquidas de sucos de frutas e leite. A exatidão e precisão foram estimadas pela comparação dos teores determinados nos digeridos obtidos na digestão em fluxo com os valores determinados em batelada, sendo esses valores estatisticamente comparados usando-se os testes *F* e *t*.

5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 - Desempenho do sistema de digestão em fluxo

As condições utilizadas na digestão das amostras, tais como volume de amostra e reagentes introduzidos no sistema e volume do digerido coletado foram facilmente ajustadas, pois o sistema de digestão em fluxo é completamente controlado por um computador. A diluição das amostras de sucos de frutas e o preparo das emulsões das amostras de leite foram simples e rápidos, sendo essa etapa realizada durante o condicionamento do sistema ou durante a digestão de outras amostras. Ambas as amostras são extremamente reativas em todas as condições experimentais avaliadas, havendo uma grande formação de gases resultantes da decomposição das amostras (CO_x e NO_x), que pôde ser observado no sistema de separação gás-líquido. O sistema atingiu temperaturas superiores a 140 °C que pôde ser medida na parte externa no tubo de PFA, na porção anterior ao sistema de refrigeração, medindo-se assim a temperatura do digerido após a etapa de irradiação. Isso indica que a temperatura no reator helicoidal era maior do que a observada na saída do sistema em fluxo. Inicialmente houve alguns vazamentos no sistema de separação gás-líquido devido à alta temperatura dos digeridos que atingiam esse dispositivo. Entretanto, esse efeito não ocorreu durante a digestão das amostras sólidas, que apresentavam menor concentração de TOC. Esses vazamentos foram ocasionados pelo amolecimento do tubo de PFA, que se tornava maleável e deslizava da arruela de fixação do tubo na saída do sistema de separação gás-líquido. Esse problema foi solucionado pelo aumento da vazão da água no sistema de refrigeração e um melhor

ajuste do tubo de PFA e da arruela de fixação no sistema. Após tais modificações, o sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas temperaturas e pressões trabalhou com segurança por meses sem nenhum problema. A frequência analítica foi de 8 digestões por hora, incluindo o tempo necessário para a etapa de amostragem e coleta do digerido.

5.4.2 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo de amostras de sucos de frutas

As amostras de sucos de frutas são ricas em açúcares (glicose e frutose), que são facilmente digeridos, o que leva a reações agressivas com grande formação de gases e, conseqüentemente, na expulsão da amostra da zona irradiada do sistema. Além disso, as digestões foram realizadas com soluções concentradas de amostra (67% V V⁻¹) para viabilizar a determinação de micronutrientes, que estão com concentrações próximas aos LOD por ICP OES. As misturas ácidas avaliadas na digestão das amostras de suco de maçã e suco de manga foram HNO₃ 3,7 mol L⁻¹, HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + HCl 0,3 mol L⁻¹ e HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹ e as eficiências de digestão atingidas foram 78, 84 e 78%, respectivamente, para as amostras de suco de maçã e 59, 71 e 54% para as amostras de suco de manga (FIGURA 5.4.2.1). Melhores eficiências foram alcançadas na digestão do suco de maçã, que não apresenta grandes partículas suspensas. A melhor mistura ácida para ambas as amostras foi a combinação de HNO₃ e HCl. Um comportamento similar foi observado na digestão de fenilalanina e das amostras sólidas de tecido animal e vegetal neste mesmo sistema em fluxo (Capítulo 4, tópico 4.4.2 - Otimização dos parâmetros de digestão, pag. 57 e tópico 4.4.4 - A, pag. 61).

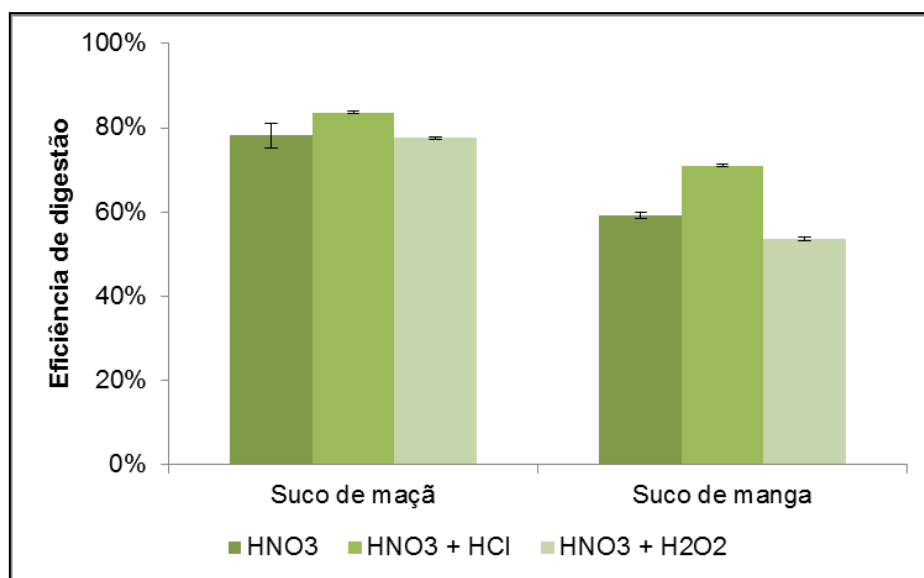


FIGURA 5.4.2.1 - Eficiência de digestão das amostras de suco de maçã e suco de manga em diferentes ácidos e/ou misturas ácidas, n = 5.

A acidez residual foi determinada para as amostras de suco de maçã e suco de manga digeridas com HNO₃ 3,7 mol L⁻¹, uma vez que esse foi o reagente presente em maior concentração e que, portanto, controla a acidez do meio. A acidez residual média nos digeridos de sucos de frutas foi 0,6 mol L⁻¹. Considerando-se que a acidez final é resultante do ácido adicionado às amostras, na solução carregadora e nas frações de soluções ácidas adicionadas na frente e na rabeira da alíquota da amostra, é importante avaliar a quantidade de ácido efetivamente consumido durante a digestão da amostra. Considerando somente a alíquota da amostra, 93 % do ácido presente foi consumido durante a digestão. Assim, pode-se inferir que é possível realizar quantificações online dos macros e micronutrientes presentes nas amostras para determinações por ICP OES, sem a prévia diluição dos digeridos devido à sua baixa acidez (ca. 0,3 mol L⁻¹). Apesar da possibilidade de realizar as determinações online de macro e micronutrientes nos digeridos de sucos de frutas, esse estudo não foi realizado devido à alta fração de gases dissolvidos no digerido, que poderiam interferir nas análises e pela baixa frequência analítica do sistema de digestão frente a amostragem do ICP OES, o que aumentaria o consumo de argônio durante as quantificações e com isso o custo da análise.

Os LODs foram determinados em 5 réplicas para cada uma das misturas ácidas avaliadas e calculadas pelo uso das equações descritas no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pag. 34). Na TABELA 5.4.2.1 são apresentados os LODs médios dessas misturas. Melhores LODs de detecção para Al,

B, Cu, K, P, S e Zn foram obtidos no sistema de digestão em fluxo, enquanto que os LODs de Ba, Ca, Mg, e Sr foram melhores na digestão em batelada. Os melhores LODs no sistema em fluxo estão relacionados com o uso de ácidos diluídos e baixa manipulação da amostra pelo analista, enquanto que os altos LODs podem estar relacionados com a contaminação da amostra com a composição do tubo de vidro do sistema de separação gás-líquido. O mesmo não foi observado na digestão das amostras sólidas, pois não houve acúmulo de digerido dentro de separador gás-líquido, assim o digerido entrou em contato somente com a base do dispositivo que é polimérica. A contaminação não foi oriunda do reator como demonstrado nas determinações dos brancos de procedimento por ICP-MS, que foram apresentados no Capítulo 4 (tópico 4.4.3 - Avaliação do desempenho do sistema, pag. 59).

TABELA 5.4.2.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras de sucos de frutas do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).

Elemento	Sistema em fluxo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Batelada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Al	7	13
B	8	29
Ba	7	1
Ca	213	26
Cu	6	14
Fe	2	3
K	50	151
Mg	24	8
Mn	0,4	0,4
Na	10	14
P	12	25
S	26	80
Sr	0,5	0,2
Zn	1	4

As características analíticas dos procedimentos de preparo de amostras de sucos de frutas no sistema de digestão em fluxo foram comparadas com aquelas da digestão em batelada (TABELA 5.4.2.2). As descrições dos cálculos da geração de resíduos e da frequência analíticas dos procedimentos estão no Capítulo 4 (tópico 4.4.4 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo das amostras de tecido animal e vegetal, pag. 61). Na digestão das amostras de suco em fluxo há uma grande redução no consumo de reagentes e, conseqüentemente, na geração de resíduos, o que está de acordo com as características dos sistemas por injeção em fluxo e os princípios da Química Analítica Verde. Isso se deve a dois motivos, o primeiro pela injeção de pequenos volumes de amostra e reagentes no sistema e o segundo pela digestão das amostras de sucos de frutas com ácidos diluídos. A redução no consumo de amostra foi pequena, uma vez que se utilizaram soluções concentradas da amostra em meio ácido a fim de garantir determinação quantitativa dos micronutrientes presentes em baixas concentrações. A frequência analítica do procedimento otimizado no sistema de digestão em fluxo é maior do que da digestão em batelada, mas vale ressaltar que algumas etapas da digestão em bateladas foram omitidas no cálculo da frequência analítica o que tornaria o método mais moroso e trabalhoso.

TABELA 5.4.2.2 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras líquidas de sucos de frutas.

Características	Digestão em fluxo	Digestão em batelada
Consumo de amostra (mL)	1,6	2
Consumo de HNO ₃ (mL)	0,6	5
Consumo de HCl (mL)	0,06	0,5
Consumo de H ₂ O ₂ (mL)	0,06	-
Resíduo de HNO ₃ (mL)	3,0	8,5
Resíduo de HCl (mL)	0,06	0,5
Frequência analítica (h ⁻¹)	8	5

Os teores de macro e micronutrientes determinados nos sucos de maçã e de manga são apresentados na TABELA 5.4.2.3. Em geral, os teores determinados pela digestão em fluxo estão em concordância com aqueles determinados pela digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. A mistura ácida aplicada na digestão influencia os valores obtidos, como observado na digestão das amostras sólidas (Capítulo 4, tópico 4.4.4 - A, pag. 61) nesse mesmo sistema ou na digestão de amostras sólidas e líquidas no sistema utilizado por WILTSCHE et al.³⁸.

TABELA 5.4.2.3 - Análise elementar de sucos de maçã e manga: comparação da digestão em fluxo e da digestão em batelada com diferentes misturas ácidas, média \pm incerteza, $n = 5$ e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento (mg L ⁻¹)	Digestão em fluxo			Digestão em batelada
		HNO ₃ ^a	HNO ₃ + HCl ^b	HNO ₃ + H ₂ O ₂ ^c	HNO ₃ + HCl ^d
Suco de maçã	Al	0,40 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	0,35 \pm 0,03	0,4 \pm 0,1
	B	1,6 \pm 0,1	1,74 \pm 0,06	1,57 \pm 0,05	1,86 \pm 0,06
	Ba	0,18 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
	Ca	115 \pm 4	123 \pm 4	116 \pm 4	123 \pm 4
	Fe	0,87 \pm 0,03	0,85 \pm 0,03	0,80 \pm 0,03	0,85 \pm 0,03
	K	744 \pm 26	797 \pm 27	619 \pm 21	670 \pm 20
	Mg	53 \pm 2	55 \pm 2	51 \pm 2	53 \pm 2
	Mn	0,38 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01
	Na	13,8 \pm 0,5	15,3 \pm 0,5	14,1 \pm 0,5	15,0 \pm 0,4
	P	63 \pm 2	68 \pm 2	60 \pm 2	63 \pm 2
	S	27 \pm 1	29 \pm 2	26 \pm 2	27 \pm 2
	Sr	0,79 \pm 0,04	0,83 \pm 0,03	0,75 \pm 0,03	0,79 \pm 0,02
	Zn	0,11 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
Suco de manga	Al	0,14 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,075 \pm 0,003	0,16 \pm 0,04
	Ba	0,7 \pm 0,1	0,18 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02
	Ca	107 \pm 4	90 \pm 3	92 \pm 3	92 \pm 3
	Cu	< LOD	0,1 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
	Fe	0,51 \pm 0,04	0,44 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,48 \pm 0,05
	K	352 \pm 12	325 \pm 11	347 \pm 12	325 \pm 10
	Mg	48 \pm 2	44 \pm 2	45 \pm 2	44 \pm 2
	Mn	0,36 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02
	Na	10,1 \pm 0,3	9,7 \pm 0,3	9,7 \pm 0,3	9,8 \pm 0,3
	P	39 \pm 1	37 \pm 1	37 \pm 1	37 \pm 1
	S	33 \pm 1	31 \pm 1	32 \pm 1	30 \pm 2
	Sr	0,63 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02
	Zn	0,26 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03

a: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹, b: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + HCl 0,3 mol L⁻¹, c: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹ e d: HNO₃ 9,3 mol L⁻¹ + HCl 0,8 mol L⁻¹.

As misturas ácidas foram avaliadas e comparadas usando-se testes estatísticos (teste *F* e teste *t*). Os resultados do teste *F* são apresentados na TABELA 5.4.2.4 e de acordo com os *F* calculados (*F*_{cal}) não há diferenças significativas entre as precisões alcançadas pela digestão em fluxo e em batelada para a maioria dos analitos avaliados, com exceção de Al nas duas amostras e em todas misturas ácidas aplicadas e Ba e Fe em suco de manga digerido com HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ e HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹, respectivamente.

TABELA 5.4.2.4 - Comparação da precisão da digestão em fluxo em diferentes soluções ácidas (A, B e C) e da precisão da análise direta (D) com a precisão digestão em batelada do suco de maçã e suco de manga aplicando-se o teste F , $n = 5$ e $P = 95\%$.

Amostra	Elemento	F_{cal}			
		A	B	C	D
Suco de maçã	Al	12,20	17,16	12,75	25,85
	B	3,21	1,13	0,72	1,60
	Ba	1,01	2,50	1,07	2,50
	Ca	1,15	1,32	1,18	4,56
	Fe	1,37	1,31	1,16	1,26
	K	1,63	1,87	1,13	1,08
	Mg	2,12	1,42	1,23	1,25
	Mn	1,28	1,31	1,33	1,38
	Na	1,13	1,39	1,17	1,40
	P	1,33	1,53	1,21	1,47
	S	2,50	1,58	1,39	5,71
	Sr	2,76	1,45	1,18	1,28
	Zn	2,55	3,94	5,34	5,01
Suco de Manga	Al	7,89	14,80	292,35	2,78
	Ba	76,69	2,51	1,75	14,59
	Ca	1,78	1,25	1,33	1,33
	Cu	ND	1,60	3,03	1,49
	Fe	1,75	4,08	9,09	10,35
	K	1,55	1,33	1,51	1,50
	Mg	1,02	1,22	1,15	1,15
	Mn	2,72	3,18	2,74	2,62
	Na	1,40	1,41	1,31	1,14
	P	1,45	1,34	1,31	1,44
	S	1,78	1,95	1,90	1,84
	Sr	1,54	1,39	1,36	1,46
	Zn	2,30	2,10	3,42	6,13

ND: não determinado, A: HNO_3 3,7 mol L^{-1} , B: HNO_3 3,7 mol L^{-1} + HCl 0,3 mol L^{-1} , C: HNO_3 3,7 mol L^{-1} + H_2O_2 0,3 mol L^{-1} e D: HNO_3 0,3 mol L^{-1} , F_{crit} : 6,63.

De acordo com o teste t pareado apresentados na TABELA 5.4.2.5 a maioria dos teores de macro e micronutrientes determinados nos sucos de maçã e manga nas diferentes misturas ácidas estão em concordância com aqueles determinados pela digestão em batelada. As exceções foram para suco de maçã e de manga digeridos com HNO_3 + HCl e HNO_3 , respectivamente. Nesses casos somente não houve diferenças significativas nas determinações de Al, Mg, P, S e Zn em suco de maçã e de Al, Fe, Mn, Na e Zn para suco de manga. Nos teores de macro e micronutrientes determinados em suco de manga somente não houve concordância com os teores de referência para as determinações de B, Ba, Ca, K e Na nas amostras digeridas com HNO_3 e de B, K e S nas amostras digeridas com HNO_3 + H_2O_2 . No suco de manga os teores de macro e micronutrientes que apresentaram diferenças significativas com

aqueles determinados em batelada foram somente para Al, Ba e Cu nos digeridos com HNO₃ + H₂O₂ e para Al e K nos digeridos com HNO₃ + HCl. O uso de HNO₃ é suficiente para garantir uma determinação exata de macro e micronutrientes em amostra de suco de maçã. Entretanto, a adição de HCl ou H₂O₂ foi essencial para obtenção de valores confiáveis quando foram determinados macro e micronutrientes em suco de manga.

TABELA 5.4.2.5 - Comparação da exatidão da digestão em fluxo em diferentes soluções ácidas (A, B e C) e da exatidão análise direta (D) com os teores de macro e micronutrientes determinado pela digestão em batelada do suco de maçã e suco de manga aplicando-se o teste *t* pareado, n = 5 e P = 95%.

Amostra	Elemento	<i>t_{cal}</i>			
		A	B	C	D
Suco de maçã	Al	0,79*	0,74**	0,18*	0,73**
	B	4,73	2,84	7,55	10,74
	Ba	8,39	1,24	5,28	1,60
	Ca	3,44	0,03	2,71	1,35
	Fe	0,88	0,16	3,14	1,09
	K	5,06	8,39	3,92	5,07
	Mg	0,49	1,77	1,71	1,34
	Mn	0,81	0,16	3,05	1,11
	Na	3,95	1,19	3,01	1,37
	P	0,19	3,64	2,23	2,52
	S	0,04	1,75	0,78	2,57
	Sr	0,04	2,26	2,71	0,78
	Zn	0,65	0,22	0,61	3,15
Suco de manga	Al	1,21*	3,93*	4,31**	3,00
	Ba	8,28**	3,58	0,11	1,88*
	Ca	7,27	1,37	0,21	0,15
	Cu	23,22	4,14	0,19	0,87
	Fe	0,81	2,10	1,55*	2,92*
	K	3,97	0,10	3,25	3,16
	Mg	3,96	0,05	1,28	1,27
	Mn	1,35	1,65	0,86	1,64
	Na	1,32	0,55	0,28	3,71
	P	2,32	0,42	0,16	2,10
	S	3,20	1,53	2,00	6,74
	Sr	3,97	1,21	0,77	2,55
	Zn	0,65	0,06	0,44	1,51

A: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹, B: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + HCl 0,3 mol L⁻¹, C: HNO₃ 3,7 mol L⁻¹ + H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹ e D: HNO₃ 0,3 mol L⁻¹, *t_{crit}*: 2,306, Exceções: *2,570 e **2,780

A análise direta de sucos de frutas proposta por CINDRIĆ et al.¹⁰⁴ apresentou-se como um procedimento simples e rápido que pode ser facilmente aplicado em uma análise de rotina. A análise elementar foi realizada sem dificuldades para ambas as amostras e os teores determinados estão de acordo com aqueles determinados pela digestão em fluxo e digestão em batelada, como pode ser observado na TABELA 5.4.2.6. De acordo com o teste *F* (TABELA 5.4.2.4) não houve diferenças significativas entre a precisão da análise direta e da digestão em batelada, sendo que as exceções foram o Al na análise direta de suco de maçã e Ba e Fe na análise direta de suco de manga. Entretanto, menor concordância foi observada para os teores determinados pela análise direta com as determinações realizadas através da digestão em batelada (TABELA 5.4.2.5). De acordo com um teste *t* pareado a maioria dos teores de macro e micronutrientes determinados pela análise direta estão de acordo com os teores determinados na digestão em batelada. De modo geral, as determinações não foram exatas para B, K, P, S e Zn em suco de maçã e para Al, Fe, K, Na e S em suco de manga. Nesse sentido, pode-se afirmar que determinações quantitativas podem ser realizadas tanto pela digestão em fluxo e como pela análise direta, apesar da digestão em fluxo apresentar uma melhor concordância com as determinações em batelada e apresentar um menor teor de carbono em solução, que pode causar efeitos de matriz em determinações de macro e micronutrientes em ICP OES¹⁷.

TABELA 5.4.2.6 - Análise elementar de sucos de maçã e manga: comparação da análise direta e da digestão em batelada, média \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento (mg L ⁻¹)	Análise direta HNO ₃ ^a	Digestão em batelada HNO ₃ + HCl ^b
Suco de maçã	Al	0,39 \pm 0,02	0,4 \pm 0,1
	B	1,47 \pm 0,05	1,86 \pm 0,06
	Ba	0,1 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
	Ca	118 \pm 8	123 \pm 4
	Fe	0,83 \pm 0,03	0,85 \pm 0,03
	K	605 \pm 21	670 \pm 20
	Mg	52 \pm 2	53 \pm 2
	Mn	0,39 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01
	Na	15,4 \pm 0,5	15,0 \pm 0,4
	P	66 \pm 2	63 \pm 2
	S	24,7 \pm 0,9	27 \pm 2
	Sr	0,78 \pm 0,03	0,79 \pm 0,02
	Zn	0,07 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
	Suco de manga	Al	0,09 \pm 0,03
Ba		0,120 \pm 0,004	0,13 \pm 0,02
Ca		92 \pm 3	92 \pm 3
Cu		0,13 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02
Fe		0,42 \pm 0,01	0,48 \pm 0,05
K		346 \pm 12	325 \pm 10
Mg		45 \pm 2	44 \pm 2
Mn		0,36 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02
Na		9,1 \pm 0,3	9,8 \pm 0,3
P		38 \pm 1	37 \pm 1
S		24 \pm 1	30 \pm 2
Sr		0,61 \pm 0,02	0,58 \pm 0,02
Zn	0,25 \pm 0,01	0,27 \pm 0,03	

a: HNO₃ 0,3 mol L⁻¹, b: HNO₃ 9,3 mol L⁻¹ + HCl 0,8 mol L⁻¹.

5.4.3 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo de amostras de leite

O desempenho do sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas pressões e temperaturas também foi avaliado no preparo de amostras de leite, que são ricas em gordura e considerada uma classe de compostos de difícil digestão⁸⁸. A avaliação do preparo das emulsões de leite em meio ácido é apresentada na FIGURA 5.4.3.1.

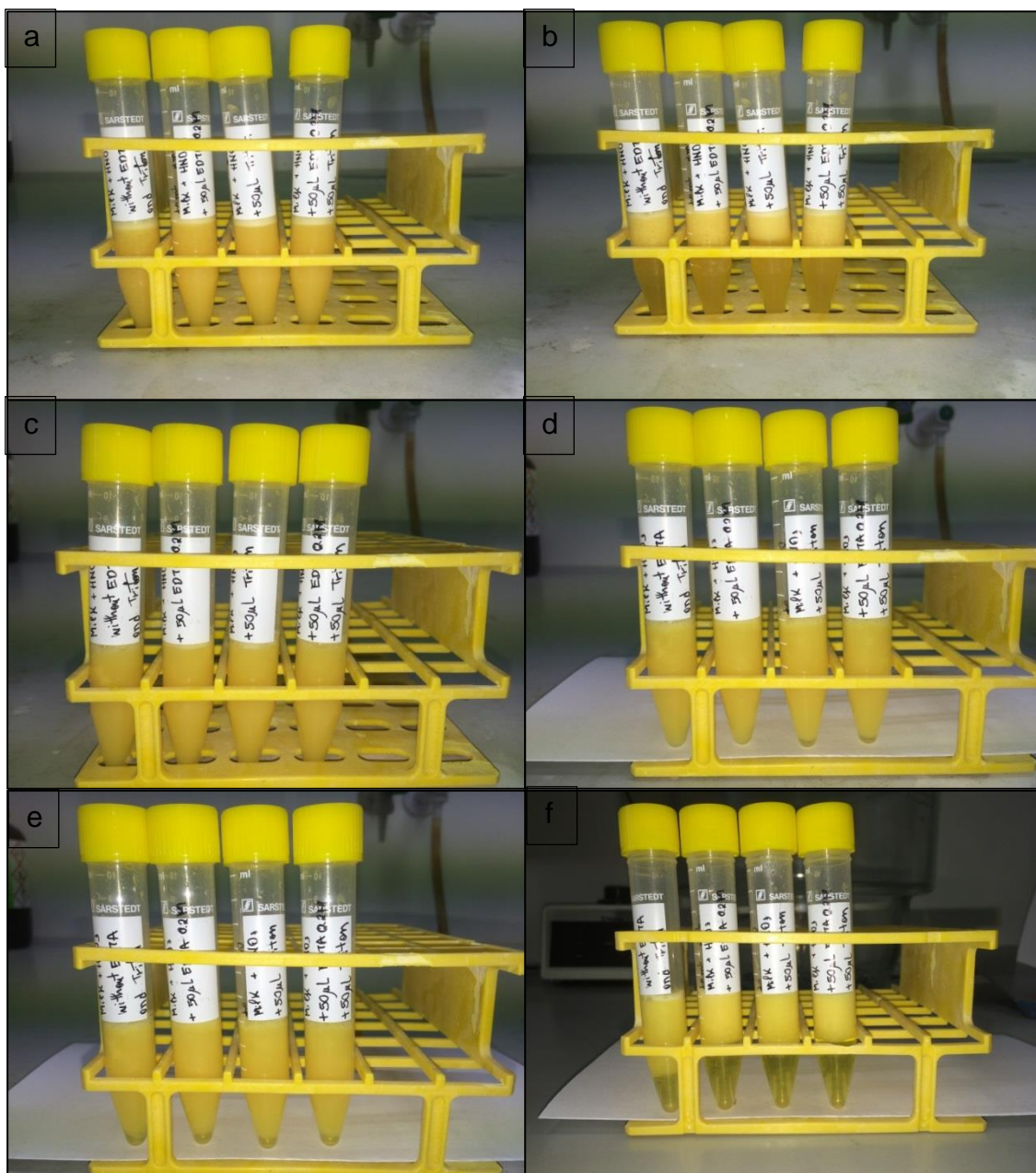


FIGURA 5.4.3.1 - Otimização do preparo das emulsões de leite e avaliação do uso de estabilizantes químicos, ultrassom e aquecimento na estabilização das emulsões, a: após preparo das misturas e agitação manual, b: 4 min após agitação manual, c: imediatamente após 1 min de sonicação, d: 20 min após sonicação durante 1 min, e: 44 min após sonicação durante 1 min e f: após 20 min de aquecimento. Tubos da esquerda para a direita: 1º tubo sem estabilizantes, 2º tubo com EDTA, 3º tubo com Triton X-100 e 4º com EDTA e Triton X-100.

Em seguida, estabilizantes químicos foram avaliados no preparo das emulsões de leite, como por exemplo: EDTA, Triton X-100 e a combinação desses compostos. A estabilidade das emulsões preparadas na presença desses estabilizantes químicos foi comparada com uma emulsão preparada somente com uso de ácido nítrico e água desionizada. As misturas preparadas por agitação manual

formavam emulsões estáveis imediatamente após agitação (FIGURA 5.4.3.1.a), entretanto foi observado a completa separação de fases em menos de 4 min (FIGURA 5.4.3.1.b), demonstrando que não houve formação de emulsão com a simples mistura e agitação manual da amostra com os reagentes, bem como os estabilizantes químicos não foram eficientes. Portanto, todas as soluções foram sonicadas por 1 min em um banho de ultrassom no intuito de avaliar o efeito do ultrassom na estabilização das emulsões. O efeito foi similar para todas as emulsões preparadas (FIGURA 5.4.3.1.c), sendo que essas se mantiveram estáveis por pelo menos 20 min quando se iniciou a quebra das emulsões (FIGURA 5.4.3.1.d). A emulsão que se manteve estável por mais tempo foi aquela preparada sem adição de nenhum estabilizante, ou seja, somente com o uso da amostra, ácido nítrico e água desionizada (FIGURA 5.4.3.1.e). O uso de estabilizantes químicos não demonstrou nenhum efeito significativo na estabilização das emulsões de leite em meio ácido, portanto, o uso desses reagentes no preparo das emulsões é desnecessário. É importante enfatizar, que mesmo sem o uso de estabilizantes químicos não houve uma completa quebra da emulsão mesmo em tempos de até 44 min após a sonicação.

O efeito da temperatura também foi avaliado no preparo das emulsões. Nesse sentido, após estabilização das emulsões por 1 min de sonicação em um banho ultrassom, esses tubos foram mantidos por 20 min em uma estufa sob temperatura de 60 °C. Apesar de se esperar o aumento da estabilidade, o aquecimento levou a uma completa separação de fases (FIGURA 5.4.3.1.f), sendo que as emulsões não puderam ser reestabilizadas mesmo após sonicadas em um banho de ultrassom.

Assim, tem-se que a melhor abordagem no preparo de emulsões estáveis de leite em meio ácido é a simples mistura da amostra com ácido nítrico e água desionizada, seguida da sonicação da mistura por 1 min em um banho de ultrassom.

O uso de padrão interno no preparo da emulsão de leite em meio ácido também foi avaliado. A adição de solução de Sc ao meio promoveu a coagulação da amostra de leite preparada em HNO_3 7,0 mol L^{-1} nas condições previamente otimizadas devido ao efeito salting-out, uma vez que a concentração de Sc nessa emulsão era elevada (12 mg L^{-1}) aumentando a força iônica do meio e diminuindo a solubilidade da amostra em meio ácido. A mistura contendo amostra, ácido nítrico, água desionizada e padrão de Sc não pode ser estabilizada mesmo após sonicação em banho de ultrassom. Apesar de não ter se obtido emulsões estáveis, essas misturas foram digeridas no sistema de digestão em fluxo assistido por radiação

micro-ondas, pois a mistura foi estabilizada com o uso de um agitador mecânico presente no amostrador automático para homogeneizar as suspensões formadas.

Um segundo procedimento para preparar as emulsões de leite foi avaliado para permitir o uso de padrão interno durante a digestão das amostras no sistema de digestão em fluxo. Foi observado que a adição concomitante de água desionizada e o padrão interno promovem a desestabilização da emulsão em meio ácido. Quando a emulsão de leite foi preparada com ácido nítrico e Sc na ausência de água desionizada foi possível estabilizá-la após 1 min de sonicação em banho de ultrassom. Portanto, há dois métodos de preparo de emulsões de leite em meio ácido, a primeira sem o uso do padrão interno e a diluição da amostra e de ácido nítrico concentrado em água desionizada, ou a segunda com uso de padrão interno e diluição da amostra em ácido nítrico concentrado. Desconsiderando o teor de água presente nas amostras de leite, os teores de água presente em cada emulsão são 48 e 27% para HNO_3 7,0 e 10,5 mol L^{-1} , respectivamente. Portanto, as digestões foram repetidas com as emulsões de leite em HNO_3 10,5 mol L^{-1} . É importante ressaltar que o preparo das amostras de leite para serem digeridas no sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas foi mais complexo do que o preparo das diluições de sucos de frutas, contudo usando-se somente um banho de ultrassom foi possível preparar emulsões estáveis que puderam ser introduzidas no sistema em fluxo.

Nesse contexto, as amostras de leite foram digeridas com ácido nítrico 7,0 e 10,5 mol L^{-1} para emulsões de leite contendo 20 e 25% V V^{-1} da amostra, respectivamente. As eficiências de digestão alcançadas no preparo das amostras foram 66 e 77% para leite semidesnatado e 66 e 75% para leite integral digeridos com HNO_3 7,0 e 10,5 mol L^{-1} , respectivamente, como pode ser observado na FIGURA 5.4.3.2. Os melhores resultados foram alcançados quando foi utilizado o segundo procedimento de preparo de emulsões de leite, e isso pode ser explicado devido à melhor dispersão da amostra no meio e a maior concentração do ácido nítrico o que aumentou a interação entre o substrato e o reagente. A acidez residual foi similar para as amostras de leite semidesnatado e leite integral, assim foi determinado a acidez residual média em cada uma das concentrações ácidas avaliadas. A acidez residual foi 1,0 mol L^{-1} para as amostras de leite digeridas com HNO_3 7,0 mol L^{-1} , enquanto que para as amostras digeridas com HNO_3 10,5 mol L^{-1} foi 1,7 mol L^{-1} . De maneira similar como foi discutido para as amostras de sucos de frutas, o consumo de ácido também foi avaliado na alíquota da amostra, sendo que esse foi 45 e 39% nas

amostras de leite digeridas com HNO_3 7,0 e 10,5 mol L^{-1} , respectivamente. Dessa maneira, pode-se concluir que para as amostras de leite seria necessária a diluição em fluxo dos digeridos antes da introdução desses no sistema de nebulização do ICP OES a fim de evitar interferências de transporte ou degradação de componentes do equipamento. Considerando-se que a diluição da amostra dificultaria a determinação de elementos presentes em baixas concentrações e os fatores previamente discutidos para as amostras de sucos de frutas, as determinações foram realizadas off-line.

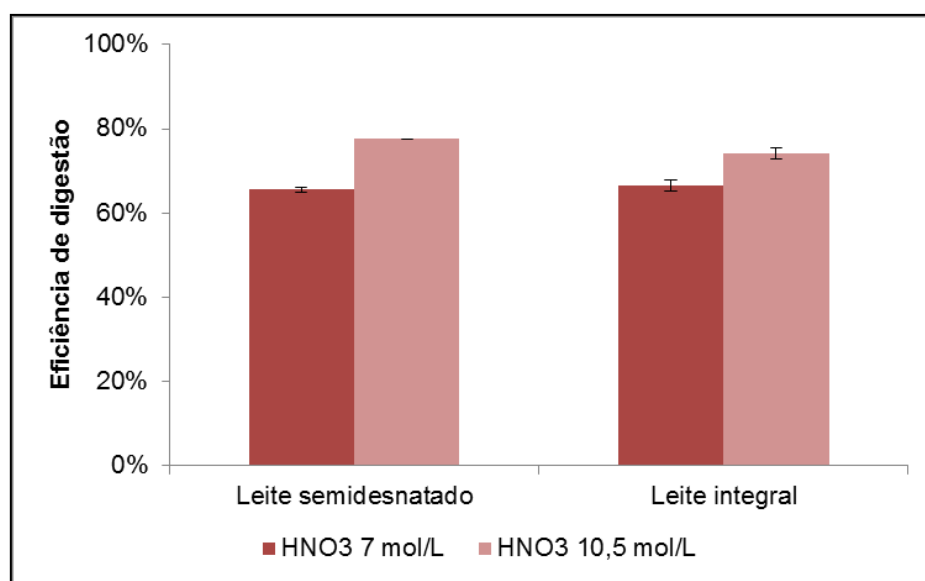


FIGURA 5.4.3.2 - Eficiência de digestão das amostras de leite semidesnatado e de leite integral em diferentes concentrações de ácido nítrico, n = 5.

Os LODs também foram determinados em 5 réplicas para cada concentração ácida e calculadas pelo uso das equações descritas no Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pag. 34). Como não houve diferenças significativas entre os LODs determinados nas duas concentrações ácidas estudadas foram calculados os LODs médios para cada elemento (TABELA 5.4.3.1). Os LODs de Fe, K, P, S e Zn foram melhores no sistema em fluxo, enquanto que para Ca, Mg e Na foram melhores na digestão em batelada. Tal como anteriormente para as amostras de sucos de frutas essas diferenças podem ser explicadas pela baixa manipulação da amostra pelo analista, enquanto os altos LODs podem ser devido à contaminação dos digeridos no sistema de separação gás-líquido, que apresenta um tubo cilíndrico de vidro em sua composição. Os LODs determinados para as amostras de leite são similares àqueles apresentados anteriormente para as amostras de sucos de frutas, sendo em alguns casos ligeiramente superiores, uma vez que foi utilizada

uma maior concentração ácida, como pode ser notado especialmente para Ca, Na e Zn.

TABELA 5.4.3.1 - LODs dos brancos analíticos das amostras de leite do sistema de digestão em fluxo e da digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (batelada).

Elemento	Sistema em fluxo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Batelada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ca	302	26
Fe	1	3
K	65	151
Mg	27	8
Na	56	14
P	14	25
S	26	80
Sr	0,3	0,2
Zn	26	4

As características analíticas do sistema de digestão em fluxo foram comparadas com aquelas da digestão em batelada (TABELA 5.4.3.2). Os cálculos da geração de resíduos e da frequência analíticas foram feitas como no Capítulo 4 (tópico 4.4.4 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo das amostras de tecido animal e vegetal, pag. 61). Em ambos os procedimentos avaliados na digestão das amostras de leite no sistema em fluxo há uma redução no consumo de amostra, reagentes e na geração de resíduos quando comparado com o procedimento em batelada. É importante enfatizar que no segundo método utilizou-se uma concentração de HNO_3 superior à digestão em batelada e mesmo assim houve uma redução no consumo de reagentes e geração de resíduos. Isso se deve à introdução de menores volumes de amostra e reagentes no sistema. A frequência analítica foi maior no sistema de digestão em fluxo do que na digestão em batelada.

TABELA 5.4.3.2 - Características analíticas da digestão em fluxo e em batelada no preparo de amostras líquidas de leite.

Características	Digestão em fluxo		Digestão em batelada
	Método 1*	Método 2**	
Consumo de amostra (mL)	0,6	0,8	2
Consumo de HNO ₃ (mL)	1,5	3,0	5
Consumo de HCl (mL)	-	-	0,5
Resíduo de HNO ₃ (mL)	3,6	5,1	8,5
Frequência analítica (h ⁻¹)	8	6	5

* HNO₃ 7,0 mol L⁻¹ e ** HNO₃ 10,5 mol L⁻¹

As concentrações dos macro e micronutrientes determinados nas amostras de leite são apresentadas na TABELA 5.4.3.3. De modo geral, os resultados estão concordantes com aqueles determinados nas digestões em batelada.

TABELA 5.4.3.3 - Comparação dos teores de macro e micronutrientes determinados na digestão em fluxo e da digestão em batelada do leite semidesnatado e leite integral em diferentes concentrações de ácido nítrico, valor médio ± incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento (mg L ⁻¹)	Sistema de digestão em fluxo		Digestão em batelada
		HNO ₃ ^a	HNO ₃ ^b	HNO ₃ + HCl ^c
Leite semidesnatado	Ca	1413 ± 68	1259 ± 43	1236 ± 43
	Fe	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,03
	K	1203 ± 50	1214 ± 42	1092 ± 38
	Mg	114 ± 6	103 ± 4	104 ± 4
	Na	354 ± 17	337 ± 12	318 ± 11
	P	1026 ± 38	950 ± 33	945 ± 33
	S	344 ± 25	323 ± 19	332 ± 21
	Sr	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01
	Zn	3,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
Leite integral	Ca	1405 ± 68	1231 ± 42	1232 ± 42
	Fe	0,4 ± 0,5	0,62 ± 0,02	0,19 ± 0,06
	K	1189 ± 41	1160 ± 40	1067 ± 37
	Mg	115 ± 5	100 ± 3	106 ± 4
	Na	351 ± 14	322 ± 11	309 ± 11
	P	1058 ± 37	949 ± 33	991 ± 34
	S	352 ± 24	327 ± 18	356 ± 29
	Sr	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,02
	Zn	4,2 ± 0,2	3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,2

a: 7,0 mol L⁻¹ HNO₃, b: 10,5 mol L⁻¹ HNO₃, c: 9,3 mol L⁻¹ HNO₃ e 0,8 mol L⁻¹ HCl.

As condições de preparo das emulsões de leite foram avaliadas através de usos de testes estatísticos como aplicados para as amostras de sucos de frutas.

Através do teste *F* (TABELA 5.4.3.4) foi possível observar que não houve diferenças significativas entre as precisões alcançadas no sistema de digestão em fluxo e na digestão em batelada para a maioria dos elementos determinados em ambas concentrações ácidas, com exceção de Fe em leite integral em ambas concentrações ácidas e Sr em leite semidesnatado digerido com HNO₃ 7,0 mol L⁻¹, que pode ser devido à baixa concentrações desses elementos nessas amostras.

TABELA 5.4.3.4 - Comparação da precisão da digestão em fluxo em diferentes concentrações de ácido nítrico (A e B) e da precisão análise direta (C) com a precisão da digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral através do teste *F*, n = 5 e P = 95%.

Amostra	Elemento	<i>F_{cal}</i>		
		A	B	C
Leite semidesnatado	Ca	2,51	1,04	1,03
	Fe	1,19	1,54	1,32
	K	1,74	1,24	1,12
	Mg	2,63	1,01	1,05
	Na	2,50	1,13	1,30
	P	1,37	1,01	1,15
	S	1,40	1,17	1,04
	Sr	20,67	6,30	1,18
	Zn	1,87	0,88	1,11
Leite integral	Ca	2,58	1,00	1,04
	Fe	52,67	7,27	13,99
	K	1,24	1,18	1,12
	Mg	2,13	1,10	1,01
	Na	1,67	1,08	1,29
	P	1,14	1,09	1,05
	S	1,53	2,72	2,21
	Sr	2,23	6,09	1,68
	Zn	1,82	1,52	1,34

A: HNO₃ 7,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 10,5 mol L⁻¹, C: Triton X-100 1% m V⁻¹, *F_{crit.}* 6,63.

De acordo com o teste *t* pareado (TABELA 5.4.3.5) há diferenças significativas entre a maioria dos teores determinados nos digeridos de leite no sistema em fluxo com os teores de referência determinados em batelada quando as digestões foram realizadas com HNO₃ 7,0 mol L⁻¹. Somente houve concordância para os teores de Fe, S, Sr e Zn determinados em ambas as amostras de leite e para Sr na amostra de leite semidesnatado. Os melhores resultados para ambas amostras de leite foram obtidos quando se utilizou HNO₃ 10,5 mol L⁻¹. Não foram observadas diferenças significativas para Ca, Mg, P, S e Sr em ambas as amostras de leite, Fe em leite semidesnatado e Na em leite integral.

TABELA 5.4.3.5 - Comparação da exatidão da digestão em fluxo em diferentes concentrações de ácido nítrico (A e B) e da exatidão da análise direta (C) com a os teores de macro e micronutrientes determinados pela digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral através do teste *t* pareado, n = 5, P = 95%.

Amostra	Elemento	<i>t_{cal}</i>		
		A	B	C
Leite semidesnatado	Ca	5,09	0,85	0,72
	Fe	1,65	0,58	0,47
	K	4,04	4,88	2,61
	Mg	3,42	0,27	1,04
	Na	3,99	2,74	6,01
	P	3,60	0,24	3,25
	S	0,78	0,72	2,36
	Sr	0,62*	0,55	3,70
	Zn	0,38	2,83	2,36
Leite integral	Ca	4,95	0,02	0,96
	Fe	1,20*	14,67**	2,44**
	K	4,95	3,85	2,51
	Mg	3,35	2,28	0,28
	Na	5,35	1,78	5,86
	P	3,01	2,01	1,02
	S	0,26	1,91	0,13
	Sr	2,91	0,12	2,49
	Zn	0,24	5,34	2,47

A: HNO₃ 7,0 mol L⁻¹, B: HNO₃ 10,5 mol L⁻¹, C: Triton X-100 1% m V⁻¹, *t_{crit}*: 2,306, Exceções: *2,780 e **2,570

O procedimento de análise direta proposto por MCKINSTY et al.¹⁰⁰ para a determinação de macro e micronutrientes em leite, também é um procedimento rápido e simples, apesar de realizado em múltiplas etapas que podem ser afetadas por erros analíticos. Esse procedimento somente requer o uso de um agitador do tipo vórtex e os autores mencionaram que o mesmo pode ser facilmente aplicado em análises de rotina. Entretanto, a análise direta das amostras de leite não pôde ser bem realizada sem o uso de uma solução de limpeza de Triton X-100 entre as medidas; além disso não foi possível realizar as determinações quantitativas usando a diluição da amostra proposta pelos autores que é de 10 vezes. Isso pode ter ocorrido devido às diferenças instrumentais do ICP OES aplicado nas análises por MCKINSTY et al.¹⁰⁰ e no trabalho aqui descrito. As principais diferenças se encontram no modo de visão do plasma e no sistema de introdução da amostra. MCKINSTY et al.¹⁰⁰ utilizaram a visão radial e um sistema de nebulização para alto teor de sólidos, enquanto neste trabalho de tese foi utilizada a visão axial, que apesar de mais sensível é mais susceptível a interferência espectrais. Também foi utilizado um nebulizador de fluxo cruzado e uma câmara de nebulização do tipo Scott. É bem conhecido que as

interferências espectrais podem ser mais intensas na visão axial do que na visão radial em um ICP OES, quando esse não é operado sob condições robustas¹⁰⁸. Assim, decidiu-se preparar emulsões mais diluídas (1:40 V V⁻¹) e utilizar uma solução de limpeza entre as medidas (Triton X-100 1% m V⁻¹). Adotando essas estratégias, as medidas foram realizadas sem problemas, porém é importante destacar que apesar do uso de uma solução de limpeza foi necessário remover o sistema de nebulização e limpá-lo adequadamente para realizar a análise de outras amostras. Foram necessários um dia e meio de trabalho para realizar as análises e limpeza do sistema de nebulização, pois além do período de preparo das emulsões e determinações o sistema de nebulização foi deixado por 24hs em um banho de ácido nítrico 10% (V V⁻¹). O sistema de nebulização precisou ser lavado com detergente neutro, enxaguado com água da torneira e, posteriormente, com água desionizada e, em seguida, foi deixado durante 24 h em um banho ácido (HNO₃ 10% V V⁻¹) para completa limpeza e desmineralização do dispositivo. A maioria das concentrações dos elementos determinados por análise direta estão de acordo com os teores determinados em batelada (TABELA 5.4.3.6). De acordo com teste *F* (TABELA 5.4.3.4) não houve diferenças significativas entre as precisões alcançadas na análise direta e na digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, com exceção de Fe em leite integral. De acordo com o teste *t* pareado, somente não foram observadas diferenças significativas nas determinações de Ca, Fe e Mg em leite semidesnatado e de Fe, Mg, P e S em leite integral. Desse modo, pode-se inferir que para a obtenção de resultados mais confiáveis é mais recomendável realizar a digestão da amostra em fluxo ou batelada.

TABELA 5.4.3.6 - Comparação dos teores de macro e micronutrientes determinados pela análise direta e pela da digestão em batelada de leite semidesnatado e leite integral, média \pm incerteza, n = 5 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento (mg L ⁻¹)	Análise direta Triton X-100 ^a	Digestão em batelada HNO ₃ + HCl ^b
Leite semidesnatado	Ca	1255 \pm 43	1236 \pm 43
	Fe	0,13 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03
	K	1031 \pm 36	1092 \pm 38
	Mg	106 \pm 4	104 \pm 4
	Na	362 \pm 13	318 \pm 11
	P	1014 \pm 35	945 \pm 33
	S	364 \pm 21	332 \pm 21
	Sr	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01
	Zn	3,9 \pm 0,1	3,7 \pm 0,1
Leite integral	Ca	1206 \pm 42	1232 \pm 42
	Fe	0,12 \pm 0,02	0,2 \pm 0,1
	K	1010 \pm 35	1067 \pm 37
	Mg	105 \pm 4	106 \pm 4
	Na	352 \pm 12	309 \pm 11
	P	1014 \pm 35	991 \pm 34
	S	358 \pm 20	356 \pm 29
	Sr	0,248 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02
	Zn	4,0 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2

a: Triton X-100 10% m V⁻¹, b: HNO₃ 9,3 mol L⁻¹ + HCl 0,8 mol L⁻¹.

5.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS

O sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas temperatura e pressão foi eficiente para digerir amostras de sucos de frutas e leite sem grandes dificuldades. A combinação de HNO₃ com HCl possibilitou atingir os menores teores de ROC nas digestões de sucos de frutas devido a capacidade dessa mistura ácida possibilitar a digestão de compostos mais complexos que apresentam um anel aromático em sua estrutura. A eficiência da digestão foi menor para as amostras de leite que são mais difíceis de digerir devido à presença de gorduras em sua composição. O preparo das amostras de leite, para que essas possam ser introduzidas no sistema em fluxo, foi mais complicada do que para as amostras de sucos de frutas, mas foi possível preparar emulsões estáveis após uma cuidadosa avaliação de efeitos de diversos parâmetros. Assim, o procedimento envolveu apenas o uso de ácido nítrico e uma etapa de sonicação. Os teores de macro e micronutrientes das amostras digeridas no sistema de digestão em fluxo assistida por radiação micro-ondas estão em concordância com aqueles determinados por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. De modo geral, os resultados obtidos por digestão em fluxo estão estatisticamente (teste *t* pareado) em

maior concordância com os teores determinados por digestão em batelada do que a análise direta as amostras de sucos de frutas e leite. A análise direta foi uma boa opção para análise da maioria dos macros e micronutrientes em sucos de frutas. Entretanto, análises diretas de amostras de leite devem ser cuidadosamente controladas usando-se soluções para limpeza do sistema de nebulização após a etapa de quantificação a fim de evitar contaminações cruzadas entre amostras.

Capítulo 6

Desenvolvimento de um sistema de extração
fluxo-batelada para determinação on-line de macro
e micronutrientes em tecidos vegetais e animais
por ICP OES

6.1 - INTRODUÇÃO

Na literatura têm sido reportados alguns sistemas de extração em fluxo no preparo de amostras de tecidos vegetais^{69,73} e de tecidos animais para determinação de nutrientes e contaminantes inorgânicos por técnicas espectrométricas^{70-72,74}. Dentre as vantagens desses sistemas de extração em fluxo está a possibilidade da realização da determinação on-line^{70-74,109}, pré-concentração dos analitos em linha por SPE^{72,73} ou micro extração líquido-líquido (MLLE)¹¹⁰ e o acoplamento com instrumentos usados no preparo de amostra como banho ultrassônico^{70-74,109} e forno de radiação micro-ondas^{69,110}.

Dentre os métodos de extração em sistemas em fluxo citados anteriormente, somente o sistema desenvolvido por HERRERA e CASTRO⁶⁹ foi desenvolvido para análise elementar em tecido foliar. Esses autores propuseram uma extração em fluxo assistida por radiação micro-ondas de Cd e Pb em tecido foliar. No sistema proposto foram empacotados 500 mg de amostra em uma MCC de PTFE, a qual foi imersa em um frasco com 30 mL de água colocado dentro do forno de radiação micro-ondas. A alça de amostragem contendo a MCC foi preenchida com 2 mL de HNO₃ 1% V V⁻¹ sob uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. Em seguida, a válvula injetora foi comutada e o circuito foi mantido fechado visando permitir a circulação da solução extratora através da alíquota de amostra sob uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e o sentido do fluxo da solução extratora foi invertido a cada 20 s. Durante a extração foi aplicada uma potência de radiação micro-ondas de 300 W e o tempo de extração foi de 10 e 15 min para Cd e Pb, respectivamente. Após a etapa de extração, a válvula injetora foi novamente comutada para coleta do extrato sob uma vazão de 0,8 mL min⁻¹, sendo o extrato diluído a um Volume final de 4 mL para posterior quantificação off-line dos analitos por GF AAS. O método otimizado mostrou-se eficiente na determinação de Cd e Pb em folhas de faia (BCR 100) e folhas de oliva (BCR 062)⁶⁹.

Aplicações para tecidos animais foram desenvolvidas por MORENO-CID e YEBRA^{70,71} e YEBRA-BIURRUN et al.^{72,74}. Essas extrações em fluxo assistido por ultrassom foram realizadas com 5 a 80 mg de amostra, e 1 a 2 mL de solução extratora de HCl ou HNO₃ diluídas (0,75 a 3 mol L⁻¹) sob uma vazão de 3,5 mL min⁻¹ e tempos de sonicação que variaram de 30 a 300 s, sendo que as condições descritas anteriormente foram selecionadas dependendo da amostra e do analito. Inicialmente as amostras foram empacotadas nas MCCs de vidro, conectadas ao sistema de extração em fluxo e imersas no banho de ultrassom. Em seguida, foi introduzida a

solução extratora no circuito que foi fechado e a solução foi mantida em circulação. Com o intuito de evitar o acúmulo dos analitos em uma das extremidades da MCC o sentido no qual a solução extratora fluía era invertido a cada 10 ou 30 s, dependendo do tempo de extração. Após a etapa de extração o circuito foi aberto e uma alíquota de 250 µL analisada por FAAS para quantificação dos analitos, i.e. Cu em mexilhão, Mn em frutos do mar, Cd em frutas e legumes secos e Zn em carne^{70,71,74}. A única exceção desse procedimento de detecção foi a quantificação de Cd e Pb em mexilhão, que precisou de uma etapa de pré-concentração para posterior quantificação dos analitos por FAAS⁷². Em todos os procedimentos as concentrações dos analitos determinados em CRMs apresentaram boa concordância com os teores certificados.

Esses sistemas em fluxo supracitados têm como desvantagem o uso de uma MCC que precisa ser repetidamente empacotada a cada réplica da amostra⁶⁹⁻⁷⁴. Além disso, nesse tipo de sistema a amostra é mantida em repouso, enquanto a solução extratora flui através da amostra, o que implica que as concentrações dos analitos são diferentes em cada fração do extrato devido ao efeito de dispersão. Isso exige que toda porção do extrato seja homogeneizada ou inteiramente direcionada para o sistema de detecção com o intuito de obter resultados exatos¹⁰⁹. Ademais, foram realizadas quantificações monoelementares⁶⁹⁻⁷⁴ e, em alguns casos, foram necessárias etapas de pré-concentração^{72,73} ou foram realizadas quantificações off-line⁶⁹.

Uma alternativa à essas desvantagens é a aplicação de sistemas de extração fluxo-batelada. Como não há dispersão da amostra na solução carregadora não há a necessidade de homogeneizar o extrato ou quantificar todo volume do extrato, além de aumentar a intensidade do sinal analítico que é similar àqueles obtidos em procedimentos em batelada⁷⁵. Essa abordagem permite combinar as vantagens das técnicas em fluxo, batelada e multicomutadas e, além disso, o acoplamento com equipamentos convencionalmente aplicados em procedimentos analíticos^{76,77}. Nesses sistemas, parâmetros como a etapa de limpeza, as vazões aplicadas e os diâmetros internos e comprimentos das tubulações são menos críticos quando comparados aos sistemas em fluxo convencionais⁷⁷. Entretanto, não há sistemas de extração fluxo-batelada reportados na literatura que sejam aplicados à determinação multielementar em amostras de tecidos vegetais e animais. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a aplicabilidade de um sistema de extração fluxo-batelada para determinação de macro e micronutrientes em

tecidos vegetais e animais por ICP OES. Busca-se o desenvolvimento de um sistema de extração fluxo-batelada que apresente baixo custo, simples confecção e operação e aplicabilidade para análises de rotina.

6.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- ✓ Desenvolver e avaliar a aplicabilidade um sistema de extração fluxo-batelada para a determinação on-line de macro e micronutrientes em tecidos vegetais e animais por ICP OES.
- ✓ Avaliar alternativas que viabilizem a execução da extração e determinação on-line com acoplamento eficiente entre o sistema de extração fluxo-batelada e o sistema de nebulização pneumática visando garantir determinações precisas e exatas.
- ✓ Otimizar as condições para o preparo das amostras no sistema de extração fluxo-batelada;
- ✓ Avaliar a precisão e exatidão do método otimizado comparando-se os teores determinados em fluxo com os teores obtidos por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados Capítulo 3 (tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pg.30);

6.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 - Equipamentos e aparatos

Os analitos foram quantificados por um ICP OES de dupla visualização (iCap 6500 Duo, Thermo Scientific, EUA) com nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica nas análises off-line, e com nebulizador do tipo ranhura em V e câmara de nebulização ciclônica de duplo passo para as análises on-line. A tocha utilizada no equipamento foi uma tocha de quartzo com tubo central de 2,0 mm de diâmetro interno. Uma potência de radiofrequência de 1,15 kW e vazões de gás externo, intermediário e de nebulização de 12; 0,5 e 0,70 L min⁻¹, respectivamente, foram utilizadas para as determinações mutielementares. As seguintes linhas de emissão (nm) na visão axial foram usadas para quantificação dos micronutrientes: Ba 455,404(II), Cu 324,754(I); Fe 238,204(II); Mn 257,611(II); Sr 407,771(II) e Zn 213,856(I), sendo I e II linhas atômicas e iônicas, respectivamente. Para as

determinações dos macronutrientes as seguintes linhas de emissão (nm) na visão radial foram utilizadas: K 766,491(I); Mg 280,270(II) e Na 589,592(I). Para a quantificação de cálcio foi utilizada a linha iônica de Ca 317,933 nm, que foi monitorada nas posições axial e radial para tecidos animais e vegetais, respectivamente. Escândio foi utilizado como padrão interno, sendo a linha iônica de 424,683 nm selecionada para as medidas em ambas as visões. A purificação do ácido nítrico foi realizada no sistema de destilação de ácidos Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha), enquanto o ácido clorídrico foi realizado no sistema de destilação de ácidos DUOPUR (Milestone, Sorisole, Itália).

Na avaliação do efeito do método de agitação sobre a eficiência de extração foram testados (1) um banho de ultrassom (AquaWave 9374, Barnstead|Lab-Line, Alemanha) com tanque de 2,75 L (29,8 cm x 13,9 cm x 10 cm), frequência de 50/60 Hz e potência de 240 W, (2) uma bomba de ar de aquário (A 230, Big Air Super Pump, China) com que proporcionava uma vazão de ar 1,5 mL min⁻¹, e (3) um agitador magnético (752A, Fisatom, Brasil) com rotação de 120 a 1800 rpm e aquecimento de 50 a 360 °C. Uma bomba peristáltica horizontal (IPC Model 78001-12, Ismatec, Suíça) com oito canais foi utilizada para propulsão da solução extratora e/ou sucção do filtrado do meio reacional. Haste, garras e pinças metálicas foram utilizadas na montagem do sistema de extração em fluxo-batelada. O reator utilizado no sistema de extração fluxo-batelada foi construído com um tubo Falcon® de 50 mL e com duas tampas perfuradas. Uma foi utilizada para a introdução do extrator no reator e a outra para filtração do extrato, sendo essas alternadas durante o procedimento. Os filtros utilizados foram confeccionados com tecido de algodão de malha grossa ou de tecido não tecido (TNT) fixados na extremidade de maior diâmetro de uma ponteira 100 µL, para extrações com tecido vegetal e animal, respectivamente.

6.3.2 - Reagentes e amostras

As extrações foram realizadas com ácidos destilado abaixo do ponto de ebulição (HNO₃ e HCl), surfactantes Triton X-100 de alta pureza (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, EUA) e água desionizada (18 MΩ cm⁻¹, Milli-Q Direct 8, Millipore, EUA). As curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir de soluções padrão monoelementares (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Suíça) de 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 3% (V V⁻¹) para Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Sc, Sr e Zn, e soluções padrão de Ca, K e Na de 10000 mg L⁻¹ em HNO₃ 3% (V V⁻¹). A faixa linear

das curvas de calibração de Ca, K e Na foram ajustadas de acordo com a concentração dos extratos de tecidos animais e vegetais.

As amostras de tecidos vegetais e animais utilizadas neste trabalho foram amostras de espinafre e folhas de laranjeira e tomateiro, fígado bovino, músculo bovino e camarão, sendo que espinafre e fígado bovino foram selecionados para o ajuste dos parâmetros do procedimento de extração. Também foram utilizados CRMs na avaliação do procedimento desenvolvido, sendo esses: espinafre (NIST 1570a), folhas de macieira (NIST 1515), folhas de tomateiro (NIST 1573a), folhas de pessegueiro (NIST 1547), fígado bovino (NIST 1577b) e músculo bovino (NIST 8414).

6.3.3 - Preparo das amostras

As amostras de tecidos animais e vegetais foram preparadas conforme descrito no Capítulo 3 (tópico 3.3.3 - Preparo de amostras, pg. 27), sendo essas armazenadas em frascos de polietileno. Os frascos utilizados nos experimentos e armazenamento das amostras foram cuidadosamente lavados e desmineralizados em banho de ácido nítrico 10% (V V⁻¹) por 24 h.

6.3.4 - Avaliação da técnica de agitação

Três técnicas de agitação foram avaliadas: (1) agitação mecânica com barra magnética com emprego de um agitador magnético, (2) borbulhamento da suspensão com ar usando uma bomba de aquário, e (3) banho de ultrassom no qual o reator foi imerso até o nível da solução dentro do frasco. Os experimentos foram realizados com 50 mg de fígado bovino ou folhas de espinafre e 10 mL de HCl 1 ou 8% (V V⁻¹), respectivamente. As suspensões foram mantidas sobre agitação constante por 5 min sob temperatura ambiente. Após a etapa de extração as suspensões foram filtradas utilizando papel de filtro quantitativo (faixa azul). As determinações foram realizadas off-line por ICP OES.

6.3.5 - Otimização dos parâmetros de extração

Após avaliação dos reatores e filtros, o sistema com melhor desempenho foi aplicado nos estudos da velocidade de extração em diferentes ácidos e/ou misturas ácidas. As soluções extratoras aplicadas nos estudos cinéticos em folhas de espinafre foram HCl, HNO₃ e água régia, todas em concentração de 8% (V V⁻¹), enquanto nos estudos cinéticos em fígado bovino foram HCl e HNO₃ ambas a 1% (V V⁻¹) e HCl

1% (V V⁻¹) com Triton X-100 0,1% (m V⁻¹). Em todas essas soluções extratoras utilizou-se Sc como padrão interno na concentração de 0,1 mg L⁻¹ para as determinações por ICP OES. Os tempos avaliados na cinética de extração para todos extratores foram 0,5; 1, 2, 4, 8 e 16 min. Antes da etapa de filtração, os filtros foram descontaminados com uso de solução de limpeza contendo a mesma solução ácida e/ou mistura e a concentração aplicada nos estudos cinéticos. Os experimentos foram realizados sob temperatura ambiente, com 50 mg de fígado bovino e folhas de espinafre e 10 mL de solução extratora.

A proporção massa de amostra e volume de extrator foi o segundo parâmetro avaliado. Nesse caso, o volume da solução extratora foi mantido constante em 10 mL, enquanto que as massas de amostra estudadas foram: 50, 100, 150 e 200 mg em folhas de espinafre e 25, 50, 75, 100 e 150 mg para fígado bovino. A faixa avaliada foi limitada a massa máxima que podia ser utilizada sem causar entupimento dos filtros. Os experimentos foram conduzidos utilizando as soluções extratoras de HCl 1 e 8% (V V⁻¹) para fígado bovino e folhas de espinafre, respectivamente. O terceiro parâmetro estudado foi o efeito da concentração das soluções de HCl, 4, 6, 8, 10 e 12% (V V⁻¹) para folhas de espinafre e 0,1, 0,5, 1, 2 e 4% (V V⁻¹) para fígado bovino. Utilizaram-se soluções com concentrações mais baixas de HCl nas extrações de fígado bovino, pois com aumento da acidez da solução extratora há a diminuição da dispersão da amostra no meio devido à presença de gordura na amostra. Nesses experimentos foram utilizados 50 mg de amostra e 10 mL da solução extratora.

6.3.6 - Avaliação do desempenho do sistema de extração fluxo-batelada

O procedimento desenvolvido para a determinação de macro e micronutrientes em folhas de espinafre e fígado bovino nos experimentos anteriores foi aplicado à outras amostras de tecidos vegetais e animais: folhas de laranjeira e tomateiro, músculo bovino e camarão, bem como a CRMs de folhas de espinafre (NIST 1570a), folhas de macieira (NIST 1515), folhas de tomateiro (NIST 1573a), folhas de pessegueiro (NIST 1547), fígado bovino (NIST 1577b) e músculo bovino (NIST 8414). Os experimentos foram realizados sob temperatura ambiente e com agitação constante durante 4 min e 10 mL de HCl 4 ou 8% (V V⁻¹) para 50mg de amostra e CRMs de tecido animais e vegetais, respectivamente. A filtração foi realizada com uma bomba peristáltica e as determinações off-line por ICP OES. Nesse estudo foram

comparados os teores determinados pelo sistema de extração fluxo-batelada e pela digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados das amostras ou com os teores certificados dos CRMs

6.3.7 - Determinações on-line por ICP OES

O diagrama de funcionamento do sistema de extração fluxo-batelada para as medidas on-line no ICP OES é apresentado na FIGURA 6.3.7.1.

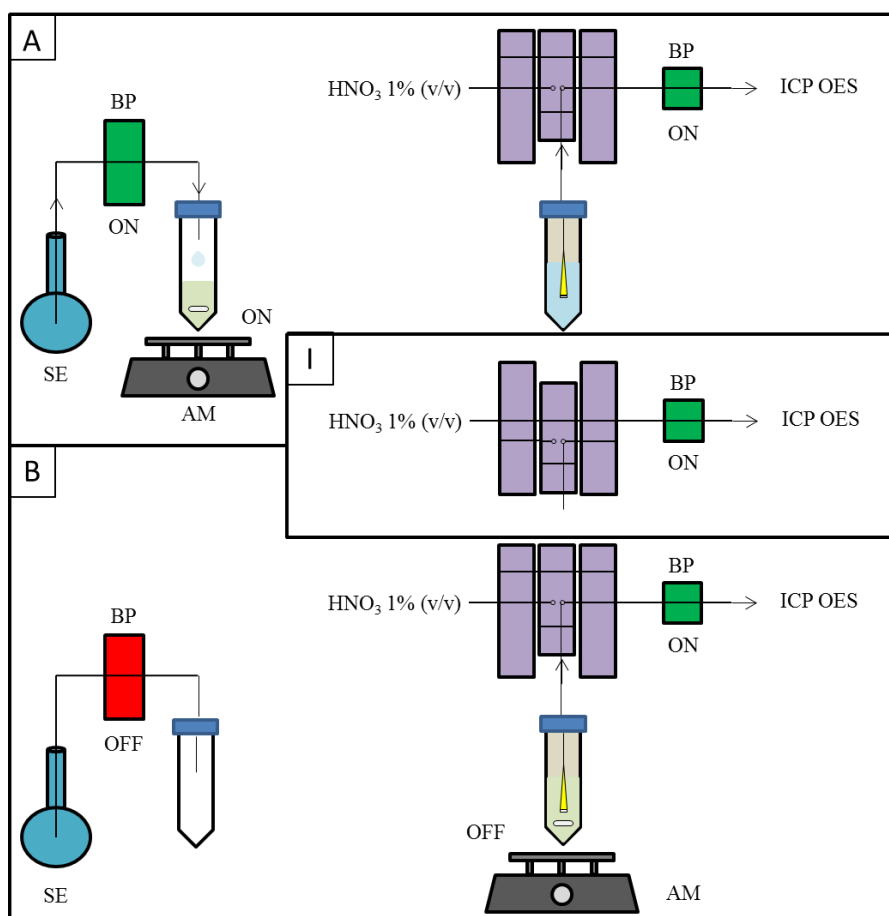


FIGURA 6.3.7.1 - Diagrama do sistema de extração fluxo-batelada com determinação on-line por ICP OES. A: Etapa de extração, limpeza do filtro e leitura do branco, B: Etapa de filtração e leitura do extrato, I: Etapa de troca de filtro ou frasco reacional, BP: bomba peristáltica, SE: solução extratora, AM: agitador magnético, ON: ligado e OFF: desligado.

Na Etapa A foi introduzida 10 mL da solução extratora de HCl 4 e 8% (V V⁻¹) no reator sob uma vazão de 2,5 mL min⁻¹ por 4 min para as amostras de tecidos animais e vegetais, respectivamente. Antes da etapa de extração e determinação on-line por ICP OES, foram pesadas nos reatores 50 mg das amostras ou CRMs, sendo adicionado 100 µL de Sc 10 mg L⁻¹ antes de cada extração. Durante

toda etapa de adição do extrator no reator o agitador magnético foi mantido ligado para garantir máxima homogeneização da solução e contato entre amostra e a solução extratora. Em paralelo à etapa de extração foi realizada a limpeza do filtro e a leitura do branco, sendo esses processos realizados em um frasco adicional contendo uma solução de HCl 4 ou 8% (V V⁻¹) com Sc 0,1 mg L⁻¹, para amostras de tecidos animais e vegetais, respectivamente. O volume inicial do branco analítico foi descartado antes das medidas dos sinais de emissão, uma vez que a parte inicial da solução de limpeza filtrada poderia conter altas concentrações de alguns analitos e gerar altos valores de brancos analíticos.

Para a filtração foi utilizada uma segunda bomba peristáltica, que para as determinações on-line por ICP OES foi usada a própria bomba peristáltica do equipamento. Nas medidas on-line utilizou-se um injetor comutador do tipo 2-3-2, no qual uma das entradas da alça de amostragem foi conectada ao filtro de extração. Dessa maneira, quando o injetor era comutado para a posição de amostragem, o filtrado era enviado para o sistema de introdução de amostras do equipamento. Na Etapa B foi efetuada a quantificação de macro e micronutrientes do extrato filtrado. As medidas foram iniciadas 70 s após o início da etapa de filtração do extrato visando garantir a chegada da solução da amostra ao plasma. Nesse momento, o agitador magnético foi mantido desligado para não entupir o filtro durante a análise. É importante ressaltar, que o filtro somente entrou em contato com a suspensão contendo a amostra e a solução extratora durante a etapa de filtração para prevenir o entupimento do filtro. Durante todo o procedimento a bomba peristáltica do ICP OES foi mantida atuando sob uma vazão constante de 1,0 mL min⁻¹ e o injetor comutador foi mantido na posição de introdução do extrato, possibilitando que os filtrados fossem enviados diretamente ao plasma de argônio. Na etapa I, denominada como etapa intermediária, o injetor comutador foi comutado para a posição inicial, introduzindo uma solução de HNO₃ 1% (V V⁻¹) no ICP OES, com o intuito de evitar a entrada de ar no sistema e promover a limpeza da câmara de nebulização entre as sucessivas introduções dos extratos filtrados.

O procedimento desenvolvido foi aplicado para a determinação de macro e micronutrientes nas amostras de espinafre, folhas de laranjeira e tomateiro, fígado bovino, músculo bovino, camarão e CRMs de folhas de macieira (NIST 1515) e fígado bovino (NIST 1577b). Todas as condições adotadas no experimento anterior foram utilizadas, com exceção da massa de amostra nos experimentos com tecidos

vegetais, que foi de 10 mg para obter as concentrações dos macronutrientes na região da região linear de calibração utilizando o nebulizador com ranhura em V. As exceções foram as determinações de Cu em todas as amostras de tecidos vegetais, de Zn em folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de tomateiro, de Ba em folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de espinafre e de Fe em folhas de macieira (NIST 1515), para as quais as concentrações ficaram abaixo do LOD e, assim, as extrações foram realizadas com 50 mg de amostra para a determinação desses elementos.

6.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.4.1 - Avaliação da eficiência da técnica de agitação

As técnicas de agitação avaliadas neste trabalho foram agitação mecânica, borbulhamento com ar e sonicação, sendo os resultados apresentados na FIGURA 6.4.1.1. De modo geral, as três técnicas de agitação apresentaram capacidades similares de extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre e fígado bovino. As exceções foram Ba, Fe e Zn em folhas de espinafre, que apresentaram eficiências de extração inferiores quando usando borbulhamento com ar, e Ca e Fe em fígado bovino que apresentaram, maiores eficiências de extração usando borbulhamento e ultrassom, respectivamente. Essa similaridade na eficiência de extração pode estar relacionada ao pequeno tamanho de partícula das amostras, na qual 50% das partículas têm tamanhos de até 29 e 35 μm para fígado bovino e folhas de espinafre (Capítulo 3, tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pag. 30), respectivamente. Assim, as amostras apresentam uma grande área superficial para contato com a solução extratora, facilitando a mobilização dos elementos facilmente extraíveis presentes na amostra. Os resultados relativamente melhores para a sonicação podem ser explicados pelo efeito de cavitação da amostra, levando a um aumento da interação entre a partícula sólida e a solução extratora. Apesar desse ligeiro ganho na eficiência da extração pela sonicação, a agitação mecânica com barra magnética foi selecionada para a realização dos futuros experimentos com o objetivo de simplificar o sistema de extração fluxo-batelada.

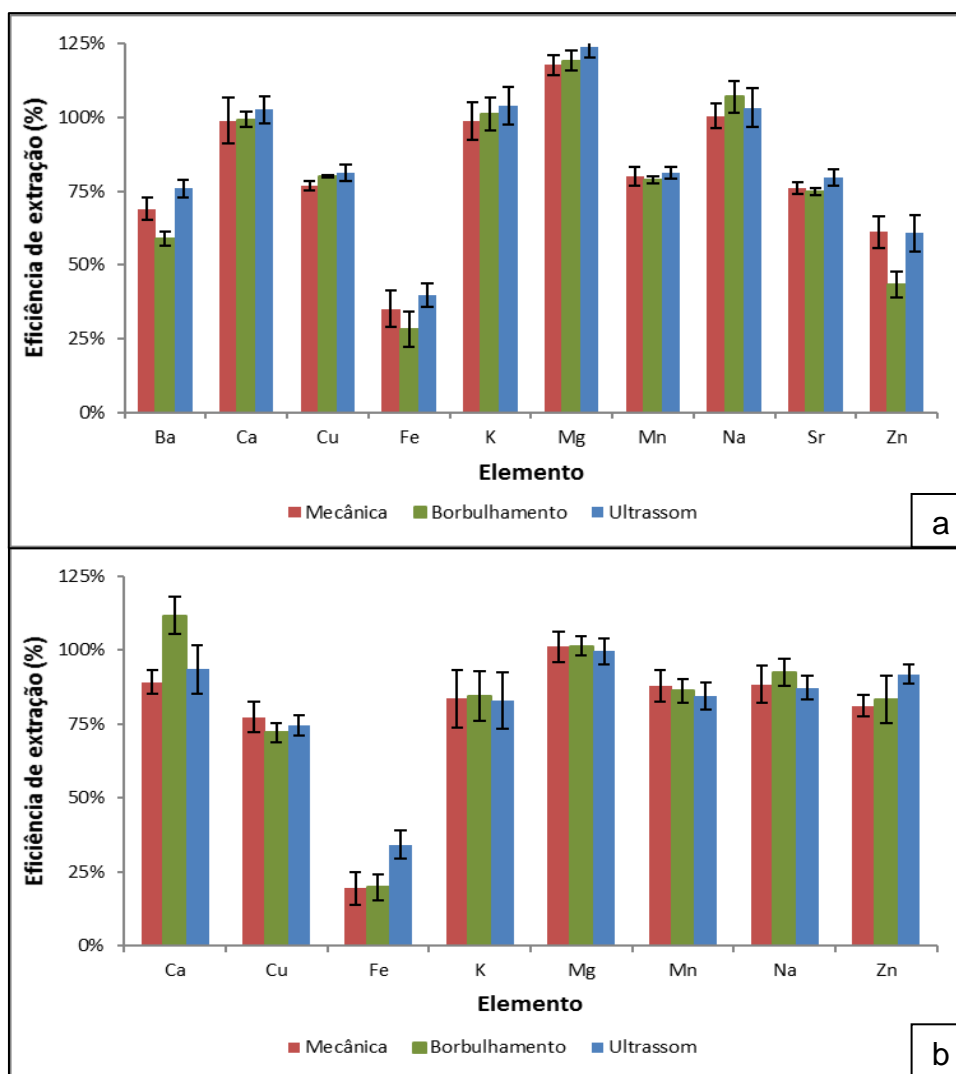


FIGURA 6.4.1.1 - Eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino com diferentes técnicas de agitação.

6.4.2 - Otimização dos parâmetros de extração

A primeira avaliação realizada foi a cinética de extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre usando diferentes soluções extratoras (HCl, HNO₃ e água régia 8% (V V⁻¹)). As eficiências de extração obtidas estão apresentadas na FIGURA 6.4.2.1. As três soluções extratoras avaliadas apresentaram capacidades similares para a extração de macro e micronutrientes nas folhas de espinafre, assim como a cinética de extração de cada elemento foi similar para as diferentes soluções ácidas. Dentre as três soluções ácidas avaliadas nas extrações em folhas de espinafre, os melhores resultados foram obtidos com HCl 8% (V V⁻¹), que apresentou as melhores eficiências de extração para Ca, Cu, Mn, Sr e Zn, enquanto os melhores resultados para Ba, Fe e Na foram obtidos com HNO₃ 8% (V V⁻¹) e para K com água régia 8% (V V⁻¹). As eficiências de extração de Mg foram similares para HCl

8% (V V⁻¹) e HNO₃ 8% (V V⁻¹), e os altos teores para esse elemento com água régia pode ser decorrente de contaminação durante a extração. A cinética de extração variou entre os elementos estudados, sendo que os tempos avaliados não influenciaram as eficiências de extração de Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn na maioria das soluções ácidas, porém, as eficiências de extração de Ca, Sr e Ba foram influenciadas pelo tempo de extração. A extração de Fe pode ser considerada ineficiente em todas as condições avaliadas, pois esse elemento se encontra fortemente ligado à matriz e mesmo intervalos de tempo maiores que aqueles avaliados não seriam eficientes para a extração desse elemento, assim seria necessário o uso de um método mais drástico para disponibilização desse analito como a digestão ácida.

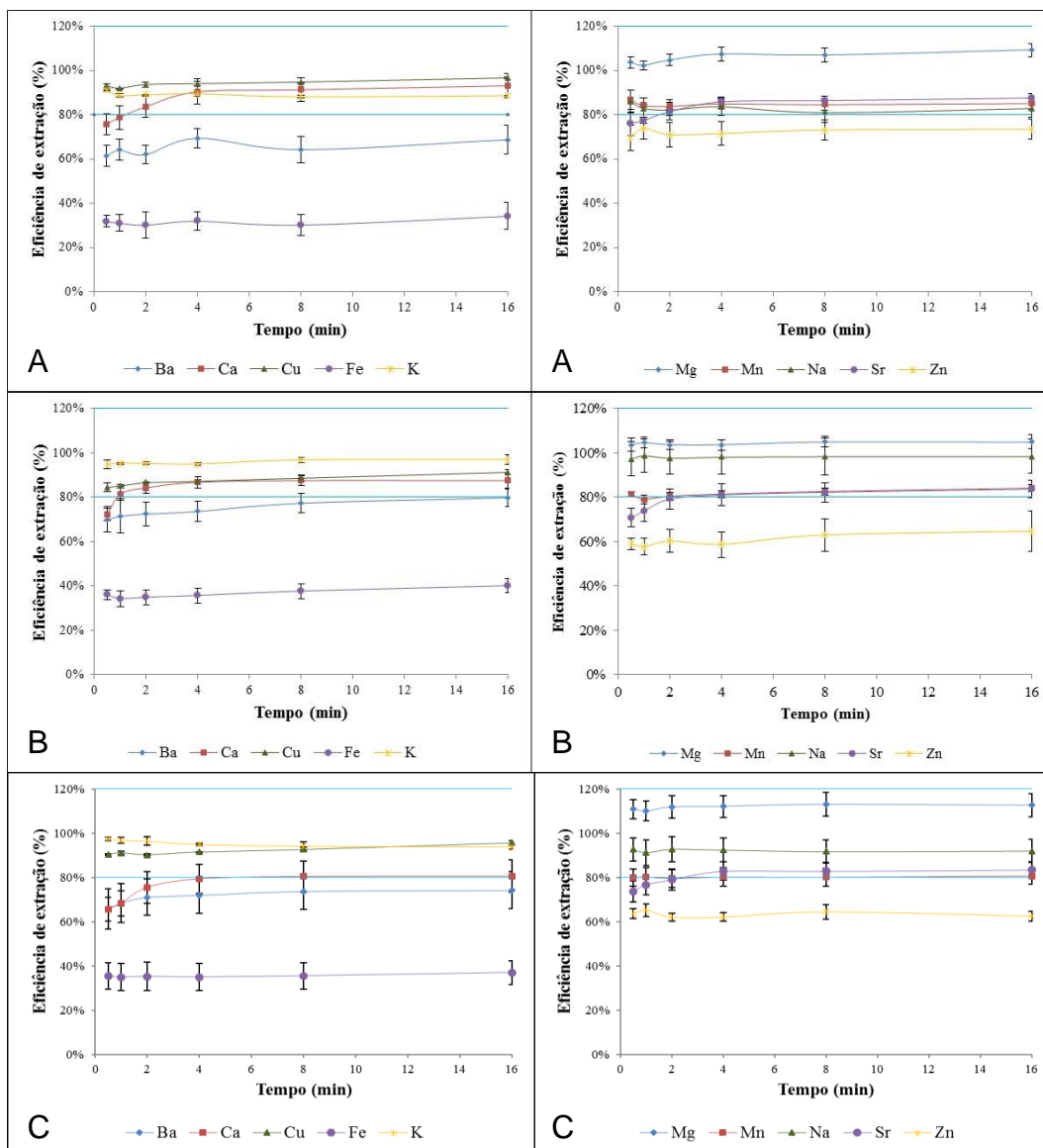


FIGURA 6.4.2.1 - Cinética de extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre com diferentes soluções ácidas, A: HCl 8% (V V⁻¹), B: HNO₃ 8% (V V⁻¹) e C: Água Régia 8% (V V⁻¹).

De modo geral, o intervalo de tempo de 4 min foi suficiente para promover a extração da maioria dos os macro e micronutrientes em folhas de espinafre, com exceção do Fe. Considerando-se que os melhores resultados obtidos foram atingidos no tempo de extração de 4 min utilizando a solução ácida de HCl 8% (V V⁻¹), essas variáveis foram escolhidas para realização dos estudos subsequentes em folhas de espinafre.

Em seguida foi avaliada a cinética de extração de macro e micronutrientes em fígado bovino usando HCl 1% (V V⁻¹), HNO₃ 1% (V V⁻¹) e HCl 1% (V V⁻¹) + Triton X-100 0,1% (m V⁻¹) e as eficiências de extração são apresentadas na FIGURA 6.4.2.2. As melhores eficiências de extração foram alcançadas com uso

de HCl 1% (V V⁻¹) e HCl (V V⁻¹) + Triton X-100 0,1% (m V⁻¹), que apresentaram capacidades similares de extração de macro e micronutrientes em fígado bovino. A cinética de extração foi mais lenta quando foi utilizado HNO₃ 1% (V V⁻¹), com exceção de K e Na nos quais as eficiências de extração se estabilizaram em 4 min, e Zn em 8 min. Para os demais elementos a estabilidade da eficiência de extração não foi atingida em tempos de até 16 min. A adição de Triton X-100 à solução de HCl 1% (V V⁻¹), acelerou a velocidade de extração de alguns elementos (Mg, Mn e Na), uma vez que o surfactante aumentou a dispersão da amostra em solução. Entretanto, como observado no uso de somente HCl 1% (V V⁻¹) a maioria dos elementos necessitam de 4 min para atingirem a eficiência de extração máxima na combinação de HCl 1% (V V⁻¹) + Triton X-100 0,1% (m V⁻¹). Nesse sentido, a melhor mistura ácida avaliada foi HCl 1% (V V⁻¹), que atingiu adequadas eficiências de extração em 4 min e gerou melhores brancos analíticos por utilizar somente um reagente, sendo essas condições aplicadas nos próximos experimentos com fígado bovino.

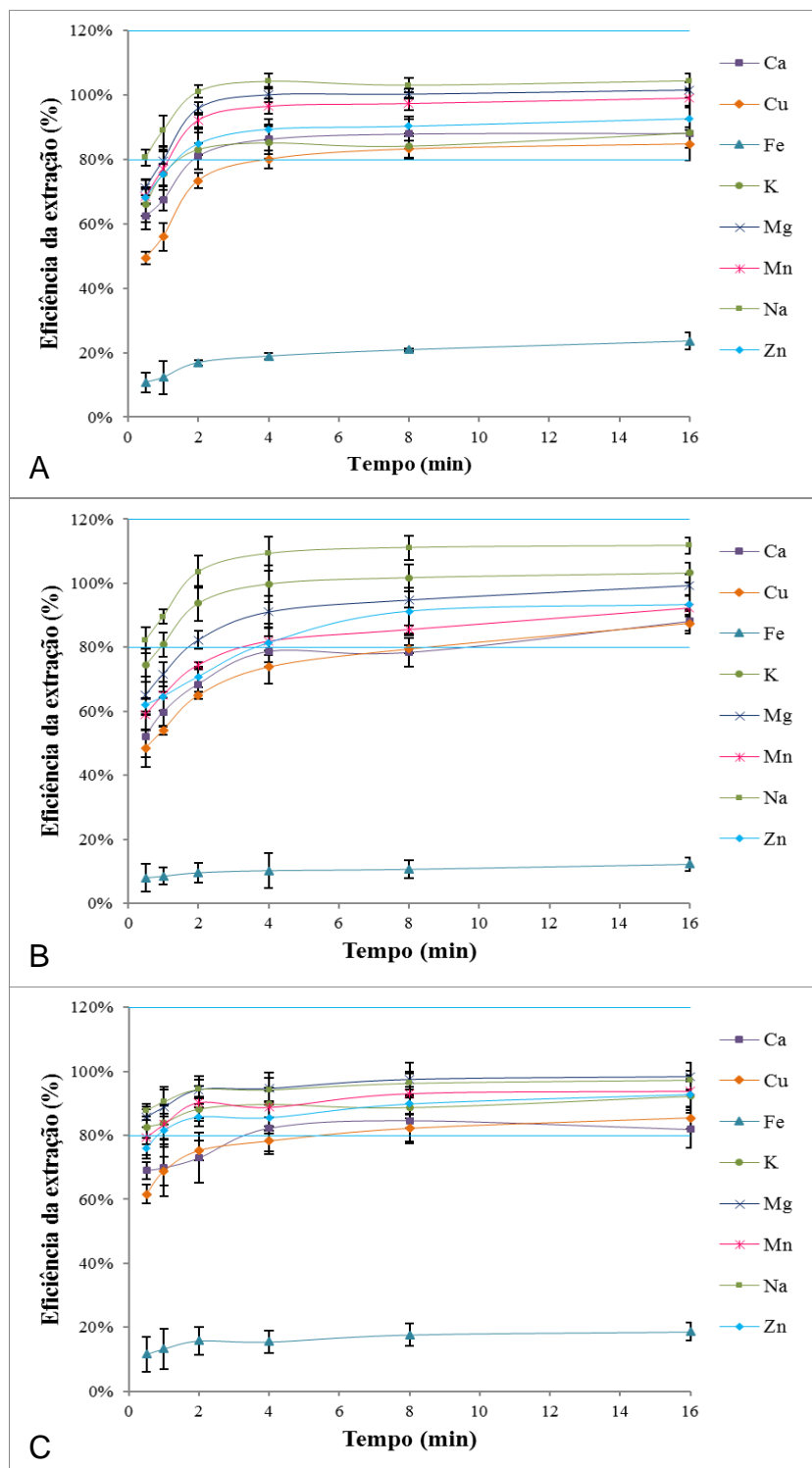


FIGURA 6.4.2.2 - Cinética de extração de macro e micronutrientes em fígado bovino com diferentes soluções ácidas, A: HCl 1% (V V⁻¹), B: HNO₃ 1% (V V⁻¹) e C: HCl 1% (V V⁻¹) + Triton X-100 0,1% (m V⁻¹).

Após avaliação da solução ácida e do tempo de extração, a proporção massa de amostra e volume de extrator foi avaliada. A massa foi variada de 50 a 200 mg para folhas de espinafre e de 25 a 150 mg para fígado bovino e o volume foi fixado em 10 mL. Não foram avaliadas massas maiores de amostras devido entupimento dos

filtros durante a etapa de filtração. De acordo com a FIGURA 6.4.2.3 não houve uma variação significativa nas eficiências de extração de Fe e Mg em ambas as amostras, Ba em folhas de espinafre, e K e Na em fígado bovino na região de massas avaliada. Entretanto, houve a diminuição das recuperações de Ca, Cu e Zn em ambas as amostras. Além disso, a diminuição das recuperações de Mn e Sr e o aumento das recuperações de K e Na em folhas de espinafre.

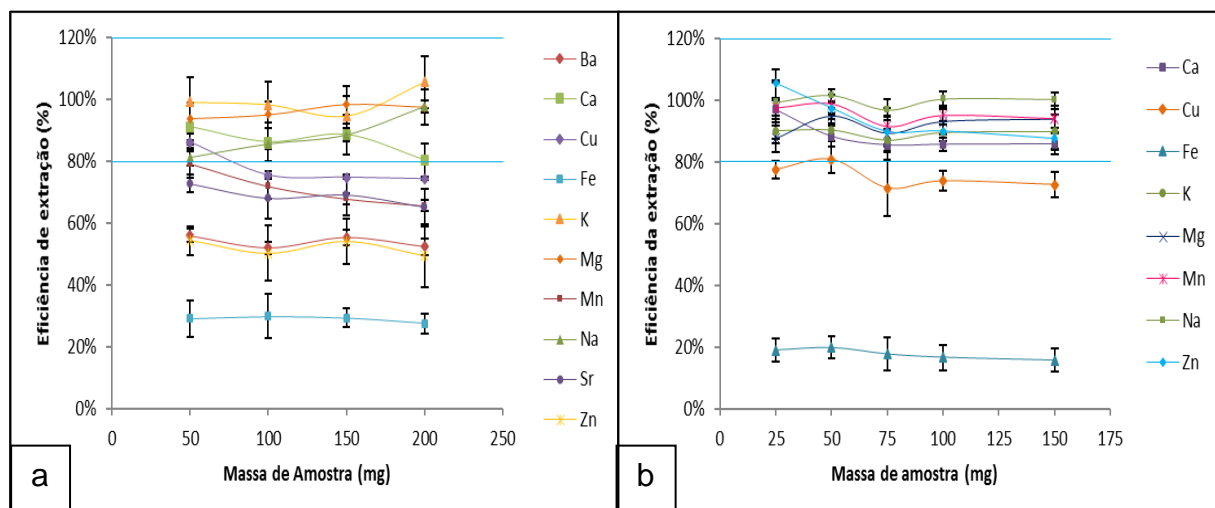


FIGURA 6.4.2.3 - Efeito da massa de amostra na eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino.

Outro fator considerado para a escolha dessa proporção foi a eficiência de filtração dos extratos. Nesses experimentos observou-se a redução na vazão do filtrado durante a análise quando a massa de amostra foi aumentada, favorecendo o entupimento do filtro para massas maiores que 100 e 150 mg para fígado bovino e folhas de espinafre, respectivamente. Isso inviabilizaria a quantificação on-line dos macros e micronutrientes por ICP OES. Assim, a proporção de massa de amostra e volume de solução extratora foi fixada em 50 mg de amostra para 10 mL de solução extratora, almejando melhores eficiências de extração, garantindo a determinação de micronutrientes e viabilizando a quantificação on-line de macro e micronutrientes em ambas as amostras por ICP OES.

O último parâmetro avaliado foi a concentração da solução extratora de HCl, que foi variou de 4 a 12% ($V V^{-1}$) e 0,1 a 4% ($V V^{-1}$) para folhas de espinafre e fígado bovino, respectivamente (FIGURA 6.4.2.4). Trabalhou-se com uma concentração mais baixa de HCl para a amostra de fígado bovino, uma vez que ocorreu uma menor solubilização da amostra em solução com o aumento da

concentração do ácido. Nas extrações para folhas de espinafre a concentração de HCl não apresentou efeito significativo sobre as eficiências de extração de Ba, Cu, Fe, Mn e Na dentro da faixa avaliada. Entretanto, o aumento na concentração de HCl favoreceu a extração de Ca, mas reduziu as concentrações extraídas de K, Mg e Zn. Enquanto que em fígado bovino não houve efeito significativo da concentração do ácido na eficiência de extração da maioria dos elementos, exceto para Cu e Fe para os quais a eficiência de extração aumentou. Outro fator importante é que nas extrações utilizando HCl 0,1% (V V⁻¹), apesar da melhor solubilização da amostra aparentemente também houve a solubilização de uma maior quantidade de compostos orgânicos solúveis, que pode ser observado pela obtenção de extratos cada vez mais turvos e devido ao entupimento dos filtros durante a extração. Nesse sentido, os experimentos subsequentes com folhas de espinafre foram realizados utilizando a concentração de HCl 8% (V V⁻¹), que foi a condição intermediária avaliada, que é uma condição de compromisso que garante extrações quantitativas para a maioria dos macros e micronutrientes avaliados. Além disso, essa concentração é equivalente à concentração molar de 0,1 mol L⁻¹, que está de acordo com aquela recomendada por MIYAZAWA *et al.*⁴⁷. Nas extrações em fígado bovino selecionou-se a solução HCl 4% (V V⁻¹), que garantiu uma boa eficiência de extração para a maioria dos elementos, com exceção do Fe, com aparente baixa solubilização de compostos orgânicos, que implicariam em maior frequência de entupimento do filtro e maior carga de carbono no plasma.

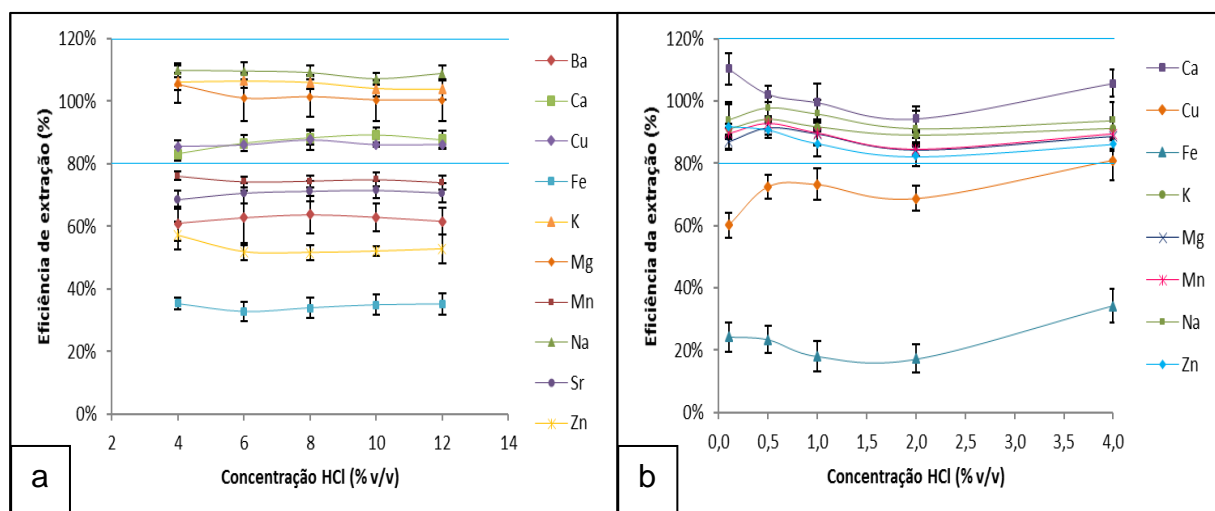


FIGURA 6.4.2.4 - Efeito da concentração do HCl na eficiência de extração de macro e micronutrientes em (a) folhas de espinafre e (b) fígado bovino.

Neste sentido, as condições ideais para a extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre e fígado bovino foram o uso de 50 mg de amostra, 10 mL de HCl 8 e 4% (V V⁻¹), respectivamente, sob agitação constante por 4 min sob temperatura ambiente. Essas condições foram utilizadas para avaliação do método de extração fluxo-batelada em outras amostras e CRMs de tecidos vegetais e animais.

6.4.3 - Avaliação do desempenho do sistema de extração fluxo-batelada

As características analíticas do procedimento otimizado no sistema de extração fluxo-batelada foram comparadas com aquelas dos procedimentos de extração em batelada propostos na literatura (TABELA 6.4.3.1). Na TABELA 6.4.3.1 não foram apresentados métodos de extração assistido por ultrassom ou radiação micro-ondas, uma vez que essas não foram aplicadas no sistema de extração fluxo-batelada. Ademais, não são apresentados resultados para extração em amostras sólidas de tecido animal, uma vez que não foram encontradas propostas de simples extrações ácidas para análise de macro e micronutrientes. A realização do procedimento de extração no sistema de extração fluxo-batelada reduziu o consumo de amostra e reagentes e, conseqüentemente, a geração de resíduos. O procedimento proposto apresentou o menor tempo de extração o que implica em aumento da frequência analítica. Além disso, no sistema de extração fluxo-batelada todo o processo foi realizado sob temperatura ambiente, enquanto aquecimento foi aplicado durante a digestão. Todas essas vantagens presentes no sistema de extração fluxo-batelada estão de acordo com o que é proposto nos sistema fluxo-batelada e com os princípios da Química Analítica Verde. É importante enfatizar que nesse sistema não há consumo de energia elétrica como nos métodos de extração em fluxo reportados na literatura⁶⁹⁻⁷⁴ e o consumo de reagentes foi diminuído quando comparado aos procedimentos de digestão em fluxo e batelada apresentados nas discussões do Capítulo 4 (tópico 4.4.4 - Aplicação do sistema de digestão em fluxo no preparo das amostras de tecido animal e vegetal, pg. 61) aplicado para amostras de tecidos animal e vegetal.

TABELA 6.4.3.1 - Características analíticas da extração fluxo-batelada e em batelada no preparo de amostras sólidas de tecido foliar.

Analito	Massa (mg)	Solução extratora	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ref.
Ca, Cu, K, Mg, Mn e Zn	2000	15 mL de HCl 3 mol L ⁻¹ ou HNO ₃ de 3 mol L ⁻¹	15	50	52
Ca, K e Mg	100	50 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹	15	30	53
Ca, Cu, K, Mg, Mn e Zn	500	25 mL de HCl 1,0 mol L ⁻¹	65	80	47
Ba, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn	50	10 mL de HCl 1,0 mol L ⁻¹	4	amb.	prop.

Siglas: amb. - temperatura ambiente, Ref. - Referências bibliográficas e Prop. - sistema proposto.

Inicialmente o desempenho do sistema foi avaliado pela extração de macro e micronutrientes em quatro CRMs de tecidos vegetais e dois de tecidos animais, sendo esses: folhas de espinafre (NIST 1570a), folhas de macieira (NIST 1515), folhas de tomateiro (NIST 1573a), folhas de pessegueiro (NIST 1547), fígado bovino (NIST 1577b) e músculo bovino (NIST 8414). Os LODs na extração fluxo-batelada off-line foram 0,2; 28; 0,1; 1; 11; 25; 0,01; 45; 0,1 e 21 mg kg⁻¹ para Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn nas análises em tecidos vegetais e 1; 0,1; 11; 0,2; 1; 2; 2; 0,05; 1; 0,5 e 16 mg kg⁻¹ para As, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn nas análises em tecidos animais. A frequência analítica atingida durante as extrações fluxo-batelada com detecção off-line foi de 7,5 extrações por hora. Os teores de macro e micronutrientes determinados, os teores certificados e as eficiências de extração alcançadas estão apresentados na TABELA 6.4.3.2 para os CRMs de tecidos vegetais e na TABELA 6.4.3.3 para os CRMs de tecidos animais.

TABELA 6.4.3.2 - Avaliação da extração fluxo-batelada com CRMs de tecidos vegetais usando determinação off-line por ICP OES, valor médio \pm incerteza, $n = 3$ e intervalo de confiança de 95%.

CRM	Elemento	Teor Certificado	Extração fluxo-batelada	Eficiência de extração (%)
Folhas de espinafre NIST 1570 ^a	Ca (%)	1,527 \pm 0,041	1,42 \pm 0,04	93
	Cu (mg kg ⁻¹)	12,2 \pm 0,6	10,1 \pm 0,5	83
	K (%)	2,903 \pm 0,052	2,7 \pm 0,1	94
	Mg (%)	0,89*	0,79 \pm 0,03	89
	Mn (mg kg ⁻¹)	75,9 \pm 1,9	72 \pm 2	95
	Na (%)	1,818 \pm 0,043	1,67 \pm 0,05	92
	Sr (mg kg ⁻¹)	55,6 \pm 0,8	42 \pm 1	76
	Zn (mg kg ⁻¹)	82 \pm 3	69 \pm 6	84
Folhas de macieira NIST 1515	Ba (mg kg ⁻¹)	49 \pm 2	47 \pm 1	96
	Ca (%)	1,526 \pm 0,015	1,27 \pm 0,04	83
	Cu (mg kg ⁻¹)	5,64 \pm 0,24	5,7 \pm 0,2	102
	Fe (mg kg ⁻¹)	83 \pm 5	26 \pm 2	31
	K (%)	1,61 \pm 0,02	1,43 \pm 0,04	89
	Mg (%)	0,271 \pm 0,008	0,24 \pm 0,01	88
	Mn (mg kg ⁻¹)	54 \pm 3	52 \pm 2	96
	Na (mg kg ⁻¹)	24,4 \pm 1,2	55 \pm 2	225
Folhas de tomateiro NIST 1573 ^a	Sr (mg kg ⁻¹)	25 \pm 2	16,8 \pm 0,5	67
	Zn (mg kg ⁻¹)	12,5 \pm 0,3	12 \pm 2	97
	Ba (mg kg ⁻¹)	63*	54 \pm 2	86
	Ca (%)	5,05 \pm 0,09	4,3 \pm 0,1	85
	Cu (mg kg ⁻¹)	4,70 \pm 0,14	5 \pm 0,1	106
	Fe (mg kg ⁻¹)	368 \pm 7	37 \pm 4	10
	K (%)	2,70 \pm 0,05	2,5 \pm 0,1	91
	Mg (%)	1,2*	0,98 \pm 0,03	81
Folhas de pessegueiro NIST 1547	Mn (mg kg ⁻¹)	246 \pm 8	233 \pm 7	95
	Na (mg kg ⁻¹)	136 \pm 4	195 \pm 19	143
	Sr (mg kg ⁻¹)	85*	68 \pm 2	80
	Zn (mg kg ⁻¹)	30,9 \pm 0,7	19 \pm 4	60
	Ba (mg kg ⁻¹)	124 \pm 4	120 \pm 4	97
	Ca (%)	1,56 \pm 0,02	1,34 \pm 0,04	86
	Cu (mg kg ⁻¹)	3,7 \pm 0,4	4,1 \pm 0,1	110
	Fe (mg kg ⁻¹)	218 \pm 14	73 \pm 8	33
Folhas de pessegueiro NIST 1547	K (%)	2,43 \pm 0,03	2,2 \pm 0,1	91
	Mg (%)	0,432 \pm 0,008	0,37 \pm 0,01	86
	Mn (mg kg ⁻¹)	98 \pm 3	96 \pm 3	98
	Na (mg kg ⁻¹)	24 \pm 2	45 \pm 18	190
	Sr (mg kg ⁻¹)	53 \pm 4	44 \pm 1	83
	Zn (mg kg ⁻¹)	17,9 \pm 0,4	16 \pm 3	88

*: teor informativo não certificado.

Os teores de Fe, Na, Sr e Zn determinados nos extratos dos CRMs de tecidos vegetais não estão de acordo com os teores certificados para todos os CRMs avaliados (TABELA 6.4.3.2). Isso já era esperado para a determinação de Fe, devido às baixas eficiências de extração alcançadas durante a etapa de otimização. Porém,

isso não reflete o comportamento esperado para as determinações de Na e Sr. Nas quantificações dos teores de Na nos extratos dos CRMs, com exceção das folhas de espinafre (NIST 1570a) que apresentam um alto teor de Na, não foi possível determinar com boa exatidão os teores desse analito, uma vez que os teores estão abaixo ou próximo ao LOD (45 mg kg^{-1}). Boas eficiências de extração de Sr só foram alcançadas para as folhas de tomateiro (NIST 1573a) e folhas de pessegueiro (NIST 1574), porém foram menores que 80% para folhas de espinafre (NIST 1570a) e folhas de macieira (NIST 1515). Para Zn os teores determinados estão de acordo com os teores certificados para as folhas de espinafre (NIST 1570a), folhas de macieira (NIST 1515) e folhas de pessegueiro (NIST 1574), enquanto a eficiência de extração foi de 60% para as folhas de tomateiro (NIST 1573a).

Nos CRMs de tecidos animais os teores de Ca, K, Mg, Na e Zn estão de acordo com os teores certificados nos dois materiais, sendo que as eficiências de extração variaram de 82 a 97% para esses elementos (TABELA 6.4.3.3). Entretanto, o mesmo não ocorreu para as determinações de Cu e Mn em músculo bovino (NIST 8414), uma vez que as concentrações desses elementos estavam próximas aos LODs que foram de 0,2 e $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cu e Mn, respectivamente. Além disso, não foi possível realizar determinações exatas de Fe em ambos os CRMs de tecido animal, uma vez que esse elemento não pôde ser eficientemente extraído em todas as amostras avaliadas por estar fortemente ligado a matriz e exigir condições mais drásticas para disponibilização em solução.

TABELA 6.4.3.3 - Avaliação da extração fluxo-batelada com CRMs de tecidos animais usando determinação off-line por ICP OES, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.

CRM	Elemento	Teor Certificado	Extração fluxo-batelada	Eficiência de extração (%)
Fígado bovino NIST 1577b	Ca (mg kg ⁻¹)	116 \pm 4	113 \pm 16	97
	Cu (mg kg ⁻¹)	160 \pm 8	150 \pm 7	94
	Fe (mg kg ⁻¹)	184 \pm 15	43 \pm 6	24
	K (%)	0,994 \pm 0,002	0,9 \pm 0,1	92
	Mg (mg kg ⁻¹)	601 \pm 28	558 \pm 40	93
	Mn (mg kg ⁻¹)	10,5 \pm 1,7	9,0 \pm 0,3	85
	Na (%)	0,242 \pm 0,006	0,20 \pm 0,01	82
	Zn (mg kg ⁻¹)	127 \pm 16	108 \pm 4	85
Músculo bovino NIST 8414	Ca (mg kg ⁻¹)	145 \pm 20	139 \pm 18	96
	Cu (mg kg ⁻¹)	2,84 \pm 0,45	0,29 \pm 0,01	10
	Fe (mg kg ⁻¹)	71,2 \pm 9,2	37 \pm 3	53
	K (%)	1,517 \pm 0,037	1,4 \pm 0,1	92
	Mg (mg kg ⁻¹)	960 \pm 95	877 \pm 72	91
	Mn (mg kg ⁻¹)	0,37 \pm 0,09	0,21 \pm 0,03	56
	Na (%)	0,21 \pm 0,008	0,20 \pm 0,01	94
	Zn (mg kg ⁻¹)	142 \pm 14	120 \pm 4	84

O desempenho do sistema de extração fluxo-batelada também foi avaliado aplicando-se o procedimento desenvolvido para as amostras previamente caracterizadas no (Capítulo 3, tópico 3.4.1 - Caracterização das amostras sólidas, pag. 30). As concentrações determinadas de macro e micronutrientes nos extratos de tecidos vegetais estão apresentadas na TABELA 6.4.3.4, juntamente com as concentrações determinadas por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados.

TABELA 6.4.3.4 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Extração fluxo-batelada	Digestão em micro-ondas	Eficiência de extração (%)
Folhas de espinafre	Ba (mg kg ⁻¹)	2,7 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	84
	Ca (%)	1,64 \pm 0,05	1,6 \pm 0,1	100
	Cu (mg kg ⁻¹)	6,8 \pm 0,2	7,6 \pm 0,2	90
	Fe (mg kg ⁻¹)	44 \pm 4	92 \pm 7	48
	K (%)	7,2 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	110
	Mg (%)	1,35 \pm 0,04	1,2 \pm 0,1	109
	Mn (mg kg ⁻¹)	137 \pm 4	129 \pm 4	106
	Na (%)	0,43 \pm 0,01	0,37 \pm 0,02	116
	Sr (mg kg ⁻¹)	93 \pm 3	105 \pm 3	89
Zn (mg kg ⁻¹)	47 \pm 2	51 \pm 2	90	
Folhas de Laranjeira	Ba (mg kg ⁻¹)	24 \pm 1	23,4 \pm 0,3	103
	Ca (%)	1,34 \pm 0,04	1,8 \pm 0,1	76
	Cu (mg kg ⁻¹)	6,2 \pm 0,2	5,8 \pm 0,2	108
	Fe (mg kg ⁻¹)	30 \pm 3	67,1 \pm 0,6	45
	K (%)	1,69 \pm 0,06	1,83 \pm 0,05	92
	Mg (%)	0,27 \pm 0,01	0,286 \pm 0,004	96
	Mn (mg kg ⁻¹)	14,7 \pm 0,4	15,3 \pm 0,2	97
	Na (mg kg ⁻¹)	119 \pm 7	105 \pm 16	114
	Sr (mg kg ⁻¹)	48 \pm 1	58,2 \pm 0,5	83
Zn (mg kg ⁻¹)	11 \pm 2	15 \pm 1	77	
Folhas de Tomateiro	Ba (mg kg ⁻¹)	74 \pm 2	72 \pm 1	103
	Ca (%)	3,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	86
	Cu (mg kg ⁻¹)	10,1 \pm 0,3	11,7 \pm 0,2	86
	Fe (mg kg ⁻¹)	64 \pm 5	206 \pm 11	31
	K (%)	3,4 \pm 0,1	2,78 \pm 0,03	123
	Mg (%)	0,46 \pm 0,01	0,45 \pm 0,03	103
	Mn (mg kg ⁻¹)	73 \pm 2	70 \pm 1	104
	Na (mg kg ⁻¹)	404 \pm 15	480 \pm 14	84
	Sr (mg kg ⁻¹)	157 \pm 5	173 \pm 6	91
Zn (mg kg ⁻¹)	11 \pm 1	16,9 \pm 0,2	62	

Os teores de Ba, Cu, Mg, Mn, Na e Sr determinados nos extratos estão de acordo com os teores determinados por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, sendo que as eficiências das extrações variaram de 83 a 116% (TABELA 6.4.3.4). Os teores determinados de Ca nas amostras de folhas de espinafre e tomateiro estão de acordo com os teores determinados por digestão em forno de micro-ondas, entretanto a eficiência de extração foi de 76% para as folhas de laranjeira. Com exceção da amostra de folhas de tomateiro, que apresentou uma eficiência de extração de 123%, os teores de K determinados nos extratos estão de acordo com os teores nos digeridos. Como observado para os CRMs, e nos estudos anteriores, não foi possível alcançar boa eficiência de extração para o Fe e Zn, com

exceção da determinação de Zn em folhas de espinafre cuja eficiência de digestão foi 90%. De modo geral, extrações quantitativas também foram alcançadas para a maioria dos elementos avaliados nas amostras de tecido animal como pode ser observado na TABELA 6.4.3.5. Nessa tabela também são apresentados os teores de macro e micronutrientes determinados pelos dois procedimentos aplicados no preparo das amostras.

TABELA 6.4.3.5 - Teores determinados de macro e micronutrientes por extração fluxo-batelada e digestão assistida por radiação micro-ondas para fígado bovino, músculo bovino e camarão, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Extração fluxo-batelada	Digestão em micro-ondas	Eficiência de extração (%)
Fígado bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	124 \pm 12	146 \pm 5	85
	Cu (mg kg ⁻¹)	246 \pm 44	253 \pm 8	97
	Fe (mg kg ⁻¹)	43 \pm 2	163 \pm 5	26
	K (%)	0,9 \pm 0,1	0,98 \pm 0,04	89
	Mg (mg kg ⁻¹)	510 \pm 61	545 \pm 16	93
	Mn (mg kg ⁻¹)	6 \pm 1	7,1 \pm 0,2	89
	Na (%)	0,18 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	97
	Zn (mg kg ⁻¹)	101 \pm 10	109 \pm 3	93
Músculo bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	114 \pm 7	131 \pm 7	87
	Cu (mg kg ⁻¹)	0,31 \pm 0,06	2,1 \pm 0,2	14
	Fe (mg kg ⁻¹)	31 \pm 1	60 \pm 2	51
	K (%)	1,34 \pm 0,05	1,34 \pm 0,04	100
	Mg (mg kg ⁻¹)	806 \pm 25	824 \pm 25	98
	Na (%)	0,17 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	88
	Zn (mg kg ⁻¹)	122 \pm 5	141 \pm 2	87
Camarão	As (mg kg ⁻¹)	11,7 \pm 0,5	12,3 \pm 0,5	96
	Ba (mg kg ⁻¹)	1,79 \pm 0,05	1,8 \pm 0,2	101
	Ca (%)	0,37 \pm 0,02	0,38 \pm 0,01	96
	Cu (mg kg ⁻¹)	3,9 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	67
	Fe (mg kg ⁻¹)	3,3 \pm 0,5	31 \pm 1	11
	K (%)	0,25 \pm 0,02	0,28 \pm 0,01	87
	Mg (%)	0,20 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	102
	Mn (mg kg ⁻¹)	7,2 \pm 0,3	7,7 \pm 0,2	94
	Na (%)	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	100
	Sr (mg kg ⁻¹)	53 \pm 2	57 \pm 2	92
Zn (mg kg ⁻¹)	48 \pm 4	48 \pm 1	100	

Os teores de Ca, K, Mg, Na e Zn determinados nos extratos de todas as amostras estão de acordo com os teores determinados por digestão assistida por micro-ondas em frascos fechados, sendo que as eficiências de extração variaram de 85 a 102%. Os teores de Mn determinados nas amostras de fígado bovino e camarão pelo sistema de extração fluxo-batelada estão de acordo com o procedimento em batelada e as eficiências de extração alcançadas para essas respectivas amostras

foram de 89 e 94%. Não foi possível determinar os teores de Mn em músculo bovino por ambos os procedimentos, uma vez que as concentrações desse elemento nos extratos e digeridos se encontravam abaixo dos LODs dos dois procedimentos. O teor de Cu só apresentou concordância com os teores determinados pelo procedimento de referência para a amostra de fígado bovino, entretanto as concentrações desse elemento nas demais amostras estavam próximas ao LOD do procedimento ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$). As eficiências de extração de As, Ba e Sr em camarão foram de 96, 101 e 92%, respectivamente. As concentrações extraídas apresentam boa concordância com os teores determinados nos extratos com a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. Esses elementos não puderam ser determinados nas demais amostras, pois estavam abaixo dos LODs para os dois procedimentos aplicados.

6.4.4 - Determinação on-line por ICP OES

A determinação on-line de macro e micronutrientes por ICP OES foi efetuada para as mesmas amostras utilizadas no estudo anterior e foi aplicada aos CRMs de folhas de macieira (NIST 1515) e fígado bovino (NIST 1577b). Inicialmente os experimentos foram realizados seguindo as condições utilizadas na extração fluxo-batelada com determinação off-line e na mesma faixa linear aplicada no experimento anterior. Entretanto, nessa condição não foi possível quantificar os macronutrientes no CRM e amostras de tecido vegetal, pois as concentrações eram superiores a faixa linear de trabalho quando utilizado o nebulizador com ranhura em V. Por isso, foi necessário alterar a proporção massa de amostra e volume da solução extratora, com exceção das determinações de Cu e Zn em folhas de tomateiro e folhas de macieira (NIST 1515) e Fe em folhas de macieira (NIST 1515) que foram realizadas com 50 mg de amostra. Os experimentos foram realizados com 10 mg de amostra para os demais elementos nos CRMs e nas amostras de tecidos vegetais. Todas as determinações no CRM e amostras de tecidos animais foram efetuadas com 50 mg de amostra. Nas extrações utilizaram-se as soluções extratoras otimizadas anteriormente, ou seja, HCl 4 e 8% ($V V^{-1}$) para tecidos animais e vegetais, respectivamente. Os LODs para as extrações on-line em tecidos vegetais foram 6; 1; 86; 4; 15 e 143 mg kg^{-1} para Ba, Cu, Fe, Mn, Sr e Zn, respectivamente, e de 0,2; 0,03; 0,2 e 0,1 % para Ca, K, Mg e Na. Os LODs obtidos para as extrações on-line em tecidos animais foram 2; 1; 87; 0,5; 2; 31; 9; 0,2; 36; 3 e 58 mg kg^{-1} para As, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn,

respectivamente. Os maiores LODs quando comparados à detecção off-line decorrem da filtração do extrato durante as quantificações, que levam a supressão na vazão nominal do sistema de nebulização e, conseqüentemente, afetam a nebulização do extrato e ao aumento do desvio padrão relativo (RSD) das quantificações. A frequência analítica foi de 15 determinações por hora e de 7,5 extrações por hora. Ressalta-se que a extração ácida e a limpeza do filtro são realizadas simultaneamente, seguido da avaliação dos sinais para o branco analítico.

Os teores de macro e micronutrientes determinados e certificados dos CRMS estão apresentados na TABELA 6.4.4.1. Com exceção do Fe, as eficiências de extração variaram de 80 a 113%. De modo geral, os teores determinados estão similares aos teores determinados off-line para os extratos de folhas de macieira (NIST 1515) e fígado bovino (NIST 1577b) para as determinações de Ca, Fe, K, Mg e Mn em ambos os CRMs avaliados, Ba e Cu em folhas de macieira (NIST 1515) e Na e Zn em fígado bovino (NIST 1577b). Para esses elementos as diferenças entre as eficiências de extração variaram para os dois procedimentos em uma média de 4%. Foi possível determinar Na e Sr no modo on-line em folhas de macieira (NIST 1515). A alta porcentagem de recuperação de Zn em folhas de macieira (NIST 1515) nas determinações on-line pode estar relacionada à contaminação da amostra durante a análise, enquanto a baixa recuperação do Cu em fígado bovino (NIST 1577b) pode ser devido à baixa concentração desse analito no extrato. A maioria dos teores determinados estão de acordo com os teores certificados de acordo com um teste t não pareado, sendo que os t calculados são inferiores ao t crítico (4,303). As exceções foram para Fe em ambos CRMs, Cu e Zn em fígado bovino (NIST 1577b) e Ca, K e Sr em folhas de macieira (NIST 1515).

TABELA 6.4.4.1 - Avaliação da extração fluxo-batelada com determinação de macro e micronutrientes em CRMs por ICP OES, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%.

CRM	Elemento	Teor Certificado	Extração fluxo-batelada	Eficiência de extração (%)
Folhas de macieira NIST 1515	Ba (mg kg ⁻¹)**	49 \pm 2	49 \pm 2	100
	Ca (%)*	1,536 \pm 0,015	1,32 \pm 0,04	87
	Cu (mg kg ⁻¹)**	5,64 \pm 0,24	5,6 \pm 0,3	99
	Fe (mg kg ⁻¹)**	83 \pm 5	32 \pm 3	39
	K (%)*	1,61 \pm 0,02	1,4 \pm 0,1	85
	Mg (%)*	0,271 \pm 0,008	0,25 \pm 0,02	91
	Mn (mg kg ⁻¹)*	54 \pm 3	49 \pm 2	90
	Na (mg kg ⁻¹)*	24,4 \pm 1,2	20 \pm 2	81
	Sr (mg kg ⁻¹)*	25 \pm 2	20 \pm 1	80
	Zn (mg kg ⁻¹)**	12,5 \pm 0,3	14 \pm 4	113
Fígado bovino NIST 1577b	Ca (mg kg ⁻¹)**	116 \pm 4	112 \pm 4	97
	Cu (mg kg ⁻¹)**	160 \pm 8	131 \pm 8	82
	Fe (mg kg ⁻¹)**	184 \pm 15	54 \pm 2	29
	K (%)**	0,994 \pm 0,002	0,9 \pm 0,1	91
	Mg (mg kg ⁻¹)**	601 \pm 28	549 \pm 63	91
	Mn (mg kg ⁻¹)**	10,5 \pm 1,7	9,3 \pm 0,6	89
	Na (%)**	0,242 \pm 0,006	0,21 \pm 0,03	87
Zn (mg kg ⁻¹)**	127 \pm 16	105 \pm 7	83	

*: 10 mg de CRM e **: 50 mg de CRM.

Os teores determinados de macro e micronutrientes nas extrações com tecidos vegetais estão apresentados na TABELA 6.4.4.2, juntamente com os teores determinados por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. Como observado anteriormente, os resultados estão de acordo com os teores determinados off-line para as folhas de espinafre, macieira e tomateiro, para os quais as variações de eficiências de extração foram em média 5% entre as determinações on-line e off-line. As maiores diferenças encontradas entre os modos de determinação on-line e off-line foram nas quantificações de Na e Zn, o que provavelmente se deve a maior facilidade de contaminação dos extratos com esses analitos. De modo geral, as quantificações de Na e Zn foram melhores aplicando-se a determinação on-line, que implica em menor manipulação da amostra e, conseqüentemente, menor possibilidade de contaminação.

TABELA 6.4.4.2 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro, valor médio \pm incerteza, n = 3 e intervalo de confiança de 95%

Amostra	Elemento	Extração fluxo-batelada	Digestão em micro-ondas	Eficiência de extração (%)
Folhas de espinafre	Ba (mg kg ⁻¹) **	2,9 \pm 0,3	3,2 \pm 0,1	89
	Ca (%) *	1,49 \pm 0,04	1,6 \pm 0,1	91
	Cu (mg kg ⁻¹) **	6,9 \pm 0,3	7,6 \pm 0,2	91
	Fe (mg kg ⁻¹) *	35 \pm 2	92 \pm 7	39
	K (%) *	7,5 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	115
	Mg (%) *	1,39 \pm 0,04	1,2 \pm 0,1	112
	Mn (mg kg ⁻¹) *	134 \pm 4	129 \pm 4	104
	Na (%) *	0,37 \pm 0,01	0,37 \pm 0,02	100
	Sr (mg kg ⁻¹) *	97 \pm 3	105 \pm 3	92
	Zn (mg kg ⁻¹) *	52 \pm 10	51 \pm 2	101
Folhas de Laranjeira	Ba (mg kg ⁻¹) *	22 \pm 1	23,4 \pm 0,3	93
	Ca (%) *	1,42 \pm 0,04	1,8 \pm 0,1	80
	Cu (mg kg ⁻¹) **	6,5 \pm 0,4	5,8 \pm 0,2	112
	Fe (mg kg ⁻¹) *	22 \pm 2	67 \pm 1	32
	K (%) *	1,7 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	94
	Mg (%) *	0,25 \pm 0,03	0,286 \pm 0,004	89
	Mn (mg kg ⁻¹) *	14,2 \pm 1	15,3 \pm 0,2	93
	Na (mg kg ⁻¹) *	84 \pm 5	105 \pm 16	80
	Sr (mg kg ⁻¹) *	51 \pm 4	58,2 \pm 0,5	88
	Zn (mg kg ⁻¹) *	13 \pm 2	15 \pm 1	89
Folhas de Tomateiro	Ba (mg kg ⁻¹) *	71 \pm 3	72 \pm 1	99
	Ca (%) *	3,4 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	89
	Cu (mg kg ⁻¹) **	11,2 \pm 0,5	11,7 \pm 0,2	95
	Fe (mg kg ⁻¹) *	65 \pm 4	206 \pm 11	32
	K (%) *	3,26 \pm 0,1	2,78 \pm 0,03	117
	Mg (%) *	0,42 \pm 0,05	0,45 \pm 0,03	94
	Mn (mg kg ⁻¹) *	70 \pm 3	70 \pm 1	100
	Na (mg kg ⁻¹) *	396 \pm 26	480 \pm 14	82
	Sr (mg kg ⁻¹) *	158 \pm 8	173 \pm 6	91
	Zn (mg kg ⁻¹) **	15 \pm 4	16,9 \pm 0,2	87

*: 10 mg de amostra e **: 50 mg de amostra.

A extração de macro e micronutrientes com detecção on-line por ICP OES também foi aplicada as amostras de tecidos animais, sendo os resultados obtidos pelos dois procedimentos apresentados na TABELA 6.4.4.3. Ao contrário do observado com as amostras de tecidos vegetais, foi observada uma diferença expressiva entre os valores determinados on-line e off-line.

TABELA 6.4.4.3 - Comparação da extração fluxo-batelada e da digestão em batelada para fígado bovino, músculo bovino e camarão, valor médio \pm incerteza, $n = 3$ e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Extração fluxo-batelada	Digestão em micro-ondas	Eficiência de extração (%)
Fígado bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	133 \pm 15	146 \pm 5	92
	Cu (mg kg ⁻¹)	255 \pm 18	253 \pm 8	100
	Fe (mg kg ⁻¹)	55 \pm 3	163 \pm 5	34
	K (%)	1,0 \pm 0,1	0,98 \pm 0,04	106
	Mg (mg kg ⁻¹)	622 \pm 40	545 \pm 16	114
	Mn (mg kg ⁻¹)	7,6 \pm 0,6	7,1 \pm 0,2	107
	Na (%)	0,21 \pm 0,03	0,19 \pm 0,01	109
	Zn (mg kg ⁻¹)	93 \pm 15	109 \pm 3	86
Músculo bovino	Ca (mg kg ⁻¹)	149 \pm 14	131 \pm 7	114
	Cu (mg kg ⁻¹)	2,3 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	108
	Fe (mg kg ⁻¹)	37 \pm 2	60 \pm 2	61
	K (%)	1,3 \pm 0,1	1,34 \pm 0,04	99
	Mg (mg kg ⁻¹)	818 \pm 41	824 \pm 25	99
	Na (%)	0,17 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	92
	Zn (mg kg ⁻¹)	122 \pm 11	141 \pm 2	87
Camarão	As (mg kg ⁻¹)	12 \pm 1	12 \pm 1	97
	Ba (mg kg ⁻¹)	1,9 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	107
	Ca (%)	0,36 \pm 0,03	0,38 \pm 0,01	93
	Cu (mg kg ⁻¹)	5,9 \pm 0,3	5,7 \pm 0,2	102
	Fe (mg kg ⁻¹)	6 \pm 1	31 \pm 1	19
	K (%)	0,26 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	91
	Mg (%)	0,19 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	100
	Mn (mg kg ⁻¹)	7,4 \pm 0,5	7,7 \pm 0,2	97
	Na (%)	1,8 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1	96
	Sr (mg kg ⁻¹)	56 \pm 6	57 \pm 2	98
Zn (mg kg ⁻¹)	36 \pm 5	48 \pm 1	75	

Foi observado uma boa concordância entre os teores determinados on-line e off-line para K, Mg e Na em músculo bovino e camarão, Ca em fígado bovino e camarão e Zn em fígado e músculo bovino. Maiores diferenças ocorreram nas eficiências de extração para Cu, que foram melhores para determinação on-line. Contudo, de forma geral as eficiências de extração ficaram em uma faixa de 86 a 114 para a maioria dos elementos, com exceção de Fe em todas as amostras como observado anteriormente e Zn em amostras de camarão que foi 75%.

O teste *F* e o teste *t* foram aplicados para comparar, respectivamente, a precisão e a exatidão da extração fluxo-batelada e a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. Na TABELA 6.4.4.4 estão apresentados os valores de *F* e *t* calculados, bem como os valores críticos para *F* e *t* para as amostras de tecidos vegetais. Não houve diferenças significativas entre os dois procedimentos

para a maioria dos elementos nas amostras de folhas de espinafre e folhas de tomateiro de acordo com teste F (TABELA 6.4.4.4), com exceção do Zn em ambas as amostras; Ba, Fe e Mg em folhas de espinafre e Cu e Mn em folhas de tomateiro. Por outro lado, diferenças significativas entre as precisões dos dois procedimentos para as amostras de folhas de laranjeira de acordo com teste F (TABELA 6.4.4.4) foram observadas para Ba, Fe, Mg, Mn, Na e Sr. As precisões foram mais baixas pela extração fluxo-batelada para a maioria dos elementos citados anteriormente, com exceção de Fe e Mg em folhas de espinafre e Na em folhas de laranjeira.

TABELA 6.4.4.4 - Comparação da precisão e exatidão da extração fluxo-batelada com a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados para folhas de espinafre, laranjeira e tomateiro aplicando-se o teste F e o teste t pareado, respectivamente, $n_1 = 3$ (extração), $n_2 = 5$ (digestão) e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Teste F		Teste t	
		F_{cal}	$F_{crí}$	t_{cal}	$t_{crí}$
Folhas de espinafre	Ba	14,974	6,940	1,747	4,303
	Ca	5,674	6,940	2,416	2,447
	Cu	2,053	6,940	3,620	2,447
	Fe	7,577	6,940	17,053	2,571
	K	1,992	6,940	14,456	2,447
	Mg	9,084	6,940	2,385	2,571
	Mn	1,099	6,940	1,622	2,447
	Na	2,265	6,940	0,010	2,447
	Sr	1,189	6,940	3,888	2,447
	Zn	43,900	6,940	0,078	4,303
Folhas de laranjeira	Ba	8,011	6,940	2,714	4,303
	Ca	2,367	6,940	8,339	2,447
	Cu	3,806	6,940	3,192	2,447
	Fe	11,455	6,940	39,698	4,303
	K	2,443	6,940	2,460	2,447
	Mg	61,957	6,940	1,918	4,303
	Mn	29,002	6,940	1,830	4,303
	Na	11,980	6,940	2,742	2,571
	Sr	48,726	6,940	3,375	4,303
	Zn	2,558	6,940	1,423	2,447
Folhas de tomateiro	Ba	3,100	6,940	0,716	2,447
	Ca	3,067	6,940	2,742	2,447
	Cu	9,493	6,940	1,924	4,303
	Fe	6,716	6,940	21,790	2,447
	K	2,483	6,940	17,708	2,447
	Mg	3,174	6,940	1,073	2,447
	Mn	9,047	6,940	0,026	4,303
	Na	3,329	6,940	6,271	2,447
	Sr	1,841	6,940	3,086	2,447
	Zn	221,931	6,940	0,989	4,303

De acordo com teste t pareado (TABELA 6.4.4.4) não houve diferenças significativas entre a maioria dos teores determinados pelos dois procedimentos. Diferenças significativas foram observadas para as determinações de Fe em todas as amostras, pois há uma baixa extração desse elemento nas amostras. Também foram observadas diferenças significativas nos teores de Cu, K e Sr em folhas de espinafre. Ca, Cu, K e Na em folhas de tomateiro e Ca, K, Na e Sr em folhas de laranjeira. Os altos teores de K determinados com a extração fluxo-batelada podem estar relacionados à contaminação da amostra durante o procedimento, enquanto que os baixos teores de Cu, Na e Sr determinados pelo mesmo procedimento podem ser causados pelas baixas concentrações desses analitos nas amostras. Os baixos teores de Ca nas amostras podem ser devido à extração incompleta desse analito da matriz.

Os mesmos testes estatísticos foram aplicados nas determinações de macro e micronutrientes em tecidos animais, sendo os F e t calculados e teóricos apresentados na TABELA 6.4.4.5. De acordo com teste F não houve diferença significativa entre as precisões dos dois procedimentos aplicados para a determinação de macro e micronutrientes nas amostras de músculo bovino e camarão, com exceção de Zn nas duas amostras, Na em músculo bovino e Ca e Sr em amostras de camarão (TABELA 6.4.4.5). Diferenças significativas foram observadas entre as precisões dos dois procedimentos para as amostras de folhas de espinafre, na qual foram observadas diferenças significativas para Ca, Mn, Na e Zn. As precisões foram inferiores na extração fluxo-batelada e isso pode ter ocorrido devido às oscilações na vazão do filtrado durante medidas on-line por ICP OES. Houve concordância para a maioria dos elementos determinados em todas as amostras pelos dois procedimentos, o que demonstra a boa exatidão do procedimento desenvolvido (TABELA 6.4.4.5). As exceções observadas foram Fe em todas as amostras, Mg em fígado bovino, Ca em músculo bovino e K e Zn em camarão. Os maiores teores de Mg e Ca quando comparados às digestões em batelada, podem ser decorrentes de contaminação. Enquanto os baixos teores de K e Zn nas amostras de camarão quando comparado a digestão em batelada pode ser devido a extrações incompletas desses analitos.

TABELA 6.4.4.5 - Comparação da precisão e exatidão da extração fluxo-batelada com a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados para fígado bovino, músculo bovino e camarão aplicando-se o teste *F* e o teste *t* pareado, respectivamente, $n_1 = 3$ (extração), $n_2 = 5$ (digestão) e intervalo de confiança de 95%.

Amostra	Elemento	Teste <i>F</i>		Teste <i>t</i>	
		<i>F</i> _{cal}	<i>F</i> _{crí}	<i>t</i> _{cal}	<i>t</i> _{crí}
Fígado bovino	Ca	7,838	6,940	1,390	4,303
	Cu	5,318	6,940	0,142	2,447
	Fe	0,295	6,940	35,479	2,447
	K	4,755	6,940	1,459	2,447
	Mg	5,920	6,940	4,324	4,303
	Mn	8,666	6,940	1,390	4,303
	Na	9,353	6,940	1,205	4,303
	Zn	19,831	6,940	1,852	2,447
Músculo bovino	Ca	3,868	6,940	2,728	2,447
	Cu	0,152	6,940	1,670	4,303
	Fe	1,421	6,940	16,623	4,303
	K	6,452	6,940	0,349	2,447
	Mg	2,696	6,940	0,282	2,447
	Na	9,331	6,940	1,451	4,303
	Zn	19,985	6,940	2,846	4,303
	Camarão	As	1,279	6,940	0,890
Ba		0,170	6,940	1,257	4,303
Ca		8,542	6,940	1,314	2,447
Cu		4,038	6,940	0,801	4,303
Fe		0,645	6,940	36,999	4,303
K		0,674	6,940	3,457	2,447
Mg		0,100	6,940	0,053	2,447
Mn		5,309	6,940	1,053	4,303
Na		0,138	6,940	1,229	2,447
Sr		11,296	6,940	0,257	4,303
Zn		10,385	6,940	4,381	4,303

6.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS

A agitação mecânica com barra magnética proporcionou adequadas eficiências de extração de macro e micronutrientes em folhas de espinafre e fígado bovino, que foram similares ao borbulhamento com ar e à sonicação, sendo selecionada visando simplificar o sistema de extração fluxo-batelada. Diversos reatores e filtros foram avaliados, sendo que os maiores problemas encontrados foram entupimentos dos filtros, redução da vazão durante a filtração e limpezas ineficientes entre as amostras. Assim, foram escolhidos reatores e filtros trocáveis a fim de aumentar a frequência analítica e possibilitar determinações on-line por ICP OES. A cinética de extração foi o parâmetro mais interessante avaliado neste trabalho, pois enquanto muitos procedimentos são baseados em tempos de extração maiores que

10 min^{44,47,52,53,69}, alguns elementos apresentam alta labilidade e podem ser extraídos com tempos de até 30 s (Cu, Mg, Mn e Na) em folhas de espinafre, independentemente da solução extratora usada. Por outro lado, a eficiência de extração do Fe foi baixa em todas as condições avaliadas, sendo que as quantidades de Fe extraídas das amostras não foram significativamente alteradas no intervalo avaliado, uma vez que a maior fração desse elemento está fortemente ligada à matriz. Ambos os métodos de detecção (off-line e on-line) se mostraram promissores para a determinação da maioria dos macros e micronutrientes avaliados e, em geral, os teores determinados estão de acordo com os teores certificados dos CRMs e os teores determinados nas amostras por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. O sistema de extração fluxo-batelada avaliado é de fácil confecção, operação e pode ser facilmente acoplado ao ICP OES para determinações on-line.

Capítulo 7

Conclusões Finais

7.1 - CONCLUSÕES FINAIS

Os sistemas de preparo de amostra em fluxo e fluxo-batelada desenvolvidos neste trabalho apresentam-se como alternativas promissoras no preparo de amostra de tecidos animais e vegetais para determinação de macro e micronutrientes por ICP OES. Em geral, não ocorreram problemas durante o preparo das amostras selecionadas para o desenvolvimento deste projeto em ambos os sistemas desenvolvidos, como: vazamentos, entupimentos e explosões. A maioria dos teores de macro e micronutrientes determinados nas amostras sólidas e líquidas estão de acordo com os teores certificados e determinados por digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. Os procedimentos propostos se mostraram rápidos, simples, confiáveis e com boas precisões e exatidões. Entretanto, aperfeiçoamentos são requeridos visando possibilitar o uso de tais sistemas em análises de rotina.

O sistema de digestão em fluxo assistido por radiação micro-ondas operado sob altas pressões e temperaturas necessita de alto nível de automação, uso de equipamentos sofisticados e resistentes a fim de possibilitar digestões eficientes, seguras e com baixos riscos aos usuários. Isso dificulta a disseminação do método, pois nem todos os laboratórios de rotina apresentam uma boa infraestrutura para a confecção de tais sistemas e ainda não há versões comerciais que possam ser adquiridas. Para confeccionar esse sistema um laboratório deve possuir oficinas especializadas que possibilitem a confecção de dispositivos usando diferentes materiais (metais, polímeros e cerâmicas) que sejam dedicados ao sistema e de mão de obra qualificada com conhecimentos em engenharia mecânica, eletrônica, computação e vidraria. Isso torna difícil a disseminação desse sistema por laboratórios de rotina. Dessa forma, a disponibilidade desse sistema é dependente de uma versão comercial, que ainda é uma realidade distante. Outra, dificuldade encontrada foi o acoplamento do sistema de digestão em fluxo com o ICP OES para realização de determinações on-line, pois a frequência analítica do método é inferior à frequência analítica do ICP OES. O aumento do número de reatores no sistema de digestão em fluxo seria uma alternativa para aumentar a frequência analítica do método ou o uso da injeção sequencial de amostra no sistema. Apesar dessas limitações, o sistema de digestão em fluxo foi viável para o preparo de amostras sólidas e líquidas complexas, no uso de diversos tipos de ácidos e possibilitou eficiências de digestão superiores a

70%. Foi possível realizar a determinação de analitos fortemente ligados a matriz, que não podem ser determinados por uma simples extração (Al, Fe, P e S).

O sistema de extração fluxo-batelada pode ser facilmente confeccionado em laboratórios de rotina, possibilita a realização de determinações on-line por ICP OES e o uso de ácido clorídrico diluído. Contudo, apresenta como limitação a determinação de analitos fortemente ligados à matriz, necessita de uma etapa de limpeza dos frascos em batelada, não permite o reuso dos filtros após a etapa de extração e requer maiores volumes de extrator e massas de amostra quando comparado aos sistemas em fluxo usuais. O desenvolvimento de reatores e filtros dinâmicos, que sejam de fácil limpeza e que permitam o reuso do filtro, é uma alternativa interessante para superar algumas dessas desvantagens. O uso de menores volumes de solução extratora e massas de amostra, poderia ser alcançado medindo-se sinais transientes, que não foi feita neste trabalho devido às características do programa de aquisição de sinais do equipamento utilizado. Por fim, a determinação de elementos que estão fortemente ligados a matriz é dependente de métodos mais drásticos, que promovem a degradação da matriz, tais como a digestão ácida. Assim, essa limitação não pode ser contornada no sistema de extração fluxo-batelada.

O sistema de extração fluxo-batelada apresenta vantagens ao sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas, pois possibilita a determinação da maioria dos macros e micronutrientes determinados em análise de rotina, é um sistema de baixo custo de confecção e operação e permite a realização de determinações on-line por ICP OES. Essas características do sistema de extração fluxo-batelada são ideais para análises de rotina, que buscam o uso de procedimentos simples, baratos e dinâmicos. Nesse contexto, avaliou-se nesse projeto o desempenho de dois sistemas de preparo de amostra, sendo um deles automatizado e de alta complexidade, enquanto o outro se caracterizava por baixa complexidade e fácil operação. Como conclusões finais tem-se que nem sempre em uma análise de rotina são requeridos procedimentos complexos, mas simples alternativas podem ser o melhor caminho para resolver problemas analíticos típicos de laboratórios de preparo de amostra e que ainda carecem de estudos na área e equipamento comercial para viabilizar o uso de procedimentos de preparo de amostra em fluxo para aplicação em análises de rotina.

Capítulo 8

Referências Bibliográfica

8.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANTOS, D.; NÓBREGA, J. A.; CARVALHO, G. G. A. & KRUG, F. J. "Erros sistemáticos no preparo de amostras". In: Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elementar. KRUG, F. J. & ROCHA, F. R. P. (Eds). São Paulo, EditSBQ; 2016. p. 56-102.
2. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. & STANLEY, R. C. Fundamentos Da Química Analítica. 8ª ed. São Paulo, Editora Thomson, 2007.
3. PAULA, C. E. R.; BRUM, D. M.; CALDAS, L. F. S. & CASSELLA, R. J. "Avaliação de métodos de extração para a determinação de cromo e níquel em formulações farmacêuticas e em matérias-primas usadas na fabricação de medicamentos à base de cefalexina e ciprofloxacino". Quim. Nova, 35 (9) : 1858, 2012.
4. PEDRERO, Z. & MADRID, Y. "Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review." Anal. Chim. Acta, 634 (2) : 135, 2009.
5. NIEGEL, C. & MATYSIK, F. M. "Analytical methods for the determination of arsenosugars - A review of recent trends and developments." Anal. Chim. Acta; 657 (2) : 83, 2010.
6. DIETZ, C.; SANZ, J.; SANZ, E.; MUÑOZ-OLIVAS, R. & CÁMARA, C. "Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation." J. Chromatogr. A, 1153 (1-2) : 114, 2007.
7. SAVONINA, E. Y.; FEDOTOV, P. S. & WENNRICH, R. "Continuous-flow fractionation of selenium in contaminated sediment and soil samples using rotating coiled column and microcolumn extraction." Talanta, **88** : 369, 2012.
8. MESTER, Z. & STURGEON, R. Sample Preparation For Trace Element Analysis. 1ª ed. Amsterdam, Elsevier B.V., 2003.
9. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A. & WORSFOLD, P. J. Flow Analysis With Spectrophotometric And Luminometric Detection. 1ª ed. Waltham, Elsevier; 2012.
10. ROSENDE, M. & MIRÓ, M. "Recent trends in automatic dynamic leaching tests for assessing bioaccessible forms of trace elements in solid substrates." Trends Anal. Chem., **45** : 67, 2013.
11. KOLEV, S. D. & MCKELVIE, I. D. Advances in Flow Injection Analysis And Related Techniques. Amsterdam, Elsevier, 2008.
12. MASON, C. J.; COE, G.; EDWARDS, M. & RIBY, P. "Development of a wide bore flow through microwave digestion device for the determination of trace metals in soil." Analyst, 125 (10) : 1875, 2000.
13. BOSS, C. B. & FREDEEN, K. J. Concepts, Instrumentation And Techniques In Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. 3ª ed., Shelton, Perkin-Elmer, 2004.
14. OLESIK, J. W. "Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS - An evaluation and assessment of remaining problems." Anal. Chem., 63 (1) : 12A, 1991.
15. EBDON, L.; FOULKES, M. & SUTTON, K. "Slurry nebulization in plasmas." J. Anal. At. Spectrom., 12 (2) : 213, 1997.
16. SCHEFFLER, G.L.; DRESSLER, V.L. & POZEBON, D. "Rice Slurry Analysis Using Mixed-Gas Plasma and Axially Viewed ICP OES." Food Anal Methods., 7 (7) : 1415, 2014.
17. WILTSCHE, H.; WINKLER, M. & TIRK, P. "Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry." J. Anal. At. Spectrom., 30 (10) : 2223, 2015.
18. CONI, E.; BOCCA, A.; COPPOLELLI, P.; CAROLI, S.; CAVALLUCCI, C. & MARINUCCI, M. T. "Minor and trace element content in sheep and goat milk and

- dairy products." *Food Chem.*, 57 (2) : 253, 1996.
19. 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 (3) : 435, 2003.
 20. OLIVEIRA, E. "Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends." *J. Braz. Chem. Soc.*, 14 (2) : 174, 2003.
 21. LAMBLE, K. J. & HILL, S. J. "Microwave digestion procedures for environmental matrices." *Analyst*, 123 (7) : 103R, 1998.
 22. LEUFROY, A.; NOËL, L.; BEAUCHEMIN, D. & GUÉRIN, T. "Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method." *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (9) : 2849, 2012.
 23. NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M. & TATRO, M. "Sample preparation in alkaline media." *Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc.*, 61 (5) : 465, 2006.
 24. BARROS, J. A. V. A.; SOUZA, P. F.; SCHIAVO, D. & NÓBREGA, J. A. "Microwave-assisted digestion using diluted acid and base solutions for plant analysis by ICP OES." *J. Anal. At. Spectrom.*, 31 (1) : 337, 2016.
 25. FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO M. F. & KNAPP, G. "Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications." *Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc.*, 62 (9) : 1051, 2007.
 26. MONK, D.J.; SOANE, D. S. & HOWE, R. T. "A review of the chemical reaction mechanism and kinetics for hydrofluoric acid etching of silicon dioxide for surface micromachining applications." *Thin Solid Films*, 232 (1) : 1, 1993.
 27. TODOLI, J. L.; MERMET, J. M.; CANALS, A. & HERNANDIS, V. "Acid effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with different nebulizers operated at very low sample consumption rates." *J. Anal. At. Spectrom.*, 13 (1) : 55, 1998.
 28. BULDINI, P. L.; RICCI, L. & SHARMA, J. L. "Recent applications of sample preparation techniques in food analysis." *J. Chromatogr A.*, 975 (1) : 47, 2002.
 29. BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A. & KORN, M. G. A. "Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products." *Food Chem.*, 175 : 212, 2015.
 30. NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; CAMPOS JORDÃO, C. E. K. M. A. & POLLO, F. "Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become?" *Talanta*, 98 : 272, 2012.
 31. BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E. & NÓBREGA, J. A. "Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent." *Microchem. J.*, 99 (2) : 193, 2011.
 32. CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P.C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A. & KORN, M. G. A. "A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry." *Talanta*, 78 (4-5) : 1378, 2009.
 33. QUARESMA, M. C.; CASSELLA, R. J.; GUARDIA, M. & SANTELLI, R. E. "Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination." *Talanta*, 62 (4) : 807, 2004.
 34. PICHLER, U.; HAASE, A.; KNAPP, G. & MICHAELIS, M. "Microwave-enhanced flow system for high-temperature digestion of resistant organic materials." *Anal. Chem.*, 71 (18) : 4050, 1999.
 35. WILTSCHE, H. & KNAPP, G. Flow digestion systems with microwave and

- conductive heating. In: Microwave-Assisted Sample Preparation For Trace Element Analysis. FLORES, E. M. M. (Ed.) Polonia, Elsevier; 2014, p. 253-280.
36. STURGEON, R. E.; WILLIE, S. N.; METHVEN, B. A.; LAM, J. W. H. & MATUSIEWICZ, H. "Continuous-flow microwave-assisted digestion of environmental samples using atomic spectrometric detection." *J. Anal. At Spectrom.*, 10 (11) : 981, 1995.
 37. BEARY, E. S.; PAULSEN, P. J.; JASSIE, L. B. & FASSETT J. D. "Determination of environmental lead using continuous-flow microwave digestion isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry." *Anal. Chem.*, 69 (4) : 758, 1997.
 38. WILTSCHE, H.; TIRK, P.; MOTTER, H.; WINKLER, M. & KNAPP, G. "A novel approach to high pressure flow digestion." *J. Anal. At Spectrom.*, 29 (2) : 272, 2014.
 39. 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.*, 14 (4) : 683, 1999.
 40. HAIBER, S. & BERNDT, H. "A novel high-temperature (360 °C)/high-pressure (30 MPa) flow system for online sample digestion applied to ICP spectrometry." *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (1) : 52, 2000.
 41. 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 (12) : 1615, 2002.
 42. BIAN, Q. Z.; JACOB, P.; BERNDT, H. & NIEMAX, K. "Online flow digestion of biological and environmental samples for inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy (ICP–OES)." *Anal. Chim. Acta*, 538 (1-2) : 323, 2005.
 43. DA-COL, J. A.; DOMENE, S. M. A. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Fast determination of Cd, Fe, Pb, and Zn in food using AAS." *Food Anal. Methods*, 2 (2) : 110, 2009.
 44. DONATI, G. L.; NASCENTES C. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; ARRUDA, M. A. Z. & NÓBREGA J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry." *Microchem. J.*, 82 (2) : 189, 2006.
 45. HORNER, N. S. & BEAUCHEMIN, D. "A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice." *Anal. Chim. Acta*, 717 : 1, 2012.
 46. REZENDE, H. C.; ALMEIDA, I. L. S.; COELHO, L. M.; COELHO, N. M. M. & MARQUES, T. L. "Non-chromatographic methods focused on speciation of arsenic and selenium in food and environmental samples." *Sample Prep.*, 2 (1) : 31, 2015.
 47. MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. & BLOCK, M. F. M. "Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe, P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by HCl extraction method." *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 15 (2) : 141, 1984.
 48. MARQUES, T. L.; WILTSCHE, H.; MOTTER, H.; NÓBREGA, J. A. & KNAPP, G. "High pressure microwave-assisted flow digestion system using a large volume reactor-feasibility for further analysis by inductively coupled plasma-based techniques." *J. Anal. At Spectrom.*, 30 (9) : 1898, 2015.
 49. NÓBREGA, J. A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A. & BARNES, R. M. "Determination of elements in biological and botanical materials by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry after extraction with a tertiary amine reagent." *J. Anal. At Spectrom.*, 12 (10) : 1239, 1997.
 50. 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 (10) : 1243,

- 1997.
51. MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G. & FLORES, E. M. M. "Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion." *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2) : 1125, 2010.
 52. BASSON, W. D. & BÖHMER, R. G. "An investigation into more rapid procedures for preparing leaf-tissue samples for analysis." *Analyst*, 97 (1155) : 482, 1972.
 53. HUNT, J. "Dilute hydrochloric acid extraction of plant material for routine cation analysis." *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 13 (1) : 49, 1982.
 54. NOVAES, H. B.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B. & PÉREZ, D. V. "Determination of nitrate in lettuce by ion chromatography after microwave water extraction." *Quim. Nova*, 32 (6) : 1647, 2009.
 55. KORN, M. G. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N. & KORN, M. "Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review." *Appl. Spectrosc. Rev.*, 43 (2) : 67, 2008.
 56. SANTOS, D.; KRUG, F. J.; PEREIRA, M. G. & KORN, M. "Currents on ultrasound-assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination." *Appl. Spectrosc. Rev.*, 41 (3) : 305, 2006.
 57. TEIXEIRA, L. S.; VIEIRA, H. P.; WINDMÖLLER, C. C. & NASCENTES, C. C. "Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry." *Talanta*, **119** : 232, 2014.
 58. PANIWNKY, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J. P. & MASON, T. J. "The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*." *Ultrason. Sonochem.*, 8 (3) : 299, 2001.
 59. KRISHNA, M. V. B. & ARUNACHALAM, J. "Ultrasound-assisted extraction procedure for the fast estimation of major, minor and trace elements in lichen and mussel samples by ICP-MS and ICP-AES." *Anal. Chim. Acta*, 522 (2) : 179, 2004.
 60. NASCENTES, C. C.; KORN, M. & ARRUDA, M. A. Z. "A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from Vegetables." *Microchem. J.*, 69 (1) : 37, 2001.
 61. KALENGA, P. M.; CUKROWSKA, E.; TUTU, H. & CHIMUKA, L. "Characterization of south african coal for metals, inorganic and organic sulfur compounds." *South African J. Chem.*, **64** : 254, 2011.
 62. BORKOWSKA-BURNECKA, J. "Microwave assisted extraction for trace element analysis of plant materials by ICP-AES." *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (6) : 633, 2000.
 63. GONZÁLEZ, A. M. & BARNES, R. M. "Comparison of microwave-assisted extraction and waste extraction test (WET) preparation for inductively coupled plasma spectroscopic analyses of waste samples." *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2) : 255, 2002.
 64. SAVONINA, E. Y.; FEDOTOV, P. S. & WENNRICH, R. "Fractionation of Sb and As in soil and sludge samples using different continuous-flow extraction techniques." *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (5) : 1441, 2012.
 65. BUANUAM, J.; TIPTANASUP, K.; SHIOWATANA, J.; MIRÓ, M. & HANSEN, E. H. "Development of a simple extraction cell with bi-directional continuous flow coupled on-line to ICP-MS for assessment of elemental associations in solid samples." *J. Environ. Monit.*, 8 (12) : 1248, 2006.
 66. LEUFROY, A.; NOËL, L.; BEAUCHEMIN, D. & GUÉRIN, T. "Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood." *Food Chem.*, 135 (2) : 623, 2012.

67. DUFAILY, V.; GUÉRIN, T.; NOËL, L.; FRÉMY, J. M. & BEAUCHEMIN, D. "A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Anal. At Spectrom.*, 23 (9) : 1263, 2008.
68. BUANUAM, J. & WENNRICH, R. "Study of leachability and fractional alteration of arsenic and co-existing elements in stabilized contaminated sludge using a flow-through extraction system." *J. Environ. Monit.*, 13 (6) : 1672, 2011.
69. HERRERA, M. C. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Dynamic approach based on iterative change of the flow direction for microwave-assisted leaching of cadmium and lead from plant prior to GF-AAS." *J. Anal. At Spectrom.*, 17 (11) : 1530, 2002.
70. MORENO-CID, A. & YEBRA, M. C. "Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction." *Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc.*, 57 (5) : 967, 2002.
71. YEBRA, M. C. & MORENO-CID, A. "On-line determination of manganese in solid seafood samples by flame atomic absorption spectrometry." *Anal. Chim. Acta*, 477 (1) : 149, 2003.
72. YEBRA-BIURRUN, M. C.; CANCELA-PÉREZ, S. & MORENO-CID-BARINAGA, A. "Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples." *Anal. Chim. Acta*, 533 (1) : 51, 2005.
73. YEBRA, M. C. & CANCELA, S. "Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from legumes and dried fruit samples coupled with on-line preconcentration-flame atomic absorption spectrometry." *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (4) : 1093, 2005.
74. YEBRA-BIURRUN, M. C.; MORENO-CID, A. & CANCELA-PÉREZ, S. "Fast on-line ultrasound-assisted extraction coupled to a flow injection-atomic absorption spectrometric system for zinc determination in meat samples." *Talanta*, 66 (3) : 691, 2005.
75. FALKOVA, M.; ALEXOVIČ, M.; PUSHINA, M.; BULATOV, A.; MOSKVIN, L. & ANDRUCH, V. "Fully automated on-line flow-batch based ultrasound-assisted surfactant-mediated extraction and determination of anthraquinones in medicinal plants." *Microchem. J.*, **116** : 98, 2014.
76. DOMÍNGUEZ, M. A.; GRÜNHUT, M.; PISTONESI, M. F.; DI NEZIO, M. S. & CENTURIÓN, M. E. "Automatic flow-batch system for cold vapor atomic absorption spectroscopy determination of mercury in honey from argentina using online sample treatment." *J. Agric. Food Chem.*, 60 (19) : 4812, 2012.
77. LIMA, M. B.; INSAUSTI, M.; DOMINI, C. E.; PISTONESI, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. & BAND, B. S. F. "Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction." *Talanta*, **89** : 21, 2012.
78. KARLBERG, B. & PACEY, G. E. *Flow Injection Analysis - A Practical Guide*. 1^a ed. Amsterdam, Elsevier, 1989.
79. TROJANOWICZ M. *Advances In Flow Analysis*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008.
80. EL-RAHMAN, M. K. A. & SALEM, M. Y. "Ion selective electrode (in-line analyzer) versus UV-spectroscopy (at-line analyzer); which strategy offers more opportunities for real time monitoring of the degradation kinetics of pyridostigmine bromide." *Sensors Actuators B Chem.*, **220** : 255, 2015.
81. MEP INSTRUMENTS. What are the differences between in-line, on-line, at-line and off-line analysers. Disponível em:
<http://www.mep.net.au/processchemist/PC_2/MEP_Inline_On_line_At_line_Off_line_Analysers.pdf> Acesso: 10 jan. 2016.

82. KALILI, K. M. & VILLIERS, A. "Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins, Part I: Theoretical considerations." *J. Chromatogr. A*, **1289** : 58, 2013.
83. PRIEGO-CAPOTE, F. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Dynamic ultrasound-assisted leaching of essential macro and micronutrient metal elements from animal feeds prior to flame atomic absorption spectrometry." *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (5) : 1376, 2004.
84. SARI, F. & VELIOGLU, Y. S. "Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea." *J. Food Compos. Anal.*, **24** (8) : 1130, 2011.
85. WIJAYA, N.; CHOO, T. K. & ZHANG, L. "Generation of ultra-clean coal from Victorian brown coal: Effect of hydrothermal treatment and particle size on coal demineralization and the extraction kinetic of individual metals." *Energy and Fuels*, **26** (8) : 5028, 2012.
86. SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; FRESCURA, V. L. A. & CURTIUS, A. J. "Evaluation of slurry preparation procedures for the simultaneous determination of Hg and Se in biological samples by axial view ICP OES using on-line chemical vapor generation." *Anal. Chim. Acta*, **548** (1-2) : 166, 2005.
87. BEZERRA, M. A.; CASTRO, J. T.; MACEDO, R. C. & SILVA, D. G. "Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling." *Anal. Chim. Acta*, **670** (1-2) : 33, 2010.
88. CARRILHO, E. N. V. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A.; SOUZA, G. B. & CRUZ, G. M. "An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion." *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371** (4) : 536, 2001.
89. 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** (2) : 269, 2001.
90. BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A. & FLORES, E. M. M. "Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid." *Talanta*, **83** (5) : 1324, 2011.
91. FROES, R. E. S.; BORGES NETO, W.; NAVEIRA, R. L. P.; SILVA, N. C.; NASCENTES, C. C. & SILVA, J. B. B. "Exploratory analysis and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) applied in the determination of metals in soft drinks." *Microchem. J.*, **92** (1) : 68, 2009.
92. DA SILVA, J. C. J.; CADORE, S.; NÓBREGA, J. A. & BACCAN, N. "Dilute-and-shoot procedure for the determination of mineral constituents in vinegar samples by axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES)." *Food Addit. Contam.*, **24** (2) : 130, 2007.
93. PRATT, K. W.; KINGSTON, H. M.; MACCREHAN, W. A. & KOCH, W. F. "Voltammetric and liquid chromatographic identification of organic products of microwave-assisted wet ashing of biological samples." *Anal. Chem.*, **60** (19) : 2024, 1988.
94. DANIEL, M. M.; BATCHELOR, J. D.; RHOADES, C. B. & JONES, B. T. "The effect of digestion temperature on matrix decomposition using a high pressure asher." *At Spectrosc.*, **19** (6) : 198, 1998.
95. KHAN, N.; JEONG, I. S.; HWANG, I. M.; KIM, J. S.; CHOI, S. H.; NHO, E. Y.; CHOI, J. Y.; PARK, K. S. & KIM, K. S. "Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)." *J. Food Compos. Anal.*, **24** (8) : 1130, 2011.

- Food Chem., **147** : 220, 2014.
96. SUTUROVIĆ, Z.; KRAVIĆ, S.; MILANOVIĆ, S.; ĐUROVIĆ, A. & BREZO, T. "Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step." Food Chem., **155** : 120, 2014.
 97. NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ-MARÍN, A. L.; POLVILLO, O.; FERNÁNDEZ-CABANÁS, V. M.; CARRIZOSA, J.; URRUTIA, B. & SERRADILLA, J. M. "Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats." Food Chem., **190** : 244, 2016.
 98. WELNA, M. & SZYMCZYCHA-MADEJA, A. "Effect of sample preparation procedure for the determination of As, Sb and Se in fruit juices by HG-ICP-OES." Food Chem., **159** : 414, 2014.
 99. SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JEDRYCZKO, D. & POHL, P. "Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices." Trends Anal. Chem., **55** : 68, 2014.
 100. MCKINSTY, P.; INDYK, H. & KIM, N. "The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES)." Food Chem., **65** (2) : 245-252, 1999.
 101. SOLA-LARRAÑAGA, C. & NAVARRO-BLASCO, I. "Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS." Food Chem., **115** (3) : 1048, 2009.
 102. FROES, R. E. S.; NETO, W. B.; SILVA, N. O. C. E.; NAVEIRA, R. L. P.; NASCENTES, C. C. & SILVA, J. B. B. "Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry." Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc., **64** (6) : 619, 2009.
 103. SZYMCZYCHA-MADEJA, A. & WELNA, M. "Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry." Food Chem., **141** (4) : 3466, 2013.
 104. CINDRIĆ, I. J.; ZEINER, M.; KRÖPPL, M. & STINGEDER, G. "Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices." Microchem. J., **99** (2) : 364, 2011.
 105. POTORTÌ, A. G.; DI BELLA, G.; LO TURCO, V.; RANDO, R. & DUGO, G. "Non-toxic and potentially toxic elements in Italian donkey milk by ICP-MS and multivariate analysis." J. Food Compos. Anal., **31** (1) : 161, 2013.
 106. STEWART, L. J. M. & BARNES, R. M. "Flow-through, microwave-heated digestion chamber for automated sample preparation prior to inductively coupled plasma spectrochemical analysis." Analyst, **119** (5) : 1003, 1994.
 107. 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** (1-2) : 41, 2000.
 108. TREVIZAN, L. C. & NÓBREGA, J. A. "Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications." J. Braz. Chem. Soc., **18** (4) : 678, 2007.
 109. YOU, J.; GAO, S.; JIN, H.; LI, W.; ZHANG, H. & YU, A. "On-line continuous flow ultrasonic extraction coupled with high performance liquid chromatographic separation for determination of the flavonoids from root of *Scutellaria baicalensis* Georgi." J. Chromatogr. A., **1217** (12) : 1875, 2010.
 110. WU, L.; HU, M.; LI, Z.; SONG, Y.; YU, C.; ZHANG, H.; YU, A.; MA, Q. & WANG, Z. "Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables." Food Chem., **192** : 596, 2016.