

tratada convenientemente. O método de preparação utilizado dependerá do tipo de amostra. O método de preparação deve ser adequado ao tipo de amostra.

VIII Encontro Nacional sobre Métodos dos Laboratórios da Embrapa

Aspectos importantes relacionados à coleta de amostras

Tema:

**Novas Perspectivas para
os laboratórios da Embrapa:
Sistema da Qualidade e
Certificação pela ISO 9001-2000**

2003.00201

4 a 7 de novembro de 2003



**Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente**

**VIII Encontro Nacional sobre Métodos dos Laboratórios da
Embrapa**

Editores

**Melissa Sitton
Meire C. da Silva Ferrari
Myrian S. T. A. dos Santos
Ariovaldo Luchiari Junior**

Jaguariúna, SP - 2003

Revisão

Maria Amélia de Toledo Leme
Victor P. Marques Simão

Projeto Gráfico

Oz Produtora

Encontro Nacional sobre Métodos dos Laboratórios da Embrapa (8.:2003 :
Jaguariúna, SP).

Novas perspectivas para os laboratórios da Embrapa:

Sistema da Qualidade e certificação pela ISO 9001-2002 / editado por
Melissa Sitton; Meire C. da Silva Ferrari; Myrian S.T.A. dos Santos e
Ariovaldo Luchiari Junior.

Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2003.

1 - CD-ROM

ISBN 85-85771-31-3

1. Laboratórios – Métodos e técnicas. I. Título.

CDD 371.382

PREPARO DE AMOSTRAS

Ana Rita de Araujo Nogueira

Grupo de Análise Instrumental Aplicada - Embrapa Pecuária
Sudeste, São Carlos, SP anarita@cnpse.embrapa.br

Resumo

Este texto é um resumo do mini-curso apresentado durante o VIII Encontro sobre Metodologias da Embrapa, organizado pela Embrapa Meio Ambiente. A apresentação teve como objetivo uma introdução aos principais aspectos voltados aos cuidados que devem ser tomados para uma boa representatividade da amostra, envolvendo a coleta, a moagem, o armazenamento e a amostragem. Também foram abordadas a lavagem e a desmineralização dos frascos e material que entra em contato com as amostras e as alternativas existentes para a escolha de reagentes, extrações e formas de digestão da matéria orgânica.

Palavras-chave - preparo de amostras, digestão, decomposição, microondas

Introdução

Como na maioria das áreas aplicadas, a química apresenta-se fundamental para o fornecimento de informações para a tomada de decisões na agronomia. É com o uso de resultados químicos que é possível se conhecer o grau de carência ou excesso de nutrientes em um solo e a necessidade de adubação e calagem (para a correção do pH do solo). A quantidade e o tipo de fertilizante necessário variam segundo o cultivo, a época e a evolução deste. A escolha, a quantidade e a frequência de aplicação do fertilizante dependem principalmente de parâmetros decorrentes da observação direta do cultivo, da análise do solo e da análise foliar. A determinação dos elementos essenciais, do pH e da condutividade, por exemplo, fornecem informações sobre as carências inerentes ao cultivo e ajudam a decidir, sobretudo, o tipo e a composição dos corretivos a serem aplicados.

Os dados relacionando os teores de minerais ou dos constituintes proteicos nas plantas, solos e alimentos são cada vez mais requisitados e um correto procedimento de coleta e preparo dessas amostras permitem uma avaliação eficiente, que irá direcionar os recursos financeiros e ambientais com segurança.

Este curso abordou as etapas de coleta e preparo das amostras, que se apresentam como as mais demoradas, onde são gastos os maiores recursos e onde também se cometem os maiores erros. Foi preparado com base em texto publicado pela Embrapa sobre coleta e preparo de amostras, em material produzido pelos Profs. Francisco Krug, Gunter Knapp e Harold Barnes para o III Workshop sobre preparo de amostras, realizado em São

Carlos, SP em 10/2000, em palestras apresentadas pelo Grupo de Análise Instrumental Aplicada - GAIA durante Encontro sobre preparo de amostras," realizado em São Carlos , SP em 04/2003 e em livro publicado pelos Prof. Kingston & Haswell, de 1997, sobre decomposições assistidas por microondas, além da descrição de discussões surgidas nas reuniões de grupo (GAIA- <http://www.dq.ufscar.br/Labs/gaia>) e em algumas experiências pessoais e resultados recentes da literatura.

Aproveito para agradecer aos organizadores do VIII Encontro Sobre Métodos de Análise da Embrapa pelo convite, parabenizando-os pela organização e empenho e desejando que todos tenham tido uma semana bastante produtiva, com o aumento dos horizontes profissionais e pessoais.

Coleta de amostras de solo, água e tecidos vegetais

Além da escolha conveniente do método analítico e estudo dos possíveis interferentes, torna-se essencial boa amostragem, preparação e solubilização da amostra para análise. Qualquer que se seja o tipo de amostra, erros significativos poderão ser introduzidos se a etapa de preparação não for satisfatoriamente conduzida.

A amostragem é a primeira fase da análise. É preciso haver integração entre os responsáveis pela coleta e o laboratório, buscando-se sincronismo entre a remessa de amostras e a capacidade do laboratório em executar as determinações.

Em alguns casos é necessário reduzir consideravelmente a dimensão da amostra antes que ela seja introduzida no sistema analítico e possa ser

b.3 em um sistema dinâmico

c) Fusão

Dissolução após fusão da amostra com fundente apropriado (envolvendo mudanças químicas)

O desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostras que resulte em uma completa solubilização, na retenção de elementos voláteis, redução das contaminações do frasco e da atmosfera, baixos valores de branco dos reagentes e rapidez é um dos pontos mais fracos de uma análise química. Atualmente, uma técnica de preparo de amostra que seja universal não existe. Devem ser observados, prioritariamente, os requerimentos do elemento a ser determinado e da amostra (HOENIG, 2001).

Via Seca

A decomposição por via seca é provavelmente o mais simples de todos os tipos de decomposição. Envolve o aquecimento da amostra em um forno tipo mufla na presença de ar a 400-800°C, permitindo a destruição da matéria orgânica. Após a decomposição, o resíduo é dissolvido em ácido e transferido para um frasco volumétrico antes da análise. Esta técnica é interessante em função da possibilidade de ser empregado um grande volume de amostra, para posteriormente ser dissolvido em pequeno volume de ácido antes da determinação, o que diminui a diluição e permite determinação de elementos presentes em baixas concentrações. Outras vantagens são a não necessidade de emprego de reagentes e o baixo tempo de atenção exigido do operador. No entanto, o método pode também levar a

perdas de elementos voláteis, como Hg, B, Pb, Zn, Cd, Ca, In, Te, As, Sb, Fe, Cr e Cu. Apesar de haver a possibilidade de adição de compostos que visem retardar as perdas desses elementos, existem outros inconvenientes para essa técnica, que por isso não vem sendo utilizada com muita frequência:

- necessidade de muito tempo para a queima de alguns materiais
- alto gasto de energia
- dificuldade na dissolução dos materiais após a queima
- contaminação.

Fusão

Algumas substâncias, tais como silicatos ou óxidos, não são normalmente destruídas pela ação de um ácido. Nessa situação, técnica alternativa é exigida. A fusão envolve a adição de um excesso de reagente (variando de 1:2 a 1:50) sobre a amostra finamente moída, colocada em um cadinho de platina ou grafite (em alguns casos de níquel ou zircônio), seguindo-se por aquecimento em forno mufla (300 – 1200 °C). Após aquecimento por um dado período de tempo (de alguns minutos a várias horas), um mineral original ou fases refratárias são convertidas em formas sólidas diferentes que são facilmente dissolvidas em ácidos, bases ou em água. Os reagentes normalmente empregados incluem carbonato de sódio (800 °C, dissolvido com HCl), meta ou tetraborato de Li (aquecimento a 900-1000 °C, dissolvido com HF), e pirossulfato de K (aquecimento a 900 °C, dissolvido em H₂SO₄). A adição do excesso de reagentes leva a um alto risco de contaminação. Além disso, as altas temperaturas empregadas aumentam

o perigo de perdas por volatilização e os altos teores salinos da solução final podem apresentar problemas na nebulização das amostras durante as análises. Cuidados devem ser tomados quando se utilizam técnicas tais como espectrometria ótica de emissão com plasma acoplado (ICP-OES). Dependendo do material do cadinho, podem ocorrer interferências espectrais (cadinho de Ni – As, Cr, La, Pb e Zr; cadinho de Zr – As, Ba, Ca, Cr, La, Pb e V; fusão com LiBO_2 em cadinho de Pt – Cr). Essas desvantagens restringem o emprego da fusão para a determinação de elementos em faixas extremamente baixas, no entanto para a determinação de maiores, menores e mesmo alguns elementos traço em alguns tipos de matrizes, tais como algumas ligas metálicas, minérios, cerâmica, silicatos e cimentos, resultados satisfatórios podem ser obtidos, pois os eletrólitos inorgânicos fundidos são solventes muito poderosos, que, em altas temperaturas, agem como um ácido ou base de Lewis (KRUG et al., 2000).

Via úmida

Os ácidos mais comumente empregados são (KINGSTON & JASSIE, 1988, KRUG et al., 2000):

- a) Nítrico (HNO_3), ponto de ebulição – 122 °C – agente oxidante mais utilizado na digestão de amostras orgânicas, libera os elementos na forma de nitratos solúveis e é normalmente comercializado em forma bastante pura, a 65 – 69% (> 69 %, HNO_3 fumegante). Em concentrações inferiores a 2,0 mol l⁻¹ apresenta-se como pobre oxidante. No entanto, quando combinado com ácidos complementares, principalmente HCl, com H_2O_2 , ou pelo aumento da pressão e da temperatura, ocorre um grande

aumento do poder oxidante. Bastante empregado na dissolução de metais, ligas e materiais biológicos. Não dissolve Au e Pt, e alguns metais são passivados, sendo no entanto facilmente dissolvidos em HNO_3 diluído e quando combinado com outros ácidos. É compatível com as técnicas por ICP.

- b) Clorídrico (HCl), ponto de ebulição, 110 °C, comercializado com alto grau de pureza a 36 – 38% (11,6 a 12,4 mol l⁻¹). Apesar de ser um ácido forte, não possui propriedades oxidantes e reage com a maioria dos cátions metálicos de transição, formando complexos bastante fortes com Au, Tl e Hg e mais fracos com Fe, Ga, In e Sn. Os cloretos metálicos são solúveis em água, exceto Hg_2Cl_2 e AgCl . É empregado na dissolução de metais e ligas, sais de carbonatos, fosfatos, alguns óxidos e alguns sulfatos. Quando em misturas com HNO_3 (água régia), empregado na dissolução de materiais geológicos e amostras ambientais. Não é normalmente empregado para dissolução de matéria orgânica. Quando em concentrações baixas de HCl , adequado para uso com ICP-OES, mas inadequado para ICP-MS (Cl).
- c) Sulfúrico (H_2SO_4), ponto de ebulição 338 °C, comercializado como 98%, apresenta o ponto de ebulição mais alto entre os ácidos minerais concentrados mais comuns. Útil para o desprendimento de produtos voláteis, apresenta boas propriedades desidratantes (reduz-se para SO_2 , S^0 e H_2S) e oxidantes para ligas, metais, óxidos, hidróxidos e sulfatos insolúveis, e é frequentemente empregado combinado com HNO_3 , elevando o ponto de ebulição da mistura, além de agilizar o processo de oxidação, agindo como oxidante inicial das misturas ácidas. Também usado para remoção de HF e/ou solubilização dos fluorcomplexos Metais

em estado de oxidação mais elevado, como Cr^{3+} , Al^{3+} e terras raras, podem formar sulfatos duplos com sulfato de potásio, de difícil solubilização. Por outro lado, os sulfatos de metais apresentam baixa volatilidade, o que impede perdas por volatilização **Cuidado:** H_2SO_4 não deve nunca ser empregado em frascos de PTFE (ponto de fusão desses frascos = 327 °C, se deformando a partir de 260 °C), além de apresentar problemas de transporte em ICP durante a nebulização devido à alta viscosidade.

- d) Perclórico (HClO_4), ponto de ebulição 203 °C, comercializado a 60 - 72% (nunca se deve utilizar em concentrações superiores) – a altas temperaturas, é um forte agente oxidante para matéria orgânica, apresenta baixo poder complexante. Quando utilizado isoladamente, torna-se perigoso devido ao risco iminente de explosão, pela formação de percloratos instáveis. **Cuidado:** quando se trabalha com esse tipo de ácido, as amostras contendo hidroxilas são normalmente pré-tratadas com HNO_3 antes da adição de HClO_4 .
- e) Fluorídrico – HF, ponto de ebulição 112 °C, ácido fraco, não oxidante, comercializado entre 38 – 48%, é empregado para a dissolução de silicatos, pois o F^- é um poderoso ânion complexante, reage com os elementos que forma óxidos refratários difíceis de serem dissolvidos. Necessidade da adição de ácido bórico para mascarar o HF e dissolver os fluoretos precipitados. Há perdas de Si como SiF_6 após aquecimento e requer a complexação do F livre com H_3BO_3 . Também não se deve usar vidraria (borossilicatos, atacados pelo HF) e tomar bastante cuidado com o contato com a pele (em caso de queimadura, como primeiro socorro deve-se usar gel de gluconato de cálcio).

Na prática, a maioria dos métodos de dissolução de amostras inorgânicas é realizada com o emprego de 2 ou 3 ácidos, pois diferentes propriedades úteis podem ser combinadas (ex.: 1 ácido oxidante e 1 ácido complexante); 2 ácidos podem reagir, formando produtos com maior reatividade do que qualquer um deles separadamente; uma propriedade indesejável de um determinado ácido pode ser moderada pela presença de outro ácido e a amostra pode ser dissolvida com um ácido que a seguir pode ser separado da mistura por um outro ácido ($\text{HF} + \text{H}_2\text{SO}_4$)

Ex:

Nítrico/clorídrico – uma mistura 1:3 de HNO_3 : HCl , conhecida como “Água régia”, forma um intermediário reativo, NOCl . Esta mistura é bastante empregada para dissolução de ligas metálicas e silicatos, sendo bastante conhecida devido a sua habilidade em dissolver Au, Pt e Pd.

Alternativas para aquecimento empregando via úmida

Dentre os métodos a altas temperaturas empregados em via úmida destacam-se o aquecimento por convecção (blocos digestores, chama ou fornos convencionais) e por microondas, normalmente empregando ácidos minerais oxidantes e peróxido de hidrogênio. Métodos em via úmida a baixas temperaturas também são empregados, como método de Fenton (formação de radical a partir da reação entre Fe^{2+} e H_2O_2), métodos enzimáticos, decomposição com surfactantes e irradiação por ultravioleta.

As microondas são ondas eletromagnéticas que cobrem uma faixa de frequência do espectro eletromagnético que varia de 300 a 300.000 MHz. Quando um material não transparente à microondas absorve este tipo de

radiação, o material pode sofrer um aumento considerável na sua temperatura, devido, principalmente, à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando *migração iônica* e *rotação de dipolos*. A ocorrência deste dois processos, que ocorrem quando as microondas interagem com a solução de um ácido (ou mistura de ácidos) usado para a digestão da amostra de interesse, resulta em um movimento molecular no material, que também contribui para o aquecimento do mesmo KINGSTON & JASSIE, 1988).

Os fornos microondas são constituídos basicamente de um gerador de microondas, um guia de ondas, uma cavidade ressonante, uma fonte, um sensor e um controlador. Atualmente existem no mercado sistemas fechados, os chamados sistemas de digestão tipo cavidade e o sistema com microondas focalizadas, que trabalha com frascos abertos a pressões próximas à ambiente.

A escolha do melhor forno de microondas deve levar em consideração os frascos de digestão oferecidos (desenho, capacidade, durabilidade e custo), os sensores de temperatura e de pressão (custo, durabilidade e tempo de resposta), os programas para o controle e aquisição de dados, a opção para secagem dos digeridos e os dispositivos de segurança.

Os fornos de microondas com cavidade, por operarem com recipientes fechados apresentam como potencialidades (KINGSTON & HASWELL, 1997):

- maior eficiência na dissolução em altas temperaturas
- possibilidade de utilização de somente ácido nítrico para a decomposição da amostra
- reduzido risco de perdas de analitos por volatilização
- risco reduzido de contaminações devidas ao ambiente de trabalho

- menor consumo de reagentes de alta pureza

Porém, devem ser observadas as seguintes limitações:

- as massas de amostras devem ser reduzidas (< 1 g inorg. e $< 0,5$ g org), devido à possibilidade de aumento da pressão interna gerada pelos produtos gasosos nas reações de decomposição (principalmente amostras cujos produtos gasosos são CO_x e NO_x)
- atenção deve ser dada quanto à homogeneidade das amostras, para evitar diferenças entre os frascos durante a decomposição.
- a decomposição de ligas metálicas e metais pode gerar H_2 , o que aumenta o risco de explosão
- necessidade de resfriamento e despressurização dos frascos para adição de reagentes durante o ciclo de aquecimento.

Aplicações típicas de um forno de microondas com radiação focalizada

O emprego de microondas com radiação focalizada é interessante do ponto de vista de segurança, pois opera a pressão ambiente, permite a adição seqüencial de reagentes, podem ser usados frascos de PTFE, vidro ou quartzo, possibilidade de uso de H_2SO_4 , devido à altas temperaturas, permite o emprego de massas de até 10 g de amostra. Porém, podem ocorrer perdas por volatilização de alguns elementos (NÓREGA et al., 2002).

Frascos utilizados em microondas

Em sistemas abertos, podem ser empregados frascos de vidro tipo

Pyrex." Em sistemas fechados, deve-se observar que as temperaturas a serem atingidas durante a digestão estarão limitadas pelo tipo de frasco utilizado, além da resistência química, capacidade para extrusão (termoplasticidade), capacidade para usinagem, densidade e transparência à microondas (no aquecimento por microondas). Frascos construídos em PTFE (politetrafluoretileno – Teflon®) podem apresentar problemas de contaminação (efeito de memória) e PFA (perfluoralkoxi) – fluorplástico processável, apresentam limitação da temperatura (máximo 260°C). No entanto, apresentam diversas vantagens na dissolução da amostra, como aceleração da digestão, possibilidade de uso de HF ou água régia sem problemas, dissolução das amostras sem perdas por volatilização, diminuição dos valores do branco, devido à diminuições das contaminações. Frascos de quartzo são utilizados quando altas temperaturas são necessárias (KINGSTON & HASWELL, 1997).

Diferenças básicas entre fornos de microondas de uso doméstico e de uso laboratorial

A principal característica são os aspectos relacionados à segurança, de forma a que não haja possibilidade de vazamento de radiação. Se uma possível explosão ocorrer, a porta é fabricada de maneira a amortecer essa explosão e resistir ao impacto.

Preparo de Amostras Agronômicas

Normalmente uma grande variabilidade de amostras orgânicas, como plantas, frutos e solos, além dos adubos e fertilizantes são considerados como materiais agronômicos. O desenvolvimento de técnicas de preservação também vêm promovendo a necessidade de um aumento do controle das amostras de silagem, envolvendo técnicas de fermentação, desaeração etc. Os subprodutos de origem animal, como leite e tecidos animais também devem aqui ser considerados.

Nas amostras de tecido vegetal, dentre as análises referentes à qualidade nutricional, como proteína, fibra, digestibilidade e gordura, normalmente são determinados os macro constituintes, como N, Ca, Mg, P, S e K e os micro constituintes, como Cu, Fe, Mn, Zn e Co. Outros metais que podem vir a ser tóxicos, como Cd e Pb também são freqüentemente solicitados.

Amostras de Solos

Para fins de fertilidade, normalmente são feitas extrações com soluções salinas (e.g. $1,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$), quelatos orgânicos (e.g. DTPA), ácidos diluídos (e.g. solução de Melich - $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$), água (e.g. extração de B com água quente) ou resinas trocadoras de íons (e.g. Amberlite). Em todos os métodos, o propósito final é uma simulação do que ocorre no solo, na tentativa de serem determinados os elementos realmente disponíveis à plantas, que estariam presentes na dupla camada externa do solo. Para a obtenção de resultados que possam ser comparados, uma homogeneidade dos resultados é obtida com a padronização dos procedimentos a partir de

protocolos bastante específicos. No Brasil existem diversos programas colaborativos que se dedicam ao estabelecimento e avaliação desses protocolos, sendo que no estado de São Paulo o Instituto Agrônomo de Campinas coordena programa que reúne cerca de 150 laboratórios. Outros programas importantes são os coordenados pela Embrapa Solos (Rio de Janeiro) e ROLAS (Rio Grande do Sul).

Por outro lado, para a obtenção de teores totais de analitos em amostras de solo, necessitam quando se deseja conhecer as características minerais, digestões empregando HF são necessárias, para a quebra dos compostos silicatados. Nesse caso, ocorrem perdas do Si como SiF_6 e o uso de HF durante o preparo deve ser precedido dos cuidados no manuseio desse ácido. Durante as determinações, deve-se atentar para a não existência de resíduos de HF, pois dependendo da técnica de determinação utilizada cuidados especiais deverão ser tomados para se evitar ataques a materiais que contenham silício (vidro ou quartzo). A complexação do F livre deve ser feita com a adição de H_3BO_3 . Alternativa para determinações totais dos elementos em solos, para fins ambientais, é o uso de extração empregando água régia (HOENIG & KERSABIEC, 1996; HOENIG, 2001).

Independente da técnica de extração, a técnica de detecção utilizada depende das condições do laboratório, não havendo restrições, desde que esteja sendo empregada de maneira correta. Quando as determinações são feitas em ICP, deve-se sempre observar os limites de detecção e quantificação, os possíveis problemas de nebulização devido à diferenças de viscosidade e tensão superficial entre as amostras e as soluções analíticas, além de possíveis interferências espectrais e de ionização, recomendando-se o uso de padrão interno.

Preparo de amostras.
2003 SP-PP-2003.00201



CPPSE-15297-1