



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA  
PREPARAÇÃO DE MATRIZES ORGÂNICAS PARA A  
DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ELEMENTOS TRAÇO**

**CRISTINA SISTI**

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre em Ciências na Área de  
Reatores Nucleares de Potência e  
Tecnologia do Combustível Nuclear.

Orientadora:  
Dra. Maria Inês Costa Cantagallo

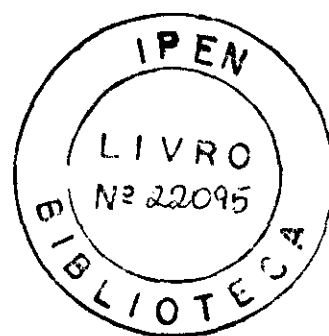
**São Paulo  
2001**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

Autarquia associada à Universidade  
de São Paulo

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA  
PREPARAÇÃO DE MATRIZES ORGÂNICAS PARA A  
DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ELEMENTOS  
TRAÇO**

**CRISTINA SISTI**



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível Nuclear

**Orientadora:**

**Dra. Maria Inês Costa Cantagallo**

**São Paulo**

**2001**

*À DEUS e aos meus pais Cândido  
e Júlia, por minha existência e proteção;  
desde o início até este momento*

## **AGRADECIMENTOS**

***Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela oportunidade de execução deste trabalho.***

***Aos integrantes da divisão de caracterização de materiais MEQ pelo profissionalismo, competência e amizade.***

***À Cleide Moreira da Silva, responsável pelo laboratório Analítico do departamento de caracterização materiais MEQ, por seu profissionalismo, incentivo diário e sobretudo pela amizade.***

***À Dra. Elizabeth Sonoda Keiko Dantas pelo incentivo e colaboração profissional dada a este trabalho.***

***Ao químico Alder Sebastião Pereira, pela execução das análises instrumentais realizadas no laboratório de espectrometria de emissão do MEQ.***

***À Dra. Elizabeth de Oliveira, responsável pelo laboratório de espectrometria de Emissão do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela utilização do laboratório e análises efetuadas durante o curso de pós graduação.***

***Aos colegas do Centro de Química Analítica e Meio Ambiente Soraya Maria Rizzo, Amélia Yamazaki, em especial à Mari Estela de Vasconcellos sempre presente nos momentos decisivos.***

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*À Dra. Maria Inês Costa  
Cantagallo por sua orientação, paciência  
sem limites, incentivo e crédito dado a este  
trabalho e especialmente por sua  
compreensão e ajuda nos momentos difíceis.*

# SUMÁRIO

|  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>i</b>      |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>ii</b>     |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | <b>iii</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | <b>v</b>      |
| <br>   |               |
| <b>CAPÍTULO 1</b>  |               |
| <br>   |               |
| Introdução.....  | <b>1</b>      |
| Revisão literatura.....  | <b>3</b>      |
| Objetivos.....   | <b>7</b>      |
| <br>   |               |
| <b>CAPÍTULO 2 - CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS DAS<br/>METODOLOGIAS DE DISSOLUÇÃO E TÉCNICAS INSTRUMENTAIS</b> |               |
| <br>   |               |
| 2.1- Métodos de dissolução.....  | <b>8</b>      |
| <br>   |               |
| 2.1.1- Decomposição via seca, em sistema aberto (mufla).....   | <b>8</b>      |
| 2.1.2- Decomposição via úmida.....   | <b>9</b>      |
| <br>   |               |
| 2.1.2.1- Decomposição via úmida e aquecimento<br>por fontes convencionais (condução).....              | <b>10</b>     |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.2.2- Decomposição por via úmida e aquecimento<br>por fonte de microondas.....     | 11 |
| 2.1.2.2.1-Equipamento tipo frasco aberto com refluxo<br>e fonte focalizada (MWA)..... | 12 |
| 2.1.2.2.2-Equipamentos tipo frasco fechado,<br>com controle de pressão (MWF).....     | 13 |
| 2.2- Técnicas Instrumentais.....  | 16 |
| 2.2.1- Voltametria de redissolução anódica<br>por pulso diferencial (DP-ASV).....     | 17 |
| 2.2.2- Espectrometria de emissão com fonte<br>de plasma induzido.(ICP-AES).....       | 18 |
| 2.2.3- Espectrometria de absorção Atômica<br>com forno de grafita.(GF-AAS).....       | 18 |

### **CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL**

|  |    |
|--|----|
| 3.1- Tipos de amostras e reagentes.....  | 19 |
| 3.1.1- Amostra de dieta porção em duplicata, consumidas<br>por crianças da creche central da Universidade de São Paulo |    |
| 3.1.2- Amostras de dieta porção em duplicata, consumidas<br>por trabalhadores de indústria                             |    |
| 3.1.3- Amostra de fígado bovino "comercial"  |    |
| 3.1.4- Material de referência certificado, "Bovine Liver" 1577b, NIST.....   | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.5- Material de referência certificado, "Total Diet" 1548, NIST   |    |
| 3.1.6- Água utilizada na preparação das soluções   |    |
| 3.1.7- Reagentes utilizados nas dissoluções e<br>preparações das soluções.....   | 19 |
| 3.2- Obtenção e preparação das amostras.....   | 20 |
| 3.2.1- Protocolo de secagem das amostras<br>a pressão atmosférica.....   | 21 |
| 3.3- Equipamentos para dissolução<br>e preparação de amostras .....  | 23 |
| 3.3.1- Forno para digestão de amostra<br>tipo frasco aberto(MWA)   |    |
| 3.3.2- Mufla com fonte de microondas (MMW)   |    |
| 3.3.3- Equipamento para digestão de amostra<br>com fonte de microondas CEM MDS 2000,<br>tipo frasco fechado (MWF)                            |    |
| 3.3.4- Equipamento para digestão de amostra<br>com fonte de microondas PROECTO DGT 100,<br>tipo frasco fechado (MWF sem controle de pressão) |    |
| 3.3.5- Equipamento para purificação de água  |    |
| 3.3.6- Capela de fluxo laminar classe 100  |    |
| 3.3.7- Equipamento de ultra-som para<br>homogeneização e solubilização de amostras.....  | 23 |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.4- Equipamentos para determinação instrumental.....     | <b>24</b> |
| 3.4.1- Analisador polarográfico PARC modelo 174 A.        |           |
| 3.4.2-Espectrômetro de emissão atômica                    |           |
| Jarrel-Ash- Atom Comp series-800                          |           |
| 3.4.3-Espectrômetro de emissão atômica                    |           |
| Espectro Flame - Spectro Modula                           |           |
| 3.4.4-Espectrômetro de absorção atômica                   |           |
| Perkin Elmer - Analyst 800.....                           | <b>24</b> |
| 3.5 Ensaios preliminares.....                             | <b>25</b> |
| 3.6 Preparação e análise instrumental das soluções        |           |
| resultantes das dissoluções da amostra de dieta infantil  |           |
| e fígado bovino, referentes aos ensaios preliminares..... | <b>29</b> |
| 3.7 Discussões sobre as metodologias de dissolução        |           |
| e avaliação dos resultados dos conteúdos dos              |           |
| elementos obtidos nos ensaios preliminares.....           | <b>33</b> |
| 3.7.1- Quantidade da amostra.....                         | <b>33</b> |
| 3.7.2- Tipo de equipamento ou método de dissolução.....   | <b>36</b> |
| 3.7.3- Análise Instrumental.....                          | <b>39</b> |

## **CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA DE DISSOLUÇÃO E DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL ESTABELECIDADA**

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1- Parâmetros utilizados para dissolução e preparação das matrizes.....    | 42        |
| 4.1.1 Dissolução das amostras .....  | 43        |
| 4.1.2-Programa de dissolução utilizado no equipamento CEM MDS-2000.....      | 43        |
| 4.1.3 Programa de dissolução utilizado no equipamento PROPECTO DGT-plus..... | 44        |
| 4.1.4- Eliminação dos resíduos remanescentes da dissolução.....              | 44        |
| 4.1.5- Preparação das amostras para determinação instrumental.....           | 44        |
| <b>CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                              | <b>46</b> |
| <b>CAPÍTULO 6- CONCLUSÕES.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                       | <b>62</b> |

# **APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA PREPARAÇÃO DE MATRIZES ORGÂNICAS PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ELEMENTOS TRAÇO**

**Cristina Sisti**

## **RESUMO**

A determinação de elementos traço em alimentos é de grande importância para a saúde humana, considerando os fatores de essencialidade e/ou toxicidade. Por outro lado, as análises químicas são grandemente afetadas pela etapa de preparação de amostras; contaminação ambiental ou dos reagentes ou ainda por volatilização e perdas dos analitos. Caso estes parâmetros não sejam controlados os resultados podem apresentar baixas precisão e exatidão. Neste trabalho, o conteúdo dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre foram determinados em amostras de dieta adultos, coletadas pela técnica de porção em duplicata e amostras de fígado bovino, aplicando-se a técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP-ASV). Na digestão das matrizes em meio ácido, foram utilizadas metodologias convencionais com aquecimento condutivo em recipientes abertos e equipamentos com fonte de microondas em frascos abertos e fechados. O melhor procedimento foi a aplicação de digestão por microondas, em frascos fechados e os demais tratamentos efetuados em ambiente controlado com capela de fluxo laminar classe 100. A metodologia estabelecida foi validada com o uso de uma amostra de referência certificada (NIST - fígado bovino 1577b).

**APPLICATION OF DIFFERENT METHODOLOGIES IN THE  
PREPARATION OF ORGANIC MATRICES FOR DETERMINATION  
TRACE ELEMENTS BY DIFFERENTIAL PULSE ANODIC  
STRIPPING VOLTAMMETRY**

**Cristina Sisti**

**ABSTRACT**

The determination of trace elements in food samples is of great importance for the human health, considering the factors of essentiality and toxicity. On the other hand, the chemical analysis is largely affected for the steps of sample preparation; laboratory contamination of the sample and the reagents or still volatilization and losses of the elements. If these parameters are not controlled the achieved precision and accuracy could be low. In this work, the content of zinc, cadmium, lead and copper was determined in adults diet samples collected by duplicate portion technique and bovine liver, applying the differential pulse anodic stripping voltammetry - (DP-ASV) technique. In the digestion of the matrices in acid medium, conventional methodologies were used, conductive heating in open recipients and equipment with microwaves source in open and closed vessels. The best procedure was the sample digestion by microwaves, in closed vessels and the other treatments made in controlled atmosphere with hood laminar-airflow class 100. The established methodology was validated with the use of a certified sample as reference (NIST - bovine liver 1577b).

**LISTAS DE TABELAS**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabela 1-</b> Umidade (%) para amostra de material de referência certificado de fígado bovino “Bovine liver” 1577 b, NIST.....  | <b>22</b>     |
| <b>Tabela 2-</b> Umidade (%) para amostra de fígado bovino comercial.....  | <b>22</b>     |
| <b>Tabela 3-</b> Umidade (%) para amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria.....   | <b>23</b>     |
| <b>Tabela 4-</b> Resumo das etapas das metodologias de dissolução aplicadas à amostra de dieta porção em duplicata consumidas por crianças da creche da USP, referentes aos ensaios preliminares.....  | <b>27</b>     |
| <b>Tabela 5-</b> Resumo das etapas das metodologias de dissolução aplicadas à amostra de fígado bovino comercial referentes aos ensaios preliminares.....  | <b>28</b>     |
| <b>Tabela 6-</b> Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cobre, cádmio e chumbo expressos em ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), obtidos para amostra de dieta infantil, porção em duplicata, referentes aos ensaios preliminares..... | <b>31</b>     |

**Tabela 7-** Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre expressos em ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), obtidos para matriz de fígado bovino comercial referentes aos ensaios preliminares..... **32**

**Tabela 8-** Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre expressos em ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra de material de referência certificado "Total Diet" 1548..... **51**

**Tabela 9-** Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre expressos em ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra material de referência certificado " Bovine Liver 1577 b"..... **55**

**Tabela 10-** Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre expressos em ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra de fígado bovino comercial..... **56**

**Tabela 11-** Resultados analíticos dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre expressos em ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostras do lote dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria..... **57**

## LISTA DE FIGURAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <p><b>FIGURA 1-</b> Curva analítica com adições de 1 ng de cádmio a 10 ml do eletrólito suporte puro (<math>\text{HNO}_3</math> <math>0,006 \text{ mol.l}^{-1}</math>); potencial de deposição – 800 mV x Ag/AgCl, tempo de pré concentração de 180 s, tempo de repouso de 30 s e corrente limite de <math>2\mu\text{A}</math>.....</p>  | <b>47</b>     |
| <p><b>FIGURA 2-</b> Curva analítica com adições de 1 ng de chumbo a 10 ml do eletrólito suporte puro (<math>\text{HNO}_3</math> <math>0,006 \text{ mol.l}^{-1}</math>); potencial de deposição – 800 mV x Ag/AgCl, tempo de pré concentração de 180 s, tempo de repouso de 30 s e corrente limite de <math>2\mu\text{A}</math>.....</p>  | <b>47</b>     |
| <p><b>FIGURA 3-</b> Curva analítica com adições de 20 ng de cobre a 10 ml do eletrólito suporte puro (<math>\text{HNO}_3</math> <math>0,006 \text{ mol.l}^{-1}</math>); potencial de deposição – 200 mV x Ag/AgCl, tempo de pré concentração de 120 s, tempo de repouso de 30 s e corrente limite de <math>10\mu\text{A}</math>.....</p> | <b>48</b>     |
| <p><b>FIGURA 4-</b> Curva analítica com adições de 2 ng de zinco a 10 ml do eletrólito suporte puro (<math>\text{HNO}_3</math> <math>0,006 \text{ mol.l}^{-1}</math>); potencial de deposição – 1,1 V x Ag/AgCl, tempo de pré concentração de 120 s, tempo de repouso de 30 s e corrente limite de <math>10 \mu\text{A}</math>.....</p>  | <b>48</b>     |

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

A manutenção de uma alimentação balanceada, com quantidades adequadas de proteínas (vegetal e animal), carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais, possibilita a melhoria da qualidade de vida do ser humano, sendo denominado nutrição o conjunto de processos através dos quais o organismo recebe, transforma e utiliza estas substâncias fundamentais para manter o crescimento e funcionamento normal do organismo humano.

O estabelecimento das quantidades recomendáveis de níveis de ingestão para minerais essenciais e níveis máximos permitidos para os elementos tóxicos, são fundamentais nos estudos de saúde do homem em relação ao meio ambiente. Tanto os minerais como os metais tóxicos são incorporados ao meio ambiente através do ar, água, solo ou alimentos e concentram-se em alguns organismos, sendo depois transferidos através da cadeia alimentar para o homem.

A análise elementar em matrizes de interesse é utilizada para esclarecer a ligação bioquímica fundamental entre os elementos químicos e os organismos vivos; avaliar as condições de saúde pública associadas à contaminação ambiental por metais pesados e hábitos alimentares de populações ou grupo de indivíduos; diagnosticar doenças e monitorar os tratamentos terapêuticos nas áreas de higiene ocupacional e medicina preventiva <sup>(1-2)</sup>.



Os elementos químicos podem ser classificados em três grupos, de acordo com as quantidades encontradas em certos tecidos, órgãos ou fluidos corpóreos, a saber: macro constituintes ou estruturais (C, H, N e O); micro constituintes (Ca, Cl, P, K, Na e Mg); elementos traço (As, Cr, Co, Cu, F, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V, Zn, Cd, Hg, Pb)<sup>(1)</sup>.

Os elementos traço, apesar de apresentarem baixas concentrações em tecidos, alimentos e na maior parte das matrizes investigadas, exercem funções biológicas importantes. Especialistas das áreas de saúde e nutrição humanas da Organização Mundial de Saúde (OMS, FAO e IAEA), têm dado grande ênfase a pesquisas relacionadas a esse grupo de elementos.

Estes especialistas, abordaram questões sobre a função de 17 elementos traço na nutrição e saúde humanas em reunião realizada em Genebra – junho de 1990, com objetivo de formular diretrizes de recomendações de ingestão e estabelecer limites de segurança de exposição ambiental para certos metais pesados<sup>(3)</sup>.

Segundo esses especialistas, “A característica de um elemento traço com significado nutricional é sua intervenção essencial nos processos fisiológicos ou seu potencial de toxicidade quando presentes em concentrações baixas em tecidos, alimentos ou água potável”; e podem ser classificados em três grupos distintos a saber:

**1-** Elementos traço essenciais (Iodo, Zinco, Selênio, Cobre, Molibdênio e Cromo); **2-** Elementos traço provavelmente essenciais (manganês, silício, níquel, boro e vanádio) e **3-** Elementos potencialmente tóxicos, alguns possivelmente com funções essenciais (fluoreto, chumbo, cádmio, mercúrio, arsênico, alumínio, lítio e estanho).

A necessidade da análise química desses elementos em matrizes representativas que possibilitem a monitoração da ingestão dos nutrientes e metais tóxicos, tem aumentado o número de pesquisas e publicações relacionadas a otimização de metodologias de preparação de amostras e determinação instrumental <sup>(4)</sup>.

No entanto, a determinação instrumental de traços de metais em amostras biológicas ou de alimentos, requer algum tipo de pré - tratamento ou solubilização total da amostra para a maior parte das técnicas empregadas. As etapas de preparação constituem a maior fonte de erros em análises, provenientes de perdas ou contaminações de várias espécies <sup>(5)</sup>.

No estudo de metodologias de dissolução de matrizes orgânicas, há que se considerar fatores relacionados tanto à natureza da amostra como também à técnica escolhida para determinação final, sendo que as faixas de concentração de alguns elementos de interesse nessas matrizes, encontram-se muito próximas do limite de detecção das técnicas instrumentais. Portanto, os cuidados na preparação da amostra torna-se condição essencial para obtenção de resultados confiáveis <sup>(6-8)</sup>.

A literatura disponível sobre o assunto é ampla e aborda tanto aspectos relacionados a funções dos elementos como preparação de amostras e técnicas instrumentais. O avanço tecnológico da área de instrumentação oferece atualmente equipamentos capazes de analisar praticamente todos os elementos com exatidão adequada. Por outro lado os métodos de preparação de amostras, até recentemente estavam limitados às técnicas convencionais, com aquecimento condutivo em sistemas abertos; com utilização de chapa elétrica, béquer, mufla e métodos de fusão <sup>(9,10)</sup>.

A partir de 1975, com o advento da utilização da energia de microondas como fonte de aquecimento na decomposição de matrizes de interesse, as publicações específicas nesta área têm aumentado drasticamente. No entanto, em 1974 HESEK e WILSON <sup>(11)</sup> já utilizam um equipamento de microondas tipo doméstico para secagem de materiais.

A utilização dos equipamentos com fonte de microondas para decomposição de amostras biológicas em meio ácido foi inicialmente demonstrada por SAMRA e col. <sup>(12)</sup>, que analisam os conteúdos de zinco, cobre e chumbo pela técnica de absorção atômica, sendo que os resultados mostraram-se satisfatórios quando comparados aos valores certificados.

Apesar de todas as vantagens demonstradas por alguns pesquisadores, esta nova tecnologia não foi grandemente difundida até 1984, sendo que muitos pesquisadores ainda utilizam métodos convencionais comparando os resultados analíticos entre a metodologia convencional e a utilização desta nova fonte de energia para decomposição de amostras.

IIDA e col. <sup>(13)</sup>, comparam os resultados obtidos por espectrometria de absorção atômica (AAS), para os elementos cobre, zinco, manganês, ferro, cálcio e magnésio em fígado bovino, após aplicação de diferentes metodologias de dissolução efetuadas com ácidos nítrico e perclórico em frasco de teflon, revestido por bloco de aço inox; frascos abertos com condensadores adaptados e queima prévia da matriz em mufla elétrica. Os valores obtidos foram concordantes entre os procedimentos, porém os valores dos brancos analíticos foram altos e dispersos nestes procedimentos.

REAMER e VEILLON <sup>(14)</sup>, comparam os resultados de selênio obtidos por AAS com geração de hidretos, em materiais biológicos digeridos em ácidos fosfórico, nítrico e peróxido de hidrogênio,

decomposição via seca em plasma de oxigênio e decomposição em mufla elétrica. Alguns parâmetros como, rapidez, segurança e eficiência foram observados, sendo que os resultados obtidos para a dissolução ácida foram mais satisfatórios.

LADEFOGED <sup>(15)</sup>, compara dois métodos convencionais para determinação de zinco em dietas por AAS, aplicando-se extração ácida com ácido clorídrico por 24 h e digestão com ácidos nítrico, sulfúrico e peróxido de hidrogênio. Os resultados de testes de recuperação para o elemento indicam a mesma eficiência e maior rapidez para a metodologia de extração ácida.

BARRET e DAVIDOWSKI <sup>(16)</sup>, utilizam um equipamento comercial de microondas 600 W, modificando o sistema de exaustão utilizado por SAMRA, para determinação de mercúrio em peixes, evitando-se assim problemas de corrosão do equipamento.

NADKARNI <sup>(17)</sup>, utiliza forno de microondas doméstico com dessecador a vácuo adaptado no interior da cavidade do equipamento e béqueres de teflon para a dissolução de várias matrizes geológicas e biológicas com água régia e ácido fluorídrico, na determinação de 25 elementos por ICP-AES. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos para materiais de referência apresentando precisão e exatidão aceitáveis.

Desde então, os sistemas operacionais dos equipamentos com fonte de microondas foram otimizados, principalmente com a utilização de sistemas de exaustão, controladores de pressão e temperatura e materiais dos frascos, tornando a metodologia mais segura e confiável.

FEINBERG e col. <sup>(18)</sup>, utilizam equipamento de microondas tipo frasco aberto para determinação de nitrogênio em alimentos, e observam a

redução do tempo de análise quando comparada aos métodos convencionais.

LAMBLE e HILL <sup>(19)</sup>, descrevem mais de 180 resumos relacionados à digestão de amostras utilizando a energia de microondas.

Neste trabalho os autores comentam a eficiência dos sistemas de digestão (frascos abertos ou fechados), para cada tipo de matriz e elementos analisados, os métodos e sistemas de digestão, reagentes utilizados, tempo de aquecimento e técnica de determinação instrumental.

Os resultados dos elementos individuais abrangem mais de vinte técnicas instrumentais, no entanto a maior parte refere-se a determinações espectrométricas por emissão ou absorção atômica e espectrometria de massa.

As determinações instrumentais por voltametria de redissolução anódica, constam de apenas quatro citações, sendo que as matrizes analisadas são materiais de referência certificados de tecidos biológicos, amostras botânicas e geológicas do NIST (National Institute of Standards and Technology, USA); BCR (Community Bureau of Reference) ou do NRCC (National Research Council of Canada), os quais foram submetidos à diferentes métodos de dissolução em equipamentos com fonte de microondas.

Nestes ensaios, foram obtidos resultados satisfatórios para os elementos níquel e cobalto em "Lobster Hepatopancreas" (NRCC); zinco, cádmio e chumbo em "Citrus Leaves" (NIST) e zinco, cádmio, chumbo e cobre em "Bovine Liver" 1577b e "Apple Leaves" (NIST).

Uma avaliação da literatura disponível sobre o assunto ora tratado indica que há espaço e é desejável que outros procedimentos analíticos, ou adaptações dos já discutidos sejam propostos.

A etapa de dissolução para o tipo de amostra abordado pode ser otimizada, considerando o conteúdo dos elementos a nível de traço. A técnica voltamétrica oferece de forma geral, bons resultados analíticos. Portanto a associação de tais parâmetros poderá arrazoar os **OBJETIVOS DESTA TRABALHO**, quais sejam:

⇒ Otimizar e comparar os procedimentos de dissolução e tratamento de amostras de dieta (coletadas pela técnica de porção em duplicata) e fígado bovino comercial, utilizando principalmente fornos de microondas com sistema aberto ou fechado sob pressão.

⇒ Otimizar os parâmetros instrumentais analíticos para a determinação de zinco, cádmio, chumbo e cobre, utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP-ASV).

⇒ Aplicar as metodologias de dissolução e análise voltamétrica a um lote de amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria e amostra de fígado bovino comercial.

⇒ Avaliar a metodologia de dissolução e análise voltamétrica proposta com o uso de material de referência certificado "Bovine Liver" 1577b.

## CAPÍTULO 2

### 2 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS DAS METODOLOGIAS DE DISSOLUÇÃO E TÉCNICAS INSTRUMENTAIS

#### 2.1-Métodos de dissolução

Os métodos normalmente empregados para solubilização de amostras estão subdivididos em grupos, conforme segue:

##### 2.1.1- Decomposição via seca, em sistema aberto (mufla)

É a técnica mais simples de decompor amostras orgânicas utilizando como reagente o oxigênio atmosférico para queima da matriz, sendo que o resíduo obtido na forma de cinzas é solúvel em ácidos diluídos.

Esta técnica é geralmente aplicada antes da dissolução ácida de matrizes com altas porcentagens de material orgânico para determinação de baixas concentrações de metais, pois permite a utilização de grandes quantidades de amostra.

A solubilização dos resíduos após queima parcial ou completa da fração orgânica torna-se possível mesmo em frascos fechados sob pressão onde a quantidade de produtos de decomposição da matriz é fator limitante na utilização deste procedimento.

Apesar da simplicidade da técnica deve-se avaliar e otimizar os parâmetros operacionais e analíticos para obtenção de resultados satisfatórios.

A temperatura e o tempo de combustão devem ser ajustados de acordo com a amostra e o elemento a ser analisado. O emprego de temperaturas mais altas ou longos períodos de queima, podem ser problemáticos no que se refere a volatilização de alguns elementos ou controle de contaminações (sistema aberto). Na faixa entre 450 e 550 °C, o risco de perdas por volatilização para alguns elementos é menor <sup>(20)</sup>.

Neste trabalho, foram realizados experimentos com aplicação de queima parcial da matriz utilizando mufla com fonte de microondas.

Este sistema permite programar gradientes de temperatura compreendidos entre a temperatura ambiente e 1200 °C, evitando-se aquecimento muito rápido e perdas por projeção da amostra. O controle das eventuais perdas ou contaminações dos elementos pode ser realizado através de brancos analíticos simulados com quantidades conhecidas de soluções padrão dos elementos de interesse.

As matrizes de dieta e fígado bovino foram submetidas à temperatura máxima de 400 °C. Os diferentes procedimentos de dissolução após queima parcial da matriz, foram comparados quanto à eficiência de solubilização dos resíduos calcinados, tempo de análise, número de etapas do procedimento e consumo de reagentes.

### **2.1.2- Decomposição via úmida**

A técnica de decomposição por via úmida, é realizada normalmente pelo aquecimento da amostra na presença de ácido mineral oxidante; ou mistura de ácidos.



A técnica permite a decomposição via aquecimento convencional (condução) ou sistemas que utilizam fontes de microondas. A determinação de baixas concentrações de elementos é possível após conversão dos metais presentes em amostras orgânicas ou biológicas, para a forma de cátions inorgânicos não voláteis em meio ácido.

O ácido nítrico é geralmente empregado para destruição da matriz devido às suas propriedades como agente oxidante, alto grau de pureza, menor risco de manipulação, alta solubilidade dos sais inorgânicos correspondentes, fácil eliminação devido ao seu baixo ponto de ebulição.

Sendo a matriz demasiadamente refratária ao ataque pelo ácido nítrico, utiliza-se o peróxido de hidrogênio como coadjuvante nessa destruição.

#### **2.1.2.1-Decomposição via úmida e aquecimento por fontes convencionais (condução).**

É a técnica mais comum utilizada em química analítica para decomposição de vários tipos de matrizes. A solubilização é normalmente efetuada em chapas elétricas onde a amostra é colocada em recipientes abertos como béqueres, cadinhos ou em recipientes com refluxo.

A eficiência da técnica depende do tipo e da quantidade de amostra, poder oxidante e temperatura de ebulição do ácido ou misturas oxidantes utilizadas.

A solubilização de grandes quantidades de amostras orgânicas utilizando sistemas abertos implica no aumento do consumo dos reagentes e tempo de reação.

Os valores dos brancos analíticos, a flutuação dos resultados finais e a dificuldade de controle de contaminações provenientes do ambiente do laboratório são maiores quando comparados aos sistemas fechados <sup>(20)</sup>.

#### **2.1.2.2- Decomposição por via úmida e aquecimento por fonte de microondas.**

É um método que possui técnicas modernas de preparação de amostras, sendo uma alternativa excelente em relação às técnicas convencionais de decomposição.

Os principais componentes dos equipamentos incluem o gerador de energia (magnetron), o guia de ondas, a cavidade do microondas, um ventilador em forma de lâminas que reflete e espalha a radiação dentro da cavidade e um carrossel que proporciona uma rotação controlada dos recipientes de digestão.

Os frascos de digestão são constituídos de materiais transparentes à energia de microondas e portanto o calor produzido é transferido diretamente para a solução. A energia de microondas interage simultaneamente com as moléculas do solvente e da amostra aumentando a velocidade de solubilização da matriz.

A eficiência da dissolução depende da programação adequada de parâmetros operacionais como potência, pressão e tempo e estão associadas ao tipo do equipamento, a natureza da matriz e as propriedades dos agentes de decomposição.

Os equipamentos podem ser classificados de acordo com o tipo de recipiente de digestão e como a radiação de microondas interage com a amostra e o solvente, conforme segue <sup>(21)</sup>:

### **2.1.2.2.1-Equipamentos tipo frasco aberto com refluxo e fonte focalizada.**

Este tipo de equipamento opera a pressão atmosférica, utiliza frascos de vidro, quartzo ou politetrafluoretileno (PTFE), possibilitando a utilização de vários tipos de agentes de dissolução.

O controle da perda de elementos voláteis é realizado através de um refluxo que condensa os vapores, permitindo a adição de reagentes entre as etapas programadas sem necessidade de abertura dos frascos ou resfriamento da solução. Por outro lado necessita maior eficiência do sistema de exaustão ou coleta de gases.

A dissolução de quantidades maiores de amostras torna-se possível devido a aplicação da radiação de microondas focalizada que proporciona o recebimento de quantidade máxima da energia aplicada.

Neste sistema os programas de digestão são compostos de uma série de etapas caracterizadas pela aplicação controlada da potência, do tempo em minutos e do volume de reagentes. Os parâmetros de potência e tempo devem ser convenientemente programados a fim de se obter total dissolução da amostra. O tempo necessário para a dissolução de matrizes orgânicas com o uso de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio é maior quando se utiliza este tipo de sistema, se comparado ao sistema fechado, descrito abaixo.

A mineralização de matrizes que contém altos teores de gordura, proteínas e carboidratos costuma ser problemática; neste caso deve-se aplicar um aumento gradual da potência, evitando-se assim a perda da amostra devido à formação excessiva de produtos de decomposição que podem ser projetados através do refluxo.

### 2.1.2.2-Equipamentos tipo frasco fechado

Na dissolução de amostras orgânicas em recipientes fechados sob pressão a temperatura de decomposição está associada ao material do frasco de reação, enquanto que a quantidade de amostra é determinada pela pressão máxima permitida no interior dos frascos.

Geralmente utilizam-se frascos constituídos de polímeros especiais como o PTFE, que possuem alta resistência química e térmica, suportando pressões de até 20 bar (1 bar = 0,9869 atm) e temperatura de até 200 °C.

O material dos frascos é inerte quimicamente e não contamina a amostra, porém alguns elementos difundem-se no PTFE causando um efeito memória e erros sistemáticos em análises de traços, principalmente quando a amostra é submetida a altas pressões e temperaturas.

Apesar do alto poder oxidante e eficiência na destruição da matriz orgânica dos ácidos sulfúrico e perclórico, não é aconselhável o uso destes ácidos para dissolução em frascos de PTFE sob pressão, devido aos riscos de explosões ou comprometimento da estrutura do material dos frascos.

Normalmente as dissoluções são efetuadas com o uso de ácido nítrico, pois seu potencial de oxidação aumenta substancialmente com o aumento da temperatura, quando utilizado em frascos fechados sob pressão.

A mistura com peróxido de hidrogênio após solubilização da maior parte da amostra acelera a decomposição dos resíduos orgânicos remanescentes. A eficiência da dissolução de várias amostras em um único programa, depende em parte da uniformidade da distribuição de energia dentro da cavidade do microondas.

Essa uniformidade no aquecimento e conseqüente dissolução de várias amostras é obtida através do uso do carrossel que submete os frascos à rotação controlada de 360°.

Dentre as principais características positivas desta técnica, estão:

- Facilidade em decompor sólidos resistentes a ácidos em sistemas abertos.
- Menor tempo de dissolução (maiores temperatura e pressão)
- As perdas por volatilização são menores
- A contaminação pela atmosfera externa é menor
- Menor consumo de reagentes, pois não há evaporação do ácido
- Menor risco de contaminação com valores de branco diminuídos
- Diminuição de riscos de manuseio, pois os vapores gerados permanecem dentro do recipiente

Apesar dos avanços obtidos nas técnicas de decomposição que utilizam fontes de microondas, a dissolução de matrizes com alto teor de gorduras e proteínas é incompleta, quando utiliza-se somente ácido nítrico e temperaturas de até 180 °C.

Produtos de decomposição de proteínas como os aminoácidos (fenilalanina, histidina, triptofano, metionina) e de gorduras como o ácido linoleico, permanecem em solução aquosa e são problemáticos especialmente para voltametria. Nas técnicas espectrométricas, a presença de compostos orgânicos na solução pode ser causa de fonte de erros na radiação de fundo e diminuição da eficiência de nebulização.

Em matrizes biológicas a parte orgânica constitui a maior fração da amostra, e o método de dissolução escolhido deve proporcionar total recuperação dos elementos de interesse, conciliando fatores como rapidez, segurança e ainda a compatibilidade com a técnica de determinação final <sup>(22)</sup>.

Os resíduos remanescentes da decomposição ácida de vários materiais biológicos em sistema fechado, foram analisados sob a forma de carbono residual (RCC) por WURFELS e JACHWERT <sup>(23)</sup>.

A identificação desses compostos foi realizada com a utilização das técnicas de espectrofotometria de infravermelho (IR), espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR) e cromatografia gasosa (GC). Os autores demonstram que os compostos identificados modificam os voltamogramas dos elementos Zn, Cd, Pb e Cu quando analisados por voltametria inversa (SWASV) em amostra de fígado bovino. Para oxidar completamente estes resíduos presentes em matrizes orgânicas, os autores indicam o emprego de temperaturas de 300 °C, que somente é obtida com a técnica de queima sob alta pressão (HPA), onde se utilizam frascos de quartzo.

Uma alternativa a esse procedimento, proposta neste trabalho, é a evaporação completa da solução resultante da solubilização até secura, e digestão prolongada dos resíduos remanescentes em ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio em chapa elétrica.

Essas etapas devem ser conduzidas preferencialmente em ambiente controlado e capela de fluxo laminar classe 100.

Como já mencionado anteriormente (introdução, parágrafo 10), as etapas de pré tratamentos ou decomposição da matriz, constituem a principal via de contaminação em análise de traços.

Essa possível contaminação é introduzida de várias formas e portanto, deve ser monitorada a partir da obtenção de brancos analíticos confiáveis, que representem todas as etapas do procedimento desde a pesagem da amostra; pré tratamento até a determinação final <sup>(24)</sup>.

A qualidade dos reagentes e descontaminação dos recipientes utilizados são também dois dos principais fatores que devem ser considerados no controle das contaminações em análise de traços.

A qualidade dos reagentes pode ser melhorada com procedimentos de destilação por sub ebulição e a descontaminação dos materiais e recipientes pode ser efetuada, conforme as indicações citadas na literatura <sup>(25,26)</sup>.

## **2.2- Técnicas Instrumentais**

Várias técnicas instrumentais oferecem limites de detecção adequados para análise elementar ao nível de traços. Por outro lado, a obtenção de resultados precisos e exatos depende da otimização de parâmetros operacionais da técnica escolhida. A escolha da técnica instrumental depende de fatores como: número de amostras, custo e tempo gasto na análise.

Nos ensaios preliminares do presente trabalho aplicaram-se outras técnicas instrumentais além da voltametria. Por este motivo, descrevem-se a seguir alguns parâmetros de tais técnicas.

### **2.2.1- Voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP-ASV)**

A voltametria é uma técnica onde estudam-se as relações tensão, corrente e tempo. O voltamograma fornece informações analíticas de

identificação e concentração do metal através do potencial e altura da onda polarográfica <sup>(27,28)</sup>.

Na voltametria de redissolução anódica os processos eletroquímicos ocorrem em duas etapas, pré – concentração, e redissolução (stripping). Na primeira etapa, a deposição dos metais presentes na solução é realizada por redução eletroquímica a potenciais negativos, sendo concentrados na superfície do eletrodo de trabalho, que na maioria das vezes é um eletrodo de mercúrio.

Após a etapa de deposição ou pré concentração, as espécies de interesse, que estão na forma metálica de amálgama com o mercúrio, são quantificadas na etapa de redissolução (stripping). Esta etapa é realizada através de uma varredura linear de potencial na direção anódica (potenciais mais positivos). Quando o sistema alcança o potencial de oxidação do metal, a corrente gerada é proporcional à concentração do metal na amostra <sup>(29)</sup>.

As principais causas de interferências, específicas da técnica são: a presença do oxigênio na solução de trabalho, o qual deve ser removido, borbulhando-se um gás inerte na solução, geralmente o nitrogênio; formação de compostos intermetálicos; sobreposição de ondas polarográficas de metais com potenciais de oxidação muito próximos e interferências devido a substâncias orgânicas que permanecem em solução aquosa; as quais podem ser reduzidas ou eliminadas, através da aplicação de parâmetros adequados na preparação das amostras ou condições operacionais do equipamento <sup>(30)</sup>.

### **2.2.2- Espectrometria de emissão com fonte de plasma induzido**

A técnica caracteriza-se como multielementar nas determinações de baixas concentrações.



O princípio fundamental da técnica é a excitação de átomos a um estado de alta energia, que posteriormente voltam ao seu nível de energia mais baixo emitindo radiação de energia e comprimento de onda característicos.

A fonte de excitação é o plasma de argônio que consiste em um gás parcialmente ionizado, gerado através de campos eletromagnéticos de alta frequência. Os espectros de emissão registrados são específicos para cada elemento, sendo que a intensidade da linha do espectro de emissão é proporcional à concentração do elemento <sup>(31)</sup>.

### **2.2.3- Espectrometria de absorção Atômica com forno de grafita**

A técnica de absorção atômica baseia-se no princípio fundamental de que um átomo é capaz de absorver radiação do mesmo comprimento de onda que emitiria normalmente quando excitado. A técnica emprega atomização sem chama sendo que a fonte de energia consiste em uma corrente elétrica que aquece um tubo de grafita.

A amostra é introduzida no tubo de grafita e durante o aquecimento ocorrem os seguintes processos: secagem da amostra, volatilização dos compostos orgânicos, atomização, absorção da radiação e produção do sinal analítico ou pico de absorção característico de cada elemento. A absorção dessa radiação é uma medida da população de átomos existentes e portanto da concentração.

A utilização do forno de grafita promove a obtenção de altas temperaturas de atomização e conferem alta sensibilidade à técnica, principalmente quando comparada com técnicas de espectroscopia com chama <sup>(32)</sup>.

## CAPÍTULO 3

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1- Tipos de amostras e reagentes

3.1.1- Amostra de dieta infantil, porção em duplicata, procedente de um estudo de avaliação do conteúdo de elementos essenciais e tóxicos em dietas consumidas por crianças da creche central da Universidade de São Paulo.

3.1.2- Amostras de dieta de adultos, porção em duplicata, procedentes do projeto “Estudo de dietas consumidas por trabalhadores de indústrias em relação aos seus constituintes nutricionais e contaminantes metálicos”, FAPESP – 1999.

3.1.3- Amostra de fígado bovino comercial, comprado no mercado nacional, que foi triturada, homogeneizada e liofilizada. Esta amostra foi distribuída para os laboratórios integrantes do projeto de estudo de dietas consumidas por trabalhadores de indústria.

3.1.4- Material de referência certificado, amostra de fígado bovino “Bovine Liver” 1577b, NIST.

3.1.5- Material de referência certificado, amostra de dieta total “Total Diet” 1548, NIST.

3.1.6- A água utilizada em todas as etapas de preparação e diluição é do tipo I, obtida por sistema de purificação Easy Pure UV.

3.1.7- O ácido nítrico e o peróxido de hidrogênio utilizados nas etapas de preparação são da marca MERCK, grau PA.

3.1.8- O eletrólito suporte utilizado nas determinações voltamétricas foi preparado a partir da diluição do ácido nítrico concentrado, marca MERCK, grau suprapur.

### **3.2- Obtenção e preparação das amostras**

As matrizes de dieta e fígado bovino, analisadas neste trabalho, foram recebidas na forma liofilizada e acondicionadas em embalagens plásticas apropriadas. A coleta das amostras de dieta infantil e de adultos, foram realizadas segundo a metodologia de amostragem de porção em duplicata. Este tipo de amostragem é realizada para grupos pequenos de indivíduos, onde cada amostra é duplicata de todo o alimento consumido durante o período de estudo <sup>(33)</sup>.

Detalhes sobre preparação e armazenamento das amostras de material de referência certificado constam dos respectivos certificados.

As amostras foram armazenadas em geladeira, e submetidas à secagem prévia em estufa elétrica antes da dissolução. O procedimento de secagem foi efetuado conforme o protocolo descrito a seguir.

### 3.2.1- Protocolo de secagem das amostras a pressão atmosférica

- Colocar aproximadamente 2 g de amostra num pesa - filtro, previamente tarado, em estufa a  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$  por 2 horas.

- Transferir o pesa - filtro para dessecador (sob vácuo) até temperatura ambiente.

- Pesar prontamente a 0,1 mg.

- Retornar o pesa - filtro à estufa por meia hora.

- Repetir o processo até que a diferença entre duas pesagens não exceda 5 mg, ou até que haja aumento de peso.

- Caso tenha aumento de peso, usar o menor valor obtido para o fator de correção "F".

- Todo o procedimento não deve exceder 4 horas.

#### Fator de correção

$$F = \frac{M_i}{M_f}$$

onde  $M_i$  = Massa inicial

$M_f$  = Massa final

Os resultados da porcentagem de umidade obtidos nas amostras de material de referência certificado ("Bovine Liver" 1577b); fígado bovino e dieta porção em duplicata de trabalhadores constam das tabelas 1, 2 e 3 respectivamente.

**Tabela 01 – Umidade (%) para amostra material de referência certificado  
("Bovine liver" 1577 b)**

| <b>Amostra</b> | <b>mi<br/>(g)</b> | <b>mf<br/>(g)</b> | <b>m H<sub>2</sub>O<br/>(g)</b> | <b>% H<sub>2</sub>O</b> | <b>F</b> |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|
| 1              | 2,0017            | 1,8980            | 0,1037                          | 5,18                    | 1,0546   |
| 2              | 2,0048            | 1,9032            | 0,1016                          | 5,07                    | 1,0534   |
| 3              | 2,0181            | 1,9122            | 0,1059                          | 5,25                    | 1,0554   |
| 4              | 2,0175            | 1,9109            | 0,1066                          | 5,28                    | 1,0558   |

% Umidade  $_{m\acute{e}dia} = 5,20$

F  $_{m\acute{e}dio} = 1,0548$

**Tabela 02 – Umidade (%) para amostra de fígado bovino comercial**

| <b>Amostra</b> | <b>mi<br/>(g)</b> | <b>mf<br/>(g)</b> | <b>m H<sub>2</sub>O<br/>(g)</b> | <b>% H<sub>2</sub>O</b> | <b>F</b> |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|
| 1              | 2,0005            | 1,8786            | 0,1219                          | 6,09                    | 1,0649   |
| 2              | 2,0029            | 1,8828            | 0,1201                          | 6,00                    | 1,0638   |
| 3              | 2,0061            | 1,8879            | 0,1182                          | 5,90                    | 1,0626   |
| 4              | 2,0044            | 1,8903            | 0,1141                          | 5,70                    | 1,0604   |

% Umidade  $_{m\acute{e}dia} = 5,92$

F  $_{m\acute{e}dio} = 1,0629$

**Tabela 03- Umidade (%) para amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria.**

| <b>Amostra</b> | <b>mi<br/>(g)</b> | <b>mf<br/>(g)</b> | <b>m H<sub>2</sub>O<br/>(g)</b> | <b>% H<sub>2</sub>O</b> | <b>F</b> |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|
| DT – 4         | 2,0128            | 1,9175            | 0,0953                          | 4,73                    | 1,0497   |
| DT – 6         | 2,0973            | 1,9848            | 0,1125                          | 5,36                    | 1,0567   |
| DT – 14        | 2,0429            | 1,9511            | 0,0918                          | 4,49                    | 1,0471   |
| DT – 16        | 2,0496            | 1,9373            | 0,1123                          | 5,48                    | 1,0580   |
| DT – 18        | 2,0404            | 1,9565            | 0,0839                          | 4,11                    | 1,0429   |
| DT – 20        | 2,1218            | 1,9933            | 0,1285                          | 6,06                    | 1,0645   |
| DT – 22        | 1,9351            | 1,8318            | 0,1033                          | 5,34                    | 1,0564   |
| DT – 26        | 2,0044            | 1,8920            | 0,1124                          | 5,61                    | 1,0594   |
| DT – 30        | 2,0470            | 1,9233            | 0,1237                          | 6,04                    | 1,0643   |

% Umidade  $_{m\acute{e}dia} = 5,25$

F  $_{m\acute{e}dio} = 1,0554$

### **3.3- Equipamentos para dissolução e preparação de amostras**

3.3.1- Forno para digestão de amostra tipo frasco aberto com refluxo e fonte focalizada (MWA) - SPEX 7400 com potência de 300 W.

3.3.2- Mufla com fonte de microondas - (MMW) - CEM, MAS 7000, potência de 975 W com operacionalidade entre temperatura ambiente e 1200 °C.

3.3.3- Forno para digestão de amostra tipo frasco fechado (MWF), com controle de pressão - CEM, MDS 2000 com potência de 650 W.

3.3.4- Forno para digestão de amostra tipo frasco fechado (MWF), sem controle de pressão – PROVECTO, DGT 100 plus com potência de 1000 W.

3.3.5- Equipamento para purificação de água EASY PURE - UV.

3.3.6- Capela de fluxo laminar classe 100.

3.3.7- Equipamento de ultra-som para homogeneização e solubilização de amostras, marca THORNTON.

### **3.4- Equipamentos para determinação instrumental**

3.4.1-Analisador polarográfico PARC modelo 174 A com eletrodo de mercúrio 303 A, modo HMDE e eletrodo de referência Ag / AgCl.

3.4.2-Espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado, Jarrel-Ash- Atom Comp series-800 (IPEN - SP).

3.4.3-Espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado, Espectro Flame - Spectro Modula (IQ-USP - SP).

3.4.4-Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafita, Perkin Elmer - Analyst 800 (IPEN - SP).

### 3.5 Ensaio preliminares

No presente trabalho, foram realizados alguns ensaios preliminares de dissolução em matriz de dieta infantil e matriz de fígado bovino comercial utilizando-se algumas técnicas descritas na literatura consultada.

Nestes ensaios, variaram-se parâmetros como: massa inicial das amostras entre 0,25 e 0,5 g para matriz de dieta infantil e de 0,5 a 2,0 g para matriz de fígado bovino. As metodologias de dissolução aplicadas envolveram desde aquecimento convencional por condução e utilização de recipientes abertos (SA) até metodologias de dissolução com aquecimento por energia de microondas em equipamentos que utilizam frasco aberto com refluxo (MWA) ou frasco fechado com controle de pressão (MWF).

Foram aplicados procedimentos de pré tratamento tais como: digestão ácida à temperatura ambiente ou queima parcial da matriz orgânica em mufla com fonte de microondas (MMW), para facilitar a dissolução e diminuir a formação excessiva de produtos de decomposição.

Todas as amostras foram submetidas a tratamento de eliminação de matéria orgânica remanescente da dissolução em chapa elétrica com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30%. O controle de contaminações foi realizado através da obtenção de brancos analíticos conduzidos paralelamente às amostras ou simulados com as quantidades dos reagentes.

Compararam-se os resultados dos conteúdos dos elementos entre experimentos conduzidos em ambiente controlado com capela de fluxo laminar classe 100 (LL) e laboratórios convencionais (LC).



Foram avaliados parâmetros de eficiência de dissolução, tempo envolvido nessa etapa, consumo de reagentes, controle de contaminações e resultados finais dos conteúdos dos elementos, sendo a determinação desses elementos efetuada por técnicas de voltametria, espectrometria de emissão e absorção atômica.

A partir da avaliação dos resultados desses ensaios estabeleceu-se a metodologia de dissolução a ser aplicada ao lote de dieta de trabalhadores e amostra de fígado bovino comercial. Para a validação desta metodologia utilizamos o material de referência certificado Bovine Liver 1577 b(NIST).

A determinação instrumental pela técnica voltamétrica foi otimizada após análise dos conteúdos dos elementos no material de referência certificado e será discutida com detalhes em capítulo posterior.

Um resumo descritivo das etapas das metodologias aplicadas às amostras de dieta infantil e fígado bovino comercial referentes aos ensaios preliminares constam das tabelas 4 e 5 respectivamente.

**Tabela 4- Resumo das etapas aplicadas à matriz de dieta infantil referentes aos ensaios preliminares**

| Quantidade de amostra | Metodologia Equipamento                        | Pré tratamentos / Programas de dissolução / Observações   |
|-----------------------|--|---|
| 0,25 g                | 1- Chapa elétrica SA<br>2- Manta Aquecedora BD | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitação em equipamento de ultra som e digestão com ácido clorídrico <math>6 \text{ mol l}^{-1}</math></li> <li>- Dissolução em béquer ou balão de destilação com refluxo adaptado com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio</li> </ul>   |
|                       | 3- MWF c/ pressão- LC                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio</li> <li>- Dissolução em 2 etapas com 130 e 325 W de potência, estágios de 5 min, com pressões programadas entre 20 e 80 psi.</li> </ul>   |
|                       | 4- MWA- LC                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Digestão em ácido nítrico concentrado após agitação em equipamento de ultra som</li> <li>- Dissolução em várias etapas com 60 e 120 W de potência, estágios de 1 e 5 min com adições de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio entre as etapas até obtenção de solução límpida, sem resíduos sólidos.</li> </ul>   |
| 0,50g                 | 5- MMW / MWA- LL                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de quantidades conhecidas dos elementos de interesse</li> <li>- Queima parcial da matriz a <math>400 \text{ }^\circ\text{C}</math> por 1 h</li> <li>- Dissolução em várias etapas com 60 e 120 W de potência, estágios de 1 e 5 min com adições de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio entre as etapas até obtenção de solução límpida, sem resíduos sólidos.</li> </ul> |

**Tabela 5- Resumo das etapas aplicadas à matriz de fígado bovino referentes aos ensaios preliminares**

| Quantidade de amostra | Metodologia Equipamento                   | Pré tratamentos / Programas de dissolução / Observações  |
|-----------------------|---|--|
| 0,5 g                 | 6- MWA – LC<br>7- MWA – LL                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Digestão em ácido nítrico concentrado após agitação em equipamento de ultra som</li> <li>- Dissolução em várias etapas com 60 e 120 W de potência, estágios de 1 e 5 min até obtenção de solução límpida, livre de resíduos sólidos.</li> <li>- Eliminação dos resíduos orgânicos remanescentes em dois ambientes.</li> </ul> |
| 1,0 g                 | 8- MWF – sem controle de pressão- LC      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de ácido nítrico concentrado</li> <li>- Dissolução em 3 etapas com 200 e 700 W de potência, 5 estágios de 5 min, sem aplicação de pré tratamento.</li> </ul>   |
|                       | 9- MWA- LC                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Digestão em ácido nítrico concentrado e adição de quantidades conhecidas dos elementos de interesse</li> <li>- Dissolução em várias etapas com 60 e 120 W potência, estágios de 1 e 5 min até solubilização completa da amostra</li> </ul>  |
| 2,0 g                 | 10- MMW / MWF sem controle de pressão- LC | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Queima parcial da matriz a 400 °C por 1 h, adição de ácido nítrico e peróxido hidrogênio</li> <li>- Dissolução em 3 etapas com 200 e 700 W de potência, 5 estágios de 5 min</li> </ul>  |
|                       | 11- MMW/MWA- LC                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Queima parcial da matriz a 400 °C por 1 h e adição de quantidades conhecidas dos elementos de interesse</li> <li>- Digestão dos resíduos calcinados em ácido nítrico concentrado</li> <li>- Dissolução em várias etapas com 60 e 120 W potência, estágios de 1 e 5 min</li> </ul>   |

### **3.6 Preparação e análise instrumental das soluções resultantes das dissoluções das amostras de dieta infantil e fígado bovino, referentes aos ensaios preliminares**

Após a eliminação completa dos resíduos orgânicos remanescentes em chapa de aquecimento e béquer por digestão em ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 10 ou 25 ml, sendo os volumes completados com ácido nítrico 1% (v/v).

Os resultados dos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre nestes primeiros ensaios de dissolução foram analisados por voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP-ASV) e por espectrometria de emissão com fonte de plasma induzido (ICP-AES).

O conteúdo de Cd referente a algumas metodologias de dissolução aplicadas em amostras de fígado bovino foi comparado com o obtido pela técnica de absorção atômica com forno de grafita (GF-AAS).

A determinação dos conteúdos dos elementos por espectrometria de emissão atômica (ICP-AES) para as metodologias 1, 2, 3, 8, 9, 10, e 11 foi efetuada no equipamento Jarrel – Ash – Atom. Comp. series – 800 (IPEN), cuja calibração foi obtida pela construção de curvas analíticas de dois pontos, situadas entre 0 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para Zn, Cd, e Cu. Para a determinação do elemento chumbo, utilizou-se curva analítica entre 0 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Nas demais metodologias (4, 5, 6 e 7), as determinações foram efetuadas no equipamento Spectro Analytical Instruments, Espectro Flame-Spectro Modula (IQ-USP - SP), cuja calibração foi obtida pela

construção da curva analítica, utilizando-se diluições convenientes de soluções de padrões certificados, ALFA AESAR – Specpure na faixa de concentração entre 0,1 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

As determinações do conteúdo de Cd pela técnica de GF-AAS foi efetuada no equipamento Perkin Elmer-Analyst 800, cuja calibração foi obtida pela construção de curva analítica situada entre 1 e 4  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  do elemento cádmio em 228,8 nm.

As determinações dos conteúdos dos elementos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para todos os experimentos, foram efetuadas no analisador polarográfico PARC modelo 174 A com eletrodo de mercúrio 303 A, modo HMDE e eletrodo de referência Ag / AgCl.

Alíquotas com concentrações convenientes para a obtenção dos voltamogramas de cada elemento foram pipetadas da solução original, levadas a secura, e retomadas em ácido nítrico diluído (0,006  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) utilizado como eletrólito suporte.

Os parâmetros operacionais das medições foram: tempo de pré concentração de 120 ou 180s, 30 s de repouso varredura de 5  $\text{mv}\cdot\text{s}^{-1}$ ; potencial de pulso de 50 mV. Empregou-se o método de adição padrão para a determinação dos elementos, utilizando-se soluções convenientemente diluídas a partir de padrões monoelementares concentrados MERCK.

Os resultados referentes aos conteúdos dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre para as amostras constam das tabelas 6 e 7 e apresenta-se no próximo item uma breve discussão sobre esses ensaios preliminares.

Tabela 6 - Resultados analíticos expressos em [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ], obtidos pelas técnicas de voltametria [DP-ASV] e espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido [ICP-AES], para matriz de dieta infantil, referentes aos ensaios preliminares.

| Metodologia  | ICP-AES |      |         |           |          | DPASV     |           |         |  |  |
|--------------|---------|------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|---------|--|--|
|              | Zn      | Cd   | Pb      | Cu        | Zn       | Cd        | Pb        | Cu      |  |  |
| 1- [SA]*     | 75      | 0,16 | ñ       | 8,3       | ñ        | ñ         | ñ         | ñ       |  |  |
| 2- [BD]**    | 85±33   | ñ    | ñ       | 11±2      | ñ        | ñ         | ñ         | ñ       |  |  |
| 3- [MWF]***  | 43,8    | ñ    | ñ       | 1,4       | 30,8     | ñ         | 0,2       | 2,4     |  |  |
| 4- [MWA]     | ñ       | ñ    | ñ       | ñ         | 21,0±2,4 | 0,07±0,01 | 1,9±0,4   | 2,4±0,3 |  |  |
| 5- [MMW/MWA] | α       | α    | 2,2±0,3 | 1,80±0,04 | α        | α         | 2,01±0,08 | 3,1±0,2 |  |  |

\*= Resultado de alíquota única sem correção do branco

\*\* = Branco analítico simulado com as quantidades dos reagentes

\*\*\*= Alíquota única e branco analítico conduzido paralelamente com as amostras

α= Alta dispersão de resultados entre alíquotas, nas duas técnicas instrumentais

ñ = significa elemento não analisado pela respectiva técnica

Tabela 7– Resultados analíticos expressos em [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ], obtidos pelas técnicas espectrometria de emissão com fonte de plasma induzido, espectrometria de absorção atômica com forno de grafita e voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial para matriz de fígado bovino comercial.

| Metodologia                                  | ICP-AES |      |         |        | DP-ASV |           |           |        | GF-AAS |    |
|--|---------|------|---------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|----|
|  | Zn      | Cd   | Pb      | Cu     | Zn     | Cd        | Pb        | Cu     | Cd     | Cd |
| [6-MWA/LC] ***                               | 158±10  | < LD | 4,2±1,0 | 207±6  | 162±10 | 0,16±0,04 | 2,5±1,5   | 277±10 | ñ      | ñ  |
| [7-MWA/LL] ****                              | 146±1   | < LD | 1,4±0,5 | 204±2  | 139±17 | 0,11±0,07 | 0,7±0,1   | 187±7  | ñ      | ñ  |
| [8-MWF] **<br>sem controle de<br>pressão     | 188±2   | < LD | 5,8±4,0 | 198±2  | ñ      | 0,14±0,05 | 0,55±0,11 | ñ      | 0,061• |    |
| [9-MWA] *                                    | 181±4   | < LD | 4,2±0,2 | 187±19 | ñ      | 0,18±0,06 | 0,35±0,07 | ñ      | 0,064• |    |
| [10-MMW/MWF] *<br>sem controle de<br>pressão | 178±8   | < LD | 3,8±0,3 | 196±1  | ñ      | ñ         | 0,46•     | ñ      | 0,075• |    |
| [11-MMW/MWA] *                               | 117±5   | < LD | 4,5±0,1 | 144±12 | ñ      | ñ         | 0,43•     | ñ      | ñ      | ñ  |

ñ = significa elemento não analisado pela respectiva técnica

LD = limite de determinação ( $0,1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

\*\*\* = alíquotas de 0,5 g

\*\* = alíquotas de 1 g

\* = alíquotas de 2 g

Resultados analíticos representam a média e desvio padrão de duas determinações individuais

•=elemento analisado em apenas uma alíquota do experimento

### **3.7 Discussões sobre as metodologias de dissolução e avaliação dos resultados dos conteúdos dos elementos obtidos nos ensaios preliminares**

A avaliação dos resultados dos conteúdos dos elementos obtidos nos ensaios preliminares é relevante e orientou o estabelecimento de uma metodologia de dissolução otimizada e conveniente para as matrizes citadas, embora ênfase, neste ponto do trabalho, tenha sido dado principalmente para a etapa de dissolução das amostras.

Os parâmetros que foram mais cuidadosamente analisados são os relativos à quantidade de amostra tratada, tipo de equipamento utilizado, método de digestão e número de etapas envolvidas. Procurou-se em todas as situações adequar esses procedimentos à sensibilidade da metodologia analítica instrumental e aos cuidados referentes às possibilidades de contaminação pelo ambiente de trabalho ou pelos reagentes.

A seguir, discutem-se esses parâmetros que foram considerados mais relevantes para o estabelecimento da metodologia de dissolução e determinação final a ser aplicada ao lote de amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria e fígado bovino comercial, proposta neste trabalho.

#### **3.7.1- Quantidade da amostra:**

Diversos fatores devem ser levados em consideração quando a quantidade de amostra está em questão. O compromisso entre essa quantidade, a sensibilidade do método analítico nas determinações de traços e as dificuldades inerentes ao processo de dissolução deve ser avaliado cuidadosamente.



No caso especial da amostra dieta infantil, com baixíssimos teores de chumbo e cádmio, praticamente é impossível trabalhar com quantidades iguais ou menores que 250 mg tanto em sistemas abertos como nos fechados. Nas metodologias 1, 2 e 3 os resultados analíticos foram afetados principalmente por três parâmetros: a contaminação ambiental, a dificuldade da obtenção do branco e a baixa sensibilidade para a técnica de ICP-AES.

A amostra de dieta infantil analisada neste trabalho, faz parte de um conjunto de amostras que foram coletadas, tratadas e analisadas por análise por ativação neutrônica (AANI)<sup>33)</sup>. Inúmeros elementos foram determinados por esta técnica. Os elementos zinco e cádmio, que também foram analisados neste trabalho, apresentaram valores médios entre cerca de 18 amostras  $24,5 \pm 4,5 \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $20,8 \pm 18,8 \text{ng.g}^{-1}$ , respectivamente.

Os resultados para o elemento zinco, obtidos por voltametria, estão mais próximos dos valores encontrados por AANI. No entanto, o elemento cádmio apresenta alta flutuação de resultados quando analisado por voltametria e espectrometria de emissão.

A necessidade de otimização dos parâmetros analíticos e operacionais, nas determinações do elemento cádmio para as duas técnicas, torna - se evidente.

A solubilização de quantidades maiores de amostra (1 ou 2 g) objetivando viabilizar as determinações para os elementos presentes em baixas concentrações, contornando assim o problema da sensibilidade, deve ser cuidadosamente avaliada. O tempo de reação para dissolução total, o consumo de reagentes, o controle de contaminações devem ser levados em consideração.

Especialmente para quantidades desta grandeza é necessária a utilização de sistemas abertos, visto que os frascos de digestão para sistemas fechados, com exceção dos adequadamente construídos não suportariam as pressões resultantes dessa solubilização.

Outra dificuldade nas dissoluções de grandes quantidades de amostras orgânicas é a transferência quantitativa da solução resultante para os béqueres, onde será realizada a etapa de eliminação completa dos resíduos remanescentes da dissolução.

Tratamentos prévios que facilitem a decomposição ou eliminem parte da fração orgânica antes da dissolução, podem ser utilizados para maiores ou menores quantidade de amostras. A queima prévia também favorece o manuseio de grandes quantidades de amostra com alto teor de carbono, transformando-o em cinzas solúveis em ácidos. Por outro lado, aumenta-se o risco de perdas de elementos por volatilização ou projeção, caso a temperatura de aquecimento não seja muito bem controlada.

Alternativamente pode-se aplicar um período de digestão ácida, no qual grande parte da matriz orgânica é eliminada. É claro que quanto maior a quantidade de amostra, maior o tempo de digestão e maior a quantidade de reagentes consumidos. Mas, nesse caso o tratamento é efetuado em frascos fechados e na temperatura ambiente, reduzindo o risco de contaminação ambiental e perda dos elementos.

Neste trabalho foram aplicados ambos os procedimentos: a queima prévia da amostra em mufla (metodologias 5, 10 e 11) e digestão ácida na temperatura ambiente por períodos de 24 ou 48 h, associada ou não à agitação por ultra som (metodologias 4, 6 e 7).

Observou-se que o segundo tratamento foi tão eficiente quanto o primeiro, com a vantagem de não ser necessária a transferência da amostra para outros frascos e dificultar a perda de elementos.

Além da digestão ácida por tempo determinado, também optou-se por utilizar cerca de 500 mg de amostra, pois desta forma, o problema de sensibilidade analítica estaria resolvido e o pré tratamento poderia ser efetuado em tempo mais adequado. Sendo o consumo de reagentes diminuído, menor deveria ser a possibilidade de contaminação em função destes.

### **3.7.2- Tipo de equipamento ou método de dissolução**

Os métodos convencionais de dissolução com aquecimento condutivo e recipientes abertos utilizados nos experimentos 1 e 2 apresentaram eficiência para dissolução de alíquotas de 250 mg de dieta infantil. No entanto, o tempo e o consumo de reagentes nestes tipos de sistemas são maiores quando comparados ao experimento 3 para a dissolução da mesma quantidade de amostra. Por outro lado, nos dois primeiros experimentos a contaminação ambiental é muito pouco controlada, a não ser que todo experimento fosse efetuado sob ambiente controlado e capela de fluxo laminar classe 100.

A comparação entre resultados dos elementos em amostras de fígado bovino tratadas em dois ambientes, laboratório convencional e laboratório com ambiente controlado e capela de fluxo laminar, foram efetuadas nos experimentos 6 e 7. A dificuldade em relação à determinação dos elementos presentes em baixas concentrações como o Cd e Pb, aumenta proporcionalmente com o número de etapas envolvidas e principalmente em relação ao ambiente do laboratório.

Verificou-se que é relevante o tratamento final em ambiente controlado (capela de fluxo laminar). Os valores encontrados demonstram menor flutuação de resultados e menor contaminação para todos elementos nas alíquotas tratadas em ambiente controlado.

A dissolução de 500 mg conduzida em equipamento com fonte de microondas tipo frasco aberto (metodologia 4) e a utilização de pré tratamentos como a digestão ácida e agitação em ultra som facilitam a decomposição da fração orgânica da amostra, principalmente quando associados ao aquecimento por energia de microondas focalizada característica deste tipo de equipamento. Apesar da decomposição mais rápida da fração orgânica da matriz, a produção excessiva de vapores na etapa de dissolução, conduzida em frascos abertos, ainda é problemática.

A aplicação de queima prévia da amostra, metodologias 5, 10 e 11, mostrou-se a princípio muito eficiente. Porém, como a queima elimina grande parte do material orgânico, há uma diminuição da formação de óxidos nitrosos na etapa posterior. Como estes auxiliam a solubilização da amostra no tratamento sob microondas <sup>(22)</sup>, esta etapa se torna lenta ou incompleta. Se aplicado a metodologia que utiliza frascos fechados essa diminuição dos óxidos nitrosos é menos crítica do que a que usa frascos abertos. Por outro lado, há um maior consumo de reagentes na última etapa de tratamento, ou seja na que elimina totalmente os resíduos orgânicos, trazendo portanto possibilidades de contaminação e alteração do branco.

Um procedimento utilizado para acompanhar essas contaminações em sistemas abertos, consiste em adicionar à amostra ou aos brancos analíticos, quantidades diferentes da substância de interesse.

Neste trabalho este procedimento foi aplicado aos brancos analíticos dos experimentos 5, 9 e 11, onde foram efetuadas adições das quantidades esperadas na massa de amostra utilizada em cada experimento.

Os resultados encontrados no experimento 5, apresentam altos níveis de contaminação tanto nas amostras como nos brancos.

Essa dificuldade no controle dessas contaminações afetou diretamente os resultados dos elementos zinco, cádmio e chumbo, que apresentaram alta dispersão, já que os brancos simulados podem não representar as contaminações que ocorrem nas amostras <sup>(24)</sup>.

Nos experimentos 9 e 11, a dificuldade no controle dessas contaminações é menor, pois os teores dos elementos em matriz de fígado bovino são bem maiores do que os encontrados em matrizes de dietas, além disto foram utilizadas quantidades de 2 g de amostra.

Os teores de zinco e cobre analisados por ICP-AES, apresentaram desvios padrão satisfatórios entre as alíquotas de cada experimento e também menor dispersão entre as metodologias. Comparando-se os resultados dos experimentos efetuados em sistemas abertos (MMW/MWA) e o experimento conduzido em sistemas fechados (metodologia 8), concluiu-se que o controle das contaminações foi satisfatória nestas condições. Já a determinação dos elementos presentes em baixas concentrações como o Cd e Pb mostraram-se inviáveis nas condições analíticas adotadas, sendo que a mesma foi prejudicada pelo fator de diluição. A obtenção de resultados satisfatórios para esses elementos só seria possível através da utilização de no mínimo 5 g de amostra, o que justificaria a utilização do pré tratamento de queima parcial da matriz.

As determinações desses elementos por técnicas mais sensíveis como a voltametria e absorção atômica com forno de grafita, são perfeitamente possíveis nessas condições. Os resultados apresentam concordância entre as metodologias, no entanto alguns parâmetros operacionais e analíticos da análise instrumental devem ser otimizados para obtenção de maior exatidão, os quais serão discutidos no próximo item.

### 3.7.3- Análise Instrumental

A avaliação dos resultados analíticos obtidos nos ensaios preliminares indicam que as etapas de preparação são de fato as principais vias de introdução de erros em análises químicas. No entanto os parâmetros operacionais e analíticos da técnica instrumental também podem afetar a precisão e exatidão desses resultados.

Os resultados analíticos obtidos pela técnica de ICP-AES, foram prejudicados primeiramente por parâmetros analíticos como quantidade de amostra e fator de diluição, especialmente nas determinações dos elementos com baixas concentrações. Outro fator importante nesta técnica é a escolha das linhas de emissão.

As linhas de emissão dos elementos zinco 334,5 e cobre 324,7 nm, que são muito próximas, podem causar flutuações nas leituras desses dois elementos. A dispersão de resultados observada para o elemento zinco na amostra de dieta infantil (experimento 5), também é decorrente deste fator. Nos demais experimentos, este parâmetro foi otimizado utilizando-se o canal N+1, que possibilita a escolha de linhas mais sensíveis para cada elemento, eliminando ou diminuindo as possíveis interferências espectrais.

A obtenção de resultados satisfatórios nas determinações dos elementos Zn, Cd, Pb e Cu efetuadas pela técnica voltamétrica dependem em parte da escolha do eletrólito suporte adequado e parâmetros operacionais estabelecidos para as condições analíticas adotadas.

O aumento da sensibilidade, principalmente para os elementos Cd e Pb, é assegurado pela aplicação da etapa de pré concentração. Alguns ensaios efetuados na amostra total, como forma de aumentar os teores presentes na célula eletrolítica, não foram satisfatórios.

Um aumento da concentração do elemento de interesse é acompanhado pelo aumento da concentração de sais ou metais que foram introduzidos na etapa de preparação, sendo responsáveis pelo aumento da corrente residual na faixa de potencial de trabalho dos elementos de interesse. Desta forma a utilização de maior quantidade de amostra não implica necessariamente em aumento de sensibilidade.

Os resultados do elemento Cd pela técnica de (GF-AAS) foram obtidos por análise de somente uma alíquota para cada experimento, porém não se observou dispersão dos resultados entre as metodologias.

Conforme mencionado no início do item 3.5, a avaliação dos parâmetros relacionados propriamente à preparação das amostras, nos ensaios preliminares, direciona ao estabelecimento de uma metodologia que engloba as etapas consideradas mais eficientes na decomposição das matrizes orgânicas, investigadas neste trabalho.

Assim optou-se por aplicar às amostras do lote de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria e à amostra de fígado bovino comercial o seguinte conjunto de parâmetros operacionais e analíticos:

- ✓ Quantidade de amostra = 500 mg
- ✓ Digestão prévia da matriz em ácido nítrico concentrado conduzida à temperatura ambiente por tempo determinado
- ✓ Dissolução em equipamento com fonte de microondas tipo frasco fechado sob pressão
- ✓ Etapas de abertura dos frascos, transferência das soluções resultantes e eliminação completa dos resíduos remanescentes em ambiente controlado e capela de fluxo laminar classe 100.

- ✓ Validação dessa metodologia de dissolução e determinação final pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial com o uso de material de referência certificado.

Descrevem-se a seguir com detalhes, as etapas da metodologia de dissolução e análise voltamétrica propostas neste trabalho, para os elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre nas matrizes de dieta de trabalhadores, fígado bovino comercial e materiais de referência certificados.



## CAPÍTULO 4

### 4- METODOLOGIA DE DISSOLUÇÃO E DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL ESTABELECIDADA

#### 4.1- Parâmetros utilizados para dissolução e preparação das matrizes

A massa de amostra utilizada para a determinação dos elementos nas duas matrizes foi estabelecida em 500 mg, em função do tipo de equipamento de dissolução utilizado.

O tratamento de digestão ácida a temperatura ambiente com ácido nítrico concentrado por 15 h foi aplicado às duas matrizes antes da dissolução em equipamento de microondas tipo frasco fechado.

As amostras de dieta e amostras de material de referência certificado Bovine Liver 1577b e Total Diet 1548, foram solubilizadas no forno para digestão de amostra tipo frasco fechado (MWF), com controle de pressão - CEM, MDS 2000 com potência de 650 W e as amostras de fígado bovino comercial no forno para digestão de amostra tipo frasco fechado (MWF), sem controle de pressão - PROPECTO, DGT 100 plus com potência de 1000 W.

As etapas de tratamento final de eliminação dos resíduos orgânicos remanescentes e de transferência da solução resultante da dissolução foram conduzidas em laboratório com ambiente controlado e capela de fluxo laminar classe 100.

Todas as amostras foram levadas a volume de 25 ml com solução de ácido nítrico 1% (v/v).

A seguir descrevem-se as etapas dos programas de dissolução, e condições analíticas utilizadas.

#### **4.1.1 Dissolução das amostras**

Amostras de 500 mg foram pesadas diretamente nos frascos de digestão sendo adicionados a seguir 8 ml de ácido nítrico concentrado PA e 1 ml de água tipo I. As amostras e os brancos permaneceram em digestão ácida, nos frascos fechados por um período mínimo de 15 h.

#### **4.1.2-Programa de dissolução utilizado no equipamento CEM MDS-2000**

A dissolução foi efetuada aplicando-se 1 etapa com 4 estágios de 390 W de potência, e um para resfriamento; e permanência de 5 min nas pressões de 20, 40, 60 e 80 psi.

Após resfriamento, os frascos foram abertos cuidadosamente, adicionando-se então 2 ml de peróxido de hidrogênio 30%, aplicando-se finalmente 1 etapa com 3 estágios de 390 W de potência, permanecendo 5 min nas pressões de 20, 40 e 60 psi.

#### **4.1.3 Programa de dissolução utilizado no equipamento PROVECTO DGT-plus.**

A dissolução foi efetuada aplicando-se 1 etapa com 5 estágios de 10 min com 230, 500 e 700 W de potência, sendo dois para resfriamento.

Após resfriamento, os frascos foram abertos cuidadosamente, adicionando-se então 2 ml de peróxido de hidrogênio 30% e repetindo-se a etapa anterior.

#### **4.1.4- Eliminação dos resíduos remanescentes da dissolução**

Após a digestão, alguns resíduos (gorduras) permanecem aderidos às paredes dos frascos, mesmo após a adição de peróxido de hidrogênio.

A transferência quantitativa da solução (e resíduos) para os béqueres, é realizada com o emprego de ácido nítrico e água aquecidos.

Nesta etapa recomenda-se manter os frascos imersos em água aquecida ( aproximadamente 80 °C ), para facilitar a remoção quantitativa de resíduos aderidos às paredes dos frascos.

O produto resultante da dissolução, transferido para béquer, é evaporado até *secura* em chapa elétrica.

Os resíduos remanescentes são digeridos por longos períodos, geralmente cerca de 24 horas com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio em béquer tampado, até que todo material orgânico seja eliminado.

#### **4.1.5- Preparação das amostras para determinação instrumental**

Do produto da dissolução (livre de resíduos orgânicos), em meio ácido nítrico 1%(v/v), foram pipetadas alíquotas com concentrações convenientes para obtenção dos voltamogramas correspondentes de cada elemento.

Os conteúdos dos elementos foram analisados pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DP-ASV), e efetuadas no analisador polagráfico PARC modelo 174 A com eletrodo de mercúrio 303 A, modo HMDE e eletrodo de referência Ag / AgCl.

As alíquotas foram analisadas com o emprego do método de adição padrão, utilizando-se soluções convenientemente diluídas a partir de padrões monoelementares concentrados MERCK.

No presente trabalho o eletrólito suporte utilizado para as medições voltamétricas foi preparado a partir da diluição de 200  $\mu$ l do ácido nítrico suprapur 65% (m/v), da MERCK, em 500 ml de água destilada tipo I purificada em sistema EASY PURE UV, 18,3 M $\Omega$ .cm. Nestas condições obtém-se uma solução 0,006 mol.l<sup>-1</sup> e pH = 2,2.

Os parâmetros operacionais das medições foram: potencial de pré concentração – 1,1 V para o zinco, – 0,2 V para o cobre e – 0,8 V para chumbo e cádmio; tempo de pré concentração de 120 ou 180s, varredura de 5 mv.s<sup>-1</sup>; potencial de pulso de 50 mV.

Os detalhes referentes a otimização dos parâmetros operacionais, da análise voltamétrica, para cada elemento, nas duas matrizes investigadas, são discutidos com detalhes nos próximos itens.

## CAPÍTULO 5

### 5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

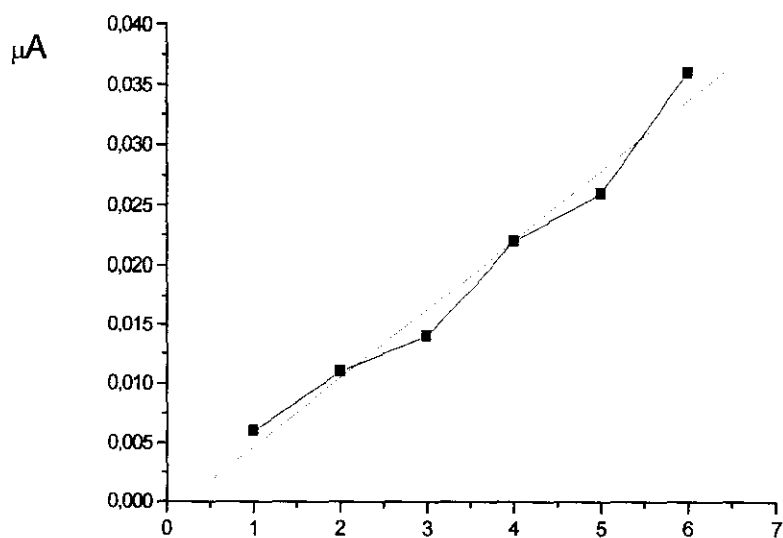
A determinação simultânea dos elementos zinco, cádmio, chumbo e cobre pela técnica de DP-ASV é possível sob certas condições, uma delas é que a concentração desses elementos tenham aproximadamente a mesma ordem de grandeza na matriz, de outra forma ela requer algumas modificações analíticas e operacionais.

Os valores desses elementos, encontrados nos materiais de referência certificados, são os seguintes: **zinco** = 30,8; **cádmio** = 0,028, **chumbo** = (0,05\*valor não certificado) e **cobre** = 2,6  $\mu\text{g.g}^{-1}$  em ("Total Diet" 1548) e **zinco** = 127; **cádmio** = 0,5; **chumbo** 0,129 e **cobre** = 160  $\mu\text{g.g}^{-1}$  em ("Bovine Liver" 1577 b).

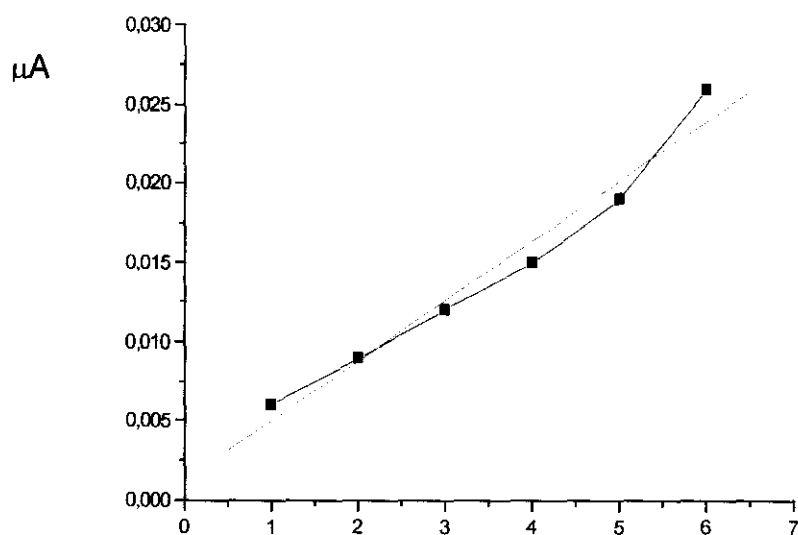
Nas condições analíticas descritas nos itens 4.1.1 a 4.1.5, os elementos presentes em concentrações inferiores a 1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , como o cádmio e chumbo devem ser analisados em alíquotas com volumes apropriados para obtenção de correntes mensuráveis nos voltamogramas correspondentes, especialmente nas matrizes de dieta total.

Os ensaios realizados com o eletrólito suporte puro, apresentam corrente residual mínima na faixa de potencial de trabalho dos elementos cádmio e chumbo. Os ensaios realizados para os elementos cobre e zinco, apresentam contaminação mínima e essa corrente residual não afeta as medições voltamétricas dos elementos, já que os mesmos encontram-se em concentrações elevadas nas matrizes.

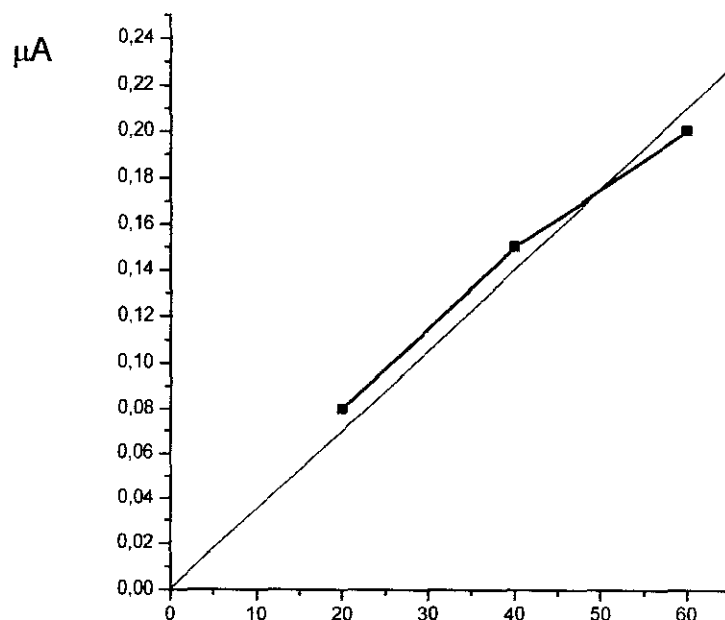
As figuras 1, 2, 3 e 4 demonstram as adições dos elementos cádmio, chumbo, cobre e zinco efetuadas em 10 ml do eletrólito suporte puro, respectivamente.



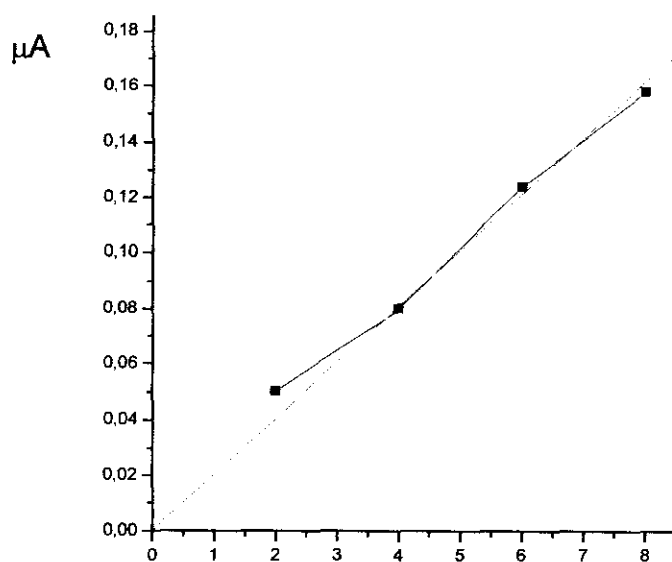
**Figura 1** - Adições de 1 ng de cádmio ao eletrólito ( $\text{HNO}_3$   $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$ ); potencial  $-800 \text{ mV}$  x  $\text{Ag/AgCl}$ ; faixa corrente  $2 \mu\text{A}$  e tempo pré concentração de  $180 \text{ s}$ .



**Figura 2** - Adições de 1 ng de chumbo ao eletrólito ( $\text{HNO}_3$   $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$ ); potencial  $-800 \text{ mV}$  x  $\text{Ag/AgCl}$ ; faixa corrente  $2 \mu\text{A}$  e tempo pré concentração de  $180 \text{ s}$ .



**Figura 3** - Adições de 20 ng de cobre ao eletrólito ( $\text{HNO}_3$   $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$ ); potencial de  $-200 \text{ mV}$  x  $\text{Ag/AgCl}$ , faixa de corrente  $10 \text{ } \mu\text{A}$  e tempo de pré concentração de  $120 \text{ s}$ .



**Figura 4** - Adições de 2 ng de zinco ao eletrólito ( $\text{HNO}_3$   $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$ ); potencial de  $-1,1 \text{ V}$  x  $\text{Ag/AgCl}$ , faixa de corrente  $10 \text{ } \mu\text{A}$  e tempo de pré concentração de  $120 \text{ s}$ .

De acordo com os ensaios realizados no eletrólito suporte puro, os limites de determinação para cada elemento, estabelecidos nas condições analíticas definidas foram os seguintes: **zinco** =  $0,04 \mu\text{g.g}^{-1}$ ; **cádmio** e **chumbo** =  $0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$  e **cobre** =  $0,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

No presente trabalho, as determinações voltamétricas dos elementos cádmio e chumbo foram efetuadas em alíquotas de 10 ml da solução original, secas e retomadas no eletrólito suporte, utilizando-se o potencial de trabalho de  $-0,8 \text{ V x Ag/AgCl}$ , faixa de corrente de  $2 \mu\text{A}$  e tempo de pré concentração de 180 s no modo HMDE.

Esta faixa de corrente utilizada foi satisfatória para obtenção dos voltamogramas correspondentes a esses dois elementos, em amostras de fígado bovino comercial e material de referência certificado "Bovine Liver" 1577 b. No entanto, os resultados dos conteúdos de cádmio e chumbo no material de referência certificado "Total Diet" 1548, não apresentaram precisão e exatidão aceitáveis, quando realizados nestas condições.

Nas amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria, as determinações desses elementos foram efetuadas na faixa de corrente de  $1 \mu\text{A}$ .

As determinações voltamétricas, referentes ao elemento cobre, no material de referência certificado "Total Diet" 1548 e nas amostras do lote de dieta porção em duplicata consumida por trabalhadores de indústria, foram efetuadas na mesma alíquota de 10 ml utilizada nas determinações de cádmio e chumbo, modificando-se apenas as condições operacionais do equipamento como potencial de trabalho de  $-0,2 \text{ V}$ , faixa de corrente de  $10 \mu\text{A}$  e tempo de pré concentração de 120 s.



O elemento zinco foi analisado separadamente em alíquotas de 200  $\mu\text{l}$  da solução original em potencial de deposição de  $-1,1\text{ V}$ , faixa de corrente de 10  $\mu\text{A}$  e tempo de pré concentração de 120 s.

Os resultados do conteúdo de zinco e cobre obtidos para amostra de material de referência certificado "Total Diet" mostraram-se satisfatórios quando realizados nas condições descritas.

Na tabela 8 constam os resultados dos elementos zinco e cobre obtidos para o material de referência certificado "Total Diet " 1548.

Os elementos cádmio e chumbo, serão analisados no material de referência certificado "Typical Diet", segundo a metodologia proposta neste trabalho.

**Tabela 8- Resultados analíticos obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra de material de referência certificado "Total Diet" 1548.**

| Alíquota                 | Elemento<br>$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ |                  |
|--------------------------|---|------------------|
|                          | Zinco                                       | Cobre            |
| 1                        | 33,1  | 2,5              |
| 2                        | 28,5  | 1,7              |
| 3                        | 34,0  | 2,0              |
| n                        | 3   | 3                |
| C V (%)                  | 7,5   | 19               |
| <b>Média</b>             | <b>31,9 ± 2,4</b>                           | <b>2,1 ± 0,4</b> |
| <b>Valor certificado</b> | <b>30,8 ± 1,1</b>                           | <b>2,6 ± 0,3</b> |
| <b>Erro relativo(%)</b>  | <b>3,6</b>                                  | <b>19</b>        |

Onde: n = número de determinações

C V = Relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores

Embora os elementos zinco e cobre encontrem-se em concentrações bastante convenientes nas matrizes de fígado bovino, as determinações simultâneas desses elementos requerem cuidados adicionais. As reações entre estes metais ou com o material do eletrodo, no caso o mercúrio podem ser problemáticas em algumas situações.

A literatura disponível sobre o assunto em questão, relata a ocorrência de interferências que podem ocorrer quando da utilização da técnica de ASV, devido à formação de compostos intermetálicos Zn - Cu - Hg<sup>(34)</sup>.

Estas interferências foram estudadas em alguns sistemas que utilizam principalmente eletrodos de gota de mercúrio (HMDE) ou filmes de mercúrio (MFE). Sob certas condições ocorre a deposição simultânea do zinco e cobre com a formação de compostos Cu - Zn, Cu - Zn<sub>2</sub> e Cu - Zn<sub>3</sub>, sendo redissolvidos próximo ao potencial do cobre, resultando em um aumento na onda polarográfica do cobre e diminuição da onda do zinco. A supressão da onda do zinco depende da razão da concentração [Cu] - [Zn] e das concentrações relativas na solução<sup>(35)</sup>.

Existem várias formas de diminuir ou eliminar este tipo de interferência, efetuando-se algumas modificações dos parâmetros operacionais ou analíticos do sistema de medida por ASV<sup>(36,37)</sup>.

No presente trabalho foram efetuadas modificações simples nos parâmetros dos ensaios e nas condições analíticas, como diminuição das concentrações desses elementos na célula voltamétrica e redução do tempo de pré concentração. Além disto, os elementos foram determinados separadamente, utilizando-se diferentes potenciais de pré concentração.

As análises voltamétricas relativas aos elementos zinco e cobre em matrizes de fígado bovino foram efetuadas em alíquotas de 50 µl da solução resultante da digestão, que foram transferidas diretamente para a célula voltamétrica.

A massa dos elementos na célula são de aproximadamente 130 ng de zinco e 160 ng cobre, sendo que os voltamogramas correspondentes a estes elementos foram obtidos separadamente em potencial de deposição de  $-1,1\text{ V}$  para o zinco e  $-0,2\text{ V}$  para o cobre com tempo de pré concentração de 120 s, para os dois elementos.

Ensaio com determinação simultânea dos dois elementos efetuadas em 100  $\mu\text{l}$  da solução resultante da dissolução do material de referência certificado, em potencial de deposição de  $-1,1\text{ V}$  x Ag/AgCl utilizando-se 180s de pré concentração, apresentaram resultados 30% acima do valor de referência de  $160\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$  para o elemento cobre. No entanto, não se observou a supressão do sinal de corrente para o zinco.

Deste ensaio observou-se que, mesmo sendo as concentrações de cobre e zinco da mesma ordem de grandeza, a pré concentração de ambos no mesmo potencial, simultaneamente, favorece a formação dos compostos intermetálicos, com introdução de imprecisões nas medições.

A supressão do sinal para o elemento zinco foi verificada em duas situações e cabem aqui algumas observações quanto às propriedades químicas e reações que ocorrem no sistema DP-ASV, modo HMDE.

Dentre os 4 metais analisados, este elemento é o que apresenta maior solubilidade no material do eletrodo, ou seja no mercúrio. A formação da amalgama e a facilidade de deposição do metal dependem principalmente desta propriedade. Embora altos teores dos elementos freqüentemente estão associados a melhoria na sensibilidade, cuidados especiais devem ser tomados para prevenir possível saturação da superfície do material do eletrodo. Este tipo de problema ocorre principalmente em eletrodos com filme de mercúrio ou em análises de soluções com alta concentração de metal.

Neste trabalho, observou-se este tipo de ocorrência nas determinações de zinco quando se transfere para a célula eletrolítica o produto total das dissoluções das dietas ( aproximadamente 15  $\mu\text{g}$  ) e dos brancos analíticos, nestes últimos a faixa linear de determinação encontra-se entre 40 e 200 ng do elemento na célula voltamétrica.

Como já mencionado no início deste capítulo, a concentração deste elemento foi determinada em alíquotas que resultam aproximadamente 120 ng do elemento zinco na célula, eliminando desta forma o problema mencionado.

Nas tabelas 9 e 10 constam os resultados referentes aos elementos Zn, Cd, Pb e Cu obtidos para a amostra de material de referência certificado " Bovine Liver" 1577 b e fígado comercial, respectivamente.

Na tabela 11 constam os resultados da média de três determinações individuais, referentes aos mesmos elementos para as amostras representativas do lote de dieta de adultos, porção em duplicata, consumidas por trabalhadores de indústria, após otimização dos parâmetros operacionais e analíticos propostos neste trabalho.

**Tabela 9- Resultados analíticos obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra material de referência certificado " Bovine Liver 1577 b" solubilizada em equipamento de microondas tipo frasco fechado sob pressão.**

| Alíquota                 | Elemento<br>$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ |                    |                      |                |
|--------------------------|---|--------------------|----------------------|----------------|
|                          | Zinco                                       | Cádmio             | Chumbo               | Cobre          |
| 1                        | 130   | 0,42               | 0,25                 | 165            |
| 2                        | 133   | 0,45               | 0,20                 | 164            |
| 3                        | 133   | 0,46               | 0,21                 | 163            |
| 4                        | 132   | 0,45               | 0,27                 | 160            |
| 5                        | 128   | 0,56               | 0,19                 | 173            |
| 6                        | 131   | 0,55               | 0,22                 | 172            |
| 7                        | 131   | 0,46               |                      |                |
| 8                        | 135   |                    |                      |                |
| 9                        | 135   |                    |                      |                |
| n                        | 9   | 7                  | 6                    | 6              |
| CV (%)                   | 2   | 11                 | 14                   | 3              |
| <b>Média</b>             | <b>132 ± 2</b>                              | <b>0,48 ± 0,05</b> | <b>0,22 ± 0,03</b>   | <b>166 ± 5</b> |
| <b>Valor certificado</b> | <b>127 ± 16</b>                             | <b>0,50 ± 0,03</b> | <b>0,129 ± 0,004</b> | <b>160 ± 8</b> |
| <b>Erro relativo(%)</b>  | <b>3,9</b>                                  | <b>4,0</b>         | <b>71</b>            | <b>3,7</b>     |

Onde: n = número de determinações

CV = Relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores

**Tabela 10- Resultados analíticos obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostra de fígado bovino comercial solubilizada em equipamento de microondas tipo frasco fechado sob pressão.**

| <b>Elemento</b> | <b>n</b> | <b><math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math></b> | <b>CV (%)</b> |
|-----------------|----------|---|---------------|
| Zinco           | 6        | $139 \pm 4$                                       | 3             |
| Cádmio          | 6        | $0,05 \pm 0,01$                                   | 25            |
| Chumbo          | 5        | $0,31 \pm 0,05$                                   | 16            |
| Cobre           | 6        | $237 \pm 5$                                       | 13            |

Onde: n = número de determinações

CV = Relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores

**Tabela 11- Resultados analíticos obtidos pela técnica de voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, para amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria.**

| Amostra | Elemento<br>$\mu\text{g.g}^{-1}$ |                   |                   |               |
|---------|----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
|         | Zn                               | Cd                | Pb                | Cu            |
| DT 1    | 22,7 $\pm$ 1,5                   | 0,005 $\pm$ 0,001 | 0,103 $\pm$ 0,009 | 1,5 $\pm$ 0,2 |
| DT 2    | 34,5 $\pm$ 1,7                   | 0,009 $\pm$ 0,006 | 0,281 $\pm$ 0,05  | 2,5 $\pm$ 0,4 |
| DT 3    | 25,2 $\pm$ 0,8                   | 0,009 $\pm$ 0,004 | 0,191 $\pm$ 0,04  | 2,4 $\pm$ 0,2 |
| DT 4    | 19,8 $\pm$ 5,4                   | 0,019 $\pm$ 0,01  | 0,115 $\pm$ 0,05  | 2,5 $\pm$ 0,6 |
| DT 5    | 20,3 $\pm$ 1,6                   | 0,017 $\pm$ 0,011 | 0,223 $\pm$ 0,04  | 2,1 $\pm$ 0,2 |
| DT 6    | 29,6 $\pm$ 2,0                   | 0,014 $\pm$ 0,006 | 0,15 $\pm$ 0,05   | 2,0 $\pm$ 0,2 |
| DT 14   | ñ                                | 0,055*            | 0,184*            | 1,4*          |
| DT 16   | 15,7 $\pm$ 1,6                   | 0,009 $\pm$ 0,007 | 0,32 $\pm$ 0,14   | 0,9 $\pm$ 0,1 |
| DT 18   | 18,2 $\pm$ 2,9                   | 0,016*            | 0,198 $\pm$ 0,166 | 2,0 $\pm$ 0,2 |
| DT 26   | 35,6 $\pm$ 0,8                   | 0,017*            | 0,055 $\pm$ 0,05  | 1,7 $\pm$ 0,1 |
| DT 30   | 31,4 $\pm$ 1,9                   | 0,032*            | 0,37*             | 2,1 $\pm$ 0,2 |

**Onde:**

ñ = significa elemento não analisado na amostra

\* = determinação efetuada em apenas uma amostra



## CAPÍTULO 6

### 6- CONCLUSÕES

A comparação entre as metodologias de dissolução para as matrizes orgânicas propostas neste trabalho, indica claramente que os equipamentos com fonte de microondas para solubilização das amostras de dieta ou fígado bovino facilitam em grande parte a etapa de preparação, embora esta facilidade não exclua a eficiência dos métodos convencionais para dissoluções desse tipo de matriz.

No entanto, uma abordagem mais ampla do assunto é necessária para a otimização e estabelecimento da metodologia como um todo, ou seja: adequar quantidade de amostra, volume de reagentes, parâmetros operacionais dos fornos de microondas (potência e tempo de permanência na pressão programada) em relação ao tipo de matriz, controlar as possíveis contaminações provenientes de todo o processo e estabelecer parâmetros convenientes para a técnica instrumental de determinação dos elementos.

Em relação à quantidade de amostra e volume de reagentes para dissoluções em frascos fechados sob pressão, a quantidade máxima de matriz orgânica admitida no sistema é de 500 mg, sendo que os parâmetros operacionais do forno foram estabelecidos de forma a solubilizar o máximo da matriz, sem comprometer o material ou vida útil dos frascos e sem que se aplique pressão ou potência além da necessária.

Para este fim, o emprego da etapa de digestão prévia antes da dissolução mostrou-se muito eficiente.

Os resíduos orgânicos que ainda permanecem em solução, mesmo com a utilização de aquecimento sob pressão, devem ser completamente eliminados para determinação final dos elementos pela técnica voltamétrica.

Esta etapa no entanto, poderá aumentar o nível de contaminação das amostras, devido à exposição da amostra por longos períodos ao ambiente do laboratório. Sendo assim, as etapas de transferência da solução resultante da dissolução e de eliminação completa desses resíduos, devem ser realizadas em ambiente controlado e capela de fluxo laminar classe 100.

Este aumento no nível de contaminação mostrou-se bastante acentuado, conforme observamos nos ensaios preliminares, principalmente nos experimentos onde as etapas da metodologia foram conduzidas em laboratório convencional. A obtenção de brancos analíticos que representem as contaminações das etapas, torna-se crítica principalmente para os elementos presentes em baixas concentrações como o cádmio e chumbo.

Desta forma, com a utilização de laboratório com ambiente controlado foi possível melhorar o nível de contaminação e obter menor flutuação de resultados nos brancos analíticos. No entanto, os valores encontrados para o elemento chumbo no material de referência, "Bovine Liver" e fígado bovino comercial, ainda são elevados.

Geralmente dados analíticos referentes ao chumbo em matrizes de dieta são de certa forma escassos. A natureza complexa da matriz, o nível de concentração e a dificuldade no controle da contaminação, diminuem o

número de laboratórios ou técnicas instrumentais capazes de fornecer dados sobre o conteúdo do elemento.

Alguns dados disponíveis do elemento chumbo são encontrados nas publicações referentes ao estudo de dieta total <sup>(38)</sup>, realizado desde a década de 60 no Reino Unido, e apresenta valores próximos a  $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

O certificado de referência da amostra "Total Diet" 1548, indica apenas o valor esperado para o elemento, ou seja  $0,05 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Em outro trabalho<sup>(4)</sup> de caracterização da amostra de dieta total "RM 8431", realizado pelo laboratório de composição nutricional do departamento de agricultura dos Estados Unidos, somente dois laboratórios integrantes enviaram resultados do elemento chumbo. Os valores foram obtidos pelas técnicas de ICP-AES  $0,103 \mu\text{g.g}^{-1}$  e voltametria  $0,108 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

Neste trabalho, os resultados obtidos para o elemento chumbo, nas amostras representativas do lote de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria, obtidos pela metodologia proposta, apresentam valores próximos aos encontrados nas publicações descritas acima.

Dados relativos ao elemento cádmio, analisado pela técnica de análise por ativação neutrônica (Divisão de Radioquímica do IPEN), apresentam valores entre 20 e  $70 \text{ ng.g}^{-1}$  para dietas consumidas em quatro regiões do Brasil <sup>(39)</sup>.

Nas amostras representativas do lote de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria, os valores obtidos para o elemento cádmio analisados por voltametria, situam-se entre 5 e  $55 \text{ ng.g}^{-1}$ .

No entanto, a precisão desses resultados podem ser melhorados, através de um estudo mais detalhado destes dois elementos.

As análises realizadas a este nível de concentração necessitam da aquisição de maior número de dados, realizando-se vários programas de digestão, estudos mais elaborados para controle de contaminações com obtenção de brancos analíticos e utilização de material de referência com valores certificados desses elementos.

Para esse propósito já se tem disponível a SRM 1548a "Typical Diet", com indicação dos seguintes valores de referência: cádmio =  $0,035 \pm 0,0015$  e chumbo =  $0,044 \pm 0,009 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Esta amostra substitui o material de referência "Total Diet 1548".

Os valores dos conteúdos de zinco, cádmio, cobre e chumbo obtidos neste trabalho, assim como os valores para esses e outros elementos obtidos por outros laboratórios e outras técnicas analíticas, nas amostras de dieta porção em duplicata consumidas por trabalhadores de indústria e fígado bovino comercial, serão avaliados estatisticamente.

Além do conteúdo dos elementos inorgânicos, farão parte dessa análise estatística, os resultados de determinações da composição centesimal, teores de cinzas, vitaminas e fibras. Essa parte do projeto será analisada posteriormente por profissionais qualificados da área de saúde e nutrição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YENGAR, G. V. *Elemental Analysis of Biological Systems*. Boca Raton, Fla. CRC, 1989. v. 1: Biomedical, environmental, compositional, and methodological aspects of trace elements.
2. ANDERSON, D. L.; DOWING, R. G.; YENGAR, G. V. Trace elements in foods reference materials: compositional and analytical perspectives. *Fres. J. Anal. Chem.*, v.352, p. 107-110, 1995.
3. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Elementos traço na nutrição e saúde humanas*; 1ª Edição, Editora ROCA Ltda., São Paulo, 1998.
4. IHLI, M. J. N.; WOLF, R. W. Characterization of a diet reference material for 17 elements. *Anal. Chem.*, v. 58, p. 3225-3230, 1986.
5. SULCEK, Z.; POVONDRA, P. *Methods of decomposition in inorganic analysis*. Boca Raton, Fla, CRC, 1992.
6. BOER, J. L. M.; MAESSEN, F. J. M. J. A comparative examination of samples procedures for ICP-AES: analysis of biological tissue. *Spectrochim. Acta*, v. 38B, p. 739-746, 1983.
7. SUBRAMANIAM, S. K. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta, Part B*, v. 51, p.291-319, 1996.
8. JONES, W. J.; CAPAR, S. G. Critical evaluation of a multi-element scheme using plasma emission and hydride evolution atomic-absorption spectrometry for the analysis of plant and animal tissues. *Analyst*, v. 107, p. 353-377, 1982.

9. CROSBY, N. T. Determination of metals in foods. *Analyst*, v. 102, p. 224-267, 1977.
10. PARMIGIANI, M. P. C. V. D.; MIDIO, A. F. Comparison of three digestion techniques for the determination of lead in baby food. *Analysis*, v. 25, p. 36-38, 1997.
11. HESEK, J.; WILSON, R. Use of microwave oven in process control. *Anal. Chem.*, v.46, p. 1160, 1974.
12. SAMRA, A.; MORRIS, J.S; KOIRTYOHANN, S.R. Wet ashing of some biological sample in a microwave oven. *Anal. Chem.*, v. 47, p. 1475-77, 1975.
13. IIDA, C.; UCHIDA, T.; KOJIMA, I. Decomposition of bovine liver in a sealed teflon vessel for determination of metals by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 113, p.365-8, 1980.
14. REAMER, D. C.; VEILLON, D. C. Preparation of biological materials for determination of seleniun by hydride generation - AAS. *Anal. Chem.* ; v.53, p 1192-95, 1981.
15. LADEFOGED, K. Determination of zinc in diet and faeces by acid extration and atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chim. Acta*, v. 100, p.149-153, 1980.
16. BARRET, P.; DAVIDOWSKI, L. J. J. Microwave oven-based wet digestion technique. *Anal. Chem.*, v. 50, p. 1021-23, 1978.
17. NADKARNI, R. Applications of microwave oven sample dissolution in analysis. *Anal. Chem.*, v. 56, p. 2233-37, 1984.

18. FEINBERG, M. H.; IRELAND, R. J.; MOUREL, R. M. Optimization procedure of open vessel microwave digestion for Kjeldahl nitrogen determination in foods. *Anal. Chim. Acta*, v. 272, p.83-90, 1993.
19. LAMBLE, K. J.; HILL, S. I. Microwave digestion procedures for environmental matrices. *Critical Review. Analyst*, v.123, p. 103R-133R, 1998.
20. KRUG, F.J. Pré tratamento de amostras. II Workshop sobre métodos de decomposição de amostras, 17-20 novembro / 1998, Centro de Energia Nuclear na agricultura, USP, Piracicaba, São Paulo.
21. KINGSTON, H. M.; JASSIE, B. L. Introduction to microwave sample preparation. ACS, 1989.
22. SAH, N. R.; MILLER, O. R. Spontaneous reaction for acid dissolution of biological tissues in closed vessels. *Anal. Chem.*, v. 64, p. 230-3, 1992.
23. WURFELS, M.; JACHWERTH, E. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. *Anal. Chim. Acta*, v. 226, p.1-41, 1989.
24. MIZUIKE, A. Enrichment techniques for inorganic trace analysis. Berlin Springer – Verlag, 1983.
25. BABINSKI, M.; CANTAGALLO, M.I.C.; IYER, S. S. Obtenção de reagentes ultrapuros através da destilação por sub ebulição. *Química Nova*, v. 24, p. 374-5, 1989.
26. CANTAGALLO, M. I. C. Aplicação da cronocoulometria a determinação de traços de urânio com base na redução catalítica de nitrato em eletrodo de mercúrio. S. Paulo: 1988. Tese (doutoramento) – Instituto de Química Universidade de São Paulo.

27. BRETT, A. M. C.; BRETT, A. M. O. *Eletroanalysis*, OCP, 1998.
28. FLORENCE, T. M. Electrochemical approaches to trace element in waters. A Review. *Analyst*, v. 111, p. 489-505, 1986.
29. KRUG, F. J; NÓBREGA, J. A ; OLIVEIRA, P. V.; GUTZ, I. G. R. Determinação de baixas concentrações de metais em amostras clínicas e biológicas. Curso IQ- USP, v.1 , voltametria, 1998, São Paulo.
30. WANG, J. *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and applications*. Deerfield Beach, FL. VCH, 1985.
31. OLIVEIRA, E. E. *Espectrometria de emissão atômica*. Curso pós – graduação IQ-USP, São Paulo, 1999.
32. OHWEILER, O. A. *Química Analítica Quantitativa*. Editora livros técnicos e científicos S.A, v.3, 2<sup>o</sup> edição, 1976.
33. MAIHARA, V. A . *Avaliação do conteúdo de elementos essenciais e tóxicos em dietas de crianças e idosos pelo método de Análise por Ativação por Nêutrons*. S. Paulo: 1996. Tese (doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
34. SHUMAN, M. S. ; WORDWARD, G. P. Intermetallic compound formation between copper and zinc in mercury and effects on anodic stripping voltametry. *Anal. Chem.*, v. 48, p. 1979-83, 1976.
35. WISE, J.A. ; ROSTON, D. A.; HEINEMAN, W. R. The effects of copper – zinc and copper – cadmiun intermetallic compounds in different systems used for anodic stripping voltametry. *Anal. Chim. Acta*, v. 154, p. 95-104, 1983.



36. COPELAND, J. R. ; OSTERYOUNG, R. A ; SKOGERBOE, R. K. Elinination of copper – zinc intermetallic interferences in anodic stripping voltametry. Anal. Chem., v. 46, p. 2093-103, 1974.
37. ABDULLAH, M. I. ; BERG, B. R. ; KLIMEK, R. The determination of zinc, cadmium, lead and copper in a single sea-water sample by differential pulse anodic stripping voltametry. Anal. Chim. Acta, v. 84, p. 307-17, 1976.
38. Total Diet Study. Disponível na Internet: <http://www.maff.gov.uk/>
39. FÁVARO, D. I. T.; HUI, M. L. T.; COZZOLINO, S. M. F.; MAIHARA, V. A.; ARMELIN, M. J. A.; VASCONCELLOS, M. B. A; YUYAMA, L. K.; BOAVENTURA, G. T. e TRAMONTE, V. L. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. Journal Trace Elements Med. Biol.; v. 11, p. 129-36, 1997.



M22095

**ipen**



**GOVERNO  
FEDERAL**

***Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares***  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000  
Fone (0XX11) 3816-9000 - Fax (0XX11) 3812-3546  
SÃO PAULO - São Paulo -  
[Http://www.ipen.br](http://www.ipen.br)

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear e associada à Universidade de São Paulo para fins de ensino de Pós-Graduação.