

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE REAÇÃO PRESENTES EM SOLUÇÕES  
RESULTANTES DE DIGESTÕES ÁCIDAS DE AMOSTRAS AGRONÔMICAS**

**Mario Henrique Gonzalez**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Química Analítica

**Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira**

\* Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2007

A teoria é que todo mundo tem 100 pontos.  
100 é a soma dos pontos das características que você tem.  
Por exemplo: 8 em alegria, 7 em disciplina, 10 em inteligência, e assim por  
diante.

Se você tem menos pontos no item experiência, é porque deve ter mais  
pontos no item capacidade de se surpreender. Se você tem menos no  
quesito falar, com certeza vai ter mais no quesito ouvir. E por ai vai.

É isso que faz a sua personalidade ser única e especial. E é isso que faz  
todas as pessoas ter a sua beleza própria.  
Segundo os direitos humanos, todo mundo é igual. Só que na verdade, todo  
mundo é também muito diferente.

Mas todo mundo tem 100 pontos.  
(autor desconhecido)

Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a  
tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para  
esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os  
obstáculos para a abrir as janelas da inteligência. (Augusto Cury)



# *DEDICATÓRIA*

Dedico esse trabalho a meus pais Alzira e João, pelo esforço e dedicação durante toda minha vida. Um agradecimento especial pela realização de um sonho construído junto com vocês.

Aos meus queridos irmãos Camila, Renato e Joana e as minhas princesas Bianca e Vitória e ao grande Rafa, (. . . tá quase nascendo), pela oportunidade da convivência. Esse é um fruto do nosso trabalho. Amo todos vocês.

# *AGRADECIMIENTOS*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela existência, possibilidade de realizar esse trabalho e por colocar pessoas tão especiais a meu lado durante a minha vida acadêmica.

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pela amizade, orientação durante minha estadia na Embrapa, pelos ensinamentos, pela ética na realização de pesquisas e por sua pessoa maravilhosa. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, pela amizade, pela presteza nas discussões durante o desenvolvimento do trabalho, pelas idéias, sugestões e pela disponibilidade em sempre me atender.

À Dra. Lucimara Forato da Embrapa Instrumentação Agropecuária pela amizade, ajuda na realização das análises e discussões dos espectros de RMN.

À Dra. Regina V. Oliveira do Departamento de Química da UFSCar, pela amizade, disponibilidade, explicações didáticas e discussões indispensáveis durante as análises de HPLC.

Ao amigo Ms. Gilberto Batista de Souza, pela amizade, por ter acreditado em mim desde o início de minha vida científica, discussões e idéias. Um verdadeiro amigo e perfeito inovador e empreendedor.

A minha querida amiga Sônia Borges e a minha “mãe” Lourdes Sumi, que sempre me acolheram com muito carinho na Embrapa Pecuária Sudeste e mostraram o verdadeiro sentido da amizade.

À Dra. Elma N. V. Carrilho e à Dra. Geórgia C. Labuto, pela amizade, pelas idéias iniciais e pelas discussões construtivas durante o desenvolver desse trabalho.

A todos os amigos, atuais e ex-integrantes do GAIA, alguns separados apenas pela distância, pelas horas de convívio, pelo aprendizado, pelo trabalho em grupo, pelos diversos cafés e almoços e principalmente pelas nossas festas e viagens. Amo todos os integrantes e “ex-integrantes” dessa maravilhosa família.

Aos meus grandes e inseparáveis amigos Edgar e Reginaldo, pela fantástica amizade, carinho, baladas, e indiscutíveis 9 anos de grande convivência.

Ao “senhor” Luciano, pela amizade, carinho, ajudas finais e convívio.



As minhas queridas amigas do teatro, em especial à Márcia pela grande amizade e presença em todos os momentos e a minha “estrela”, Drica Geribello, por todas as alegrias e fraterna convivência.

A todos os técnicos e funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, aos estagiários e pessoal de campo.

As secretárias de Pós-Graduação do IQSC e as funcionárias da Biblioteca pela gentileza e educação no atendimento.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida.

À Embrapa Pecuária Sudeste pela infra-estrutura e recursos na realização deste e de tantos outros trabalhos.

À FAPESP pela bolsa concedida.

**Obrigado a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.....meus sinceros agradecimentos e que todos possam receber em dobro o bem e ajuda que me foram oferecidos.**

**ÍNDICE**

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Preparo de Amostras Empregando Radiação Microondas com Ácidos Diluídos.....	5
2.2. Investigação da Composição Química das Amostras.....	10
2.3. Análise Quimiométrica.....	12
2.3.1. Pré-processamento dos dados.....	13
2.3.2. Reconhecimento de Padrões.....	13
2.4. Investigação dos Principais Produtos de Reação Obtidos Após Decomposição Ácida Empregando Radiação Microondas.....	15
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
4.1. Reagentes e Soluções.....	21
4.2. Instrumentação.....	22
4.3. Amostras e padrão de referência certificado.....	23
4.4. Procedimento Experimental.....	23
4.4.1. Análise Elementar (C,H,N e S).....	23
4.4.2. Análise de Proteína Bruta (PB) e Extrato Etéreo (EE).....	23

4.4.3. Preparo de Amostras Empregando Radiação Microondas com Ácidos Diluídos.....	24
4.4.4. Determinação dos minerais e teores de carbono residual.....	25
4.4.5. Caracterização inicial dos digeridos por RMN <sup>1</sup> H.....	27
4.4.5.1. Preparo das Amostras para obtenção dos espectros.....	27
4.4.6. Separação dos compostos por HPLC.....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>30</b>
5.1. Análise da Composição Química das Amostras.....	30
5.1.1 Análise Elementar (C,H,N e S).....	30
5.1.2. Análise de Proteína Bruta (PB) e Extrato Etéreo (EE).....	30
5.2 Avaliação do Procedimento de Decomposição por Microondas.....	31
5.3. Carbono Residual.....	34
5.4. Recuperação de Minerais.....	36
5.4.1 Análise quimiométrica.....	38
5.4.2 Análise da exatidão e precisão das decomposições ácidas.....	41
5.5. Caracterização inicial dos digeridos por RMN <sup>1</sup> H.....	43
5.5.1 Músculo Bovino.....	44
5.5.2 Sangue Bovino.....	46
5.5.3 Vísceras Bovina.....	47
5.5.4 Soja em Grãos.....	49
5.5.5 Paspalum.....	51
5.6 Separação dos Isômeros de NBA's e Análise das Amostras.....	52
5.6.1 Separação dos Isômeros de NBA's nas Amostras de Músculo e Sangue Bovino.....	54

## ÍNDICE

---

5.6.2 Separação dos Isômeros de NBA's nas Amostras de Vísceras Bovina e Soja em grãos.....	<b>56</b>
5.6.3 Separação dos Isômeros de NBA's na Amostra de Paspalum.....	<b>58</b>
5.5.4 Soja em Grãos.....	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Espectro Eletromagnético<sup>3</sup>

**Figura 2.** (A) Migração Iônica e (B) Rotação de Dipolo devido a presença do campo eletromagnética oscilante<sup>7</sup>.

**Figura 3.** Moléculas: (A) ácido linoléico e (B) molécula de triglicerídeo<sup>24</sup>.

**Figura 4.** Moléculas: (A) Fenilalanina e (B) Histidina<sup>24</sup>.

**Figura 5.** Estruturas dos Isômeros do ácido nitrobenzóico<sup>44</sup>.

**Figura 6.** Seqüência de pulsos para aquisição dos espectros de RMN de hidrogênio em solução.  $T_d$  é o tempo de repetição e  $T_{ac}$  é o tempo de aquisição. A largura do pulso é  $\pi/2$ .

**Figura 7.** Procedimento experimental para extração dos NBA's nas amostras estudadas.

**Figura 8.** (%) de Carbono Orgânico Residual nos diferentes frascos, programas e com soluções de  $\text{HNO}_3$  7 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$

**Figura 9.** (%) de Carbono Orgânico Residual nos diferentes frascos, programas e com soluções de  $\text{HNO}_3$  7 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$ .

**Figura 10.** (%) de Carbono Orgânico Residual nas diferentes amostras após decomposições com  $\text{HNO}_3$  em diferentes concentrações.

**Figura 11.** Dendograma da HCA para as amostras vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

**Figura 12.** Scores para vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

**Figura 13.** *Loadings* para vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

**Figura 14.** Gráfico de bolas para amostras de músculo bovino certificado (CRM) para os macronutrientes Ca e Mg nas diferentes concentrações ácidas.

**Figura 15.** Gráfico de bolas para amostras de músculo bovino certificado (CRM) para os micronutrientes Fe e Zn nas diferentes concentrações ácidas.

**Figura 16.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H para amostras de músculo bovino decompostos em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 17.** Expansão dos espectros de RMN <sup>1</sup>H na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 18.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H para amostras de sangue bovino decompostas em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 19.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 20.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de vísceras bovina decompostas em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 21.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 22.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de hidrogênios carbinólicos para amostras de vísceras decompostos em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 23.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de soja em grãos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 24.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 25.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de Paspalum em grãos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

**Figura 26.** Cromatograma dos padrões de *o*-NBA (A), *m*-NBA (B) e *p*-NBA (C), concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Figura 27.** Cromatogramas das amostras de músculo e sangue bovino decompostos com  $\text{HNO}_3$  14, 7 e 2 mol  $\text{L}^{-1}$  nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o-NBA* (A), *m-NBA* (B) e *p-NBA* (C).

**Figura 28.** Cromatogramas das amostras de vísceras bovina e soja em grãos decompostos com 14, 7 e 2 mol  $\text{L}^{-1}$  nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o-NBA* (A), *m-NBA* (B) e *p-NBA* (C).

**Figura 29.** Cromatogramas da amostra de paspalum decomposta com  $\text{HNO}_3$  14, 7 e 2 mol  $\text{L}^{-1}$  nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o-NBA* (A), *m-NBA* (B) e *p-NBA* (C).

**Figura 30.** Cromatogramas dos brancos analíticos decomposto com  $\text{HNO}_3$  14, 7 e 2 mol  $\text{L}^{-1}$  nas condições cromatográficas descritas na tabela 4.



---

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Potência absorvida por diferentes volumes de ácidos minerais concentrados comparados com água destilada <sup>4</sup>.

**Tabela 2.** Programa de Aquecimento Utilizado no Forno Microondas.

**Tabela 3.** Parâmetros Instrumentais do ICP OES utilizado nas determinações.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas para os isômeros e amostras estudadas.

**Tabela 5.** Teores de C, H, N, e S em diferentes amostras.

**Tabela 6.** Valores de PB e EE nas diferentes amostras ( $n=3$ ).

**Tabela 7.** Programa Utilizado no forno de radiação microondas

**Tabela 8.** Concentração de minerais nas amostras decompostas com 2 mL of  $\text{HNO}_3$  com 1 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%v/v),  $n=3$ .

**Tabela 9.** Tempo de Retenção Típico dos Padrões, ( $n=6$ ).

**Tabela 10.** Tempo de Retenção Típico para as amostras de músculo e sangue Bovino, ( $n=2$ ).

**Tabela 11.** Tempo de Retenção Típico para as amostras de vísceras bovina e soja em grãos, ( $n=2$ ).

**Tabela 12.** Tempo de Retenção Típico para as amostras de paspalum, ( $n=2$ ).

## RESUMO

Entre as diferentes formas empregadas para o preparo de amostras orgânicas visando a determinação de elementos inorgânicos, uma alternativa que foi avaliada neste trabalho foi a digestão assistida por radiação microondas empregando ácidos diluídos. Estudos recentes demonstram ser essa uma alternativa eficiente no tocante à solubilização de elementos minerais para determinação por técnicas espectroscópicas. No entanto, a eficiência deste procedimento depende das características originais da amostra. Neste enfoque, a eficiência da decomposição foi avaliada, considerando-se as características originais das amostras e a caracterização dos produtos finais presentes na solução após a decomposição. Amostras de tecido vegetal (soja em grãos e *Paspalum*) e de tecido animal (sangue e vísceras de bovino), utilizando misturas oxidantes em diferentes concentrações ácidas foram digeridas em forno por radiação microondas com cavidade.

A eficiência das decomposições foi avaliada a partir da determinação dos teores de carbono orgânico residual e da recuperação de minerais. A caracterização original das amostras, realizada a partir da determinação dos teores de proteína bruta (PB), gordura (EE) e carbono original (CHN-S), foi efetuada com o intuito de correlacionar essas características com os compostos remanescentes após as digestões.

As soluções residuais foram caracterizadas inicialmente por técnica espectroscópica (RMN de  $^1\text{H}$ ) para identificar os principais compostos orgânicos remanescentes. Após os primeiros resultados, estudos para separação foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. Em seguida os produtos de reação foram, correlacionados com a composição química inicial das amostras.

**ABSTRACT**

Microwave-assisted with diluted acids is an alternative to sample preparation of organic samples owing inorganic elements solubilization for spectroscopic techniques determination. The efficiency of this procedure depends on the sample's original characteristics. In this way, the decomposition efficiency was evaluated considering the sample's original characteristics and the final products presents in the solution after decomposition. Grains of soybean and samples of forage, bovine blood, and bovine viscera were digested in cavity-microwave oven using oxidants mixtures in different acid concentrations. The decomposition efficiency was evaluated from residual organic carbon determination and mineral recovery by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. The original sample characterization was performed from crude protein amount, fatty, and original carbon. In order to identify the main remaining organic compounds, the residual solutions were firstly characterized by spectroscopy technique ( $^1\text{H}$  NMR), with the identification of typical nitro-, aliphatic- and aromatic- compounds. Studies concerning separation of nitrobenzoic acids isomers were performed by HPLC-UV, by using reversal phase chromatography with  $\text{C}_{18}$  as stationary phase and  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitrile:methanol (75:20:5) + 0.05% TFA as mobile phase. The use of diluted acids proved to be useful and recommended alternative, reducing the reagents volume and consequently the variability of the residues provided by the decomposition process. Comparing the digested solutions with the original sample composition, biological matrix with structural amino acids, proteins and lipids produced nitrobenzoic acid isomers and other organic compounds provided from the cleavage in chemical bonds.

## 1. INTRODUÇÃO

Experimentos que envolvem a quantificação de elementos inorgânicos freqüentemente necessitam de uma etapa de preparo da amostra. Todavia, essa etapa apresenta um limitado desenvolvimento e pode ser considerada a etapa mais lenta em uma metodologia analítica, não acompanhando a velocidade e a eficiência da instrumentação em análises químicas<sup>1</sup>.

No final da década de 70, a utilização da radiação microondas (MW) surgiu como uma alternativa para a decomposição de amostras por via úmida. O emprego de fornos sob radiação microondas ganhou popularidade quando foi associado à digestão ácida, reduzindo o tempo de preparo das amostras e minimizando a quantidade de reagentes e de resíduos gerados<sup>2,3</sup>. A utilização da radiação microondas em procedimentos de fusão, extração, catálise e sínteses orgânicas, também é cada vez mais estudada.

Na decomposição por via úmida, a combinação de um ou mais ácidos geralmente é utilizada. As características físicas e químicas de cada ácido são unidas para melhorar a eficiência da decomposição. Outra forma de melhorar o desempenho da decomposição é a utilização de frascos fechados sob altas pressões. O conseqüente aumento do ponto de ebulição dos ácidos, possibilita a obtenção de temperaturas mais elevadas e decomposições mais efetivas, além disso a perda de analitos voláteis é evitada.<sup>4</sup>

Frascos fechados têm sido empregados para o preparo de amostras e um grande número de publicações descreve os procedimentos experimentais, sendo os equipamentos comerciais compostos por esse tipo de frasco, dotados de diferentes dispositivos de segurança. Em relação ao emprego de diferentes ácidos para

digestão de amostra,  $\text{HNO}_3$  é freqüentemente empregado devido à simplicidade de manipulação, facilidade de purificação e sua eficiência na oxidação de compostos orgânicos de amostras biológicas <sup>1,5,6</sup>.

Porém, a eficiência da decomposição das amostras, relacionada à sua composição original e à obtenção de resultados necessita maiores investigações, com o objetivo de adequar o uso de diferentes misturas extratoras e avaliar parâmetros tais como redução de volume de reagentes e tempo de submissão à radiação microondas. Dependendo da técnica de determinação empregada, esses parâmetros podem influenciar os resultados analíticos.

Em função das características e das potencialidades do uso da radiação microondas para a decomposição de amostras, o emprego de ácidos diluídos é recomendável. Essa alternativa já se mostrou bastante efetiva na diminuição da quantidade de resíduos gerados, redução de custos, obtenção de branco e desvios padrão menores, além disso propicia digeridos mais apropriados para introdução por nebulizadores em análises espectroscópicas.

Uma análise química envolve normalmente as seguintes etapas: coleta da amostra, secagem, estocagem (acondicionamento), digestão, diluição volumétrica, remoção das partículas, determinação dos analitos de interesse e ação a ser tomada <sup>7</sup>. O procedimento a ser seguido depende da matriz da qual o soluto será isolado. Observa-se que não há continuidade após a obtenção dos resultados analíticos desejados, sendo importante considerar a etapa do tratamento dos resíduos gerados durante o desenvolvimento do método analítico.

A química exerce papel preponderante no meio ambiente. É comum atribuir às substâncias químicas os principais problemas de poluição. Mesmo entre os cientistas, ainda não existe um consenso a respeito dos níveis de concentração das

substâncias que podem oferecer efeitos adversos à saúde dos seres humanos e de outros organismos vivos. Torna-se cada vez mais clara a necessidade de estudos relacionados ao meio ambiente e ao impacto que diferentes compostos causam quando descartados sem tratamento prévio <sup>8</sup>.

Vários compostos são persistentes (muito resistentes à degradação no meio ambiente), bioacumulativos (acumulam-se nos tecidos de organismos vivos) e tóxicos. Devido à essas três características, pode-se dizer que esses compostos são poluentes problemáticos, aos quais os sistemas naturais podem estar expostos.

Conseqüentemente, a quantificação dos efeitos dos contaminantes deve ser feita. O conhecimento dos níveis de poluentes pode ajudar a traçar a origem dos contaminantes, além de permitir averiguar sua degradação no meio ambiente <sup>9</sup>.

A crescente preocupação com o desenvolvimento de uma “química limpa” tem por objetivo a minimização da produção de resíduos tóxicos, aliada à geração de resultados representativos. É necessário o conhecimento da composição dos resíduos de produtos orgânicos de origem reacional que são gerados após as decomposições químicas em meio ácido que, na maioria dos laboratórios, são descartados sem tratamento prévio. Devido ao desconhecimento da composição orgânica dos resíduos de digestão, os tratamentos convencionais limitam-se à neutralização da acidez residual e, em casos de maior vigor, realiza-se a precipitação de íons metálicos remanescentes que possuam potencial tóxico.

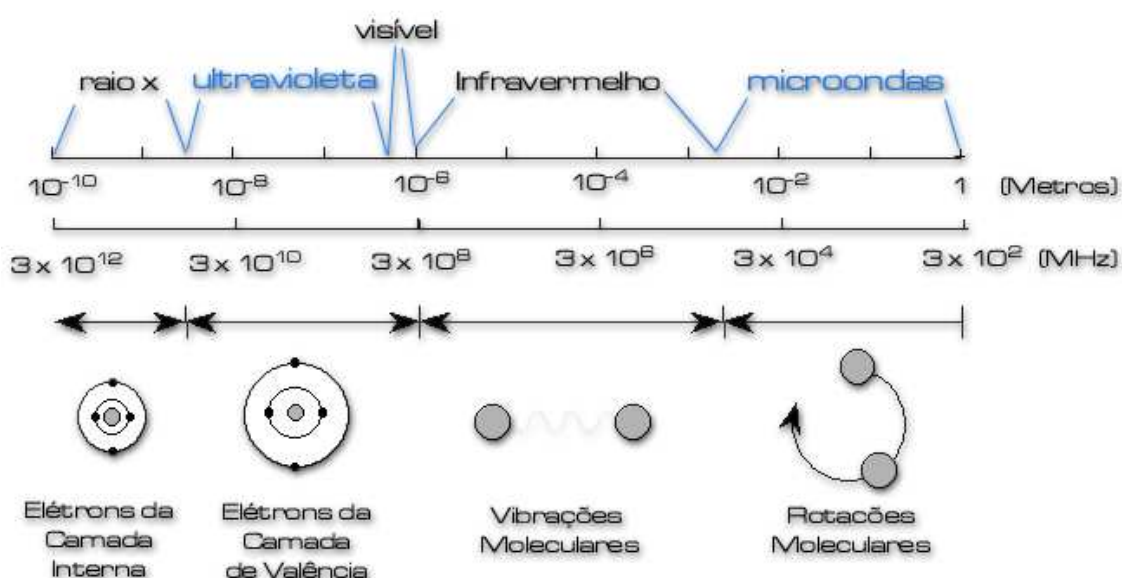
Outra importante razão para se conhecer a composição dos resíduos é a possibilidade de se fazer estudos relacionados ao preparo das amostras de maneira “mais seletiva”, sem a necessidade de se destruir totalmente o composto orgânico original.

Um grande número de trabalhos descreve o ácido nitrobenzóico e seus isômeros como os principais produtos de decomposição de matrizes biológicas quando se emprega solução de ácido nítrico à altas pressão e temperatura. Neste trabalho foi realizada uma tentativa de separação e identificação desses isômeros após digestão de tecido animal e vegetal empregando ácido nítrico diluído.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Preparo de Amostras Empregando Radiação Microondas com Ácidos Diluídos.

As microondas são ondas eletromagnéticas e, como tal, são portadoras de energia. Cobrem uma faixa de frequência do espectro eletromagnético que varia de 300 a 300.000 MHz, como mostra a figura 1.

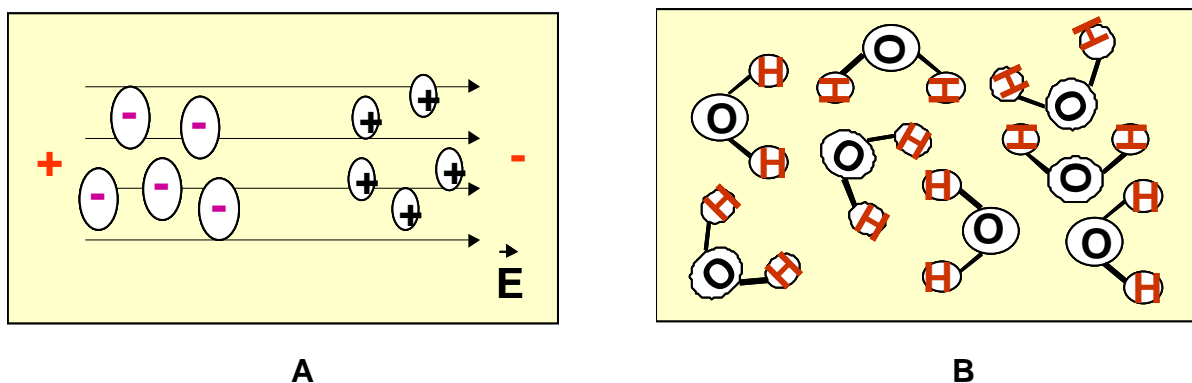


**Figura 1.** Espectro Eletromagnético<sup>3</sup>

Quando um material não transparente à radiação 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 a elevação da temperatura devido a dois principais mecanismos: migração iônica e rotação de dipolos. Esses dois



mecanismos ocorrem quando a radiação microondas interage com a solução usada para oxidação da amostra de interesse, como demonstrado na figura 2.



**Figura 2.** (A) Migração Iônica e (B) Rotação de Dipolo devido a presença do campo eletromagnética oscilante<sup>7</sup>.

A interação da radiação microondas com o solvente é um dos principais fatores responsáveis pelo aquecimento e, conseqüentemente, pelo aumento da temperatura nos frascos reacionais. A tabela 1 mostra as temperaturas obtidas quando ácidos inorgânicos em diferentes concentrações são empregados para a decomposição de matrizes biológicas, tendo a água como referência. Observa-se que soluções de ácidos diluídos apresentam temperaturas superiores quando comparadas com seus respectivos ácidos concentrados. Isso indica que soluções diluídas podem ser empregadas sem que se comprometa a temperatura do meio reacional<sup>4</sup>.

**Tabela 1.** Potência absorvida por diferentes volumes de ácidos minerais concentrados comparados com água destilada <sup>4</sup>.

Reagente e Concentrações	50 mL	100 mL	200 mL
H <sub>2</sub> O	344 ± 9	408 ± 3	468 ± 5
HNO <sub>3</sub> (14 mol L <sup>-1</sup> )	184 ± 2	234 ± 5	313 ± 4
HNO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	212 ± 3	269 ± 6	332 ± 3
HF (29 mol L <sup>-1</sup> )	167 ± 3	238 ± 12	315 ± 15
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (18 mol L <sup>-1</sup> )	231 ± 6	331 ± 4	396 ± 8
HCl (12 mol L <sup>-1</sup> )	148 ± 3	173 ± 6	251 ± 2
HCl (6 mol L <sup>-1</sup> )	138 ± 3	190 ± 4	253 ± 4
HCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	227 ± 4	287 ± 7	340 ± 5

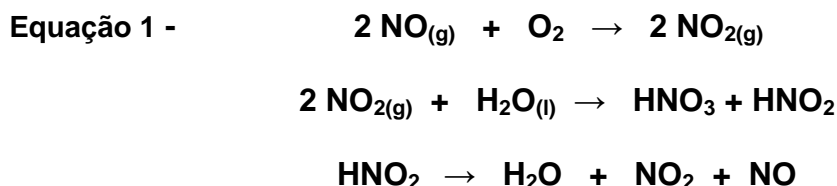
\* Todas as potências calculadas são em watts ± desvio padrão; n=5

O HNO<sub>3</sub> concentrado sofre decomposição térmica, podendo gerar diferentes óxidos, sendo todos solúveis em água e com características oxidantes reconhecidas. Alguns desses óxidos foram descritos por Cotton e Wilkinson (1996)<sup>10</sup> são eles: NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, HNO, e HNO<sub>2</sub>

Soluções de HNO<sub>3</sub> concentrado quando aquecidas em sistemas fechados, têm como principal produto de decomposição o NO<sub>2</sub>. Quando se emprega soluções de HNO<sub>3</sub> diluídas, o principal produto de reação é o NO.

O NO reage em atmosfera oxidante, levando à formação de NO<sub>2</sub>, que reage com água formando como produtos o HNO<sub>3</sub> e o HNO<sub>2</sub>. Esses ácidos nitrosos se decompõem, levando à formação de NO novamente, proporcionando uma reação em cadeia, como demonstra a equação 1 <sup>11,12</sup>. Essa pode ser uma possível

explicação para o fato de se obter resultados satisfatórios quando se emprega HNO<sub>3</sub> diluído em decomposições de materiais biológicos.



Carrilho et al. (2002)<sup>13</sup> recomendam uma proporção das misturas oxidantes de 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado combinados com 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v), suficientes para digestão de 300 mg de amostras biológicas.

Kotz et al. (2002)<sup>14</sup> e Stoeppler et al. (1979)<sup>15</sup> recomendam o uso de 0,4 a 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> para digestão de 200 mg de amostra. Würfels e Jackwerth (1985 - 1989-a)<sup>5,6</sup>, empregaram eficientemente um volume de 2,0 ml de HNO<sub>3</sub> para a digestão de 100 mg de amostras de padrões de compostos orgânicos, controlando somente a temperatura.

Myazawa et al. (1984)<sup>16</sup> empregaram soluções de HNO<sub>3</sub>, HCl, HClO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes concentrações (0,5; 1 e 2 mol L<sup>-1</sup>) para extração de Ca, Mg, K, P, Mn, Zn, Cu, e Fe de amostras de folhas de café, soja e *Panicum maximum* com determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Neste estudo, as soluções de HCl e HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> apresentaram-se eficientes para procedimentos de extração, com o objetivo de determinar os elementos analisados, eliminando riscos de explosão e problemas com a precipitação de KClO<sub>4</sub>, que podem ocorrer quando HClO<sub>4</sub> é empregado. Os autores obtiveram resultados eficientes para todos os elementos estudados, com exceção do Fe e P.

Chao et al. (1996)<sup>17</sup> realizaram o estudo de ácidos diluídos associado à radiação microondas para extração de metais a níveis traço em amostras biológicas e determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS). Massa equivalente a 300mg de material de referência certificado de folha de maçã (NIST 1515) foi digerida com 5,0 mL de HNO<sub>3</sub> diluído. Soluções 10 e 14% v v<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> apresentaram recuperações acima de 95% para Mn, Fe, Mg e Cu.

Crow et al. (1995)<sup>18</sup> empregaram ácidos diluídos para extração de Cu, Pb e Hg em amostras medicinais e em materiais de referência certificados (CRM's) e determinados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O método mostrou-se eficiente e simples, com pouca geração de gases e soluções finais com acidez inferior a 4% v v<sup>-1</sup>, minimizando interferência da solução na análise e redução da corrosão no queimador do equipamento.

A comparação de métodos convencionais para digestão ácida de resíduos de incineração com a digestão com ácidos diluídos em microondas foi estudada por Dugenest et al. (1998)<sup>19</sup> O método empregando radiação microondas mostrou-se rápido, simples, econômico e eficaz para a determinação de Zn, Pb, As, Ca, Na e K.

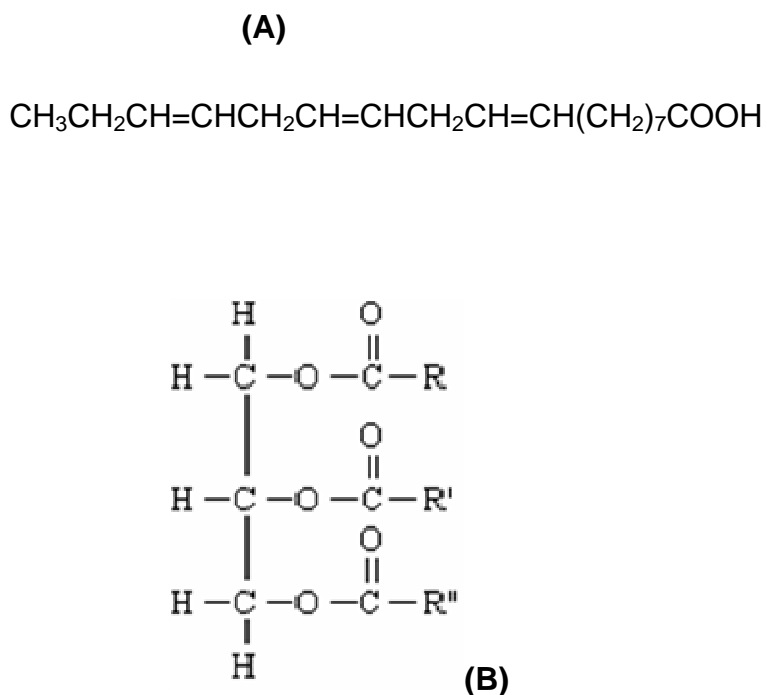
O emprego de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é requerido como agente oxidante auxiliar quando pequenos volumes de ácidos ou ácidos diluídos são empregados. Wu et al. (1997)<sup>20</sup> observaram um decréscimo dos teores de carbono residual e de espécies residuais remanescentes, quando o volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aumentado. Uma elevação da pressão interna em sistemas fechados foi estudada por Veschetti et al. (2000)<sup>21</sup>, mostrando uma maior eficiência de oxidação da matéria orgânica a baixas temperaturas.

Gouveia et al. (2001)<sup>22</sup> argumentam que a eficiência da digestão com uso de soluções de ácidos diluídos e a redução dos volumes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são fatores possibilitados pelo uso de altas pressões e temperaturas em digestão de amostras em sistemas fechados, que proporcionam uma destruição mais eficiente da matriz da amostra, melhorando a confiabilidade nos resultados.

## **2.2. Investigação da Composição Química das Amostras**

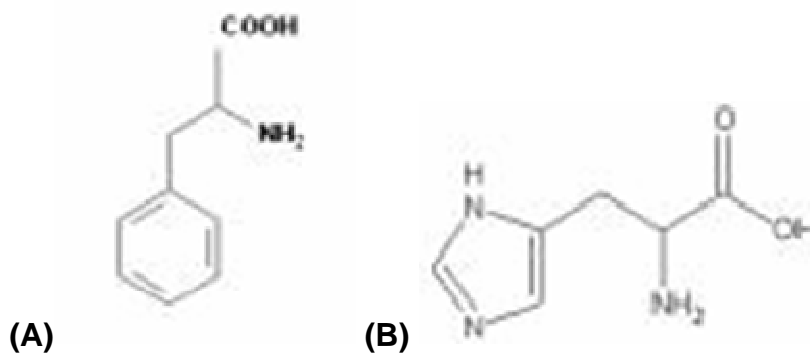
A maioria das técnicas analíticas para análise multielementar requer que as amostras sejam convertidas na forma de solução. Esses procedimentos envolvem uma decomposição total ou parcial da amostra, visando a destruição da matéria orgânica presente. Sendo assim, é importante se conhecer as características originais dos compostos orgânicos das amostras biológicas.

Os lipídeos constituem o grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem como característica definidora e comum a insolubilidade em água. Fosfolipídios e esteróis são os principais elementos estruturais de membranas biológicas<sup>25</sup>. O ácido linoléico é um ácido graxo insaturado e é mostrado na figura 3, juntamente com a estrutura de um triglicérideo.



**Figura 3.** Moléculas: (A) ácido linoléico e (B) molécula de triglicerídeo<sup>23</sup>.

As proteínas correspondem a um largo grupo de substâncias, incluindo diferentes aminoácidos e algumas estruturas não aromáticas. A eficiência de decomposição para amostras com alto teor de proteína, depende dos tipos de aminoácidos presentes nas amostras. Fenilalanina e histidina são exemplos de aminoácidos de difícil decomposição (figura 4).



**Figura 4.** Moléculas: (A) Fenilalanina e (B) Histidina<sup>24</sup>.

Temperaturas específicas foram determinadas para a decomposição de três componentes básicos de matrizes biológicas e botânicas com  $\text{HNO}_3$ . Matrizes que contêm em sua estrutura basicamente carboidratos são decompostas a  $140\text{ }^\circ\text{C}$ , proteínas à  $150\text{ }^\circ\text{C}$  e moléculas lipídicas a aproximadamente  $160\text{ }^\circ\text{C}$ . Enquanto as matrizes orgânicas são convertidas a  $\text{CO}_2$  e o  $\text{HNO}_3$  é convertido a  $\text{NO}_2$ , esses gases, produtos de decomposição, produzem aumento da pressão, com mudanças na temperatura. Esse aumento é uma boa indicação da ocorrência da decomposição<sup>24</sup>.

Carrilho et al (2001)<sup>25</sup> apresentaram uma tentativa de correlacionar os teores de gordura e proteína bruta de amostras biológicas com o carbono residual após decomposições assistidas por radiação microondas. O coeficiente de correlação entre a gordura nas amostras e o carbono residual foi de 0,9173. Entretanto, não foi observada uma correlação entre os teores de proteína bruta com e carbono residual.

### **2.3. Análise Quimiométrica**

A quimiometria é uma ferramenta matemática e estatística freqüentemente utilizada para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados. Usando seus recursos, os métodos de desenvolvimento de produtos alimentícios e análise de alimentos em geral são simplificados. Como exemplo de aplicações, pode-se citar: controle e monitoramento de processos, classificação de alimentos e determinação da origem geográfica, avaliação sensorial e determinação e fraude em alimentos, entre outras. Nesses casos, o uso da quimiometria ajuda a decidir quais determinações são importantes e, assim, algumas delas podem ser suprimidas. Isso pode ser facilmente visualizado em gráficos bidimensionais, contendo grande parte das informações estatísticas pelo uso da técnica de Análise

por Componentes Principais. Pode-se também agrupar as amostras por similaridade e representar essa informação na forma de um diagrama bidimensional, denominado dendograma, Análise por Agrupamento Hierárquico, (MORGANO,1999<sup>26</sup>.)

### 2.3.1 Pré-processamento dos dados

Para garantir o sucesso da análise multivariada é necessário um tratamento dos dados originais. Frequentemente é necessário um ajuste do conjunto de dados antes de utilizar o algoritmo multivariado. Quando uma variável tem uma magnitude acentuadamente maior que as outras, esta variável isolada pode dominar os dados subsequentes baseado na variância ou na distância. Em outras palavras, os elementos que estão em maiores concentrações podem ser mais significantes para o modelo. O pré-processamento dos dados usado nesta dissertação foi o autoescalamento, em que cada variável (cada coluna da matriz de dados) é centrado na média e então dividido pelo seu desvio padrão.

### 2.3.2 Reconhecimento de padrões

As ferramentas de reconhecimento de padrões aplicadas aos conjuntos de dados incluem análise por componentes principais (PCA) como um método de visualização e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA) como um método não supervisionado de reconhecimento (MASSART,1997<sup>27</sup>). Na análise por componentes principais a matriz de dados é decomposta em *scores* e *loadings*. Os vetores de *scores* descrevem a relação entre as amostras no subespaço do modelo e os vetores de *loadings* descrevem a importância de cada descritor dentro do modelo. Ele pode representar graficamente a relação inter amostras e inter variáveis



e fornecer uma maneira de reduzir a dimensionalidade dos dados. Semelhante ao PCA, o agrupamento de amostras revela similaridades entre as amostras enquanto o agrupamento de variáveis define com precisão correlação entre variáveis (SMOLINSKI,2002<sup>28</sup>). A finalidade preliminar de técnicas de agrupamento é apresentar os dados em uma aproximação que demonstre o agrupamento em um espaço multidimensional de tal maneira que todos os objetos de um simples grupo tenha alguma relação natural a um outro, e os objetos de diferentes grupos sejam diferentes de cada outro. Os resultados de HCA apresentados na forma de um dendograma facilitam o reconhecimento visual de tais grupos.

Kokot et al. (1992)<sup>29</sup> estudaram a aplicação de diversos procedimentos quimiométricos para a seleção de um método apropriado para digestão de amostras de sedimentos por radiação microondas. Os quatro métodos quimiométricos aplicados, PCA, MDM, SIMCA e FC, nos dados analíticos para metais em sedimentos e materiais de rochas, se mostraram adequados e forneceram informações consistentes sobre outliers, agrupamentos e tendências. Foi possível selecionar um método apropriado para a decomposição das amostras estudadas empregando radiação microondas.

#### **2.4. Investigação dos Principais Produtos de Reação Obtidos Após Decomposição Ácida Empregando Radiação Microondas**

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre duas fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio dos analitos entre as duas fases imiscíveis e é determinada pelos fatores que afetam esse equilíbrio: composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura de separação. Mudanças em um ou mais destes parâmetros levam a alterações na migração diferencial.

A separação de uma mistura por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) se dá por uma ou mais interação entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. Os modos de separação podem ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons ou troca iônica e exclusão.

A cromatografia em fase reversa é mais utilizada em HPLC, uma vez que permite a separação de uma grande variedade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente empregada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetraidrofurano. O princípio de separação em fase reversa é a hidrofobia. A

separação em fase reversa se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa<sup>30</sup>.

Várias técnicas analíticas podem ser hifenadas com HPLC para averiguação dos contaminantes orgânicos e para sua quantificação. Técnicas espectroscópicas podem ser aplicadas para a identificação de compostos orgânicos a partir de informações obtidas dos espectros. Esses quatro tipos de espectrometria se completam: massas (MS), infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e ultravioleta (UV). Essencialmente a molécula a ser analisada é testada por diferentes feixes de energia e as respostas são registradas como espectros.

Mörner et. al. (1915-1918 apud PRATT, K., W., KINGSTON, H.M., MAcCREHEN, 1989, p.2024-2027) realizaram estudos sistemáticos, entre 1915 e 1918, em decomposições de amostras de proteínas em aquecimento convencional com HNO<sub>3</sub>. Ácidos benzóico, oxálico, pícrico, tereftálico, succínico e *p*-ácidos nitrobenzóicos foram os produtos identificados após as decomposições.

Erlenmeyer e Lipp. (1939)<sup>31</sup> relataram estudos sobre a nitração branda em amostras de proteínas em sistemas de aquecimento convencional, evidenciando, espécies de *p*-nitrofenilalanina como produto majoritário. Essa hipótese foi confirmada por Takayama e Tsubuku (1942)<sup>32</sup>.

Pratt et al. (1988)<sup>24</sup> realizaram estudos de identificação por cromatografia líquida e voltametria dos produtos orgânicos de decomposições de amostras biológicas com o emprego de ácido nítrico. Encontraram como principais espécies os isômeros *o*-, *m*-, e *p*- ácidos nitrobenzóicos. Esses isômeros podem ser eliminados através do refluxo com HClO<sub>4</sub>. Segundo os autores, dependendo do tipo de reação inicial, nitração ou oxidação, espécies distintas dessa mistura de isômeros vão prevalecer.

Würfels e Jackwerth (1989)<sup>6</sup> descreveram os processos de decomposição de amostras biológicas com o início de uma hidrólise ácida nas seguintes ligações: a) peptídeos ligados a proteínas: b) éster ligado a gordura: c) glicosídeos ligados a carboidratos, e d) nucleosídeos e amidas ligadas a aminoácidos. Os autores salientaram a importância do NO<sub>2</sub> nos processos de clivagem de ligação e listaram várias substâncias que são decompostas por HNO<sub>3</sub> a altas pressões.

Na segunda parte do trabalho, onde Würfels et al. (1989)<sup>33</sup> realizaram a identificação dos produtos de reação, concluíram que, durante a degradação de materiais biológicos, a maioria dos constituintes da matéria orgânica é completamente mineralizada, com poucas exceções. Padrões de fenilalanina têm os isômeros de ácidos nitrobenzóicos (NBA's), padrões de ácido linoléico têm o ciclopropano-1,2-ácidos dicarboxílicos e padrões de triptofano têm uma mistura de compostos aromáticos como produtos majoritários após digestão ácida.

Os resíduos não voláteis remanescentes em digestões assistidas por radiação microondas em frascos fechados, de diferentes amostras usando HNO<sub>3</sub>, com e sem tratamento pós-digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram estudados por Reid et al.(1995)<sup>34</sup>. Com o uso de técnicas como infravermelho, cromatografia, voltametria e a medida do carbono orgânico residual, avaliou-se a eficiência de decomposição. As

conclusões referem-se à necessidade do emprego de diferentes métodos de decomposição, de acordo com a matriz da amostra e da técnica analítica a ser usada.

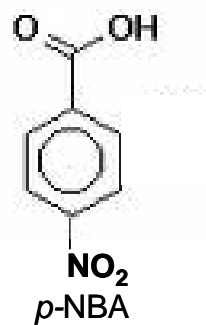
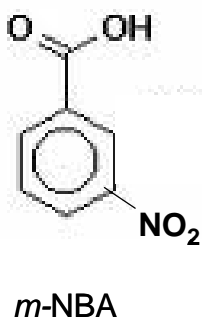
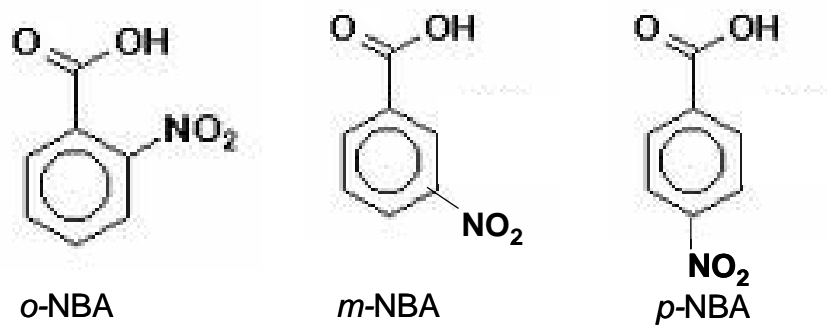
O efeito da temperatura nas decomposições de amostras de folhas de pêsego e de carvão foi avaliado por Daniel et al. (1998)<sup>35</sup>. O monitoramento dos produtos de reação foi feito por HPLC em uma faixa de 180-300°C. As conclusões são que com um aumento da temperatura, há um decréscimo na concentração dos NBA's para a amostra de folhas de pêsego. Já para o carvão, alguns problemas foram relatados em relação ao processo de decomposição. Não foram observados problemas relacionados à recuperação de minerais.

A oxidação de compostos orgânicos por ácido nítrico de padrões de aminoácidos e proteínas foi averiguada por Kubrakova et al. (1999)<sup>36</sup>. Além do CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, nitro derivados de ácidos aromáticos foram os maiores produtos de oxidação em quase todos os casos.

Araújo et al. (2002)<sup>37</sup> estudaram a eficiência da digestão ácida assistida por radiação microondas em plantas utilizando diferentes concentrações ácidas (2,0, 3,0, 5,0, 7,0, e 14 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>), avaliando o carbono orgânico residual e a recuperação de minerais em amostras certificadas. O emprego de solução 2 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> mostrou-se eficiente para a recuperação de Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn, apresentando menor variedade de resíduos quando comparado com ácido concentrado, observado por espectros de RMN de prótons.

Os nitroaromáticos são constituídos de um anel benzênico, mono ou polisubstituídos por grupos nitro (-NO<sub>2</sub>). O ácido nitrobenzóico (NBA) é um nitroaromático e possui 3 isômeros de posição, *o*-, *m*-, *p*-NBA. São substâncias sólidas a temperatura ambiente, com fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>4</sub>, massa molecular

de 167,12. Os pontos de ebulição são: 146-148°C para 2-ácido nitrobenzóico, 139-141°C para o 3-ácido nitrobenzóico e 237-240°C para o 4-ácido nitrobenzóico. As estruturas dos três isômeros estão representadas na figura 5<sup>38</sup>.



**Figura 5.** Estruturas dos Isômeros do ácido nitrobenzóico<sup>38</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi avaliar procedimentos de decomposição conduzida em forno de microondas com cavidade, empregando soluções de ácidos diluídos em amostras com diferentes composições químicas, visando a determinação elementar, averiguar a eficiência de decomposição e caracterizar as soluções residuais

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reagentes e Soluções

Todos os frascos, ponteiras e vidrarias utilizados foram previamente descontaminados em banhos contendo 10 % (v/v) de HNO<sub>3</sub> por 24 horas.

Os reagentes empregados nesse trabalho foram de grau analítico, e quando necessário, de grau HPLC.

Para o preparo das soluções ácidas empregadas, foi utilizado HNO<sub>3</sub> concentrado J. T. Baker (Mallinckrodt<sup>®</sup>, Alemanha), e água destilada-desionizada purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (18Ω cm, Millipore, EUA). Como agente oxidante auxiliar, foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % v v<sup>-1</sup> Synth (LabSynth, São Paulo).

Os padrões para construção das curvas analíticas e as soluções de calibração necessárias para análise dos elementos químicos por ICP OES foram preparados a partir de diluições de soluções estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> (Tritisol<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup>, Alemanha). As curvas analíticas para determinação de carbono orgânico residual foram preparadas a partir de uréia, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, Synth (LabSynth, São Paulo) em meio HNO<sub>3</sub>.

Os solventes éter etílico, metanol, acetonitrila e clorofórmio, utilizados para as extrações líquido-líquido, foram de grau HPLC J. T. Baker (Mallinckrodt<sup>®</sup>, Alemanha).

Os padrões de isômeros *o*,-*m*,-*p*- ácido nitrobenzóico (NBA's) utilizados foram obtidos da Acros Organics (New Jersey, USA), apresentam grau analítico HPLC e pureza na faixa de 99%.



## 4.2. Instrumentação

A determinação do carbono original total nas amostras foi realizada em analisador elementar EA 1108 CHNS-O (Fisons Instruments, Itália).

As análises de proteína bruta foram realizadas empregando analisador automático Kjeltex Auto Sampler System 1035 Analyzer (Tecator, Suécia).

Os teores de gordura foram determinados empregando-se o equipamento Ankon XT2016 (Ankon, EUA).

Nesse trabalho, as amostras foram digeridas em fornos de radiação microondas com cavidade Multiwave (Anton-Paar-Perkin Elmer, Áustria) contendo frascos de TFM (PTFE quimicamente modificado) de 50 mL.

A determinação do carbono residual foi efetuada em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP OES, (VISTA RL, Varian, Áustria) que opera com visão radial e sistema simultâneo de detecção. A quantificação dos analitos de interesse (Al, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sn, V e Zn) foi realizada pelo mesmo equipamento.

Análises por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  foram realizadas por um espectrômetro Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 T (INOVA, Varian, Áustria).

O cromatógrafo líquido empregado nas separações dos isômeros é da marca ShimAdzu, Japão.

Todas as medidas e procedimentos foram realizados em triplicata.

### **4.3. Amostras e padrão de referência certificado.**

As amostras estudadas de tecido vegetal foram: *P notatum* (paspalum) e soja em grãos. Sangue e vísceras de bovinos foram as amostras de origem animal. A amostra de vísceras é uma mistura de fígado, rins, coração, pulmão, baço e outros órgãos do aparelho digestivo bovino.

Para avaliar a eficiência de digestão, medida pela recuperação de minerais e carbono orgânico residual, empregou-se amostra de referência certificada de músculo bovino (NIST 8433, National Institute of Standards and Technology, EUA).

## **4.4. Procedimento Experimental**

### **4.4.1. Análise Elementar (C,H,N e S)**

O carbono original foi determinado por análise elementar. Os instrumentos para análise elementar se baseiam na oxidação a altas temperaturas dos compostos orgânicos, que convertem os elementos de interesse em moléculas gasosas. Na maioria dos instrumentos, a detecção da condutividade térmica serve para completar as determinações <sup>39</sup>.

### **4.4.2. Análise de Proteína Bruta (PB) e Extrato Etéreo (EE)**

Proteína bruta foi determinada pelo método Kjeldahl. Este procedimento baseia-se na decomposição da matriz orgânica por ácido sulfúrico e o nitrogênio na forma de amônia é coletado usando um sistema de destilação. A proteína contida é

calculada pela multiplicação do valor de N por 6,25. Esse valor refere-se à uma estimativa para a porcentagem de nitrogênio (em torno de 16%), que estaria presente na maioria das proteínas destes tipos de amostras <sup>40</sup>.

O extrato etéreo, incluindo triglicerídeos e outros compostos solúveis em éter foram determinados pela solubilização dessas substâncias, por sistema de extração acelerado por solventes (EAS), que opera a altas pressões, realizando as extrações em menor tempo e com redução de até 90% dos solventes utilizados.

#### **4.4.3. Preparo de Amostras Empregando Radiação Microondas com Ácidos Diluídos**

Otimizou-se o desempenho das digestões considerando aspectos como massa de amostra, periculosidade, eficiência de decomposição, velocidade do processo e avaliação da utilização de diferentes composições de misturas oxidantes com variação das concentrações ácidas.

As amostras foram submetidas à decomposição por radiação microondas em frascos de alta pressão (75 bar) de TFM (PTFE quimicamente modificado), de 50 mL. O equipamento utilizado permite o monitoramento da temperatura em cada frasco, sendo a pressão determinada a partir da média do conjunto de frascos.

Massas equivalentes a 0,200 g de amostras foram decompostas no forno microondas com cavidade usando 2,0 mL de solução de  $\text{HNO}_3$  nas concentrações 2,0; 7,0 e 14,0 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v).

O programa de decomposição utilizado foi otimizado e é mostrado na tabela 2. Depois de submetidas à decomposição, as amostras foram transferidas para frascos volumétricos e diluídas para 25,0 mL com água destilada e desionizada.

**Tabela 2.** Programa de Aquecimento Utilizado no Forno Microondas

<b>ETAPA</b>	<b>POTÊNCIA (W)</b>	<b>TEMPO (min)</b>
1	250	2
2	0	3
3	650	4
4	850	5
5	1000	5
6	0	15

#### **4.4.4. Determinação dos minerais e teores de carbono residual**

Análise multielementar e a determinação do carbono orgânico residual foram realizadas por ICP OES com configuração radial. A tabela 3 sumariza as condições de operação empregadas.

**Tabela 3.** Parâmetros Instrumentais do ICP OES utilizado nas determinações.

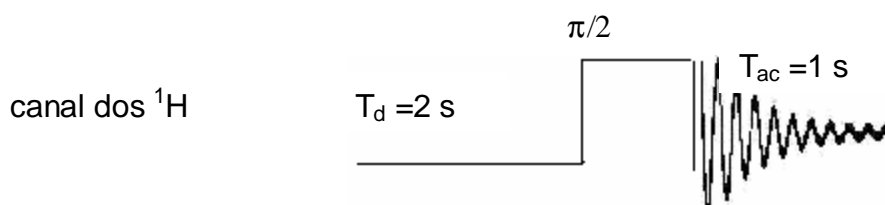
<b>Parâmetros Instrumentais</b>	
Visão	Radial
Sistema Ótico	Echelle
Detector	Sólido CCD (167-785 nm)
Potência (W)	1,3
Fluxo do gás plasma (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Fluxo gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Fluxo gás nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,90
Câmara de Nebulização	Tipo Ciclone
Nebulizador	Concentrico
Fluxo de amostra (L min <sup>-1</sup> )	0,80
<i>Linhas analíticas (nm)</i>	
Al (II)	167,019
Ba (II)	455,409
C (I)	193,025
Ca (II)	396,847
Fe (II)	279,553
K (I)	766,491
Mg (II)	280,275
Na (II)	588,995
P (I)	213,618
Zn (II)	202,275

(I) linhas atômicas

(II) linhas iônicas

#### 4.4.5. Caracterização inicial dos digeridos por RMN $^1\text{H}$

Para os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , em solução, foram obtidos 256 transientes, com pulso  $\pi/2$  de 10  $\mu\text{s}$ , tempo de repetição de 2s, tempo de aquisição de 1 s (Figura 6) e janela espectral de 6,4 KHz. Os espectros em solução foram realizados em solventes, como clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e água ( $\text{D}_2\text{O}$ ).



**Figura 6.** Seqüência de pulsos para aquisição dos espectros de RMN de hidrogênio em solução.  $T_d$  é o tempo de repetição e  $T_{ac}$  é o tempo de aquisição. A largura do pulso é  $\pi/2$ .

##### 4.4.5.1. Preparo das amostras para obtenção dos espectros

Extrações líquido-líquido (ELL) foram realizadas para a separação dos compostos mais apolares. Éter etílico e clorofórmio foram empregados, cujos índices polares ( $k'$ ) são 2,9 e 4,3 respectivamente e densidade de 0,706  $\text{g mL}^{-1}$  à 25°C para o éter etílico e 1,489  $\text{g mL}^{-1}$  para o clorofórmio.

Outros métodos como secagem em estufa à 105°C e liofilização foram empregados. Não foi possível liofilizar os extratos, pois estes não se mantinham congelados durante o processo.

Optou-se pelo uso do éter etílico para todas as outras extrações e como método de preparo da amostra para análise por RMN  $^1\text{H}$ .

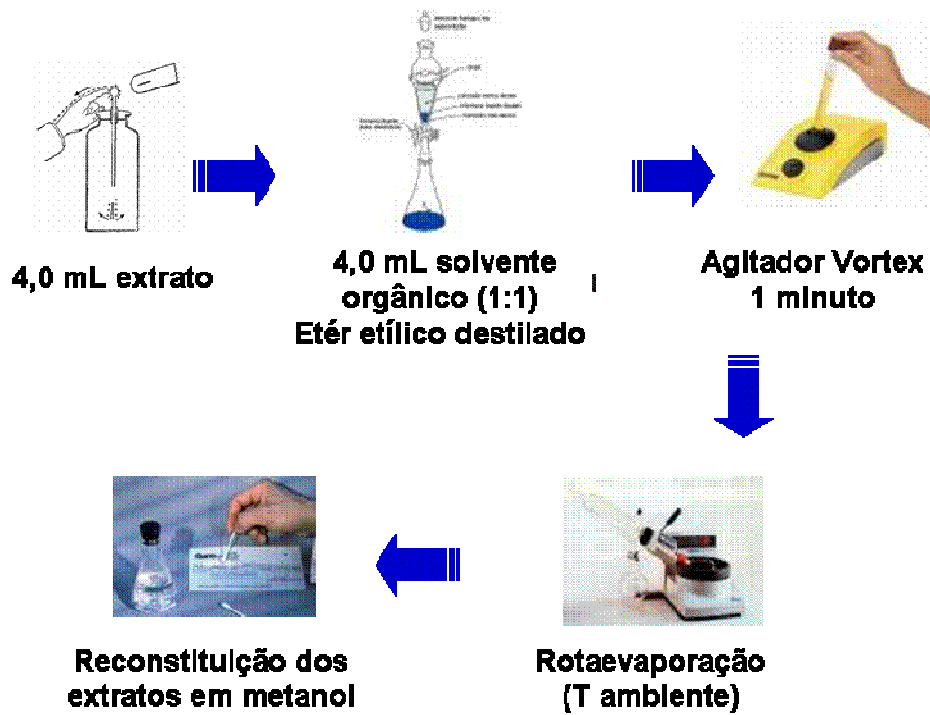
#### 4.4.6. Separação dos compostos por HPLC

As condições cromatográficas para separação dos isômeros e amostras estudadas são descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas para os isômeros e amostras estudadas.

<b>Coluna</b>	C18 (25x0,46cm), Thermo Electron Corporation.
<b>Detector</b>	UV-vis, ( $\lambda$ 254 nm), SPD-10 AV vp;
<b>Bomba</b>	Shimadzu, Mod. LC-10 AD vp.
<b>Auto Injetor</b>	Mod. Sil, 10 AD vp
<b>Software</b>	LCsolutions
<b>Controladora</b>	SCL – 10 A vp
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Volume Injetado</b>	20 $\mu\text{L}$

Para identificação por HPLC-UV dos resíduos remanescentes após a decomposição ácida nas amostras estudadas, optou-se pela extração líquido-líquido com éter etílico destilado devido à sua polaridade, próxima a dos isômeros estudados, e por sua imiscibilidade com água. O procedimento é descrito na figura 7.



**Figura 7.** Procedimento experimental para extração dos NBA's nas amostras estudadas.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise da Composição Química das Amostras

#### 5.1.1 Análise Elementar (C,H,N e S)

A tabela 5, mostra os valores em porcentagem encontrados para C, H, N e S nas amostras estudadas.

**Tabela 5.** Teores de C, H, N, e S em diferentes amostras.

	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
PASPALUM	0,9	41,4	6,2	----
SOJA	7,1	50,9	7,8	0,42
SANGUE	13,6	47,2	7,2	0,75
VÍSCERAS	3,2	65,6	10,2	----
MÚSCULO	13,2	50,1	7,6	0,81

Os teores iniciais de carbono variaram entre 41e 65%, sendo as vísceras a amostra com os maiores teores. Sangue e músculo bovino apresentaram os maiores teores de nitrogênio, ambas na faixa de 13%.

#### 5.1.2. Análise de Proteína Bruta (PB) e Extrato Etéreo (EE)

Os valores encontrados de PB e EE nas diversas amostras estão na tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de PB e EE nas diferentes amostras ( $n=3$ ).

	PB (%)	EE(%)
PASPALUM	8,5 ± 0,27	2,3 ± 0,83
SOJA	41,4 ± 0,01	20,4 ± 0,74
SANGUE	80,5 ± 0,4	1,6 ± 0,29
VÍSCERAS	18,9 ± 0,67	63,7 ± 0,31
MÚSCULO	80,1 ± 0,43	10,8 ± 0,14

As vísceras apresentaram os maiores teores de gordura, seguida pela soja em grãos, que também apresentou um valor intermediário no teor de proteína, em torno de 42%.

O sangue e o músculo bovino apresentam maiores teores de proteína bruta, em torno de 81%, confirmado também pelos teores de nitrogênio na análise elementar.

## **5.2 Avaliação do Procedimento de Decomposição por Radiação Microondas**

Dois importantes fatores na avaliação de procedimentos de decomposição são: o tempo gasto e a decomposição completa da matriz original.

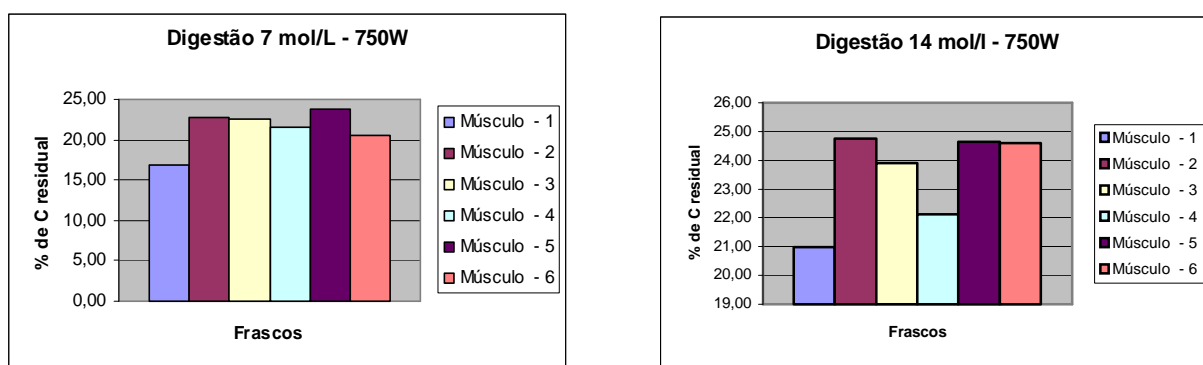
Uma forma de avaliar a eficiência da decomposição pode ser realizada através da medida do carbono orgânico residual. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência de decomposição empregando radiação microondas com dois diferentes programas de decomposição, um operando a potência nominal de 1000W e outra a 750W, em cada um dos seis frascos do rotor reacional.

Massas equivalentes a 0,200 g das diferentes amostras foram decompostas em forno microondas com cavidade usando 2,0 mL de solução de  $\text{HNO}_3$  (14,0 e 7,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v). O programa de aquecimento utilizado é descrito na tabela 7.

**Tabela 7.** Programa Utilizado no forno de radiação microondas

ETAPA	PROGRAMA 1		PROGRAMA 2	
	POTÊNCIA(W)	TEMPO (min)	POTÊNCIA(W)	TEMPO (min)
1	250	2	250	2
2	0	3	0	3
3	550	4	650	4
4	650	5	850	5
5	750	5	1000	5
6	0	15	0	15

Na figura 8, são apresentados os resultados obtidos em relação ao carbono residual para amostras de músculo bovino em cada um dos 6 frascos de reação empregando 750W e soluções 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

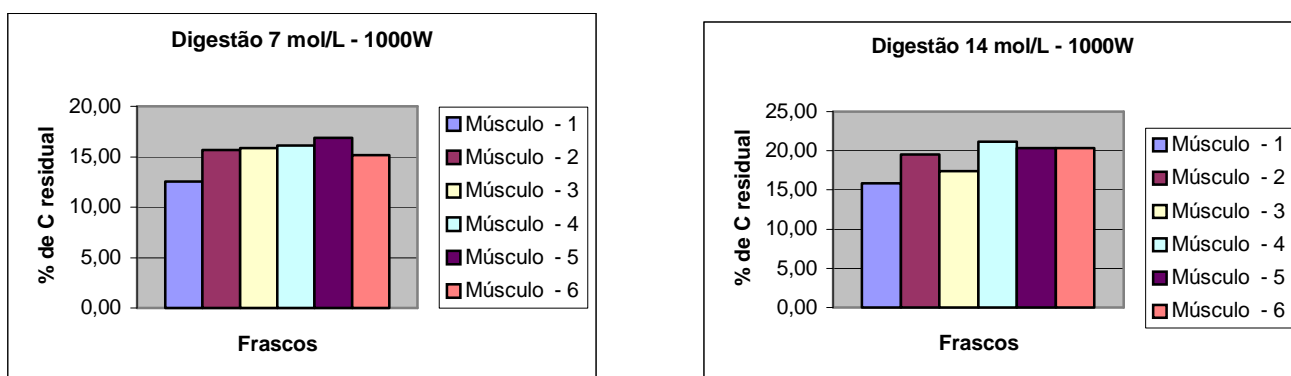


**Figura 8.** (%) de Carbono Orgânico Residual nos diferentes frascos, programas e com soluções de HNO<sub>3</sub> 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

O emprego de HNO<sub>3</sub> 7 mol L<sup>-1</sup> apresentou teores de carbono residual entre 15 e 24 %, com diferentes valores nos seis frascos do equipamento. Para o HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>, os teores de carbono ficaram entre 21 e 25%, sendo o frasco número 1 a posição do rotor que apresentou os menores valores de carbono residual em ambos os casos. Isso provavelmente se deva ao desgaste dos frascos, uma vez que a

radiação é distribuída igualmente dentro da cavidade do forno microondas e o rotor está em constante movimento, o que implica numa homogeneidade na absorção das microondas para todos os frascos.

Essa hipótese pode ser confirmada com o emprego de maior potência, conforme pode ser observado na figura 9.



**Figura 9.** (%) de Carbono Orgânico Residual nos diferentes frascos, programas e com soluções de  $\text{HNO}_3$  7 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$ .

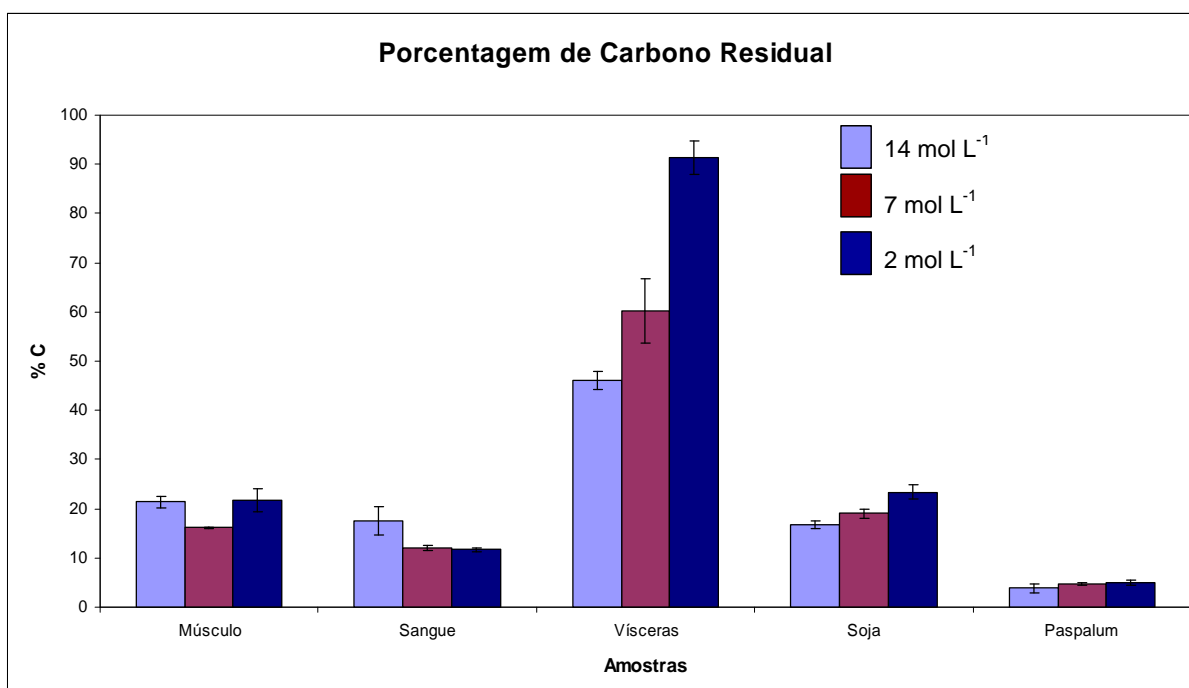
Nesse caso, verificou-se teores de 13 a 16 % de carbono residual empregando ácido 7 mol  $\text{L}^{-1}$  com 1000W, e valores entre 16 e 21% com solução concentrada, mostrando maior eficiência de decomposição quando comparado ao programa com 750W. Sabe-se que, quanto maior potência usada em fornos com radiação microondas, maior será a temperatura no frasco reacional, aumentando a assim a eficiência na decomposição.

Deve ser enfatizado que os resultados apresentados referem-se ao equipamento utilizado nesse estudo (Multiwave Anton-Paar-Perkin Elmer, Áustria). No entanto, essa discussão pode ser generalizada para outros equipamentos. Uma das características dos atuais fornos de microondas comercializados para serem utilizados em laboratórios analíticos é a possibilidade de reprodução das características relacionadas à temperatura e pressão.

Visando essa universalização, fez-se a calibração do forno de microondas para se ter a certeza da potência incidida sobre as amostras. Neste caso, foi observada uma diminuição da potência nominal do equipamento, de aproximadamente 25%. Assim, nas tabelas 1 e 2, a potência de 750W na realidade se refere a aproximadamente 560 W e a potência de 1000W corresponde a aproximadamente 750W.

### 5.3. Carbono Residual

Os valores de carbono orgânico residual obtidos para os diferentes grupos de amostras estão representados no gráfico da figura 10.



**Figura 10.** (%) de Carbono Orgânico Residual nas diferentes amostras após decomposições com  $\text{HNO}_3$  em diferentes concentrações.

Observa-se para as vísceras, com 64% de EE, que conforme se diminui a concentração ácida, há um aumento no teor de carbono residual, sendo que quando soluções de  $\text{HNO}_3$  2 mol  $\text{L}^{-1}$  são empregados, os valores de carbono residual são da ordem de 90%, o que indica que não ocorrem decomposições efetivas, prejudicando as recuperação e determinação de minerais.

Pode-se verificar o mesmo efeito para a amostra de soja em grãos, com aproximadamente 21% de EE, só que o efeito nesse caso não é tão pronunciado quando comparado com as vísceras. Uma possível explicação pode ser dada pela diferença de lipídios estruturais entre amostras de tecido animal e de tecido vegetal. Observa-se também desvios padrão maiores quando se emprega soluções ácidas diluídas.

Dependendo da técnica analítica a ser empregada, os teores de carbono residual podem interferir significativamente nos resultados, e para essa técnicas, seria necessário o emprego de decomposições com soluções ácidas concentradas.

No caso das amostras com altos teores de proteína, observa-se o inverso. Quando se diminui a concentração ácida observa-se um decréscimo nos valores de carbono residual.

Para o músculo bovino, quando se emprega soluções de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ , os valores de carbono residual obtidos se encontram na faixa de 16%. Já com soluções 2 mol  $\text{L}^{-1}$ , os valores são na faixa de 22%, bem próximos aos valores encontrados para a solução concentrada.

Isso pode ser observado para a amostra de sangue bovino, que apresentou um decréscimo significativo nos teores de carbono residual conforme se diminui a concentração ácida.

Para o paspalum, a variação nos teores de carbono residual não foram tão significativas quando se diminuiu a concentração ácida. Pode se verificar teores na faixa de 7-4% de carbono residual, demonstrando que ocorre uma destruição efetiva da matéria orgânica. Observa-se também um aumento dos desvios padrão com a diminuição da concentração ácida. No entanto, essa diminuição não é significativa.

#### **5.4. Recuperação de Minerais**

Os valores encontrados para a recuperação de minerais nas diferentes concentrações ácidas, para as amostras de músculo, sangue, paspalum, grãos de soja e vísceras, são mostrados na tabela 8.

**Tabela 8.** Concentração de minerais nas amostras decompostas com 2 mL of HNO<sub>3</sub> com 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%v/v), n=3.

	mol L <sup>-1</sup>	Al (mg kg <sup>-1</sup> )	Ba (mg kg <sup>-1</sup> )	C (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	K (mg kg <sup>-1</sup> )	Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	Na (mg kg <sup>-1</sup> )	P (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Músculo Bovino</b>	14	_____	_____	87512 ± 15984 <sub>ab</sub>	131 ± 4 <sub>b</sub>	50 ± 7 <sub>b</sub>	10609 ± 238 <sub>c</sub>	1089 ± 14 <sub>c</sub>	1491 ± 42 <sub>c</sub>	10640 ± 204 <sub>c</sub>	_____
	7	_____	_____	80157 ± 1409 <sub>b</sub>	155 ± 10 <sub>a</sub>	75 ± 7 <sub>a</sub>	11587 ± 87 <sub>b</sub>	1213 ± 97 <sub>b</sub>	1657 ± 30 <sub>b</sub>	11703 ± 192 <sub>b</sub>	_____
	2	_____	_____	128351 ± 34593 <sub>a</sub>	143 ± 11 <sub>ab</sub>	69 ± 6 <sub>a</sub>	12145 ± 41 <sub>a</sub>	1731 ± 17 <sub>a</sub>	1731 ± 17 <sub>a</sub>	12655 ± 162 <sub>a</sub>	_____
<b>Sangue Bovino</b>	14	_____	_____	48365 ± 10462 <sub>a</sub>	174 ± 4 <sub>b</sub>	1692 ± 57 <sub>a</sub>	745 ± 22 <sub>a</sub>	56 ± 2 <sub>b</sub>	5899 ± 222 <sub>b</sub>	860 ± 130 <sub>a</sub>	198 ± 3 <sub>c</sub>
	7	_____	_____	30105 ± 8565 <sub>b</sub>	196 ± 4 <sub>a</sub>	1867 ± 19 <sub>b</sub>	683 ± 11 <sub>b</sub>	64 ± 2 <sub>a</sub>	6414 ± 127 <sub>a</sub>	896 ± 73 <sub>a</sub>	236 ± 8 <sub>b</sub>
	2	_____	_____	43139 ± 7413 <sub>ab</sub>	199 ± 8 <sub>a</sub>	1942 ± 4 <sub>b</sub>	693 ± 20 <sub>b</sub>	66 ± 3 <sub>a</sub>	6624 ± 110 <sub>a</sub>	907 ± 77 <sub>a</sub>	249 ± 4 <sub>a</sub>
<b>Vísceras Bovina</b>	14	_____	_____	164591 ± 53152 <sub>c</sub>	2510 ± 281 <sub>a</sub>	99 ± 2 <sub>b</sub>	1810 ± 76 <sub>a</sub>	134 ± 9 <sub>a</sub>	1021 ± 30 <sub>a</sub>	3646 ± 185 <sub>a</sub>	11 ± 3 <sub>b</sub>
	7	_____	_____	294700 ± 25841 <sub>b</sub>	2382 ± 762 <sub>a</sub>	117 ± 2 <sub>a</sub>	1644 ± 72 <sub>ab</sub>	133 ± 17 <sub>a</sub>	1030 ± 4 <sub>a</sub>	3638 ± 377 <sub>a</sub>	18 ± 2 <sub>a</sub>
	2	_____	_____	502752 ± 12732 <sub>a</sub>	2437 ± 189 <sub>a</sub>	_____	1508 ± 207 <sub>b</sub>	140 ± 14 <sub>a</sub>	868 ± 156 <sub>a</sub>	3689 ± 377 <sub>a</sub>	21 ± 4 <sub>a</sub>
<b>Soja em Grãos</b>	14	16 ± 1 <sub>a</sub>	_____	26575 ± 8261 <sub>c</sub>	1874 ± 44 <sub>b</sub>	113 ± 10 <sub>b</sub>	10870 ± 389 <sub>a</sub>	2629 ± 37 <sub>c</sub>	116 ± 24 <sub>a</sub>	6207 ± 231 <sub>b</sub>	19 ± 4 <sub>b</sub>
	7	17 ± 4 <sub>a</sub>	6 ± 0,5 <sub>a</sub>	65757 ± 10381 <sub>b</sub>	1960 ± 40 <sub>a</sub>	133 ± 5 <sub>a</sub>	11286 ± 136 <sub>ab</sub>	2847 ± 55 <sub>b</sub>	78 ± 4 <sub>b</sub>	6351 ± 103 <sub>b</sub>	46 ± 4 <sub>a</sub>
	2	26 ± 9 <sub>a</sub>	4 ± 0,3 <sub>a</sub>	106530 ± 9832 <sub>a</sub>	2005 ± 44 <sub>a</sub>	129 ± 4 <sub>a</sub>	11694 ± 196 <sub>b</sub>	2981 ± 43 <sub>a</sub>	100 ± 2 <sub>ab</sub>	6889 ± 254 <sub>a</sub>	53 ± 5 <sub>a</sub>
<b>Paspalum</b>	14	622 ± 51 <sub>b</sub>	7 ± 1 <sub>a</sub>	18997 ± 4178 <sub>a</sub>	7938 ± 166 <sub>b</sub>	586 ± 23 <sub>b</sub>	8504 ± 137 <sub>b</sub>	11277 ± 277 <sub>b</sub>	47 ± 5 <sub>a</sub>	1087 ± 45 <sub>b</sub>	21 ± 2 <sub>a</sub>
	7	729 ± 55 <sub>a</sub>	5 ± 0,2 <sub>c</sub>	23607 ± 1776 <sub>a</sub>	8109 ± 355 <sub>b</sub>	678 ± 58 <sub>a</sub>	8694 ± 507 <sub>b</sub>	11863 ± 576 <sub>b</sub>	48 ± 5 <sub>a</sub>	1043 ± 39 <sub>b</sub>	24 ± 1 <sub>ab</sub>
	2	772 ± 33 <sub>a</sub>	7 ± 0,1 <sub>b</sub>	25179 ± 3169 <sub>a</sub>	8880 ± 85 <sub>a</sub>	670 ± 5 <sub>a</sub>	9498 ± 68 <sub>a</sub>	12960 ± 291 <sub>a</sub>	26 ± 8 <sub>b</sub>	1189 ± 35 <sub>a</sub>	29 ± 6 <sub>b</sub>
<b>Corn Bran</b>	14	_____	_____	32198 ± 1008 <sub>a</sub>	475 ± 33 <sub>b</sub>	17 ± 1 <sub>a</sub>	445 ± 32 <sub>a</sub>	899 ± 19 <sub>b</sub>	325 ± 22 <sub>ab</sub>	204 ± 64 <sub>a</sub>	29 ± 7 <sub>b</sub>
	7	_____	_____	23242 ± 2155 <sub>a</sub>	508 ± 5 <sub>ab</sub>	19 ± 3 <sub>a</sub>	295 ± 13 <sub>b</sub>	980 ± 13 <sub>b</sub>	353 ± 5 <sub>a</sub>	178 ± 85 <sub>a</sub>	40 ± 2 <sub>a</sub>
	2	_____	_____	29381 ± 7826 <sub>a</sub>	515 ± 32 <sub>a</sub>	25 ± 10 <sub>a</sub>	258 ± 30 <sub>b</sub>	1015 ± 74 <sub>a</sub>	295 ± 30 <sub>b</sub>	126 ± 72 <sub>a</sub>	34 ± 4 <sub>ab</sub>

- Letras significativamente diferentes, teste t de *Stuart*<sup>17</sup>



#### 5.4.1 Estudos Quimiométricos

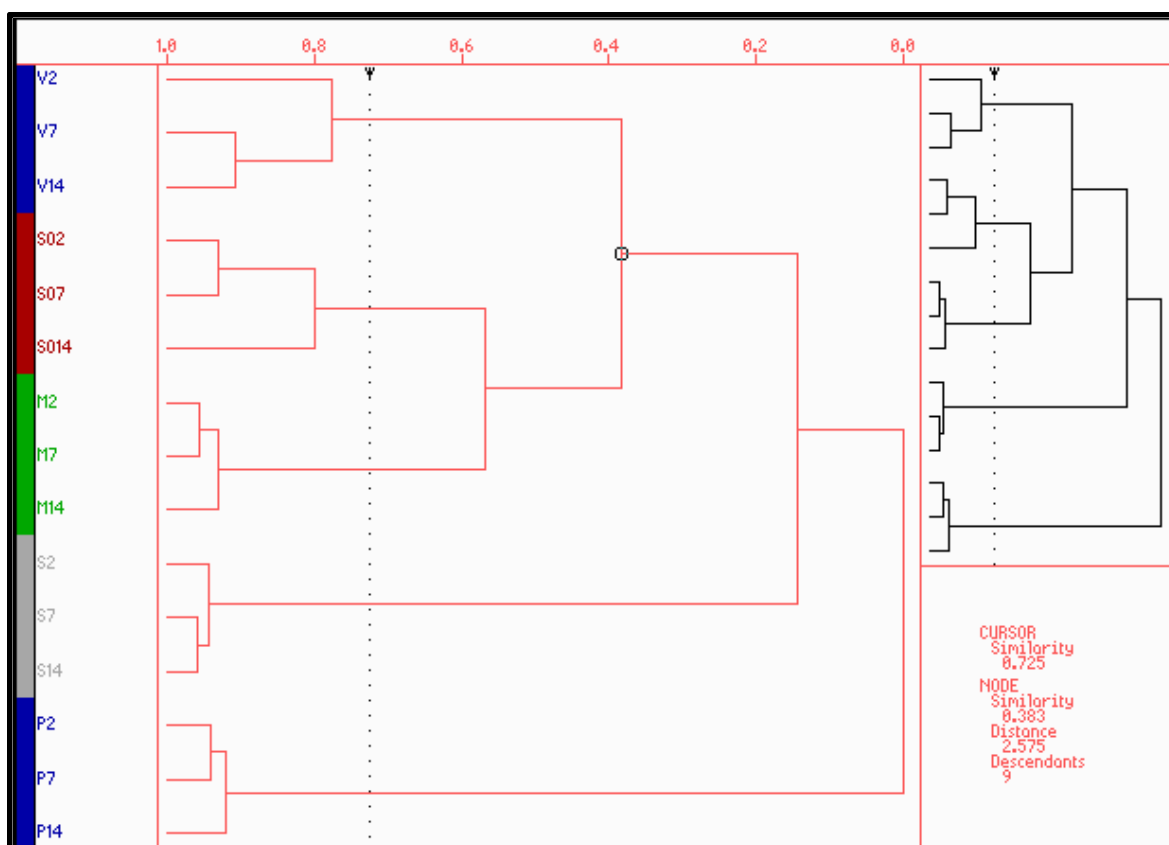
Devido ao grande destaque que esses métodos têm recebido e visando encontrar diferenças químicas que pudessem ser um indicativo para o estabelecimento de protocolos de preparo de amostras, foram realizados estudos quimiométricos das análises de amostras avaliadas neste trabalho, músculo, sangue e vísceras de bovinos, grãos de soja e paspalum. Para tais amostras, as variáveis utilizadas foram as concentrações dos constituintes inorgânicos determinados por ICP OES após digestão por radiação microondas empregando ácidos diluídos em diferentes concentrações.

Cada amostra foi considerada como um conjunto de variáveis (isto é, a quantidade dos metais determinados), que constituem seus descritores químicos. Para as amostras de músculo bovino, uma matriz de dados composta de 9 colunas e 9 linhas foi construída, sendo cada triplicata considerada como uma amostra. Outras duas matrizes de dados de 8 colunas e 9 linhas foram construídas para amostras de sangue e vísceras bovinas. Para as amostras de grãos de soja foi construída uma matriz de 10 colunas e 10 linhas, cada triplicata sendo considerada como uma amostra e outra matriz de 9 colunas e 9 linhas composta apenas pelas amostras de paspalum, sendo também cada triplicata considerada como uma amostra. Essas matrizes foram usadas nos cálculos quimiométricos.

A análise de dados foi executada usando o software Pirouette 2.1 (Infometrix, Seattle, WA)<sup>47</sup>. Os métodos de reconhecimento de padrões foram aplicados para os conjuntos de dados de acordo com a seguinte discussão:

A HCA tem o objetivo de agrupar os dados em “clusters” com características semelhantes, sendo os resultados apresentados na forma de

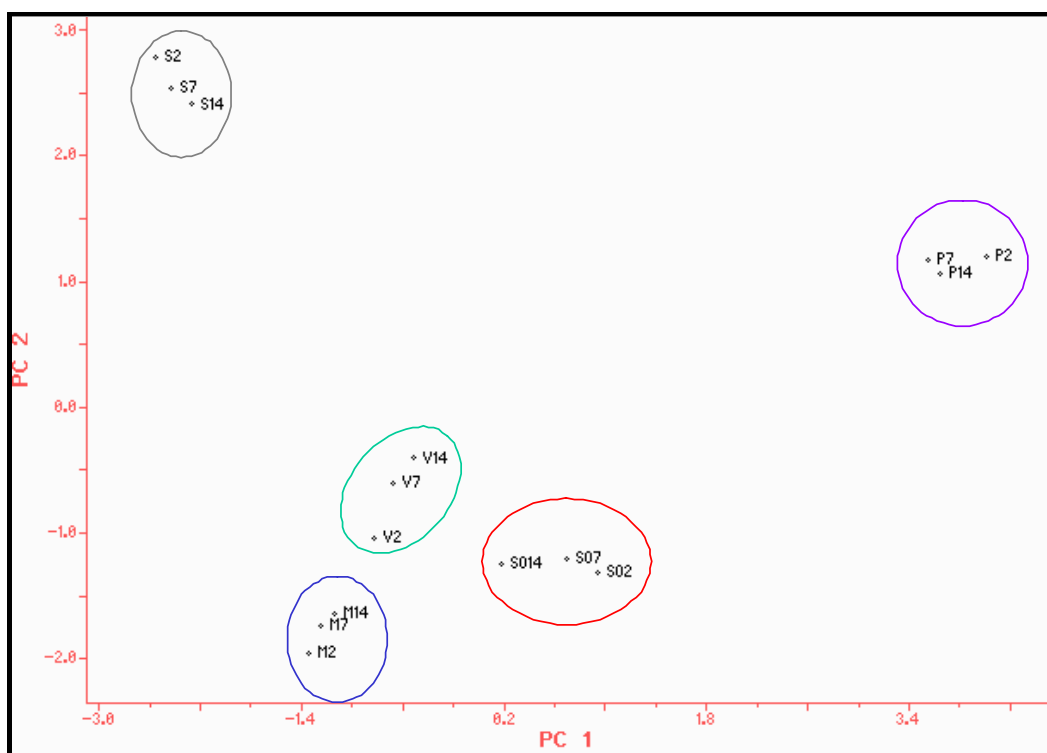
dendogramas. Dessa forma, por meio do dendograma obtido pela HCA apresentado na figura 11, pode-se observar o agrupamento entre as amostras decompostas com diferentes concentrações ácidas, uma proximidade entre as amostras com a mesma característica química, vísceras e soja em grãos (V e SO) e músculo e sangue bovino (M e S).



**Figura 11.** Dendrograma da HCA para as amostras vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

O tipo de pré-processamento empregado para Análise de Componentes Principais (PCA) foi o autoescalado. Este método de pré-processamento fornece pesos iguais para as variáveis estudadas e possibilita agrupar as amostras considerando as semelhanças entre variáveis (recuperação dos analitos).

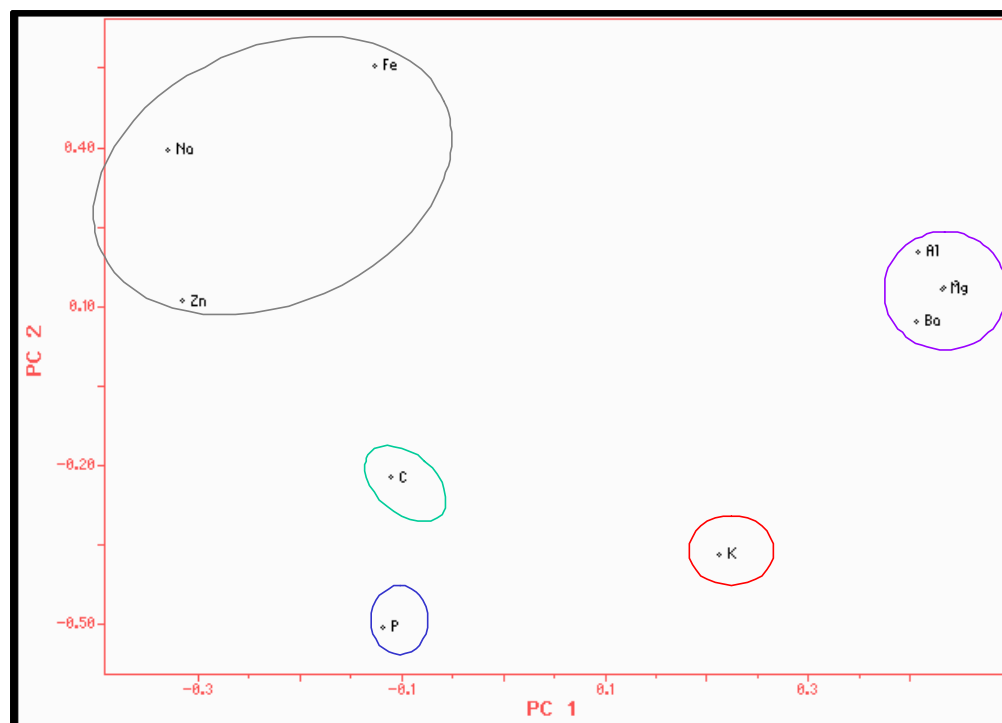
Através do gráfico da PCA das amostras (figura 12), pode-se observar o agrupamento entre as amostras estudadas e a separação entre elas empregando soluções com diferentes concentrações, sendo que músculo, vísceras e sangue bovino apresentaram scores negativos na PC<sub>1</sub> e soja e paspalum apresentaram scores positivos nessa PC.



**Figura 12.** Scores para vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

Os *loadings* para esse grupo de amostras é mostrado na figura 13. Com loading negativo na PC<sub>1</sub> estão as amostras de sangue, músculo e vísceras bovina. As amostras de sangue são bem caracterizadas por maiores concentrações de Fe, Na e Zn, enquanto as amostras de músculo estão separadas por teores elevados de P e as amostras de vísceras caracterizadas por apresentarem os maiores teores de C residual. Com loadings positivos na PC<sub>1</sub> estão as amostras de soja e paspalum,

sendo a primeira com maiores teores de K e o paspalum com as maiores concentrações de Al, Ba, Ca e Mg.



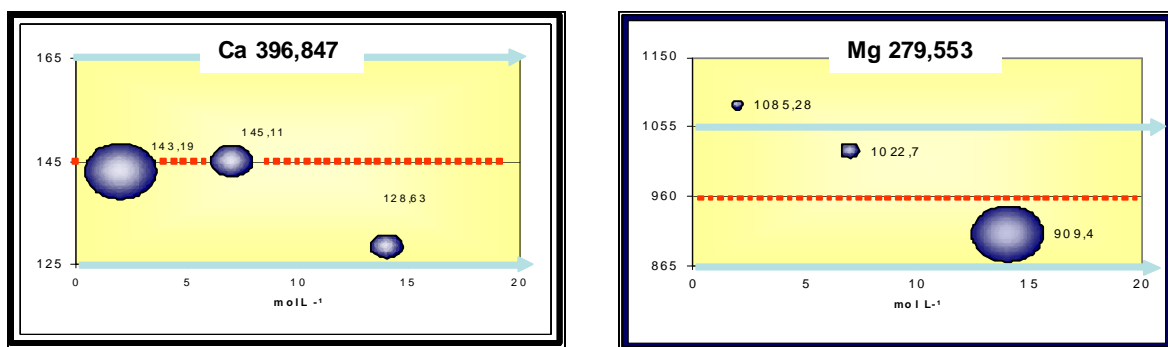
**Figura 13.** *Loadings* para vísceras (v), soja em grãos (SO), músculo (M), sangue (S) e paspalum (P) nas diferentes concentrações ácidas 2, 7 e 14 mol L<sup>-1</sup>.

#### 5.4.2 Análise da Exatidão e Precisão das Decomposições Ácidas

Para verificar a exatidão dos procedimentos de decomposição foi empregado material de referencia certificado. Uma das propriedades mais importantes de um método analítico é que ele deve ser isento de erros sistemáticos, isto é, o valor calculado pelo método deve ser o valor real.

Gráficos de bolas foram adquiridos para analisar a exatidão e precisão dos valores encontrados utilizando as médias e seus respectivos desvios padrão (figura 14).

HNO <sub>3</sub> mol L <sup>-1</sup>	Ca		Mg	
	Média	± DP	Média	± DP
2	143,19	± 11,2	1085,28	± 0,70
7	145,11	± 3,6	1022,70	± 1,77
14	128,63	± 1,9	909,40	± 20,1
Certificado	145,00	± 20,00	960,00	± 95,00
Intervalo	125 a 165		865 a 1055	

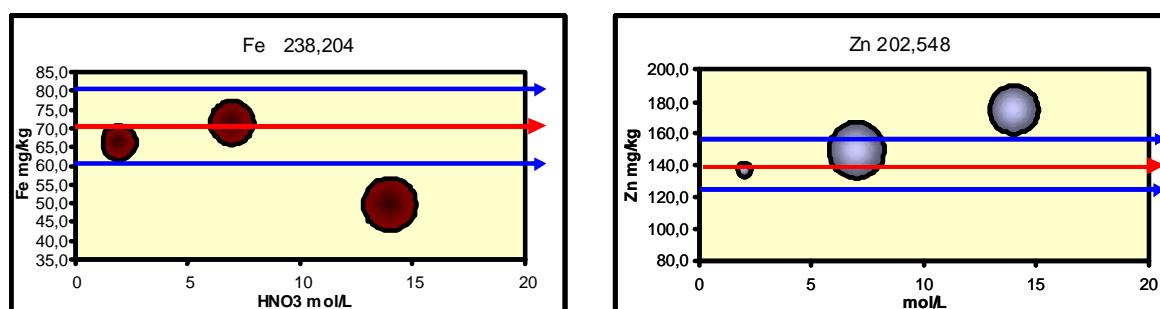


**Figura 14.** Gráfico de bolas para amostras de músculo bovino certificado (CRM) para os macronutrientes Ca e Mg nas diferentes concentrações ácidas.

Para os macronutrientes Ca e Mg em músculo bovino, pode ser verificado que a melhor recuperação ocorre quando se emprega soluções de HNO<sub>3</sub> 7 mol L<sup>-1</sup> para ambos elementos, com menores dispersões encontradas entre os valores obtidos e os valores de referência. Uma maior exatidão também pode ser observada nos dois casos, como pode ser observado na figura 14.

Observa-se que para o Fe e Zn, soluções mais diluídas (7 e 2 mol L<sup>-1</sup>) apresentaram resultados mais próximos do valor real, sendo que soluções 2 mol L<sup>-1</sup> apresentaram valores mais precisos e exatos, diferentemente de soluções concentradas, que mostraram bem diferentes do valor real (figura 15).

HNO <sub>3</sub> mol L <sup>-1</sup>	Fe Média ± DP	Zn Média ± DP
2	66,1 ± 5,7	136,9 ± 9,6
7	71,2 ± 9,7	148,8 ± 8,9
14	49,8 ± 9,1	174,7 ± 8,2
Certificado	71,2 ± 9,2	142 ± 14
Intervalo	80,4 a 62	156 a 128



**Figura 15.** Gráfico de bolas para amostras de músculo bovino certificado (CRM) para os micronutrientes Fe e Zn nas diferentes concentrações ácidas.

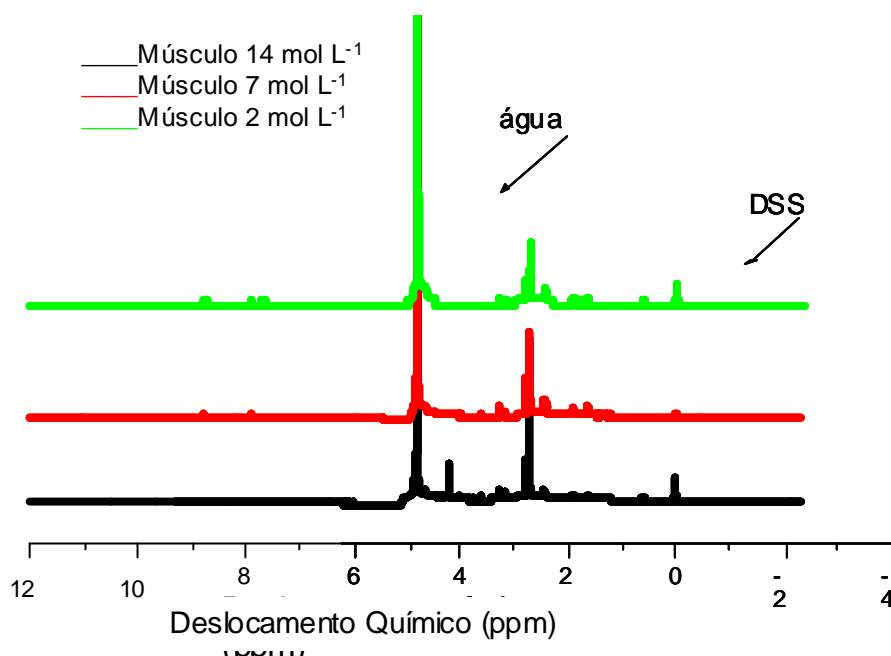
### 5.5 Caracterização Inicial dos Digeridos por RMN <sup>1</sup>H

Nos primeiros espectros obtidos para os brancos analíticos foi possível verificar que o melhor extrator foi o éter etílico. Os espectros obtidos com o clorofórmio não apresentavam picos e nem resoluções suficientes.

Optou-se pelo uso do éter etílico para todas as outras extrações como método de preparo das soluções residuárias para análise por RMN <sup>1</sup>H.

### 5.5.1 Músculo Bovino

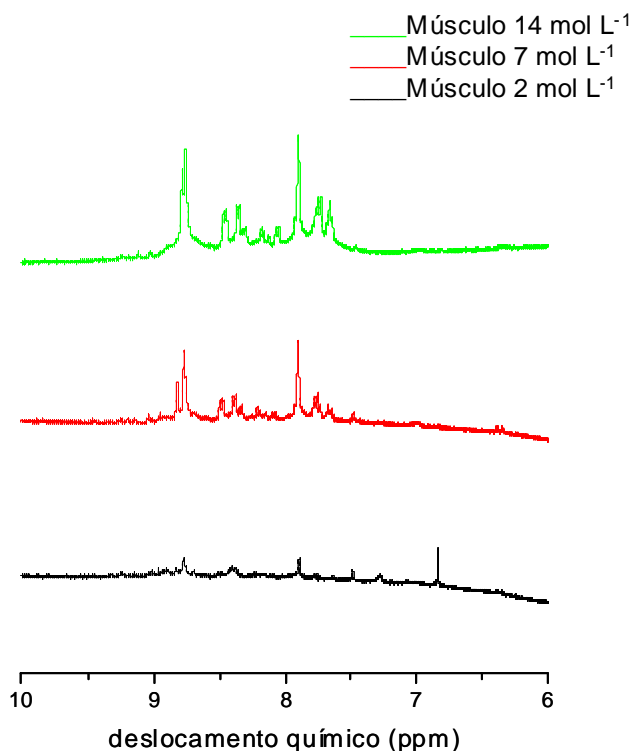
Assim como observado na análise de digeridos de amostras de tecido vegetal<sup>37</sup>, em concentrações superiores (14 e 7 mol L<sup>-1</sup>) os espectros mostram-se mais complexos, ou seja, com maior número de compostos formados após a decomposição assistida por radiação microondas.



**Figura 16.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H para amostras de músculo bovino decompostos em diferentes concentrações ácidas.

Nos espectros de 14 e 7 mol L<sup>-1</sup>, observou-se a presença de resíduos orgânicos na região típica de alifáticos ( $\delta$  0,5-3,0 ppm) com sinais mais intensos e abundantes do que na região típica de aromáticos e nitrocompostos ( $\delta$  7,0-10,5 ppm), figura 16. Uma possível explicação é que em altas concentrações, altas pressão e altas temperaturas, há um incremento no poder oxidante da mistura

reacional, que oxidam uma maior quantidade de compostos e ligações químicas, gerando uma maior diversidade de resíduos.



**Figura 17.** Expansão dos espectros de RMN <sup>1</sup>H na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

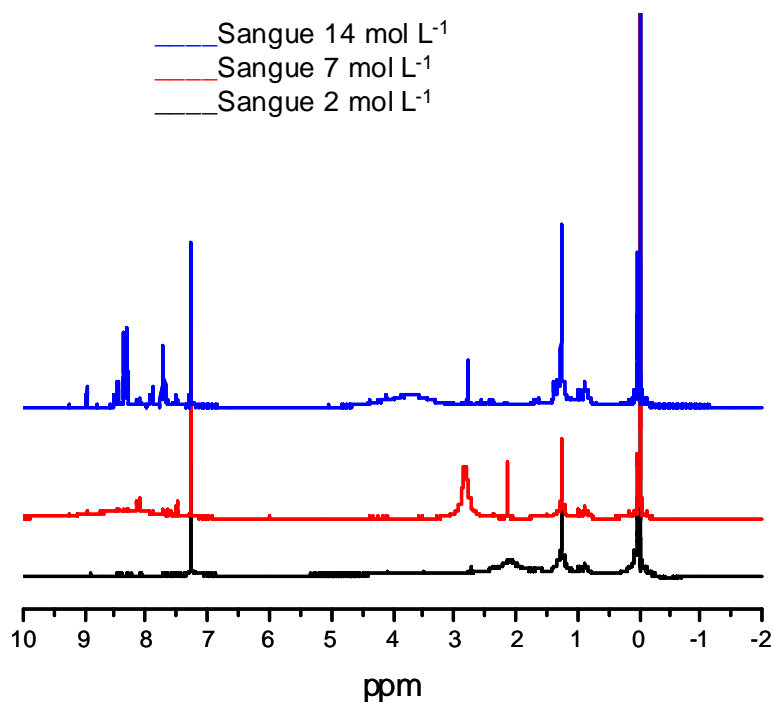
A figura 17 mostra uma expansão na região dos aromáticos dos espectros mostrados na figura 16. Pode se observar diferentes quantidades e menor diversidade de compostos quando as diferentes concentrações ácidas são comparadas.

Observou-se também sinais de baixa intensidade na região de  $\delta$  4,0-4,7 ppm, que pode ser um indicativo da presença de hidrogênios carbinólicos. Na condição menos oxidante, 2 mol L<sup>-1</sup>, houve uma drástica diminuição destes sinais, fato também observado para decomposição de tecidos vegetais sob as mesmas condições de oxidação<sup>37</sup>.



### 5.5.2 Sangue Bovino

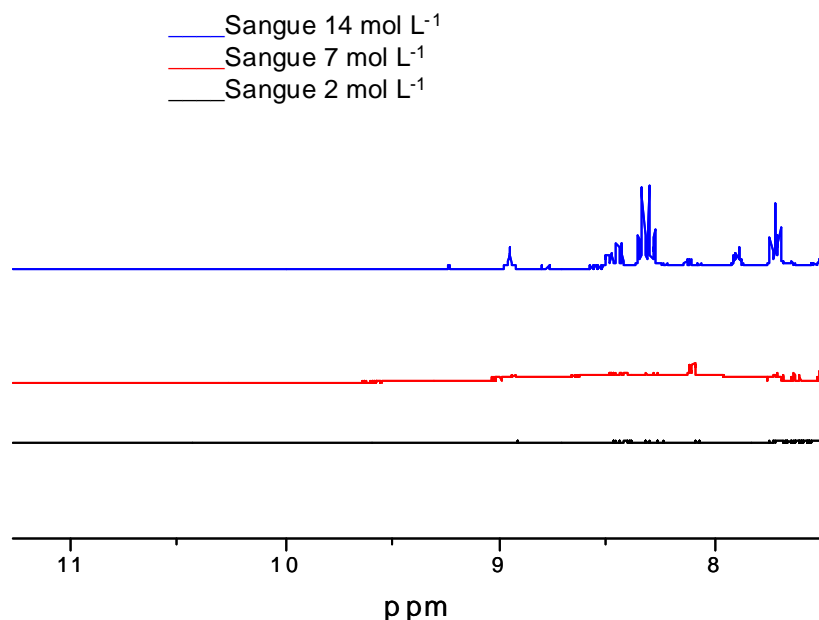
Na figura 18, são apresentados os espectros obtidos nas três concentrações ácidas empregadas para amostras de sangue. É possível verificar diferenças nos espectros, sendo que o espectro referente a  $\text{HNO}_3$   $2 \text{ mol L}^{-1}$  apresenta uma menor diversidade de picos e características mais simples. Nos espectros referentes às concentrações de  $\text{HNO}_3$  14 e  $7 \text{ mol L}^{-1}$ , observou-se a presença de resíduos orgânicos na região típica de alifáticos ( $\delta$  0,5-3,0 ppm) e na região típica de aromáticos ( $\delta$  7,0-10,5 ppm).



**Figura 18.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de sangue bovino decompostas em diferentes concentrações ácidas.

A região típica de aromáticos e nitrocompostos ( $\delta$  7,0-10,5 ppm) apresentou picos mais intensos conforme o aumento da concentração ácida. Uma possível explicação é que em altas concentrações, ocorre um aumento da pressão e temperatura, havendo um incremento no poder oxidante da mistura reacional.

Nesse caso, uma maior quantidade de compostos e ligações químicas seriam oxidados, gerando uma maior diversidade de resíduos, como pode ser observado na figura 19.

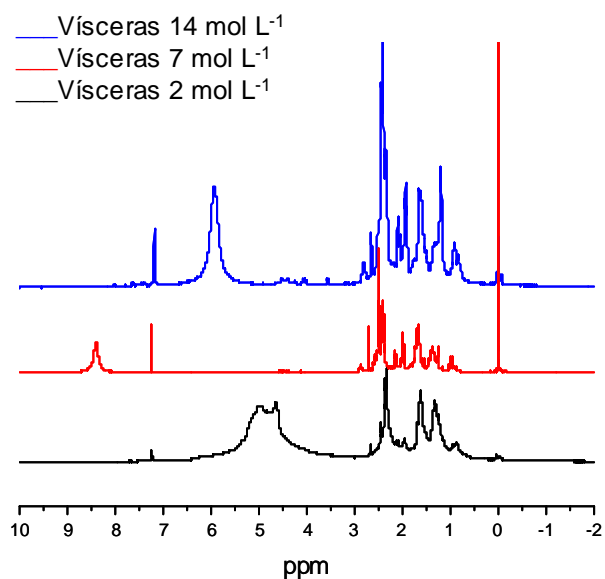


**Figura 19.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

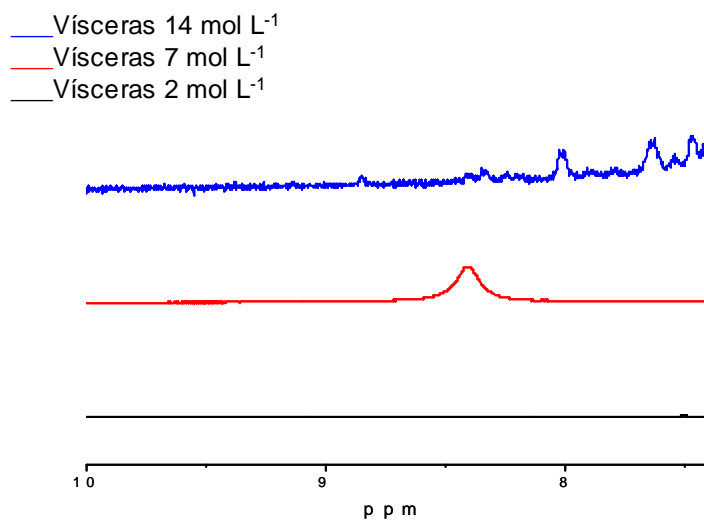
### 5.5.3 Vísceras Bovina

Para amostras de vísceras, os espectros obtidos para as concentrações de  $\text{HNO}_3$  14, 7 e 2 mol  $\text{L}^{-1}$  são apresentados na figura 20.

O espectro obtido referente a  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  apresenta uma maior diversidade na região de aromáticos e um sinal na região de  $\delta$  5.9 ppm, que pode ser indicativo da presença de nitrocompostos. O resíduo referente a  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ , está na região de  $\delta$  8,4 ppm. Isso mostra a presença de diferentes nitrocompostos nos resíduos avaliados. A figura 21 demonstra a expansão dos espectros na região dos aromáticos.

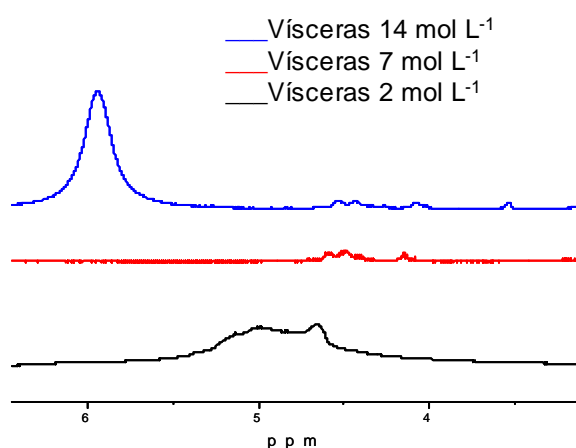


**Figura 20.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de vísceras bovina decompostas em diferentes concentrações ácidas.



**Figura 21.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostos em diferentes concentrações ácidas.

Sinais na região de  $\delta$  5,2 ppm, em solução 2 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>, podem ser atribuídos à presença de água na amostras ( $\delta$  4,7 ppm), com sobreposição de outros picos de compostos, como por exemplo lipídeos com dupla ligação, que apresentaria sinais típicos em  $\delta$  5,3 ppm<sup>42</sup>, (figura 22). Isso indica que concentrações baixas de HNO<sub>3</sub> não são suficientes para oxidação de compostos lipídicos em amostras que apresentam altos teores de gordura em sua composição química.



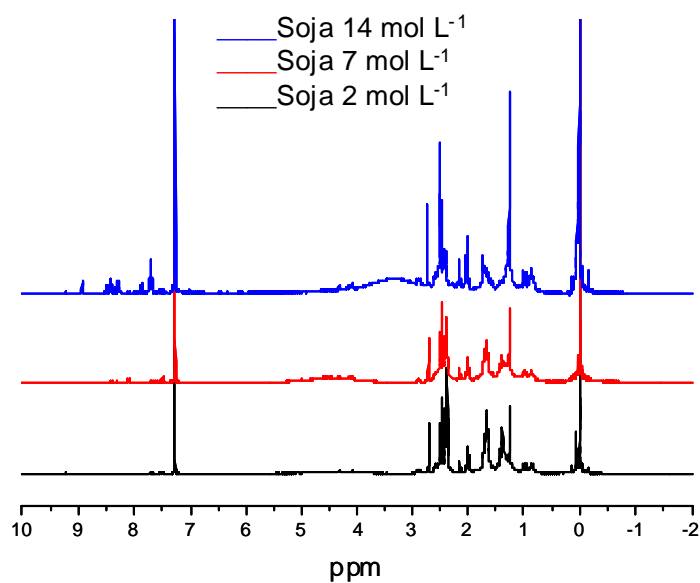
**Figura 22.** Expansão dos espectros de RMN <sup>1</sup>H na região de hidrogênios carbinólicos para amostras de vísceras decompostas em diferentes concentrações ácidas.

#### 5.5.4 Soja em Grãos

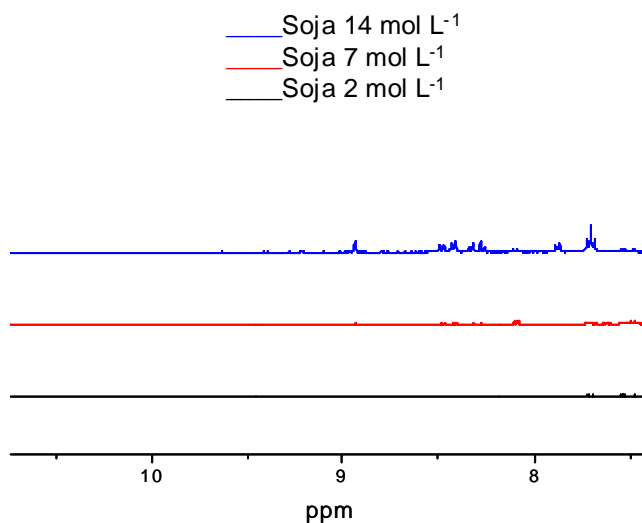
Na figura 23 é possível verificar que não há diferenças nos espectros nas diferentes concentrações ácidas na região dos compostos alifáticos ( $\delta$  0,5-3,0 ppm), mas alguma diferença pode ser observada na região típica dos compostos aromáticos e nitrocompostos ( $\delta$  7,0-10,5 ppm), como mostra a figura 24. Pode-se

observar menores quantidades e diversidade de compostos entre as diferentes concentrações ácidas.

Neste caso, foi possível verificar que não há indícios de resíduos de lipídeos com dupla ligação com sinais típicos em  $\delta$  5,3 ppm, indicando que a decomposição nessa matriz foi eficiente, mesmo com o decréscimo da concentração ácida.



**Figura 23.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para amostras de soja em grãos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

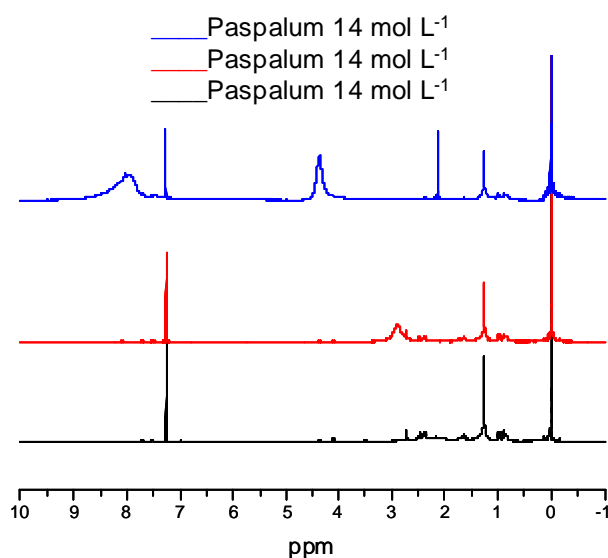


**Figura 24.** Expansão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  na região de aromáticos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

### 5.5.5 Paspalum

A figura 25 apresenta os espectros para as diferentes concentrações ácidas na decomposição de amostras de paspalum.

Observa-se que em concentrações superiores de  $\text{HNO}_3$  (14 e 7 mol  $\text{L}^{-1}$ ), os espectros mostram-se mais complexos, ou seja, com maior número de compostos formados após a decomposição assistida por forno com radiação microondas. Conclusão semelhante à previamente obtida em trabalho anterior que avaliou o mesmo tipo de amostra<sup>37</sup>.



**Figura 25.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H para amostras de Paspalum em grãos decompostas em diferentes concentrações ácidas.

### 5.6. Separação dos Isômeros de NBA's e Análise das Amostras

Após a definição da coluna cromatográfica a ser utilizada, estudos sobre a força da fase móvel foram realizados.

Misturas em porcentagem de H<sub>2</sub>O:Metanol (70:30) e H<sub>2</sub>O:Metanol (70:30) + 0,05% de TFA, H<sub>2</sub>O:Acetonitrila:Metanol (80:15:5) + 0,05% de TFA e H<sub>2</sub>O:Acetonitrila:Metanol (75:20:5) + 0,05% de TFA foram empregadas inicialmente como fase móvel. Observou-se uma melhor separação cromatográfica quando do emprego de ácido trifluoracético na fase móvel. Segundo Chen e Zhang (1997)<sup>43</sup> os NBA são ácidos orgânicos e quando dissociados em água formam íons aniônicos. A pequena diferença de pK<sub>a</sub> faz com que os três isômeros eluam quase que ao mesmo tempo, especialmente *m*- e *p*-NBA. A separação dos três isômeros foi significativamente maior com o uso de um supressor de ionização, como o ácido acético, misturado na fase móvel.

Nesse caso, uma melhor resolução, que é uma medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos, melhores separações e menores tempos de análise, foram obtidos utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>O:Acetonitrila:Metanol (75:20:5) e 0,05% de TFA como supressor de ionização dos grupos ácidos dos NBA's.

O tempo de retenção (*tr*), que é o tempo transcorrido desde o momento da injeção da amostra até que se tenha o máximo do pico, foi utilizado como modelo de comparação entre as diferentes amostras e o padrão analítico <sup>44</sup>. Este tempo é característico do soluto, do fluxo da fase móvel e da temperatura da coluna. O mesmo pico, na mesma coluna, em idênticas condições de análise terá sempre o mesmo tempo de retenção. Esse fato permite utilizar os tempos de retenção para identificação dos picos já que, em condições estritamente controladas, são reprodutíveis <sup>45</sup>.

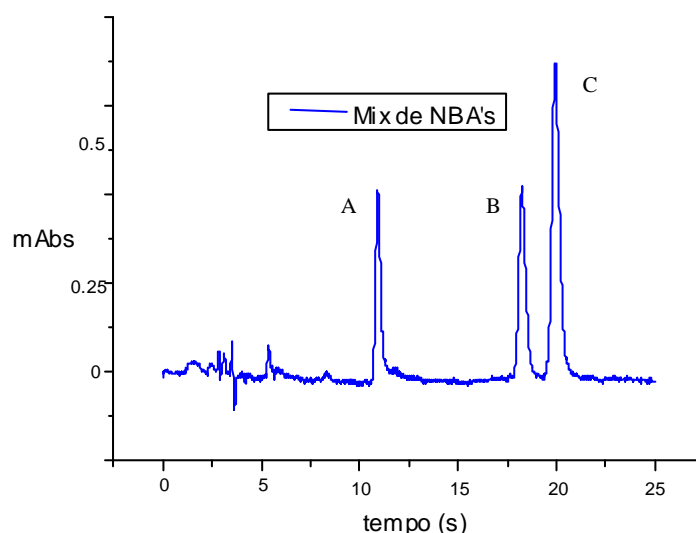
A figura 26 mostra o cromatograma obtido através da injeção da mistura padrão dos isômeros *o*-, *m*- e *p*- do ácido nitrobenzóico na concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup> para cada analito. As condições cromatográficas estão descritas na tabela 4.

Os tempos de retenção obtidos para os padrões estão descritos na tabela 9.

**Tabela 9.** Tempo de Retenção Típico dos Padrões, (*n*=6).

Isômero	Tempo de Retenção (min)
<i>o</i> -NBA	10,9
<i>m</i> -NBA	18,2
<i>p</i> -NBA	19,9





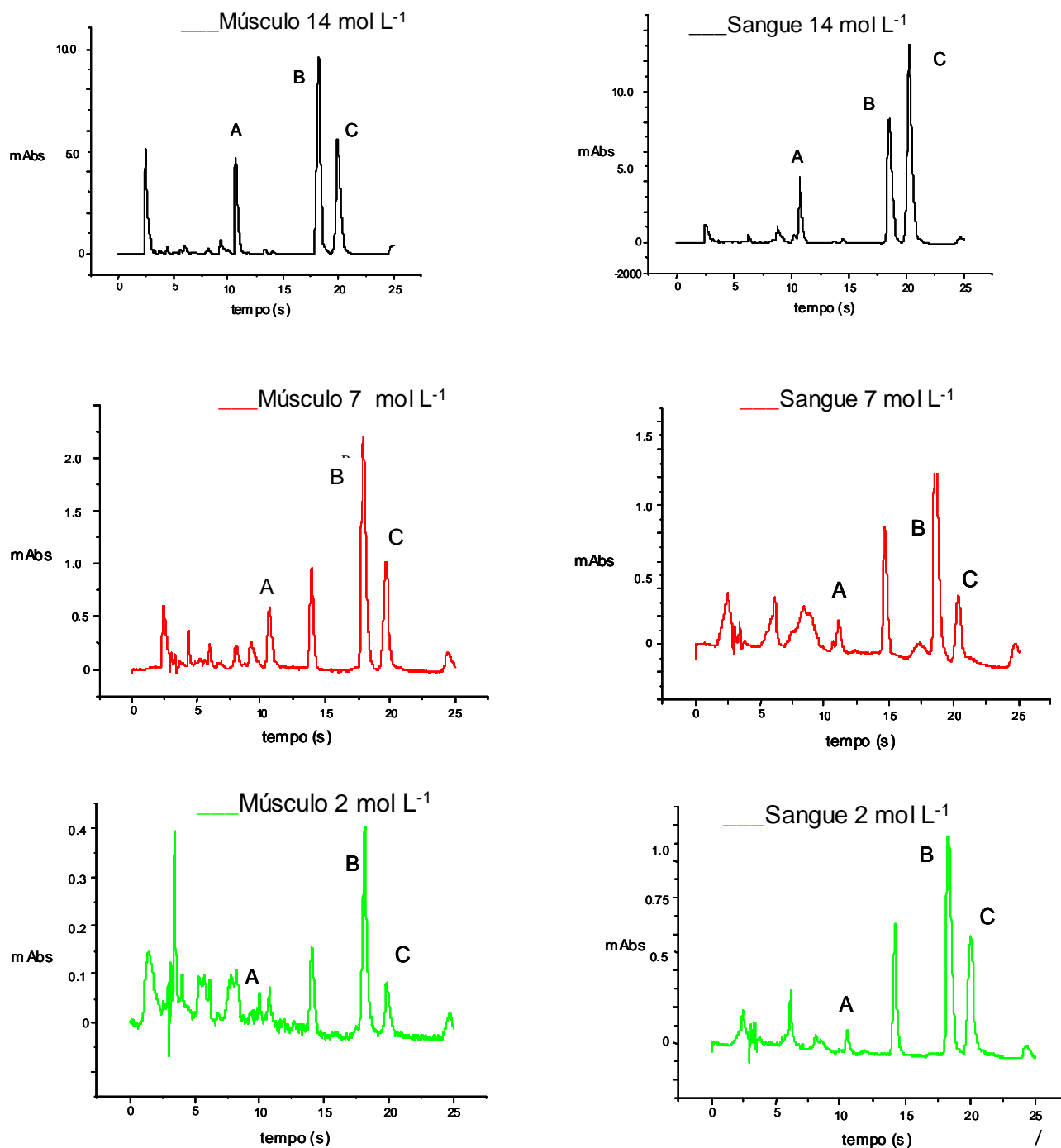
**Figura 26.** Cromatograma dos padrões de *o*-NBA (A), *m*-NBA (B) e *p*-NBA (C), concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A ordem de eluição de cada analito presente na mistura padrão dos isômeros foi determinada pela injeção, nas mesmas condições cromatográficas, de soluções com concentração  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada isômero individualmente.

Para verificar qualitativamente os produtos de decomposição ácida nas amostras tratadas, os cromatogramas das amostras com as mesmas características químicas foram comparados entre si.

### 5.6.1. Separação dos Isômeros de NBA's nas Amostras de Músculo e Sangue Bovino

A figura 27, demonstra os cromatogramas para músculo e sangue bovino decompostos nas concentrações de 14, 7 e  $2 \text{ mol L}^{-1}$ . Verifica-se que com a diminuição da concentração ácida, há um decréscimo das absorvâncias dos isômeros do ácido nitrobenzóico. Com o emprego de soluções mais diluídas, é perceptível o decréscimo dos isômeros formados nas soluções resultantes após a decomposição ácida.



**Figura 27.** Cromatogramas das amostras de músculo e sangue bovino decompostos com HNO<sub>3</sub> 14, 7 e 2 mol L<sup>-1</sup> nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o*-NBA (A), *m*-NBA (B) e *p*-NBA (C).

A tabela 10, mostra os tempos de retenção para esse grupo de amostras. É possível perceber que os tempos de retenção, são bem próximos ou exatamente os mesmos dos isômeros estudados. Também se conclui, através das intensidades de absorção de cada analito, que o isômero *m*-NBA pode ser o mais representativo nesse grupo de amostras.

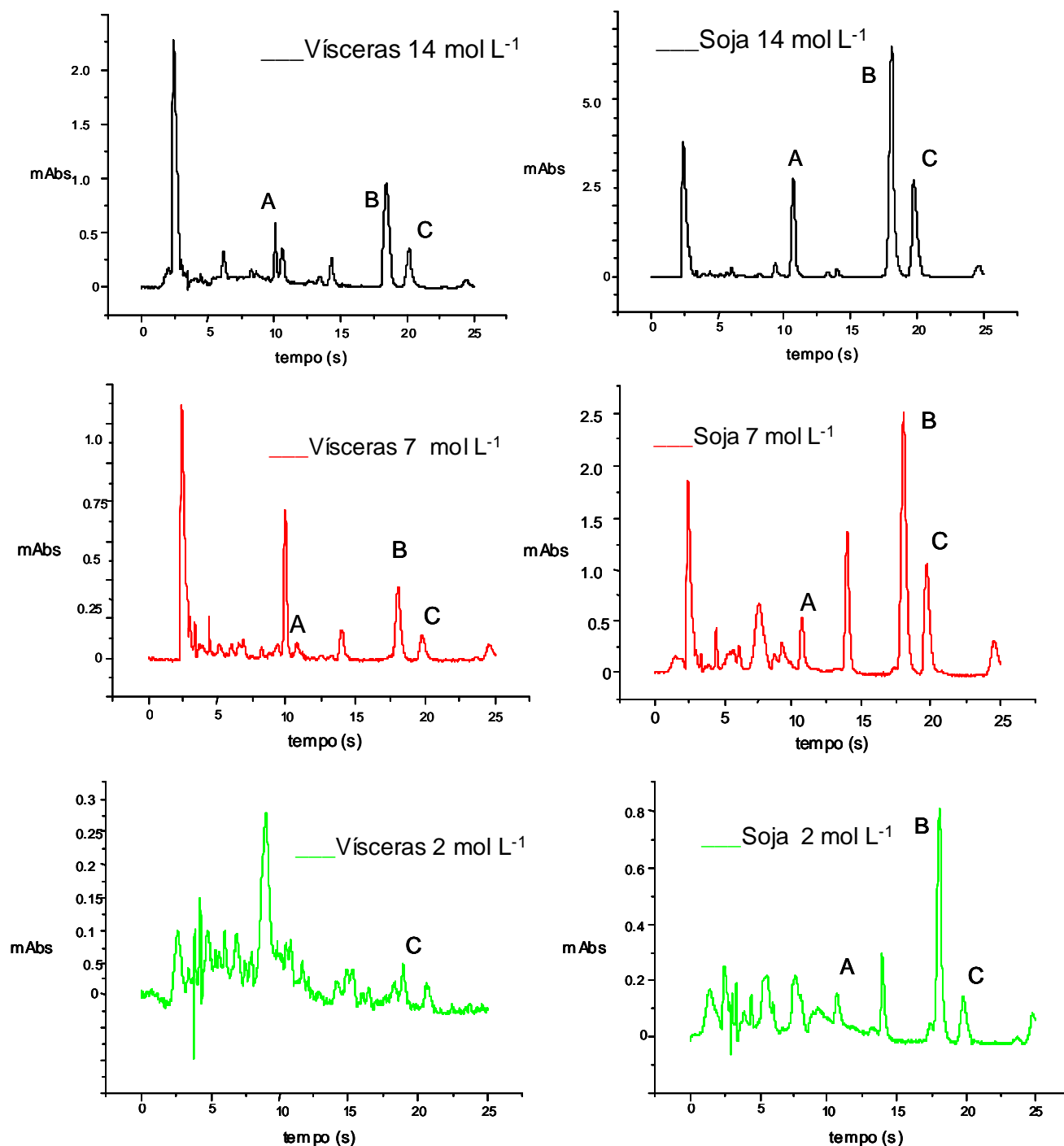
**Tabela 10.** Tempo de Retenção Típico para as Amostras de músculo e sangue bovino, ( $n=2$ ).

Amostras	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de Retenção (min)
Músculo Bovino	14	<i>o</i> - 10,8; <i>m</i> -18,2 e <i>p</i> -20,0
Músculo Bovino	7	<i>o</i> - 10,7; <i>m</i> -17,9 e <i>p</i> -19,6
Músculo Bovino	2	<i>o</i> - 10,8; <i>m</i> -18,1 e <i>p</i> -19,9
Sangue Bovino	14	<i>o</i> - 10,8; <i>m</i> -18,5 e <i>p</i> -20,2
Sangue Bovino	7	<i>o</i> - 10,7; <i>m</i> -18,6 e <i>p</i> -20,3
Sangue Bovino	2	<i>o</i> - 10,5; <i>m</i> -18,3 e <i>p</i> -20,0

### 5.6.2. Separação dos Isômeros de NBA's nas Amostras de Vísceras e Soja em grãos

Na figura 28, estão representados os cromatogramas obtidos na análise de vísceras bovina e soja em grãos decompostos nas concentrações de 14, 7 e 2 mol L<sup>-1</sup>. Observa-se a mesma diminuição nas intensidades de absorbância dos compostos com a diminuição da concentração ácida, tanto para as amostras de vísceras como par as de soja. Verifica-se também, que o isômero *o*-NBA não está presente nas vísceras decompostas em 7 e 2 mol L<sup>-1</sup> e que somente o isômero *p*-NBA aparece nas amostras decompostas com solução 2 mol L<sup>-1</sup>. Isso pode sugerir que uma solução ácida diluída não proporciona decomposições efetivas e torna-se necessário

o uso de concentrações ácidas mais elevadas para a solubilização dos compostos orgânicos contido nessa matriz..



**Figura 28.** Cromatogramas das amostras de vísceras bovina e soja em grãos decompostos com HNO<sub>3</sub> 14, 7 e 2 mol L<sup>-1</sup> nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o*-NBA (A), *m*-NBA (B) e *p*-NBA (C).

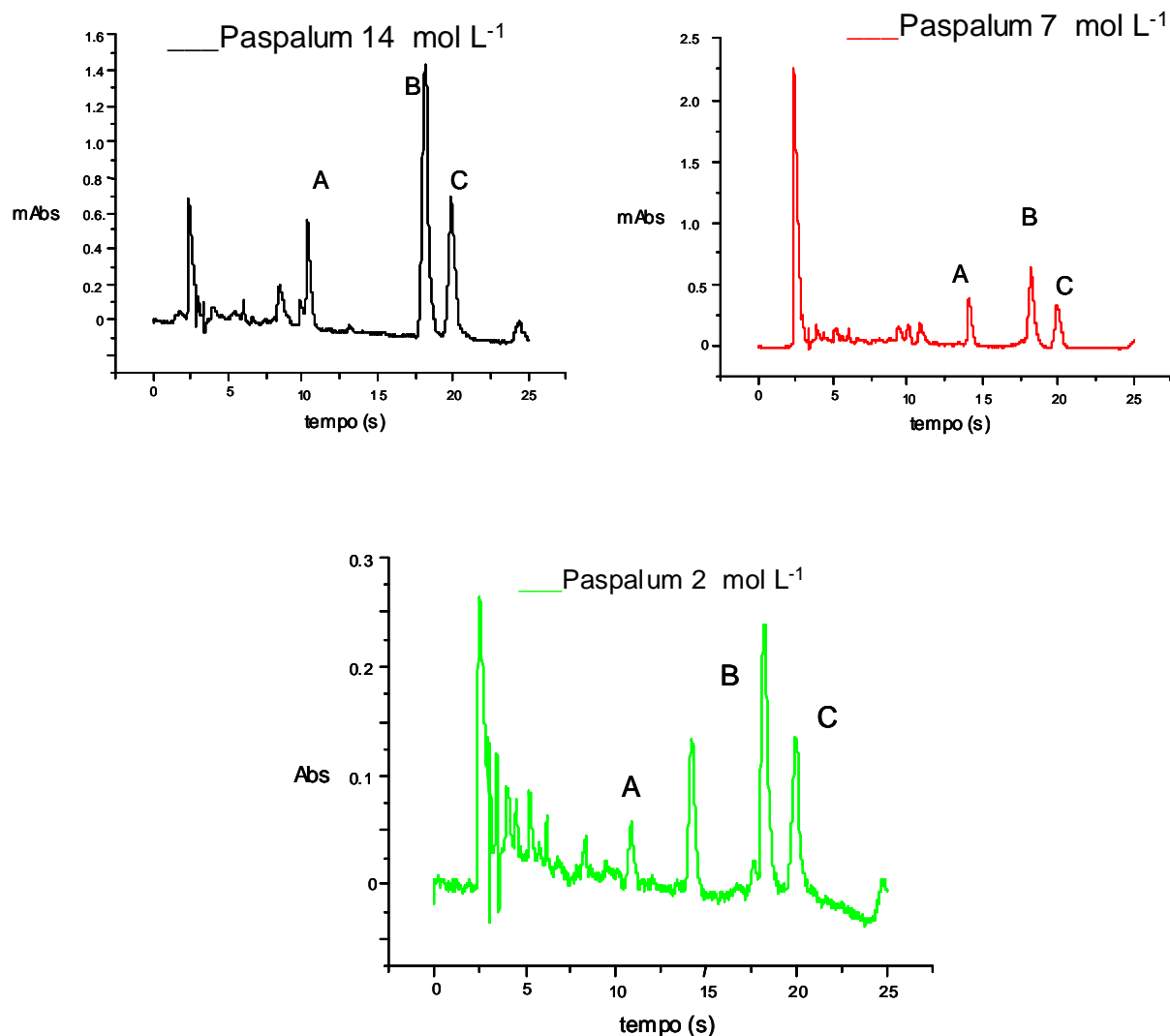
O tempo de retenção para esse grupo de amostras está descrito na tabela 11. Observa-se o mesmo efeito encontrado para amostras com altos teores de proteína bruta, porém para as vísceras alguns dos isômeros não estão presentes nas soluções mais diluídas.

**Tabela 11.** Tempo de Retenção Típico para as amostras de vísceras bovina e soja em grãos, ( $n=2$ ).

<b>Amostras</b>	<b>Concentração (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>
Vísceras bovina	14	<i>o- 10,1; m-18,4 e p-20,1</i>
Vísceras bovina	7	<i>o- *; m-18,1 e p-19,8</i>
Vísceras bovina	2	<i>o- *; m-* e p-19,0</i>
Soja em grãos	14	<i>o- 10,7; m-18,0 e p-19,8</i>
Soja em grãos	7	<i>o- 10,7; m-18,0 e p-19,7</i>
Soja em grãos	2	<i>o- 10,7; m-18,0 e p-19,8</i>

### 5.6.3. Separação dos Isômeros de NBA's nas Amostras de Paspalum

Para as amostras de paspalum, intensidades bem menores na produção dos ácidos nitrobenzóicos foram observadas nas diferentes concentrações ácidas utilizadas quando comparada com tecido animal, figura 29. Na tabela 12 os tempos de retenção para cada isômero são descritos.

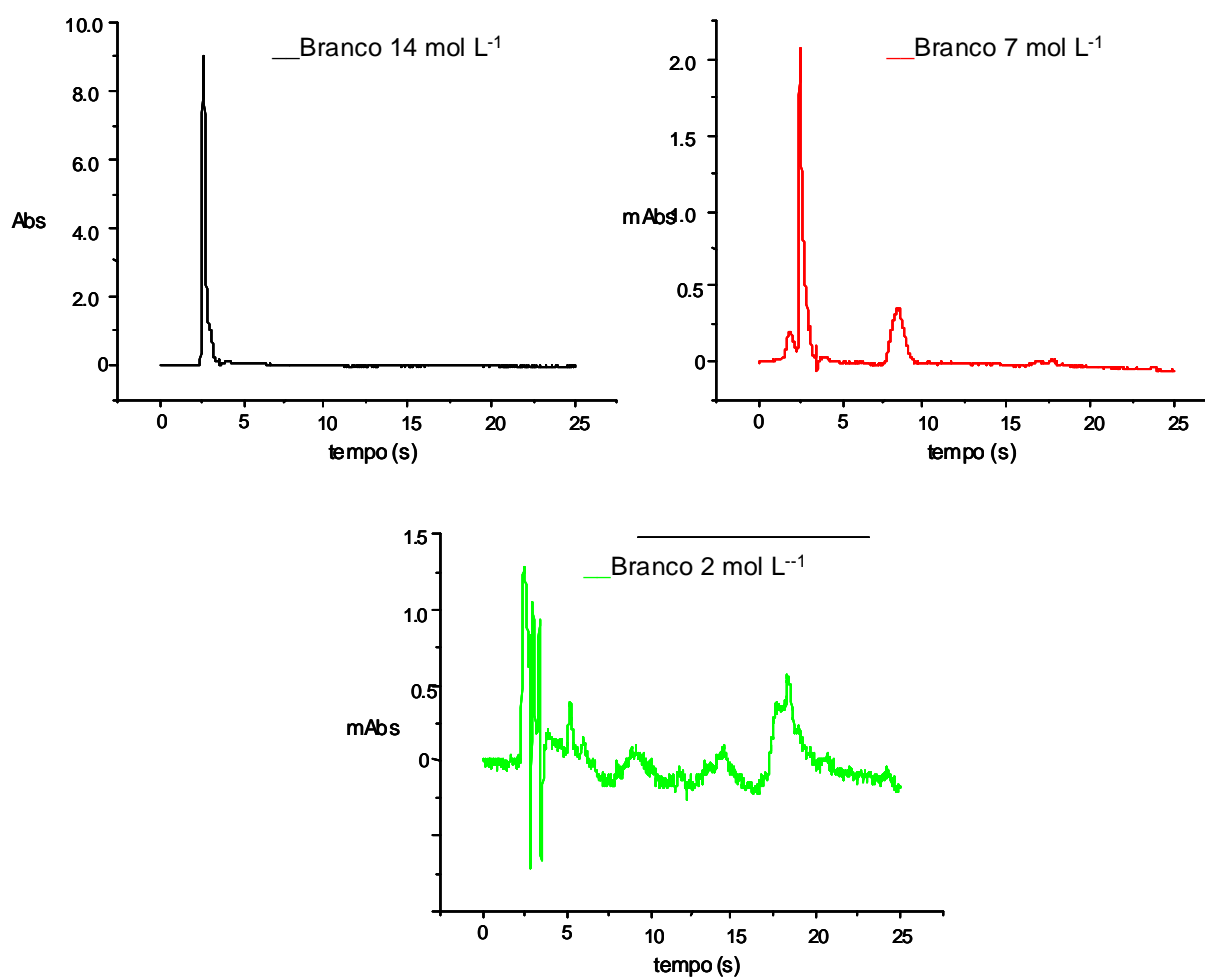


**Figura 29.** Cromatogramas da amostra de paspalum decomposta com HNO<sub>3</sub> 14, 7 e 2 mol L<sup>-1</sup> nas condições cromatográficas descritas na tabela 4. *o*-NBA (A), *m*-NBA (B) e *p*-NBA (C).

**Tabela 12.** Tempo de Retenção Típico para as amostras de paspalum, ( $n=2$ ).

Amostras	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de Retenção (min)
Paspalum	14	<i>o</i> - 10,4; <i>m</i> -18,2 e <i>p</i> -19,9
Paspalum	7	<i>o</i> - 10,9; <i>m</i> -18,2 e <i>p</i> -20,0
Paspalum	2	<i>o</i> - 10,9; <i>m</i> -18,2 e <i>p</i> -19,9

Cromatogramas dos brancos analíticos foram também realizados para verificar a ausência de compostos interferentes e constatar que a presença dos produtos formados era inerente das diferentes composições químicas das amostras. No tempo de análise dos analitos de interesse não foram observados picos interferentes. A figura 30 demonstra esses cromatogramas.



**Figura 30.** Cromatogramas dos brancos analíticos decomposto com HNO<sub>3</sub> 14, 7 e 2 mol L<sup>-1</sup> nas condições cromatográficas descritas na tabela 4.

Pode-se perceber pela análise qualitativa das amostras estudadas que houve uma predominância do isômero *m*-NBA foi superior. Essa preponderância de uma

espécie de isômero foi verificada por Pratt et al.<sup>24</sup> em matrizes contendo fenilalanina. Segundo os autores, uma oxidação da cadeia de  $-COOH$  seguida pela nitração poderia resultar na formação de *m*-NBA como produto de reação primário, devido aos efeitos no grupo carboxílico. Nitração da fenilalanina seguida da oxidação das cadeias de aminoácidos poderia resultar em espécies *o*- e *p*-NBA como produtos majoritários.



## 6. CONCLUSÕES

No estudo de avaliação das condições do forno de microondas os resultados obtidos foram esperados e concordantes com os relatados na literatura, mostrando a necessidade de potências elevadas levando a temperaturas maiores nos frascos reacionais.

O emprego de ácidos diluídos comprovou ser uma alternativa viável e recomendável, reduzindo o volume de reagentes e conseqüentemente as variedades de resíduos advindos dos processos de decomposição.

Para análise de traços pode-se obter menores diluições, com ácidos diluídos, aumentando a sensibilidade da técnica utilizada, além de introduzir menores quantidades de contaminantes no processo de preparo de amostra.

O emprego da solução  $\text{HNO}_3$   $7,0 \text{ mol L}^{-1}$  propiciou a recuperação de analitos com quantidades de carbono orgânico residual e desvios padrão menores quando comparado com  $\text{HNO}_3$  concentrado.

O método de quimiometria empregado mostrou-se eficiente, pois possibilitou agrupar as amostras em diferentes grupos. A caracterização das amostras empregando os métodos propostos foi útil para verificar qual solução extrai a maior concentração de analitos e como essa distribuição é feita durante o processo de decomposição.

As melhores extrações para compostos polares foram obtidas quando se utiliza éter etílico destilado como solvente.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos com as soluções mais diluídas mostram-se mais simples e menos complexos do que os obtidos em maiores concentrações.

Soluções mais concentradas têm uma maior variedade de compostos orgânicos tais como nitrocompostos, compostos alifáticos e aromáticos, tendo uma possível explicação pelo alto poder oxidante dessas misturas em altas pressão e temperatura, gerando dessa forma uma quantidade maior de resíduos orgânicos.

Foi possível verificar a presença de compostos aromáticos e nitrocompostos por RMN  $H^1$ , não sendo possível separar e identificar individualmente cada espécie. Isso já era esperado, pela diversidade de amostras avaliadas e suas diferentes composições químicas.

As separações dos isômeros de ácido nitrobenzóico empregando HPLC-UV-vis foram obtidas utilizando fase estacionária  $C_{18}$ , cromatografia em fase reversa empregando fase móvel  $H_2O$ :Acetonitrila:Metanol (70:25:5) + 0,05% de TFA.

A comparação entre os resíduos produzidos e a composição química original das amostras, demonstra que as matrizes biológicas contendo aminoácidos, proteínas e lipídeos em sua estrutura, levam a produção dos isômeros de ácido nitrobenzóico e outros compostos orgânicos oriundos dos processos de clivagem de ligações químicas.

O *m*-NBA foi obtido na maioria dos resíduos resultantes de decomposição ácida assistida por radiação microondas de amostras biológicas, confirmando a hipótese de trabalhos anteriores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WIETESKA, E.; ZIÓEK, A.; DRZEWINSKA, A. Extraction as a method for preparation of vegetable in samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v.330, p.251, 1996.
2. ZHOU, C.Y.; WONG, M. K.; KOH, L. L.; WEE, Y. C. Microwave digestion of biological samples with tetramethylene hidroxiide and etylene tetracetic acid for element determination. **Talanta**, v.43, p.1061, 1996.
3. KINGSTON, H.M.; JASSIE, L.B. **Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Praticce**. Washington: ACS Professional Reference Book, 76, 1997. v.x
4. KINGSTON, H.M.S.; HASWELL, S.J. **Microwave-Enhanced Chemistry – Fundamentals, Sample Preparation and Applications**. Washington: DC, EUA. American Chemical Society, 1997. v.M
5. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. Investigations on the carbon balance in decomposition of biological materials with Nitric Acid. **Frenesius Z. Anal. Chem**, v.XXX, p. 322-345, 1985.
6. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric-acid. 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Anal. Chim. Acta**, v.226, p. 1-16, 1989.
7. KRUG, F.J – **III Workshop Sobre Preparo de Amostra**. São Carlos: UFSCar, 2000.
8. LUNA, A. S. **Química Analítica Ambiental**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 2003. p. 13.
9. HEWITT, C.N. **Instrumental Analysis of Pollutants**. Lancaster; Editora Elsevier Applied Science, 1991. p.1.

10. COTTON, F.A.; WILKINSON, G. **Advanced Inorganic Chemistry**. New York: Wiley-Interscience. 1996. p.112-113, 320-329, 709.
11. NEKRÁSOV, B.V. **Química General**. URSS:mmmm
12. LEE, J. D. **Química Inorgânica Não tão Concisa**. Inglaterra. 1996. p.250-255.
13. CARRILHO, E.N.V.M.; GONZALEZ, M.H.; NOGUEIRA, A.R.A.; CRUZ, G.M.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted acid-decomposition of biological samples using a single heating program for element determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **J. Agric. Food Chem**, v.50, p.4164-4168, 2002.
14. KOTZ, L.; HENZE, G.; KAISER, G.; PAHLKE, S.; VEBER, M.; TÖLG, G. Wet mineralization of organic matrices in glassy-carbon vessel in a pressure bomb system for trace elements analysis. **Talanta**, v 50, p.4164, 2002.
15. STOEPLER, M.; MÜLLER, K.P.; BACKHAUS, F. Pretreatment studies with biological and environmental materials 3. Pressure evaluation and carbon balance in pressurized decomposition with nitric-acid. **Frenesius Z. Anal. Chem**, v.279, p.107, 1979.
16. MYAZAWA, M.; PAVAN, M., A.; BLOCK, M., F. Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe, And P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grasss leaf tissues by a HCl extraction method. **Commun. in Soil. Sci. Plant Anal**, v.15, p.141, 1984.
17. CHAO, Y., Z.; WONG, M., K.; KOH, L., L.; WEE, Y., C. Microwave-assisted diluted acid extraction of trace metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v.11, p.585, 1996.
18. CHOW, P., Y., T.; CHUA, T., H.; OW, B., Y. Diluted-acid digestion procedure for the determination of lead, copper, and mercury in traditional chinese medicines bBy atomic absorption. **Analyst**, v.120, p.1221, 1995.

19. DUGENEST, S.; OLLE, M.; RIBES, A.; GRENIER-LOUSTALOT, M., F. Chemical characterization of municipal solid waste incineration residue. Dissolution of elements with microwave-diluted acids digestion technique compared to conventional methods.

**Analisis**, v.26, p.256,1998.

20. WU, S., L.; FENG, X., B.; , WITTMIEIER, A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v.12, p.797, 1997.

21. VESCHETTI, E.; MARESCA, D.; CUTILLI, D.; SANTARSIERO, A. & OTTAVIANI, M. Optimization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> action in sewage-sludge microwave digestion using  $\Delta$  pressure vs temperature. **Microchem. J.**, v.67, p.171-179, 2000.

22. GOUVEIA, S.T.; SILVA. F.V.; COSTA, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations . **Anal. Chim. Acta**, v.445, p. 269-275, 2001.

23. NELSON, D., L.; COX, M.,M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 975.

24. PRATT, K., W.; KINGSTON, H.M.; MAcCREHEN, W., A.; KOCH, W., F. Voltammetric and liquid chromatographic identification of organic products of microwave-assisted wet ashing of biological samples. **Analytical Chemistry**, v.60, p. 2024-2027, 1988.

25. CARRILHO,E.,N.,V.,M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J., A.; SOUZA, G., B., CRUZ, G., M. An attempt to corralate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion. **Frenesius J. Anal. Chem.**, v.371, p. 536-540, 2001.

26. MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Aplicação da Análise Exploratória na Diferenciação de Vegetais. **Braz. J. Food Technol.**, v.2, p.73-79, 1999.

27. MASSART, D.L.; VANDEGINSTE, B.G.M.; BUYDENS, L.M.C.; DE JONG, S.; LEWI, P.J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics; Data Handling In Science and Technology**. Amsterdam: B. Elsevier, 1997. v.20.

28. SMOLIŃSKI, A., WALCZAK, B., EINAX, J. Robust SIMCA - Bounding Influence of Outliers **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, 64, 45-54, 2002.

29. KOKOT, S.; KING, G.; KELLER, H.R.; MASSART, D. L. Application of chemometrics for the selection of microwave digestion procedures. **Analytica Chim. Acta**, v.268, p.81-84, 1992.

30. CASS, Q., B. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001, 77p.

31. ERLLENMEYER, E., LIPP, A. Chemical and metabolic studies on phenylalanine\* I. the nitration of phenylalanine. **The Journal of Biological Chemistry**. 219, 179, 1939.

32. TAKAYAMA, Y.; TSUBUKU, Y. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v.17, p.109, 1942.

33. WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric-acid. 2. Identification of the reaction products. **Anal. Chim. Acta**, v.226, p.17-30, 1989.

34. REID, H., J.; GREENFIELD, S.; EDMONDS, T.E. Investigation of decomposition of microwave digestion of food samples. **Analyst**, v.120, p.1543-1548, 1995.

35. DANIEL, M., M.; BATCHELOR, J., D.; RHOADES, C.; JONES, B., T. The effect of digestion temperature on matrix decomposition using a high pressure asher. **Atomic Spectroscopy**, v.19 (6), p 198-203, 1998.

36. KUBRAKOVA, I. V.; FORMANOVSKII, A. A.; KUDINOVA, T.F.; KUZ'MIN, N.M. Microwave oxidation of organic compounds by nitric acid. **Journal of Analytical Chem.** v. 54 (5), p.460-465, 1999.

37. ARAÚJO, J.C.L., GONZALEZ, M.H., FERREIRA, A.G., NOGUEIRA, A.R.A., NÓBREGA, J.A. Effect of acid concentration on closed vessel microwave-assisted acid digestion of plant materials **Spect. Acta B**, v. 57 (12), p. 2121-2132, 2002.

### 38. HandBook

39. SKOOG, D., A.; HOLLER, F., J.; NIEMAN, T.,A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p 743-744.

40. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. New York, 1995.

41. PIROUETT Multivariate Data Analysis for IBM PS Systems, version 2.1: Infometrix, Seattle, WA, USA, 1997.

42. FORATO, L., A.; COLNAGO, L.,A.; GARRATT, R.,C.; LOPES, M., A. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified alpha zeins by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, p.106-114, 2000.

43. CHEN, P., ZHANG, M. Separation of position isomers of nitrobenzoic acid by reverser-phase liquid chromatography with 2-propanol-water-acetic acid as eluent. **Journal of Chromatography A**. v.773, p.365-367, 1997.

44. LANÇAS, F., M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240p.

45. McNAIR, H., M. **Am. LAB.** 33, maio, 1980.