

ALLEN LOPES DE BARROS

**EMPREGO DE SISTEMA EM FLUXO A ALTAS TEMPERATURA E PRESSÃO NO
PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE E SANGUE DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos para obtenção do título de Mestre
em Química.

Área de Concentração: Química Analítica
Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

SÃO CARLOS, SP

2008

Dedico este trabalho ao bom Deus, na certeza de que foi Ele quem primeiro acreditou e proporcionou todos os meios.

À minha esposa Gyselle, minha avó Mirtes e minha mãe Sandra.

Ao prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pelo apoio e oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação.

À Embrapa Pecuária Sudeste, por ter-me proporcionado as condições necessárias às atividades experimentais em seus laboratórios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa e auxílio financeiro concedidos, acreditando na importância da pesquisa científica em benefício da Sociedade.

Aos professores – Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega – e demais amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada, da Universidade Federal de São Carlos, pela acolhida, convivência e inestimável aprendizado em nossas reuniões de grupo e fora delas.

A todos os amigos da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo ótimo ambiente de trabalho proporcionado.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, da Universidade Federal do Ceará, e à minha querida amiga e colega de profissão, Geiza Rebouças, por acreditarem em meu potencial e lançarem a idéia.

À minha amada esposa Gyselle, por sua companhia incomparável em todos os momentos desta caminhada; primeira a me incentivar, seu apoio incondicional, seu amor, paciência e cuidado fizeram toda a diferença e deram mais sentido a tudo que foi feito.

À minha avó Mirtes Camurça e minha mãe Sandra, pelas oportunidades que me proporcionaram, por seu amor, apoio e esforço diante deste novo desafio.

Ao meu irmão Fernando, pelo amor, amizade, companheirismo e apoio; ao meu irmão Adam pelo incentivo e a minha prima Glaudênia pela torcida.

À minha sogra Miliani, pela presença firme e apoio com que podemos sempre contar; à tia Magda, que sempre dá um jeitinho e demonstra tanta dedicação e amor em tudo o que faz na busca de tornar nossos sonhos reais; à vó Lindalva, por ter me adotado como seu neto do coração e ao tio Leine, pelo exemplo de humanidade.

Aos casais Carlos e Ticiara Saraiva e Giovanni e Adriana Almeida, pela amizade fiel e por sua presença constante mesmo à distância, meu muito obrigado.

Às amigas Silvia Brondi e Bernadete Figueiredo, pelos muitos momentos de partilha de experiências, dificuldades, vitórias e por suas palavras de ânimo quando mais precisei.

Aos vizinhos, que na convivência diária se fizeram amigos, Maria Aparecida Rodrigues – Cidinha, mãe que Deus emprestou a mim e Gyselle –, Laércio Javarez, André e Renato Billia, Kátia Gabrielli, sentirei falta de nossos almoços e conversas. Vocês são grandes companheiros.

A Silvia Plepis e Andreia Cardozo, do Serviço de Pós-Graduação, e Eliana Cordeiro, do Serviço de Biblioteca e Informação, pela disponibilidade, atenção e carinho tão visíveis no trabalho que realizam.

Aos amigos que fiz no IQSC agradeço pela torcida, pelos momentos de descontração e de estudo, pela partilha das experiências; agradeço pelo muito que aprendi com vocês, com sua força interior, sua coragem e capacidade de enfrentar a vida.

RESUMO

No presente trabalho, um sistema em fluxo operando sob altas temperaturas e pressão foi avaliado, com o objetivo de solubilizar amostras de sucos, leite e sangue de bovinos para a determinação de constituintes inorgânicos. O sistema emprega uma bomba de alta pressão utilizada em cromatografia líquida para o transporte dos líquidos através de um tubo capilar metálico aquecido e de um capilar restritor de menor diâmetro interno, com a finalidade de se obter digeridos ácidos das amostras em estudo. A eficiência da digestão foi avaliada a partir da determinação do carbono residual, realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado. Espectrometria de absorção atômica com chama e geração de hidretos voláteis foi usada para as determinações de selênio. Foram exploradas diferentes configurações relacionadas ao sistema, tais como emprego de um capilar restritor e da bobina digestora construída em aço inoxidável com diferentes comprimentos, pressões de trabalho e formas de introdução das amostras, além da proposta alternativa para a inserção de amostras que permitiu contornar a inconveniente precipitação das proteínas antes da entrada das amostras no sistema. Para isso, configuração que possibilitou mistura entre a amostra e os reagentes por confluência no interior do sistema sem prévia mistura foi avaliada. Os resultados indicaram a viabilidade do sistema, com a redução do carbono residual em mais de 60 %. Porém, problemas relacionados a perdas de elementos por volatilização necessitam ser contornados.

ABSTRACT

A flow injection system, operated under high temperature and high pressure conditions has been evaluated concerning the dissolution of fruit juices and samples of bovine milk and blood for the determination of inorganic constituents. In this system, a high pressure liquid chromatography pump was used for the transportation of liquid samples through a stainless steel heated capillary and finally through a restrictor capillary, which has a shorter inner diameter, so that the digestion of the samples could be attained. The residual carbon contents were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Hydride generation flame atomic absorption spectrometry was used for selenium determinations. Different configurations for the flow system were evaluated, such as variable lengths for the restrictor and digestion capillaries. Different working pressures as well as different ways for the sample introduction were tried out, being reached an alternative that avoided the precipitation of proteins before the introduction of the samples in the system. For this purpose, a configuration in which the contact between sample and reagents occurs inside the system, with no previous mixture, was evaluated. The results indicated the viability of the system which used the confluence configuration. Although digestion efficiency of 60 % was observed for milk samples, problems related to volatilization have to be circumvented.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Sistema em fluxo a altas temperatura e pressão.....	33
Figura 2 -	Digestor construído para uso no sistema em estudo.....	35
Figura 3 -	Etapas do programa de aquecimento utilizado nas digestões em forno de microondas.....	37
Figura 4 -	Diagrama do sistema em fluxo em desenvolvimento para decomposição de amostras a altas temperatura e pressão.....	38
Figura 5 -	Aspecto das soluções de material digerido e não-digerido obtidos a partir de leite bovino desnatado diluído nas proporções 1:10 e 1:5.....	49
Figura 6 -	Curvas analíticas de calibração (ABS vs. concentração) para selênio em diferentes faixas de concentração.....	55
Figura 7 -	Curvas analíticas de calibração para determinação de Se por HG-AAS.....	56
Figura 8 -	Avaliação do efeito de 50 mg L ⁻¹ de concomitantes em solução analítica 100 µg L ⁻¹ de Se.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições operacionais empregadas no ICP OES com configuração radial para a determinação do teor de RCC nos digeridos obtidos.....	36
Tabela 2 -	Eficiência de decomposição para a amostra de suco de laranja. Diluição 1:20, digestor de 26 cm de comprimento; 200 °C e 61 bar; vazão de 0,2 mL min ⁻¹ e 0,1mL min ⁻¹ , com os respectivos tempos de residência.....	41
Tabela 3 -	Teores de carbono residual para amostra de suco de laranja. Material digerido e não-digerido, com e sem degaseificação antes da determinação do RCC por ICP OES.....	42
Tabela 4 -	Eficiências de decomposição para amostra de leite bovino integral desproteinado. Digestor de 40 cm; 200 °C e 6 bar.....	44
Tabela 5 -	Eficiência de decomposição para amostra plasma bovino, injetado sob diluição 1:10. Digestor de 40 cm de comprimento; 200 °C e 6 bar.....	45
Tabela 6 -	Concentrações de metais determinadas por ICP OES em amostras de leite integral UHT e desnatado UHT, após digestão assistida por microondas.....	46
Tabela 7 -	Eficiências de decomposição para amostra de leite bovino integral. Digestor de 40 cm; T = 230 °C e P = 6 bar.....	48
Tabela 8 -	Teores de selênio obtidos em amostras de leite bovino desnatado e integral após digestão assistida por radiação microondas.....	57
Tabela 9 -	Composição química do tubo digestor utilizado no sistema em fluxo.....	58
Tabela 10 -	Percentuais agregados à concentração de selênio determinada em solução analítica de 100 µg L ⁻¹ de Se na presença de concomitantes em concentração de 50 mg L ⁻¹	59
Tabela 11 -	Estudo da interferência de cobre na determinação de 40 µg L ⁻¹ de Se por HG-AAS.....	60

Tabela 12 - Teores de selênio e recuperações obtidas, determinadas por HG-AAS em amostras de leite bovino UHT integral e desnatado, após decomposições no sistema em fluxo; digestor de 60 cm, 240 °C, 6 bar.....	61
Tabela 13 - Adição e recuperação de selênio em solução aquosa, após passagem pelo sistema em fluxo, com digestor aquecido a 240 °C e sob temperatura ambiente, 6 bar.....	63
Tabela 14 - Teores de selênio e recuperações obtidas, determinadas por HG-AAS a partir de soluções analíticas de Se tratadas no sistema em fluxo.....	65

SUMÁRIO

1 -	Introdução	12
2 -	Revisão da literatura	15
2.1 -	Decomposição de amostras biológicas por meio de sistemas em fluxo	16
2.2 -	Espectrometria de absorção atômica	20
2.3 -	Geração de hidretos em espectrometria atômica	23
2.4 -	O leite	27
2.5 -	Selênio	29
3 -	Parte experimental	31
3.1 -	Material e métodos	32
3.2 -	Soluções	37
3.3 -	Diagrama do sistema em estudo	38
4 -	Resultados e discussão	39
4.1 -	Testes de decomposição de diferentes matrizes	40
4.1.1 -	Amostras de sucos de fruta	40
4.1.2 -	Leite desproteinado	43
4.1.3 -	Plasma de sangue bovino	45
4.1.4 -	Leite bovino integral e desnatado	46
4.2 -	Otimização das condições de operação do sistema proposto	50
4.2.1 -	Pressão máxima de trabalho	50
4.2.2 -	Problemas de obstrução	50
4.2.3 -	Diluição da amostra	52
4.2.4 -	Concentração da solução oxidante	54
4.3 -	Determinação de selênio	55
5 -	Conclusão	67
6 -	Referências bibliográficas	70

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A alimentação é a via mais importante pela qual os elementos químicos são assimilados pelos organismos superiores, o que por si explica a importância da caracterização dos alimentos quanto aos teores dos diversos macro e micronutrientes.

Neste sentido, a quantificação e a especiação dos elementos químicos em tecidos dos organismos vivos nos fornecem informações úteis para a investigação do estado de saúde humana e animal. Essas informações podem servir de guia para a adequação nutricional conforme as necessidades características de cada espécie ou de um indivíduo em particular.

Muitos dos elementos requeridos à nutrição humana são reconhecidos como essenciais, o que significa que sua ausência na dieta pode causar danos sérios e irreversíveis ao organismo.

No entanto, um elemento que em certa dosagem ou faixa de concentração no organismo é considerado essencial, pode ser tóxico em outras concentrações. Exemplo disso é o que ocorre com os elementos zinco, cobre e selênio. De modo geral, existe uma quantidade adequada de consumo que deve ser observada para os nutrientes, sendo que a ingestão destes em quantidades diferentes das recomendadas pode resultar em prejuízos à saúde.

Frente à importância da quantificação e da caracterização de elementos químicos e de seus compostos nas mais diversas matrizes biológicas e ambientais, a variedade de técnicas disponíveis possibilita a escolha da alternativa mais apropriada para cada fim específico.

No entanto, independentemente da técnica a ser usada, os primeiros passos na seqüência analítica têm basicamente por objetivo condicionar adequadamente a amostra para posterior processamento, sendo que a escolha do procedimento a ser adotado com este fim depende, por exemplo, do tipo de amostra, da natureza e da concentração do elemento a ser determinado, do método de análise escolhido e, além disso, da precisão e exatidão desejadas (BURGUERA; BURGUERA, 1998b; KRUG, 2006).

Normalmente associados aos procedimentos de preparo são observados grande consumo de tempo e intensa manipulação da amostra, o que pode ser uma importante fonte de erros e contaminações (OLIVEIRA, 2003). Nesse contexto, são de grande interesse procedimentos que resultem em maior rapidez no tratamento de amostras, especialmente em áreas nas quais há uma alta demanda de análises, como as áreas clínica, industrial e ambiental (LUQUE DE CASTRO; SILVA, 1997; GRÄBER et al., 1999). Para atender a essa demanda, diferentes metodologias têm sido propostas, dentre as quais pode ser destacado o uso de sistemas que operam por injeção em fluxo.

A principal vantagem do uso de sistemas em fluxo no preparo de amostras é a inerente possibilidade de sua completa automação, em adição às altas freqüências de amostragem e redução do consumo de reagentes, das perdas de analito e dos riscos de contaminação, devido à simplificação no manuseio da amostra (GRÄBER et al., 1999).

Em sistemas desse tipo as configurações nas quais se faz uso da radiação microondas como fonte de energia têm a vantagem de promover o aquecimento da amostra de modo rápido e eficiente, reduzindo o tempo necessário para a etapa de preparo (BURGUERA et al., 1986), mas também oferecem condições inadequadas à digestão de diversas matrizes (GRÄBER et al., 1999; ARRUDA et al., 1997), em decorrência das limitações físicas dos materiais empregados na confecção da bobina de digestão, materiais esses que devem ser transparentes às microondas e comumente não resistem a elevadas temperaturas e pressões de operação (GRÄBER et al., 1999; HAIBER et al., 2000).

Como alternativa ao uso da radiação microondas no desenvolvimento de procedimentos de decomposição em fluxo, o uso de aquecimento resistivo em sistemas em fluxo que operam sob altas temperatura e pressão (GRÄBER et al., 1999) tem sido investigado em diversos trabalhos. Tais sistemas têm em potencial as características gerais

próprias dos sistemas em fluxo, com a vantagem de superar as limitações quanto à temperatura e pressão de trabalho.

Nesta dissertação, buscou-se avaliar as potencialidades de uso de sistema em fluxo operando sob aquecimento resistivo na decomposição de diferentes matrizes como sucos de frutas, plasma sanguíneo, soro e leite de bovinos, visando posterior quantificação de elementos químicos de relevante importância em nutrição animal.

REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Decomposição de amostras biológicas por meio de sistemas em fluxo

Visando disponibilizar os analitos para a detecção por meio de técnicas apropriadas, diferentes fontes de energia (radiações ultravioleta, infravermelho e microondas, por exemplo) podem ser utilizadas em processos de decomposição de amostras (SILVA, 2004).

Nos procedimentos de digestão assistida por radiação microondas, obtém-se vantajosa redução do tempo empregado no processo quando comparados a outras formas de transferência de calor, pois a radiação incidente fornece energia diretamente para o seio da solução da amostra, sem depender, portanto, da capacidade de transferência de calor das paredes do recipiente em que está inserida.

Desta forma, a taxa de aquecimento torna-se consideravelmente maior do que a obtida por aquecimento convectivo, e assim um processo de digestão que consumiria algumas horas pode ter seu tempo reduzido a poucos minutos (BURGUERA; BURGUERA, 1998b) quando a radiação microondas é aplicada como fonte de energia.

Além do aquecimento notadamente eficiente, as técnicas de digestão assistida por radiação microondas também proporcionam um menor risco de contaminação da amostra por metais, pois existe a necessidade de uso de materiais transparentes à radiação microondas nos frascos e outros elementos do sistema, os quais em geral são confeccionados de politetrafluoroetileno (PTFE) ou perfluoroalcoxi (PFA) (GRÄBER; BERNDT, 2005). Largamente utilizados, procedimentos de digestão que envolvem a aplicação da radiação microondas são executados principalmente em batelada, mediante o uso de fornos com cavidade ou com radiação focalizada (NÓBREGA et al., 2005).

A opção por sistemas de digestão operando em fluxo encontra seu impulso na busca de soluções para algumas dificuldades existentes em outras abordagens, como a produção de

vapores ácidos que no caso de sistemas abertos representa um risco à saúde do operador, ou o considerável tempo necessário ao resfriamento de frascos de digestão, característica de sistemas fechados (BURGUERA; BURGUERA, 1998b).

Ao longo das últimas duas décadas, o uso da radiação microondas como fonte de aquecimento foi proposto em diferentes alternativas para a construção de sistemas de digestão que operam por injeção da amostra em fluxo.

Nesses sistemas, após ser inserido em um fluxo carregador e impulsionado pelo interior do forno onde ocorrem o aquecimento e decomposição, a amostra digerida pode ser coletada em frascos para posterior análise. Alternativamente, há ainda a possibilidade de tais sistemas serem aplicados particularmente à amostragem em técnicas de detecção que requerem um fluxo contínuo de amostra – como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) ou espectrometria óptica de emissão com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Burguera & Burguera, 1998a). O emprego dessas alternativas representa a possibilidade do acoplamento entre a etapa de digestão e o detector apropriado por meio de uma interface adequada, sendo eliminadas várias etapas de manipulação e exposição da amostra, que além de consumirem grande parte do tempo total do processo representam importante fonte de erros por contaminação ou perdas de analitos (ASFAW; WIBETO, 2005; OLIVEIRA, 2003).

Burguera e Burguera (1986), em um trabalho pioneiro, apontaram as potencialidades de um sistema deste tipo. Em seu trabalho, amostra e reagente são inseridos em um fluxo de água e aquecidos no interior de um forno de microondas doméstico, seguindo diretamente para o nebulizador de um espectrômetro de absorção atômica, obtendo-se boa recuperação dos analitos e reduzido tempo de residência.

Além da possibilidade de acoplamento com sistemas de detecção, outras características positivas dos sistemas de digestão em fluxo podem ser apontadas quando comparadas com a digestão realizada em batelada: mistura automática de amostra e reagentes, mais alta freqüência analítica, facilidade no uso associada à segurança do operador, aplicabilidade na digestão de diversos tipos de matrizes (BURGUERA; BURGUERA, 1998a,b), redução no consumo de reagentes e geração de mínimas quantidades de resíduos (OLIVEIRA, 2003).

No entanto, os materiais transparentes à radiação microondas, necessariamente usados na constituição de diversos elementos destas configurações, apresentam alterações em suas características de resistência mecânica mediante o aquecimento, implicando em limitações das condições a que o sistema pode ser submetido. De modo geral, temperatura e pressão de operação ficam limitadas a 200°C e 10 a 20 bar, respectivamente (JACOB et al., 2005), comprometendo a eficiência na decomposição de matrizes mais complexas.

Para contornar a necessidade do uso de materiais transparentes à radiação microondas e, portanto, tornar possível o uso de condições operacionais mais severas, sistemas em fluxo operando com aquecimento resistivo em substituição ao aquecimento por microondas têm sido propostos.

Os elementos de construção do digestor em tais sistemas podem ser compostos não mais necessariamente de polímeros transparentes à radiação microondas, mas de ligas metálicas especiais (JACOB et al., 2005) ou tubos metálicos revestidos internamente por vidro borossilicato ou materiais poliméricos de alta resistência (GRÄBER; BERNDT, 1999), tornando viável a aplicação de temperaturas acima de 200°C simultaneamente a pressões de algumas centenas de atmosferas, resultando em velocidades de reação mais elevadas e melhor eficiência na digestão de amostras de diversas Naturezas (HAIBER; BERNDT, 2000).

O acoplamento direto destes sistemas a diferentes detectores, como espectrômetros de absorção ou emissão atômica, tem sido avaliado e os resultados obtidos demonstram a potencialidade da aplicação destas configurações na digestão de diversas matrizes (JACOB et al., 2005), possibilitando ainda seu acoplamento a sistemas que operam a baixas pressões, como os sistemas de geração de hidretos para espectrometria de absorção atômica.

Apesar dos detalhes das configurações variarem um pouco entre si, de um modo geral em sistemas deste tipo uma bomba utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é utilizada para transportar, sob alta pressão (50-400 bar), as soluções contendo amostra e reagentes através de um capilar restritor de pequeno orifício (50 μm) posicionado no final do sistema.

Em seu percurso no interior do sistema em fluxo o líquido é aquecido, no interior de um capilar, a temperaturas mais altas do que o seu ponto de ebulição normal, sem que ocorra, no entanto, formação de vapores dentro do sistema.

A vaporização da mistura contendo amostra e reagentes é impedida pela elevada pressão interna imposta pelo restritor, sendo esta superior à pressão de vapor do líquido na temperatura à qual é submetido. Desse modo apenas a fase líquida é mantida no interior do capilar aquecido (GRÄBER; BERNDT, 1999; BERNDT et al., 1996).

Empregando esta configuração, que possivelmente vem solucionar as limitações encontradas na utilização de microondas como fonte de aquecimento, amostras biológicas podem ser solubilizadas em linha, sendo coletadas após a saída do restritor para posterior análise (determinação off-line) ou levadas diretamente ao detector utilizando uma interface apropriada (determinação on-line) (JACOB et al., 2005; LUO et al., 1994).

2.2- Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica que permite a detecção e quantificação de elementos químicos pela medida da absorção de radiação por átomos livres em fase gasosa.

Em geral, considera-se que as primeiras observações referentes à divisão da radiação eletromagnética em comprimentos de onda foram comunicadas no século XVII por Issac Newton, que descreveu observações sobre a formação de diversas cores quando a luz branca passa por um prisma.

Em 1802 Wollaston marcou o início dos estudos sobre absorção da luz, com a descoberta da existência de linhas negras no espectro da luz solar, que se supunha ser contínuo. Esta constatação foi melhor investigada por Fraunhofer, que associou a ocorrência de linhas “apagadas” como evidência de absorção da radiação luminosa.

Mais tarde, em 1820, Brewster afirmou que as linhas de Fraunhofer eram de fato consequência de absorção da luz por átomos, provavelmente átomos gasosos localizados nas proximidades da superfície solar.

Os princípios deste tipo de absorção foram estabelecidos algum tempo depois por Bunsen e Kirchhoff, por meio de estudos das linhas do espectro de metais alcalinos e alcalino-terrosos, e em 1860 Kirchhoff enunciou a lei que passou a ser o princípio fundamental da AAS e diz que “em condições normais todos os corpos são capazes de absorver radiações que eles são capazes de emitir”.

Em 1900, a relação entre a absorção de radiação por átomos e a estrutura atômica foi traduzida por Planck com a lei quântica de absorção e emissão de radiação. Segundo esta lei um átomo apenas pode absorver energia radiante em comprimentos de onda bem definidos, podendo também liberar quantidades definidas (*quanta*) de energia. Seguiu-se a isto a proposta em 1913 de um revolucionário modelo atômico por Niels Bohr, que trata da

quantização dos estados energéticos dos átomos, e somente a publicação quase simultânea de trabalhos por Walsh (1955) e por Alkemade e Milatz (1955) levou a AAS ao status de técnica recomendada como aplicável de um modo geral para procedimentos analíticos. As aplicações da AAS foram impulsionadas quando Holak (1969) propôs a técnica de introdução da amostra a partir da geração de hidretos voláteis.

Os modernos espectrômetros de absorção atômica apresentam basicamente a mesma estrutura daqueles primeiramente produzidos em meados da década de 1960: uma fonte de radiação; um sistema de injeção e atomização da amostra; um sistema óptico para seleção do comprimento de onda a ser detectado; sistema de detecção composto de válvulas fotomultiplicadoras para conversão da radiação não absorvida em energia elétrica e amplificação do sinal assim obtido.

Para evitar que as interferências devidas às radiações emitidas pelo atomizador, a radiação da lâmpada de catodo oco é modulada. Nos sistemas mais antigos esta modulação é realizada mecanicamente por meio de um dispositivo rotatório (*chopper*) localizado no percurso do feixe de radiação. A modulação também pode ser feita por meio de corrente alternada em sintonia com o amplificador.

As fontes de radiação utilizadas em espectrometria de absorção atômica são principalmente fontes de espectro contínuo, lâmpadas de descarga sem eletrodo e lâmpadas de catodo oco, sendo estas últimas as fontes de uso mais difundido.

As lâmpadas de catodo oco são lâmpadas seladas construídas em vidro. De formato cilíndrico, em seu interior temos em uma das extremidades um catodo feito do elemento de interesse – recoberto com este – e um anodo de zircônio ou tungstênio. Preenchida com gás inerte – normalmente argônio ou neônio em baixas pressões, de 100 a 200 Pa – a lâmpada tem a outra extremidade fechada com uma janela de quartzo. A tensão de 150 a 400 volts provoca a ionização do gás de enchimento. Os cátions formados são atraídos e colidem fortemente

com o catodo e arrancando de sua superfície átomos do elemento de interesse, que passam assim ao estado de vapor, ficando ainda mais expostos a choques com os íons do gás de preenchimento acelerados rumo ao catodo. Com novos choques os átomos do elemento de interesse sofrem excitação energética e ao retornarem ao estado fundamental emitem radiação em comprimentos de onda específicos.

Em espectroscopia de absorção atômica a etapa de atomização é necessária para que sejam obtidos os átomos livres em seu estado fundamental. Os tipos de atomizadores podem variar bastante, sendo mais comumente utilizados aqueles que fazem uso da chama. No entanto, tem grande destaque o uso do forno de grafite quando se deseja alcançar maior sensibilidade. Ao se fazer uso da técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos voláteis, a atomização do hidreto ocorre no interior de uma célula de quartzo aquecida pela chama do atomizador. As chamas mais comumente usadas são a chama acetileno e óxido nitroso-acetileno.

Em espectroscopia de absorção atômica o monocromador tem papel obviamente importante, porém não tão crítico quanto no caso da espectrometria de emissão atômica, pois em AAS a especificidade da radiação que chega ao espectrômetro é obtida anteriormente como característica do elemento que a emite na fonte de radiação e que a absorve parcialmente. Os espectrômetros em AAS são do tipo Czerny-Turner e possuem relativamente baixa resolução (0,2 – 0,02 nm), sendo possível considerar de maior relevância no equipamento o conjunto de elementos ópticos que antecedem o espectrômetro no percurso da radiação (SKOOG et al., 2002; WELZ; SPERLING, 1999).

2.3- Geração de hidretos em espectrometria atômica

O sucesso de uma análise em espectrometria atômica depende em grande parte da eficiência da etapa de introdução da amostra, de modo que a maior quantidade possível do analito deve ser conduzida às etapas subseqüentes do processo.

Normalmente, em espectrometria atômica a introdução da amostra é realizada com o uso de nebulizadores pneumáticos, que têm a função de converter a amostra líquida em um aerossol com partículas de dimensões apropriadas. Este aerossol deve ser então conduzido por um gás de arraste para o sistema de detecção do espetrômetro.

No entanto, apesar de serem a forma mais comum de introdução da amostra nos espetrômetros de absorção ou emissão atômicas, os sistemas pneumáticos de nebulização apresentam uma baixa eficiência de nebulização, de modo que menos de 10% da amostra líquida – e consequentemente menos do que a décima parte do analito presente em solução – são convertidos em aerossol útil, sendo descartado todo o restante (TAKASE et al., 2002).

Se por um lado apresentam conveniente e fácil operação – características que os tornam largamente adotados –, por outro os sistemas pneumáticos de introdução da amostra também apresentam dificuldades quando são usadas soluções com elevada viscosidade ou alto teor salino. Outra questão complicada no uso desses sistemas de introdução surge quanto à viabilidade da análise quando é disponível um volume muito pequeno da amostra (TAKASE et al., 2002), pois não menos que alguns mililitros são geralmente necessários.

Para contornar os problemas inerentes à nebulização pneumática, especialmente nos casos em que os analitos encontram-se em baixas concentrações, uma alternativa pode ser a conversão da espécie de interesse em uma forma volátil, o que pode ser feito pela geração química de hidretos.

As vantagens das técnicas de geração de hidretos voláteis incluem simplicidade e relativamente baixos riscos de interferências (BEACH, 1992), além da alta velocidade de

reação, relativamente baixo consumo de reagente e melhoria nos limites de detecção de selênio por uma ou duas ordens de magnitude em relação às técnicas espectrométricas correspondentes.

Importantes fontes de erro em técnicas de geração de hidretos são relacionadas a perdas de selênio por volatilização e adsorção ou por variações em seu estado de oxidação. Portanto a etapa de pré-redução do analito ao estado de oxidação adequado para o processo de formação do hidreto de interesse - Se (IV) deve ser realizada com observação desses aspectos e consideração de possíveis interferências causadas por íons de metais nobres e de transição e também por matéria orgânica (DEDINA; TSALEV, 1995).

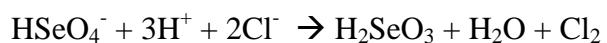
Inicialmente aplicada à redução de arsênio a arsina pela adição de zinco metálico à amostra ácida (HOLAK, 1969), o procedimento já representava um ganho em sensibilidade resultante da maior eficiência no transporte do analito ao atomizador. No entanto havia, apesar da melhor sensibilidade, algumas dificuldades causadas pela absorção da chama convencional em comprimentos de onda próximos às linhas mais sensíveis do arsênio. Posteriormente foi proposto (CHU et al., 1972) um procedimento em que o vapor gerado é conduzido não mais à chama do atomizador, mas ao interior de uma célula de absorção consistindo de uma tubulação em T. Composta de quartzo e aquecida eletricamente, a célula de absorção promove em seu interior a atomização das espécies moleculares para quantificação por absorção atômica.

Antes de se tornar prática comum o uso de tetrahidroborato de sódio no processo de redução para a geração de hidretos, a redução realizada com uso de metais restringia a técnica à quantificação basicamente de As e Se. Adotadas nos primeiros estudos sobre aplicação da geração de hidretos, esta abordagem resulta em reações mais lentas, baixa eficiência na formação de hidretos e consideravelmente mais interferências (MCDANIEL et al., 1976).

Com a proposta do uso de soluções redutoras de tetrahidroborato de sódio para a redução das espécies de interesse (BRAMAN et al., 1972), houve considerável diversificação dos elementos passíveis de determinação pela técnica, incluindo-se Bi, Ge, Pb, Sb, Sn, Te (DEDINA; TSALEV, 1995; OLIVAS; CÂMARA, 2003).

Etapa importante na aplicação da geração de hidretos para a determinação de Se e Te é a pré-redução realizada mediante o aquecimento da amostra em meio ácido, para que ocorra a conversão da espécie Se (VI) em Se (IV) (HOBBINS, 1981), que reage mais eficientemente para a formação de hidretos. Para elementos do grupo 15 da tabela periódica (As, Sb e Bi) observa-se que estados de oxidação mais altos implicam em redução do sinal analítico. Para os elementos do grupo 16, o estado de oxidação mais alto – Se (VI) – não leva a sinal detectável, sendo indispensável a etapa de pré-redução do analito para o estado de oxidação IV (BOWMAN et al., 1997; DEDINA; TSALEV, 1995; HALICZ; RUSSELL, 1986).

Foi verificado que, a 25 °C, 97% do selênio permanece como Se (VI) em solução de HCl 5 mol L⁻¹ (KRIVAN et al., 1985), o que implica na necessidade de se fornecer energia para o deslocamento da reação no sentido de formação da espécie mais favorável à geração de hidretos, conforme a reação (CRISPINO, 2005):

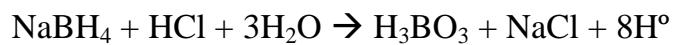


Como citado, a necessidade da conversão de Se para uma forma específica, antes de ser submetido a reação de formação de hidretos, é uma consequência do fato de que as velocidades e eficiências das reações com o NaBH₄ são diferentes entre as espécies de cada um destes elementos.

Deste modo, os vários elementos formadores de hidretos voláteis, ainda que em sua forma inorgânica, reagem com o NaBH₄ de maneira particular, diferenciada entre si, sob as

mesmas condições. Isso torna possível o ajuste das condições reacionais para a separação de diferentes espécies (OLIVAS; CÂMARA, 2003).

A formação de hidretos voláteis por meio da redução com tetrahidroborato de sódio baseia-se na rápida reação do íon tetraborato com um ácido, levando à produção de hidrogênio radicalar, que reage com os elementos formadores de hidretos. As reações envolvidas são representadas a seguir (TAKASE et al., 2002):



O tetrahidroborato de sódio pode ser utilizado na forma de drágeas, mas seu uso em forma de solução é mais apropriado e é nesta forma que o reagente é mais largamente utilizado, permitindo melhor eficiência na geração de hidretos, com sinais mais reprodutíveis e gerados com maior regularidade, especialmente em sistemas automatizados de geração de vapor que permitem a mistura da amostra com as soluções de reagentes, mediante controle das vazões de aspiração das soluções.

A quantidade de redutor utilizada deve ser suficiente para as reações de formação de hidretos, e um excesso de reagente atua de modo favorável por ocasionar maior produção de hidrogênio molecular, resultando em maior arraste do hidreto formado para fora da solução.

A acidificação da amostra é importante e há recomendações para que sejam utilizados meios com elevada concentração de ácido clorídrico, indo de 4 mol L⁻¹ a 7,5 mol L⁻¹. Acidificação da mostra a tais níveis resulta em melhoria da sensibilidade na maioria dos sistemas de geração de hidretos e em maior tolerância à presença de metais nobres e de transição, além do que o próprio ácido clorídrico é utilizado como pré-redutor de Se(VI) para Se(IV) em concentração de 5 a 6 mol L⁻¹.

Para a etapa de pré-redução, melhores resultados são obtidos com o uso de cloreto – a partir de ácido clorídrico aquecido – e brometo – a partir de HBr ou KBr em meio clorídrico, havendo preferência pelo uso do meio clorídrico em determinações on-line e off-line.

Como principais fatores que interferem nesta etapa, podem ser citados a temperatura, a acidez total do meio, a concentração de cloreto disponível, o refluxo no interior do frasco e a pressurização do sistema (DEDINA; TSALEV, 1995). Também podem interferir nesta etapa a acidez residual de etapas anteriores do preparo da amostra (BYE; LUND, 1988), a presença de componentes da matriz ou de matéria orgânica residual (VIJAN; LEUNG, 1980), o material dos recipientes em que ocorrem as reações (SINEMUS; MAIER, 1985).

2.4- O Leite

2.4.1- Aspectos gerais

Por sua composição e também por sua disponibilidade, o leite pode ser considerado um alimento quase perfeito para recém-nascidos (NÓBREGA et al., 2003), sendo fonte de nutrientes durante os primeiros meses de vida dos mamíferos. Sua relevância – especialmente no caso do leite bovino – na dieta humana é devida inclusive ao fato de que, além de nutritivo, trata-se de um alimento que em muitas culturas no mundo todo é fortemente inserido na alimentação de pessoas de todas as idades (MUÑIZ-NAVEIRO et al., 2005) diretamente ou como ingrediente comum no preparo de alimentos, ou ainda na forma dos muitos derivados da indústria de laticínios (LEITE et al., 2006).

Os leites produzidos pelas diversas espécies de mamíferos terrestres apresentam semelhanças de constituição entre si, mas para cada espécie ou raça são verificadas particularidades na composição (JENSEN, 1995) que atendem as necessidades específicas dos filhotes.

2.4.2- Composição

As análises da composição do leite e de sua constituição elementar são importantes como fontes de informação sobre possíveis contaminações ambientais e também para estudos de nutrição (TAME; HOBBIN, 1999), pois se trata de importante fonte de nutrientes essenciais à saúde humana.

Em média a água corresponde a 87% do leite bovino, e é na fração aquosa que são encontradas emulsionadas, suspensas ou dissolvidas todas as demais espécies que compõem o leite. Além da fração aquosa, o leite contém aproximadamente 3,3 % de proteína, 3,9 % de gordura, 4,6 % de lactose e cerca de 1,0 % de outras espécies, que incluem substâncias minerais e ácidos orgânicos (SILVA, 1997; WALSTRA; JENNESS, 1984).

A lactose é o principal carboidrato presente no leite bovino, que apresenta glicose e galactose em pequenas proporções. É a principal fonte de energia dos recém-nascidos e um dos componentes mais estáveis do leite. A quantidade de lactose secretada pelas glândulas mamárias desempenha papel regulador da quantidade de água e do consequente volume de leite produzido (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA TECNOLÓGICA EM INFORMÁTICA PARA A AGRICULTURA, 2008).

A gordura do leite bovino está presente na forma de glóbulos em suspensão na fase aquosa. Constituída majoritariamente por triglicerídeos, esta fração do leite serve de veículo para vitaminas (A, D, E e K) e outras substâncias lipossolúveis como carotenóides, cuja presença confere ao leite sua cor amarelo-creme (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA TECNOLÓGICA EM INFORMÁTICA PARA A AGRICULTURA, 2008).

A fração protéica do leite é representada principalmente pela caseína, espécie à qual correspondem aproximadamente 80% do teor proteínas no leite bovino e que se encontra quase que em sua totalidade (95%) na forma de micelas, associada a espécies inorgânicas,

especialmente fosfato de cálcio, apresentando boa qualidade nutricional (SILVA, 1997; SILVA, 2004; RÜEGG & BLANC, 1982).

A composição mineral do leite bovino resulta de diversos fatores, como a alimentação a que o animal é submetido, suas condições gerais de saúde – incluindo-se fatores relacionados à secreção do leite pela glândula mamária –, ou ainda a raça, o período do ano e as características do solo da região (FOSTER et al, 1997).

Além destes fatores mais intimamente relacionados ao animal e à produção do leite por seu organismo, etapas posteriores de processamento às quais o leite é submetido, inclusive o tratamento térmico realizado industrialmente, podem levar a alterações nos teores de seus constituintes minerais (ZURERA-COSANO et al., 1994).

2.5 Selênio

A princípio a relevância dada à quantificação de selênio se devia à toxicidade deste elemento, mas seu estudo ganhou ainda mais destaque após a constatação de sua importância como elemento traço essencial (D'ULIVO, 1997).

O Se é um elemento representativo do grupo de nutrientes que, por não ser acumulado no organismo do bebê durante seu desenvolvimento no útero, precisam ser inseridos na alimentação dos recém-nascidos já a partir do nascimento, visando seu ótimo crescimento (NÓBREGA et al., 2003).

Isoladamente, o Se pode ser encontrado na forma de selenito, selenato, Se^0 ou Se^{+II} . Na forma de compostos, ocorre na constituição de estruturas metiladas de menor complexidade, além de aminoácidos, espécies de baixa massa molecular (selenometionina, selenocisteína, selenocistina, dentre outras), selenoproteínas e selenoenzimas (D'ULIVO, 1997).

O consumo diário recomendado de selênio aumenta gradativamente para cada faixa etária, sendo de 0,015 mg/dia até o sexto mês de vida e 0,055 mg/dia para homens e mulheres

adultos. Maior consumo é recomendado para gestantes e lactantes, respectivamente 0,060 e 0,070 mg/dia.

Apesar de ser um elemento relativamente raro na superfície terrestre, o Se é largamente distribuído na natureza, tendo sido quantificado em amostras de diversos tipos, incluindo tecidos vegetais e animais, amostras de ar, sedimentos e solo (D'ULIVO, 1997), além de amostras biológicas diversas como leite e sangue (PECHOVÁ, 2005).

Os níveis de Se encontrados no leite bovino apresentam-se de modo geral em torno de 20 a 30 ng g⁻¹, mas podem variar bastante, indo de menos de 10 ng g⁻¹ a até mais de 100 vezes este valor, conforme a região de criação – e, consequentemente, a alimentação – do gado seja pobre ou rica em selênio. No leite bovino, de 2% a 10% do total de selênio são encontrados na fração lipídica e cerca de 70% no soro, com a β -lactoglobulina (CASEY et al., 1995; MUÑIZ-NAVEIRO et al., 2005).

PARTE EXPERIMENTAL

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material e métodos

No sistema em desenvolvimento para decomposição em fluxo de amostras a altas temperatura e pressão foi empregada uma bomba de HPLC (ProStar LC System 210, Varian, EUA) equipada com um cabeçote em PEEK (poli-éter-éter-cetona) e módulo de pressão com limite máximo de 4000 psi (275 bar), para impulsionar as soluções através do capilar restritor. Para injeção das amostras com mistura prévia da solução oxidante, foi empregado um injetor manual de 6 vias para HPLC (9725i, Rheodyne, EUA), com alças de amostragem em PEEK. As conexões no sistema foram feitas empregando-se conjuntos de conectores e ferrules em PEEK e em aço inox – para conexão com partes em PEEK e com partes metálicas, respectivamente –, resistentes às faixas de pressão e temperatura aplicadas nos experimentos.

Como se trata de um sistema em que a injeção da amostra é feita simultaneamente com a da solução de reagente ácido, foi preciso considerar a ocorrência de precipitação das proteínas da amostra mediante redução do pH do meio, quando do contato entre as duas soluções. Essa precipitação torna inviável a mistura prévia das soluções, especialmente no caso de amostras de leite e sangue, que contém elevado teor protéico. Para contornar este problema, foram realizados experimentos com a configuração na qual amostra e reagente são inseridos em confluência, em um ponto imediatamente anterior à entrada do digestor.

O sistema construído (figura 1) apresenta a configuração na qual os dois líquidos são encaminhados em confluência, localizada próxima à entrada do tubo digestor. A amostra é injetada com uso do injetor manual para HPLC e impulsionada pela bomba de HPLC, sendo usada água como meio transportador. Para injeção da solução oxidante no sistema foi usada uma bomba tipo seringa (341b, Orion, EUA), que opera por deslocamento do êmbolo de uma seringa plástica carregada com a solução ácida digestora ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$) e possibilita o ajuste

da vazão imposta, com base na variação da velocidade de deslocamento do êmbolo e nas dimensões da seringa utilizada.

Para a manutenção da pressão interna do sistema, foram usados capilares de sílica fundida com d.i. 50 μm e comprimento definido de acordo com a pressão de trabalho desejada.

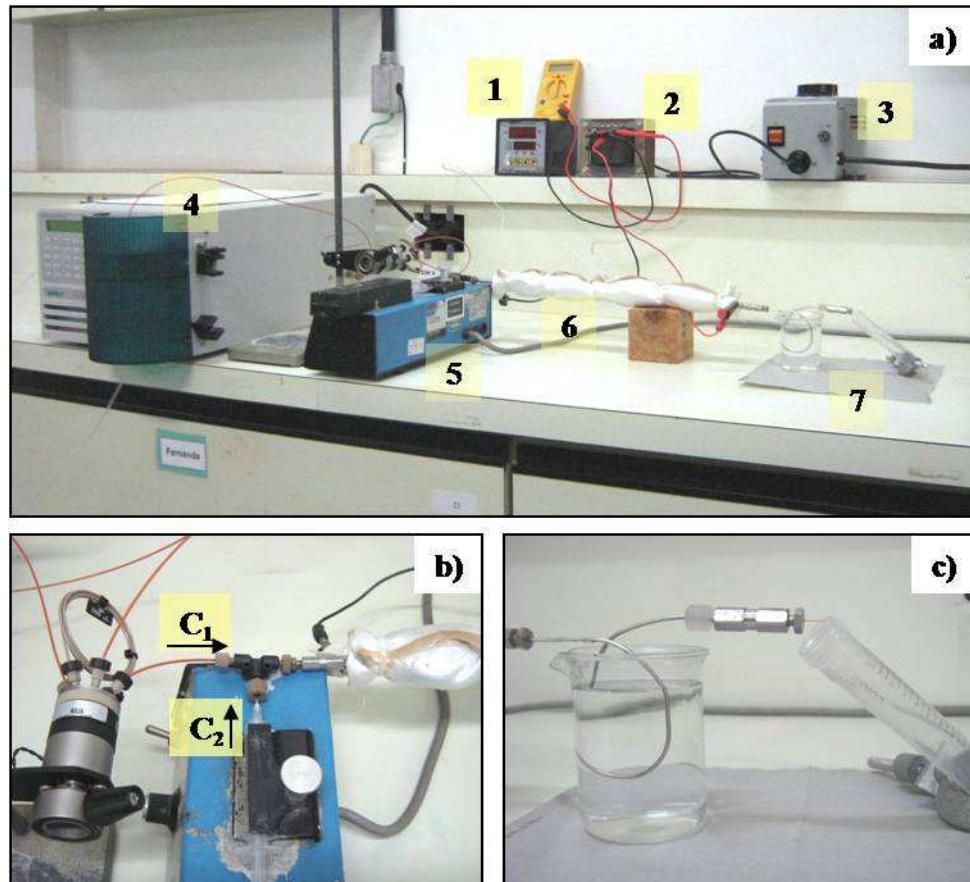


Figura 1. Sistema em fluxo a altas temperatura e pressão. a) 1- multímetro e monitor de temperatura; 2- transformador de tensão; 3- variador de tensão; 4- bomba de HPLC; 5- bomba tipo seringa; 6- digestor; 7- resfriamento e coleta; b) confluência. C_1 - fluxo carregador da amostra; C_2 - fluxo carregador dos reagentes; c) detalhe da etapa de resfriamento e coleta.

Visando a simplificação, o sistema avaliado foi construído quase completamente com materiais de baixo custo, substituindo-se capilares especiais de difícil obtenção ou de alto custo de fabricação por capilar de aço inox. O sistema de aquecimento também foi

simplificado, sendo o mesmo realizado por meio de resistência elétrica de cobre do tipo que normalmente é usada em chuveiros elétricos.

O tubo digestor avaliado consistiu de um capilar em aço inox com d.i. 0,030" e d.e. 1/16", recoberto em toda a sua extensão por um tubo concêntrico de material cerâmico. O uso do revestimento cerâmico tem a finalidade de uniformizar a distribuição da energia térmica fornecida ao sistema em toda a extensão do digestor e evitar o contato direto entre a resistência elétrica e o tubo metálico.

Envolvendo a parte externa do tubo cerâmico, foi disposta em helicóide uma resistência elétrica. Sobre essa resistência, constituída de uma liga de ferro e cobre, pode ser aplicada a diferença de potencial desejada, para que ocorra o aquecimento do sistema.

A tensão aplicada à resistência elétrica foi ajustada com o uso de um transformador acoplado a um variador de tensão (3PN1520B, Staco, EUA). Essa combinação permitiu o controle da diferença de potencial com incrementos de décimos de volt, sendo o monitoramento feito com uso de um multímetro digital.

O digestor assim constituído pelo tubo em aço inox, tubo cerâmico e resistência elétrica foi isolado termicamente com lã de vidro, sendo o conjunto finalmente envolvido por tecido sintético resistente ao calor. A temperatura em que o sistema permanecia durante os experimentos resultava de fatores como vazão no sistema, tensão aplicada na resistência elétrica, pressão de trabalho e temperaturas das soluções utilizadas.

O monitoramento da temperatura no digestor foi feito com uso de um termopar tipo K, posicionado em contato com a parte externa do digestor em aço, em sua porção central, por meio de pequena abertura deixada no revestimento cerâmico. A figura 2 traz imagens dos elementos usados na montagem do digestor.

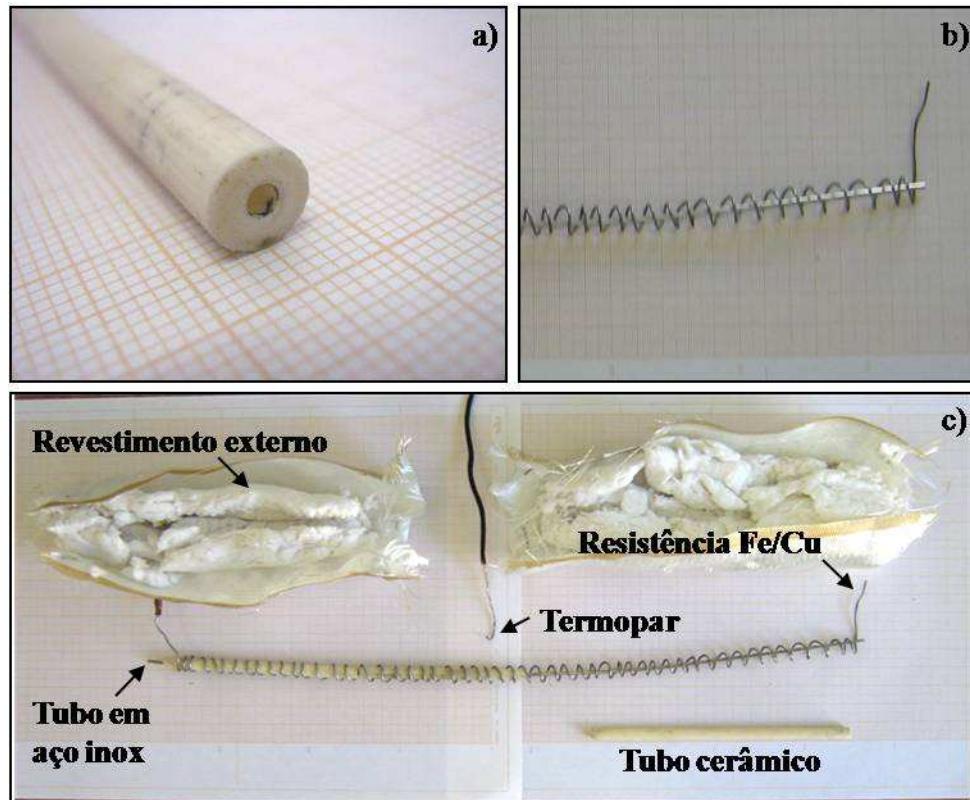


Figura 2. Digestor construído para uso no sistema em estudo: a) Tubo cerâmico; b) capilar em aço inox, envolvido pela resistência Fe/Cu, sem o tubo cerâmico; c) vista dos diferentes elementos usados na montagem do sistema.

Para avaliar a eficiência da decomposição em fluxo foi monitorado o teor de carbono residual (*residual carbon content* – RCC) nas soluções processadas no sistema em desenvolvimento, empregando procedimento descrito por Gouveia (2001). Na etapa imediatamente anterior à determinação do RCC as soluções foram desgaseificadas empregando aquecimento em banho-maria, a 100°C por 20 minutos com frascos abertos (SILVA, 2004).

Tabela 1. Condições operacionais empregadas no ICP OES com configuração radial para a determinação do teor de RCC nos digeridos obtidos.

Parâmetro operacional	
Potência RF (kW)	1,0
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,9
Amostra (mL min ⁻¹)	0,8
Altura de observação (mm)	8
Câmara de nebulização	Sturman Masters
Nebulizador	V-groove
Linhos de emissão (nm)	C I 193,025
	C II 247,857

I e II – linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

Para as quantificações de carbono para a avaliação da eficiência de decomposição, foi usado um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (Vista Pro RL, Varian, Austrália), operado nas condições apresentadas na tabela 1. Para determinações de selênio foi usado um espectrômetro de absorção atômica (SpectrAA-800, Varian, Austrália), sendo a introdução da amostra feita com sistema de geração de hidretos comercialmente disponível (VGA 77, Varian, Austrália).

No procedimento utilizado para a geração de hidretos neste trabalho, antecedendo a etapa de geração de hidretos propriamente dita foi realizada pré-redução do analito nas soluções a serem analisadas, consistindo da adição de HCl 12 mol L⁻¹ à amostra digerida, obtendo-se a concentração final HCl 6 mol L⁻¹, indicada para a redução do Se. Após a adição, a mistura era homogeneizada e submetida a aquecimento sob 80°C por 15 min e deixada a resfriar até temperatura ambiente antes da análise (VARIAN, 2004).

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos no sistema a altas temperaturas e pressão foi empregada digestão ácida por radiação microondas em forno com cavidade

(Multiwave, Anton Paar, Áustria). Esse forno possui um rotor com 6 frascos de PFA (Teflon® modificado) de 50 mL. O programa utilizado foi o previamente estabelecido para amostras de leite, que emprega 2,5 mL de amostra, 2,0 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} e 1,0 mL de H_2O_2 30% m v^{-1} e está apresentado na figura 3.

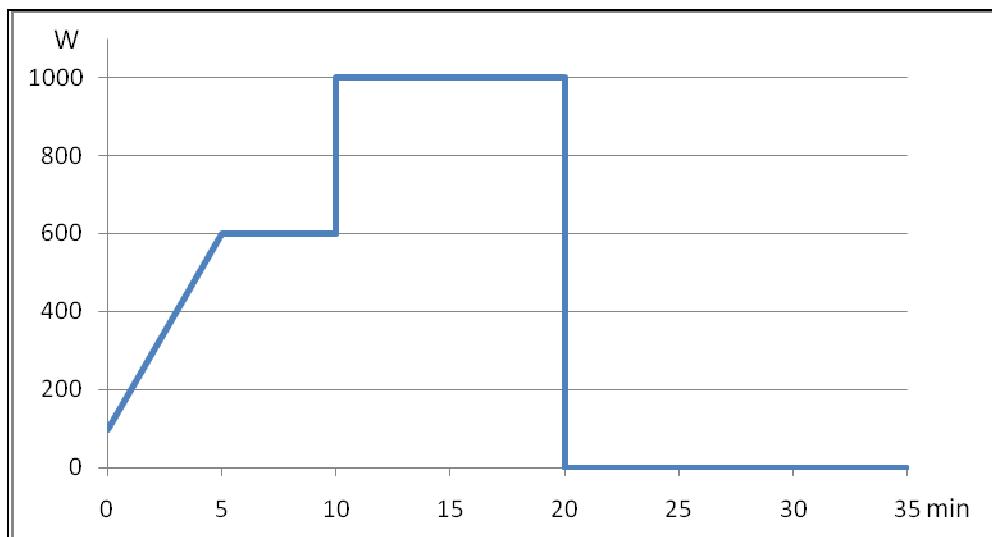


Figura 3. Etapas do programa de aquecimento utilizado nas digestões em forno de microondas. Etapa 1: 100 – 600 W, 5 min; Etapa 2: 600 W, 5 min; Etapa 3: 1000 W, 10 min; Etapa 4: resfriamento, 15 min.

3.2- Soluções

No preparo de todas as soluções foi usada água ultra-pura (resistividade 18 $\text{M}\Omega\text{cm}$) obtida em sistema de purificação Milli-Q (Milli-Q Plus, Millipore, EUA).

As curvas de calibração de carbono foram preparadas a partir de solução de biftalato de potássio P.A. (Vetec, Brasil).

As soluções contendo Ca, Cu (SpecSol, Brasil), Se (Tec-Lab, Brasil), K e Zn (Qhemis, Brasil) foram preparadas em meio ácido (HNO_3 0,14 mol L^{-1}), a partir de soluções 1000 mg L^{-1} destes elementos.

Foi usado ácido nítrico 65% P.A. (aprox. 14 mol L^{-1}) (Qhemis, Brasil) e peróxido de hidrogênio 30% m v^{-1} (Tec-Lab, Brasil).

Como amostras utilizadas na avaliação do sistema, foram empregados suco de laranja industrializado, leite integral UHT e leite desnatado UHT originalmente acondicionados em embalagem Tetra-pak®, adquiridos no mercado local.

Amostras de sangue e plasma bovino foram obtidas a partir de experimentos em andamento na Embrapa Pecuária Sudeste.

3.3- Diagrama do sistema em estudo

Pela configuração apresentada na figura 4 observa-se que, após ser inserida no fluxo transportador (H_2O , $0,20 \text{ mL min}^{-1}$), a solução passa pelo tubo digestor, sendo aquecida conforme a temperatura deste, que é ajustada de acordo com a tensão aplicada à resistência de Fe/Cu. Após passar pelo digestor o fluxo é resfriado em um capilar similar ao usado no digestor (d.i. $0,030''$ e d.e. $1/16''$) – com cerca de 15 cm de comprimento e do qual uma parte permanece imersa em banho de gelo –, chegando então ao capilar restritor, ponto no qual o material é coletado. O tempo de residência da amostra no interior do digestor depende diretamente do volume deste e da vazão utilizada no fluxo transportador.

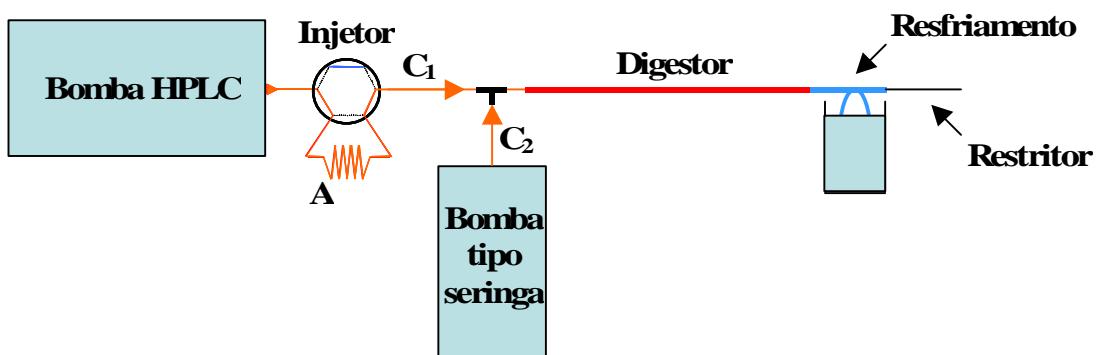


Figura 4. Diagrama do sistema em fluxo em desenvolvimento para decomposição de amostras a altas temperaturas e pressão. A - alça de amostragem, para injeção da amostra com ou sem solução oxidante; C_1 - fluxo transportador (H_2O), C_2 - fluxo da mistura oxidante ($\text{HNO}_3 1,4 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{O}_2 3,0\% \text{ m v}^{-1}$; $0,1 \text{ mL min}^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Testes de decomposição de diferentes matrizes

4.1.1- Amostras de sucos de fruta

Após a montagem do sistema, foram feitos testes preliminares visando a verificação das condições experimentais, após o que foi realizado o tratamento de amostras de suco de laranja pasteurizado, adquirido no comércio local.

Volume equivalente a 0,5 mL de suco previamente homogeneizado recebeu a adição de 2,0 mL de HNO_3 50 % v v⁻¹ e 1,0 mL de H_2O_2 30 % m v⁻¹. Essa solução foi diluída a 10,0 mL com água, obtendo-se concentração final de HNO_3 1,4 mol L⁻¹ e 3,0% H_2O_2 m v⁻¹. A seguir essa mistura foi injetada no sistema com uso de um alça de 500 μL de capacidade, o que corresponde a um volume efetivo de 25 μL do suco original, em cada injeção. Duas injeções foram feitas e seus respectivos digeridos foram coletados em um mesmo tubo de ensaio para cada replicata, sendo então este material diluído a 5,0 mL em HNO_3 0,14 mol L⁻¹. Seguiu-se à degaseificação por aquecimento em banho-maria a 100 °C por 20 min (SILVA, 2004) e imediata leitura do teor de carbono residual por ICP OES (GOUVEIA et al., 2001).

Para verificação da eficiência de digestão, as amostras assim preparadas com uso do sistema em estudo tiveram seu teor de carbono comparado com o de alíquotas não-digeridas. Essas alíquotas foram preparadas a partir da mesma solução de suco 1:20 v v⁻¹ em meio oxidante, com diluição final na mesma proporção que a solução submetida à digestão e degaseificada, com o objetivo de comparar a eficiência da digestão.

Foram coletadas ainda amostras de branco do sistema, para subtração do teor de carbono destas do teor de carbono das amostras processadas. Esses brancos do sistema foram obtidos com o mesmo procedimento e sob as mesmas condições em que foram obtidos os

digeridos das soluções contendo a amostra, com a diferença de que para o branco foi injetada no sistema apenas solução aquosa de HNO_3 1,4 mol L^{-1} e H_2O_2 3 % m v^{-1} , sem conter, no entanto, o suco diluído. Nos experimentos com suco foi usado digestor em aço inox com 26 cm de comprimento, temperatura de 200 °C e capilar restritor com comprimento de aproximadamente 20 cm, para que fosse mantida pressão equivalente a 61 bar. O efeito do tempo de residência da amostra no digestor sobre a eficiência de digestão foi avaliado. Para isso operou-se com a bomba de HPLC impulsionando o carregador com vazões de 0,20 mL min^{-1} e 0,10 mL min^{-1} , levando-se a tempos de residência de 60 e 120 s, respectivamente.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Eficiência de decomposição para a amostra de suco de laranja. Diluição 1:20, digestor de 26 cm de comprimento; 200 °C e 61 bar; vazão de 0,2 mL min^{-1} e 0,1 mL min^{-1} , com os respectivos tempos de residência.

Vazão (mL min^{-1})	Tempo de residência (s)	RCC (mg L^{-1})	Eficiência (%)
1 0,2	60	4328 ± 40	980 ± 99
2 0,1	120	9805 ± 350	712 ± 64

* Alíquotas de amostra obtidas de maneira distinta - (1) sobrenadante; (2) suco homogeneizado

Ao aumento do tempo de residência da amostra no interior do digestor, mantidas as condições de temperatura e pressão, correspondeu um aumento significativo da eficiência de digestão. Além disso, a eficiência verificada com a vazão de 0,1 mL min^{-1} foi similar à verificada por Silva (2004) para suco de laranja, nas mesmas condições experimentais, mas com digestor de 45 cm de comprimento e vazão equivalente a 0,2 mL min^{-1} .

Estas observações indicam, como seria esperado, a importância do tempo de residência na eficiência da digestão, sendo um fator que deve ser considerado na otimização das condições para a digestão de amostras mais complexas, como leite e sangue bovinos, podendo mesmo ajudar a compensar a redução do comprimento do digestor.

Como forma de verificar a importância do processo de degaseificação na determinação do RCC foi feita a decomposição de solução 1:10 da mesma amostra de suco de laranja, sob as mesmas condições, porém sem submeter à degaseificação o material coletado. Os teores encontrados para C nos digeridos assim obtidos – com e sem degaseificação – são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teores de carbono residual para amostra de suco de laranja. Material digerido e não-digerido, com e sem degaseificação antes da determinação do RCC por ICP OES. Diluição 1:20, digestor de 26 cm de comprimento; 200 °C e 61 bar; vazão de 0,2 mL min⁻¹.

	RCC (mg L ⁻¹)	
	Sem degaseificação	Com degaseificação
Suco digerido	2494 ± 460	980 ± 99
Suco não-digerido	3030 ± 263	4328 ± 39

Pode-se observar que o material digerido, sem degaseificação, apresentou uma quantidade de carbono residual muito superior à encontrada no material digerido e degaseificado. Isto demonstra que o procedimento adotado para a degaseificação de fato promove a remoção do CO₂ formado a partir da oxidação do carbono orgânico presente nas amostras.

O teor de carbono encontrado no material *digerido* sem degaseificação foi bastante superior ao encontrado no material *não-digerido* sem degaseificação. Isto pode ser explicado pelo fato de que, no primeiro caso, a forma em que o carbono se encontra, CO₂, chega à tocha do ICP OES de modo mais eficiente do que ocorre com o C na forma orgânica em que se encontra no material não-digerido.

É importante notar a potencialidade da aplicação do sistema proposto à decomposição de amostras biológicas, considerando-se que os resultados deste experimento foram

observados para decomposição realizada usando-se digestor com comprimento inferior a 30 cm. Na literatura são apresentadas configurações com digestor de comprimento da ordem de 1,5 m (HAIBER; BERNDT, 2000).

4.1.2- Leite desproteinado

O leite integral desproteinado foi obtido a partir da mistura de 5,0 mL de leite bovino integral UHT e 5,0 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético 100 g L⁻¹. A mistura foi homogeneizada e centrifugada sob resfriamento (4000 rpm, 4°C), com o que houve a separação do material em duas fases: uma sólida, constituída principalmente de proteínas, e outra, sobrenadante, considerada como o “leite desproteinado”.

Nestes experimentos foi usado um digestor de 40 cm de comprimento e 200°C como temperatura de digestão.

Nessas condições o leite desproteinado foi inserido no sistema nas formas de solução aquosa 1:10, 1:2 e sem diluição, contendo ácido nítrico como oxidante e peróxido de hidrogênio como agente oxidante auxiliar, concentração de 10% v v⁻¹ cada.

Como nos testes com suco de laranja, também aqui foram feitas em cada amostragem duas injeções de 500 µL da amostra e a coleta dos respectivos digeridos, resultando em um total de pouco mais de 4,0 mL de material coletado.

Para determinação do teor de carbono residual por ICP OES, esse volume de aproximadamente 4,0 mL de material coletado foi levado a 5,0 mL por adição de ácido nítrico e água, para uniformização das diluições das amostras. Foram seguidas as mesmas etapas de acidificação, diluição e degaseificação descritas anteriormente para os experimentos com o suco, inclusive a determinação do teor de carbono residual por ICP OES.

Os resultados obtidos na digestão de leite desproteinado são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Eficiências de decomposição para amostra de leite bovino integral desproteinado. Digestor de 40 cm de comprimento; 200 °C e 6 bar.

Diluição	RCC (mg L⁻¹)		Eficiência (%)
	Não-digerido	Digerido	
1:10	1671 ± 63	194 ± 37	88
1:2	3699 ± 224	1430 ± 78	61
Sem diluição	7740 ± 162	3437 ± 429	56

Como esperado, observa-se a redução da eficiência de decomposição da amostra conforme é menor a diluição utilizada. Isto certamente é causado pelo aumento no teor de matéria orgânica na amostra em relação à quantidade disponível de agentes oxidantes em solução, pois a concentração de ácido e peróxido utilizada foi a mesma em todos os casos. Ainda assim, mesmo nos testes de injeção da amostra sob diluição 1:2 e sem diluição não houve problemas relacionados à obstrução do sistema, sendo o digerido coletado normalmente em suas triplicatas.

Diante da redução na eficiência de decomposição com o aumento da concentração da amostra há, além da proporção entre a quantidade de amostra e de reagentes, dois outros importantes aspectos a considerar: o tempo de residência e a velocidade de reação.

Quanto ao tempo de residência, foi demonstrado nos experimentos com suco de laranja que se trata de uma variável importante na definição da eficiência de digestão, de modo que se pode esperar que ao aumento do tempo de residência correspondam percentuais mais elevados de eficiência de decomposição. Esta variação no tempo de residência, como mencionado anteriormente, pode ser efetuada por meio de alterações em diversos fatores, como o comprimento do digestor e a vazão total em seu interior.

Com relação à temperatura de digestão, foi demonstrado (Gräber & Berndt, 1999) que, ao invés de uma simples relação de proporcionalidade entre temperatura e eficiência de digestão, incrementos de 10°C podem significar um verdadeiro salto na eficiência de digestão. A temperatura de 200 °C na qual foi realizada a decomposição das amostras de leite desproteinado é relativamente baixa dentro das potencialidades do sistema em estudo. Assim, os testes com amostra de leite bovino foram realizados sob temperaturas mais elevadas, buscando-se reduzir os problemas de digestão incompleta.

4.1.3- Plasma de sangue bovino

Para a decomposição da amostra de plasma bovino foram mantidas as condições do experimento com leite desproteinado, bem como os procedimentos realizados de coleta, diluição, acidificação e degaseificação do digerido, antes da determinação de carbono por ICP OES.

Nestes experimentos o plasma foi inserido no sistema em confluência na forma de solução aquosa 1:10. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5. Eficiência de decomposição para amostra plasma bovino, injetado sob diluição 1:10. Digestor de 40 cm de comprimento; 200 °C e 6 bar.

	RCC (mg L ⁻¹)	Eficiência (%)	
	Não-digerido	Digerido	
Diluição 1:10	1979 ± 146	897 ± 240	55

A princípio optou-se por realizar a digestão do plasma sob diluição 1:10 para que os resultados obtidos possam indicar a viabilidade do processo e a concentração mais adequada para realizá-lo.

A eficiência de digestão da amostra de plasma bovino mostrou-se inferior à obtida nos experimentos com leite desproteinado diluído na mesma proporção, 1:10.

Observa-se ainda maiores teores de carbono original na amostra de plasma bovino, quando se compara com os valores encontrados no leite desproteinado, porém a eficiência verificada na digestão do plasma se aproxima daquela encontrada na digestão do leite desproteinado sob diluição 1:2, ou seja, cinco vezes mais concentrado.

4.1.4- Leite bovino integral e desnatado

Anteriormente aos procedimentos de decomposição com uso do sistema em fluxo, amostras de leite bovino UHT integral e desnatado foram analisadas quanto à concentração de alguns metais, após procedimento de decomposição em forno de microondas, tendo sido obtidos os resultados apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Concentrações de metais determinadas por ICP OES em amostras de leite integral UHT e desnatado UHT, após digestão assistida por radiação microondas.

Analito (mg L ⁻¹)	Ca	Cu	Fe	K	Zn
Amostra					
Leite integral	913 ± 13	0,30 ± 0,09	0,42 ± 0,11	1734 ± 58	3,67 ± 0,25
Leite desnatado	926 ± 36	0,22 ± 0,05	0,28 ± 0,03	1695 ± 99	3,96 ± 0,19

Nos procedimentos de decomposição das amostras de leite com uso do sistema em fluxo, para evitar a ocorrência de precipitação nas amostras de leite optou-se pelo uso da configuração em confluência, visando o contato da amostra com a solução oxidante já no interior do sistema, em um ponto imediatamente anterior à entrada do digestor, visto que a desnaturação em meio ácido e consequente insolubilização de material protéico das amostras inviabilizam sua mistura com os reagentes previamente à inserção no sistema.

Primeiramente, para verificar a viabilidade da injeção de amostras de leite no sistema, foram feitos testes de injeção de amostra de leite integral UHT diluído nas proporções 1:20, 1:5 e 1:2 v v^{-1} e também sem diluição, com a digestão ocorrendo sob a pressão limitada de 6 bar.

Para a injeção das amostras de leite o uso da configuração em confluência mostrou-se fundamental. Com um simples teste de adição de ácido nítrico 10% v v^{-1} a uma solução de leite diluído cinco ou dez vezes é possível notar que a desnaturação das proteínas leva à formação de minúsculos grumos que se apresentam na forma de material em suspensão, o que resulta em perda de homogeneidade na amostragem que ocorreria se fosse realizada a mistura prévia de amostra e reagentes.

A amostra e a solução oxidante (HNO_3 1,4 mol L^{-1} + H_2O_2 a 3% m v^{-1}) foram inseridas no ponto de confluência sob vazão de 0,1 mL min^{-1} cada uma, gerando uma vazão de 0,2 mL min^{-1} após este ponto.

Optou-se por realizar os testes de viabilidade de digestão de amostras de leite mantendo-se o digestor a 230 °C, temperatura 30 °C mais alta do que nos experimentos anteriormente descritos com leite desproteinado, como forma de assegurar um melhor desempenho do sistema em função da complexidade da amostra.

Em virtude do alto teor protéico e lipídico do leite bovino, especialmente no caso do leite integral, a injeção desse tipo de amostra, ainda que diluída, despertou expectativa quanto à viabilidade, devido à considerável probabilidade de entupimento, principalmente no capilar restritor, pois ao encontro da solução da amostra com a solução ácida há a conversão do material protéico em material particulado insolúvel, que segue arrastado pelo fluxo. Se as condições de digestão não forem apropriadas, a obstrução do sistema por essas partículas é certa, inviabilizando a coleta do material digerido.

Comparando-se visualmente o leite em solução aquosa antes do processo de digestão e o material digerido coletado, é possível verificar a nítida diferença na turbidez destes materiais. Enquanto as soluções originais de leite apresentam o aspecto esbranquiçado característico, mais intenso conforme menor era a diluição do leite, os digeridos obtidos a partir as diluições 1:20 e 1:5 se apresentaram límpidos ou com pouca turvação, o que indicou a provável ocorrência da decomposição de matéria orgânica das amostras. Menores diluições provocaram problemas de obstrução do sistema, inviabilizando a avaliação. Além disso, o material digerido que pôde ser coletado antes de acontecer o entupimento era uma solução de tonalidade caramelo, indicando a ocorrência da reação de Maillard e evidenciando a não digestão da amostra.

Em seguida a esses testes de injeção de leite integral, sob as mesmas condições foi realizada a digestão de leite integral UHT sob diluição 1:10, com determinação do RCC. Na tabela 7 são apresentados os resultados obtidos neste experimento, referentes à eficiência de digestão. Neste ponto a diluição 1:10 foi escolhida por ser intermediária às diluições avaliadas e ainda porque relativamente a diluição 1:5 resultou em maiores problemas de entupimento, gerando grande dificuldade na obtenção de triplicatas das digestões.

Tabela 7. Eficiências de decomposição para amostra de leite bovino integral. Digestor de 40 cm de comprimento; T = 230 °C e P = 6 bar.

	RCC (mg L⁻¹)	Eficiência (%)	
	Não-digerido	Digerido	
Diluição 1:10	5590	2200	61

Devido ao superior conteúdo de proteínas e gordura, a decomposição da amostra de leite integral teve eficiência similar à obtida com o leite desproteinado injetado sob

concentração 5 vezes mais alta e sob temperatura inferior. No entanto, fica demonstrada a potencialidade de aplicação do sistema, mediante otimização das condições experimentais, na decomposição de amostras de leite.

Com base nos resultados observados para a digestão preliminar de amostras de leite integral a várias concentrações, o sistema em fluxo foi usado para a digestão de leite bovino desnatado, sob diluições de 1:10 e 1:5.

Na figura 5 pode-se verificar a diferença observada entre o aspecto do material digerido e não-digerido, referente às soluções 1:10 e 1:5 de leite bovino desnatado. Nos dois casos o material coletado se apresentou límpido e incolor, indicando a provável ocorrência de digestão das amostras.

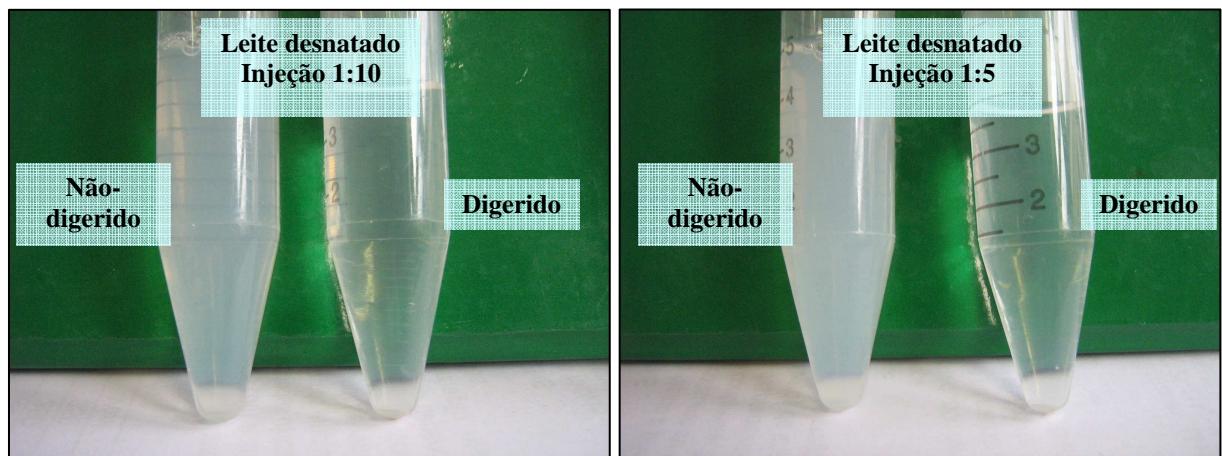


Figura 5. Aspecto das soluções de material digerido e não-digerido obtidos a partir de leite bovino desnatado diluído nas proporções 1:10 e 1:5.

O material não-digerido foi preparado como feito nos experimentos descritos anteriormente, ou seja, 1,0 mL da solução de leite 1:10 ou 1:5 foi diluído a 5 mL e acidificado da mesma maneira que o respectivo material obtido após duas injeções de 500 μ L da amostra, para que possa ser feita a comparação.

4.2- Otimização das condições de operação do sistema proposto

4.2.1- Pressão máxima de trabalho

Durante a etapa de otimização do sistema para estes testes, verificou-se que a bomba tipo seringa, usada para injeção da solução oxidante, operava com vazão regular até a pressão máxima de 7 bar. Acima desse valor o êmbolo da seringa era deslocado com dificuldade pelo mecanismo da bomba, resultando em variações na vazão de injeção da solução oxidante no sistema, podendo ocorrer em último caso até mesmo inversão do fluxo e retorno de solução para o interior da seringa.

Por isso, o comprimento do capilar restritor foi reduzido para cerca de 2 cm, de modo que a pressão interna do sistema não viesse a superar a faixa de 6 a 7 bar. Buscou-se operar na faixa de mais alta pressão possível para que o aquecimento pudesse continuar sendo feito sem que o fluxo das soluções no interior do sistema sofresse maiores perturbações pela ocorrência da ebulação do líquido ao passar pelo digestor. Foi aplicada a vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ para o fluxo transportador C_1 (contendo a amostra) e também para o fluxo transportador C_2 (solução oxidante), totalizando a vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ no interior do digestor.

4.2.2- Problemas de obstrução

A injeção da solução de leite bovino desnatado 1:10 e a coleta do respectivo digerido foram realizadas com razoável normalidade, sem importantes problemas de obstrução do sistema. No caso da injeção e coleta referentes ao leite desnatado 1:5, ocorreram problemas relacionados à obstrução do sistema.

Como consequência desta rápida vaporização dos líquidos do interior do digestor, todo o material sólido que ainda não havia sido decomposto e, portanto, permanecia em suspensão, provavelmente fica aderido às paredes internas do digestor, e somente voltam a se desprender

mediante lavagem do sistema, causando muitos problemas de obstrução do sistema até que sejam removidos. Isso pode ser deduzido da necessidade que havia de permitir passagem do fluxo de água pelo sistema durante vários minutos, preferencialmente sob aquecimento, até que se pudesse novamente colocar o restritor. Sem esse processo – muitas vezes demorado – de lavagem do sistema, o capilar apresentava entupimento imediatamente após ser recolocado.

A chegada constante de material não-digerido ao capilar restritor posicionado ao final do sistema acontece provavelmente em consequência da limitada pressão de trabalho determinada pela bomba tipo seringa. Sem uma pressão alta o suficiente no interior do sistema, nas temperaturas de operação o líquido entra em ebulação ao alcançar o digestor, e este fato pode ser constatado facilmente pela observação de que na saída do sistema, ou seja, no capilar restritor, a solução contendo o material digerido é coletada sob a forma líquida ocorrendo simultaneamente a formação de um spray que alcança a parede do tubo de ensaio em que o material é coletado. Pode-se dizer que quantidades equivalentes do material coletado após a digestão são obtidas por gotejamento direto e por condensação do spray que chega à parede do tubo.

Os vapores formados internamente no digestor representam naturalmente uma expansão do volume do líquido correspondente, sendo impulsionado mais rapidamente em direção ao capilar restritor e forçando na mesma direção o deslocamento acelerado da fase líquida. Esta perturbação do sistema no interior do digestor certamente leva à ocorrência de pontos em que a digestão não ocorre de modo eficiente, seja pela ausência momentânea de meio líquido, seja pela chegada de material à saída do digestor em tempo insuficiente para que ocorresse a decomposição, restando no interior dos capilares algum material protéico ainda não digerido. Este material é arrastado pelo fluxo irregular produzido pela ebulação, e enquanto não for completamente removido do sistema por um procedimento de lavagem, continuará causando a obstrução do restritor.

Desta forma, a melhor maneira de contornar o aumento de pressão causado pela obstrução do sistema, especialmente na digestão de amostras de leite, é promover o resfriamento do sistema antes de remover qualquer um de seus elementos de vedação ou mesmo o capilar restritor, de modo a evitar que o líquido no interior do digestor entre em ebulição e produza resíduos de difícil remoção.

4.2.3- Diluição da amostra

Na seqüência dos experimentos, considerando os resultados obtidos com os primeiros testes de decomposição de leite integral e desnatado, bem como após a observação das principais características operacionais do sistema em estudo, foi enfatizada a decomposição das amostras com uso do sistema com a menor diluição possível, visando a posterior determinação dos analitos.

No leite bovino, zinco e cobre ocorrem em concentrações relativamente altas – 3 a 5 mg L⁻¹ e 0,05 a 0,2 mg L⁻¹, respectivamente (DE LA FUENTE et al., 1995; CASEY et al., 1995) –, se comparadas aos teores de selênio, normalmente situados na faixa de 20 a 30 ng g⁻¹ (CASEY et al., 1995).

Faz-se então imperativa a diminuição das diluições pelas quais os analitos passam ao longo do processo de decomposição com o sistema em fluxo, até o momento da análise propriamente dita. Assim, buscou-se ajustar as quantidades de amostra e reagentes e também o tempo de coleta do material digerido, para que a amostra passasse pela menor diluição possível, pois, considerando a baixa concentração de Se em amostras de leite bovino integral e desnatado, as sucessivas diluições que a amostra sofre até a análise podem tornar inviáveis as quantificações pelas técnicas disponíveis.

Conforme dito anteriormente, a pressão máxima de trabalho do sistema é de 6 a 7 bar na configuração em confluência, sendo este limite determinado pelas características da bomba

tipo seringa, que impulsiona a mistura oxidante. Esta pressão foi definida considerando-se o uso de seringas com capacidade para até 3,0 mL, pois não foi possível o uso de êmbolos de maior diâmetro, por requerer, para uma mesma pressão, maior força imposta pelo mecanismo da bomba. Para citar um exemplo, no teste de funcionamento com uma seringa de capacidade de 20 mL a pressão máxima verificada foi de aproximadamente 1 bar.

Considerando a capacidade da seringa utilizada e o tempo máximo de operação do sistema correspondente ao esvaziamento do êmbolo, foi estipulado que o uso de seringa de 3,0 mL seria a melhor opção; o uso de seringas de menor capacidade resulta em um tempo muito curto de autonomia na operação, e seringas de maior capacidade requerem uma pressão muito baixa de operação.

Testes preliminares realizados com corantes indicaram 23 min como o tempo mínimo necessário entre o surgimento e o fim do sinal transiente que corresponde à chegada da amostra no ponto de coleta após sua inserção com o injetor, quando utilizada alça de amostragem de 1,5 mL, dentre várias possibilidades testadas. O uso de uma alça com esta capacidade foi adotado em substituição às duas injeções de 0,5 mL, havendo importante diminuição da diluição final da amostra ao passar pelo sistema.

O tempo de 23 min necessário para se coletar a amostra é aproximadamente o mesmo tempo necessário para o consumo de 80% do conteúdo da seringa de 3,0 mL, e assim o uso da seringa com esta capacidade em conjunto com a alça de amostragem de 1,5 mL se mostrou uma combinação adequada para a que se conseguisse reduzir a diluição final da amostra com o processo de digestão.

Com o uso desta combinação, 1,5 mL de amostra de leite (previamente diluído cinco vezes) passaram a ser injetados no sistema, gerando um volume aproximado de 4,8 mL de material coletado após a digestão, o que corresponde a uma diluição total de 16,7 vezes.

No caso da determinação de Se por geração de hidretos, o procedimento de preparo da amostra inclui, após a etapa de digestão, uma pré-redução dos analitos realizada mediante a adição de ácido clorídrico, sendo necessária a concentração final $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl, o que leva a uma nova diluição da amostras (diluição final de aproximadamente 33 vezes). Este fator de diluição é significativo quando o analito pode ser encontrado na amostra *original* em concentrações de apenas algumas dezenas de microgramas por litro, como é o caso de selênio em amostras de leite bovino.

4.2.4- Concentração da solução oxidante

A princípio, para que, como nos experimentos com sucos, as concentrações de HNO_3 e H_2O_2 em contato com a amostra fossem $10\% \text{ v v}^{-1}$, respectivamente, a solução oxidante injetada foi preparada com o dobro dessa concentração, ou seja, HNO_3 e H_2O_2 a $20\% \text{ v v}^{-1}$ cada, como forma de compensar a diluição que ocorre após a confluência dos dois fluxos de igual vazão. No entanto, o sistema passou a apresentar freqüentes entupimentos principalmente em suas porções finais – capilar de resfriamento e capilar restritor –, provavelmente devido ao desprendimento de fragmentos do próprio capilar em aço inox, o que pode ser decorrente do ataque da solução ácida ao metal. Este ataque ao material do tubo provavelmente é mais intenso próximo à entrada do digestor, região na qual o ácido nítrico ainda não se encontra efetivamente diluído ou consumido pela mistura com a solução da amostra. Pode-se deduzir também que a maior freqüência de entupimentos mediante aumento na concentração ácida é resultado de maior perturbação ao fluxo no interior do digestor, causada por intensa ebulação do ácido nítrico ainda não homogeneizado logo após a confluência.

Portanto, apesar da diluição que naturalmente ocorreria após o encontro das soluções de amostra e de reagentes, as concentrações de HNO_3 e H_2O_2 na solução oxidante foram

mantidas a 10% v v⁻¹, como um meio de evitar os entupimentos e mesmo um maior desgaste do material do digestor pelo ataque ácido, resultando em HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3,0% mv⁻¹ antes da confluência.

4.3- Determinação de selênio

Os teores de selênio foram determinados por espectrometria de absorção atômica, fazendo-se uso da geração de hidretos voláteis para melhoria na sensibilidade e nos limites de detecção (HG-AAS) (DEDINA; TSALEV, 1995). Faixa linear foi observada até aproximadamente 10 µg L⁻¹ ($y = 0,0084 + 0,032 x$, $r^2 = 0,998$). Na figura 6 são apresentados os perfis obtidos para curvas de calibração construídas inicialmente até 50 µg L⁻¹ (a) e até 10 µg L⁻¹ (b).

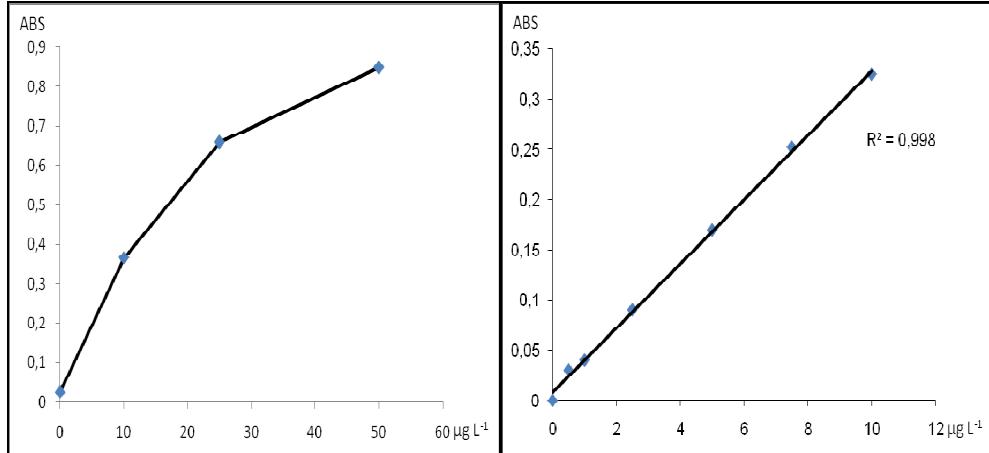


Figura 6. Curvas analíticas de calibração (ABS vs. concentração) para selênio em diferentes faixas de concentração: a) até 50 µg L⁻¹; b) faixa linear identificada até 10 µg L⁻¹.

A acidificação das soluções utilizadas para construir as curvas de calibração também foi considerada. Antes da etapa de geração de hidretos, as amostras passaram por etapa de acidificação, com adição de ácido clorídrico até concentração de 6 mol L⁻¹. Com isto, a concentração ácida é devida principalmente ao HCl, tanto nas amostras quanto nas soluções utilizadas para a construção das curvas de calibração, sendo o HNO₃ empregado durante o

preparo das amostras (5 % vv^{-1}) como oxidante, quando de sua passagem pelo sistema. O volume adicionado das soluções oxidantes (2,5 mL de HNO_3 1,4 mol L^{-1} + H_2O_2 3% m v^{-1}) é ainda consumido durante o processo de digestão no sistema a alta pressão e temperatura.

Mesmo assim, com o objetivo de se verificar a possível interferência do meio ácido, foram preparadas curvas de calibração com soluções contendo excesso de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (7,0 mol L^{-1} e 15 % m v^{-1} , respectivamente). Na figura 7 as curvas de calibração obtidas em meio nítrico e em meio clorídrico são apresentadas, tendo sido observada interferência em função do meio (diferentes inclinações nas curvas de calibração – $y = 0,0147x + 0,0238$, $R^2 = 0,989$ e $y = 0,0278x + 0,0055$, $R^2 = 0,997$, respectivamente). No entanto, em função da concentração final do HNO_3 após a digestão das amostras, não houve interferência na determinação do Se, que nos experimentos de adição e recuperação realizados foram observadas recuperações da ordem de 95 % de Se. Essa recuperação foi observada em função do pequeno volume de HNO_3 adicionado e dos efeitos de diluição.

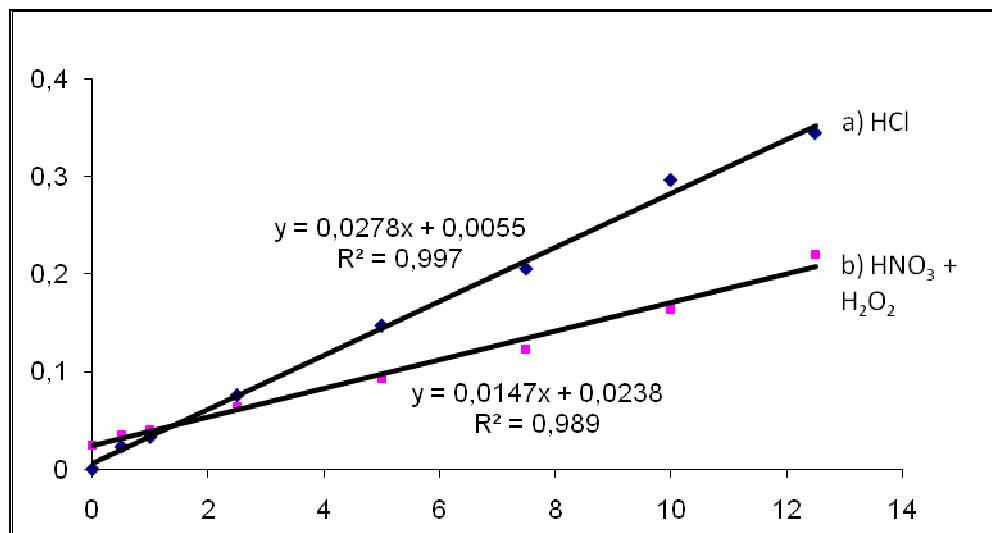


Figura 7. Curvas analíticas de calibração para determinação de Se por HG-AAS; a) curva preparada em meio HCl 6,0 mol L^{-1} ; b) curva preparada em meio contendo 7,0 mol L^{-1} HNO_3 e 15 % m v^{-1} H_2O_2 .

Os limites de detecção e de quantificação encontrados para determinação de Se por HG-AAS foram $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,99 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Considerando-se os valores típicos da concentração de selênio em leite bovino – 20 a 30 ng g^{-1} (CASEY et al., 1995) –, poder-se-ia esperar, mesmo após as sucessivas diluições pelas quais a amostra passa ao ser tratada no sistema em estudo, que o teor de selênio no digerido se encontrasse em uma faixa ainda passível de determinação com a instrumentação utilizada.

Inicialmente as amostras de leite foram digeridas em forno com radiação microondas, como método comparativo. Na tabela 8 são apresentados os teores obtidos após digestão empregando o programa descrito no item (3.1).

Tabela 8. Teores de selênio obtidos em amostras de leite bovino desnatado e integral e em amostra de material de referência certificado (CRM 8435 – whole milk powder), após digestão assistida por radiação microondas.

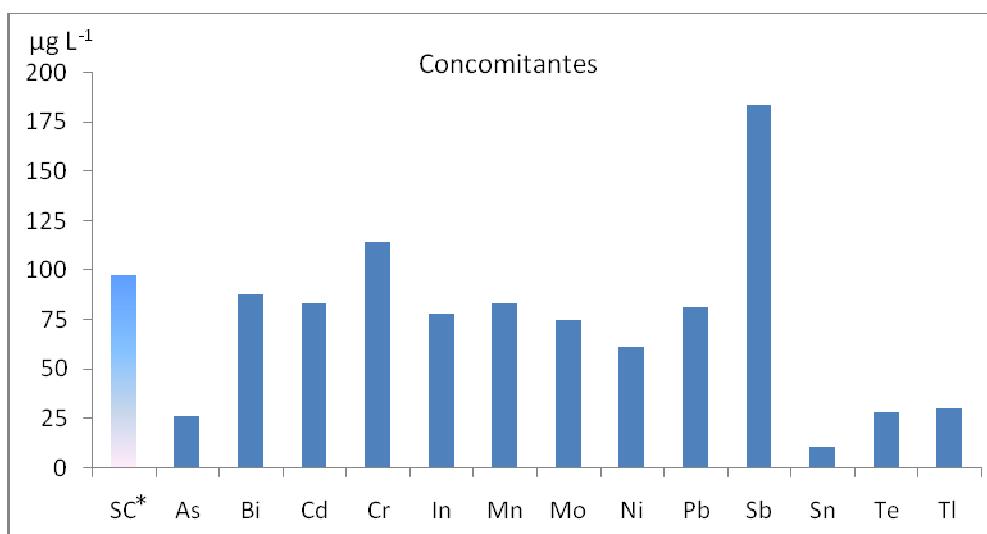
	Leite bovino		CRM		
	Desnatado	Integral	Encontrado	Referência	Recuperação
Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$38,0 \pm 5,6$	$29,7 \pm 1,3$	3,60	$4,02 \pm 0,004$	$111,7 \% \pm 0,12$

Outro aspecto considerado no experimento de digestão foi a hipótese relativa à contaminação por elementos químicos solubilizados a partir dos materiais que compõem o sistema (aço inoxidável). Para tanto, a composição química da liga metálica que constitui o tubo usado no digestor foi considerada. O digestor é a parte do sistema mais susceptível à lixiviação de elementos contaminantes em virtude do meio ácido e das condições de alta temperatura a que é submetido durante o processo de decomposição das amostras. Na tabela 9 é apresentada a composição química da liga metálica conforme fornecida pelo fabricante.

Tabela 9. Composição química do tubo digestor utilizado no sistema em fluxo**Composição da liga metálica**

Componentes	Porcentagem em massa
Ferro	65,0
Cromo	17,0
Níquel	12,0
Molibdênio	2,50
Manganês	2,00
Silício	1,00
Carbono	0,0800
Fósforo	0,0450
Enxofre	0,0300

(UPCHURCH SCIENTIFIC, 2008)

**Figura 8.** Avaliação do efeito de 50 mg L⁻¹ de concomitantes em solução analítica 100 µg L⁻¹ de Se. (*sem concomitante adicionado).

Testes de interferência na determinação de selênio foram realizados e consistiram no preparo de soluções analíticas $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, às quais foram adicionados individualmente os contaminantes em excesso, equivalente a 50 mg L^{-1} .

Na tabela 10 são apresentados os valores em porcentagem dos efeitos sobre a leitura de Se em relação aos concomitantes avaliados.

Tabela 10. Percentuais agregados à concentração de selênio determinada em solução analítica de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se na presença de concomitantes em concentração de 50 mg L^{-1} .

Concomitante	As	Bi	Cd	Cr	In	Mn	Mo
Percentual	-73,2 %	-10,5 %	-14,8 %	+16,8 %	-20,4 %	-14,8 %	-23,7 %
Concomitante	Ni	Pb	Sb	Sn	Te	Tl	
Percentual	-37,2 %	-17,0 %	+88,4 %	-89,5 %	-71,3 %	-69,5 %	

Pode ser visualizado na figura 8 e também na tabela 10 que as maiores interferências na determinação de selênio foram observadas para as soluções contendo excesso de As, Ni, Sb, Sn, Te e Tl. Destes elementos, apenas o níquel participa da composição do digestor. Além do níquel, podemos verificar que o cromo presente como concomitante levou a um incremento, embora menor, na concentração de selênio medida. Suas interferências causaram respectivamente diminuição de 37,2 % e elevação de 16,8 % na intensidade do sinal obtido para Se. Foi avaliada também a interferência que a adição de cobre às amostras poderia causar nas determinações de selênio, por ser um concomitante que diminui a sensibilidade nas determinações deste elemento por HG-AAS (DEDINA. 1995). Como nos experimentos de adição e recuperação também seria adicionado ao leite, juntamente com Se, procurou-se verificar a possibilidade de ocorrer interferências entre as medidas. Além disso, embora não conste da lista de constituintes do material do digestor, nas determinações de cobre os brancos

se apresentaram elevados. Soluções contendo 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se e diferentes teores de cobre foram analisadas para quantificação de Se. Os resultados são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Estudo da interferência de cobre na determinação de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se por HG-AAS.

Cu (mg L⁻¹)	0	6,25	12,5	25,0	75,0	125,0	250,0
Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43,7	43,2	45,1	44,3	45,9	44,7	43,7

Com este experimento foi possível verificar que não há interferência do cobre na determinação de Se por HG AAS nas faixas de concentração de trabalho. Também foi possível observar a recuperação do sistema de geração de hidretos, que proporcionou 100% de recuperação.

Além dos elementos até aqui citados, é importante considerar que o ferro é o principal constituinte do digestor, e para detecção de Se por HG-AAS os níveis toleráveis são de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,0 mg mL^{-1} para Fe(II) e Fe(III), respectivamente (DEDINA, 1995), sendo esses valores mais elevados do que o que se pode encontrar por lixiviação do material do digestor pela solução ácida (SILVA, 2004). Além disso, as amostras correspondentes ao branco do sistema apresentaram-se baixos.

Em seguida, experimentos de adição e recuperação de selênio foram realizados com adição de maior concentração do analito utilizando-se, desta vez, leite desnatado em substituição ao leite integral.

A mudança da matriz foi realizada com o intuito de se favorecer a eficiência de decomposição da amostra, o que poderia levar a menores interferências causadas por resíduos de decomposição incompleta. Na tabela 12 são apresentados os resultados obtidos para os experimentos de adição e recuperação de selênio em amostras de leite bovino UHT integral e desnatado.

Tabela 12. Teores de selênio e recuperações obtidas, determinadas por HG-AAS em amostras de leite bovino UHT integral e desnatado, após decomposições no sistema em fluxo; digestor de 60 cm, 240 °C, 6 bar.

Sistema em fluxo			
	Se (determinado)	Se (adicionado)	% recup
Leite integral	0,48 mg L ⁻¹	0,67 mg L ⁻¹	72 ± 12,4
Leite desnatado	0,24 mg L ⁻¹	1,33 mg L ⁻¹	18 ± 9,2

Os testes com leite desnatado – matriz menos complexa à qual foi adicionada maior quantidade de selênio – foram realizados nas mesmas condições que os experimentos com leite integral, no entanto os valores adicionados não foram recuperados (apenas 18% de adição e recuperação), ao contrário do observado com o leite integral (72%).

Não sendo possível a determinação direta de selênio nas amostras digeridas com o sistema em fluxo, fez-se necessária então a aplicação de uma estratégia que levasse em conta a compatibilidade entre a curva analítica de calibração e as amostras. Para isso foi feito uso da técnica de adição de analito.

No entanto, também a técnica de adição de analito não possibilitou a quantificação de selênio nas amostras tratadas com o sistema em fluxo. Foi constatado que, mesmo adicionando-se o analito em uma ampla faixa de concentração, os valores permaneceram constantes, não havendo tendência de incremento nos valores de absorbância quando realizada a leitura por HG-AAS, indicando poder estar ocorrendo a perda do Se por volatilização, o que foi comprovado nos próximos experimentos.

Dois fatores importantes a serem considerados podem ajudar a compreender a baixa recuperação obtida para essas elevadas quantidades de analito adicionadas à amostra,

previamente à decomposição no sistema em fluxo em estudo. São eles: a característica de volatilidade do Se e a ocorrência de ebulação sob altas temperaturas no interior do sistema.

Como explicado anteriormente, de modo ideal o sistema deveria ser operado sob pressão suficiente para que não houvesse possibilidade de vaporização do líquido no interior do digestor. Por uma limitação imposta pelo equipamento (bomba tipo seringa) utilizado, a pressão de trabalho foi limitada a um máximo de 6 ou 7 bar, condição insuficiente para conter a vaporização da solução no interior do digestor.

É importante salientar que, em decorrência da volatilidade de selênio, há uma série de precauções a serem tomadas quando se trabalha com as soluções deste elemento, de modo a se evitar perdas. Por exemplo, evita-se aquecer tais soluções a altas temperaturas, sendo recomendável o cuidado de manter bem fechados os frascos que as contêm e realizar os procedimentos analíticos o quanto antes.

Por suas propriedades de volatilização, nas condições dos experimentos provavelmente está havendo transferência do selênio para a fase vapor no interior do digestor, e nesta fase é provável que o analito seja perdido, mesmo após a passagem pela região do sistema na qual ocorre o resfriamento em banho de gelo. É observado que, mesmo passando por esta etapa de resfriamento, o líquido coletado na saída do sistema chega até o recipiente de coleta juntamente com uma fração que se encontra ainda no estado de vapor. Considerando este aspecto, torna-se razoável supor que a ebulação que ocorre no interior do sistema tem relação com esta baixa recuperação dos analitos adicionados. Desta forma, o uso do sistema sob condições em que não ocorra ebulação da fase líquida resultaria em melhores resultados de recuperação para este analito.

Para melhor investigar se os motivos da baixa recuperação estão relacionados com deficiência na decomposição da amostra ou com perdas por volatilização, soluções analíticas de Se foram submetidas ao mesmo tratamento de aquecimento que as amostras de leite, para

verificação do efeito da temperatura utilizada no processo na recuperação do analito. Os resultados desse teste podem ser vistos na tabela 13.

Tabela 13. Adição e recuperação de selênio em solução aquosa, após passagem pelo sistema em fluxo, com digestor aquecido a 240 °C e sob temperatura ambiente, 6 bar.

	Sistema em fluxo		% recup
	Valor encontrado	Valor adicionado	
240 °C	-	40 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se	-
T ambiente	38 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se	40 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se	95

Para o sistema em fluxo operando sob a temperatura de 240 °C não foi observada recuperação do analito. Com a passagem da solução pelo sistema a frio, houve completa recuperação, evidenciando que a razão da perda de selênio nas amostras tratadas com uso do sistema em fluxo reside de fato na volatilização do analito ainda no interior do sistema.

Elucidada a causa da perda do analito nos experimentos anteriores, foram avaliadas algumas alternativas que tornassem possível a recuperação de selênio após tratamento sob a temperatura de 240 °C.

Utilizando-se o sistema com configuração em confluência, uma alteração foi feita na maneira como a amostra era coletada. Um tubo Tygon® com alguns centímetros de comprimento e pequeno diâmetro interno foi acoplado ao capilar restritor, para que a fase líquida obtida fosse conduzida à porção inferior do frasco de coleta, e inserida diretamente em 0,2 mL de solução de HCl 5 mol L^{-1} juntamente com a fase de vapor e as gotículas que formam o spray. A solução ácida utilizada foi escolhida por ser o meio no qual é realizada a etapa de pré-redução. Os procedimentos de injeção, coleta e análise foram os mesmos

utilizados com as amostras e, além disso, o tubo de ensaio no qual foi feita a coleta foi mantido em banho de gelo.

Com o uso do tubo para conduzir as soluções do capilar restritor ao interior da solução ácida, foi possível visualizar a grande proporção de vapor que chega à saída do sistema.

No sistema assim descrito foi injetada solução de Se $40 \mu\text{g L}^{-1}$, não se observando a recuperação do analito, apesar da estratégia que procurou recuperar os vapores gerados diretamente no interior da solução ácida resfriada em banho de gelo.

O sistema em fluxo foi então alterado para voltar a operar sob alta pressão, pela remoção da bomba tipo seringa. Capilar restritor com maior comprimento foi utilizado, sendo obtida pressão de aproximadamente 85 bar mediante vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Para a coleta das soluções após a saída do sistema, a extremidade do capilar restritor foi posicionada no interior de $0,2 \text{ mL}$ de solução HCl 5 mol L^{-1} , em tubo de ensaio que foi mantido em banho de gelo durante toda a coleta.

Mesmo com a pressão de 85 bar, a temperatura de 240°C foi suficiente para levar à formação de vapores que chegavam à saída do sistema, sempre que a solução oxidante era injetada. Foi possível visualizar a evolução de bolhas muito pequenas que se desprendiam da extremidade do capilar restritor em direção à superfície da solução ácida usada para coleta. Foi observado que a formação dessas bolhas persistia até temperaturas inferiores a 200°C , o que faz da redução da temperatura uma alternativa inviável para controlar essa formação de vapores, pois seria necessário trabalhar com temperaturas muito baixas. Mais uma vez, a principal condição a ser adequada deveria ser a pressão, que na faixa de temperatura acima de 200°C deve ser ajustada a mais de 200 bar (HAIBER; BERNDT, 2000).

Foi verificado que com a injeção de solução de ácido nítrico 10 %, sem conter o peróxido, a formação de vapores é consideravelmente reduzida, chegando a cessar em alguns momentos mesmo sob a temperatura de 240°C .

Para comprovar o papel definitivo que a volatilização no interior do sistema em fluxo tem sobre a recuperação de Se nas soluções, e conseqüentemente na viabilidade de análises de Se em amostras submetidas a este tratamento, soluções analíticas de Se foram injetadas no sistema, tendo sido preparadas de duas maneiras distintas: solução de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ Se em meio HNO_3 10 % v v⁻¹ e solução $40 \mu\text{g L}^{-1}$ Se em meio HNO_3 10% v v⁻¹ + H_2O_2 10 % m v⁻¹. Os resultados para a recuperação de selênio são mostrados na tabela 14.

Tabela 14. Teores de selênio e recuperações obtidas, determinadas por HG-AAS a partir de soluções analíticas de Se tratadas no sistema em fluxo; digestor de 60 cm, 240 °C, 85 bar.

Sistema em fluxo			
	Se (determinado)	Se (adicionado)	% recup
HNO_3 10 %+ H_2O_2 10 %	$7,9 \mu\text{g L}^{-1}$	$40 \mu\text{g L}^{-1}$	19
HNO_3 10 %	$24,3 \mu\text{g L}^{-1}$	$40 \mu\text{g L}^{-1}$	60

Para a solução injetada com a presença de peróxido, ou seja, para a qual houve a formação de bolhas na solução de coleta, não houve recuperação do analito. No entanto, para a solução de mesma concentração preparada apenas em meio nítrico, houve recuperação um pouco mais efetiva do analito, o que demonstra que a manutenção da fase líquida no interior do sistema é fator determinante para a viabilidade da quantificação de selênio em amostras tratadas no sistema em fluxo proposto.

É importante acrescentar ainda que não foi possível realizar a determinação de selênio nas amostras de leite UHT ou de leite desproteinado diretamente por HG-AAS, preparadas apenas mediante diluição. No caso do leite UHT, a mistura da solução da amostra com os reagentes no interior da câmara de separação no sistema de geração de hidretos resulta na

formação de espuma que tende a ser arrastada pelo fluxo de argônio em direção à cela de quartzo onde ocorre a atomização. Além disso, a solução da amostra suja bastante o sistema.

CONCLUSÃO

5- CONCLUSÃO

O sistema em fluxo apresentou elevada eficiência de decomposição para a oxidação da matéria orgânica quando os experimentos foram realizados com diferentes amostras de sucos de frutas, mesmo considerando as reduzidas dimensões da bobina digestora, inferior inclusive às utilizadas nos demais experimentos e em outros trabalhos que constam na literatura. Com as dimensões empregadas, as decomposições foram efetuadas a 200 °C e 60 atm.

Variando-se a vazão aplicada no sistema, foi possível verificar a relevância do tempo de residência no interior do digestor de 26 cm de comprimento, sendo mantidas as condições experimentais de temperatura e pressão (200 °C e 6 atm). Operando-se a 0,1 mL min⁻¹ foi alcançada eficiência similar à observada quando a vazão de 0,2 mL min⁻¹ foi usada com digestor de 45 cm de comprimento, demonstrando que nesse tipo de sistema o aumento do tempo de residência pode compensar a redução das dimensões do digestor.

Resultados dos teores de carbono residual encontrados em amostras digeridas e não digeridas de diversas matrizes indicam a conversão do carbono orgânico em estruturas menos complexas, especialmente em dióxido de carbono.

A inserção da solução oxidante no fluxo carregador, confluindo com as amostras de leite bovino imediatamente antes da introdução na bobina digestora demonstrou ser uma alternativa adequada para a introdução da amostra no sistema digestor, pois favorece a amostragem evitando a ocorrência de precipitação das proteínas. Com esta configuração, foi possível a obtenção de considerável eficiência de oxidação da matéria orgânica das amostras de leite e de plasma sanguíneo.

Por outro lado, a pressão máxima de trabalho foi limitada em função das características de potência da bomba usada para injeção da solução oxidante, fator determinante para a otimização dos demais parâmetros de operação do sistema, como

temperatura do digestor e teor de matéria orgânica das amostras, inviabilizando a determinação de selênio proposta inicialmente. Esse fato ocorreu em função da perda do elemento por volatilização, sendo que o aumento da pressão de trabalho viabilizaria a determinação de selênio.

Mesmo considerando os problemas que ocorreram, entende-se que o emprego de sistema a altas pressão e temperatura apresenta-se como alternativa para decomposição de amostras líquidas ou suspensões, devendo ser viabilizada após a implementação de sistema em confluência suscetível à altas pressões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAEJOS, M. S.; ROMERO, C. D. Selenium concentration in milks. **Food Chemistry**, v. 52, p. 1-18, 1995.

ALKEMADE, C. T. J.; MILATZ, J. M. W. Double-beam method of spectral selection with flame. **Applied Scientific Research**, v. 4B, p. 289-299, 1955.

ARRUDA, M.A.Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.

ASFAW, A.; WIBETOE, G. Simultaneous determination of hydride (Se) and non-hydride formind (Ca, Mg, K, P, S and Zn) elements in various beverages forming (beer, coffee and milk), with minimum sample preparation, by ICP-AES and use of a dual-mode sample-introduction system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 173-179, 2005.

BEACH, L. M. Determination of As, Sb and Se in difficult environmental samples by hydride generation, AA Instruments at work, AA-105, Varian, 1992. Disponível em: <<http://www.varianinc.com.cn/products/spectr/aa/atworks/aa105.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2008.

BERNDT, H.; SCHALDACH, G.; KÄGLER, S.H. Flame AAS/flame AES for trace determination in fresh and used lubricating oils with sample introduction by hydraulic high-pressure nebulization. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 355, p. 37-42, 1996.

BERNDT, H.; SCHALDACH, G.; SPIVAKOV, B.Y.; SHKINEV, V.M. Atomic absorption determination of Cd, Co, Cu, Fe, Ni in viscous aqueous solutions of poly(ethyleneimine) using a high-pressure flow and nebulization system for sample introduction. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 345, p. 428-431, 1993.

BERNDT, H.; YÁNEZ, J. High-temperature hydraulic high pressure nebulization: a recent nebulization principle for sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 11, p. 703-712, 1996.

BOWMAN, J.; FAIRMAN, B.; CATTERICK, T. Development of a multi element hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry procedure for the simultaneous determination of arsenic, antimony and selenium in waters. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 3, p. 313-316, 1997.

BRAMAN, R. S.; JUSTEN, L. L.; FOREBACK, C. C. Direct volatilization-spectral emission type detection system for nanogram amounts of arsenic and antimony. **Analytical Chemistry**, v. 44, p. 2195, 1972.

BRAMAN, R.S.; FOREBACK, C.C. Methylated forms of arsenic in environment. **Science**, v. 182, p. 1247-1249, 1973.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. Flow injection and microwave-oven sample decomposition for determination of copper, zinc and iron in whole blood by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 179, p. 351-357, 1986.

BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. On-line sample pre-treatment systems interfaced to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 123, p. 561-569, 1998. (a)

BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 63-80, 1998. (b)

CASEY, C. E.; SMITH, A.; ZHANG, P. Microminerals in human and animal milks. In: JENSEN, R. G. (Ed.). **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 622-674.

CAVA-MONTESINOS, P.; CERVERA, M. L.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIA, M. Hydride generation atomic fluorescence spectrometric determination of ultratraces of selenium and tellurium in cow milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, p. 291- 300, 2003.

CAVA-MONTESINOS, P.; DE LA GUARDIA, A.; TEUTSCH, C.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Speciation of selenium and tellurium in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 696-699, 2004.

CHU, R. C.; BARRON, G. P.; BAUMGARNER, P. A. Arsenic determination at sub-microgram levels by arsine evolution and flameless atomic absorption spectrophotometric technique. **Analytical Chemistry**, v. 44, p. 1476, 1972.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA TECNOLÓGICA EM INFORMÁTICA PARA A AGRICULTURA (CNPTIA) – Agência de informação Embrapa Negócio do Leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 04 jun. 2008.

CRISPINO, C. C. **Determinação de As, Sb e Se em material agronômico espectrometria de emissão óptica acoplada a plasma induzido com geração de hidretos (HG-ICP-OES).** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

DÉDINA, J.; TSALEV, D. L. **Hydride generation atomic absorption spectrometry**, New York: John Wiley, 1995. 526 p.

DE LA FUENTE, M. A.; GUERRERO, G.; JUÀREZ M. Manganese and zinc analysis in milk by microwave oven digestion and platform graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 2406-2410, 1995.

D'ULIVO, A. Determination of selenium and tellurium in environmental samples. **Analyst**, v. 122, p. 117-144, 1997.

FOSTER, L. H.; CHAPLIN M. F.; SUMAR, S. The effect of heat treatment on intrinsic and fortified selenium levels in cow's milk. **Food Chemistry**, v. 62, p. 21-25, 1998.

GÁSPÁR, A.; POSTA, J.; BRAUN, M.; SÓGOR, C. On-line multielement preconcentration and inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of transition metals using a flow injection hydraulic high-pressure nebulization-desolvation sample introduction system. **Microchemical Journal**, v. 58, p. 245-250, 1998.

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. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 269, 2001.

GRÄBER, C.; BERNDT, H. Development of a new high temperature/high pressure flow system for the continuous digestion of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 683-691, 1999.

HAIBER, S.; BERNDT, H. A novel high-temperatures (360°C)/high-pressure (30 MPa) flow system for online sample digestion applied to ICP spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, p. 52-58, 2000.

HALICZ, L.; RUSSELL, G. M. Simultaneous determination, by hydride generation and inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry, of arsenic, antimony, selenium and tellurium in silicate rocks containing the noble-metals and in sulfide ores. **Analyst**, v. 111, p. 15-18, 1986.

HOLAK, W. Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 41, p. 1712, 1969.

JACOB, P.; BIAN Q.Z.; BERNDT, H.; NIEMAX, K. Online flow digestion of biological and environmental samples for inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES). **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 323–329, 2005.

JENSEN, R. G. (Ed.). **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995. 919 p.

KLOTZ, L. O.; KRÖNCKE, K. D.; BUCHYK, D. P.; SIES, H. Emerging functional endpoints of trace element status. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1448S-1451S, 2003.

KRIVAN, V.; PETRICK, K.; WELZ, B.; MELCHER, M. Radiotracer error-diagnostic investigation of selenium determination by hydride generation – atomic absorption spectrometry involving treatment with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1703, 1985.

KRUG, F.J (Ed.). **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: Luiz de Queiroz, 2008. 340 p.

LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados: da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 876-880, 2006.

LUO, S.K.; BERNDT, H. Sample introduction in ICP spectrometry by hydraulic high-pressure nebulization. **Spectrochimica Acta**, v. 49B, n. 5, p. 485-492 ,1994.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; SILVA, M.P. Strategies for solid sample treatment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 16-24 ,1997.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. **Avaliação nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MUÑIZ-NAVEIRO, Ó.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; BERMEJO-BARRERA, A.; COCHO, J. A.; FRAGA, J. M.; BERMEJO-BARRERA, P. Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1145-1151, 2005.

NÓBREGA, J.A.; ALEIXO, P.C. Direct determination of iron and selenium in bovine milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 83, p. 457-462, 2003.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, D. M.; PEDROSO, M. M.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A. A new procedure for bovine milk digestion in a focused microwave oven: gradual sample addition to pre-heated acid. **Talanta**, v. 65, p. 505-510, 2005.

OLIVEIRA, C.C.; ZAGATTO, E.A.G.; ARAÚJO, A.N.; LIMA, J.L.F.C. Sample preparation in sequential injection analysis: spectrophotometric determination of total phosphorus in food samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, p. 57-62, 1998.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

PECHOVÁ, A.; PAVLATA, L.; ILLEK, J. Blood and tissue selenium determination by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 74, p. 483-490, 2005.

POSTA, J.; GÁSPÁR, A.; TÓTH, R.; OMBÓDI, L. Cr(III) e Cr(VI) on-line preconcentraton and high-perfomance flow flame emission spectrometric determinations in water samples. **Microchemical Journal**, v. 54, p. 195-203, 1996.

RÜEGG, R.; BLANC, B. Structure and properties of the particulate constituents of human milk: a review. **Food Microstructure**, v. 3, p. 25-47, 1982.

SILVA, F. V. **Avaliação de procedimentos para preparo de amostras agronômicas visando determinação multielementar por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido**. 112 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, 2004.

SILVA, P. H. F. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3-5, 1997.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

STURGEON, R. E.; MESTER, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives. **Applied Spectroscopy**, v. 56, n. 8, p. 202-213, 2002.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P., De Campos, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1132-1144, 2002.

TAME, A.; HOOBIN, D. Direct analysis of milk powder by axially-viewed simultaneous ICP-AES, ICP-AES Instruments at Work, ICP-26, Varian, 1999. Disponível em: <<https://www.varianinc.com/media/sci/apps/icpes026.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2008.

THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 650-666, 1995.

UPCHURCH SCIENTIFIC – Materials guide. Disponível em: <<http://www.upchurch.com/TechInfo/mat316SSExt.asp>>. Acesso em: 04 set. 2008.

VARIAN. **Vapor generation accessory VGA-77**: operation manual. Mulgrave: Varian, 2004. 1 v.

WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochimica Acta**, v. 7, p. 108-117, 1955.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. Nova York: John Wiley, 1984. 467 p.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. Weinheim: John Wiley, 1999. 941 p.

ZURERA-COSANO, G.; MORENO-ROJAS R.; AMARO-LOPEZ M. Effect of processing on contents and relationships of mineral elements of milk. **Food Chemistry**, v. 51, p. 75-78, 1994.