

## Declaração

Eu, Cristiano Cabral Müller, declaro que a pesquisa descrita nesta tese foi elaborada por mim, e as informações utilizadas no processo de escrita da mesma estão devidamente referenciadas. Esta tese não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

  
**Cristiano Cabral Müller**

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

**TESE DE DOUTORADO**

**DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS BOTÂNICAS E LEITE EM PÓ UTILIZANDO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POSTERIOR  
DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP OES E ICP-MS**

**Cristiano Cabral Müller**

**Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil**

**2016**

**DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS BOTÂNICAS E LEITE EM PÓ UTILIZANDO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POSTERIOR  
DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP OES E ICP-MS**

**Por**

**Cristiano Cabral Müller**

Tese apresentada ao **Departamento de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa Maria** como requisito parcial para a obtenção do  
título de **Doutor em Ciências**.

**Área de concentração: Química Analítica**  
**Orientador: Prof. Dr. Edson Irineu Müller**

**Santa Maria**  
**2016**

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química


A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

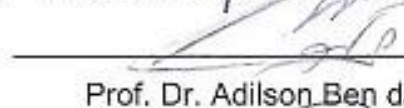
**DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS BOTÂNICAS E LEITE EM PÓ UTILIZANDO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POSTERIOR  
DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP OES E ICP-MS**

Elaborada por  
**Cristiano Cabral Müller**

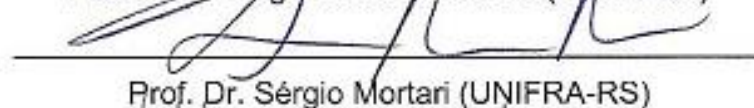
Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Doutor em Ciências**

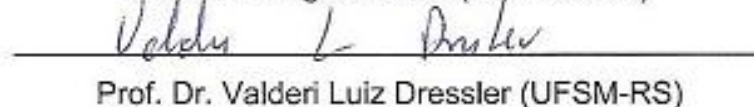
**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Edson Irineu Müller - Orientador (UFSM)

  
Prof. Dr. Adilson Ben da Costa (UNISC-RS)

  
Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan (UFSM-RS)

  
Prof. Dr. Sérgio Mortari (UNIFRA-RS)

  
Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler (UFSM-RS)

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cabral Muller, Cristiano  
DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS BOTÂNICAS E LEITE EM PÓ  
UTILIZANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SISTEMA DE ALTA  
PRESSÃO E POSTERIOR DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP OES E  
ICP-MS / Cristiano Cabral Muller.- 2016.  
80 p.; 30 cm

Orientador: Edson Irineu Muller  
Coorientador: César Augusto Bizzi  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2016

1. Preparo de amostras 2. Espectrometria atômica 3.  
Aquecimento por irradiação de micro-ondas 4. Química verde  
5. Peróxido de hidrogênio I. Muller, Edson Irineu II.  
Bizzi, César Augusto III. Título.

## **Agradecimentos**

---

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

Ao **Prof. Dr. Edson Irineu Müller**, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo, e pelo vários ensinamentos e convívio ao longo da minha passagem no programa de pós-graduação.

Aos **Profs. Drs. Adilson Ben da Costa, Rodrigo Cordeiro Bolzan, Sérgio Mortari e Valderi Luiz Dressler** pela participação na banca examinadora e valiosas sugestões que contribuíram para esta tese.

Aos demais Profs. Drs. que fazem parte do grupo de pesquisa do **Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais, Érico Marlon de Moraes Flores, Fábio Andrei Duarte, José Neri G. Paniz e Paola de Azevedo Mello**, pelo convívio e contribuição no desenvolvimento deste e outros trabalhos realizados durante o meu doutoramento.

Aos **Profs. Drs. Aline Hermes Müller, César Augusto Bizzi, Edson Irineu Müller e Valderi Luiz Dressler** pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho, convívio e amizade.

As alunas, de doutorado, **Juliana Souza** e, de metrado, **Kéllen Anschau** pela grande contribuição no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

A todos os amigos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, e do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Ademir** e a **Valéria**, ambos da Secretaria do PPGQ, pela disponibilidade e atenção demonstradas durante a execução deste trabalho.

A **Tielle Moraes de Almeida**, pelo apoio incondicional, atenção, companheirismo e bons conselhos.

Em especial, agradeço aos meus Pais, **Sônia Maria Cabral Müller e Osmar Müller**, pelos mais valiosos ensinamentos.

***“O todo é maior do que a simples soma das suas partes”***

***Aristóteles***

## Sumário

---

---

Sumário .....	IV
Lista de abreviaturas e símbolos.....	VIII
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas .....	XII
Resumo .....	13
Abstract .....	14
1 Introdução.....	15
2 Revisão da Literatura.....	19
2.1 Preparo de amostras para análise elementar .....	20
2.1.1 Fontes de aquecimento .....	21
2.1.2 Decomposição de amostras em sistemas aberto e fechado .....	23
2.2 Agentes oxidantes para a decomposição de amostras orgânicas por via úmida.....	27
2.3 Decomposição de amostras biológicas utilizando somente H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
2.4 Reações entre compostos orgânicos e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	32
2.5 Interferências causadas por carbono nas determinações por ICP OES e ICP-MS.....	33
3 Materiais e Métodos.....	36
3.1 Amostras e materiais de referência.....	37
3.2 Reagentes.....	38
3.3 Equipamentos .....	39
3.4 Procedimentos .....	42
3.4.1 Método comparativo - Decomposição utilizando HNO <sub>3</sub> concentrado e sistema Multiwave 3000.....	42



3.4.2	Decomposição utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e sistema UltraWave - SRC .....	42
3.4.3	Decomposição utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e bloco digestor .....	43
3.4.4	Decomposição utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e sistema Multiwave 3000.....	44
3.5	Determinação de carbono residual .....	44
3.6	Estabilidade dos analitos em digeridos após estocagem.....	44
4	Resultados e Discussões.....	47
4.1	Experimentos preliminares para a digestão de amostras botânicas .....	48
4.2	Decomposição de espinheira-santa ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ) empregando o sistema UltraWave-SRC® .....	50
4.2.1	Otimização e considerações sobre o uso do UltraWave-SRCpara a decomposição de espinheira-santa.....	51
4.2.2	Influência da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas digestões .....	53
4.2.3	Determinação elementar em amostras botânicas após decomposição empregando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
4.3	Otimização das variáveis para decomposição de leite em pó com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em um sistema SRC: Considerações iniciais.....	58
4.3.1	Influência de temperatura e da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	59
4.3.2	Influência da massa e composição do leite em pó .....	61
4.3.3	Avaliação da pressão do sistema durante a digestão do leite em pó .....	63
4.3.4	Determinação elementar em amostras leite em pó e materiais de referência.....	65
4.4	Avaliação da acidez dos digeridos de leite em pó e espinheira-santa .....	69
4.5	Estabilidade dos analitos em digeridos de espinheira-santa e leite em pó LP05.....	69
4.6	Limites de detecção .....	70
5	Conclusão .....	72
6	Referências.....	74

## ***Lista de abreviaturas e símbolos***

---

<b>AOAC</b>	Associação oficial dos Químicos Analíticos, do inglês, Association of Official Analytical Chemists
<b>CRM</b>	Material de referência certificado, do inglês, Certified reference material
<b>DRC</b>	Célula dinâmica de reação, do inglês, Dinamic reaction cell
<b>ETV</b>	Vaporização eletrotérmica, do inglês, Electrothermal vaporization
<b>FEP</b>	Etileno propileno fluorado, do inglês, Fluorinated ethylene propylene
<b>HPA</b>	Digestor de alta pressão, do inglês, High pressure asher
<b>IAEA</b>	Agência internacional de energia nuclear, do inglês, International Atomic Energy Agency
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, Inductively coupled plasma mass spectrometry
<b>LOD</b>	Limite de detecção, do inglês, Limite of detection
<b>MO</b>	Micro-ondas
<b>NIST</b>	Instituto nacional de padrões e tecnologia, do inglês, National Institute of Standards and Technology
<b>PEEK</b>	Poliéter éter cetona, do inglês, Polyether ether ketone

<b>PFA</b>	Perfluoroalcoxi alcano, do inglês, Perfluoroalkoxy alkane
<b>PPVE</b>	Perfluoropropil vinil etér, do inglês, Perfluoropropyl vinyl ether
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno, do inglês, Polytetrafluoroethylene
<b>PTFE-PFA</b>	Mistura de politetrafluoroetileno e perfluoroalcoxi alcano
<b>RCC</b>	Carbono residual, do inglês, Residual carbon content
<b>SRC</b>	Câmara de reação única, do inglês, Single reaction chamber
<b>SRM</b>	Material padrão de referência, do inglês, Standard reference material
<b>TFM</b>	PTFE modificado pela adição de PFA

## ***Lista de figuras***

---

- Figura 1**—Ilustração do processo de aquecimento de uma solução de forma convectiva e empregando irradiação MO. As setas vermelhas demonstram o sentido de deslocamento do calor durante o aquecimento da solução com as duas formas de aquecimento. Ilustração adaptada.<sup>33</sup> .....23
- Figura 2** - Ilustração do sistema para decomposição de amostras de modelo *High Pressure Asher HPA*. A figura mostra as principais partes deste equipamento. Ilustração adaptada.<sup>30</sup> .....26
- Figura 3** - Sistema de decomposição de amostras empregado por Denbsky para decomposição de amostras biológicas empregando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O dispositivo é em aço V4A, sem costuras, sendo que a parte superior pode ser lacrada por uma tampa rosca (parafuso). A cavidade tem volume de 450 mL. O disco de ruptura suporta aproximadamente 400 bar. Na lateral do dispositivo há uma válvula de alívio para a diminuição da pressão após a etapa de decomposição. Ilustração adaptada.<sup>55</sup> .....30
- Figura 4**—Organograma demonstrando as diferentes etapas do trabalho. ....46
- Figura 5** - Pressão (linha sólida), temperatura (linha pontilhada) e potência (linha tracejada) durante a decomposição de 1250 mg de espinheira-santa usando 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m como oxidante utilizando o UltraWave-SRC. As duas regiões representadas pela coloração branca e cinza mostram as regiões onde ocorreram as etapas de aquecimento e resfriamento, respectivamente. O programa empregado para a decomposição foi uma rampa de 20 minutos (1200 s) até 250 °C, permanência nesta temperatura por 10 minutos e resfriamento até atingir 50 °C. ...52
- Figura 6** - Carbono residual em digeridos de espinheira-santa proveniente da decomposição empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m ou 9,8 mol L<sup>-1</sup> (Barras cinzas) e 50% m/m ou 17,6 mol L<sup>-1</sup> (Barras brancas). Razão molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% m/m (Linha preta com marcador preto) e 50% m/m (Linha preta com marcador branco), e massa de carbono total contida na amostra. As quantidades molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e carbono são anteriores ao processo de decomposição empregando o UltraWave-SRC. As barras de erros dos gráficos de barras são referentes a n = 4. ....54

<b>Figura 7-</b> Influência da temperatura e da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% m/m mostrado pelas barras cinzas e 50% m/m pelas barras brancas) na concentração de C para decomposição de 500 mg de amostra de leite em pó LP05 utilizando o UltraWave-SRC (n=4). .....	60
<b>Figura 8</b> -Carbono residual em digeridos de leite em pó (LP05) proveniente da decomposição empregando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30% m/m ou 9,8 mol L <sup>-1</sup> (Barras cinzas) e 50% m/m ou 17,6 mol L <sup>-1</sup> (Barras brancas), e a razão molar de carbono contida na amostra. As quantidades molares de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e carbono são anteriores ao processo de decomposição utilizando o UltraWave-SRC (n = 4). .....	62
<b>Figura 9</b> - Comportamento da temperatura e pressão para a decomposição de 500 mg de leite em pó (LP05) com 6 mL de HNO <sub>3</sub> 65% m/m e 8 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50% m/m utilizando o UltraWave-SRC.....	65

## ***Lista de tabelas***

---

<b>Tabela 1</b> - Composição das amostras de leite em pó utilizadas neste trabalho, conforme informações descritas no rótulo destes produtos. ....	37
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros empregados para a determinação elementar empregando ICP OES e ICP-MS. ....	41
<b>Tabela 3</b> - Programa utilizado para o preparo de amostras botânicas e leite em pó empregando o método desenvolvido. ....	43
<b>Tabela 4</b> - Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em amostras de espinheira-santa e guaraná empregando os métodos proposto e referência. Os valores médios e os desvios padrão são referentes a procedimentos realizados em quadruplicata ( $n = 4$ ). ....	56
<b>Tabela 5</b> - Resultados da determinação elementar ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em amostras de um material de referência padrão (SRM) denominado NIST 1515 e um CRM (IAEA-V9) empregando o método proposto. Os valores médios e os desvios padrão são referentes a procedimentos realizados em quadruplicata ( $n = 4$ ).....	57
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos para a determinação elementar ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em CRMs de leite em pó integral e desnatado. ....	67
<b>Tabela 7</b> - Resultado das análises de diferentes amostras de leite em pó ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados por ICP OES e ICP-MS após decomposição com métodos desenvolvido e comparativo. ....	68
<b>Tabela 8</b> - Tabela de LOD para o método desenvolvido empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS. Os LOD foram calculados a partir da equação $3D + Bc$ , onde $D$ representa o desvio padrão de 10 determinações da solução branco, ....	71

Recentemente, há um apelo para reduzir a utilização de reagentes tóxicos em um grande esforço para o desenvolvimento de métodos analíticos "verdes". Assim, o trabalho propõe a análise elementar de amostras botânicas e leite em pó sem a utilização de reagentes tóxicos tais como  $\text{HNO}_3$  na etapa de preparo de amostra. Nesta tese, o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é considerado um reagente "verde", foi avaliado para a decomposição de amostras de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), guaraná (*Paullinia cupana*) e amostras de leite em pó com diferentes percentuais de carboidratos, proteínas e gorduras. Na primeira etapa deste trabalho foram realizados testes para a avaliar o comportamento do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como único agente oxidante para a decomposição de espinheira santa em 3 diferentes sistemas de preparo de amostra: (1) bloco digestor, (2) Multiwave 3000 e (3) UltraWave-SRC. Como resultado destes testes, destacou-se a necessidade do uso de um sistema com capacidade de alcançar pressões superiores a 100 bar para obtenção de digeridos sem a presença de resíduos insolúveis e concentração de C inferior a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , quando 250 mg de espinheira-santa foram decompostos. A partir desta observação o sistema UltraWave-SRC foi requerido para os demais testes de otimização visto que o mesmo pode suportar uma pressão de até 199 bar. Na etapa de otimização foram avaliados os efeitos da massa de amostra, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e relação da razão molar entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e carbono contidas antes a decomposição. A otimização do método levou a obtenção de digeridos eficientemente decompostos (concentração de C  $< 1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) até mesmo quando 1250 mg de espinheira-santa foram submetidos a decomposição com  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m. Com o sucesso obtido nos testes para decomposição de amostras de espinheira-santa e guaraná foi realizado o estudo com amostras de leite em pó, que possuem em sua composição elevados teores de proteínas e gorduras. Empregando o sistema UltraWave-SRC com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a decomposição de leite em pó foi possível a completa decomposição de até 500 mg de amostra. Como esperado a concentração de C nos digeridos de leite em pó foram superiores as concentrações observadas para os digeridos de espinheira-santa, pois as amostras de leite possuíam elevado teor de gordura ( $>20\%$ ). Subsequentemente a estas constatações procedeu-se a otimização do método proposto para leite em pó. Nestes testes, utilizou-se a uma amostra de leite em pó com o maior teor de gordura entre as amostras avaliadas para estudar os parâmetros temperatura e a pressão máximas, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a massa da amostra. Digeridos de leite em pó com menor concentração de C ( $< 918 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram obtidos usando a temperatura e pressão máximas de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e 199 bar, respectivamente, massa da amostra de até 500 mg e 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% m/m. A exatidão do método proposto foi avaliada pelo uso dos materiais de referência certificados NIST 1515 (Apple leaves), IAEA V9 (Cotton cellulose), NIST 8435 (*Whole milk*) NIST 1549 (*Non fat milk powder*) junto ao método proposto. Não foram observadas diferenças significativas para um nível de significância de 95% (teste t Student) quando os valores certificados e os resultados obtidos foram comparados. Interferências significativas não foram observadas na determinação elementar em todas as amostras estudadas quando as técnicas de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foram utilizadas. Assim, o método proposto permite o controle de qualidade das amostras botânicas e de leite em pó no que diz respeito à determinação elementar. Além disso, os limites de detecção do método proposto atendem os requisitos de compêndios oficiais, em especial no que diz respeito à determinação de elementos tóxicos avaliados. Além disso, o método desenvolvido pode ser considerado amigável, do ponto de vista ambiental, devido a este não empregar reagentes tóxicos.

## Abstract

---

Recently, there is an appeal to reduce the use of toxic reagents in a great effort for the development of analytical "green" methods. Thus, the paper proposes the elemental analysis of botanical and food samples without the use of toxic reagents such as HNO<sub>3</sub> in sample preparation step. In this thesis, the use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is considered a "green" reagent was evaluated for the decomposition of espinheira-santa samples (*Maytenus Maytenus*), guarana (*Paullinia cupana*) and milk powder samples with different percentages of carbohydrates, proteins and fats. In the first step of this study, tests were performed to evaluate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behavior as a single oxidizing agent for decomposition of espinheira-santa in 3 different sample preparation systems: (1) the digester block (2) Multiwave 3000 and (3) UltraWave -SRC. The results of these tests, there is the need to use a sample preparation system capable to achieve pressures greater than 100 bar to obtain digests without the presence of insoluble residues and concentration C of less than 1000 mg L<sup>-1</sup> when 250 mg of espinheira-santa were decomposed. From this observation, the UltraWave-SRC system was required for other optimization tests since it can withstand a pressure up to 199 bar. In the optimization step, was evaluated the effects of sample mass, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and molar ratio of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and carbon contained before decomposition. The optimization method led to obtaining digested efficiently decomposed (C concentration < 1600 mg L<sup>-1</sup>) even when 1250 mg of espinheira-santa underwent decomposition with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m. With the success of the tests for decomposition espinheira-santa and guarana samples, was conducted the study with milk powder samples, which have in their composition high levels of proteins and fats. Employing the UltraWave-SRC system with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for milk powder decomposition was possible to complete decomposition using 500 mg of sample. As expected, the concentration of C in powdered milk digested were higher than the concentrations observed in digested of espinheira-santa, probably due the milk powder samples has a high fat content (> 20%). Subsequent to these findings proceeded to the optimization of the method proposed for powdered milk. In these tests, was used a sample of powdered milk with higher fat content between samples assessed for to study the parameters temperature and maximum pressure, the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the sample mass. Digested of milk powder with lower concentrations of C (< 918 mg L<sup>-1</sup>) was obtained using the highest temperature and pressure of 250 °C and 199 bar, respectively, the sample mass of 500 mg and 8 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m. The accuracy of the method was assessed by using the NIST 1515 certified reference material (leaves Apple), IAEA V9 (Cotton cellulose), NIST 8435 (Whole Milk) and NIST 1549 (Non fat milk powder) with the proposed method. No significant differences were observed for a significance level of 95% (Student t test) when the certified values and the results were compared. Significant interferences were not observed in the elemental determination in all samples when the techniques of optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES) and mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) were used. Thus, the proposed method allows the quality control of botanical samples and milk powder with respect to the elemental determination. Furthermore, the detection limits of the proposed method meet the requirements of official compendia, in particular with regard to the determination of this toxic elements. The developed method can be considered friendly from an environmental point of view, due to this not employ toxic reagents.



# 1 *Introdução*

---

Um estudo analítico é realizado para a obtenção de informações sobre um determinado material ou objeto, que pode se encontrar na forma sólida, líquida ou gasosa. A informação obtida pode ser variada, sendo esta a respeito da composição e estrutura química ou propriedades físicas. Para a obtenção de informações acerca da composição elementar de amostras de origem diversa (botânica, alimentos, petróleo, gás, cerâmicas, polímeros, etc), muitas vezes é necessária uma etapa preliminar a análise, a etapa do preparo de amostras. O preparo de amostras para análise elementar compreende uma série de procedimentos realizados com o intuito de transformar uma amostra, que pode ser sólida, em uma solução contendo as espécies de interesse, para a posterior realização da análise utilizando técnicas instrumentais.

Para amostras botânicas e de alimentos, que possuem composição majoritariamente orgânica, o emprego de agentes oxidantes (ex.  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$ ) para a conversão de estruturas orgânicas a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  é uma das estratégias mais simples utilizadas. A oxidação de compostos orgânicos até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  é muito importante para a minimização das interferências físicas e/ou espectrais, visto que a presença de C nas soluções após o preparo destas amostras pode levar a erros sistemáticos.<sup>1</sup> Sendo assim a quantidade de C em soluções obtidas da etapa de preparo de amostras, também chamada de digerido, deve ser investigada principalmente para a quantificação de elementos traço empregando técnicas instrumentais.

Alguns compostos orgânicos possuem elevada estabilidade ao ataque de  $\text{HNO}_3$  concentrado para temperaturas de até  $180\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo os ácidos nitrobenzóicos e ácido nicotínico exemplos destes compostos. As estruturas moleculares destes compostos possuem como característica a presença de anéis aromáticos.<sup>2-4</sup>

De forma geral, mesmo o emprego de excesso de  $\text{HNO}_3$ , um oxidante com elevado potencial de oxidação (+0,79 V), e temperaturas de até  $300\text{ }^\circ\text{C}$ , não

convertem completamente a fração orgânica contida na amostra a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O durante o processo de decomposição por via úmida em sistema fechado.<sup>5</sup> A fração resistente ao ataque do oxidante permanece no digerido final em uma forma solúvel, sendo que a concentração de carbono no digerido um fator importante para o sucesso da análise. Quando a concentração de carbono nos digeridos é demasiadamente elevada ao ponto de resultar em resíduos insolúveis, a decomposição da amostra é dita incompleta. A concentração de carbono no digerido final pode ser, por muitas vezes, responsável por vários tipos de interferências espectrais e não-espectrais, principalmente quando técnicas espectrométricas e voltamétricas são utilizadas para a determinação elementar.<sup>1,6</sup>

A eficiência no processo de oxidação de amostras botânicas e alimentícias pode ser influenciada por alguns fatores como: temperatura, volume de oxidante, propriedades do oxidante empregado, pressão máxima, tempo de aquecimento, etc. Estes parâmetros são influenciados pelo tipo de instrumentação empregada (ex. sistemas aberto ou fechado).<sup>7</sup> Desta forma faz-se necessário o conhecimento dos parâmetros e da instrumentação empregada durante a etapa de preparo de amostras, sobretudo para a obtenção de uma etapa de preparo de amostras eficiente e sem perda de analitos. Todavia é importante ressaltar que a escolha de parâmetros, como volume de ácido e temperatura máxima, que por ora podem ser adequados a uma finalidade podem não ser para o preparo de amostras com diferentes composições.

Há no mercado, relacionado a instrumentação científica, um grande número de modelos de equipamentos desenvolvidos para o preparo de amostras visando a análise elementar. Estes equipamentos empregam, geralmente, frascos fechados e aquecimento por irradiação MO para tornar esta etapa mais rápida e segura, bem como para tornar a determinação mais simples, pela minimização de possíveis interferentes.

Nos últimos anos, a partir dos anos 2000, ouve um aumento dos estudos voltados para a etapa de preparo de amostras orgânicas com a finalidade do desenvolvimento de procedimentos mais “amigáveis”, no sentido destes atenderem aos preceitos da química verde. Neste contexto, as MO foram amplamente estudadas, não apenas como forma de aumentar a cinética de reações, mas também com o intuito de minimizar o consumo de energia pelo emprego destas.<sup>8-10</sup>

A literatura relacionada ao preparo de amostras botânicas e alimentícias para a posterior análise elementar tem reportado um grande número de metodologias empregando sistemas de preparo de amostras com aquecimento por MO.<sup>11-14</sup> Estes métodos possuem o aquecimento por irradiação MO como um parâmetro que atende aos preceitos da “química verde”, contudo o uso de reagentes altamente tóxicos e corrosivos (ex. HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) levam estes métodos a não serem considerados “amigáveis”. Indubitavelmente, o HNO<sub>3</sub> é o oxidante preferido para a digestão de amostras orgânicas, em função do seu elevado potencial de oxidação, +0,79 V, e pureza apropriada para a determinação elementar.<sup>15</sup> Contudo como mencionado anteriormente este reagente é tóxico, já o uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem sido encorajado para processos de oxidação em síntese devido a este ter como produtos de decomposição a água e oxigênio.<sup>16,17</sup>

Alguns trabalhos da década de 1980, reportados na literatura científica, propuseram a utilização do peróxido de hidrogênio como único agente oxidante para a decomposição de amostras botânicas e fígado bovino empregando temperaturas de até 125 °C.<sup>18,19</sup> Contudo para a realização de decomposições empregando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante há a necessidade da utilização de sistemas de preparo de amostras que permitam altas temperaturas e pressão para que se possam atingir condições onde o processo de oxidação da matéria orgânica é eficiente.

Uma alternativa para o emprego do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como único oxidante, tendo em vista um efetivo processo de oxidação de matrizes de origem alimentícia e botânica, é o uso o sistema de “câmara de reação única”. Este sistema foi desenvolvido a menos de 5 anos e tem o nome de UltraWave-SRC. Ele possui aquecimento por irradiação de MO que permite o uso de temperaturas e pressões máximas de 280°C e 199 bar, respectivamente.<sup>20</sup>

Desta forma, no presente trabalho foi avaliada a utilização do sistema de câmara de reação única e peróxido de hidrogênio para a decomposição de diferentes amostras e subsequente determinação elementar utilizando a ICP OES e a ICP-MS. O estudo foi realizado com amostras botânicas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e guaraná (*Paullinia cupana*) e amostras de leite em pó com diferentes teores de carboidratos, proteínas e gorduras. Neste estudo foram avaliados parâmetros importantes como: (i) diferentes sistemas de preparo de amostras; (ii) massa de amostra; (iii) temperatura, (iv) pressão máximas do sistema

de preparo de amostras e (v) concentração do peróxido de hidrogênio. A avaliação destes parâmetros foi feita a partir da concentração de C presente nos digeridos. A avaliação da exatidão do método proposto foi feita a partir da análise de diferentes materiais de referência certificados (CRM), bem como pela comparação com resultados obtidos pela decomposição por via úmida com ácido nítrico concentrado em um sistema Multiwave 3000.

## **2 Revisão da Literatura**

---

*Neste capítulo são revisadas as informações sobre diferentes métodos de decomposição de amostras de composição majoritariamente orgânica empregando a via úmida. O desenvolvimento da instrumentação utilizada nestes procedimentos é destacado, bem como o uso dos vários reagentes oxidantes que podem ser usados para a via úmida. O uso do  $H_2O_2$  como agente oxidante na decomposição de amostras botânicas e alimentos também é discutido. A necessidade de uma etapa de decomposição de amostra eficiente também é relatada como um dos pontos da revisão, visto que este é o principal fato que impulsiona as pesquisas em preparo de amostras para a análise elementar. Por fim, são relatadas algumas informações sobre reações que ocorrem entre  $H_2O_2$  e compostos orgânicos que podem estar presentes nas decomposições das amostras empregadas neste estudo.*

## 2.1 Preparo de amostras para análise elementar

Os métodos de preparo para amostras orgânicas, para posterior análise elementar utilizando técnicas espectrométricas, baseiam-se usualmente na conversão de compostos orgânicos até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, sendo que os constituintes inorgânicos da amostra devem permanecer no digerido. Quando a etapa de preparo de amostra é bem-sucedida, o digerido resultante é uma solução homogênea sem a presença de resíduos orgânicos e/ou inorgânicos insolúveis. A presença destes resíduos pode levar a co-precipitação da espécie de interesse e acarretar em problemas na etapa de determinação quando utiliza-se técnicas que empregam nebulização do tipo pneumática, sendo que estas interferências levam a erros sistemáticos durante a análise.<sup>21,22</sup>

A etapa de decomposição de amostras orgânicas geralmente é feita empregando sistemas com aquecimento convectivo ou dielétrico, sendo que as amostras são digeridas no interior de um frasco junto a um agente oxidante. Os frascos empregados para decomposição por via úmida, geralmente, são de borossilicato, sílica fundida ou algum tipo de fluoropolímero (PTFE, PFA, FEP e TFM).<sup>23</sup>

O sucesso da decomposição por via úmida para quantificação de elementos traço (< 100 mg kg<sup>-1</sup>) deve atender alguns quesitos, tais como o uso de pequenos volumes de ácidos ou misturas de ácidos de alta pureza, o emprego de materiais de alta pureza na fabricação das partes que entram em contato (frascos e tampas) com o reagente utilizado, uso de materiais que sejam inertes ao ataque de agentes ácidos e oxidantes usados para decomposição, e utilização de elevadas temperaturas e pressão que garantem a eficiência da decomposição. O emprego destes princípios, para a quantificação de elementos traço, leva a uma análise com uma menor probabilidade de contaminação e um processo de decomposição eficiente devido ao uso de elevadas temperaturas.<sup>15</sup>

Nos parágrafos seguintes serão abordados os principais aspectos envolvidos na decomposição das amostras orgânicas por via úmida tais como fontes de aquecimento, e sistemas aberto e fechado.

### 2.1.1 Fontes de aquecimento

O aquecimento convectivo tem sido usado como fonte de aquecimento para o preparo de amostras. Este tipo de aquecimento é usado em grande parte de suas aplicações através de reações de combustão (bicos de Bunsen) ou um resistor elétrico (mantas e chapas de aquecimento).<sup>8</sup> Na década de 1950, o uso da irradiação MO foi inicialmente implementada para o uso em fornos comerciais e domésticos.<sup>24</sup> Sendo esta forma de aquecimento, as MO, nesta época uma alternativa ao uso do aquecimento convectivo. As MOs apenas foram empregadas para aquecimento visando a decomposição de amostras em 1975.<sup>25</sup> Uma das vantagens do aquecimento usando as MO, frente ao convectivo, é a velocidade do processo de aquecimento, que pode ser explicada pela forma como ocorre a transferência de energia quando esta forma de aquecimento é empregada.<sup>26</sup>

A frequência da radiação de MO se estende de 0,3 a 30 GHz ( $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  eV), sendo que o uso deste tipo de radiação na indústria, ciência e na medicina é restrito as frequências de 0,9 e 2,45 GHz para que sejam evitadas interferências nas telecomunicações.<sup>27</sup> Os sistemas empregados para o aquecimento empregando radiação MO exibem complexidade maior que os empregados para o aquecimento convectivo. Em um sistema com aquecimento dielétrico a produção de radiação é realizada por um magnetron que converte a energia de uma corrente elétrica alternada (50 ou 60 Hz) em energia eletromagnética com frequência de 2,45 GHz. A elevada voltagem empregada para o funcionamento adequado de um magnetron é fornecida por um circuito composto por transformador, retificador e filtro que transformam a corrente alternada em corrente contínua com voltagem de aproximadamente 4kV. Após a conversão de energia elétrica em radiação MO, esta é conduzida através de um guia de ondas até a cavidade, onde o material a ser aquecido poderá absorve-la.<sup>28</sup>

A velocidade na qual uma solução é aquecida pela irradiação de MO no interior de uma cavidade depende da potência irradiada pelo magnetron. Em sistemas, como da câmara de reação única (UltraWave-SRC), a potência irradiada pode ser modulada para que o aquecimento siga uma taxa de aquecimento predeterminada.<sup>20</sup> Outras vezes, a potência irradiada é programada e o aquecimento

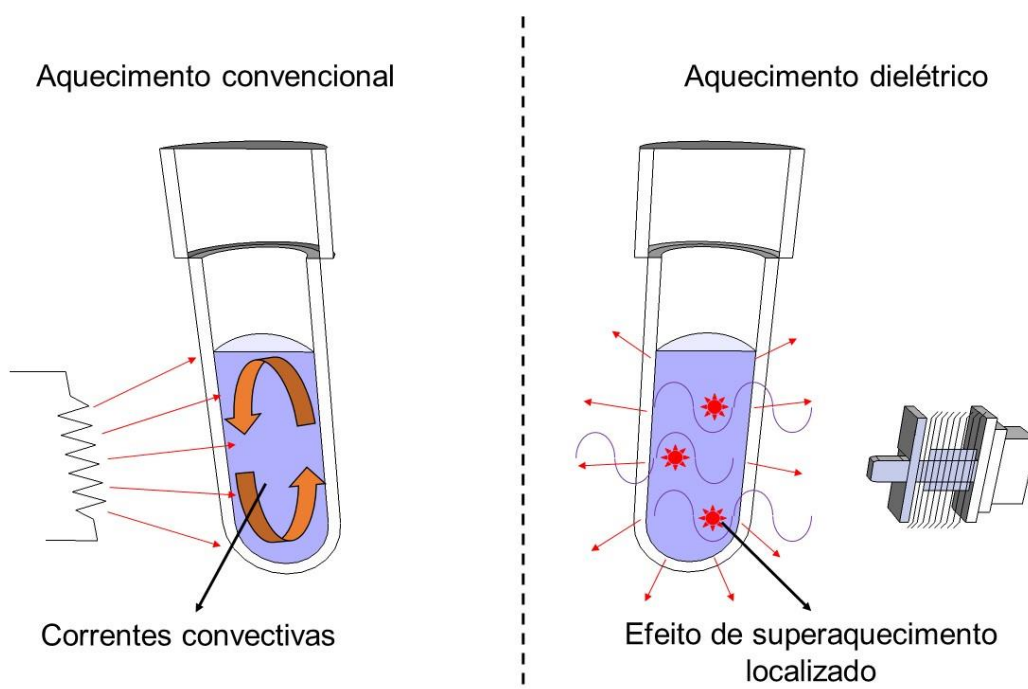
se dá pela capacidade da solução absorver a radiação, esta forma de controle de aquecimento ocorre no sistema de preparo de amostras Multiwave 3000.<sup>29</sup>

A escolha da taxa de aquecimento ou potência irradiada durante o preparo de amostras depende principalmente do comportamento da amostra frente as mudanças de temperatura e pressão que ocorrem durante a oxidação da amostra pelo reagente escolhido. Este fato é importante, sobretudo para prevenir acidentes, como explosões, durante a decomposição das amostras. Programas de aquecimento para a decomposição de amostras orgânicas e inorgânicas, geralmente, possuem grandes diferenças com relação a taxas de aquecimento aplicadas. Para amostras orgânicas o aquecimento deve iniciar de forma moderada com temperaturas de 80 a 140 °C e, posteriormente, temperaturas maiores devem ser utilizadas para uma decomposição eficiente. Já para amostras inorgânicas com baixa reatividade, o aquecimento pode ocorrer da forma mais rápida possível, sendo o programa de aquecimento formado por apenas uma etapa de aquecimento.<sup>30</sup>

A eficiência do aquecimento empregando radiação MO, que é definida pela razão entre a quantidade de energia absorvida pelo material aquecido e pela quantidade de energia produzida durante o processo de aquecimento, é de aproximadamente 70 a 80%. Por outro lado, a eficiência da transferência de calor utilizando o aquecimento convectivo é de aproximadamente 5 a 10%.<sup>28</sup> Estes dados demonstram como o uso das MO é muito mais efetivo que o aquecimento convencional.

Durante o aquecimento da matéria usando estas diferentes formas de aquecimento, os efeitos em nível molecular são diferentes. Durante o aquecimento convectivo, uma fonte de calor fornece energia para um determinado sistema que eleva as energias de translação e rotação das moléculas.<sup>31</sup> Durante o aquecimento com MO, as estruturas moleculares estão imersas em um campo eletromagnético. Moléculas que possuem momentos de dipolo diferente de zero, se orientam com o campo elétrico das MO e como consequência sofrem alterações em sua rotação e mudança de sua conformação que levam ao aumento de colisões entre as mesmas e consequentemente ao aumento da energia do sistema.<sup>32</sup> A Figura 1 é adaptada de Saxena e Chandra<sup>33</sup> e mostra uma ilustração do aquecimento empregando radiação MO e aquecimento convectivo utilizando resistência elétrica como fonte de aquecimento.





**Figura 1**—Ilustração do processo de aquecimento de uma solução de forma convectiva e empregando irradiação MO. As setas vermelhas demonstram o sentido de deslocamento do calor durante o aquecimento da solução com as duas formas de aquecimento. Ilustração adaptada.<sup>33</sup>

A Figura 1 mostra que o aquecimento utilizando MO leva ao aquecimento seletivo da solução, ou seja, a solução tem em sua estrutura características que a fazem interagir com as MO. Posterior ao aquecimento da solução, esta inicia o processo de perda de calor para as vizinhanças do sistema de forma convectiva. A Figura 1 também mostra o processo convectivo, onde o calor gerado pela resistência elétrica é perdido para as vizinhanças e apenas parcela desta energia é transferida para o aquecimento do frasco contendo a solução.

### 2.1.2 Decomposição de amostras em sistemas aberto e fechado

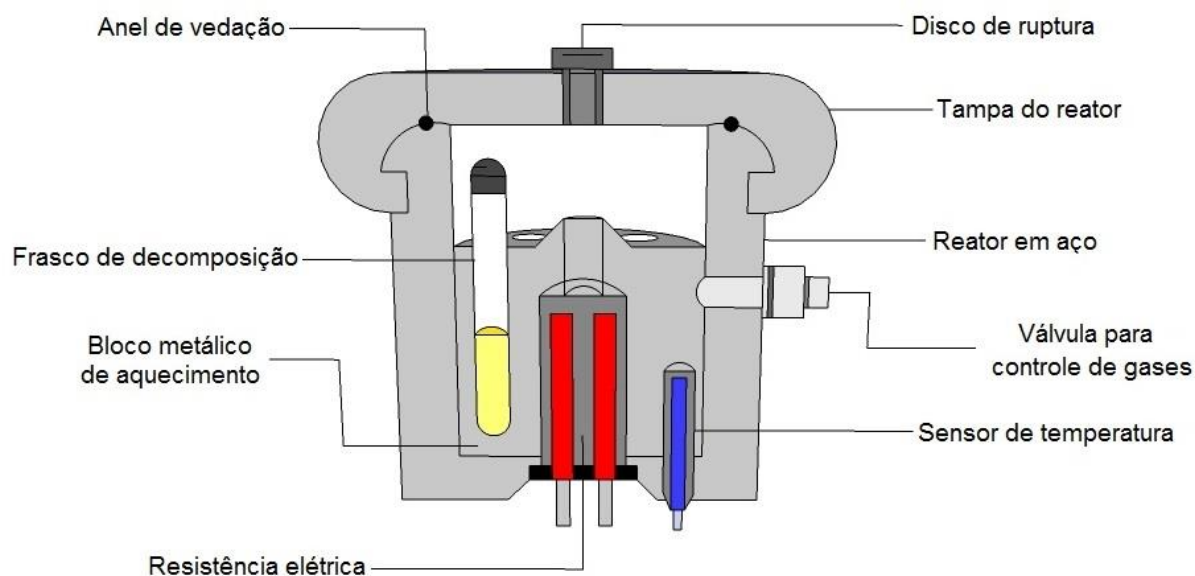
Os sistemas de preparo de amostras podem ser classificados em aberto ou fechado. O emprego de um sistema aberto para o preparo de amostras tem como principal limitação a temperatura máxima atingida durante a decomposição, sendo esta a do ponto de ebulição do reagente utilizado. Assim, para o emprego de ácidos como  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em um sistema aberto as maiores temperaturas

alcançadas são de 121, 203 e 339 °C, respectivamente.<sup>23</sup> A temperatura de ebulição esta intrinsecamente relacionada a pressão de vapor do líquido e à pressão externa, onde o líquido atinge a temperatura de ebulição quando sua pressão de vapor se iguala a pressão externa. Assim, em um sistema fechado, sem troca de matéria com a vizinhança, a pressão, assim como a temperatura, podem ser aumentadas continuamente desde que exista uma fonte que forneça energia para isto.<sup>34</sup> Esta afirmativa é verdadeira pelo ponto de vista teórico, contudo não se aplica a prática da decomposição por via úmida em sistema fechado devido a limitação imposta pelos materiais empregados na fabricação dos frascos de decomposição. De acordo com a literatura sistemas que operam a pressões de até 20 bar e temperaturas em torno de 180 °C são considerados sistemas de baixa pressão, ao passo que os sistemas classificados como de alta pressão operam a pressões superiores a 70 bar e temperaturas de até 300 °C. Desta forma, para a utilização de sistemas fechados faz-se necessário a utilização de frascos de suportem elevadas temperaturas e pressões. Neste sentido os frascos de sílica fundida e borossilicato podem suportar temperaturas de até 1200 °C e 800 °C, respectivamente. Temperaturas estas superiores as geralmente empregadas durante a decomposição por via úmida de amostras orgânicas, contudo a pressão máxima de trabalho destes materiais não ultrapassa 80 bar.<sup>23</sup>

O avanço nos estudos de fluoropolimeros também tem proporcionado a descoberta de materiais que possam ser empregados na fabricação de frascos de decomposição que possuam elevada resistência a pressão e temperatura. Um destes materiais é o TFM (politetrafluoretileno modificado pela Hoescht®), uma mistura de PTFE e 0,1% de PPVE, que possui elevada resistência a tração (superior a 400 bar), além de poder ser empregado a temperaturas de até 290 °C. Uma estratégia aplicada a estes materiais, com o objetivo de ultrapassar a barreira de 40 bar de pressão, é o uso de jaquetas de cerâmica como suporte para evitar a expansão do polímero (deformação ou abertura de fissura no frasco). Empregando jaquetas de cerâmicas, os frascos de TFM podem ser utilizados a pressões de até 100 bar.<sup>35,36</sup> Alguns sistemas de preparo de amostra que utilizam também a mesma estratégia, mas aplicando jaquetas de PEEK como suporte para evitar a expansão dos frascos, entretanto a pressão limite é de aproximadamente 20 bar.<sup>37</sup>

Os primeiros sistemas fechados comercialmente disponíveis eram baseados no modelo descrito por Tolg,<sup>15</sup> que é denominado bomba de decomposição. O sistema era constituído de um frasco de PTFE contido em um cilindro de aço. O recipiente era fechado por uma tampa de PTFE pressionada por uma mola ou fazendo uso de disco de ruptura que permitia o alívio da pressão quando esta excedia o valor máximo de aproximadamente 20 bar. O aquecimento era baseado no princípio convectivo a partir da disposição do cilindro de aço em um bloco de metal aquecido ou em uma estufa termostatizada. Contudo, este sistema apresenta como desvantagens a baixa eficiência de decomposição nos digeridos já que a eficiência da decomposição é comprometida pela temperatura e pressão máximas permitidas pelo mesmo (aproximadamente 180°C e 20 bar, respectivamente).<sup>15</sup>

Para a utilização de pressões mais elevadas, o sistema High Pressure Asher (HPA) permite a pressurização da cavidade com um gás inerte que equilibra a pressão no interior do frasco de quartzo resultante do vapor do ácido e dos gases resultantes da oxidação da matéria orgânica. O HPA é talvez o único sistema de decomposição com aquecimento convectivo que suporta pressões de até 130 bar e temperatura máxima de 320 °C. Este equipamento é um sistema pressurizado fechado, ou seja, não há troca de matéria do interior dos frascos com o interior da cavidade pressurizada. Para suportar elevadas pressões e temperaturas, o sistema utiliza uma cavidade de aço inoxidável junto a frascos de quartzo hermeticamente selados. Na Figura 2 é mostrado o esquema do sistema HPA com as principais partes deste sistema de preparo de amostras.



**Figura 2** - Ilustração do sistema para decomposição de amostras de modelo *High Pressure Asher HPA*. A figura mostra as principais partes deste equipamento. Ilustração adaptada.<sup>30</sup>

Em um extenso trabalho realizado por Würfels,<sup>4</sup> foi evidenciado que alguns compostos originários, principalmente, da oxidação parcial de macromoléculas orgânicas tais como, ácido graxos insaturados, aminoácidos e vitaminas, são resistentes ao ataque de HNO<sub>3</sub> concentrado sob temperatura de aproximadamente 180 °C e em sistema fechado (pressão do sistema de aproximadamente 20 bar). Segundo Würfels, compostos como o ácido nicotínico e a betaína não são completamente oxidados (RCC superior a 80%) na presença de ácido nítrico a 180°C, pressão de 20 bar e aquecimento convectivo.<sup>4</sup> Em trabalho semelhante, Knapp e colaboradores<sup>38</sup> demonstraram que a temperatura tem um papel fundamental no processo de oxidação destes compostos refratários, sendo necessária a utilização do sistema de decomposição HPA para garantir digeridos com mínimo teor de RCC para garantir a exatidão das análises utilizando as técnicas baseadas em plasma indutivamente acoplado.

O primeiro sistema de decomposição fechado com aquecimento assistido por MO foi o modelo MDS-81D desenvolvido pela CEM Corporation composto por rotor com 12 posições para frascos de PTFE.<sup>39,40</sup> Mais tarde, a CEM introduziu os sistemas de controle de pressão e temperatura durante a decomposição das amostras no sistema com aquecimento assistido por MO (modelo MDS-2000/2100 series). Anos mais tarde, a CEM disponibilizou para usuários de sistemas de decomposição assistida por MO os frascos de PTFE modificados (por exemplo,

PTFE-PFA) com maior resistência química quando comparados a primeira geração de frascos de decomposição de fluoropolímeros. Na sequência, a Anton Paar desenvolveu o sistema PMD equipado com frascos de quartzo de alta pureza que permitem pressão e temperatura máximas de operação de 80 bar e 280°C, respectivamente.<sup>39</sup>

Recentemente, foi disponibilizado comercialmente pela empresa Milestone a tecnologia da SRC, que consiste em uma cavidade metálica que é pressurizada com gás inerte e aquecida com a energia das MO. A cavidade metálica deste sistema é coberta por um frasco de PTFE, e os frascos de quartzo ficam cobertos com uma tampa de fluoropolímero. Para que a radiação MO possa ser transmitida até o interior da cavidade no sistema UltraWave que utiliza a tecnologia da SRC, a radiação é transmitida do magnetron por um guia de onda até a cavidade através de uma antena que fica no interior de um bloco de TFM que é utilizado para selar a parte inferior da cavidade. O modelo UltraWave com frascos de quartzo permite pressão e temperaturas máximas de 199 bar e 300°C, respectivamente.<sup>39,41</sup>

## **2.2 Agentes oxidantes para a decomposição de amostras orgânicas por via úmida**

Os agentes oxidantes mais empregados para a decomposição de amostras orgânicas são o HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (somente quando à quente e concentrado), HClO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Destes oxidantes apenas o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pK<sub>a</sub> maior que 11,62) não é um ácido forte, sendo que os demais todos possuem pK<sub>a</sub> inferior a 1 em meio aquoso. Os ácidos HF, HCl e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> são considerados agentes complexantes, sendo empregados, geralmente, para solubilização de algumas espécies insolúveis na presença dos ácidos oxidantes, como o SiO<sub>2</sub>. Antes da popularização dos sistemas fechados para o preparo de amostras, o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi amplamente empregado em misturas com HNO<sub>3</sub> para permitir o aumento da temperatura obtida durante a decomposição de amostras orgânicas, pois este apresenta o maior ponto de ebulição entre os oxidantes comumente utilizados (337°C).<sup>42</sup>

Contudo, o uso do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para a decomposição de amostras orgânicas pode acarretar em vários problemas tais como: (i) precipitação de metais na forma de

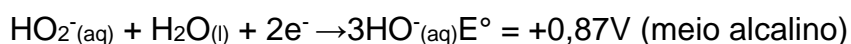
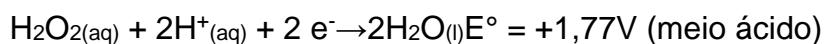
sulfatos insolúvel,<sup>43</sup> (ii) coprecipitação do analito,<sup>44</sup> (iii) interferências físicas devido diferenças na tensão superficial e viscosidade entre as soluções de calibração e amostra<sup>45,46</sup> e (iv) interferências espectrais na técnica de ICP-MS causadas por espécies poliatômicas contendo enxofre.<sup>47,48</sup>

O HClO<sub>4</sub>, por sua vez, é o ácido empregado para a decomposição de amostras com o maior potencial de oxidação e podendo este reagir de forma violenta com a matéria orgânica. Seu uso é limitado a sistemas abertos e, geralmente, é utilizado em combinação com o HNO<sub>3</sub> que é utilizado para promover a oxidação dos compostos orgânicos mais facilmente oxidáveis, enquanto que os compostos refratários são oxidados num segundo momento pelo HClO<sub>4</sub>.<sup>49</sup>

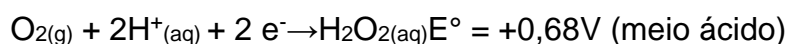
O HNO<sub>3</sub> concentrado é o oxidante mais empregado para a decomposição de amostras orgânicas por via úmida em sistemas fechados com aquecimento MO, principalmente pelo fato de solubilizar grande parte de metais presentes na matriz orgânica. Além disso, é um poderoso agente oxidante, cujo potencial de oxidação é somente menor que do HClO<sub>4</sub> e pode ser obtido em alta pureza após destilação em sistema “subboiling”.<sup>50</sup>

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um agente oxidante que pode reagir explosivamente com inúmeras substâncias orgânicas, principalmente quando utilizada suas formas mais concentradas, mas pode agir como agente redutor em algumas condições específicas. Desta forma, o oxigênio presente no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir como redutor ou oxidante em meio ácido e alcalino.

Como agente oxidante:



Como agente redutor:



Os potenciais padrão de redução das reações acima sugerem que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um agente oxidante mais efetivo em meio ácido do que em meio alcalino. Porém, sem a

presença de um catalisador as reações em meio ácido são lentas devido ao impedimento cinético.<sup>51</sup>

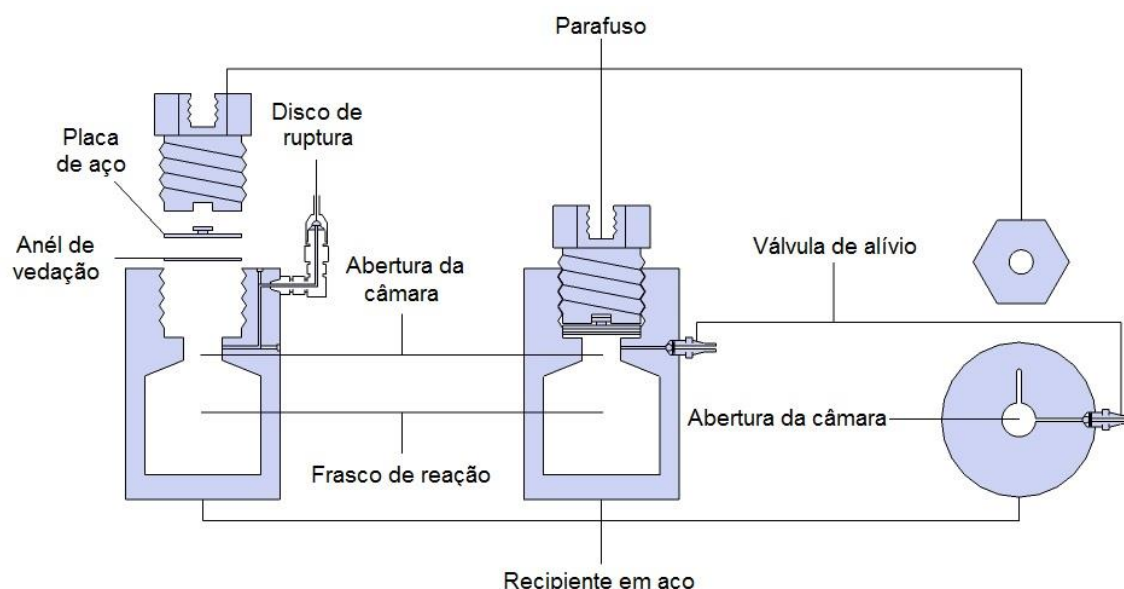
O  $H_2O_2$ , quando empregado como oxidante para a decomposição de componentes orgânicos, pode converter estes até  $CO_2$  e  $H_2O$ , sendo que, geralmente, os intermediários formados durante esta reação são ácidos orgânicos.<sup>52</sup> Comercialmente pode ser encontrado em diversas concentrações, sendo que as mais comuns são as de 30% m/m e 50% m/m.<sup>53</sup> Para garantir a estabilidade e o manuseio seguro das soluções de  $H_2O_2$  são utilizados agentes estabilizantes, como o estanato de sódio e o pirofosfato de sódio.<sup>54</sup>

Na literatura são escassos os relatos da utilização isolada do peróxido de hidrogênio como oxidante para o preparo de amostras orgânicas. O peróxido de hidrogênio é usualmente utilizado em combinação com um ácido, pois o seu poder oxidante aumenta com o aumento da acidez.<sup>53</sup>

### **2.3 Decomposição de amostras biológicas utilizando somente $H_2O_2$**

O emprego isolado de  $H_2O_2$  como agente oxidante para a decomposição de amostras orgânicas sob elevada pressão e temperatura utilizando aquecimento convectivo foi primeiramente reportado por Denbsky<sup>55</sup> em 1973. Neste trabalho o autor demonstrou a possibilidade da decomposição de até 15 g de diferentes amostras orgânicas, entre as quais destacam-se amostras ricas em carboidratos (como farinha de trigo e amido de batata), gordura (manteiga, margarina e gordura de suíno) e proteínas (carne e leite). Em função da elevada pressão e temperaturas necessárias durante a decomposição, o autor construiu uma câmara de reação em aço com volume total de 450 mL e temperatura e pressão máximas de 370°C e 400 atm, respectivamente. Inicialmente avaliou a influência do volume de  $H_2O_2$  30% m/m (50 a 100 mL) na eficiência da decomposição de amostra de pão. Para avaliar a eficiência da decomposição foi realizada a determinação do C residual nos digeridos utilizando a volumetria com permanganato de potássio. O autor observou que o aumento do volume de  $H_2O_2$  causou a diminuição do conteúdo de RCC de 3,8% para 0,65% quando comparados os volumes de 50 e 100 mL do  $H_2O_2$ . Para a decomposição das amostras de leite *in natura* foram misturados 20 g de amostra

com 120 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m e aquecimento durante 30 min com temperatura máxima (370°C) permitida pelo sistema. Segundo o autor, os digeridos obtidos para as amostras de leite apresentarem-se incolores atestando a eficiência da decomposição. Além disso, observou-se que as decomposições de matrizes ricas em carboidratos ocorriam mais facilmente do que nas ricas em gorduras. Neste sentido, somente 2 g de amostra rica em gordura, como por exemplo gordura de suíno e manteiga, foram eficientemente digeridas no método proposto. Com relação as proteínas, não foi observada nenhuma dificuldade na decomposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em materiais ricos com esta biomolécula, como o queijo e a carne. A exatidão do método proposto foi verificada a partir de ensaios de recuperação de isótopos radioativos (<sup>85</sup>Sr, <sup>106</sup>Ru, <sup>131</sup>I e <sup>137</sup>Cs) utilizando espectrometria gama. Recuperações variando de 96,0 a 98,2% foram obtidas para os isótopos determinados, atestando a exatidão do método proposto. Por fim, de acordo com o autor, os digeridos obtidos utilizando somente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não contém ácidos ou bases em excesso, fato que é favorável para posterior análise utilizando técnicas instrumentais. A Figura 3 ilustra o equipamento empregado por Denbsky<sup>55</sup> para a decomposição de grandes quantidades de amostra usando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante.



**Figura 3** - Sistema de decomposição de amostras empregado por Denbsky para decomposição de amostras biológicas empregando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O dispositivo é em aço V4A, sem costuras, sendo que a parte superior pode ser lacrada por uma tampa rosca (parafuso). A cavidade tem volume de 450 mL. O disco de ruptura suporta aproximadamente 400 bar. Na lateral do dispositivo há uma válvula de alívio para a diminuição da pressão após a etapa de decomposição. Ilustração adaptada.<sup>55</sup>



Denbsky<sup>56</sup> em 1975 propôs um método utilizando também o sistema representado pela Figura 3, porém destinado a decomposição de alimentos ricos em gordura. Este trabalho fez uso de um banho de aquecimento composto de mistura de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  que permite temperaturas de até  $450\text{ }^\circ\text{C}$ , esta temperatura é superior a máxima observada na primeira publicação apresentada por Denbsky<sup>55</sup> em trabalho anterior. Amostras como manteiga de cacau (7 g), manteiga (5 g) e azeite de oliva (6 g) foram eficientemente digeridas permitindo a determinação de isótopos radioativos nestes alimentos utilizando a espectrometria gama.

Na década de 1980, Matusiewicz e Barnes<sup>18</sup> propuseram a decomposição de anéis de tronco de árvores utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 e 30% m/m em bombas de PTFE (aquecidas por aquecimento convectivo) e posterior determinação de 21 elementos utilizando vaporização eletrotérmica (ETV) acoplada a ICP OES. A partir de experimentos iniciais e levando em conta os aspectos de segurança, massas de até 120 mg foram transferidas para frascos de PTFE e foram adicionados 1,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% m/m. Os autores observaram que a eficiência de decomposição foi dependente da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e da temperatura, de forma que soluções límpidas apenas foram obtidas para digeridos provenientes da decomposição com  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% m/m e temperatura de pelo menos  $125\text{ }^\circ\text{C}$ , que foi mantida durante 4 horas. Os autores concluem que a decomposição com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi eficiente para os materiais ricos em celulose, além de permitir a redução dos gastos com reagentes e a obtenção de brancos sem a presença de contaminantes.

Com base nos resultados obtidos na procura de artigos científicos, contendo as palavras chaves “hydrogen peroxide”, microwave, “wet digestion” or “sample decomposition” or “sample digestion” no site Google Acadêmico, há indícios que nenhum trabalho que empregue aquecimento por irradiação de MO usando somente  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a decomposição de amostras orgânicas tenha sido publicado no período de 1940 a 2016.

## 2.4 Reações entre compostos orgânicos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O peróxido de hidrogênio tem alto potencial de oxidação (1,77 V), contudo a maioria dos substratos não reage rapidamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois geralmente é necessária a ativação deste oxidante. A ativação pode se dar através dos mecanismos de cisão homolítica e heterolítica na presença de um catalisador metálico. Um dos mecanismos de ativação homolítica bastante utilizado é o processo Fenton no qual é utilizado o sistema Fe(II)/Fe(III) para a produção de radicais hidroxil. É importante frisar que mesmo quantidades diminutas de metal podem causar a decomposição do peróxido com a formação de radical hidroxil.<sup>57</sup>

A produção de radicais hidroxil também é observada a partir da exposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à radiação ultravioleta, mesmo na ausência de catalisadores metálicos. O mecanismo de cisão heterolítica ocorre para misturas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição com a formação de espécies ativas de peroxo ou hidroperoxometálicos.<sup>58</sup>

Além disso, deve-se destacar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é mais ácido do que a água e um aumento do pH pode aumentar a instabilidade do peróxido com a produção do ânion perhidroxila (HOO<sup>-</sup>). De acordo com trabalhos reportados na literatura,<sup>59</sup> soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio alcalino são capazes de oxidar aldoses e cetoses. Sob temperaturas de 0 °C, altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e meio alcalino, aldoses são degradadas em açúcares de menor cadeia carbônica e ácido fórmico. O mecanismo envolve a adição nucleofílica do ânion peridroxila ao grupamento carbonílico da aldose e a repetição deste processo resulta na degradação total da aldose à ácido fórmico. De forma análoga, as cetoses são degradadas via ataque nucleofílico do ânion peridroxila com formação de uma molécula de ácido glicólico e 4 moléculas de ácido fórmico, quando utilizada uma hexose. O principal carboidrato presente no leite é a lactose (dissacarídeo formado por glicose e galactose), que é totalmente degradada quando é misturada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio alcalino a temperatura ambiente.<sup>60</sup>

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio alcalino também promove a quebra das ligações peptídicas e subsequente oxidação de aminoácidos, como metionina e cisteína. Há relatos que a quebra das ligações peptídicas também possa ocorrer quando na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sob elevadas temperaturas. A reação da cisteína com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ausência de metais e pH 6 ocorre através do mecanismo de ataque nucleofílico do anion tiolato pelo ânion perhidroxila.<sup>61,62</sup>

A peroxidação de lipídios ocorre através de reações que envolvem radicais livres e o oxigênio é o principal agente envolvido nestas reações. Teoricamente, a molécula de oxigênio não é capaz de reagir com os ácidos graxos insaturados por impedimentos de ordem termodinâmica. Contudo, o oxigênio pode ser convertido a espécies mais reativas, tais como os radicais hidroxila e hidroperoxila. Neste caso, para promover a oxidação de ácidos graxos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser misturado com catalisadores (Fe, por exemplo) para produção das espécies radicalares.<sup>63</sup>

## **2.5 Interferências causadas por carbono nas determinações por ICP OES e ICP- MS**

Técnicas espectrométricas, como ICP OES e ICP-MS, geralmente requerem que a amostra esteja na forma de uma solução para que a análise possa ser feita. A presença de algumas espécies em elevada concentração nos digeridos, e que não estejam presentes nas soluções empregadas para calibração, podem causar interferências espectrais e não espectrais (físicas) nas determinações que utilizam as técnicas baseadas em plasma indutivamente acoplado.<sup>64,65</sup>

Interferências espectrais são basicamente causadas pela sobreposição de sinais provenientes do analito e de uma espécie interferente. Na ICP OES, este problema pode ser corrigido através do uso de algoritmos matemáticos, uso de uma solução branco contendo o interferente na mesma concentração que nas amostras ou então a escolha de outra linha de emissão. Na ICP-MS, as interferências espectrais, também, são causadas pelas sobreposições de sinais do analito e de interferentes, sendo que as mesmas opções podem ser tomadas para sanar estes problemas.

Outras interferências possíveis para a técnica de ICP-MS são as interferências causadas pelas formações de óxidos e espécies com carga dupla. Mas estas interferências podem ser minimizadas a níveis de 1 a 2%, valores estes aceitáveis, do sinal analítico pela otimização das condições instrumentais.

Interferências espectrais na ICP-MS podem ser resolvidas quando a instrumentação empregada faz uso de cela de colisão ou reação com gás

apropriado. O uso desta cela tem como finalidade a fragmentação de espécies poliatômicas que possam ter mesma razão massa-carga que o analito.

Com relação as interferências provocadas pelas variações nas condições do plasma devido a presença de carbono nos digeridos, deve-se destacar que no caso da ICP-OES as interferências sob linhas de emissão atômicas são mais pronunciadas, ao passo que na ICP-MS as interferências são mais significativas para os elementos parcialmente ionizados no plasma. A presença de carbono em elevadas concentrações pode causar severas interferências para a determinação dos isótopos  $^{52}\text{Cr}$  e  $^{53}\text{Cr}$ , devido a formação das interferências poliatômicas  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$  e  $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ . Além destas interferências, outras podem surgir por reações entre Ar, O e H, juntamente a espécies majoritárias presentes em digeridos.<sup>66</sup>

Além do carbono, outros elementos comumente encontrados em elevadas concentrações em matrizes biológicas (Ca, Cl, P, K, Na e S), também podem causar interferências espectrais na técnica de ICP-MS. Contudo, devido a este tipo de matriz ser majoritariamente orgânica, talvez o carbono seja a interferência mais crítica, devido a dependência desta com a etapa de preparo de amostras.

Para resolver as interferências provocadas por C, Cl, P, e S para a técnica de ICP-MS, Muller e colaboradores<sup>67</sup> desenvolveram uma metodologia empregando cela dinâmica de reação (DRC). Os autores realizaram a quantificação de dezesseis elementos em quatro ativos farmacêuticos (levodopa, sulfametoxazol, difosfato de primaquina e propranolol), sendo que para a quantificação de V, Cr e Cu houve a necessidade do emprego da DRC empregando  $\text{NH}_3$  como gás reagente, devido a interferências causadas por C, Cl, P e S.

Além das interferências espectrais, discutidas anteriormente, interferências físicas, ou não espectrais, como por exemplo, as originárias das diferenças no processo de transporte do aerossol de soluções amostra (que possuem parte da matriz em sua composição) e soluções padrão. As diferentes composições de aerossol provenientes de fontes contendo ou não a matriz também podem provocar a variações nas condições do plasma em decorrência de interações deste com componentes da matriz.<sup>22,64</sup> Neste sentido Fernández e colaboradores<sup>68</sup> estudaram a influência das condições operacionais nos efeitos provocados por diferentes ácidos ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HCl}$ ) e suas concentrações (0 a  $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) para a técnica de ICP OES. Sempre que soluções ácidas foram empregadas, resultaram em pequena

redução da intensidade do sinal analítico quando comparada a solução sem a presença dos mesmos. A supressão da intensidade do sinal analítico foi minimizada de forma significativa quando as condições do plasma aplicadas resultaram em uma razão de Mg II / Mg I de 8,5. Para esta condição a densidade eletrônica e a temperatura de excitação foram as maiores observadas,  $2,05 \times 10^{13} \text{ e}^- \text{ cm}^{-3}$  e 5100 K, respectivamente.

### **3    *Materiais e Métodos***

---

---

*Neste capítulo são apresentados os reagentes e equipamentos usados para a realização deste trabalho, bem como os métodos para o preparo das amostras botânicas, amostras de leite em pó e dos materiais de referência certificados. As condições instrumentais empregadas para a análise dos digeridos com as técnicas de ICP OES e ICP-MS são mostradas. O capítulo também traz informações sobre a metodologias empregadas para a determinação de carbono total, nitrogênio total, RCC e acidez dos digeridos, bem como para os testes para a avaliação da estabilidade dos elementos nos digeridos.*

### 3.1 Amostras e materiais de referência

As amostras empregadas para este estudo foram todas obtidas no comércio local da cidade Santa Maria-RS. Os materiais botânicos (extratos de espinheira-santa e guaraná) e as amostras de leite em pó foram submetidas a etapa de decomposição sem necessidade de uma etapa preliminar de cominuição, pois estas encontravam-se na forma de pó. Todas as amostras empregadas neste trabalho foram estocadas em frascos de polipropileno de 50 mL, e mantidas em ambiente livre de umidade e temperaturas de 20 a 25 °C. As amostras de espinheira-santa e leite em pó nomeada como LP05, foram empregadas para a etapa de otimização da etapa de decomposição. Previamente a esta etapa utilizando o peróxido de hidrogênio, estas mesmas amostras foram caracterizadas com relação aos seus teores totais de carbono e nitrogênio.

A Tabela 1 mostra o percentual de carboidratos, proteínas e gorduras nas amostras de leite em pó usadas durante este trabalho, estas informações foram extraídas do rótulo destes produtos.

**Tabela 1** - Composição das amostras de leite em pó utilizadas neste trabalho, conforme informações descritas no rótulo destes produtos.

Amostras de leite em pó	Carboidratos, %	Proteínas, %	Gorduras,%
LP01	58,0	15,0	21,0
LP02	57,0	11,0	27,0
LP03	54,0	15,0	19,0
LP04	38,0	26,0	27,0
LP05	37,0	26,0	27,0

Para a avaliação da exatidão dos métodos propostos foram utilizados diferentes materiais certificados. Os materiais de referência certificados de origem botânica foram folhas de macieira (NIST 1515 *Apple leaves*, EUA) e celulose (IAEA V9 *Cotton cellulose*, International Atomic Energy Agency, Áustria), leite em pó integral (NIST 8435 *Whole milk powder*, EUA) e leite em pó desnatado (NIST 1549 *Non fat milk powder*, EUA ).

### **3.2 Reagentes**

A água (resistividade maior que  $18\text{M}\Omega\text{ cm}$ ) empregada em todas as etapas deste trabalho foi previamente desmineralizada empregando sistema de destilação e de troca iônica (Milli-Q Ultrapure water purification system, Gradient System, Millipore, Billerica, EUA). As metodologias desenvolvidas fizeram uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e 50% m/m (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). O  $\text{HNO}_3$  65% m/m (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizado foi primeiramente bidestilado em sistema de destilação de quartzo com temperaturas abaixo de seu ponto de ebulição (modelo duoPUR, Subboiling distillation system, Millestone, Bergamo, Itália).

A determinação de acidez total foi realizada empregando volumetria de neutralização com KOH (Merck, Darmstadt, Alemanha)  $0,10\text{ mol L}^{-1}$  em água. Esta solução foi previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio (Vetec, Duque de Caxias, Brasil).

A determinação de carbono e nitrogênio total foram realizadas empregando um analisador elementar que utilizou gás He como carreador (pureza  $> 99,9\%$ , White Martins, Duque de Caxias, Brasil) e  $\text{O}_2$  como oxidante (pureza  $> 99,9\%$ , White Martins). A calibração para a determinação destes elementos foi realizada empregando um material de referência de L-ácido aspártico (pureza  $>99,5\%$ , Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

A determinação de B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Zn foi realizada mediante a calibração externa, com solução de referência SCP33 MS (Solução estoque com concentração de  $10\text{ mg L}^{-1}$ , SCP Science, Quebec, Canadá). As determinações de carbono nos digeridos foram realizadas empregando a solução de referência de ácido tartárico (CGC1-5Y, Inorganic Ventures,  $1001 \pm 12\text{ mg L}^{-1}$ ) diluído em 0,2% m/v de  $\text{HNO}_3$ . Para a determinação de carbono foi empregado calibração interna empregando ítrio.<sup>69</sup>

Para a geração do plasma indutivamente acoplado foi empregado o gás argônio com pureza  $> 99,998\%$  (White Martins).



### 3.3 Equipamentos

Durante o trabalho foram avaliados diferentes sistemas de preparo de amostra empregando a via úmida. A decomposição das amostras botânicas e de leite em pó foram realizadas em três sistemas: (i) bloco digestor com aquecimento convectivo e equipado com frascos de vidro borossilicato com temperatura máxima limitada pela escolha do reagente; (ii) sistema de preparo de amostras Multiwave 3000 (Microwave Sample Preparation System Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com 4 frascos de quartzo com volume interno de 80 mL, cada. A temperatura e a pressão máximas foram limitadas para 280 °C e 80 bar, respectivamente. O controle de aquecimento foi realizado através da programação da potência e os parâmetros temperatura, pressão e taxa de variação de pressão ( $0,8 \text{ bar seg}^{-1}$ ) foram monitorados durante o processo. A potência máxima aplicada foi de 1400 W e as etapas de FAN 1 e FAN 2 (etapas de resfriamento 1 e 2) foram empregadas durante as etapas de aquecimento e resfriamento, respectivamente; e (iii) sistema de preparo de amostras UltraWave (UltraWave Single Reaction Chamber-SRC, Milestone, Sorisole, Itália) equipado com uma “raque” com 5 frascos de quartzo e cavidade com volume total de 1 litro. A temperatura, pressão e taxa de variação de pressão máximas foram limitadas para 250 °C, 180 bar e  $5 \text{ bar seg}^{-1}$ , respectivamente. O controle do sistema foi realizado pela modulação da potência irradiada para se alcançar a temperatura programada. A cavidade deste sistema foi pressurizada com gás argônio, geralmente 40 bar. O sistema de resfriamento empregado forneceu água com temperatura de 10 °C para resfriar a parte externa da cavidade metálica.

As determinações de C, Ca, Fe, K, Mg e Na foram realizadas em um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Cirus CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha) equipado com câmara de nebulização duplo passo de vidro e nebulizador de fluxo cruzado. O espectrômetro empregado possui a ótica selada, permitindo assim a detecção de radiação a partir de 120 nm, sistema de dispersão baseado em policromador círculo de Rowland e detecção empregando CCD. As informações sobre as condições utilizadas durante a análise são mostradas na Tabela 2.

As determinações de B, Ba, Cu, Cd, Mn, Mo, Pb, Sr e Zn foram realizadas em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Modelo ELAN DRC II, Perkin Elmer-SCIEX, Waltham, EUA) equipado com câmara de nebulização ciclônica de quartzo (Glass Expansion, Inc, West Melbourne, Austrália) e nebulizador concêntrico de vidro (Mainhard Tipo A, Golden, EUA). O espectrômetro utilizado conta com separador de massas do tipo quadrupolo com capacidade para discriminação e 1 u.m.a.. A Tabela 2 mostra as condições operacionais empregadas.

A determinação de carbono e nitrogênio total foram realizadas empregando um analisador elementar (modelo Flash EA1112, Thermo electron, USA) que operou no modo simultâneo para carbono e nitrogênio. Os catalisadores empregados para a oxidação quantitativa foram óxidos de cromo II e cobalto III. A temperatura da cela de combustão foi de 950 °C e a separação dos gases gerados foi mediante ao uso de cromatografia gasosa e a detecção foi realizada por um detector de condutividade térmica.

A determinação de acidez total foi realizada empregando volumetria de neutralização em digeridos após estes serem condicionados em frascos de polipropileno e diluídos. Para a determinação foi utilizado um titulador automático (Titrande 836, Metrohm, Herisau, Suíça) equipado com agitador magnético (Módulo 803 Ti Stand, Metrohm) e uma bureta de 20 mL (Dosino 800, Metrohm). O ponto de equivalência durante a reação de neutralização foi determinado por um eletrodo de vidro combinado para meio aquoso (LL Electrode Plus, modelo 6.0262.100, Metrohm).

**Tabela 2** – Parâmetros empregados para a determinação elementar empregando ICP OES e ICP-MS.

Parâmetros	ICP OES	ICP-MS
Potência da RF, W	1400	1300
Gás principal, L min <sup>-1</sup>	14	15
Gás auxiliar, L min <sup>-1</sup>	1,00	1,20
Gás de nebulização, L min <sup>-1</sup>	0,80	0,95
Câmara de nebulização	Duplo passo	Concêntrica
Modo de coleta de dados	Integração do sinal (5 s de aquisição)	Altura do sinal (Peak hopping)
Medições por replicata	3	3
Aquisições por medição	3 readings	8 sweeps
Dual time,ms	-	50
Cones de amostragem e skimmer	-	Pt
Forma de observação do plasma	Axial	
	C - 193,030	
	Ca - 396,847	
	Fe - 238,204	
Comprimento de onda, nm	K - 766,490	
	Mg - 280,270	
	Na - 589,592	
	Y - 371,029	
		<sup>10</sup> B
		<sup>138</sup> Ba
		<sup>65</sup> Cu
		<sup>114</sup> Cd
		<sup>55</sup> Mn
		<sup>95</sup> Mo
		<sup>208</sup> Pb
		<sup>88</sup> Sr
		<sup>64</sup> Zn

### **3.4 Procedimentos**

#### **3.4.1 Método comparativo - Decomposição utilizando HNO<sub>3</sub> concentrado e sistema Multiwave 3000**

A decomposição em sistema fechado com HNO<sub>3</sub> concentrado como oxidante, foi utilizada como método de preparo de amostras comparativo. As decomposições foram realizadas em um sistema de preparo Multiwave 3000 com aquecimento dielétrico, equipado com rotor XQ80 e quatro frascos em quartzo com volume interno de 80 mL cada. Os extratos de Espinheira-Santa, e guaraná, as amostras de leite em pó foram pesadas (500 mg) e transferidas para os frascos de quartzo e a estes foi adicionado um volume de 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Posteriormente, estes frascos foram selados adequadamente com suas tampas e submetidos ao aquecimento. O programa de aquecimento utilizado para o método comparativo foi composto por uma rampa de 0 a 1400 W com duração de 10 minutos, patamar sob a potência máxima, 1400 W, com duração de 20 minutos e uma etapa de resfriamento.

O sistema de ventilação empregou durante a etapa de decomposição o FAN 1 (60 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>), enquanto que para a etapa de resfriamento foi utilizado o nível FAN 2 (125 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>). Posterior à decomposição das amostras, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno graduados e aferidos ao volume de 30 mL.

#### **3.4.2 Decomposição utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sistema UltraWave -SRC**

Os procedimentos empregados para a decomposição de amostras botânicas e leite em pó apresentaram diferenças no que diz respeito ao programa de aquecimento e massa de amostra usada para a decomposição. Para espinheira-santa, massas de 100 a 1250 mg foram empregadas, enquanto que para a amostra de leite em pó LP05 foram avaliadas massas de 100 a 500 mg. Para ambas as amostras o volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizado foi de 8 mL. Com a amostra e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no frasco de quartzo, este foi agitado de forma cuidadosa durante aproximadamente 1 minuto para solubilizar o máximo possível da amostra em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois testes preliminares

demonstraram que esta etapa minimizou o efeito da reação entre a amostra e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, por sua vez, levava ao aumento da pressão no interior da cavidade a ultrapassar o limite de 5 bar seg<sup>-1</sup>. Posteriormente à decomposição das amostras, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno graduados e aferidos ao volume de 30 mL. Na Tabela 3 são mostrados os programas de aquecimento desenvolvidos para a decomposição das amostras botânicas e das amostras de leite em pó.

**Tabela 3**-Programa utilizado para o preparo de amostras botânicas e leite em pó empregando o método desenvolvido.

Botânica	Rampa	Patamar	Resfriamento
Temperatura, °C	20 →250	250	250→50
Tempo, min	20	10	30
Leite em pó	Rampa	Patamar	Resfriamento
Temperatura, °C	20 →250	250	250→50
Tempo, min	10	20	30

A pressão inicial empregada para as decomposições foi de 40 bar de argônio e a solução utilizada na cavidade foi uma mistura de 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% m/m, 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m e 130 mL de água. A etapa de resfriamento ocorreu com a passagem de água resfriada a 10 °C na parte externa da cavidade metálica por 20 minutos.

### 3.4.3 Decomposição utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bloco digestor

O primeiro teste realizado para avaliação do comportamento da amostra de espinheira-santa junto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado empregando bloco digestor. Para estes testes, massas de amostras de 50 e 100 mg de amostra foram aquecidas juntamente com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m durante 2 h e 30 min. Sendo que foi empregado uma rampa de 30 min. até a temperatura de 110 °C e esta temperatura foi mantida por 2 h. Posteriormente ao arrefecimento para 50 °C, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL e completados com água para 30 mL. O preparo de amostras em bloco digestor foi realizado empregando uma “raque” com 5 frascos de 40 mL cada.

#### 3.4.4 Decomposição utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sistema Multiwave 3000

A decomposição das amostras por MO com o sistema de preparo de amostras Multiwave 3000 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante foi feito empregando as mesmas condições de aquecimento e arrefecimento descritas no item 3.4.1 (Método comparativo). Contudo, para este teste, foram decompostas massas de 100 a 250 mg de espinheira-santa utilizando 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m. Após ao arrefecimento, os digeridos foram transferidos para frascos graduados de polipropileno e completados com água para o volume de 30 mL.

### 3.5 Determinação de carbono residual

Os RCC provenientes das decomposições das amostras de espinheira-santa e de leite em pó (amostra LP05), foram determinados mediante ao conhecimento dos valores de carbono total destas amostras e as concentrações de carbono presente nos digeridos. A equação 4 foi utilizada para calcular o RCC.

$$RCC = \frac{C_l f_d V_{Af}}{m_a T_c} \cdot 100$$

Onde *RCC* é o carbono residual (%), *C<sub>l</sub>* é concentração de carbono em solução (mg L<sup>-1</sup>), *f<sub>d</sub>* é fator de diluição, *V<sub>Af</sub>* é o volume de aferição das soluções (L), *m<sub>a</sub>* é a massa de amostra utilizada (g) e *T<sub>c</sub>* é o teor de carbono total contido na amostra (%).

### 3.6 Estabilidade dos analitos em digeridos após estocagem

A estabilidade dos analitos, nos digeridos provenientes das amostras de espinheira-santa e de leite em pó (amostra LP05), foram avaliadas mediante a análise dos digeridos em diferentes momentos. A determinação foi realizada

mensalmente, durante os 4 primeiros meses de estocagem dos digeridos. Sendo que os digeridos foram estocados em ambiente fechado (frascos de propileno), sem presença de luz e a temperatura ambiente.

A Figura 4 mostra as etapas realizadas neste trabalho de forma resumida em um organograma. O organograma é dividido nos testes realizados para as amostras de espinheira-santa e para a amostra de leite em pó.



Figura 4 – Organograma demonstrando as diferentes etapas do trabalho.



## **4 Resultados e Discussões**

---

*Neste capítulo são mostrados os resultados obtidos nos testes empregando  $H_2O_2$  como oxidante para a decomposição de amostras de espinheira-santa e guaraná, e amostras de leite em pó com diferentes composições (teores proteicos e de gordura). Durante os experimentos realizados para a avaliação da decomposição destas amostras foi avaliada a eficiência das decomposições, com base nas determinações de RCC, empregando diferentes instrumentos para o preparo destas amostras buscando o sistema que mais se adequa ao emprego do  $H_2O_2$  como oxidante. Posteriormente, também são demonstrados e discutidos os vários testes empregados para a etapa de otimização e os resultados obtidos das análises das matrizes orgânicas empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS.*

#### 4.1 Experimentos preliminares para a digestão de amostras botânicas

A etapa inicial para o desenvolvimento da metodologia para a decomposição das amostras, empregando apenas  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante, se deu avaliando uma amostra de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em 3 diferentes equipamentos: (i) bloco digestor, (ii) sistema de preparo de amostra Multiwave 3000 e (iii) sistema de preparo de amostras UltraWave-SRC. O emprego destes diferentes equipamentos teve como objetivo avaliar o comportamento da amostra botânica frente à presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m em diferentes temperaturas. Com o bloco digestor a temperatura máxima alcançada foi de 106 °C, já para os sistemas com aquecimento por irradiação MO as temperaturas alçadas foram superiores a 230 °C. A escolha desta amostra para os testes iniciais foi devido a este tipo de amostra ser composta majoritariamente por carboidratos, que podem ser facilmente convertidas até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .<sup>4,70</sup>

Inicialmente um bloco digestor foi empregado para a decomposição de massas de 50 a 100 mg de espinheira-santa com 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30% m/m e temperatura máxima programada de 110 °C (ponto de ebulição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%  $\approx$  106 °C).<sup>23</sup> No entanto estes testes resultaram em digeridos contendo resíduos insolúveis (decomposição incompleta), e por isso outros testes foram realizados empregando um sistema de preparo de amostras com capacidade para atingir temperatura de até 280 °C. O Multiwave 3000, equipamento utilizado para estes testes, é um sistema fechado com aquecimento por irradiação de MO e que pode atingir a pressão máxima de 80 bar.

A utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m (8 mL) em sistema de preparo de amostras Multiwave 3000 resultou na decomposição completa da amostra de espinheira-santa. Contudo, massas superiores a 250 mg não foram avaliadas, devido a elevada taxa de reação entre os constituintes da amostra e o oxidante, principalmente para temperaturas acima de 150 °C. A reação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a amostra resultou na rápida elevação da pressão no interior dos frascos de quartzo, de forma que a taxa da variação de pressão ultrapassou o limite máximo permitido pelo equipamento (0,80 bar  $\text{seg}^{-1}$ ), levando assim ao sistema de preparo de amostra a cessar

automaticamente o processo de irradiação e iniciar o resfriamento (mudança do nível de exaustão de  $60 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$  para  $125 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ ) até que a elevação da pressão assumisse valores inferiores ao limite. A elevação da pressão acima do seu limite ocorreu de 3 a 5 vezes durante o procedimento, o que acarretou em etapas de resfriamento sucessivas durante a decomposição e isso pode ter diminuído a eficiência do processo de decomposição pois temperaturas de 200 a 230 °C foram atingidas apenas ao final da etapa de aquecimento. Além disso estas temperaturas foram apenas alcançadas faltando de 2 a 3 min para o fim do programa de aquecimento.

Durante a decomposição da amostra de espinheira-santa empregando o sistema Multiwave 3000, a pressão máxima atingida foi de 80 bar e a temperatura máxima atingida foi de 230 °C. O aquecimento utilizado para este sistema inicialmente empregou uma rampa de 10 minutos e posteriormente a potência máxima (1400 W) foi mantida por 10 min. Após a etapa de decomposição, o RCC dos digeridos foi avaliado.

O sistema UltraWave-SRC também foi avaliado para a decomposição da espinheira-santa com objetivo de comparar estes sistemas. Para decomposição da espinheira-santa com este sistema de preparo de amostras, o programa de aquecimento usado foi o mesmo ao utilizado para as decomposições usando o Multiwave 3000, contudo para o UltraWave-SRC o programa de aquecimento realizado mediante o controle da temperatura, que teve como valor máximo 250 °C. Para as massas de 100 e 250 mg de espinheira-santa as decomposições foram completas, sendo que para ambos os casos o digerido final teve aparência límpida sem coloração.

Empregando o sistema UltraWave-SRC não foi observado variação da pressão acima do limite máximo quando massas de amostra de 250 mg foram submetidas a decomposição. Sendo que, para este equipamento, a variação máxima para a pressão é de  $5,0 \text{ bar s}^{-1}$ . Neste sentido, vale ressaltar que o aquecimento durante a decomposição da amostra foi ininterrupto, atingindo, assim, a temperatura máxima programada de 250 °C.

Comparando os sistemas com aquecimento por irradiação MO empregados para os testes iniciais, sob o ponto de vista operacional, pode-se verificar que o sistema UltraWave-SRC permite a digestão da amostra de espinheira-santa com peróxido de hidrogênio sem que ocorram interrupções durante a etapa de

aquecimento em virtude de variações abruptas da pressão. Estas variações de pressão, além de interromperem o processo de aquecimento, podem ser consideradas pontos críticos no que tange as questões sobre a segurança do equipamento e do usuário e, desta forma, pode-se assegurar que o sistema de preparo de amostras UltraWave é mais seguro devido a sua capacidade em suportar até 199 bar.<sup>20</sup>

Além disso, a eficiência de decomposição da espinheira-santa empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m foi o fator considerado mais importante para a escolha do equipamento a ser empregado para as demais etapas do trabalho. Para a decomposição de 100 mg de amostra, ambos os equipamentos demonstraram capacidade para o processo de decomposição semelhantes, visto que os resultados não apresentaram diferença significativa (teste t, nível de confiança de 95%). Contudo, quando comparadas as concentrações de C nos digeridos provenientes da decomposição de 250 mg nos diferentes sistemas foi encontrado uma concentração média (mg L<sup>-1</sup>) de carbono de 350% maior nos digeridos provenientes do sistema Multiwave 3000, quando comparados aos provenientes do sistema UltraWave-SRC. Além disso, massas maiores do que 250 mg de espinheira-santa não foram decompostas no Multiwave 3000 por precaução, devido ao aumento abrupto da pressão durante a decomposição desta massa. Em contrapartida, a decomposição de 500 mg da mesma amostra no UltraWave-SRC resultou em digerido com concentração de carbono inferior ao encontrado na solução proveniente da decomposição de 250 mg empregando o Multiwave 3000. Assim, com base nos dados pode-se observar as vantagens do sistema UltraWave-SRC empregando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante quando comparado aos demais sistemas avaliados e por estes motivos este foi escolhido para ser empregado nas demais etapas do presente trabalho.

#### **4.2 Decomposição de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) empregando o sistema UltraWave-SRC®**

O sistema de preparo de amostras UltraWave-SRC permite a decomposição completa de grandes quantidades de amostras (> 1000 mg) botânicas. Isso já foi

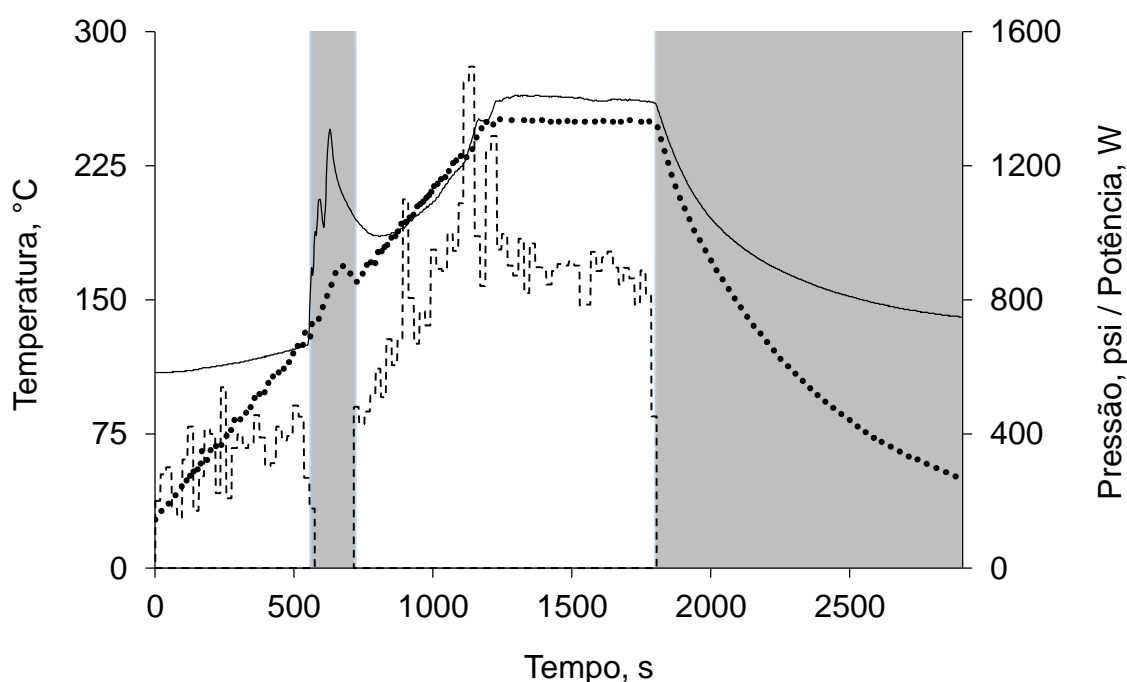
demonstrado em trabalho anterior, quando decomposições completas de até 1500 mg de amostras de amêndoa, avelã e castanha-do-Pará foram realizadas empregando HNO<sub>3</sub> concentrado e misturas de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>71</sup>

No trabalho proposto foram avaliadas decomposições de até 1500 mg de amostra de espinheira-santa com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m com objetivo de melhorar o limite de detecção (LOD) do método. Quando a massa de 1500 mg de amostra foi submetida ao processo de decomposição o digerido apresentou resíduos sólidos (decomposição incompleta), porém foram obtidos digeridos livres de material insolúvel para massas de até 1250 mg. Vale ressaltar que para a obtenção de digeridos provenientes da decomposição de 750 a 1250 mg de espinheira-santa empregando o UltraWave-SRC algumas modificações foram necessárias, e estas informações são detalhadas no próximo item.

#### 4.2.1 Otimização e considerações sobre o uso do UltraWave-SRC para a decomposição de espinheira-santa

Para a decomposição de massas maiores do que 500 mg da amostra de espinheira-santa foram necessários alguns cuidados para tornar o procedimento reprodutível e seguro. Inicialmente, com o objetivo de evitar a combustão da amostra no interior da cavidade e deformação do frasco de 900 mL em PTFE (usado para cobrir a cavidade metálica) e tampas de PTFE, as amostras foram vigorosamente agitadas com peróxido de hidrogênio para evitar depósito da amostra nas paredes do frasco e na superfície da solução. Além disso, todas as digestões das amostras com peróxido de hidrogênio foram realizadas em frascos de quartzo de 40 mL. A etapa de agitação foi necessária devido imiscibilidade de grandes quantidades de espinheira-santa em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que por sua vez, poderia ocasionar a rápida reação entre o oxidante e a amostra, podendo até mesmo provocar a combustão da amostra no interior da câmara de reação. É importante ressaltar que foi verificado indícios de combustão no interior da cavidade quando 750 mg desta amostra foram submetidas a decomposição sem a etapa de homogeneização da amostra em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A outra modificação realizada foi referente a rampa de aquecimento que foi alterada de 10 minutos (23 °C min<sup>-1</sup>) por uma rampa de 20 minutos (11,5 °C min<sup>-1</sup>), pois a

utilização da maior taxa de aquecimento (rampa de 10 minutos) levou a pressão a ultrapassar o limite de  $5 \text{ bar s}^{-1}$ . Posterior a estas modificações no procedimento não foram observados problemas relacionadas as avarias ocasionadas em peças de PTFE e ao abrupto aumento da pressão. A Figura 5 mostra as variações de pressão e temperatura durante a irradiação de MO para a decomposição de 1250 mg de espinheira-santa com 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m.



**Figura 5** - Pressão (linha sólida), temperatura (linha pontilhada) e potência (linha tracejada) durante a decomposição de 1250 mg de espinheira-santa usando 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m como oxidante utilizando o UltraWave-SRC. As duas regiões representadas pela coloração branca e cinza mostram as regiões onde ocorreram as etapas de aquecimento e resfriamento, respectivamente. O programa empregado para a decomposição foi uma rampa de 20 minutos (1200 s) até 250 °C, permanência nesta temperatura por 10 minutos e resfriamento até atingir 50 °C.

Durante a decomposição de 1250 mg de espinheira-santa foi observado que a quantidade de energia liberada foi suficiente para que a temperatura no interior da cavidade excedesse a taxa de aquecimento empregada, ou seja, a temperatura aumentou mais do que estava previsto pelo programa de aquecimento, mesmo que a irradiação de MO pelo magnetron tenha cessado. Isso pode ser evidenciado na Figura 5 onde durante a rampa de aquecimento o sistema inicia o processo de resfriamento em 530 segundos (8 minutos e 50 segundos), momento no qual a temperatura estava em aproximadamente 125 °C. O processo de aquecimento

apenas reiniciou após 3 minutos de resfriamento realizado pela passagem de água a 10 °C em torno da cavidade de aço. Provavelmente o aumento da temperatura mesmo sem a irradiação MO, deve ser decorrente da decomposição do peróxido de hidrogênio que apresenta características exotérmicas.

Nesta mesma temperatura de 125 °C observou-se um aumento abrupto da pressão, conforme é mostrado pela linha sólida na Figura 5, sendo esta variação causada provavelmente pela elevada taxa de reação da amostra junto ao oxidante e pela decomposição do peróxido de hidrogênio.

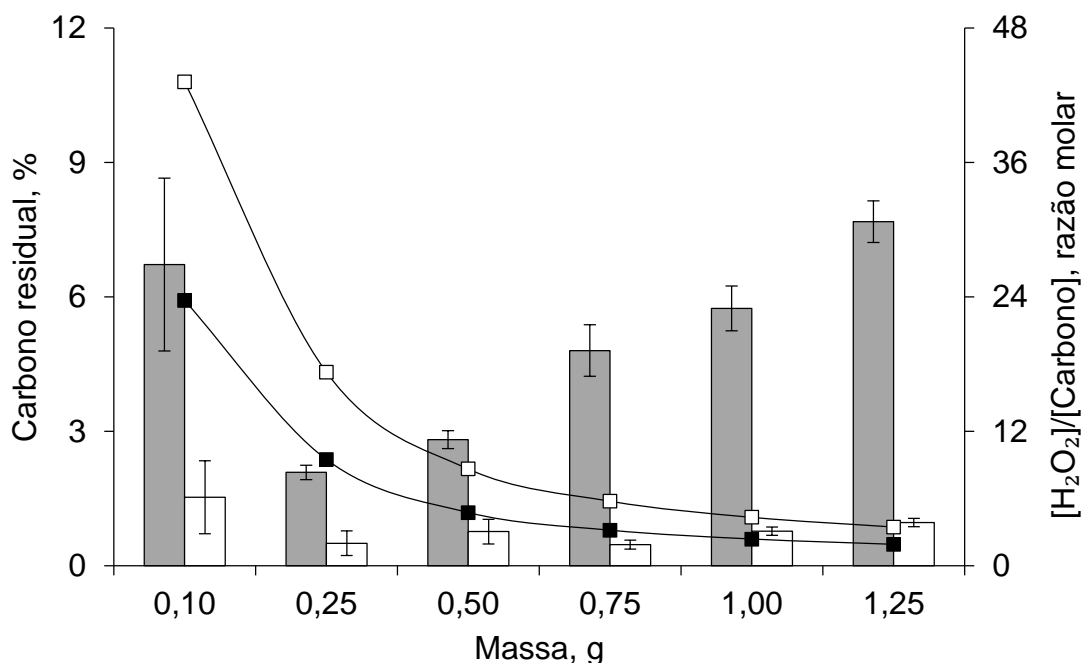
Para prevenir que a variação abrupta de pressão ultrapassasse o limite de 5 bar  $\text{seg}^{-1}$  durante a decomposição da amostra de espinheira-santa a quantidade máxima de amostra decomposta empregando 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% m/m foi limitada a 1250 mg, mesmo que com esta concentração de reagente houve-se a possibilidade da decomposição de massas ainda maiores.

#### 4.2.2 Influência da concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ nas digestões

De acordo com os trabalhos realizados por Denbsky<sup>56</sup> e Matusiewicz e Barnes<sup>18</sup> as decomposições mais eficientes de amostras orgânicas foram observadas quando  $\text{H}_2\text{O}_2$  mais concentrado foi empregado. Desta forma, foram realizados experimentos comparando a eficiência das decomposições empregando  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 e 50% m/m. A Figura 6 mostra o RCC (%) em digeridos de diferentes massas de espinheira-santa (100 a 1250 mg) decompostas a partir do uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 e 50% m/m, bem como são mostradas as razões molares entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o carbono total presente na amostra de espinheira-santa, para ambos antes a decomposição.

Como pode ser observado na Figura 6, o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas concentrações de 30 e 50% m/m foram eficientes para a decomposição de até 1250 mg de espinheira-santa. Produzindo digeridos sem a presença de material insolúvel. Para o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m o RCC foi inferior a 9%, independente da massa de amostra decomposta. Por outro lado, para  $\text{H}_2\text{O}_2$  50% m/m o RCC foi inferior a 3%. Comparando as diferentes massas testadas pode-se observar que o uso do reagente mais concentrado levou a uma decomposição mais eficiente em todos os casos. Com relação a razão  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{C}$ , observa-se que razões superiores a 2

garantiram a eficiência na digestão com a produção de digeridos sem a presença de material insolúvel.



**Figura 6** - Carbono residual em digeridos de espinheira-santa proveniente da decomposição empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m ou 9,8 mol L<sup>-1</sup> (Barras cinzas) e 50% m/m ou 17,6 mol L<sup>-1</sup> (Barras brancas). Razão molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% m/m (Linha preta com marcador preto) e 50% m/m (Linha preta com marcador branco), e massa de carbono total contida na amostra. As quantidades molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e carbono são anteriores ao processo de decomposição empregando o UltraWave-SRC. As barras de erros dos gráficos de barras são referentes a n = 4.

O RCC (expresso em %) foi calculado com base na massa de carbono presente na amostra de espinheira-santa antes da decomposição e a concentração de carbono presente nos digeridos. O valor de RCC nos digeridos é importante para a avaliação da eficiência do processo de decomposição, mas também para minimizar possíveis interferências, entretanto para a etapa de quantificação o mais importante é a concentração de carbono nos digeridos finais, que foi estimada em mg L<sup>-1</sup>. De acordo com a literatura, são observadas interferências nas determinações utilizando a ICP OES para digeridos com concentração de carbono superior a 8000 mg L<sup>-1</sup>.<sup>65</sup> Como as concentrações de carbono foram inferiores a 1600 mg L<sup>-1</sup>, para digeridos provenientes da decomposição usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 e 50% m/m, todos os digeridos obtidos são apropriados para a análise por ICP OES. Contudo, para as determinações por ICP-MS somente os digeridos obtidos do uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m



foram utilizados, pois estas decomposições tiveram concentrações de carbono inferiores a 200 mg L<sup>-1</sup>.

O excesso de oxidante, comparando quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e carbono antes das decomposições, é mostrado na Figura 6 através da razão molar entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e carbono contido na massa de amostra empregada para a decomposição. O excesso de oxidante observado para as diferentes massas de espinheira-santa decompostas variou de ≈ 40, decomposição de 100 mg de espinheira-santa com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m, até ≈ 2 para decomposição de 1250 mg com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m. A mesma figura ainda traz como informação, que o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m para a decomposição das diferentes massas de espinheira-santa não tem qualquer efeito significativo para o processo de decomposição. Já quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m foi empregado pode se observar que com o aumento da massa de espinheira-santa decomposta, menor razão molar oxidante/carbono, levou ao aumento da concentração de carbono nos digeridos finais.

Posterior aos testes demonstrando a efetividade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante para a decomposição de até 1250 mg de espinheira-santa usando aquecimento por irradiação MO para temperaturas de até 250 °C, foi realizada a determinação elementar nos digeridos resultantes. Este método também foi aplicado para outras amostras de mesma origem: guaraná, folhas de macieira e celulose.

#### 4.2.3 Determinação elementar em amostras botânicas após decomposição empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Após os testes iniciais e de otimização do processo de decomposição das amostras usando o sistema UltraWave-SRC, as amostras de espinheira-santa e guaraná foram decompostas utilizando 8 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50% m/m. Como método de comparação, foi realizada a decomposição das mesmas amostras utilizando HNO<sub>3</sub> concentrado como oxidante. Posterior ao preparo de amostras foram determinados os elementos B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Zn, por ICP OES e ICP-MS.

A Tabela 4 traz os resultados obtidos para a determinação elementar em amostras, onde é importante destacar que não foi observada diferença significativa

entre os valores obtidos para os digeridos utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNO<sub>3</sub> (teste t Student, nível de significância de 95%). Comparando os resultados empregando o método proposto com o método de referência foram obtidas recuperações de 93,4 a 107,5%.

É importante destacar que a acidez final dos digeridos obtidos utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é irrelevante, sendo esta inferior a acidez residual observada para os digeridos com HNO<sub>3</sub>. Desta forma, os digeridos obtidos com decomposição usando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser analisados sem prévia diluição pelas técnicas de ICP OES e ICP-MS. Para o emprego destas técnicas para a análise dos digeridos provenientes do método de referência ouve a necessidade de diluição para minimizar o efeito provocado pela acidez elevada.

**Tabela 4** - Resultados obtidos para a determinação elementar (mg kg<sup>-1</sup>) em amostras de espinheira-santa e guaraná empregando os métodos proposto e referência. Os valores médios e os desvios padrão são referentes a procedimentos realizados em quadruplicata (n=4).

Elemento	Espinheira-santa		Guaraná	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>
B	4,27 ± 0,14	4,22 ± 0,37	5,51 ± 0,37	5,59 ± 0,42
Ba	1,71 ± 0,15	1,73 ± 0,13	0,590 ± 0,049	0,569 ± 0,025
Ca*	254 ± 7	260 ± 10	809 ± 69	815 ± 50
Cd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Cu	0,421 ± 0,038	0,440 ± 0,032	14,1 ± 1,1	15,1 ± 1,2
Fe*	67,3 ± 4,0	71,1 ± 5,3	278 ± 7	274 ± 4
K*	825 ± 22	809 ± 34	956 ± 64	937 ± 45
Mg*	175 ± 6	172 ± 5	889 ± 9	881 ± 7
Mn	12,5 ± 0,7	13,2 ± 1,5	24,4 ± 1,4	22,7 ± 1,4
Mo	0,253 ± 0,021	0,260 ± 0,015	< 0,005	< 0,005
Na*	365 ± 12	354 ± 19	26,7 ± 0,9	26,7 ± 1,7
Pb	< 0,0002	< 0,0002	0,094 ± 0,010	0,088 ± 0,016
Sr	3,95 ± 0,18	3,85 ± 0,28	2,72 ± 0,18	2,72 ± 0,28
Zn	2,37 ± 0,23	2,36 ± 0,34	21,2 ± 0,6	20,2 ± 0,9

\*Elemento determinado por ICP OES

Além do método comparativo, a exatidão do método proposto também foi avaliada mediante ao emprego de materiais de referência certificados de folhas de macieira (NIST 1515) e cotton celulose IRM V9. A Tabela 5 traz os resultados obtidos para estes materiais, onde é possível perceber que não houve diferença significativa para os resultados obtidos e certificados (teste t Student, nível de significância de 95%).

**Tabela 5** - Resultados da determinação elementar ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em amostras de um material de referência padrão (SRM) denominado NIST 1515 e um CRM (IAEA-V9) empregando o método proposto. Os valores médios e os desvios padrão são referentes a procedimentos realizados em quadruplicata ( $n = 4$ ).

Elemento	NIST 1515 (Apple Leaves)		IAEA V9 (Cotton Cellulose)		
	Determinado	Certificado	Determinado	Certificado <sup>1</sup>	
B	43,6 ± 0,9	49,0 ± 2,0	n.d.	-----	
Ba	27,0 ± 0,7	27,0 ± 2,0	8,74 ± 0,49	9	6-12
Ca*	15955 ± 2398	15260 ± 150	244 ± 12	240	220-260
Cd	0,014 ± 0,002	0,013 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,002	0,001-0,006
Cu	5,44 ± 0,21	5,64 ± 0,24	0,61 ± 0,04	0,59	0,47-0,94
Fe*	78,8 ± 1,5	83,0 ± 5,0	11,4 ± 1,2	11	7-15
K*	15841 ± 358	16100 ± 200	n.d.	-----	
Mg*	2662 ± 95	2710 ± 80	54,5 ± 2,8	53	46-67
Mn	49,8 ± 0,6	54,0 ± 3,0	0,168 ± 0,012	0,15	0,12-0,21
Mo	0,101 ± 0,011	0,0940 ± 0,0130	0,039 ± 0,004	0,034	0,03-0,049
Na*	25,4 ± 1,9	24,4 ± 1,2	n.d.	-----	
Pb	0,465 ± 0,035	0,470 ± 0,024	0,243 ± 0,018	0,25	0,22-0,33
Sr	22,8 ± 0,6	25,0 ± 2,0	0,664 ± 0,037	0,65	0,54-0,96
Zn	12,3 ± 0,9	12,5 ± 0,3	n.d.	-----	

Traços (-----) = Elementos não avaliados

n.d. = não determinado

\* Elemento determinado por ICP OES

Após a decomposição das amostras botânicas foram realizados testes com amostras de leite em pó. Estes testes foram realizados para verificar se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia ser empregado para decomposição eficiente de amostras contendo elevado percentual de proteínas e gorduras. No item a seguir são demonstrados os testes que foram realizados com a amostra de leite em pó nomeada como LP05.

#### **4.3 Otimização das variáveis para decomposição de leite em pó com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um sistema SRC: Considerações iniciais**

Para esta etapa do trabalho foram feitos experimentos para avaliação de alguns parâmetros importantes para assegurar a completa decomposição de leite em pó. Dentre os parâmetros avaliados destacam-se massa de amostra, volume e concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, temperatura e pressão do sistema UltraWave-SRC. Após a realização dos experimentos nos quais foram investigados os parâmetros citados, os digeridos obtidos foram analisados com relação ao teor de RCC em solução ou a partir do conteúdo de RCC calculado utilizando a quantidade de carbono total presente na amostra. É importante destacar que a amostra LP05 foi empregada para a etapa de otimização dos principais parâmetros para a decomposição usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sistema UltraWave-SRC devido a esta possuir maior conteúdo de gordura e proteína (Tabela 1).

O controle do programa de aquecimento em sistemas empregando MO, geralmente, é realizado pelo monitoramento da potência irradiada e pressão máxima. No sistema UltraWave-SRC a temperatura é controlada pelo monitoramento da mesma, que é rigorosamente controlada pela modulação da potência irradiada. O desenvolvimento do programa de aquecimento foi elaborado por meio de testes iniciais empregando a amostra LP05, demonstrando assim o comportamento desta amostra frente ao aquecimento em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 e 50% m/m. Para uma matriz majoritariamente orgânica geralmente se emprega uma taxa de irradiação que não eleve a temperatura de forma repentina para que a reação não gere um aumento abrupto da pressão, que por sua vez, ultrapasse o limite da variação de pressão do instrumento (5,0 bar seg<sup>-1</sup> para o UltraWave-SRC).

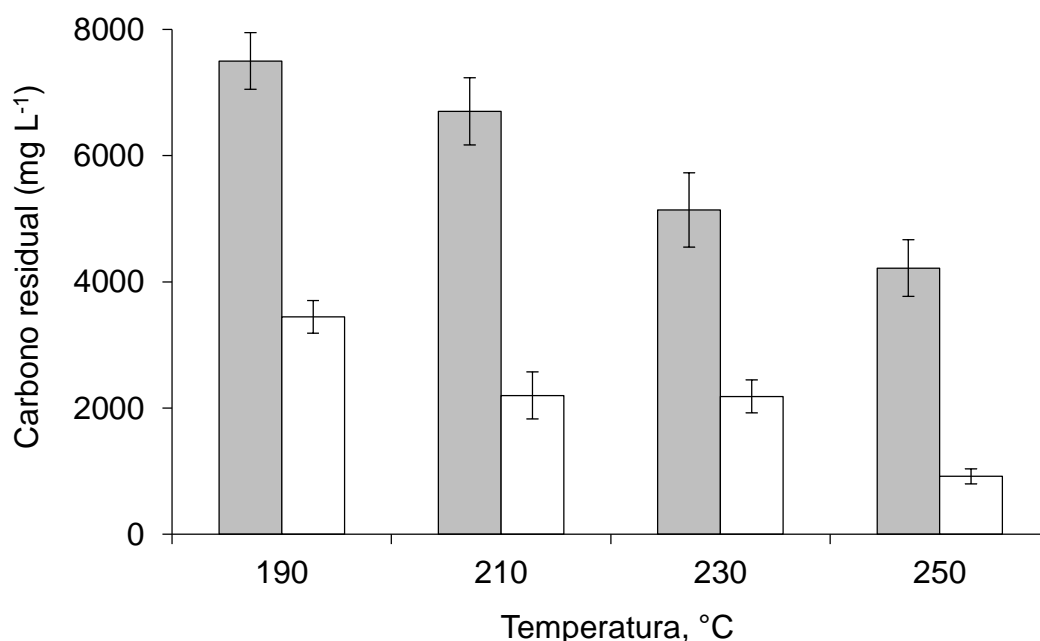
A explicação para este fato é a mesma já explanada nos testes com amostras botânicas.

Apesar do sistema UltraWave-SRC permitir temperaturas de até 300 °C, a temperatura máxima foi fixada em 250 °C durante 20 min, com rampa de aquecimento de 10 min para minimizar o desgaste das partes de PTFE do sistema. Após o ciclo de aquecimento foi feita uma etapa de resfriamento do sistema até a temperatura final de 50 °C. Durante a realização dos experimentos iniciais observou-se que massas de até 500 mg de leite em pó eram eficientemente digeridas (sem a presença de material insolúvel nos digeridos) utilizando pelo menos 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% m/m. Volumes inferiores a 8 mL produziram digeridos com a presença de material insolúvel. Desta forma, os demais experimentos foram realizados utilizando massas de no máximo 500 mg e 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A seguir serão apresentados os resultados obtidos na etapa de otimização dos demais parâmetros. Comparando com a decomposição de amostras botânicas, a decomposição das amostras de leite em pó integral teve de ser realizada empregando uma condição mais drástica de aquecimento, ou seja, 20 minutos sob 250 °C.

#### 4.3.1 Influência de temperatura e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

As decomposições das amostras de leite em pó no sistema UltraWave-SRC foram avaliadas nas temperaturas de 180, 190, 210, 230 e 250 °C, com a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 30 e 50% m/m. Temperaturas inferiores a 190 °C produziram digeridos com resíduo insolúvel. Comparando-se as diferentes temperaturas pode-se observar que há um aumento na eficiência da digestão com o aumento da temperatura, já que os digeridos obtidos na máxima temperatura utilizada apresentaram as menores concentrações de RCC. Com relação à concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, constatou-se que a concentração de 50% m/m forneceu os digeridos com menor concentração de C. Assim, os digeridos obtidos na temperatura de 250 °C e com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50% m/m resultaram em concentração de C de 918 mg L<sup>-1</sup>, cerca de 4 vezes menor que os digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% m/m nesta mesma temperatura (4218 mg L<sup>-1</sup> de C). De acordo com a literatura, a eficiência da digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é aumentada com os incrementos da temperatura de digestão e

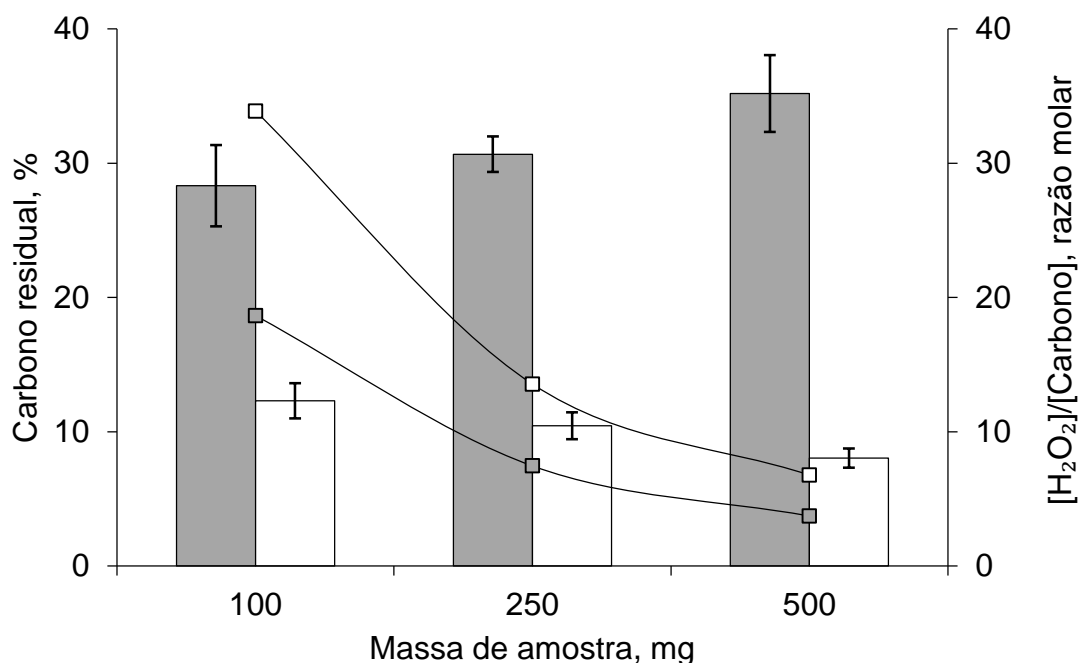
da concentração do oxidante.<sup>72</sup> Também é importante destacar que digeridos com concentrações de C de até 8000 mg L<sup>-1</sup> não apresentam interferência de determinação elementar por ICP OES, com exceção As, Be e Se.<sup>73</sup> Neste sentido todos os digeridos obtidos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 e 50% m/m nas temperaturas variando de 190 a 250 °C foram apropriados para análise por ICP-OES. Por outro lado, para garantir a exatidão adequada nas análises por ICP-MS, os digeridos devem apresentar a menor concentração de C possível. Desta forma, somente os digeridos obtidos com 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m, na temperatura de 250 °C, são adequados para determinação elementar por ICP-MS. A Figura 7 mostra os resultados obtidos para os testes da avaliação de diferentes temperaturas e concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na decomposição da amostra de LP05.



**Figura 7-** Influência da temperatura e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m mostrado pelas barras cinzas e 50% m/m pelas barras brancas) na concentração de C para decomposição de 500 mg de amostra de leite em pó LP05 utilizando o UltraWave-SRC (n=4).

#### 4.3.2 Influência da massa e composição do leite em pó

A influência da massa de leite em pó na eficiência da digestão foi avaliada para massas variando de 100 a 500 mg, conforme é mostrado na Figura 8. Para estes testes, é importante destacar que a eficiência da decomposição foi avaliada em termos do conteúdo de RCC, já que o teor de carbono da amostra LP05 foi previamente determinado. Adicionalmente, a Figura 8 mostra a razão molar entre  $H_2O_2$  e carbono para cada uma das diferentes massas da amostra LP05. A decomposição de massas maiores do que 500 mg não foi eficiente (apresentaram resíduos insolúveis), o teor de RCC e a razão molar entre  $H_2O_2$  e carbono das decomposições usando massas maiores que 500 mg não foram incluídas na Figura 8 e os digeridos provenientes destas decomposições não foram analisados por ICP OES ou ICP-MS. A partir da análise da razão entre  $H_2O_2$  e carbono pode-se observar que foram obtidos digeridos livres de resíduos insolúveis quando esta razão molar foi superior a 3. Com relação aos valores de RCC, constata-se que, para ambas as concentrações de  $H_2O_2$ , estes permanecem praticamente constantes mesmo com o incremento da massa de amostra. Isto é provavelmente decorrente do fato que alguns dos compostos majoritários presentes no leite (carboidratos, proteínas e gordura) são mais facilmente oxidados que outros. Quando submetido à condições de oxidação mais brandas, com  $H_2O_2$  a 30% m/m, observou-se que em torno de 60% do carbono presente no leite em pó foi oxidado, conforme Figura 8. Dentre estes 60% de carbono dos compostos do leite que foram oxidados, provavelmente incluem-se os carboidratos que são mais facilmente oxidáveis que proteínas e gorduras, especialmente a lactose. Por outro lado, sob condição oxidante mais energética com  $H_2O_2$  a 50% m/m, mas com mesmo programa de aquecimento, cerca de 90% do carbono originalmente presente no leite em pó é oxidado. Contudo, mesmo na presença de  $H_2O_2$  a 50% m/m cerca de 10% do carbono da amostra não é oxidado, no qual inclui-se, principalmente o carbono presente nas gorduras do leite. De acordo com dados reportados na literatura, a gordura presente nos alimentos só é eficientemente oxidada com  $H_2O_2$  utilizando temperaturas de digestão da ordem de 450 °C.<sup>56</sup>



**Figura 8** -Carbono residual em digeridos de leite em pó (LP05) proveniente da decomposição empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% m/m ou 9,8 mol L<sup>-1</sup> (Barras cinzas) e 50% m/m ou 17,6 mol L<sup>-1</sup> (Barras brancas), e a razão molar de carbono contida na amostra. As quantidades molares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e carbono são anteriores ao processo de decomposição utilizando o UltraWave-SRC (n = 4).

De forma semelhante ao observado para as amostras botânicas, o emprego do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m forneceu soluções com concentrações de carbono menores aos encontrados nos digeridos resultantes do uso deste reagente a 30% m/m. Além disso, percebe-se que há uma facilidade maior na oxidação dos componentes da espinheira-santa quando comparados ao leite em pó, já que mais que 90% do carbono nos digeridos é removido até mesmo empregando massas de 1250 mg de amostra e uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m, enquanto que para o leite em pó isso apenas é possível empregando 500 mg de amostra junto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m. Isto deve-se, provavelmente ao fato de que as folhas são constituídas majoritariamente de celulose que é mais facilmente oxidada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que as gorduras e proteínas presentes no leite em pó. Esta afirmação é corroborada por trabalhos, publicados na literatura de química analítica, que mostram que é possível a obtenção de digeridos de amostras de celulose (madeira) sem a presença de resíduos insolúveis utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em temperaturas de 125 °C.<sup>18</sup>

Para tentar compreender a reatividade dos compostos presentes no leite em pó, amostras com diferentes quantidades de carboidratos, proteína e gordura foram decompostas utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m. A amostra LP05 (utilizada na otimização da



digestão) com a maior quantidade de gordura (27%) e a menor quantidade de carboidratos (37%) apresentou concentração de C de 918 mg L<sup>-1</sup>. A amostra LP02 por sua vez, com 57% e 27% de carboidratos e gordura, respectivamente, apresentou concentração de C 5 vezes menor. Para corroborar este fato, o RCC obtido para o digerido do material de referência NIST 8435 (whole milk powder - 43%, 26% e 21% de carboidratos, proteínas e gordura de acordo com o certificado de análise, respectivamente) foi aproximadamente 2 vezes maior do que a concentração de C presente nos digeridos do material de referência NIST 1549 (non-fat milk powder, aproximadamente 49% de lactose de acordo com certificado de análise). Outra importante informação é de que Denbsky,<sup>56</sup> em seu trabalho utilizando a digestão de alimentos com peróxido de hidrogênio observou que os alimentos ricos em carboidratos eram mais facilmente oxidados do que os alimentos ricos em gordura.

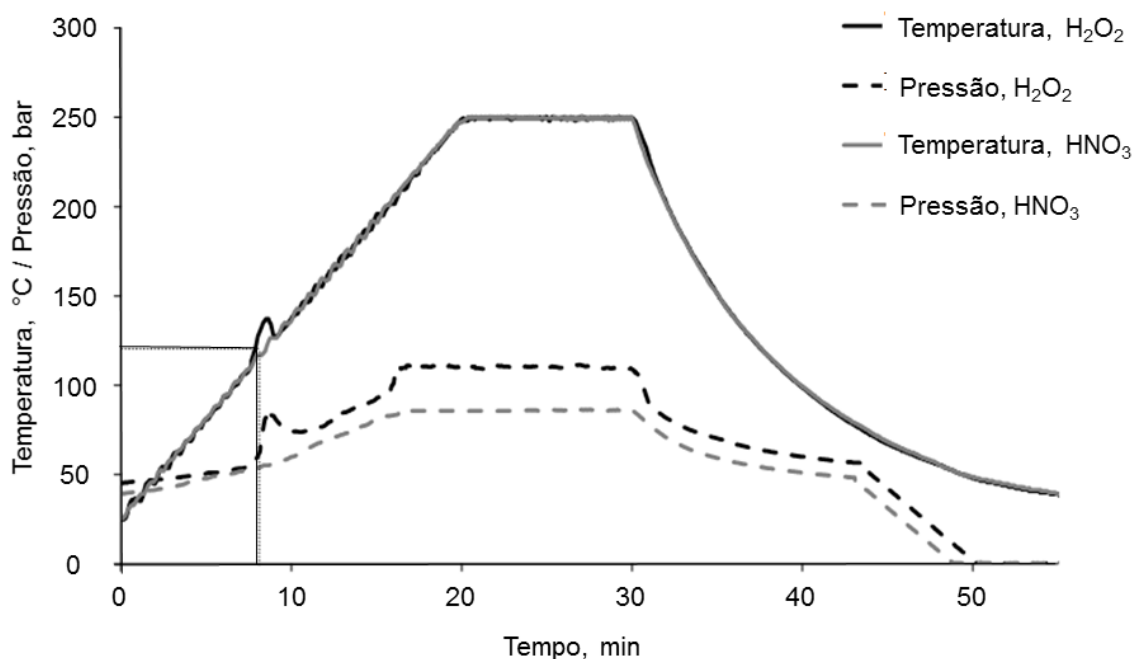
#### 4.3.3 Avaliação da pressão do sistema durante a digestão do leite em pó

A utilização de sistemas pressurizados permite a realização das digestões sob maiores temperaturas com o conseqüente aumento da eficiência da oxidação da matéria orgânica. Na Figura 9 são apresentados os perfis de temperatura e pressão das digestões de leite em pó feitas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m e HNO<sub>3</sub> concentrado (65% m/m). Por questões de segurança e aumento do tempo de vida útil do material utilizado no sistema de MO a temperatura máxima do sistema foi fixada em 250 °C. Inicialmente ao analisar o comportamento da temperatura e da pressão da digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m, observa-se um aumento significativo da pressão decorrente, provavelmente, da decomposição do peróxido de hidrogênio, já que na digestão com HNO<sub>3</sub> não se observa aumento significativo da pressão da forma como ocorre com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observa-se, também um pico na curva de temperatura, mostrando que há um aumento da temperatura da câmara de aquecimento do forno de MO decorrente da reação de decomposição do peróxido de hidrogênio, que é exotérmica. É importante frisar que a pressão máxima obtida na digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de 110 bar enquanto que durante a oxidação com HNO<sub>3</sub> a pressão máxima atingida foi de 90 bar. Contudo, a concentração de carbono nos digeridos obtidos com HNO<sub>3</sub> concentrado

é de 300 mg L<sup>-1</sup> que é aproximadamente 3 vezes menor do que a obtida nos digeridos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m.

Finalmente, para avaliar a influência da pressão sob a eficiência da digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizados experimentos limitando a pressão máxima em 40 e 80 bar que são as pressões máximas permitidas para um grande número de sistemas de preparo de amostras comerciais que utilizam aquecimento por irradiação de MO. É importante lembrar que a câmara de reação do sistema Ultrawave-SRC é previamente pressurizada com argônio a pressão de 40 bar.

Durante o aquecimento da câmara de reação, quando esta atinge a pressão limite (40 ou 80 bar) o sistema inicia o processo de resfriamento para que a pressão não ultrapasse este valor, sendo que este processo impede que o processo de aquecimento prossiga. Para ambos os testes empregando pressões máximas de 40 ou 80 bar resultaram em digeridos com decomposição incompleta (resíduos insolúveis), demonstrando que a pressão tem um efeito importante na decomposição, por permitir o emprego de temperaturas maiores, mas não que esta tenha um efeito sobre a reação de decomposição. Além disso, limitando-se a pressão, não se atingiu a temperatura mínima de 190 °C, necessária para garantir a completa decomposição (digeridos livres de material insolúvel). Baseado nestas constatações, somente o sistema UltraWave-SRC, entre os demais sistemas avaliados, pode fornecer digeridos livres de material insolúvel para a digestão de massas de 500 mg de leite em pó com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m, pois a pressão que este sistema suporta é de até 199 bar, pressão esta que permite o emprego de temperaturas de até 250 °C.



**Figura 9** - Comportamento da temperatura e pressão para a decomposição de 500 mg de leite em pó (LP05) com 6 mL de HNO<sub>3</sub> 65% m/m e 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m utilizando o UltraWave-SRC.

#### 4.3.4 Determinação elementar em amostras de leite em pó e materiais de referência

Os resultados para as determinações dos analitos estudados nos materiais de referência empregados para a avaliação da exatidão estão resumidas na Tabela 6, enquanto que na Tabela 7 são enumerados os resultados das concentrações para todos os elementos estudados de todas as amostras de leite em pó decompostas empregando o método desenvolvido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e comparativo (HNO<sub>3</sub>).

Neste trabalho os digeridos resultantes do método desenvolvido foram basicamente água e constituintes inorgânicos da amostra, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empregado se decompõe completamente em oxigênio e água. Sendo assim, foi possível realizar as determinações através de padrões preparados com soluções de referência empregados para a calibração externa, que foram feitos em água para prevenir qualquer efeito decorrente das diferentes composições das soluções empregadas para a calibração e os digeridos. Sendo que todas as soluções

empregadas na metodologia desenvolvida não utilizaram ácidos comumente empregados nas etapas de decomposição ou de análise (ex. HNO<sub>3</sub> e HCl) em nenhuma das etapas.

Os desvios padrão relativos (RSD) dos resultados das determinações em digeridos provenientes das decomposições usando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram inferiores a 13%, valor este similar aos relatados em metodologias desenvolvidas para a análise de leite em pó.<sup>74</sup>

Os resultados provenientes das decomposições dos CRMs de leite em pó integral (NIST 8435) e de leite em pó desnatado (NIST 1549) demonstraram que os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida são exatos para os elementos estudados e que pode ser empregada para determinação em uma ampla faixa de concentrações, visto que as concentrações de elementos como o Cd, Cu, Pb, Mn e Mo ficaram abaixo de 1 mg Kg<sup>-1</sup> e K, Mg e Na ficaram acima de 1000 mg Kg<sup>-1</sup>.

Os resultados das concentrações dos elementos estudados não apresentaram diferença significativa frente aos valores certificados, ao nível de confiança de 95%, teste t Student.

**Tabela 6-** Resultados obtidos para a determinação elementar (mg kg<sup>-1</sup>) em CRMs de leite em pó integral e desnatado.

Analito	Whole milk powder (NIST 8435)		Non-fat milk powder (NIST 1549)	
	Determinado	Certificado	Determinado	Certificado
B	1,13 ± 0,15	1,1 ± 0,1	n.d.	-----
Ba	0,61 ± 0,08	0,58 ± 0,23	n.d.	-----
Ca*	9570 ± 855	9220 ± 490	12610 ± 420	13000 ± 500
Cd	0,0003 ± 0,0001	0,0002*	0,0006 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002
Cu	0,47 ± 0,05	0,46 ± 0,08	0,68 ± 0,15	0,7 ± 0,1
Fe*	2,2 ± 0,8	1,8 ± 1,1	1,85 ± 0,15	1,78 ± 0,10
K*	13852 ± 512	13630 ± 470	17525 ± 600	16900 ± 300
Mg*	793 ± 81	814 ± 76	1131 ± 85	1200 ± 30
Mn	0,20 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,28 ± 0,10	0,26 ± 0,06
Mo	0,23 ± 0,10	0,29 ± 0,13	0,26 ± 0,10	0,34 <sup>1</sup>
Na*	3780 ± 420	3560 ± 400	4873 ± 125	4970 ± 100
Pb	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,05	0,022 ± 0,005	0,019 ± 0,003
Sr	4,61 ± 0,45	4,35 ± 0,50	n.d.	-----
Zn	28,4 ± 3,5	28,0 ± 3,1	47,0 ± 3,0	46,1 ± 2,2

n.d. = não determinado

<sup>1</sup>Valor informado

Traços (-----) = Elementos não avaliados

\* Elemento determinado por ICP OES

Os resultados obtidos para a determinação de diferentes amostras de leite em pó empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS são enumeradas na Tabela 9. Comparando os resultados obtidos pelo método desenvolvido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de referência (HNO<sub>3</sub>) não foi observada nenhuma diferença significativa ao nível de confiança de 95%, teste t Student. Isso demonstra que os resultados obtidos são exatos.

*Resultados e Discussões*

**Tabela 7** - Resultado das análises de diferentes amostras de leite em pó (mg kg<sup>-1</sup>) determinados por ICP OES e ICP-MS após decomposição com métodos desenvolvido e comparativo.

Analito	LP01		LP02		LP03		LP04		LP05	
	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
B	1,1 ± 0,1	0,93 ± 0,12	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,3 ± 0,2	0,51 ± 0,04	0,51 ± 0,03	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Ba	0,67 ± 0,07	0,73 ± 0,08	0,44 ± 0,05	0,55 ± 0,04	0,86 ± 0,7	0,92 ± 0,6	1,15 ± 0,10	1,24 ± 0,12	0,91 ± 0,08	1,03 ± 0,09
Ca*	5887 ± 488	5864 ± 425	5387 ± 545	5496 ± 488	5432 ± 511	5641 ± 495	9470 ± 855	9159 ± 811	7557 ± 720	7997 ± 740
Cd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Cu	5,4 ± 0,5	6,1 ± 0,4	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,7 ± 0,2	0,26 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,36 ± 0,01
Fe*	86 ± 9	80 ± 8	81 ± 7	89 ± 6	71 ± 6	73 ± 7	168 ± 11	158 ± 10	86 ± 7	82 ± 5
K*	6874 ± 844	6823 ± 799	6581 ± 455	6549 ± 489	7686 ± 689	7346 ± 625	10072 ± 895	11080 ± 812	8960 ± 755	8678 ± 689
Mg*	452 ± 36	473 ± 45	396 ± 33	405 ± 32	593 ± 44	591 ± 45	793 ± 47	813 ± 55	842 ± 47	878 ± 39
Mn	0,39 ± 0,04	0,45 ± 0,05	0,56 ± 0,05	0,63 ± 0,05	0,57 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,57 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,43 ± 0,03	0,47 ± 0,03
Mo	0,50 ± 0,07	0,50 ± 0,06	0,63 ± 0,06	0,68 ± 0,05	0,59 ± 0,05	0,70 ± 0,06	0,68 ± 0,05	0,76 ± 0,06	0,81 ± 0,05	0,81 ± 0,04
Na*	1987 ± 187	2005 ± 178	2440 ± 269	2599 ± 245	2180 ± 198	2570 ± 221	3217 ± 289	3407 ± 315	3523 ± 289	3875 ± 275
Pb	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Sr	3,3 ± 0,34	3,8 ± 0,39	4,1 ± 0,3	4,9 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,5 ± 0,3	4,4 ± 0,2	5,0 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,8 ± 0,4
Zn	58 ± 6	62 ± 5	46 ± 4	44 ± 3	71 ± 6	72 ± 7	34 ± 2	35 ± 3	38 ± 3	37 ± 2

\* Elemento determinado por ICP OES

#### 4.4 Avaliação da acidez dos digeridos de leite em pó e espinheira-santa

O pH do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 e 50% m/m é de cerca de 5,5 a 5,0 e após a digestão das amostras de leite em pó o pH diminui para até o valor de 3, quando massas de 500 mg de amostras foram decompostas. Este decréscimo no valor do pH dos digeridos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser justificados pela formação de ácidos orgânicos (em especial de ácido fórmico) decorrentes da oxidação de compostos orgânicos presentes no leite em pó, sendo que para a amostra de espinheira-santa a mudança de pH pode ser ocasionada pelo mesmo fato. Os digeridos obtidos com 500 mg de leite em pó ou 1250 mg de espinheira-santa junto a 8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% m/m foram titulados com KOH e os valores obtidos foram inferiores a 1 mg g<sup>-1</sup>(mg de KOH/g de digerido) demonstrando que a acidez dos digeridos foi baixa. É importante informar que os digeridos obtidos utilizando 500 mg de leite em pó e 1250 mg de espinheira-santa com 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado apresentaram pH igual ou menor a 1.

#### 4.5 Estabilidade dos analitos em digeridos

Para a estocagem de soluções aquosas é recomendado a acidificação das mesma para pH de 2.<sup>75</sup> Devido ao pH dos digeridos provenientes das decomposições usando apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser maior ou igual a 3, as estabilidades dos analitos B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Sr e Zn, nestes digeridos. Assim foram realizadas determinações mensais destes 14 elementos durante os primeiros quatro meses de estocagem. Sendo que para todos os elementos foram obtidas recuperações entre 90 e 110% quando comparados aos resultados iniciais (valores obtidos da primeira análise empregando o método proposto).

#### 4.6 Limites de detecção

Os LOD foram calculados com base no critério de 3 vezes o desvio padrão, este obtido através de 10 leituras da solução branco. Para a obtenção dos LOD em massa foram utilizadas as massas de 500 mg e 1000 mg para as amostras de leite em pó e botânicas, respectivamente (Tabela 8). O emprego da técnica de ICP-MS levou a obtenção de melhores LOD quando comparados com a técnica de ICP OES. O uso da técnica de ICP-MS para a determinação de elementos tóxicos como Cd e Pb foi indispensável, visto que os LOD as concentrações dos mesmos foram, geralmente, abaixo de  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Além disso, os LOD obtidos para estes elementos usando a técnica de ICP OES impossibilitaria a determinação destes elementos. Os LOD para Ca, K e Na foram demasiadamente elevados, devido a contaminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incorporação de estabilizadores, que possuem em sua estrutura algum destes elementos.

Do ponto de vista regulatório os LOD obtidos para a metodologia proposta são adequados visto que são inferiores aos limites especificados pela Comunidade Europeia,<sup>76</sup> Codex Alimentarius<sup>77</sup> e FDA<sup>78</sup> para diversos tipos de alimentos.



**Tabela 8** - Tabela de LOD para o método desenvolvido empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS. Os LOD foram calculados a partir da equação  $3D + B_c$ , onde  $D$  representa o desvio padrão de 10 determinações da solução branco,

Analito	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Leite em pó		Espinheira-santa e guaraná	
	ICP OES	ICP-MS	ICP OES	ICP-MS
B	0,1	0,02	0,06	0,01
Ba	0,1	0,01	0,06	0,01
Ca	3,0	n.d.	1,7	n.d.
Cd	0,05	0,0001	0,03	0,0001
Cu	0,1	0,01	0,6	0,005
Fe	0,3	n.d.	0,17	n.d.
K	3,0	n.d.	1,7	n.d.
Mg	0,5	n.d.	0,3	n.d.
Mn	0,05	0,005	0,03	0,003
Mo	0,5	0,005	0,3	0,003
Na	30	n.d.	16	n.d.
Pb	0,5	0,0002	0,3	0,0001
Sr	0,1	0,01	0,6	0,006
Zn	0,5	0,2	0,3	0,1

n.d. = não determinado

## 5 Conclusão

---

O método proposto utilizando somente  $H_2O_2$  como oxidante permitiu a digestão, de forma eficiente, das amostras botânicas e de leite em pó e a subsequente determinação de 16 elementos por ICP-OES e ICP-MS.

Os digeridos das amostras botânicas de leite em pó, com menores concentrações de C, foram obtidos nas condições de elevada temperatura e pressão (250 °C e 180 bar de pressão) e com o uso de  $H_2O_2$  na concentração de 50% m/m. Comparativamente, as amostras de leite em pó mostraram-se mais refratárias a oxidação com  $H_2O_2$  que as amostras botânicas, provavelmente em decorrência do maior teor de gordura presente nas amostras de leite em pó. Massas de até 500 mg e 1250mg de leite em pó e botânicas, respectivamente, foram eficientemente digeridas com concentração de C inferior a 918 mg L<sup>-1</sup>. Nestas condições não foram observadas interferências significativas na determinação de 16 elementos por ICP OES e ICP-MS. Além disso, deve-se destacar que os digeridos apresentam menor acidez residual quando comparados com os digeridos obtidos com  $HNO_3$  concentrado, já que a água é o produto majoritário da oxidação com  $H_2O_2$ . Assim, os digeridos resultantes das decomposições usando  $H_2O_2$  puderam ser analisados via nebulização convencional (pneumática) empregando as técnicas de ICP OES e ICP-MS sem necessidade do uso de padronização interna, pois Interferências físicas provocadas pela elevada acidez dos digeridos não foram observadas em decorrência das propriedades do  $H_2O_2$

A exatidão foi avaliada mediante o uso de materiais de referência certificados e com a comparação dos resultados obtidos com o método comparativo e não foi encontrada diferença significativa na comparação dos resultados obtidos com o método proposto com os valores certificados e os obtidos com o método comparativo.

Os limites de detecção obtidos para a metodologia proposta atendem aos limites preconizados pelos órgãos regulatórios como o FDA e *Codex Alimentarius*

para elementos tóxicos. A metodologia proposta pode ser usada também para determinar a composição nutricional em termos dos elementos essenciais.

Por fim, a metodologia desenvolvida possui um caráter inovador no sentido que emprega a irradiação MO combinada ao  $H_2O_2$  para a decomposição de materiais orgânicos o que está de acordo com os princípios da Química Verde.

## 6 Referências

---

1. Würfels, M., Jackwerth, E., Stoeppler, M., Probenvorbehandlungsstudien mit biologischen und Umweltmaterialien, *Z. Anal. Chem.* 329 (1987) 459-461.
2. Pratt, K. W., Kingston, H. M., MacCrehan, W. A., Koch, W. F., Voltammetric and liquid chromatographic identification of organic products of microwave-assisted wet ashing of biological samples, *Anal Chem* 60 (1988) 2024-2027.
3. Würfels, M., Jackwerth, E., Investigations on the carbon balance in decomposition of biological materials with nitric acid, *Z. Anal. Chem.* 322 (1985) 354-358.
4. Würfels, M., Jackwerth, E., Stoeppler, M., Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid : Part 1. Carbon conversion during sample decomposition, *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.
5. Wasilewska, M., Goessler, W., Zischka, M., Maichin, B., Knapp, G., Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1121-1125.
6. Schramel, P., Hasse, S., Knapp, G., Einsatz des Hochdruckveraschers HPA nach Knapp [1] für die voltammetrische Bestimmung von Spurenelementen in biologischem Material, *Z. Anal. Chem.* 326 (1987) 142-145.
7. Mihály, J., Sterkel, S., Ortner, H. M., Kocsis, L., Hajba, L., Furdyga, É., Mink, J., FTIR and FT-Raman spectroscopic study on polymer based high pressure digestion vessels, *Croatica chemica acta* 79 (2006) 497-501.
8. Kappe, C. O., Controlled microwave heating in modern organic synthesis, *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004) 6250-6284.
9. Hoogenboom, R., Wilms, T. F., Erdmenger, T., Schubert, U. S., Microwave-assisted chemistry: a closer look at heating efficiency, *Australian journal of chemistry* 62 (2009) 236-243.
10. Kappe, C. O., Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry, *Chemical Society Reviews* 37 (2008) 1127-1139.
11. Bizzi, C. A., Flores, E. L. M., Nobrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mortari, S. R., Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted

- nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 332-338.
12. Bizzi, C. A., Barin, J. S., Müller, E. I., Schmidt, L., Nóbrega, J. A., Flores, E. M. M., Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid, *Talanta* 83 (2011) 1324-1328.
  13. Mesko, M., Mello, P., Bizzi, C., Dressler, V., Knapp, G., Flores, É. M., Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Anal Bioanal Chem* 398 (2010) 1125-1131.
  14. Bizzi, C. A., Marlon de Moraes Flores, E., Sogari Picoloto, R., Smanioto Barin, J., Araujo Nobrega, J., Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid, *Analytical Methods* 2 (2010) 734-738.
  15. Flores, É. M. d. M., Krug, F. J., Barin, J. S., Arruda, M. A. Z., Decomposição de Materiais Orgânicos por Via Úmida, 2008, pp. 252-275.
  16. Deng, Y., Ma, Z., Wang, K., Chen, J., Clean synthesis of adipic acid by direct oxidation of cyclohexene with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over peroxytungstate-organic complex catalysts, *Green Chemistry* 1 (1999) 275-276.
  17. Noyori, R., Aoki, M., Sato, K., Green oxidation with aqueous hydrogen peroxide, *Chemical Communications* (2003) 1977-1986.
  18. Matusiewicz, H., Barnes, R. M., Tree Ring Wood Analysis after Hydrogen Peroxide Pressure Decomposition with Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Electrothermal Vaporization, *Anal Chem* 57 (1985) 406-411.
  19. Alcock, N., A hydrogen-peroxide digestion system for tissue trace-metal analysis, *Biol Trace Elem Res* 13 (1987) 363-370.
  20. UltraWAVE Microwave Digestion System Technical Specifications, Helping Chemists - UltraWAVE Transforming Microwave Digestion, Milestone.
  21. Todoli, J. L., Gras, L., Hernandis, V., Mora, J., Elemental matrix effects in ICP-AES, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 142-169.
  22. Mermet, J. M., Is it still possible, necessary and beneficial to perform research in ICP-atomic emission spectrometry?, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005) 11-16.
  23. Matusiewicz, H., Wet digestion methods, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2003, pp. 193-233.

24. Osepchuk, J. M., A History of Microwave Heating Applications, *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 32 (1984) 1200-1224.
25. Abu-Samra, A., Morris, J. S., Koirtyohann, S. R., Wet ashing of some biological samples in a microwave oven, *Anal Chem* 47 (1975) 1475-1477.
26. Chen, P.-K., Rosana, M. R., Dudley, G. B., Stiegman, A. E., Parameters Affecting the Microwave-Specific Acceleration of a Chemical Reaction, *The Journal of Organic Chemistry* 79 (2014) 7425-7436.
27. Kingston, H. M., Jassie, L. J., Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice, American Chemical Society, 1988, pp. 263.
28. Marra, F., Microwave and radio-frequency heating process for food *in Handbook of food process design* Wiley-Blackwell, 2012, pp. 1031-1056.
29. Fast, easy sample preparation, Multiwave 3000 Sample Preparation System, Perkin Elmer Anton Paar.
30. Jr., R. T. W., Kettisch, P., Kainrath, P., The high pressure asher: a high-performance sample decomposition system as an alternative to microwave-assisted digestion, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 187-192.
31. Atkins, P., Paula, J. d., Físico-Química, 8ª Edição ed., LTC, Rio de Janeiro, 2008, pp. 3-28.
32. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J., Microwave assisted organic synthesis—a review, *Tetrahedron* 57 (2001) 9225-9283.
33. Saxena, V., Chandra, U., Microwave synthesis: a physical concept, INTECH Open Access Publisher, 2011, pp.
34. Peter Atkins, J. d. P., Transformações físicas de substâncias puras, 2008, pp.
35. Great results begin with good preparation - Titan MPS Microwave Sample Preparation System, [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com).
36. ETHOS UP High performance microwave digestion system - Milestone Helping Chemists, [www.milestonesrl.com](http://www.milestonesrl.com).
37. Sample Preparation - Clear solutions in sample preparation / Product range, [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com).
38. Knapp, G., Maichin, B., Baumgartner, U., Interferences in ICP-OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 220-222.
39. Matusiewicz, H., Chapter 3 - Systems for Microwave-Assisted Wet Digestion A2 - Flores, Érico Marlon de Moraes, Microwave-Assisted Sample

- Preparation for Trace Element Analysis, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 77-98.
40. CEM - MDS-81D Microwave digestion system. Instrument Database; Disponível em: <http://www.speciation.net/Database/Instruments/CEM/MDS81-D-Microwave-digestion-system-;i3103> Acessado em: cited 2016 15 de maio.
  41. Nóbrega, J. A., Pirola, C., Fialho, L. L., Rota, G., de Campos Jordão, C. E. K. M. A., Pollo, F., Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become?, *Talanta* 98 (2012) 272-276.
  42. Müller, E. I., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Korn, M. d. G. A., Flores, É. M. M., Chapter 4 - Wet Digestion Using Microwave Heating, *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 99-142.
  43. Prichard, E., MacKay, G. M., Points, J., *Inorganic Analytes: Sample Preparation*, E. Prichard, J. Points, G. M. Mackay (Eds.) *Trace Analysis : A Structured Approach to Obtaining Reliable Results*, Royal Chemical Society, 2006, pp. 61-94.
  44. Townshend, A., Jackwerth, E., Precipitation of major constituents for trace preconcentration: potential and problems, *Pure and applied chemistry* 61 (1989) 1643-1656.
  45. Greenfield, S., McGeachin, H. M., Smith, P. B., Nebulization effects with acid solutions in i.c.p. spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 84 (1976) 67-78.
  46. Fernández, A., Murillo, M., Carrión, N., Mermet, J.-M., Influence of operating conditions on the effects of acids in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 217-221.
  47. May, T. W., Wiedmeyer, R. H., A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *atomic spectroscopy-norwalk connecticut- 19* (1998) 150-155.
  48. Tan, S., Horlick, G., Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry, *Applied Spectroscopy* 40 (1986) 445-460.
  49. Miller, R. O., Kalra, Y., Nitric-perchloric acid wet digestion in an open vessel, *Handbook of reference methods for plant analysis* (1998) 57-61.
  50. Krug, F. J., Junior, D. S., *Erros Sistemáticos no Preparo de Amostras*, Piracicaba, 2008, pp. 13-58.
  51. Decomposing Hydrogen Peroxide. Education in Chemistry; Disponível em: <http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2007May/ExhibitionChemistry.asp> Acessado em: cited 2016 20 de maio.

52. Glaze, W. H., Kang, J.-W., Chapin, D. H., The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation, (1987).
53. Walter, P. J., Chalk, S., Kingston, H. M. S., Overview of Microwave-Assisted Sample Preparation, H. M. S. Kingston, S. J. Haswell (Eds.) Microwave-Enhanced Chemistry, American Chemical Society, 1999, pp. 55-218.
54. Schumb, W., Stabilization of Concentrated Solutions of Hydrogen Peroxide, *Industrial & Engineering Chemistry* 49 (1957) 1759-1762.
55. Denbsky, G., Schnelle und nahezu verlustfreie Naßveraschung biologischen Materials mit Wasserstoffperoxid unter Anwendung hoher Temperaturen und Drucke, *Z. Anal. Chem.* 267 (1973) 350-355.
56. Denbsky, G., Rapid wet-ashing of biogenous fats, oils, waxes and food-stuffs of high lipid content using hydrogen peroxide under high temperature and pressure, *Z. Anal. Chem.* 277 (1975) 375-375.
57. Zepp, R. G., Faust, B. C., Hoigne, J., Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction, *Environmental Science & Technology* 26 (1992) 313-319.
58. Gardner, H., Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (1979) 220-229.
59. Arts, S., Mombarg, E. J., Bekkum, H., Sheldon, R. A., Hydrogen peroxide and oxygen in catalytic oxidation of carbohydrates and related compounds, *Synthesis* 1997 (1997) 597-613.
60. Pullanikat, P., Jung, S. J., Yoo, K. S., Jung, K. W., Oxidative degradation of reducing carbohydrates to ammonium formate with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub>OH, *Tetrahedron letters* 51 (2010) 6192-6194.
61. Luo, D., Smith, S. W., Anderson, B. D., Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution, *Journal of pharmaceutical sciences* 94 (2005) 304-316.
62. Oxidation, Chemical Reagents for Protein Modification, Fourth Edition, CRC Press, 2014, pp. 161-184.
63. Min, D. B., Boff, J. M., Lipid Oxidation of Edible Oil, C. C. Akoh, D. B. Min (Eds.) Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marcel Dekker, 2007, pp. 331-363.
64. Machat, J., Otruba, V., Kanicky, V., Spectral and non-spectral interferences in the determination of selenium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1096-1102.



65. Grindlay, G., Gras, L., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M. T. C., Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 234-243.
66. Vanhoe, H., Goossens, J., Moens, L., Dams, R., Spectral interferences encountered in the analysis of biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.
67. Muller, A. L. H., Oliveira, J. S. S., Mello, P. A., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements, *Talanta* 136 (2015) 161-169.
68. Fernandez, A., Murillo, M., Carrion, N., Mermet, J.-M., Influence of operating conditions on the effects of acids in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 217-221.
69. Gouveia, S. T., Silva, F. V., Costa, L. c. M., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Analytica Chimica Acta* 445 (2001) 269-275.
70. Reid, H. J., Greenfield, S., Edmonds, T. E., Investigation of decomposition products of microwave digestion of food samples, *Analyst* 120 (1995) 1543-1548.
71. Muller, C. C., Muller, A. L. H., Pirola, C., Duarte, F. A., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP-OES, *Microchemical Journal* 116 (2014) 255-260.
72. E. Levine, K., D. Batchelor, J., B. Rhoades Jr, C., T. Jones, B., Evaluation of a high-pressure, high-temperature microwave digestion system, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 49-59.
73. Wiltzsche, H., Winkler, M., Tirk, P., Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 2223-2234.
74. Krushevska, A., Barnes, R. M., Amarasiriwaradana, C. J., Foner, H., Martines, L., Comparison of sample decomposition procedures for the determination of zinc in milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7 (1992) 851-858.
75. Knapp, G., Schramel, P., Sources of analyte contamination and loss during the analytical process, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2003, pp. 23-45.

## Referências

---

76. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, T. F. S. Authority (Ed.), Irland, 2006.
77. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (codex stan 193-1995), C. Alimentarius (Ed.), 2009, pp. 31-36.
78. U.S. Food and Drug Administration (FDA) - Metals. Food; Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Metals/default.htm>  
Acessado em: cited 2016.