

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Kéllen Francine Anschau

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE  
SOLUÇÃO DE NUTRIÇÃO ENTERAL MEDIANTE SISTEMA DE  
DIGESTÃO DE ALTA PRESSÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO  
MULTIELEMENTAR**

Santa Maria, RS  
2018

Kéllen Francine Anschau

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE SOLUÇÃO  
DE NUTRIÇÃO ENTERAL MEDIANTE SISTEMA DE DIGESTÃO DE ALTA  
PRESSÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Santa Maria, RS  
2018

Anschau, Kéllen Francine  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE  
SOLUÇÃO DE NUTRIÇÃO ENTERAL MEDIANTE SISTEMA DE DIGESTÃO  
DE ALTA PRESSÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO  
MULTIELEMENTAR / Kéllen Francine Anschau.- 2018.  
66 p.; 30 cm

Orientador: Edson Irineu Müller  
Coorientador: Rodrigo Cordeiro Bolzan  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Solução de nutrição enteral 2. Preparo de amostra 3.  
Câmara única de reação 4. Peróxido de Hidrogênio I. Müller,  
Edson Irineu II. Bolzan , Rodrigo Cordeiro III. Título.

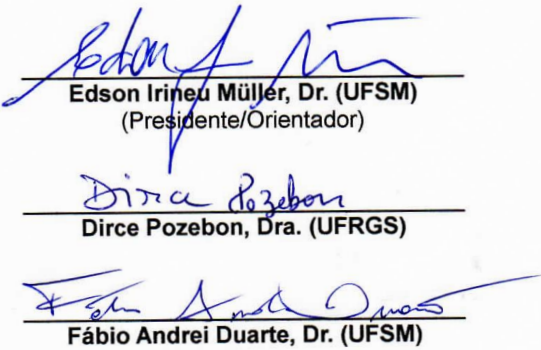
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

**Kéllen Francine Anschau**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE SOLUÇÃO  
DE NUTRIÇÃO ENTERAL MEDIANTE SISTEMA DE DIGESTÃO DE ALTA  
PRESSÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

**Aprovado em 01 de março de 2018:**



**Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

**Dirce Pozebon, Dra. (UFRGS)**

**Fábio Andrei Duarte, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2018

## DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retidas na literatura então devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para a obtenção de qualquer outro grau.



---

Kellen Francine Anschau

## AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria**, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Edson Irineu Müller**, pela orientação durante esses anos, pela amizade, pela paciência em transmitir seus conhecimentos, pela total disponibilidade em discutir as tarefas desenvolvidas, principalmente por ser um exemplo de profissional.

A Prof. Dra. **Dirce Pozebon**, por fazer parte da banca examinadora e pelas sugestões que contribuíam para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, por fazer parte da banca examinadora, por suas validas contribuições para esse trabalho, por todos os ensinamentos compartilhados e pelo exemplo profissional.

Ao prof. Dr. **Rodrigo Cordeiro Bolzan** e Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler** por participarem da banca de qualificação e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos demais professores do setor de Química Industrial e Ambiental, Prof. Dr. **Cezar Augusto Bizzi**, Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, Prof. Dr. **José Neri Gottfried Paniz**, Prof<sup>a</sup>. Dra. **Paola de Azevedo Mello** e Prof<sup>a</sup>. Dra. **Rochele Sogari Picoloto**, pelas oportunidades de crescimento profissional que foram concebidas a mim, por todos os ensinamentos compartilhados e exemplo de profissionalismo.

A **Ingrid Brikalski** e a **Tássia Seeger** pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pela amizade, apoio e companheirismo demonstrado.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir e Valéria**, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Em especial a minha família, a minha mãe **Leane** meu pai **Mario**, pelo apoio, incentivo, compreensão e apoio incondicional. Agradeço também, ao meu irmão **Maicon**, pela ajuda durante e apoio durante todos esses anos.

A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento.

Frederick Herzberg

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE SOLUÇÃO DE NUTRIÇÃO ENTERAL MEDIANTE SISTEMA DE DIGESTÃO DE ALTA PRESSÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR

AUTORA: Kéllen Francine Anschau

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos de decomposição de amostra de solução de nutrição enteral (SNE), empregando decomposição assistida por radiação micro-ondas (MWAD) em sistema de câmara única de reação (SRC) com subsequente determinação multielementar pelas técnicas de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foram avaliados a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30, 40 e 50% v/v), a temperatura de aquecimento do sistema SRC (190, 230 e 250 °C), o volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6, 8 e 10 mL) e a massa de amostra (250, 500, 750, 1000 e 1500 mg). A avaliação da melhor condição foi feita a partir dos resultados da concentração de C residual e acidez nos digeridos. A melhor condição para o sistema SRC com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% v/v, temperatura de 250 °C e massa de 1000 mg de SNE. Nessa condição, a concentração de C residual obtida foi 711 mg L<sup>-1</sup> e a acidez residual desprezível. Posteriormente, nessas condições o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi substituído pelo HNO<sub>3</sub> concentrado. Com o uso de HNO<sub>3</sub> concentrado obteve-se uma concentração de C residual de 123 mg L<sup>-1</sup> e uma elevada acidez residual (7,7 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>). Além disso, foi realizada a avaliação da eficiência de decomposição dos componentes da formulação das SNE, separadamente. Para isso, caseinato de sódio, xarope de glicose e óleo de girassol e canola foram decompostos com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% v/v. Observou-se que o caseinato de sódio e os óleos de girassol e canola apresentaram os maiores concentrações de carbono residual. Além disso, foi realizada a decomposição de compostos orgânicos refratários à oxidação por via úmida tais como, histidina, triptofano, fenilalanina e ácido linoleico, utilizando o sistema SRC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% e HNO<sub>3</sub> concentrado. Os valores de concentração de carbono residual (RCC), para estas substâncias orgânicas refratárias, foram significativamente menores do que reportados na literatura, provavelmente devido às condições de pressão e temperatura mais drásticas permitidas pelo sistema SRC. Por fim, foi feita a determinação de As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Se e Zn por ICP OES e ICP-MS e não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos. A exatidão também foi avaliada mediante análise de um material de referência (NIST 8435 *Whole Milk Powder*).

**Palavras-chave:** Solução de nutrição enteral, preparo de amostra, câmara única de reação, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF SAMPLE PREPARATION METHODS USING HIGH PRESSURE DIGESTION SYSTEM FOR SUBSEQUENT MULTIELEMENT DETERMINATION IN ENTERAL NUTRITION SOLUTION

AUTHOR: Kéllen Francine Anschau  
ADVISOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

In this work two methods of sample preparation for the digestion of enteral nutrition solution (SNE) using microwave assisted digestion (MWAD) in a single reaction chamber (SRC) system and subsequent multielement determination by plasma-based techniques (ICP OES and ICP-MS) were evaluated. For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parameters such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (30, 40 and 50%), temperature of the SRC system (190, 230 and 250 ° C), volume of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6, 8 and 10 mL) and the sample mass (ranging from 250 mg to 1500 mg) were investigated. The evaluation of the best condition was made based on the concentration of residual C and the residual acidity of the digests. The best condition for the SRC system with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 8 mL of 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, temperature of 250 ° C and mass of 1000 mg of SNE. In this condition, the residual C concentration obtained was 711 mg L<sup>-1</sup> and negligible residual acidity. Subsequently, the best condition obtained with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was also applied to concentrated HNO<sub>3</sub>. Using concentrated HNO<sub>3</sub>, a residual C concentration of 123 mg L<sup>-1</sup> and a high residual acidity (7,7 mol L<sup>-1</sup> of HNO<sub>3</sub>) were obtained. In addition, the decomposition efficiency of the components of the SNE formulation were evaluated. For this, sodium caseinate, glucose syrup and sunflower and canola oils were digested using 8 mL of 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It was observed that sodium caseinate and sunflower and canola oils had the highest values of residual carbon. In addition, wet digestion of refractory organic compounds such as histidine, tryptophan, phenylalanine and linoleic acid was performed using the SRC system with 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and concentrated HNO<sub>3</sub>. The values of residual carbon content (RCC) obtained for these refractory organic substances were significantly lower than reported in the literature, probably due to the more drastic pressure and temperature conditions allowed by the SRC system. Finally, the determination of As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Se and Zn were performed by ICP OES and ICP-MS and were not observed significant differences between the results obtained by the methods that used 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and concentrated HNO<sub>3</sub>. The accuracy was also evaluated with a reference material (NIST 8435 Whole Milk Powder).

**Keywords:** Enteral nutrition solution, sample preparation, single reaction chamber, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração do sistema de decomposição por câmara única de reação (SRC), Milestone. ....	22
Figura 2- Etapas envolvidas na decomposição de solução de nutrição enteral, utilizando o sistema de SRC. A) Frasco reacional de PTFE, com a adição de 130 mL de H <sub>2</sub> O e 5 mL de HNO <sub>3</sub> ; B) Frascos de 40 mL de quartzo, com 1 g de amostra e 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50% v/v; C) Frascos com a amostra são fixados no rotor; D) Introdução das amostras na cavidade; E) Fechamento manual e com trava de segurança; F) Pressurização do sistema com até 40 bar com argônio; G e H) Frascos com as amostras decompostas, depois de serem retirados da cavidade. ....	31
Figura 3- Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados. ....	33
Figura 4- Concentração de C residual para a decomposição de 1 g de SNE com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	35
Figura 5- Concentração de C residual para diferentes temperaturas decomposição de 1 g de SNE com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	36
Figura 6- Concentração de C para diferentes volumes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%, com 1 g de SNE e temperatura de 250 °C. ....	37
Figura 7- Concentração de C para a decomposição de diferentes massas de SNE, a temperatura de 250 °C com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	39
Figura 8- Gráfico da pressão e temperatura, limitando o sistema SCR a 80 bar (-) pressão (-) temperatura com 500 mg de SNE com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	40
Figura 9- Gráfico da pressão e temperatura, limitando o sistema SCR a 160 bar (-) pressão (-) temperatura com 1000 mg de SNE com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	40
Figura 10- Concentração de C residual, utilizando 500 mg de SNE com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50% a 80 e 160 bar. ....	41
Figura 11- Concentração de C residual e concentração de acidez residual (■ mol L <sup>-1</sup> ) para diferentes massas de SNE, temperatura de 250°C e volume de 8 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado. ....	42
Figura 12- Concentração de C residual em função da massa de óleo de canola digerido a 250°C com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	44
Figura 13- Concentração de C residual em função da massa de óleo de girassol digerido a 250 °C com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	44
Figura 14- Concentração de C residual em função da massa de caseinato de sódio digerido a 250°C com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	45
Figura 15- Concentração de C residual em função da massa de xarope de glicose a 250°C com 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50%. ....	45
Figura 16- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de histidina a 250°C. ....	47
Figura 17- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de triptofano a 250°C. ....	48
Figura 18- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de fenilalanina a 250°C. ....	49

Figura 19- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados  
8 mL na digestão de 400 mg de ácido linoleico a 250°C. ....50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições operacionais para a determinação elementar por ICP OES e ICP-MS. ....	27
Tabela 2- Composição das amostras (%). ....	29
Tabela 3- Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de amostras de solução de nutrição enteral (SNE) mediante sistema SRC. ....	30
Tabela 4- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> após decomposição utilizando $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HNO}_3$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE. ....	52
Tabela 5- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> após decomposição utilizando $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HNO}_3$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE. ....	53
Tabela 6- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> após decomposição utilizando $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HNO}_3$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE. ....	54
Tabela 7- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> após decomposição utilizando $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HNO}_3$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE. ....	55
Tabela 8- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> após decomposição utilizando $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HNO}_3$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE. ....	56
Tabela 9- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) por ICP OES <sup>a</sup> e ICP-MS <sup>b</sup> em RM de leite em pó utilizando SRC com $\text{H}_2\text{O}_2$ 50%. ....	57
Tabela 10- Limites de detecção ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidos para o método de preparo de amostra para $\text{HNO}_3$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ por SRC. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASPEN	Sociedade americana de soluções parentais e enterais, do inglês <i>American Society for Parental and Enteral Nutrition</i>
RM	Material de referência, do inglês <i>reference material</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
MWDA	Decomposição assistida por radiação micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted wet digestion</i>
NE	Nutrição enteral, do inglês <i>enteral nutrition</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
RCC	Teor de carbono residual, do inglês <i>residual carbon content</i>
SNE	Soluções de nutrição enterais, do inglês <i>enteral nutrition solution</i>
SRC	Câmara única de reação, do inglês <i>single reaction chamber</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Soluções de nutrição enteral .....	16
2.1.1 Composição das SNE .....	16
2.1.1.1 Gorduras/Lipídios .....	16
2.1.1.2 Proteínas .....	17
2.1.1.3 Carboidratos .....	17
2.1.1.4 Elementos essenciais e tóxicos .....	17
2.2 Técnicas para a determinação multielementar: ICP OES e ICP-MS .....	18
2.2.1 Interferências da acidez e carbono residuais nas determinações por técnicas com plasma indutivamente acoplado .....	18
2.3 Métodos de preparo de amostra .....	20
2.3.1 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas .....	20
2.3.2 Sistema de decomposição com câmara única de reação .....	21
2.3.3 Peróxido de hidrogênio .....	22
2.3.4 Compostos orgânicos refratários à digestão ácida por via úmida .....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1 Instrumentação .....	26
3.2 Reagentes .....	28
3.3 Amostras .....	28
3.4 Procedimentos de decomposição das amostras .....	29
3.4.1 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema SRC .....	29
3.5 Determinação do teor de carbono residual .....	32
3.6 Determinação da acidez residual .....	32
3.7 Determinação do pH dos digeridos .....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1 Avaliação da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na digestão da SNE .....	35
4.2 Avaliação da temperatura do sistema SRC na digestão da SNE .....	36
4.3 Avaliação do volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
4.4 Avaliação da massa de amostra .....	37
4.5 Avaliação da influência da pressão na eficiência da digestão com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
4.6 Digestão de SNE utilizando HNO <sub>3</sub> concentrado no sistema SRC .....	41
4.7 Decomposição dos compostos orgânicos presentes na composição da SNE .....	43
4.8 Avaliação do conteúdo de carbono residual (RCC) em substâncias orgânicas refratárias à oxidação por via úmida .....	46
4.9 Determinação multielementar utilizando ICP OES e ICP-MS após a decomposição empregando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e HNO <sub>3</sub> nas SNE .....	50
4.9.1 Decomposição de material de referência (RM) empregando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
4.9.2 Limites de detecção .....	58
5 CONCLUSÃO .....	60
REFERÊNCIAS .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

As soluções de nutrição enteral (SNE) são definidas como alimentos, que visam suprir as necessidades nutricionais de pacientes. Seu uso ocorre quando a alimentação via oral é impossibilitada, sendo administradas através de sondas até o trato gastrointestinal. Sua administração pode ser recomendada tanto para adultos quanto crianças, quando os níveis de ingestão diária de nutrientes não são atingidos. Deste modo, é necessário o uso das SNE, ricas em carboidratos, gorduras, proteínas, vitaminas e nutrientes.<sup>1-3</sup>

Atualmente, as diversas formulações de SNE, disponíveis podem ser classificadas, em função de sua composição, como proteínas e nutrientes. Geralmente, as fórmulas contêm  $1 \text{ kcal mL}^{-1}$ , porém em casos de pacientes com insuficiência cardiovascular, renal e hepática, é necessário que a formulação contenha de 1,5 a  $2 \text{ kcal mL}^{-1}$ , devido à restrição de líquidos aos pacientes.<sup>2, 4</sup>

Em virtude das SNE serem amplamente utilizadas na alimentação de pacientes debilitados, é necessário realizar análises de sua composição, para verificar se as soluções atendem as recomendações no que diz respeito a composição de elementos essenciais ao organismo.<sup>5</sup> Ademais, também é necessário verificar se a nutrição enteral possui em sua composição elementos considerados tóxicos, como As, Cd e Pb, que podem ser prejudiciais aos pacientes, causando problemas à saúde. A determinação desses elementos pode ser feita utilizando técnicas como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), entre outras. Todavia, previamente à determinação elementar, é necessário realizar o preparo de amostra, para que a mesma esteja em forma de solução, em condições adequadas para ser introduzida nos equipamentos de medida. Geralmente, a preparação da amostra é a etapa da sequência analítica mais propícia à ocorrência de erros sistemáticos.<sup>6</sup>

Dentre os métodos de preparo de amostra mais utilizados está a decomposição por via úmida em sistema fechado, que tem por objetivo a decomposição da matéria orgânica e sua conversão em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Métodos de preparo de amostra que utilizam energia das micro-ondas vem sendo muito utilizados, nos quais geralmente utilizado  $\text{HNO}_3$  ou misturas deste com  $\text{HCl}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>6</sup>

No que diz respeito aos sistemas de digestão por micro-ondas, em 2011 foi lançado no mercado um sistema de decomposição utilizando uma câmara única de reação (SRC, do inglês *single reaction chamber*) que permite operação com temperatura e pressão de até 300 °C e 199 bar, respectivamente.<sup>7</sup>

Além disso, nos últimos anos foi mostrado que o sistema SRC possibilita a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante de forma isolada, sem a mistura com ácidos. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparado a demais oxidantes, apresenta como principal vantagem a formação de H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> como produtos da digestão, minimizando a geração de resíduos tóxicos quando comparado com o HNO<sub>3</sub>.<sup>8</sup>

Tendo em vista os aspectos mencionados anteriormente, o presente trabalho busca avaliar dois métodos de preparo de amostras, utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub> em sistema SRC para a decomposição de SNE e posterior determinação elementar, utilizando técnicas com plasma indutivamente acoplado. Além de ser feito um estudo em relação à composição das soluções de nutrição enteral.



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

*Neste capítulo serão tratados aspectos relacionados à formulação e a composição das soluções de nutrição enterais e posteriormente serão apresentadas as principais técnicas analíticas empregadas na determinação multielementar. Adicionalmente, será realizada uma breve abordagem sobre alguns dos principais métodos de preparo de amostras de composição majoritariamente orgânica.*

## 2.1 SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO ENTERAL

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define soluções de nutrição enteral (SNE) como “alimento para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida ou estimada, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializado ou não, utilizada exclusiva ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas”.<sup>9</sup> Dessa forma, a solução enteral é administrada para fornecer todos os nutrientes necessários para a recuperação e manutenção da saúde do paciente.<sup>1</sup>

Apesar da administração das SNE não ser feita por via parenteral, e sim através de uma sonda por via oral, essa administração também pode ser considerada complexa. Alguns erros quanto ao uso destas soluções podem levar a morte de pacientes, em virtude de deslocamentos da sonda, anormalidades metabólicas, complicação quanto ao tubo mecânico e a intolerância a componentes das fórmulas. Além disso, outro risco para pacientes ocorre em função de contaminações das formulações pela presença de micro-organismos, nas etapas de produção, armazenamento, preparação e/ou administração das SNE. As soluções líquidas são o meio ideal para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e, em decorrência da presença dos mesmos, ocorre a redução dos nutrientes das soluções.<sup>1, 2, 10</sup>

### 2.1.1 Composição das SNE

#### 2.1.1.1 Gorduras/Lipídios

Nas dietas enterais, as fontes mais comuns de lipídios são os óleos de canola, girassol, soja e peixe, que correspondem a 30 a 40% das calorias das formulações das SNE. O ácido linoleico é muito utilizado para prevenir deficiências de ácidos graxos essenciais, sendo que de 2 a 4% das calorias são provenientes do ácido linoleico. A principal função das gorduras e óleos é como reserva de energia, que são fontes de triacilgliceróis posteriormente convertidas em dióxido de carbono

e água, produzindo muito mais calorias que as proteínas e carboidratos, devido à alta quantidade de ligações carbono-hidrogênio.<sup>3, 4, 11, 12</sup>

#### *2.1.1.2 Proteínas*

A função principal das proteínas no corpo humano é a regulação e catálise das reações que ocorrem no organismo, tais como a movimentação de músculos, tendões, ainda sendo responsáveis pela transferência de oxigênio no organismo. As SNE contêm de 4 a 32% de calorias provenientes de proteínas, sendo caseinato, lactoalbumina, carne bovina e proteína isolada de soja as fontes mais comuns. A partir das proteínas é possível obter os aminoácidos que são utilizados pelas células para sintetizar as proteínas, sendo os aminoácidos classificados em três grupos distintos, quanto a função nutricional, seu destino ou com base na cadeia lateral. Dentre a classificação nutricional, os aminoácidos são classificados como essenciais (fenilalanina, histidina, metionina, lisina, triptofano etc) e não essenciais (alanina, ácido aspártico, cisteína, glicina etc).<sup>3, 4, 11, 12</sup>

#### *2.1.1.3 Carboidratos*

Os carboidratos são uma das principais fontes de energia consumidas pelo ser humano. Com relação às SNE, as fontes de carboidratos mais utilizadas são xarope de milho, sacarose, frutose e glicose, que contribuem com 40 a 90% das calorias contidas nas SNE.<sup>3, 4</sup>

#### *2.1.1.4 Elementos essenciais e tóxicos*

Além dos elementos majoritários como C, O, N, cerca de 20 outros elementos encontrados em menor concentração nos alimentos são considerados essenciais para a vida humana.<sup>13</sup> Dentre eles destacam-se macro elementos tais como Ca, Mg, Na, K, P, S e micro elementos tais como Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Cr, Mo, Se e etc.<sup>14-16</sup>

Neste sentido, a formulação das SNE com relação à composição dos elementos essenciais pode variar em função das necessidades nutricionais de cada paciente. A deficiência de alguns desses elementos é prejudicial, pois são responsáveis pela síntese enzimática e diversos processos bioquímicos.<sup>4, 5</sup>

Além dos elementos essenciais, outros elementos considerados tóxicos podem ser introduzidos nas SNE em decorrência da manipulação ou estarem presentes nos insumos utilizados no preparo destas soluções.<sup>14</sup> Os principais elementos tóxicos investigados são As, Cd, Hg e Pb.<sup>17</sup> Infelizmente, não há ainda compêndio ou legislação que trate dos limites máximos de concentração de elementos tóxicos permitidos nas SNE.

## 2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR: ICP OES E ICP-MS

As técnicas com fontes de plasma indutivamente acoplado são muito utilizadas para a determinação multielementar, principalmente ICP OES e a ICP-MS. Ambas as técnicas são muito utilizadas, em virtude de baixos limites de detecção (LDs) que permitem a determinação de metais, não metais<sup>18-20</sup>, metaloides e halogênios<sup>21-23</sup> em diferentes matrizes.<sup>24</sup>

A técnica de ICP-MS se baseia na separação, de acordo com a relação massa-carga ( $m/z$ ), dos íons gerados no plasma.<sup>25, 26</sup> Para esta técnica, LDs da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  podem ser obtidos para maioria dos elementos. A técnica de ICP OES, por sua vez tem como princípio a emissão da radiação eletromagnética pelos átomos ou íons gerados e excitados no plasma.<sup>27</sup> Quando comparadas, as técnicas de ICP-MS e ICP OES os limites de quantificação (LQs) da técnica de ICP-MS são melhores, o que a torna uma técnica bastante utilizada para quantificação de elementos tóxicos geralmente encontrados em baixa concentração (As, Cd, Pb, e outros).<sup>28, 29, 30</sup> Por outro lado, a técnica de ICP OES possibilita maior versatilidade e maior aplicação para a determinação de elementos como Ca, Fe, Mg, Mn, Na e P presentes em maior concentração na maior parte das matrizes.<sup>18, 29, 31</sup>

### 2.2.1 Interferências da acidez e carbono residuais nas determinações por técnicas com plasma indutivamente acoplado

Alguns estudos têm mostrado que o carbono residual e a acidez remanescente na solução da amostra após a sua digestão por via úmida podem causar interferências nas determinações por ICP OES e ICP-MS. O carbono residual e a acidez residual causam aumento ou supressão do sinal analítico. Sendo assim, a

concentração de carbono residual e acidez nas soluções de calibração devem ser próximas.<sup>32-36</sup>

Com relação às interferências causadas pela acidez residual dos digeridos, de acordo com a literatura, a presença de HNO<sub>3</sub> pode causar supressão do sinal analítico nas determinações por ICP OES e ICP-MS. De acordo com o trabalho reportado por Müller et al.<sup>34</sup> concentrações de HNO<sub>3</sub> de até 20% (v/v) não causaram supressão do sinal analítico para as determinações de <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>53</sup>Cr, <sup>60</sup>Ni, <sup>62</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>75</sup>As, <sup>95</sup>Mo, <sup>98</sup>Mo, <sup>99</sup>Ru, <sup>101</sup>Ru, <sup>103</sup>Rh, <sup>105</sup>Pd, <sup>108</sup>Pd, <sup>111</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>189</sup>Os, <sup>191</sup>Ir, <sup>192</sup>Os, <sup>193</sup>Ir, <sup>194</sup>Pt, <sup>195</sup>Pt, <sup>200</sup>Hg, <sup>201</sup>Hg, <sup>207</sup>Pb e <sup>208</sup>Pb por ICP-MS.<sup>34</sup>

As interferências causadas pelo C, por sua vez, podem promover a supressão ou aumento do sinal analítico para alguns elementos e estão relacionadas com alterações nos mecanismos de ionização no plasma ou simplesmente diferença de viscosidade da solução da amostra e das soluções de calibração. Grindlay et al. verificou que em concentrações superiores a 5000 mg L<sup>-1</sup> de C, ocorre a supressão de sinal de até 15% para uma série de linhas de emissão de alguns elementos (As, Br, Cl, I, P, S e Se) na determinação por ICP OES, principalmente para a linhas de emissão atômicas.<sup>37</sup>

Em um estudo semelhante realizado por Wiltsche et al., foi verificado o efeito do C no sinal analítico de 157 linhas de emissão de diversos elementos nas determinações por ICP OES.<sup>35</sup> Segundo os autores, concentrações de até 8000 mg L<sup>-1</sup> de carbono (na forma de fenilalanina), não causam aumento ou supressão do sinal analítico para a maioria das linhas de emissão avaliadas, com exceção das linhas de emissão As (I), Be (II) e Se (I) para as quais foi observado um aumento de sinal de até 22%. Os autores comentam, a partir dos dados experimentais, que as interferências causadas pelo C dependem de uma combinação de cinco fatores: *i*) tipo de fonte de C que pode promover mudanças na nebulização da amostra; *ii*) reações de transferência de carga induzidas pelo C; *iii*) mudanças na impedância do plasma causadas pela introdução de C no plasma; *iv*) efeito “thermal pinch” e *v*) o estado físico da fonte de carbono.<sup>35</sup>

A técnica de ICP-MS, por sua vez, é mais suscetível que a técnica de ICP OES a interferências causadas pelo carbono residual presente nas soluções dos digeridos. Segundo Müller et al.,<sup>34</sup> concentrações de C superiores a 250 mg L<sup>-1</sup> já são suficientes para causar interferências na determinação de alguns isótopos, tais como <sup>53</sup>Cr e <sup>75</sup>As.<sup>34</sup> Por fim, segundo Allain et al., glicerol com concentração de 1 mol L<sup>-1</sup>

(36000 mg L<sup>-1</sup>), causa aumento de sinal de até 600% na determinação de As, Au, Hg e Se por ICP-MS.<sup>38</sup>

## 2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA

Na maioria das técnicas analíticas, ainda é necessário que a amostra esteja na forma de uma solução para ser introduzida no plasma indutivamente acoplado. Diferentes métodos de digestão de amostras são relatados para amostras com matriz de diferentes tipos, com destaque especial para utilização do aquecimento utilizando a energia das micro-ondas combinada com o uso de ácidos minerais. Assim, o preparo de amostras é uma etapa importante na sequência analítica, contudo apresenta alguns riscos relacionados à contaminação e perdas por volatilização.<sup>6</sup>

Quando se trata de métodos visando a posterior determinação de metais, geralmente são utilizados ácidos concentrados, podendo fazer uso de sistemas abertos ou fechados. Porém quando utilizados sistemas abertos, além de possíveis contaminações, podem ocorrer perdas de elementos voláteis tais como Hg e As.<sup>6, 39,</sup>  
40

A seguir, serão abordados métodos de decomposição de amostras orgânicas por via úmida, através de aquecimento assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados, bem como algumas particularidades quanto ao uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>6, 39,</sup>  
40

### 2.3.1 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas

O preparo de amostra com a utilização da energia das micro-ondas permite uma forma de aquecimento alternativa, possibilitando que a digestão da amostra ocorra através da interação entre a energia das micro-ondas com a amostra e o reagente oxidante. As micro-ondas são ondas eletromagnéticas e a energia associada a estas ondas está relacionada diretamente à frequência e no comprimento de onda. As micro-ondas se encontram na faixa de frequência de 300 a 300,000 MHz, porém para evitar interferências nas redes de telecomunicação é permitido que para fins industriais e científicos a frequência seja 900 ou 2450 MHz. Nas decomposições de amostras assistidas por radiação micro-ondas, quando o

reagente absorve a radiação micro-ondas ocorrem os fenômenos de migração iônica e rotação de dipolos, posteriormente convertidos em calor e, conseqüentemente, ocorre o aquecimento do sistema. Todos os íons em solução contribuem para o aquecimento do sistema, porém é dependente da concentração e mobilidade dos íons, a rotação de dipolos está relacionada com o alinhamento da molécula quando é aplicado um campo elétrico ao sistema.<sup>40, 41</sup>

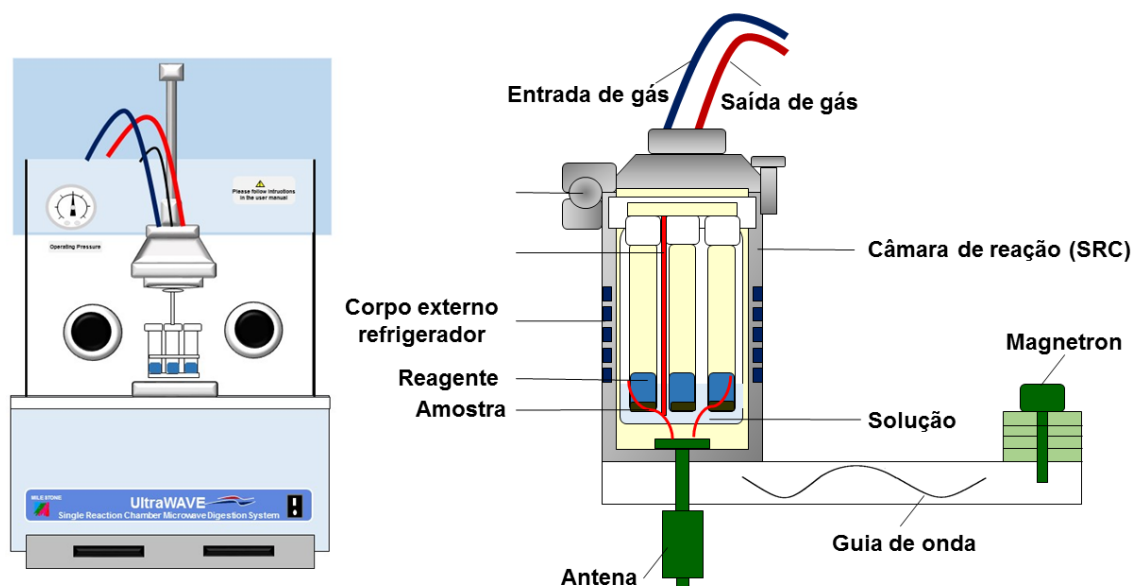
A decomposição das amostras orgânicas em sistemas fechado ou aberto tem por objetivo a degradação da matéria orgânica, com uso de um reagente oxidante. Geralmente é empregado o  $\text{HNO}_3$ , em virtude de ser um forte agente oxidante, permitir a solubilização de boa parte dos metais na forma de nitratos solúveis e de ser um reagente de fácil purificação. Apesar do  $\text{HNO}_3$  ser um reagente com um alto potencial de oxidação e com várias aplicações em preparo de amostra, existem algumas desvantagens como a geração de resíduos tóxicos após a decomposição da amostra.<sup>6</sup> Ademais, geralmente é necessário realizar a diluição dos digeridos em virtude da alta acidez residual, para não ocorrer interferências no processo de determinação por ICP OES e ICP-MS.<sup>32</sup>

Para aumentar a temperatura de decomposição do  $\text{HNO}_3$ , geralmente são realizadas misturas com outros ácidos, como o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HCl}$ .<sup>6, 39</sup> Além disso, em função da dependência do poder de oxidação do  $\text{HNO}_3$  com a temperatura, as empresas fabricantes de sistemas de micro-ondas desenvolveram de sistemas de digestão que operam em temperaturas e pressões cada vez mais elevadas. Neste sentido, foi desenvolvido o sistema com câmara única de reação (SRC) pela empresa Milestone, que será apresentado no item seguinte.<sup>6, 7</sup>

### **2.3.2 Sistema de decomposição com câmara única de reação**

O sistema de decomposição onde o aquecimento ocorre através de radiação micro-ondas em uma câmara única de reação fechada desenvolvido pela empresa Milestone é ilustrado na Figura 1. O equipamento pode ser operado sob temperatura e pressão mais altas, até 300 °C e 199 bar, respectivamente. O sistema possui uma câmara pressurizada com um gás inerte, onde são adicionados água e  $\text{HNO}_3$ , ou outro reagente (responsáveis pela absorção das micro-ondas), juntamente com os frascos contendo as amostras.<sup>6, 7</sup>

Figura 1- Ilustração do sistema de decomposição por câmara única de reação (SRC), Milestone.

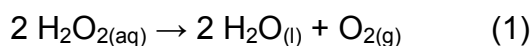


Esse sistema possui algumas vantagens tais como permitir a decomposição simultânea de diversas amostras, com matriz tanto orgânica quanto inorgânica, e de massas mais altas de amostra (até 1,5 g).<sup>7, 42</sup> Existem relatos na literatura onde se utilizou o sistema de SRC para a decomposição de amostras de mel,<sup>21</sup> fígado bovino, leite em pó,<sup>18, 31</sup> petróleo,<sup>43, 44</sup> nanotubos de carbono,<sup>45</sup> fármacos<sup>34</sup> e outras matrizes,<sup>46, 47</sup> utilizando como reagentes HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>42</sup>

Sendo assim, o sistema SRC avaliado no presente trabalho para a decomposição de SNE, devido à alta temperatura e pressão permitidas pelo sistema.

### 2.3.3 Peróxido de hidrogênio

Na atualidade, deve-se ter grande cuidado em relação à geração de resíduos, buscando-se atender aos preceitos da química analítica verde. Nesse contexto, a utilização de reagentes como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se degrada formando água e oxigênio molecular (Equação 1), é bem-vinda. Assim, o uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparado ao HNO<sub>3</sub> e outros ácidos minerais, é vantajosa devido ao manuseio mais fácil e menor geração de resíduos.





O peróxido de hidrogênio é comercializado em concentrações entre 20 e 60% (v/v). Além disso, o  $H_2O_2$  é um oxidante forte, possuindo um potencial padrão de redução de 1,77 V, sendo o seu uso como oxidante para preparo de amostra ainda não está totalmente difundido.<sup>8</sup> Contudo, existem poucos trabalhos publicados na literatura que relatam o uso de  $H_2O_2$  de forma isolada, e geralmente o mesmo é utilizado em misturas com outros ácidos ( $HNO_3$  e  $H_2SO_4$ ).<sup>6</sup> Provavelmente, a limitação na utilização do  $H_2O_2$ , como agente oxidante dos componentes orgânicos que constituem a amostra, seja em decorrência da utilização de sistemas de digestão que não permitam maiores pressões. Além, do aumento da pressão em decorrência da produção dos gases da oxidação da matéria orgânica, há também a produção de oxigênio a partir do  $H_2O_2$  (degradação térmica) que contribui para o aumento da pressão do sistema de digestão.

O primeiro trabalho que relata o uso de  $H_2O_2$  como agente oxidante, sob altas temperaturas e pressões, data de 1973. Nesse trabalho, Denbsky et.al.<sup>48</sup> avaliou decomposição de diversas amostras biológicas, com altas quantidades de carboidratos, proteínas e gorduras, propondo a decomposição de até 15 g de amostra. No sistema construído em aço pelo próprio pesquisador, a temperatura e pressão limite eram 370 °C e 400 atm, respectivamente.<sup>48</sup>

Alguns anos após o primeiro relato do uso do  $H_2O_2$ , em 1985, Matusiewicz et al.<sup>49</sup> propôs a utilização do  $H_2O_2$  para a digestão de anéis de árvores ricos em celulose para a posterior determinação elementar por ICP OES combinado com vaporização eletrotérmica (ETV). Os autores realizaram o preparo de amostras através de uma decomposição em bombinhas de teflon em sistema fechado, juntamente com  $H_2O_2$  50% v/v sob temperaturas de até 125 °C. Os autores relatam que a eficiência de decomposição está diretamente relacionada à concentração de  $H_2O_2$  e a temperatura.<sup>49</sup>

Alguns trabalhos mais recentes relatam o uso de  $H_2O_2$  na decomposição de amostras no SRC, Müller et al. realizaram determinação elementar em fígado bovino, leite em pó, farinha e mel após serem decompostos no referido sistema.<sup>18, 21,</sup>

<sup>31</sup> No primeiro trabalho, até 500 mg de leite em pó foram eficientemente digeridos com 8 mL de  $H_2O_2$  50% a 250 °C e 199 bar, produzindo digeridos com 918 mg L<sup>-1</sup> de carbono residual e com pH mais alto do que os digeridos obtidos com  $HNO_3$  concentrado.<sup>18</sup> O método proposto mostrou-se exato, não foi observada diferença

significativa entre os resultados obtidos para a digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou com  $\text{HNO}_3$  para diferentes materiais de referência certificados.<sup>18</sup> Para demonstrar a adequabilidade da digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , perante os preceitos da Química Verde, Müller et al.<sup>31</sup> propuseram a digestão de alimentos ricos em carboidratos (farinha, leite em pó e mel) e classificação do método segundo a “Analytical Eco-Scale”.<sup>31</sup> Os autores observaram a decomposição eficiente de até 1,25 g de amostra com 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% (v/v), havendo produção de digeridos com carbono residual inferior a  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . Ainda de acordo com os autores, o método proposto atingiu o escore de 85, que o classifica como “excellent green analysis” de acordo com a “Analytical Eco-Scale”.<sup>31</sup>

### **2.3.4 Compostos orgânicos refratários à digestão ácida por via úmida**

A determinação de carbono na solução dos digeridos permite avaliar a eficiência da decomposição da amostra. Neste sentido, observa-se experimentalmente que para algumas amostras orgânicas a concentração de carbono residual é maior do que para outras. Isto pode ser justificado pelo fato de que alguns compostos orgânicos são mais refratários ao ataque com  $\text{HNO}_3$ .<sup>50</sup>

Trabalhos iniciais, em 1989, feitos por Wurfels et al.<sup>50</sup> avaliaram a eficiência de decomposição de diferentes compostos orgânicos utilizando  $\text{HNO}_3$ . Como método de preparo das amostras, os autores utilizaram sistema fechado com frascos de politetrafluoretileno (PTFE), em temperatura de  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  (aquecimento convencional) durante 3 h, para 90 mg de amostra adicionada de 2 mL de  $\text{HNO}_3$ .<sup>50</sup>

Após a decomposição de alguns destes compostos (aminoácidos, ácidos graxos, ácidos nucleicos) presentes em amostras biológicas, foi analisado teor de carbono residual (RCC, do inglês residual carbon content) dos digeridos. Dentre os compostos orgânicos mais refratários ao ataque com  $\text{HNO}_3$ , destacam-se a histidina, fenilalanina, triptofano e ácido linoleico, cujos valores de RCC foram 31, 57, 12,2 e 11,4%, respectivamente.<sup>50</sup>

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

*Nesse capítulo são descritos as amostras, os reagentes, equipamentos, instrumentos e materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho, bem como a descrição dos procedimentos utilizados.*

### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

As decomposições foram realizadas em um forno de micro-ondas (modelo UltraWave, Milestone, Itália), que possui câmara única de reação feita de aço e revestida com frasco de PTFE. O sistema é equipado com 5 frascos de quartzo com capacidade individual de 40 mL, temperatura e pressão máxima de 300°C e 199 bar. A potência máxima do equipamento pode chegar a 1500 W e seu resfriamento é realizado através da passagem de um fluxo de água pelo sistema. A cavidade do sistema é pressurizada utilizando 40 bar de argônio (pureza 99,0, White Martins, Brasil). Uma balança analítica (modelo AY220, Shinadzu do Brasil, Brasil), com resolução de 0,0001g e carga máxima de 220 g foi utilizada para a pesagem das amostras.

A determinação da acidez residual nos digeridos foi realizada utilizando um titulador automático (modelo titrando 836, Metrohm, Suíça) equipado com módulo de agitação magnética (modelo 803 Ti Stand, Metrohm), bureta de 20 mL (modelo Dosino 800, Metrohm) e um eletrodo de pH combinado para meio aquoso (modelo 6.0262.100, Metrohm). Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro digital (781 pH/Ion Meter, Metrohm), com resolução de 0,01 unidades de pH, que possui um eletrodo de vidro combinado (6.0258.010, Metrohm).

A determinação de As, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, Se, Zn e C foi feita utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Cirus CCD<sup>®</sup>, Spectro Analytical Instruments, Alemanha), equipado com nebulizador fluxo cruzado (*cross-flow*), câmara de nebulização de duplo passo (tipo *Scott*) e tocha com tubo injetor de quartzo. Para a determinação de As, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Pb e Se foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo ELAN<sup>®</sup> DRC II, PerkinElmer-SCIEX, EUA), equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard, EUA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro.

Na Tabela 1 estão citadas as condições de operação desses equipamentos.

Tabela 1- Condições operacionais para a determinação elementar por ICP OES e ICP-MS.

<b>Parameter</b>	<b>ICP OES</b>	<b>ICP-MS</b>
Potência de radiofrequência, W	1400	1300
Vazão do gás principal, L min <sup>-1</sup>	15,0	15,0
Vazão do gás auxiliar, L min <sup>-1</sup>	0,20	1,2
Vazão do gás nebulizador, L min <sup>-1</sup>	0,7	1,15
Câmara de nebulização, tipo	Duplo passo	Ciclônica
Nebulizador, tipo	Cross-flow	Concêntrico
Analito	Linha de emissão, nm	Isótopo, m/z
As	193,629 (I)	75
C <sup>a</sup>	193,030 (I)	-
Ca	396,847 (II)	-
Cd	-	114
Co	283,563 (II)	59
Cr	205,552 (II)	53
Cu	-	65
Fe	238,204 (I)	-
K	766,491 (I)	-
Mg	280,270 (II)	-
Mn	259,373 (II)	55
Mo	-	98
Na	589,592 (I)	-
P	213,617 (I)	-
Pb	-	208
Se	196,026 (I)	82
Zn	213,856 (I)	-
Y <sup>b</sup>	371,029 (II)	-

<sup>a</sup> C foi avaliado para a eficiência de decomposição

<sup>b</sup> Y foi utilizado como padrão interno para a determinação de C

(I) Linha de emissão atômica

(II) Linha de emissão iônica

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o software Graph Stad (GraphPad InStat Software, EUA) com nível de confiança de 95%.

### 3.2 REAGENTES

A água utilizada passou por um processo de destilação, deionização em uma coluna de troca iônica e finalmente purificada por um sistema Milli-Q® (Millipore, EUA), possuindo assim uma resistividade de 18,2 MΩ cm. Os métodos desenvolvidos fazem uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P.A (30%, Vetec, Brasil), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50%, Vetec) e HNO<sub>3</sub> P.A. (65%, Vetec). O HNO<sub>3</sub> passa por um processo de destilação abaixo do seu ponto de ebulição (em sistema de destilação de quartzo, modelo duoPUR, Milestone).

A determinação dos analito por ICP OES e ICP-MS foram feitas mediante calibração externa utilizando solução de referência (SCP 33 MS, 10 mg L<sup>-1</sup>, SCP Science, Canadá). As determinações de RCC foram realizadas por ICP OES, mediante uma curva de calibração com 7 pontos (5 a 500 mg L<sup>-1</sup>) de C, preparada a partir de uma solução de ácido cítrico monohidratado (Vetec) em HNO<sub>3</sub> 5% a 1000 mg L<sup>-1</sup> de C. A exatidão da concentração de calibração para carbono foi avaliada através de uma solução de referência de carbono (Inorganic Ventures, EUA) e como padrão interno foi utilizado Y (1000 mg L<sup>-1</sup>, Fluka, EUA) na concentração final de 1 mg L<sup>-1</sup>.

Nas técnicas de ICP OES e ICP-MS o plasma foi gerado com o uso de gás argônio de alta pureza (99,998, White Martins, Brasil), também utilizado como gás de nebulização e gás auxiliar.

Para a determinação de acidez residual, uma solução de KOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) foi preparada a partir do reagente sólido (KOH P.A., Merck), que foi dissolvido em água, e foi utilizado como titulante na determinação da acidez. A padronização do KOH foi feita com biflatato de potássio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>, Merck), previamente seco a 105 °C durante 2 h.

### 3.3 AMOSTRAS

As amostras de SNE foram doadas pelo Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). As amostras de óleos de girassol e canola, xarope de glicose foram adquiridas no comércio local (Santa Maria - RS). O ácido linoleico (C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>), caseinato de sódio, a DL-fenilalanina (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>), L-histidina (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 99% de

pureza), L-metionina ( $C_5H_{11}NO_2S$ , 98% de pureza) e o T-triptofano ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ , 98% de pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA).

Neste trabalho foram analisadas 9 amostras de SNE, as amostras foram nomeadas aleatoriamente como AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9. Para o desenvolvimento do método foi utilizada apenas a amostra AM5, em virtude de sua composição, com elevado percentual de proteínas (20%), carboidratos (35%) e gorduras (45%), informados no rótulo do produto, na Tabela 2 está mostrada a composição das 9 amostras.

A avaliação da exatidão do método proposto foi feita mediante análise de material de referência (RM) de leite em pó integral (NIST 8435, *Whole milk poder*, USA).

Tabela 2- Composição das amostras (%).

Composição	AM1	AM2	AM3	AM4	AM5	AM6	AM7	AM8	AM9
Carboidrato	55,0	48,9	48,9	55,0	35,0	7,0	45,0	41,0	41,0
Gordura	30,0	35,5	35,5	30,0	45,0	10,0	38,0	42,0	35,0
Proteína	15,0	16,0	16,0	15,0	20,0	18,0	17,0	17,0	24,0

### 3.4 PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 3.4.1 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema SRC

Para a realização do trabalho foi empregado o sistema UltraWave, utilizando um rotor com 5 frascos de quartzo com capacidade de 40 mL. Massas de 250, 500, 700, 1000 e 1500 mg de SNE foram digeridas com  $H_2O_2$  30, 40 ou 50% (v/v). Os volumes de  $H_2O_2$  avaliados foram 6, 8 e 10 mL, enquanto que temperaturas compreendidas entre 190 e 250 °C foram utilizadas.

O copo de PTFE foi preenchido com uma mistura constituída de 130 mL de H<sub>2</sub>O e 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado, conforme orientações do fabricante. Posteriormente, os frascos com as amostras previamente pesadas com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram alocados no suporte e introduzidos no interior do copo de PTFE. O sistema foi fechado, pressurizado com Ar até 40 bar e aplicado o programa de aquecimento conforme Tabela 3. A Figura 2 ilustra as etapas do programa de digestão.

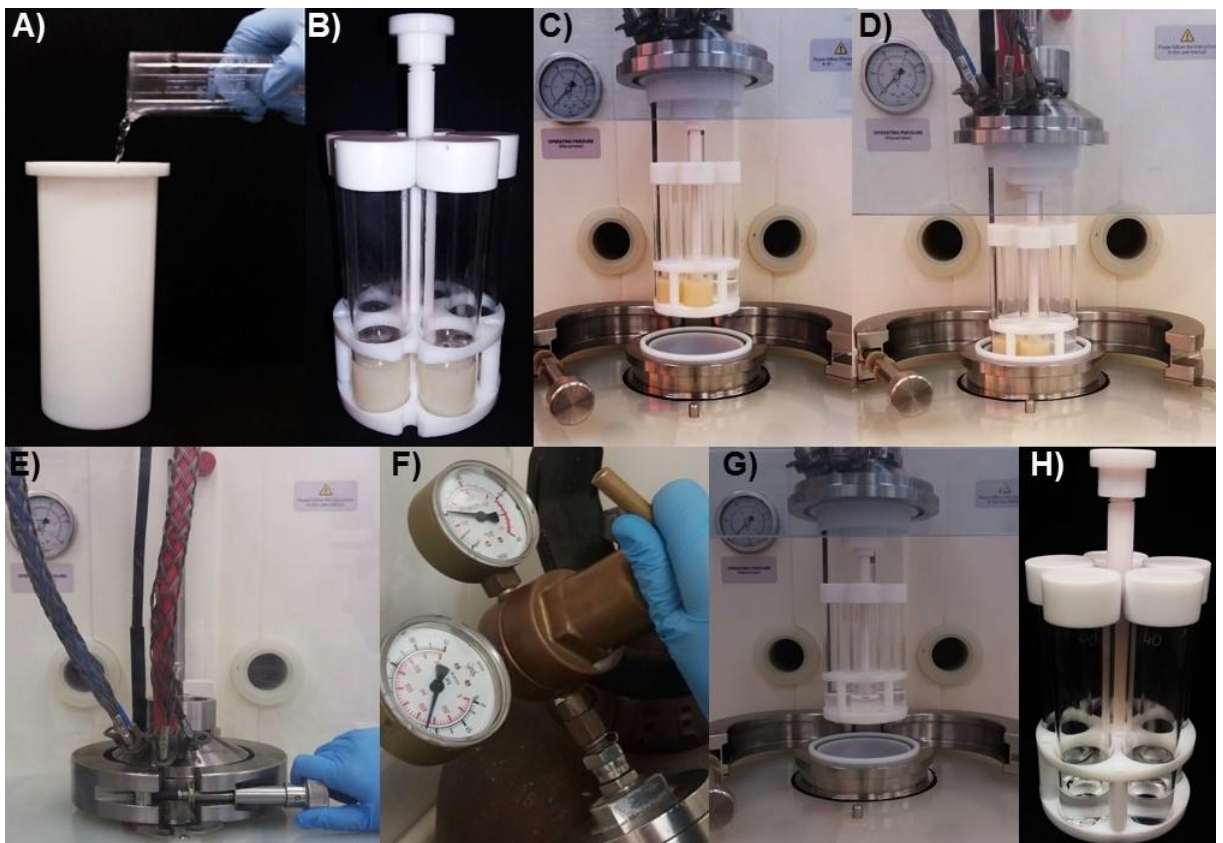
Tabela 3- Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de amostras de solução de nutrição enteral (SNE) mediante sistema SRC.

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência, min	Temperatura, °C
1	1500	25	10	250
2*	0	-	-	-

\*Etapa de resfriamento



Figura 2- Etapas envolvidas na decomposição de solução de nutrição enteral, utilizando o sistema de SRC. A) Frasco reacional de PTFE, com a adição de 130 mL de H<sub>2</sub>O e 5 mL de HNO<sub>3</sub>; B) Frascos de 40 mL de quartzo, com 1 g de amostra e 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% v/v; C) Frascos com a amostra são fixados no rotor; D) Introdução das amostras na cavidade; E) Fechamento manual e com trava de segurança; F) Pressurização do sistema com até 40 bar com argônio; G e H) Frascos com as amostras decompostas, depois de serem retirados da cavidade.



Após a digestão, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e avolumados a 25 mL.

Como método comparativo ao proposto, foi realizada digestão de 1 g de amostra de SNE, com 8 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado, à temperatura de 250°C, no mesmo sistema pressurizado a 40 bar.

Para a decomposição dos compostos presentes na formulação das SNE, foi realizado um estudo variando-se a massa de amostra, sendo que 100, 200 e 400 mg

foram decompostos a 250°C, com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 % (v/v) no sistema de SRC. Dessa forma, foi realizada a decomposição de óleo de canola e girassol, xarope de glicose e caseinato de sódio. Após a decomposição, os extratos foram avolumados com água a 25 mL e posteriormente realizada a determinação de C residual.

O mesmo procedimento foi seguido para os aminoácidos (histidina, triptofano e fenilalanina) e o ácido linoleico, sendo decompostos 400 mg das substâncias, com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 8 mL de HNO<sub>3</sub>. O fluxograma da Figura 3 resume os procedimentos e parâmetros avaliados neste trabalho.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO RESIDUAL

A concentração de C foi determinada por ICP OES. As soluções das amostras digeridas foram diluídas com HNO<sub>3</sub> 5% sendo adicionada Y, como padrão interno de modo a se obter 1 mg L<sup>-1</sup> do elemento. Posteriormente, as amostras foram purgadas durante 2 min com Ar, para eliminação do CO<sub>2</sub> dissolvido em solução. Esse procedimento foi realizado previamente à determinação de C por ICP OES, tanto para as soluções de calibração quanto amostras.

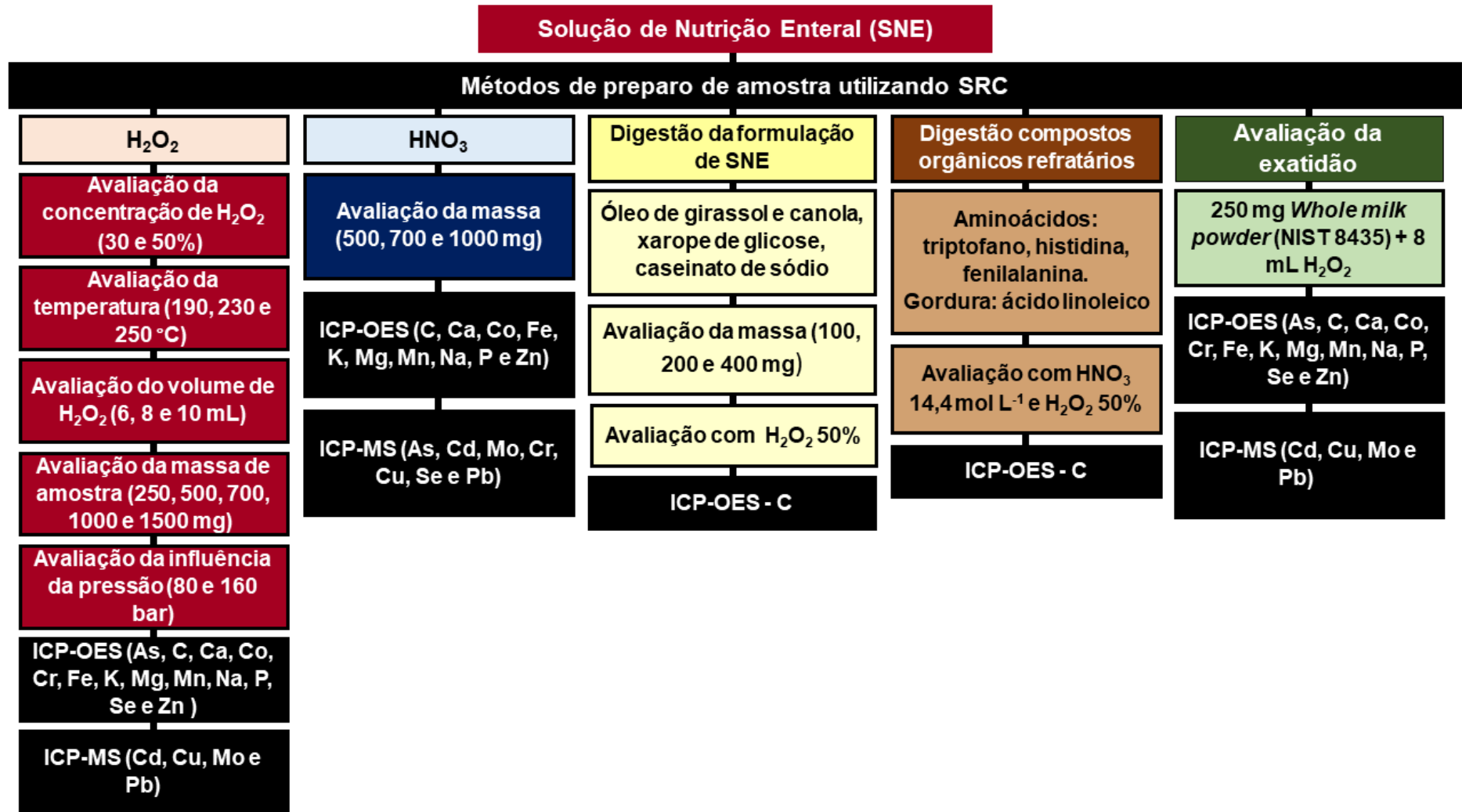
### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ RESIDUAL

A determinação da acidez residual foi realizada por titulação potenciométrica em meio aquoso. Para tanto, 100 a 1000 mg dos digeridos foram diluídos com água até 30 mL. A titulação foi feita com solução de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, previamente padronizada com biflatato de potássio.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO pH DOS DIGERIDOS

As amostras, após o processo de decomposição foram avolumadas a 25 mL com água ultrapura e, subsequentemente, realizada a determinação do pH, com um eletrodo vidro combinado.

Figura 3- Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Neste capítulo, são mostrados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento do procedimento de decomposição das amostras SNE, utilizando como oxidante o  $H_2O_2$  em sistema de SRC e posterior determinação elementar por ICP OES e ICP-MS. Inicialmente foi desenvolvido um método de análise, aplicando-o posteriormente para uma variedade de amostras. A exatidão do método foi verificada comparando os resultados obtidos pelo método proposto com aqueles obtidos por digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, fazendo uso de  $HNO_3$  concentrado. Para esse fim, também foi analisado RM para avaliar a exatidão. Ademais, foi realizada a digestão dos principais componentes orgânicos presentes nas formulações das soluções de nutrição enterais (carboidratos, gorduras e proteínas). Por fim, foi avaliada a eficiência de digestão do sistema SRC com  $H_2O_2$  e  $HNO_3$  para algumas substâncias orgânicas sabidamente refratárias à oxidação por via úmida em sistema fechado.*

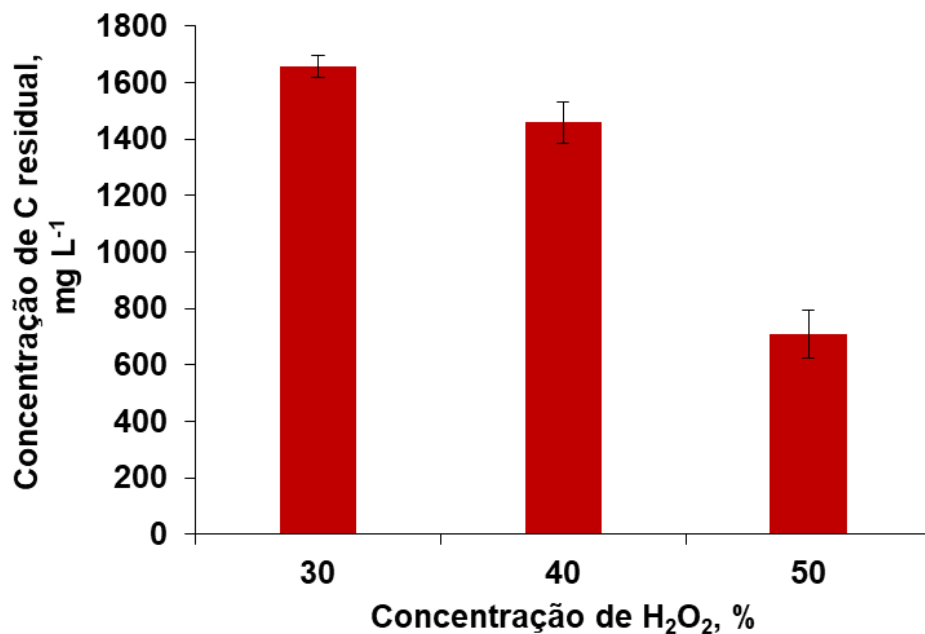
#### 4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NA DIGESTÃO DA SNE

Inicialmente, é importante destacar que para o desenvolvimento do método foi utilizada a amostra AM 5. A avaliação da eficiência de digestão foi feita baseada na concentração de C residual.

O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração do peróxido de hidrogênio. Nesse sentido, inicialmente foi realizado um estudo utilizando 1 g de amostra e 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 30, 40 e 50% (v/v).

Na Figura 4 é mostrada a concentração de C residual nos digeridos de SNE para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 30, 40 e 50%. Como esperado, a condição empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% apresentou uma menor concentração de C residual (711 mg L<sup>-1</sup>). Diante disso, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% foi escolhido para a realização dos demais experimentos.

Figura 4- Concentração de C residual para a decomposição de 1 g de SNE com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



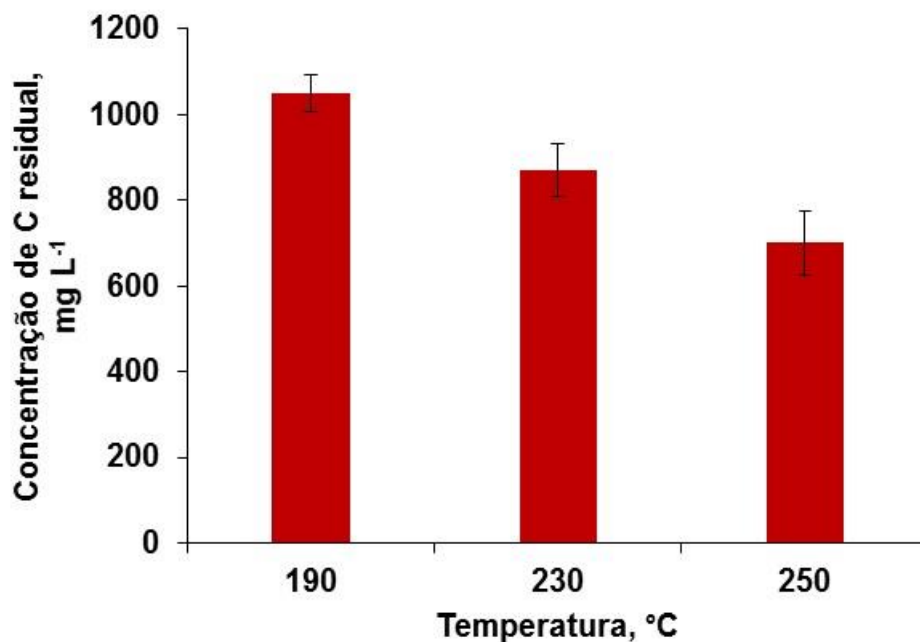
## 4.2 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DO SISTEMA SRC NA DIGESTÃO DA SNE

A avaliação da temperatura foi feita com a finalidade de se determinar a eficiência da decomposição de SNE, utilizando o sistema SRC. Dessa forma, foram feitos experimentos a 190, 230 e 250 °C. Apesar do equipamento de SRC permitir até 300 °C, temperaturas superiores a 250 °C não foram testadas para minimizar eventuais desgastes no sistema.

A avaliação da temperatura foi realizada com a massa de aproximadamente 1 g de amostra, com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%. Conforme observado na Figura 5, há uma relação direta entre temperatura e eficiência da digestão, de forma que para 250 °C houve a menor concentração de C residual. A mesma influência da temperatura nas digestões com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reportada por outros trabalhos na literatura.<sup>18, 31</sup>

Em vista da maior eficiência de digestão a 250°C, os demais experimentos foram realizados empregando essa temperatura.

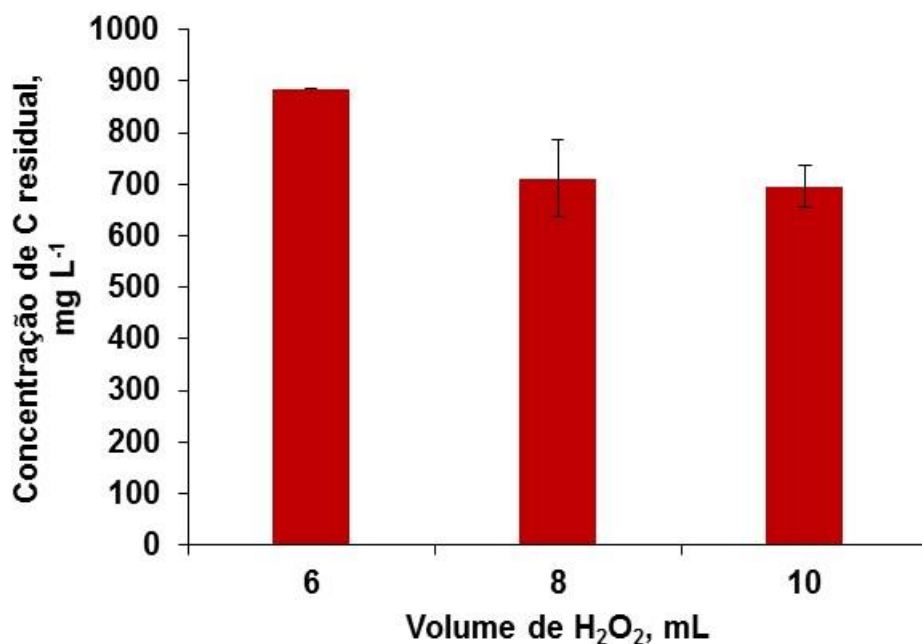
Figura 5- Concentração de C residual para diferentes temperaturas decomposição de 1 g de SNE com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.



### 4.3 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Subsequentemente, foi avaliada a influência do volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% adicionado. Para tanto, foram conduzidas digestões no sistema SRC, empregando os volumes de 6, 8 e 10 mL de reagente. Na Figura 6 é mostrada a concentração de C residual obtida após a digestão da amostra em função dos diferentes volumes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionados. Nesta Figura 6 pode-se observar que com o aumento do volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentração de C residual diminuiu. Quando comparados os resultados de C residual obtidos para 8 e 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os resultados segundo o teste t-Student (nível de confiança de 95%). Assim, o volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% escolhido foi de 8 mL, pois há geração de menor quantidade de resíduos quando comparado com 10 mL, atendendo aos princípios da Química Verde.

Figura 6- Concentração de C para diferentes volumes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%, com 1 g de SNE e temperatura de 250 °C.



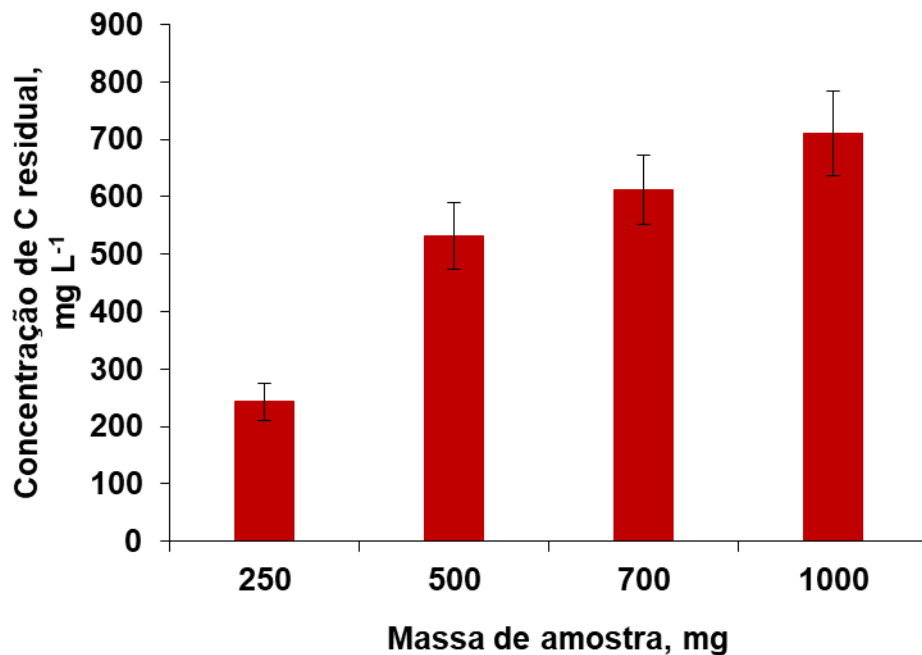
### 4.4 AVALIAÇÃO DA MASSA DE AMOSTRA

Outro importante parâmetro que deve ser avaliado nos métodos de digestão é a massa de amostra. O sistema SRC permite decompor até 1,5 g de amostra, sem comprometer a eficiência de decomposição<sup>42</sup>. Desta forma, foram avaliadas massas de amostra de 250, 500, 700, 1000 e 1500 mg de SNE. Inicialmente, é importante destacar que a decomposição de 1500 mg de amostra produziu digeridos com a presença de um resíduo branco insolúvel, sendo um indicativo da decomposição incompleta. Por outro lado, quando a massa de amostra foi igual ou inferior a 1000 mg, não foi observada a presença de material insolúvel. Na Figura 7 observa-se, como esperado, um aumento da concentração de C residual com o incremento da massa de amostra. Para 1000 mg de amostra a concentração de C residual foi 711 mg L<sup>-1</sup> que, segundo a literatura não produz interferências na determinação multielementar por ICP OES.<sup>35</sup> Segundo Wiltsche et al. concentrações de até 8000 mg L<sup>-1</sup> de C (na forma de fenilalanina) não produzem interferências significativas nas determinações por ICP OES.<sup>35</sup>

As determinações por ICP-MS, por sua vez, requerem digeridos com concentração de C ainda menor. De acordo com a literatura, para a maioria dos isótopos não é observada supressão ou aumento do sinal analítico para soluções contendo até 2000 mg L<sup>-1</sup> de C, com exceção dos isótopos <sup>52</sup>Cr, <sup>53</sup>Cr e <sup>75</sup>As.<sup>34</sup> Para esses isótopos, concentrações de C superiores a 250 mg L<sup>-1</sup> já são suficientes para produzir interferências na determinação destes elementos.<sup>34</sup> Assim, em função da concentração de C (711 mg L<sup>-1</sup>) no digerido obtido a partir de 1000 mg de SNE, todos os elementos previamente selecionados também podem ser determinados por ICP-MS, com exceção de Cr e As. Estes dois elementos foram determinados por ICP OES devido à pronunciada interferência do carbono na determinação dos mesmos por ICP-MS.



Figura 7- Concentração de C para a decomposição de diferentes massas de SNE, a temperatura de 250 °C com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.



#### 4.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESSÃO NA EFICIÊNCIA DA DIGESTÃO COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Uma vez que muitos sistemas comerciais baseados no uso da radiação micro-ondas suportam pressões inferiores à suportada pelo sistema SRC (199 bar), foi realizado um ensaio com a pressão do equipamento limitada a 80 bar (pressão máxima atingida por alguns sistemas comerciais) para verificar a eficiência de digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%. A massa de amostra decomposta neste experimento foi 500 mg com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% sendo o programa de aquecimento o mesmo previamente otimizado. Como mostrado na Figura 8, quando o sistema atingiu a pressão de 80 bar, a temperatura manteve-se constante em 220 °C, não atingindo 250 °C. Desta forma, evidenciou-se a necessidade da utilização de sistemas que suportem pressões mais elevadas, permitindo temperaturas mais elevadas e, conseqüentemente uma melhor eficiência da digestão, quando esta for realizada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> somente, Figura 9. A influência da pressão também é mostrada na Figura 10, onde se observa que a concentração de C residual no digerido diminui com o aumento da pressão do sistema.

Figura 8- Gráfico da pressão e temperatura, limitando o sistema SCR a 80 bar (-) pressão (-) temperatura com 500 mg de SNE com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

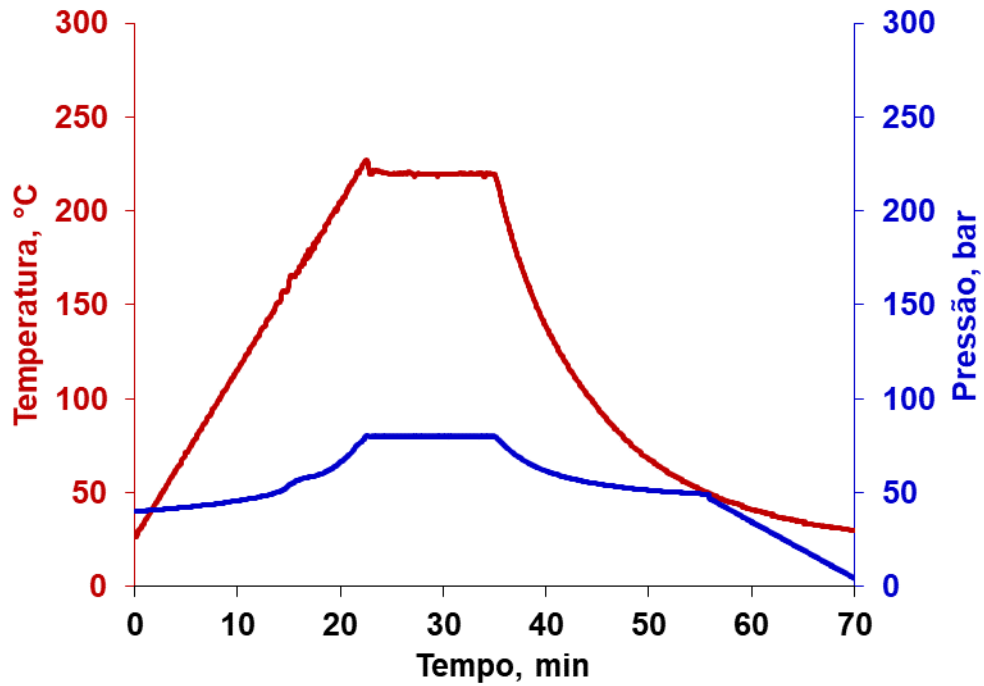


Figura 9- Gráfico da pressão e temperatura, limitando o sistema SCR a 160 bar (-) pressão (-) temperatura com 1000 mg de SNE com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

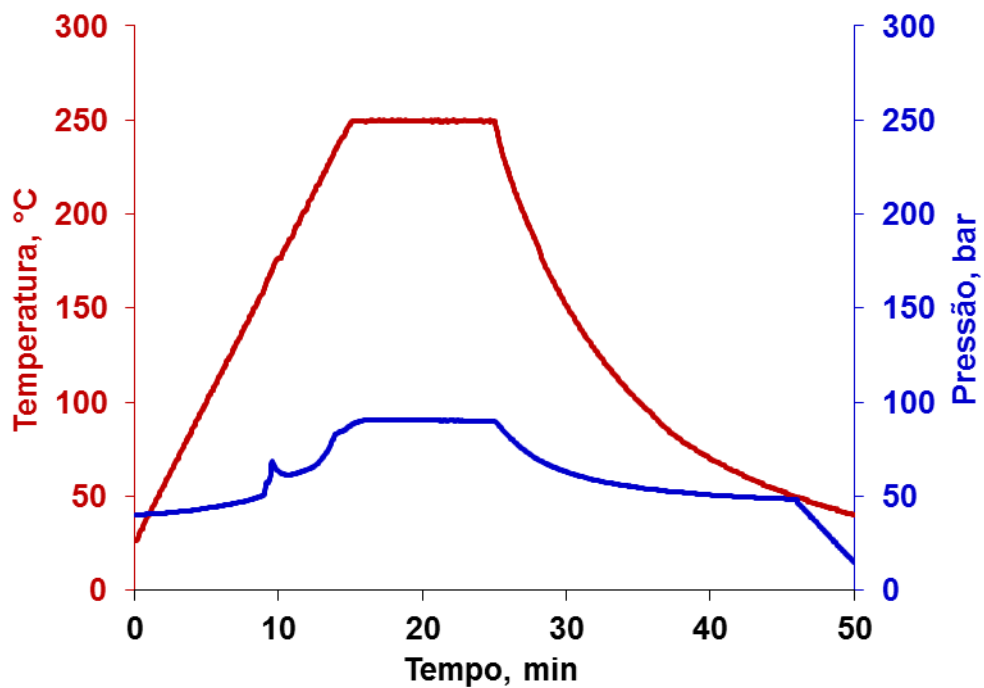
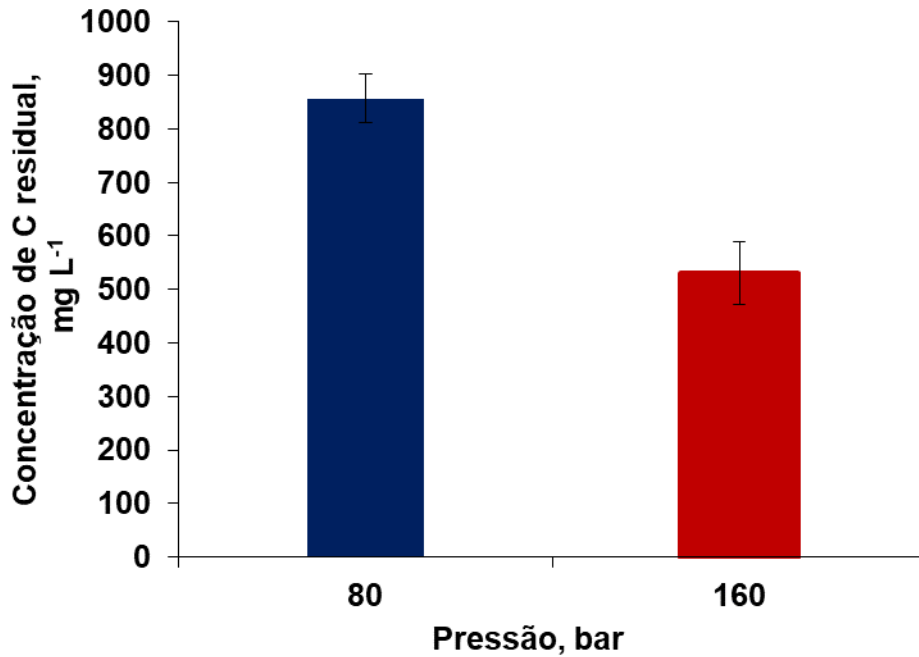


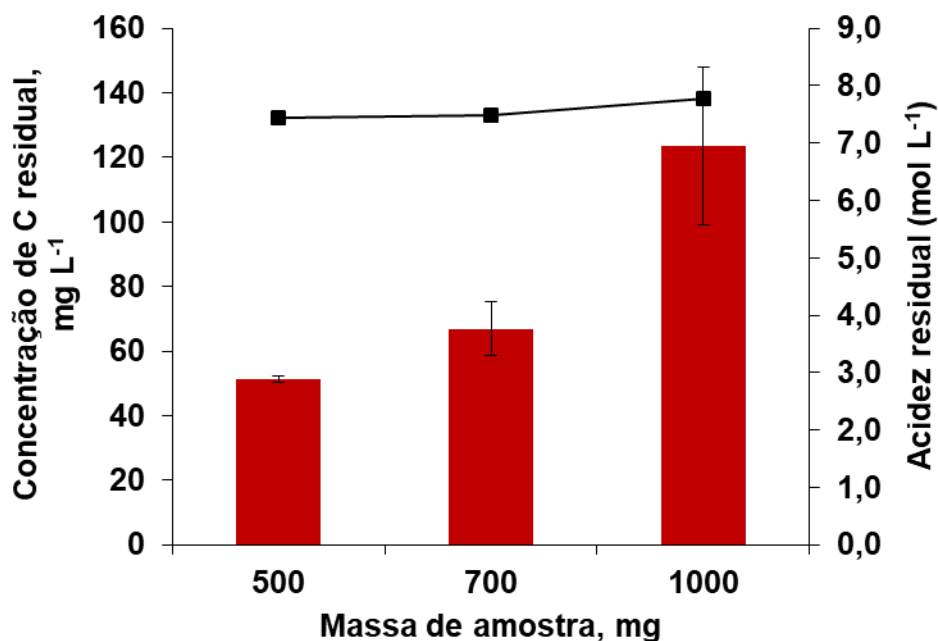
Figura 10- Concentração de C residual, utilizando 500 mg de SNE com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% a 80 e 160 bar.



#### 4.6 DIGESTÃO DE SNE UTILIZANDO HNO<sub>3</sub> CONCENTRADO NO SISTEMA SRC

Para fins de comparação a amostra AM5 foi digerida utilizando HNO<sub>3</sub> concentrado em substituição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mantendo as demais condições que foram otimizadas. Inicialmente, 500, 700 e 1000 mg de amostra foram digeridos com 8 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado a 250°C. Na Figura 11 são mostrados os valores de C residual e acidez residual em função da massa de amostra. De forma análoga ao que fora constatado para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observa-se aumento da concentração de C residual com o incremento da massa de amostra. Contudo, a concentração de C residual quando utilizado o HNO<sub>3</sub> para decompor 1000 mg de amostra (123 mg L<sup>-1</sup> de C) foi significativamente menor que a observada quando utilizado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Figura 11- Concentração de C residual e concentração de acidez residual (■ mol L<sup>-1</sup>) para diferentes massas de SNE, temperatura de 250°C e volume de 8 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado.



No que diz respeito à acidez residual, observa-se na Figura 10 um valor de aproximadamente 8 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> nos digeridos. De acordo com a literatura soluções contendo até 2,8 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> (v/v) não causam interferências significativas nas determinações por ICP-MS.<sup>34</sup> Assim, fez-se necessária a diluição dos digeridos com HNO<sub>3</sub>, em pelo menos 3 vezes para evitar interferências nas determinações por ICP-MS e ICP OES. Neste caso, houve prejuízo do LD, em função da diluição necessária para evitar as interferências decorrentes da elevada acidez residual.

De forma comparativa, a acidez residual nos digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi desprezível, não tendo sido possível a sua quantificação através da titulação potenciométrica. Salienta-se ainda que o pH dos digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% foi aproximadamente 4,0, enquanto que para os digeridos obtidos com o HNO<sub>3</sub> o pH foi 0,0.

Assim, tanto do ponto de vista analítico quanto no que diz respeito aos preceitos da Química Verde, os digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são considerados mais adequados do que aqueles obtidos com HNO<sub>3</sub>.

#### 4.7 DECOMPOSIÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NA COMPOSIÇÃO DA SNE

Para tentar compreender a influência dos compostos orgânicos presentes na SNE, na concentração de C residual nos digeridos, estes compostos foram digeridos com  $H_2O_2$  50% no sistema SRC. Foram digeridas amostras de xarope de glicose (fonte de carboidrato na SNE), caseinato de sódio (fonte de proteína na SNE) e óleos de canola e girassol (fonte de lipídio na SNE). Massas de 100, 200 e 400 mg destas substâncias foram digeridas com  $H_2O_2$  50%, seguindo-se o método desenvolvido para SNE. Como mostram as Figuras 12, 13, 14 e 15, maiores valores de C residual foram obtidos para os lipídios (óleo de canola e girassol) e proteína (caseinato de sódio). Desta forma, a fonte de carboidrato (xarope de glicose) é mais facilmente oxidada pelo  $H_2O_2$  do que as fontes de lipídio e proteína. Assim, as maiores contribuições para o C residual obtidos para a amostra de AM5 são provenientes das fontes de proteína e lipídio. Resultados reportados na literatura também foi demonstrado que matrizes ricas em gordura e proteína são mais refratárias à oxidação com  $H_2O_2$  do que matrizes ricas em carboidratos.<sup>18, 48, 50</sup>

Figura 12- Concentração de C residual em função da massa de óleo de canola digerido a 250°C com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

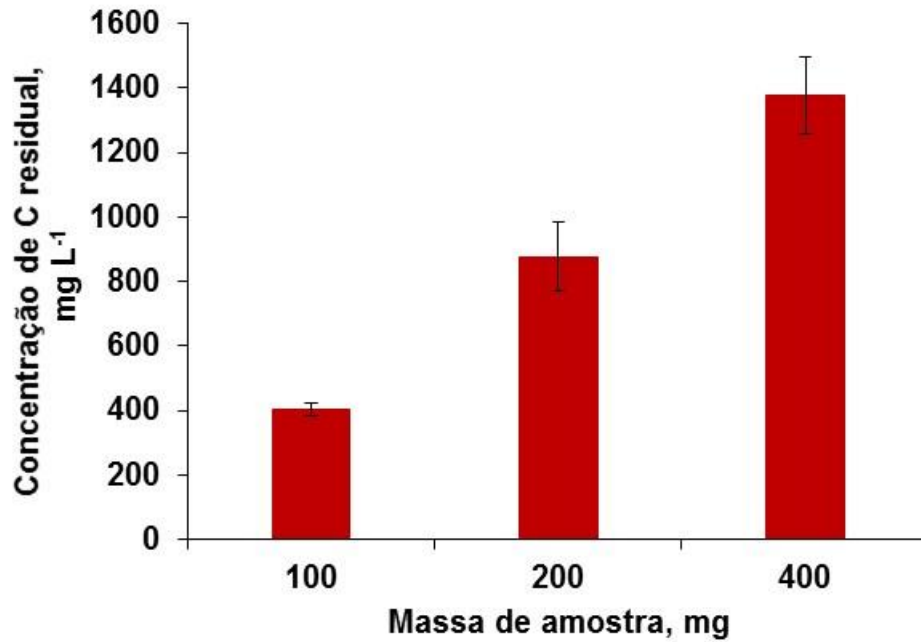


Figura 13- Concentração de C residual em função da massa de óleo de girassol digerido a 250 °C com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

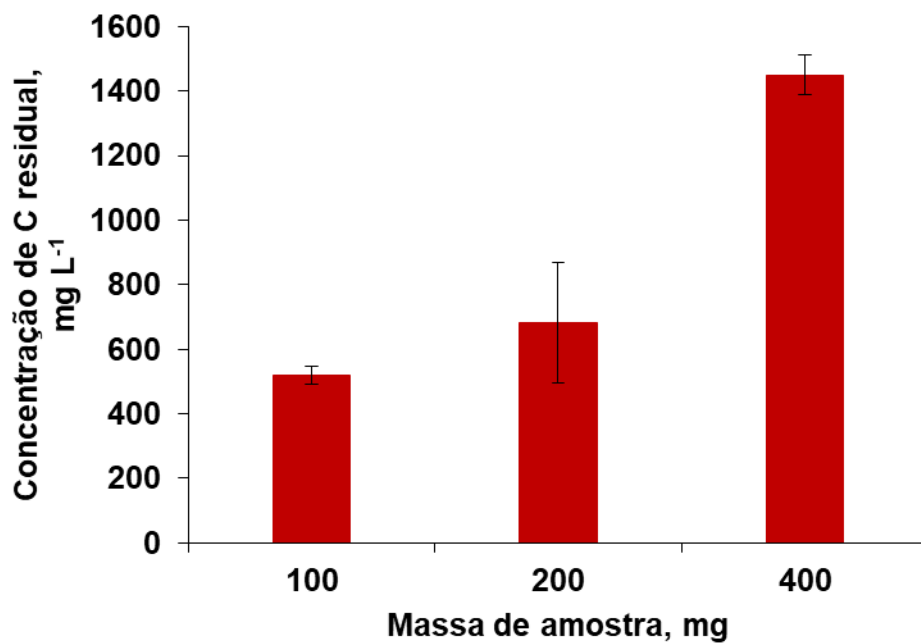


Figura 14- Concentração de C residual em função da massa de caseinato de sódio digerido a 250°C com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

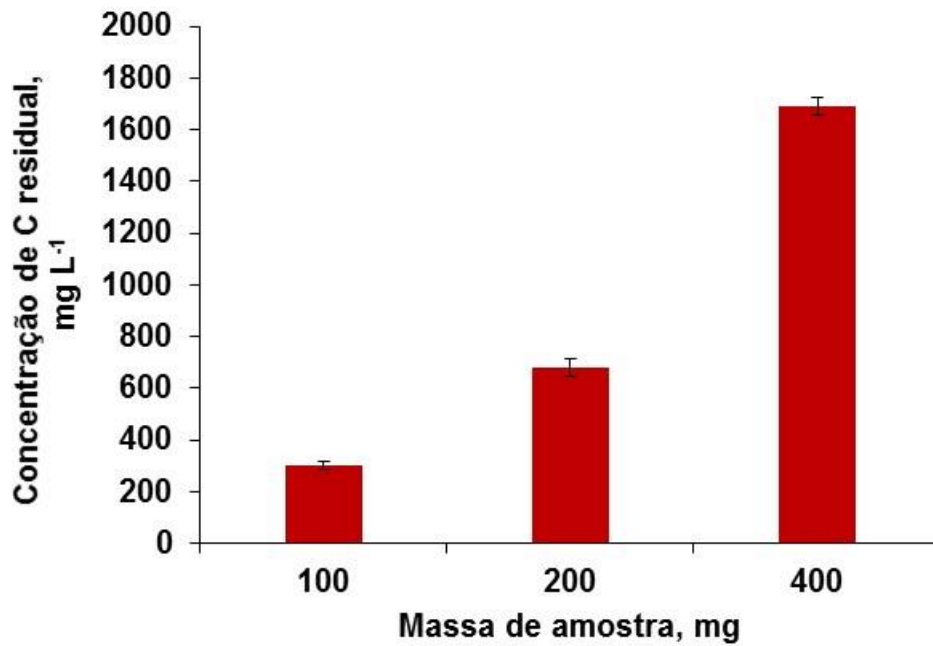
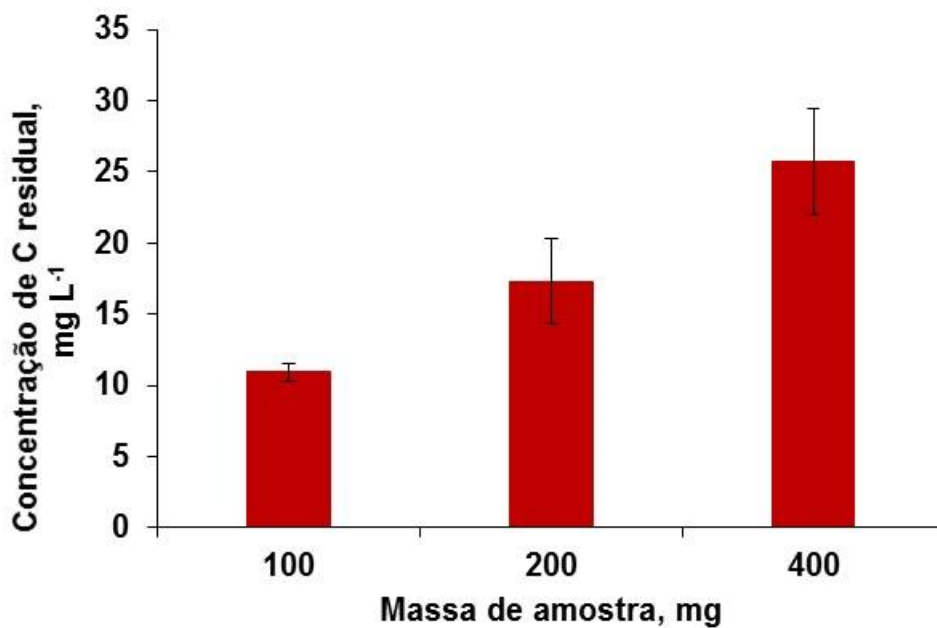


Figura 15- Concentração de C residual em função da massa de xarope de glicose a 250°C com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.



#### 4.8 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE CARBONO RESIDUAL (RCC) EM SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS REFRATÁRIAS À OXIDAÇÃO POR VIA ÚMIDA

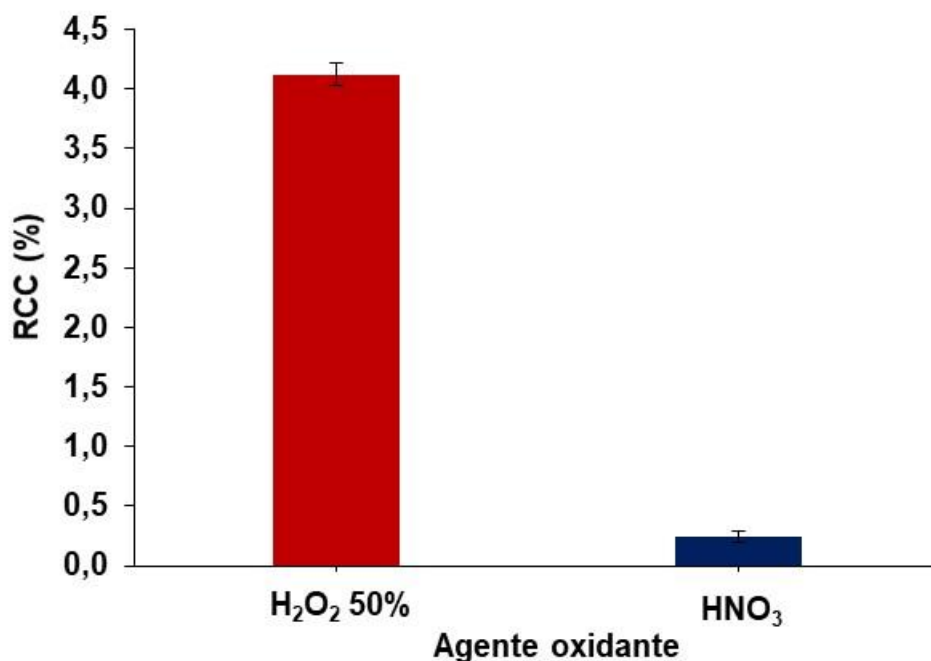
Wurfels et al. avaliaram a eficiência da decomposição de diversas substâncias orgânicas em sistema fechado usando  $\text{HNO}_3$  concentrado e aquecimento resistivo, com temperatura e pressões máximas de 180 °C e 20 bar, respectivamente.<sup>50</sup> Os autores observaram que para algumas substâncias orgânicas, tais como aminoácidos (histidina, triptofano e fenilalanina) e ácidos graxos insaturados (ácido linoleico, por exemplo), valores de RCC (maiores que 10%) foram encontrados.

Desta forma, para verificar a eficiência de digestão de algumas destas substâncias refratárias à oxidação por via úmida em sistema fechado, foram conduzidos experimentos utilizando-se o sistema SRC com  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% e  $\text{HNO}_3$  concentrado como agente oxidante. É importante destacar que não foram encontrados relatos na literatura do comportamento destas substâncias refratárias à oxidação em sistemas de alta pressão (superior a 20 bar), ou mesmo sobre a utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  somente.

Assim, foram conduzidos experimentos envolvendo a digestão de 400 mg de histidina, triptofano, fenilalanina e ácido linoleico, com 8 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% no sistema SRC. Nas Figuras 16, 17, 18 e 19 são apresentados os valores de RCC para estas substâncias orgânicas utilizando o sistema SRC (250 °C e 160 bar). Inicialmente, de acordo com Figura 16 observa-se que os valores de RCC obtidos para histidina foram menores quando o  $\text{HNO}_3$  foi utilizado como oxidante em comparação com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por outro lado, quando comparados com o valor relatado por Wurfels et al. (RCC de 31% para histidina) constata-se que os valores de RCC obtidos para a digestão com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sistema SRC são muito menores (cerca de 9 vezes). Isto, pode ser justificado pela maior temperatura e pressão atingidas no sistema SRC, com conseqüente incremento do poder de oxidação do  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>50</sup>



Figura 16- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de histidina a 250°C.



Nos valores de RCC para o triptofano (Figura 17) não se observou diferença significativa entre os valores obtidos para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RCC de 6,7%) e o HNO<sub>3</sub> (RCC de 6,4%). Diferentemente do que foi observado para a histidina, os valores de RCC para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub> não diferem significativamente. Isto, pode ser explicado pela presença do anel aromático no triptofano, que quando reage com o HNO<sub>3</sub> é desativado, diminuindo a reatividade do anel. A reação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provavelmente, não promove a desativação do anel e assim valores de RCC próximos foram obtidos para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub>. Os valores de RCC obtidos para o sistema SRC, com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou HNO<sub>3</sub> como oxidantes, são menores do que o observado por Wurfels et al. (RCC de 12,2%), provavelmente em função das condições mais drásticas de pressão e temperatura permitidas pelo SRC.<sup>50</sup>

Os resultados de RCC para o último aminoácido analisado (fenilalanina) são apresentados na Figura 18. Diferentemente do que foi observado para os outros aminoácidos, os valores de RCC obtidos para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram significativamente menores do que os valores obtidos para o HNO<sub>3</sub>. Novamente, a justificativa para o menor valor de RCC para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RCC de 9,3%) do que para o HNO<sub>3</sub> (RCC de 25,2%), pode ser a presença do anel aromático na estrutura da fenilalanina e a

consequente desativação deste anel na presença do  $\text{HNO}_3$  como oxidante. Os resultados reportados por Wurfels et al. para a fenilalanina são significativamente superiores (RCC de 57%) aos observados para o sistema SRC.<sup>50</sup>

Figura 17- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de triptofano a 250°C.

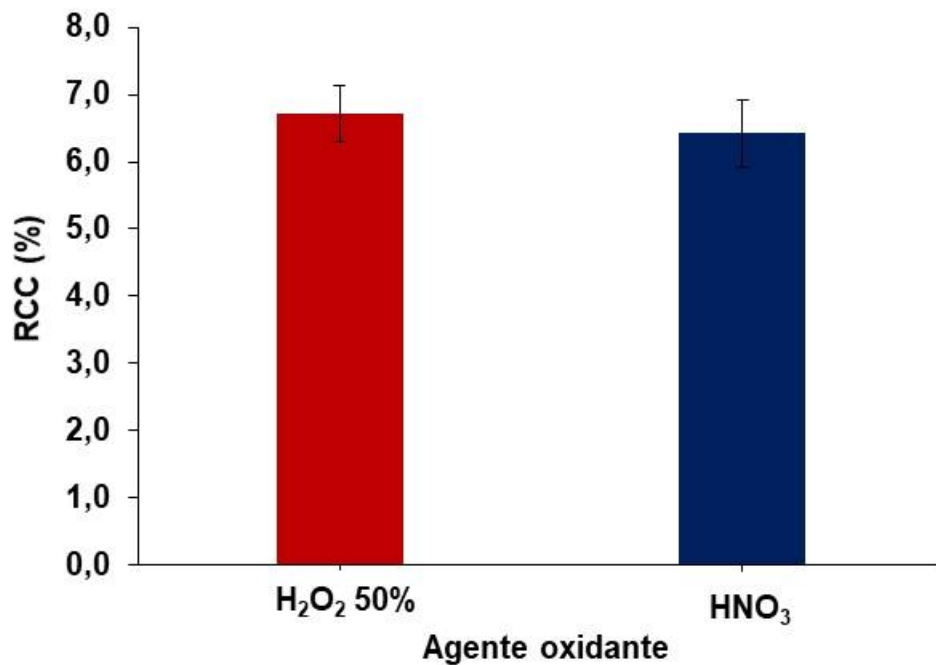
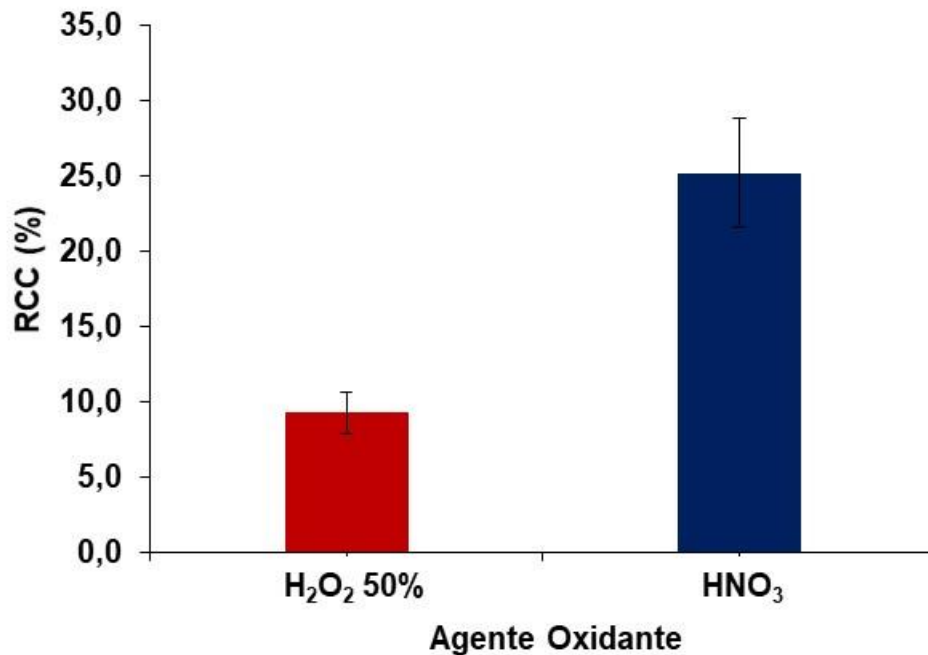
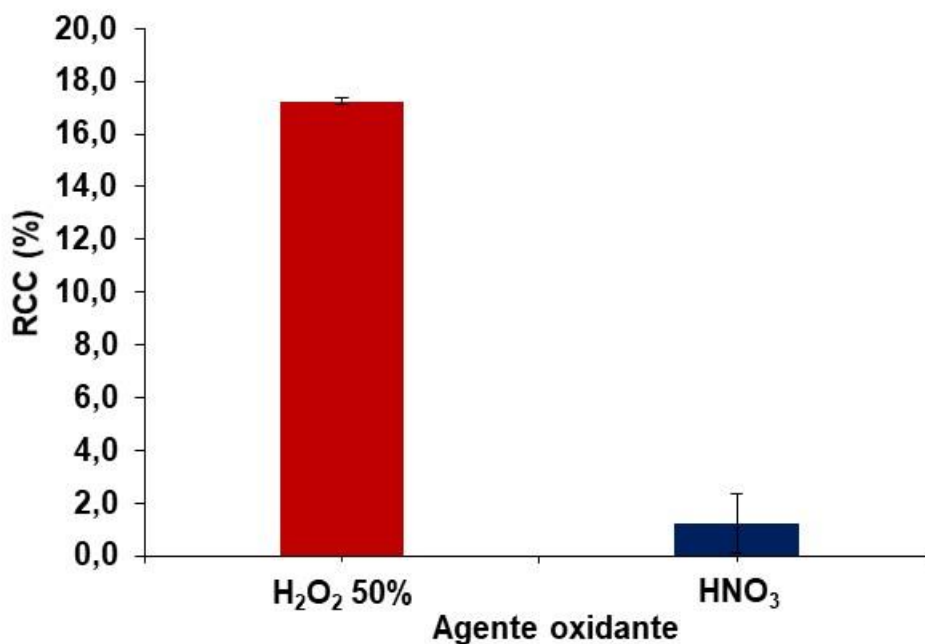


Figura 18- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de fenilalanina a 250°C.



Os valores de RCC para o ácido linoleico digerido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou HNO<sub>3</sub> são apresentados na Figura 18, onde observa-se que os valores de RCC para o HNO<sub>3</sub> são menores do que os observados para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso pode ser explicado pelas insaturações presentes nos ácidos graxos, que são menos suscetíveis à oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que com HNO<sub>3</sub>. Contudo, fazem-se necessários estudos adicionais para verificar esta diferença de reatividade dos ácidos graxos insaturados frente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub>. Por fim, os valores de RCC obtidos para o sistema SRC, com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub> como oxidantes, são significativamente inferiores aos obtidos por Wurfels et al. (RCC de 17,3%). Novamente afirma-se que as condições de temperatura e pressão mais drásticas permitidas pelo sistema SRC justificam os menores valores de RCC.<sup>50</sup>

Figura 19- Variação do RCC em função do agente oxidante foram adicionados 8 mL na digestão de 400 mg de ácido linoleico a 250°C.



#### 4.9 DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR UTILIZANDO ICP OES E ICP-MS APÓS A DECOMPOSIÇÃO EMPREGANDO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E HNO<sub>3</sub> NAS SNE

Após as avaliações dos parâmetros e a escolha das melhores condições para decomposição, foram analisadas 9 amostras de SNE, as quais foram decompostas com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%. Para avaliação da exatidão do método, as 9 amostras foram também decompostas com HNO<sub>3</sub>. Os elementos investigados foram determinados por ICP OES e ICP-MS, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 juntamente com as concentrações informadas nos rótulos das SNE. É importante destacar que, em função da possibilidade de interferências causadas pelo C, nos digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% As, Cr e Se foram determinados por ICP OES, enquanto que para os digeridos obtidos com HNO<sub>3</sub> estes elementos foram determinados por ICP-MS. Cabe destacar também que os digeridos obtidos com HNO<sub>3</sub> foram diluídos com água 3 vezes.

Nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 pode-se observar que as concentrações de As, Cd e Pb são baixas, em algumas amostras estão abaixo dos LDs. Porém, é importante

destacar que não há legislação para limites máximos permitidos para estes elementos tóxicos em SNE.

Com relação aos elementos essenciais, conforme as Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 observa-se que as concentrações de alguns deles, tais como Ca, K, Na e P, são inferiores àquelas indicadas em alguns rótulos das SNE. A concentração de Ca para a amostra AM1, K para as amostras AM2, AM4 e AM8, P amostra AM4 e Na para a amostra AM8 estão em concentrações inferiores as indicadas pelo fabricante.

Quanto à avaliação da exatidão das amostras, não se observou diferença significativa (teste t-Student, nível de confiança de 95%), entre os resultados para o método proposto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% quando comparado com o método que faz uso de HNO<sub>3</sub> concentrado.

Tabela 4- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> após decomposição utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE

Analito	AM1			AM2		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo
As	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Ca <sup>a</sup>	841 $\pm$ 42	803 $\pm$ 33	1111	1088 $\pm$ 128	1249 $\pm$ 98	1104
Co <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	0,009 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,002	-
Cr	< 0,10 <sup>a</sup>	0,049 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,044	< 0,10 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,09
Cu <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	-	1,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	-
Fe <sup>a</sup>	13 $\pm$ 1,0	15 $\pm$ 0,9	17	18 $\pm$ 2,5	22 $\pm$ 1,7	22
K <sup>a</sup>	1479 $\pm$ 125	1525 $\pm$ 173	1713	1600 $\pm$ 164	1586 $\pm$ 141	1849
Mg <sup>a</sup>	253 $\pm$ 21	240 $\pm$ 23	240	360 $\pm$ 25	347 $\pm$ 33	310
Mn <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	2,4	4,4 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,3	4,6
Mo <sup>b</sup>	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,13	0,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,14
Na <sup>a</sup>	1010 $\pm$ 122	1150 $\pm$ 94	879	1200 $\pm$ 159	1151 $\pm$ 121	1232
P <sup>a</sup>	816 $\pm$ 80	799 $\pm$ 70	796	1100 $\pm$ 135	1045 $\pm$ 125	993
Pb <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Se	< 0,50 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03	< 0,50 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,08
Zn <sup>b</sup>	8,2 $\pm$ 0,7	7,8 $\pm$ 0,7	8,0	16 $\pm$ 1,0	15 $\pm$ 0,9	17

Tabela 5- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> após decomposição utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE.

Analito	AM3			AM4		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo
As	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Ca <sup>a</sup>	688 $\pm$ 82	701 $\pm$ 38	756	755 $\pm$ 95	795 $\pm$ 71	937
Co <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Cr	< 0,10 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,06	< 0,10 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,10
Cu <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,1	-	1,5 $\pm$ 0,45	1,4 $\pm$ 0,1	-
Fe <sup>a</sup>	12 $\pm$ 0,9	14 $\pm$ 0,5	22	13 $\pm$ 1,3	13 $\pm$ 1,2	24
K <sup>a</sup>	1254 $\pm$ 114	1306 $\pm$ 133	1417	1300 $\pm$ 172	1530 $\pm$ 108	2153
Mg <sup>a</sup>	236 $\pm$ 23	224 $\pm$ 19	217	290 $\pm$ 33	263 $\pm$ 17	288
Mn <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	3,1	2,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	-
Mo <sup>b</sup>	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,004	0,01	0,15 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,22
Na <sup>a</sup>	1010 $\pm$ 132	988 $\pm$ 135	945	812 $\pm$ 73	795 $\pm$ 750	956
P <sup>a</sup>	683 $\pm$ 67	716 $\pm$ 52	680	965 $\pm$ 31	835 $\pm$ 83	1188
Pb <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Se	< 0,50 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,05	< 0,50 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,10
Zn <sup>b</sup>	13 $\pm$ 1,1	11 $\pm$ 1,3	11	17 $\pm$ 2,2	15 $\pm$ 0,9	17

Tabela 6- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> após decomposição utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE.

Analito	AM5			AM6		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo
As	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Ca <sup>a</sup>	2003 $\pm$ 179	1934 $\pm$ 138	1882	702 $\pm$ 75	758 $\pm$ 108	914
Co <sup>b</sup>	0,009 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,001	-	< 0,001	< 0,003	-
Cr	< 0,10 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,12	< 0,10 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	-
Cu <sup>b</sup>	2,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	-	1,8 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	2,0
Fe <sup>a</sup>	24 $\pm$ 1,5	24 $\pm$ 1,8	24	18 $\pm$ 1,8	20 $\pm$ 1,8	23
K <sup>a</sup>	1341 $\pm$ 129	1332 $\pm$ 123	1561	1395 $\pm$ 144	1322 $\pm$ 146	1372
Mg <sup>a</sup>	172 $\pm$ 16	171 $\pm$ 13	184	195 $\pm$ 29	175 $\pm$ 19	182
Mn <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,2	4,9	4,5 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,3	5,5
Mo <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	0,18	< 0,02	< 0,03	-
Na <sup>a</sup>	581 $\pm$ 42	582 $\pm$ 51	551	1204 $\pm$ 123	1236 $\pm$ 133	1418
P <sup>a</sup>	1288 $\pm$ 144	1100 $\pm$ 133	1102	719 $\pm$ 56	787 $\pm$ 67	503
Pb <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Se	< 0,50 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,012	< 0,50 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,09
Zn <sup>b</sup>	25 $\pm$ 1,3	21 $\pm$ 1,6	22	30 $\pm$ 2,4	26 $\pm$ 1,9	29



Tabela 7- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> após decomposição utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE.

Analito	AM7			AM8		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado no Rótulo
As <sup>a</sup>	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Ca <sup>a</sup>	1870 $\pm$ 183	2048 $\pm$ 198	927	730 $\pm$ 42	758 $\pm$ 31	744
Co <sup>b</sup>	0,003 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,0005	-	< 0,001	< 0,003	-
Cr	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03	< 0,10 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03
Cu <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,01	0,83	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,1
Fe <sup>a</sup>	20 $\pm$ 2,8	17 $\pm$ 1,5	12	14 $\pm$ 1,8	16 $\pm$ 1,2	16
K <sup>a</sup>	1412 $\pm$ 123	1398 $\pm$ 153	1480	1652 $\pm$ 141	1639 $\pm$ 165	2048
Mg <sup>a</sup>	275 $\pm$ 20	253 $\pm$ 21	213	223 $\pm$ 18	226 $\pm$ 17	232
Mn <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,10	2,59	2,9 $\pm$ 0,01	2,9 $\pm$ 0,02	2,7
Mo <sup>b</sup>	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,09	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,07
Na <sup>a</sup>	736 $\pm$ 47	746 $\pm$ 62	974	838 $\pm$ 62	952 $\pm$ 91	1350
P <sup>a</sup>	1417 $\pm$ 135	1549 $\pm$ 125	788	636 $\pm$ 78	662 $\pm$ 59	603
Pb <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-	< 0,001	< 0,003	-
Se	< 0,50 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	0,041	< 0,50 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,06
Zn <sup>b</sup>	15 $\pm$ 0,9	13 $\pm$ 0,8	8,3	14 $\pm$ 0,8	12 $\pm$ 0,6	12

Tabela 8- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de SNE por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> após decomposição utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) e valores informados nos rótulos das SNE.

Analito	AM9		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$	Informado
As	< 0,25 <sup>a</sup>	< 0,006 <sup>b</sup>	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-
Ca <sup>a</sup>	639 $\pm$ 58	635 $\pm$ 39	674
Co <sup>b</sup>	0,003 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,001	-
Cr	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,13
Cu <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	2,0
Fe <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1,4	16 $\pm$ 1,3	18
K <sup>a</sup>	1665 $\pm$ 169	1658 $\pm$ 152	1872
Mg <sup>a</sup>	355 $\pm$ 18	351 $\pm$ 28	346
Mn <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,1	3,6
Mo <sup>b</sup>	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,11
Na <sup>a</sup>	936 $\pm$ 82	1009 $\pm$ 99	1226
P <sup>a</sup>	856 $\pm$ 74	840 $\pm$ 65	767
Pb <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,003	-
Se	< 0,50 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,08
Zn <sup>b</sup>	12 $\pm$ 0,8	11 $\pm$ 0,7	13

#### 4.9.1 Decomposição de material de referência (RM) empregando $\text{H}_2\text{O}_2$

Além da comparação dos resultados obtidos para  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$ , utilizados na digestão de SNE a avaliação da exatidão da digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  também foi realizada mediante análise de material de referência (RM do inglês *reference material*) de leite em pó integral (NIST 8435). Em virtude de não haver material referência de SNE, o RM de leite em pó foi utilizado, tendo em vista sua composição rica em carboidratos (43%), gorduras (21%) e proteínas (26%). Na Tabela 9 estão

informadas as concentrações determinadas no leite em pó digerido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% no sistema SRC, bem como os valores de referência.

Tabela 9- Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) por ICP OES<sup>a</sup> e ICP-MS<sup>b</sup> em RM de leite em pó utilizando SRC com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%.

<b>Analito</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Valor de referência</b>
As <sup>a</sup>	< 0,25	-
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	0,0002
Ca <sup>a</sup>	10231 ± 1043	9220 ± 940
Co <sup>b</sup>	0,04 ± 0,001	-
Cu <sup>b</sup>	0,44 ± 0,04	0,46 ± 0,08
Fe <sup>a</sup>	2,1 ± 0,10	1,8 ± 1,1
K <sup>a</sup>	12840 ± 900	13630 ± 470
Mg <sup>a</sup>	879 ± 62	814 ± 76
Mn <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01	0,17 ± 0,05
Mo <sup>b</sup>	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,13
Na <sup>a</sup>	3413 ± 260	3560 ± 400
P <sup>a</sup>	7780 ± 390	7800 ± 490
Pb <sup>b</sup>	0,10 ± 0,033	0,11 ± 0,05
Se <sup>a</sup>	< 0,50	0,13 ± 0,014
Zn <sup>b</sup>	28 ± 1,9	28 ± 3,1

A partir dos resultados foi possível observar que os resultados obtidos na digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sistema SRC não apresentam diferença significativa (teste t-student, nível de confiança de 95%) quando comparados com os valores de referência, com exceção do As, Cd, Co e Se cujos valores de referência não estão disponíveis ou os valores obtidos pelo método proposto são inferiores ao LD. De qualquer forma, o método proposto para SNE, utilizando somente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ser considerado exato.

#### 4.9.2 Limites de detecção

O limite de detecção está relacionado a quantidade mínima de analito presente na amostra que pode ser detectado, onde os valores do LDs foram estabelecidos a partir de 10 medidas do branco considerando a média e o desvio padrão, para cada analito. O LD é expresso como três vezes o desvio padrão somado a concentração média do branco e dividido pela sensibilidade.

Na Tabela 10 estão mostrados os resultados para os LDs obtidos pelas técnicas de ICP OES e ICP-MS após digestão em sistema SRC utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% e  $\text{HNO}_3$  concentrado. A maioria dos limites de detecção obtidos para a digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  é melhor do que os obtidos com  $\text{HNO}_3$ , com exceção dos elementos As, Cr, Na, P, Se e Zn. Em virtude da diluição necessária, para minimizar os efeitos da acidez residual, os limites de detecção para o  $\text{HNO}_3$  são piores do que os observados para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

No caso dos elementos As, Cr e Se os LDs são maiores para o método que utiliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo fato das determinações terem sido realizadas por ICP OES em decorrência da concentração de C residual nestes digeridos. Para Na, P e Zn os maiores valores de LDs para a digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  são justificadas pela contaminação deste reagente com estes elementos.

Tabela 10- Limites de detecção ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidos para o método de preparo de amostra para  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  por SRC.

Analito	LD	
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{HNO}_3$
As	0,25 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>
Cd <sup>b</sup>	0,001	0,003
Ca <sup>a</sup>	0,3	0,9
Co <sup>b</sup>	0,001	0,003
Cr	0,10 <sup>a</sup>	0,06b
Cu <sup>b</sup>	0,005	0,015
Fe <sup>a</sup>	0,03	0,09
K <sup>a</sup>	4	12
Mg <sup>a</sup>	0,002	0,006
Mn <sup>a</sup>	0,01	0,03
Mo <sup>b</sup>	0,02	0,06
Na <sup>a</sup>	450	9
P <sup>a</sup>	118	3
Pb <sup>b</sup>	0,001	0,003
Se	0,50 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>
Zn <sup>b</sup>	0,35	0,06

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos digestão de amostras de SNE em sistema de alta pressão (SRC) com o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  para a amostra e posterior determinação multielementar por ICP OES e ICP-MS. Em uma primeira análise, ambos os métodos avaliados foram obtidos digeridos sem a presença de material insolúvel. No que diz respeito à eficiência de digestão, os digeridos obtidos com  $\text{HNO}_3$  concentrado apresentaram menor concentração de carbono residual do que os digeridos obtidos com  $\text{H}_2\text{O}_2$  50%. As concentrações de C residual em ambos os digeridos não interferiu nas determinações por ICP OES e ICP-MS para a grande maioria dos elementos, com exceção dos elementos As, Cr e Se nos digeridos obtidos com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ficou evidente também que a digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  deve ser feita em sistemas que permitam elevadas pressões (acima de 100 bar) para garantir o maior poder de oxidação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Com relação à acidez residual, nos digeridos obtidos com  $\text{HNO}_3$  apresentaram valores de acidez residual de 55% necessitando-se diluir o digerido (pelo menos 3 vezes) para minimizar a supressão de sinal nas determinações por ICP OES e ICP-MS. Já nos digeridos obtidos com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a acidez residual foi desprezível e estes puderam ser analisados diretamente por ICP OES e ICP-MS. Neste sentido observa-se um prejuízo para os LDs quando a amostra é digerida com  $\text{HNO}_3$ , se comparada à digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, cabe destacar que a digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apresentam as características que atendem melhor aos preceitos da Química Verde, pois os principais produtos decorrentes da oxidação da matéria orgânica pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  são a água e o oxigênio.

Na investigação da eficiência de digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  das principais substâncias presentes nas SNE, observa-se que o caseinato de sódio (fonte de proteína) e os óleos (fonte de lípidios) são mais difíceis de serem oxidados do que o xarope de glicose (fonte de carboidrato), pois continham maiores concentrações de C residual. De igual maneira, foi investigada a digestão de algumas substâncias orgânicas (histidina, triptofano, fenilalanina e ácido linoleico) notadamente refratárias à oxidação em sistema fechado por via úmida, observando-se que o C residual, era menor que o encontrado em trabalhos prévios envolvendo sistemas que suportam baixas pressões. As condições de pressão e temperatura mais drásticas permitidas

pelo sistema SRC utilizado no presente trabalho, garantem uma melhora do poder de oxidação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$ , o que justifica o teor de C residual.

Nas amostras de SNE analisadas, as concentrações de As, Cd e Pb são inferiores aos respectivos LDs. Além disso, elementos essenciais tais como Ca, K, Na e P estavam presentes em concentração inferior a informada no rótulo da embalagem do produto, mas ausência de legislação que trate da variação permitida para a concentração destes elementos impede uma análise mais profunda.

Por fim, a partir dos resultados para o material de referência (RM, NIST 8435 *Whole Milk Powder*), pode-se afirmar que o método de digestão com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e exato, já que não há diferença significativa (teste t-Student, nível de confiança de 95%), dos valores obtidos pelo método proposto e os valores de referência.

## REFERÊNCIAS

1. BANKHEAD, R. et al. Enteral nutrition practice recommendations. **JPEN-Parenter. Enter.**, v. 33, p. 122-167, 2009.
2. COBER, M. P. et al. Definition of terms, style, and conventions used in A.S.P.E.N. guidelines and standards. **JPEN-Parenter. Enter.**, v. 20, n. 2, p. 281-285, 2015.
3. ANVISA. Resolução nº 449, de 9 de setembro de 1999 , aprova o regulamento técnico referente a alimentos para nutrição enteral, constante do anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 set. 1999 Disponível em: Disponível em:<<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0NQ%2C%2C>>. Acesso em: 21 fev. 2018.
4. MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005.
5. SRIRAM, K.; LONCHYNA, V. A. Micronutrient supplementation in adult nutrition therapy: Practical considerations. **JPEN-Parenter. Enter.**, v. 33, p. 548-562, 2009.
6. KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 1. ed. São Paulo: EditSBQ, 2016.
7. MILESTONE. **Milestone, Srl UltraWAVE, Operator Manual**. Sorisole, 2013. Disponível em:<[http://milestonesci.com/wp-content/uploads/2017/08/Ultrawave\\_Brochure.pdf](http://milestonesci.com/wp-content/uploads/2017/08/Ultrawave_Brochure.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2018.
8. MATTOS, I. L. et al. Hydrogen peroxide: Importance and determination. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
9. ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 63, de 6 de julho de 2000, regulamento técnico para a terapia de nutrição enteral. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 jul. 2000. Disponível em: Disponível em:<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_63\\_2000.pdf/c7328947-02d2-4fc6-bebe-8ff140d392ad](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_63_2000.pdf/c7328947-02d2-4fc6-bebe-8ff140d392ad)>. Acesso em: 21 fev. 2018.
10. HARKNESS, L. The history of enteral nutrition therapy: From raw eggs and nasal tubes to purified amino acids and early postoperative jejunal delivery. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 3, p. 399-404, 2002.
11. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
12. DELUCIA, R. et al. **Farmacologia Integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.



13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2. ed. Tailândia: WHO Library Cataloguing in Publication Data, 1998.
14. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1998.
15. ANVISA. Portaria nº 33, de 13 de janeiro de 1998 ementa não oficial: Adota valores como níveis de IDR para as vitaminas, minerais e proteínas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Disponível em: Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_269\\_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3)>. Acesso em: 21 fev. 2018.
16. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Essential nutrients - minerals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB470E/AB470E06.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2018.
17. OOSTHUIZEN, J. **Environmental health-emerging issues and practice** 1. ed. Rijeka: InTech, 2012.
18. MULLER, E. I. et al. Microwave-assisted wet digestion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 156, p. 232-238, 2016.
19. PEREIRA, J. S. F. et al. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 4-11, 2010.
20. MELLO, P. A. et al. Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 746, p. 15-36, 2012.
21. MULLER, E. I. et al. Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a single reaction chamber. **Anal. Methods-Uk**, v. 9, n. 4, p. 649-654, 2017.
22. MULLER, A. L. H. et al. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 27, n. 11, p. 1889-1894, 2012.
23. MESKO, M. F. et al. Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: Challenges and trends of sample preparation. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 31, n. 6, p. 1243-1261, 2016.
24. BECKER, J. S.; DIETZE, H. J. State of the art in inorganic mass spectrometry for analysis of high purity materials. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 228, n. 2-3, p. 127-150, 2003.

25. MONTASER, A. **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. 1. ed. Nova York: Wiley-VCH, 1998.
26. EBDON, L. et al. **An introduction to analytical atomic spectrometry** 1. ed. Chichester: Wiley-VCH, 1998.
27. GINÉ, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. 1. ed. Piracicaba: CENA, 1998.
28. MULLER, A. L. H. et al. Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Food Anal. Method.**, v. 6, n. 1, p. 258-264, 2013.
29. POZEBON, D. et al. Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Addit. Contam. B**, v. 8, n. 3, p. 215-220, 2015.
30. IOP, G. D. et al. Feasibility of microwave-assisted ultraviolet digestion of polymeric waste electrical and electronic equipment for the determination of bromine and metals (Cd, Cr, Hg, Pb and Sb) by ICP-MS. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 32, n. 9, p. 1789-1797, 2017.
31. MULLER, E. I. et al. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 257-261, 2017.
32. ARAUJO, G. C. L. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 2121–2132, 2002.
33. STEWART, II; OLESIK, J. W. Steady state acid effects in ICP-MS. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 13, n. 12, p. 1313-1320, 1998.
34. MULLER, A. L. H. et al. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v. 136, p. 161-169, 2015.
35. WILTSCHE, H.; WINKLER, M.; TIRK, P. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 30, n. 10, p. 2223-2234, 2015.
36. TODOLI, J. L.; MERMET, J. M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 54, n. 6, p. 895-929, 1999.
37. GRINDLAY, G. et al. Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 2, p. 234-243, 2008.

38. ALLAIN, P. et al. Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 1497-1498, 1991.
39. ARRUDA, M. A. Z. **Trends in sample preparation**. 1. ed. Nova York: Nova Science Publishers, 2007.
40. FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1. ed. Amsterdã: Elsevier, 2014.
41. ZLOTORZYNSKI, A. The application of microwave-radiation to analytical and environmental chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 43-76, 1995.
42. MULLER, C. C. et al. Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP-OES. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 255-260, 2014.
43. DRUZIAN, G. T. et al. Rare earth element determination in heavy crude oil by USN-ICP-MS after digestion using a microwave-assisted single reaction chamber. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 31, n. 6, p. 1185-1191, 2016.
44. SEEGER, T. S. et al. Direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry - Feasibility of Na and K determination in desalted crude oil. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 141, p. 28-33, 2018.
45. KRZYZANIAK, S. R. **Determinação de contaminates inorgânicos em nanotubos de carbono por ICP-OES e ICP-MS**. 2016. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
46. OLIVEIRA, J. S. S. et al. Determination of inorganic contaminants in electrical and electronic equipment after digestion using microwave-assisted single reaction chamber. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1657-1664, 2017.
47. NOBREGA, J. A. et al. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272-276, 2012.
48. DENBSKY, G. Schnelle und nahezu verlustfreie nabverasehung biologischen materials mit wasserstoffperoxid unter anwendung hoher temperaturen und drucke. **Z. Anal. Chem.**, v. 267, p. 350-355, 1973.
49. MATUSIEWICZ, H.; BARNES, R. M. Tree-ring wood analysis after hydrogen-peroxide pressure decomposition with inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry and electrothermal vaporization. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 406-411, 1985.

50. WURFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological-materials after pressure decomposition with nitric-acid Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Analytica Chimica Acta**, v. 226, n. 1, p. 1-16, 1989.