

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE COBRE, MANGANÊS E SELÊNIO POR GFAAS EM
AMOSTRAS DE VEGETAIS DE CULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL
UTILIZANDO EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM**

CILENE DO CARMO FEDERICI PADILHA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ PEDRO SERRA VALENTE

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada ao Departamento de
Química e Bioquímica do Instituto
Biociências, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho -
UNESP, Campus de Botucatu, para
obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

BOTUCATU-SP

FEVEREIRO-2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Padilha, Cilene do Carmo Federici.

Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de selênio, cobre e manganês por GFAAS em amostras de vegetais de cultura orgânica e convencional utilizando extração por ultra-som / Cilene do Carmo Federici Padilha. – Botucatu, 2010.

Trabalho de conclusão (Bacharel - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: José Pedro Serra Valente

1. Química orgânica 2. Vegetais - Análise

Palavras-chave: Cultivar orgânico e convencional; Extração por ultra-som; GFAAS; Micronutrientes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre acreditaram em mim e sempre me incentivaram a continuar meus estudos;

Aos meus pais José e Dilce “in memoriam” pela oportunidade que me deram;

Aos meus irmãos Circe, Sérgio, Célia e Silvio pelo sempre amável convívio e respeito mútuo;

Aos meus colegas do Departamento de Física e Biofísica, Químico e Bioquímico e demais Departamentos do Instituto de Biociências-UNESP/Botucatu pela amizade e respeito;

Aos meus colegas do Instituto de Química-UNESP/Araraquara pelos bons momentos de convivência durante dez anos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por não ter me deixado fraquejar nos momentos difíceis;

Ao Prof. Dr. José Pedro Serra Valente pela orientação desse trabalho.

A todos os meus professores por terem me proporcionado a oportunidade de aprender;

De uma forma geral, agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

RESUMO

No presente trabalho é proposto um método para determinação de cobre, manganês e selênio em amostras de vegetais de cultura orgânica e convencional utilizando ultra-som no processo de extração dos analitos e posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Utilizando como solução extratora HCl 0,10 mol L⁻¹, as condições ótimas de extração estabelecidas foram: massa de amostra de 100 mg; granulometria da amostra < 60 µm; tempo de sonificação de cinco ciclos de 40 s e potência de sonificação de 136 W. As determinações dos analitos por GFAAS foram feitas utilizando-se temperaturas de secagem de 90-250 °C, temperatura de pirólise de 1300 °C, temperatura de atomização de 2300 °C e temperatura de limpeza de 2800 °C. Foi utilizado como modificador químico nitrato de paládio co-injetado junto com as amostras e tungstênio como modificador permanente. A exatidão e precisão do método de extração proposto foram avaliadas utilizando-se padrão certificado Corn Bran, RM 8433 – National Institute of Standards and Technology. Os resultados obtidos pelo método de extração por ultra-som mostraram-se equivalentes aos obtidos pelo método utilizando-se mineralização ácida das amostras em forno de microondas. No entanto, a metodologia proposta diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a velocidade analítica. Além disso, a quantidade de resíduos gerados para o ambiente também é bastante minimizada.

Palavras-chave: Micronutrientes, cultivar orgânico e convencional, extração por ultra-som, GFAAS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS.....	1
1.1. Importância dos minerais no crescimento e desenvolvimento dos vegetais.....	1
1.2. Vegetais de cultivo orgânico.....	5
1.3. Principais fundamentos da espectrometria de absorção atômica.....	7
1.3.1. Espectrometria de absorção atômica em chama.....	10
1.3.2. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	13
1.3.3. Determinação de minerais em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	17
1.4. Fundamentos do processo de extração por ultra-som.....	21
1.4.1. Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido.....	22
1.4.2 Ultra-sons no preparo de amostras.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Reagentes, soluções de referência e amostras.....	27
3.2. Equipamentos.....	27
3.3. Preparo e obtenção das amostras.....	28
3.3.1. Mineralização das amostras em forno de microondas.....	28
3.3.2. Extração dos analitos por ultra-sonificação.....	29
3.4. Determinação dos analitos nas amostras de vegetais.....	29
3.4.1. Preparo do tubo de grafite.....	30
3.4.2. Preparo das curvas analíticas.....	31

3.4.3. Preparo das amostras.....	31
3.4.4. Procedimentos analíticos.....	31
3.4.5. Avaliação da precisão e exatidão dos métodos de extração.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Otimização do tempo de sonificação.....	33
4.2. Otimização da potência do ultra-som.....	35
4.3. Determinações por GFAAS: Otimizações das condições experimentais.....	37
4.3.1. Obtenção das curvas analíticas.....	39
4.4. Aplicação do método de extração proposto.....	41
5. CONCLUSÕES.....	44
6. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. Introdução Geral e Justificativas

1.1. Importância dos minerais no crescimento e desenvolvimento dos vegetais

A determinação química dos minerais encontrados nos vegetais é o primeiro passo para se analisar a necessidade de adição ou não desses nutrientes no solo para suprir a necessidade nutricional das plantas. Cada elemento, em maior ou menor quantidade tem sua função no metabolismo do vegetal. Se houver pouca disponibilidade do mineral no solo, o crescimento e desenvolvimento da planta podem ser prejudicados e, em excesso, também pode causar desenvolvimento anormal do vegetal.¹⁻⁹

Dependendo da quantidade requerida de um dado nutriente, o elemento pode ser classificado, como macronutriente ou micronutriente. Os macronutrientes são necessários em quantidades elevadas pelo fato de fazerem parte de moléculas essenciais para o vegetal, ou seja, possuem um papel estrutural. Por outro lado, os micronutrientes estão mais relacionados à ativação de certas enzimas, tendo ação regulatória do sistema fisiológico.¹⁻³

Um nutriente metálico pode funcionar como constituinte de uma estrutura orgânica, como ativador de reações enzimáticas ou como transportador de cargas, além de ter função regulatória. A deficiência dos minerais nas plantas apresenta sintomas que dependem de sua função e mobilidade no vegetal. Como os nutrientes inorgânicos têm funções específicas, os sintomas de sua deficiência são característicos, sendo limitantes para o desenvolvimento do vegetal.³⁻⁵

Elementos como o nitrogênio, ferro e magnésio estão envolvidos na formação da molécula de clorofila. Na falta destes elementos, o sintoma característico é o

amarelecimento da planta, denominado clorose. A deficiência desses elementos causa o mesmo sintoma, porém com diferenciação entre cada um deles devido à sua mobilidade no vegetal.⁵

Como as reações metabólicas são bastante integradas, uma perturbação específica causada por um determinado nutriente pode desencadear uma série de reações que leva a uma sintomatologia geral, como enfezamento (subdesenvolvimento), clorose e a necrose dos tecidos. Desse modo, é difícil diagnosticar qual nutriente está em falta a partir da observação de sintomas de deficiência. A análise do solo é uma das maneiras de se determinar se uma cultura está bem nutrida ou se há carência de algum nutriente. Contudo, esta análise apenas fornece a quantidade de nutrientes que pode ser absorvido pelas raízes, mas não fornece informações se isso realmente irá ocorrer já que a absorção depende de outros fatores. A alternativa mais correta para se determinar o teor de um nutriente na planta é a chamada análise foliar.

Também é importante ressaltar que os micronutrientes em excesso também podem causar necrose e enfezamento. Além disso, o excesso de certos macronutrientes pode provocar a deficiência de alguns micronutrientes. Um exemplo clássico é a interação negativa entre o fósforo e o zinco, reafirmando a importância da determinação química dos nutrientes presentes na planta.⁸

Existe também a necessidade de sabermos a quantidade de nutrientes no vegetal não só para determinar se há deficiência ou não do mineral, mas também porque cada macronutriente ou micronutriente é essencial para o funcionamento do metabolismo vegetal e indiretamente no animal. Daí a importância da determinação química dos nutrientes presentes na planta.^{9,10}

A chamada “Lei do mínimo” de Liebig diz que a produtividade de uma cultura é limitada pelo elemento que está em menor quantidade. Nesse caso, mesmo se aumentarmos a concentração dos demais nutrientes, não haverá aumento na produção, em decorrência da ação limitante deste nutriente em déficit. Além de se levar em conta a “lei do mínimo”, devemos considerar que há limite máximo para a utilização de um nutriente. Se a planta possui uma deficiência, há um crescimento proporcional à quantidade de nutrientes nos tecidos, porém depois de algum tempo, o crescimento tende a desacelerar e depois ficar estagnado. No caso de macronutrientes, a zona adequada corresponde a sobra do nutriente absorvido, o qual pode se acumular no vacúolo sem provocar resposta no crescimento. No caso de micronutrientes, essa sobra pode provocar toxidez nos tecidos e reduzir o crescimento da planta. A região crítica de um nutriente no tecido é aquela que quantidades inferiores ao da região provocam diminuição do seu potencial de crescimento e acima dela o incremento deixa de ser exponencial.⁸⁻¹⁰

Os nutrientes estudados são importantes não só para a nutrição vegetal, mas também para a nutrição animal, já que sua presença na dieta humana é de significativa importância para o funcionamento dos processos vitais do metabolismo.

Os minerais desempenham diversas funções, muitos são usados com “blocos” construtores dos tecidos corporais, como ossos, dentes, músculos e outras estruturas orgânicas. Podem também ser componentes de enzimas porque estão envolvidos na regulação do metabolismo, além de atuar como íons, ou eletrólitos, que carregam cargas elétricas, podendo ainda, ser ativadores de vários hormônios e enzimas.¹¹

A presença de cálcio é fundamental para o homem, pois participa principalmente da estrutura óssea, onde a formação de sais, como o fosfato de cálcio, é responsável pela resistência desta estrutura. Este mineral também participa da formação dos dentes e em

estado iônico ou em combinação com certas proteínas, exerce considerável influência no metabolismo humano.¹²

A deficiência de cálcio está relacionada principalmente a doenças ósseas, muitos fatores estão envolvidos na formação ou mineralização, dos tecidos ósseos e um desequilíbrio qualquer desses fatores pode resultar em desmineralização óssea causando raquitismo em crianças e osteoporose em adultos.¹¹

A principal função do ferro no organismo é a formação de compostos essenciais ao transporte e à utilização de oxigênio. A maior parte dele é usada para formar hemoglobina, um complexo de ferro e proteína que transporta oxigênio dos pulmões aos tecidos corporais. É também armazenado nos tecidos, sobretudo como compostos de proteína chamados ferritinas.¹²

O selênio é componente de várias enzimas, sobretudo a glutatona peroxidase, uma enzima que ajuda a catabolizar os radicais livres e evita danos às estruturas celulares, como as membranas das hemácias. Atua também em conjunto com a vitamina E, como um antioxidante, e supõe-se ter atuação importante na prevenção de câncer.¹¹

O zinco é encontrado em praticamente todos os tecidos corporais como componentes de diversas metaloenzimas. Várias dessas enzimas estão envolvidas nas principais vias do metabolismo de energia, incluindo a lactato desidrogenase (LDH), que é importante para o sistema de energia do ácido láctico. O zinco também tem participação em uma série de outras funções, como a síntese de proteínas, o processo de crescimento e a cicatrização. Além disso, ele está associado às funções imunológicas, incluindo o funcionamento ideal dos glóbulos brancos e o sistema linfático.¹²

1.2. Vegetais de cultivo orgânico

Diversos compostos encontrados nos vegetais, tais como carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, além de muitos outros, podem ser alterados ou apresentar variações de acordo com o modo de cultivo. Estudos apontam o aumento da procura por vegetais cultivados de forma não convencional, sobretudo por não conterem substâncias que possam ser tóxicas (resíduos de pesticidas) e provocar algum tipo de dano ao ecossistema/organismo, porém poucos estudos mostram o teor de nutrientes nesses vegetais.^{13, 14}

Os dados sobre a composição química dos vegetais são bastante variáveis, em decorrência dos numerosos fatores de influência, tais como diferenças entre cultivares, grau de maturidade do produto, época de colheita, local e clima, além do modo de cultivo (orgânico ou convencional).¹⁵

A agricultura orgânica caracteriza-se como um sistema de produção que busca a harmonia entre o meio ambiente e a produção agrícola. Dispensa o uso de fertilizantes e defensivos químicos que podem causar desequilíbrios ecológicos ou que sejam agressivos ao organismo humano se utilizados indiscriminadamente. É um sistema que adota normas para produzir um alimento com suas características originais e que atenda as expectativas do consumidor.¹⁶

Atualmente diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de comprovar que os alimentos orgânicos apresentam vantagens nutricionais. Embora ainda exista muita discussão a respeito desse assunto e não haja consenso científico sobre o tema, sabe-se que os produtos livres de agrotóxicos tendem a ser mais nutritivos que os convencionais.¹⁷⁻¹⁹

Estudos como o desenvolvido por pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu, mostram que cenouras cultivadas sem agrotóxicos têm maior durabilidade (tempo de conservação é maior) e apresentam maiores teores de vitamina A e betacaroteno.²⁰

Outros estudos afirmam que alimentos orgânicos levam mais tempo para se desenvolver, o que aumenta sua concentração de micronutrientes, como selênio, zinco e ferro, que são essenciais à saúde. Plantas cultivadas no sistema orgânico estão em competição acirrada com outras espécies, por essa razão, acionam as vias de síntese de substâncias de defesa e nesse processo, a produção de antioxidantes e outros nutrientes essenciais é aumentada. Em verdade, os parâmetros para determinação da qualidade nutricional são multifatoriais, por isso, condições de solo, clima, variabilidade genética (heterogeneidade) mesmo dentro de uma mesma variedade, poderiam mostrar diferenças significativas entre o modo de produção convencional e orgânico.¹⁹⁻²²

De uma forma geral, observa-se que estudos concernentes aos teores de elementos nutritivos (aminoácidos, vitaminas, proteínas, minerais, etc.) ainda são pouco conclusivos. Portanto, a composição química das plantas é uma ferramenta que permite confrontar os tipos de adubações, compará-las as extrações e translocações de nutrientes da planta inteira ou parte dela permitindo direcionar ou corrigir as adubações, bem como suporte para a nutrição animal.

Considerando-se o exposto, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos macros e micronutrientes torna-se fundamental para os estudos de nutrição vegetal. Neste contexto, a extração de analitos por ultra-som, apresenta-se como um método bastante promissor. Este procedimento de extração permite a eliminação da mineralização nítrico/perclórica das amostras em bloco digestor, que na metodologia

clássica, constitui o principal problema, pois além de gerar gases tóxicos para o ambiente, pode comprometer a saúde do analista. Além disso, o tempo de análise poderá ser reduzido consideravelmente.

1.3. Principais fundamentos da Espectrometria de Absorção Atômica

O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica consiste na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária emitida por átomos gasosos no estado fundamental. Suas determinações utilizam a absorbância como grandeza física e a Lei de Lambert-Beer para determinação das concentrações. A absorbância é puramente uma quantidade matemática que pode ser representado por: $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$, e segue uma relação linear com a concentração, definida pela "Lei de Beer", onde, I_0 a radiação inicial emitida em um determinado comprimento de onda e I a radiação final emitida pelo decaimento.²³

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é utilizada para determinações quantitativas tanto de elementos metálicos e semimetálicos quanto de alguns elementos não metálicos. É aplicada a uma grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, geológicos, tecnológicos etc. Dentre os tipos de atomizadores mais usados em AAS estão a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg/L, enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GFAAS - do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption

Spectrometry) é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g/L}$). Sendo assim, a GFAAS apresenta maior sensibilidade que a FAAS devido a maior parte do analito ser introduzido no tubo de grafite e atomizada no caminho óptico, além de condensar a nuvem atômica mais eficientemente por ser um sistema fechado. Já a FAAS é um sistema onde maior parte da amostra é descartada pelo dreno do nebulizador (95%) e a parte da amostra que alcança a chama é diluída pelos gases desta, diminuindo sua sensibilidade. Outra vantagem na GFAAS quando comparada com a FAAS é a pequena quantidade de amostra utilizada, da ordem de microlitros na GFAAS, enquanto que a FAAS trabalha com amostra de alguns mililitros.²³⁻²⁶

O átomo é composto de um núcleo rodeado por elétrons. Estes elétrons ocupam posições nos orbitais em uma determinada ordem e com caminhos definidos. O “estado fundamental” é a distribuição normal dos elétrons, onde, a energia mais baixa corresponde a configuração eletrônica estável do átomo.²⁶

Quando os átomos se encontram no estado gasoso fundamental podem absorver energia sofrendo alterações e passando para um estado conhecido como “estado excitado”, onde os elétrons mais externos (elétrons de valência) serão promovidos para configurações menos estáveis. A radiação absorvida para passar um determinado átomo de seu estado fundamental para seu estado excitado corresponde a comprimentos de ondas específicos característicos de cada elemento que podem ser determinados pela equação de Planck:

$$E = hc/\lambda$$

Onde, (E) é a energia para passar um átomo do seu estado fundamental para seu estado excitado, (h) é a constante de Planck ($h=6,62608 \times 10^{-34}$); (c) é a velocidade da luz ($c=2,99792 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$) e (λ) é o comprimento de onda.²⁵

Por ser instável, o estado excitado do átomo tende imediatamente e espontaneamente a retornar para sua configuração no estado fundamental. Ao retornar ao seu estado inicial a energia radiante equivalente à quantidade absorvida no processo inicial de excitação será emitida (I).^{24,25}

Como todos os elementos possuem uma estrutura eletrônica única e o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade individual de cada elemento, pode-se determinar qualitativamente qual é o elemento, sendo assim, uma técnica que apresenta alta seletividade e relativamente poucas interferências.²⁶

A fração de átomos excitados em um determinado nível de energia é uma função da temperatura e do comprimento de onda (Tabela 1) e é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E/KT}}{g_0}$$

Sendo, N^* o número de átomos no estado excitado e N_0 o número de átomos no estado fundamental; E é a energia específica da excitação; K é a constante de Boltzmann ($k=1,38066 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta.^{26,27}

Tabela 1. Razão N^*/N_0 e a dependência com a Temperatura e o comprimento de onda.

Elemento	Energia de Excitação (eV)	λ (nm)	g^*/g_0	N^*/N_0		
				2000 K	3000 K	4000 K
Zn	5,80	213,9	3	$7,29 \cdot 10^{-15}$	$5,58 \cdot 10^{-10}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$
Cu	2,93	422,7	3	$1,21 \cdot 10^{-7}$	$3,69 \cdot 10^{-5}$	$6,03 \cdot 10^{-4}$
Na	2,11	589,0	2	$0,86 \cdot 10^{-4}$	$5,88 \cdot 10^{-4}$	$4,44 \cdot 10^{-3}$
Cs	1,46	852,1	2	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$7,24 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-2}$

Com isso, chega-se á lei de Lambert-Beer, relacionando a absorbância (A) ou densidade óptica com o número de átomos no estado fundamental (N).

$$A = \log \frac{\Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43 Nlk(\lambda)$$

Onde, $\Phi_0(\lambda)$ é a potência radiante emitida, $\Phi_{tr}(\lambda)$ é a potência radiante transmitida em λ ; N é o número de átomos livres na camada absorvedora; l é o comprimento da camada absorvedora e $k(\lambda)$ é o coeficiente de absorção atômica espectral.²⁴⁻²⁷

Os seis principais constituintes da espectrometria de absorção atômica são: 1) a fonte de radiação; 2) o sistema de introdução de amostras; 3) o sistema de atomização; 4) o monocromador; 5) o sistema de detecção e 6) a leitura. Estes componentes são conectados a sistemas computadorizados para o controle do equipamento e tratamento dos dados.²⁷

1.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

O atomizador é uma parte importantíssima do FAAS, pois neste dispositivo serão gerados os átomos gasosos no estado fundamental que irão absorver a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação dada pela lâmpada de catodo oco e, conseqüentemente, a concentração do elemento de interesse será determinada.²⁴

No nebulizador, operando pela ação de fluxo de gás comprimido, a solução da amostra é aspirada do seu recipiente e nebulizada na forma de um aerossol (gotículas dispersas em gás) por uma pérola de vidro em uma câmara de nebulização. Essa névoa formada é direcionada ao queimador por arraste dado pela mistura dos gases combustível e oxidante. No ambiente da chama ocorre a evaporação do solvente das gotículas, etapa

denominada dessolvatação, produzindo em seguida, um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas ou fundidas do soluto). Sob elevadas temperaturas da chama, ocorre a volatilização destas partículas e logo em seguida, a atomização, isto é, a conversão da espécie volatilizada em átomos livres. Então, os átomos da nuvem atômica que se encontram no estado fundamental estão aptos para absorverem a energia dada pela fonte de radiação em um comprimento de onda específico e assim, gerarem íons ou moléculas no estado excitado.²⁵

Assim, por diferença do que está sendo emitido pela lâmpada de catodo oco e do que está sendo captado dessa radiação pela fotocélula do detector tem-se o quanto da radiação foi absorvida pela nuvem atômica. Portanto o equipamento, após amplificar o sinal e transformar o sinal térmico em sinal elétrico, fornece o resultado em absorbância e a concentração, em mg L^{-1} . No entanto, salienta-se que isso somente é possível se já tiver sido feita uma curva analítica, pois o equipamento é um comparador.^{24,27} A Figura 1 mostra um esquema de um espectrômetro de absorção atômica com chama e seus principais componente e a Figura 2 mostra a representação do feixe de radiação eletromagnética da fonte até o sistema detector e a Figura 3 mostra no detalhe, a chama do espectrômetro.²³

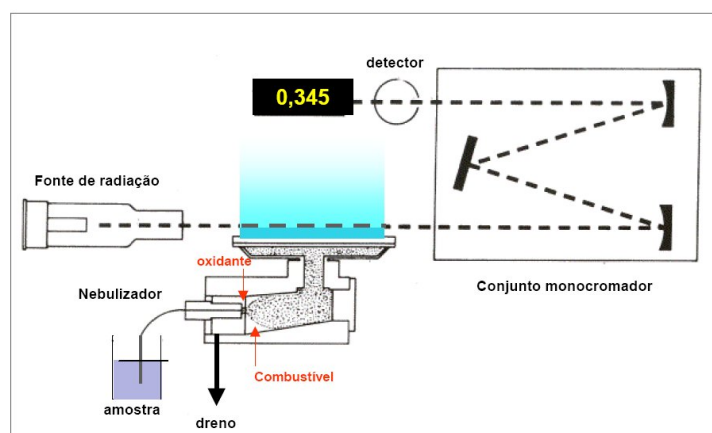


Figura 1. Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama e seus componentes.

Fonte: Krug, F.J. / CENA - USP

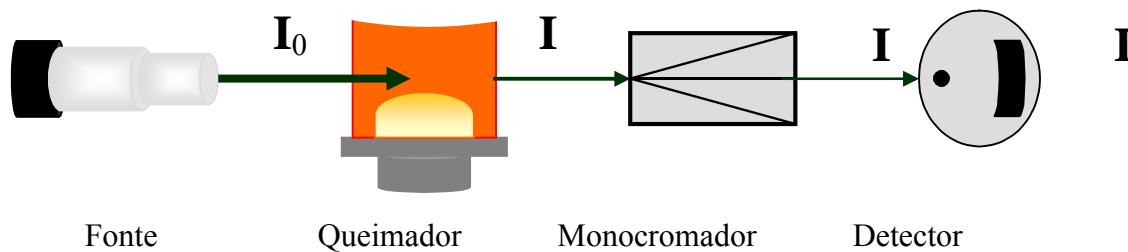


Figura 2. Representação do caminho da radiação eletromagnética.

Pela ilustração acima, podemos observar a radiação que chega até o sistema detector com diminuição de intensidade I e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de I e I_0 . A diferença de intensidade entre I e I_0 corresponde à concentração do analito dentro da amostra.^{23,24}

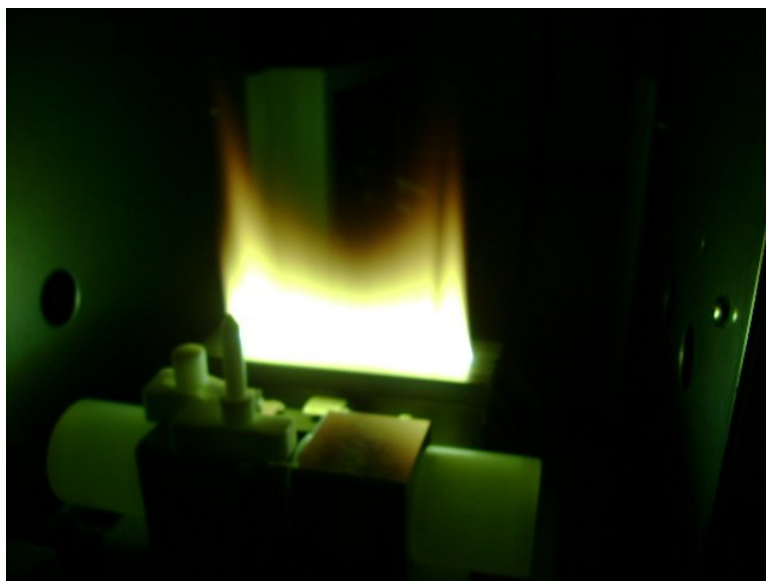


Figura 3. Chama do Espectrômetro de Absorção Atômica.

A chama tem a finalidade de transformar íons e moléculas em átomos no estado fundamental. O tipo de chama mais utilizado em AAS é a mistura ar/acetileno (Figura 3), numa proporção relativamente elevada de oxidante em relação ao combustível (chama azul), a chama apresenta temperatura mais alta, o que favorece a atomização do íon metálico.²⁷

1.3.2. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a amostra é introduzida por uma micropipeta ou um amostrador automático no tubo de grafite através de um orifício no tubo. A amostra pode ser injetada no tubo caindo diretamente em sua parede ou sobre uma plataforma de L'vov presente na parte inferior do tubo. Dentre as diferentes configurações de tubos de grafite, a THGA (Transversely-Heated Graphite Atomizer) é uma das mais utilizadas, pois permite uma distribuição uniforme da temperatura ao longo do tubo de grafite, reduzindo eventuais condensações nas extremidades do tubo, o que diminuiria a sensibilidade. A GFAAS permite a utilização de um programa de aquecimento, pré-definido, que submete a amostra injetada no tubo de grafite a diferentes ciclos de temperatura e tempo. As cinco etapas básicas de aquecimento do tubo são:²⁸⁻³⁶

SECAGEM: etapa de eliminação do solvente, que é evaporado lentamente da amostra para evitar respingos e conseqüente perda do analito, restando apenas os resíduos sólidos (Figura 4).

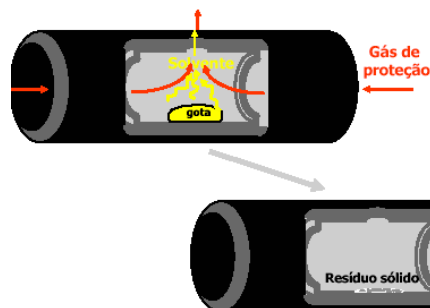


Figura 4. Etapa de secagem da amostras no programa de aquecimento para determinação em GFAAS.

PIRÓLISE: nesta etapa a temperatura e o tempo de pirólise devem ser ajustados para remoção da maior parte da matriz orgânica da amostra, reduzindo a interferência química e o sinal de fundo. Geralmente modificadores químicos são utilizados para estabilizar o analito a temperaturas mais altas, garantindo a eliminação da matriz sem perda do analito (Figura 5).

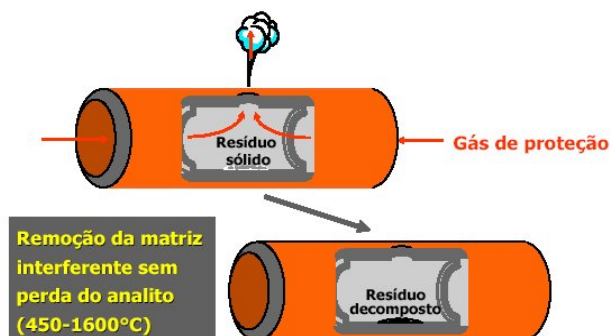


Figura 5. Etapa de pirólise da amostras no programa de aquecimento para determinação de em GFAAS.

ATOMIZAÇÃO: etapa em que a temperatura deve ser alta o suficiente para garantir a completa e rápida atomização do analito, formando a nuvem atômica para a conseqüente medida da radiação absorvida pelo analito no estado fundamental (Figura 6).

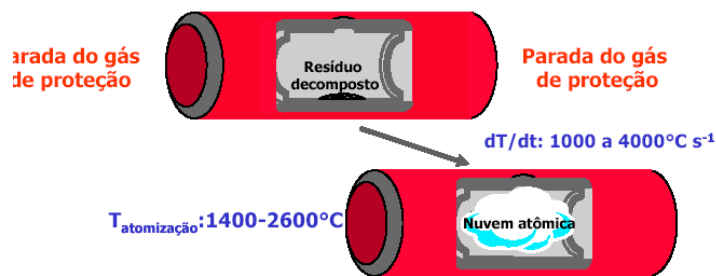


Figura 6. Etapa de atomização da amostras no programa de aquecimento para determinação em por GFAAS.

LIMPEZA: etapa para eliminar qualquer resíduo que possa ter ficado no tubo e posteriores efeitos de memória, onde as temperaturas são elevadas a $2400-2550^\circ\text{C}$ por um curto período de tempo.

RESFRIAMENTO: retorna a temperatura ambiente para introdução de uma nova amostra .

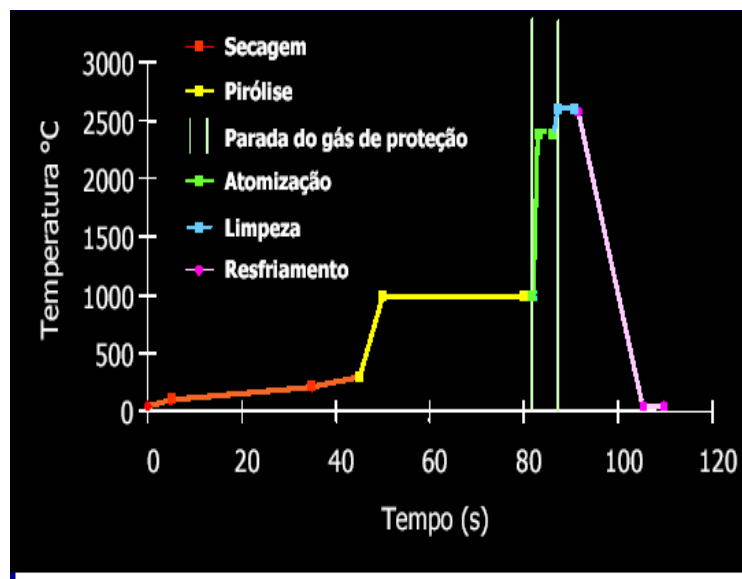


Figura 7. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

Durante todo o programa de aquecimento, um fluxo externo de argônio (gás inerte) passa ao redor do tubo protegendo-o do excessivo desgaste devido às elevadas temperaturas e o contato com o oxigênio atmosférico. Ao mesmo tempo, um fluxo interno de argônio, exceto na etapa de atomização, auxilia na eliminação do ar e dos vapores formados a partir da volatilização das amostras. A Figura 7 mostra um exemplo de um programa de aquecimento com as cinco etapas envolvidas no processo de atomização do analito metálico.²⁸⁻³²

Uma grande vantagem da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite consiste na análise direta de amostras sólidas e/ou suspensões, eliminando a etapa de digestão ácida, o que reduz o tempo de análise, o custo e a contaminação, além de minimizar, consideravelmente, a exposição de analista a manipulação de ácidos concentrados. Além disso, a GFAAS apresenta outras vantagens devido a sua versatilidade, como, ação do atomizador como reator químico, obtenção de excelentes limites de detecção, separação do analito da matriz no reator, utilização de pequenos volumes de amostra, caráter multielementar, rapidez, espectro simples etc.³³⁻³⁶

Entretanto, apesar de ser uma técnica bem desenvolvida e robusta, a susceptibilidade a efeitos de matriz, que pode diminuir a sensibilidade ou provocar excessivo desgaste do tubo, limita uma aplicação mais ampla desta técnica em análises de rotina. Além dos erros sistemáticos e aleatórios que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados e o desempenho de método analítico em questão. Porém, estando todos os parâmetros instrumentais devidamente otimizados e se o conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) for adotado, o desempenho analítico da técnica pode ser melhorado. O conceito STPF consiste no uso de tubos de grafite com aquecimento transversal, recoberto piroliticamente e com plataforma; uso de modificadores químicos; aquecimento rápido;

fluxo de gás interno interrompido durante a atomização; sinal analítico em absorvância integrada; rápido processamento do sinal e corretor de fundo eficiente (Zeeman).^{33,34}

Os erros resultantes de alterações nas variáveis instrumentais e/ou operacionais podem ser reduzidos através da padronização interna em GFAAS, minimizando erros sistemáticos e corrigindo efeitos de matriz. Os métodos de adição de padrão e de compatibilização de matriz são bem estabelecidos e conhecidos, porém, a adição de padrão demanda muito tempo nas determinações quando comparada com a calibração externa e a compatibilização de matriz requer diluentes de elevada pureza e de composição química similar a matriz, o que é de difícil obtenção. Sendo assim, a padronização interna é uma alternativa para esses dois métodos de calibração, onde os cálculos são feitos baseados na suposição de que tanto o analito quanto o padrão interno apresentam influência similar à da matriz e que ambos são perturbados da mesma forma pelas condições instrumentais ou operacionais.^{35,36}

1.3.3. Determinação de minerais em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

A determinação de minerais em amostras biológicas (vegetais, sangue, fezes de animais, alimentos, etc.) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) proporciona diversas vantagens, como alta sensibilidade, limites de detecção em níveis de ng Kg^{-1} , utilização de pequenos volumes de amostra, determinação de uma ampla variedade de elementos traços e considerando-se que o atomizador pode agir como um reator químico, tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de decomposição prévia total da amostra.³⁷

A amostragem de sólidos na forma de suspensão apresenta vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito por manipulação excessiva ou retenção sobre produtos insolúveis, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista.^{38, 39}

A pré-concentração da amostra por evaporação do solvente, utilizando-se a queima da matriz em mufla a 600 °C, é uma das formas utilizadas para aumentar a sensibilidade da técnica de quantificação do analito, quando fatores de pré-concentração de 10 a 40 podem ser obtidos. Este procedimento de pré-concentração é utilizado principalmente na determinação de elementos traço em amostras de sangue.⁴⁰

Quando se trabalha com amostragem de sólidos na forma de suspensões, a homogeneidade da suspensão, a utilização de agentes protetores e antiaglutinantes, tamanho das partículas, utilização de modificadores químicos e de corretor de fundo adequados, são os principais fatores para se conseguir uma boa exatidão e precisão nas medidas analíticas.⁴¹

A determinação de elementos voláteis em amostras de solos e sedimentos tem sido feita utilizando-se suspensões dessas matrizes. Suspensões com da ordem de 0,5 a 3 % (m/v) em ácido fluorídrico, com injeção de 1% (m/v) de Ni como modificador químico, possibilita a determinação de selênio nessas amostras, eliminando-se assim a etapa de extração/digestão manual que envolve a utilização de reagentes perigosos.⁴²

Determinações de Pb, Se e Cd em suspensões de alimentos para bebês por GFAAS, podem ser feitas em meio de Triton X-100 0,1 % (m/v), H₂O₂ 30% (v/v) e HNO₃ 1 % (v/v). Os modificadores de matriz mais eficientes neste método são: Ni 0,5 % (m/v) para selênio, Ni + NH₄H₂PO₄ 1 % (m/v) para cádmio e NH₄H₂PO₄ 1 % (m/v) para chumbo. A calibração

do equipamento pode ser feita utilizando-se padrões aquosos para selênio e chumbo, para cádmio deve-se utilizar o método da adição de analito.⁴³

Nas últimas décadas diversos trabalhos têm destacado a importância da utilização de modificadores químicos adequados nas determinações de metais traços por GFAAS, tanto em amostras líquidas como em suspensão. O uso do modificador nessas determinações, visa obter uma temperatura de pirólise o mais elevada possível ao analito, para garantir a remoção da matriz com eficiência. De uma maneira geral, temperaturas a partir de 1000 °C têm se mostrados suficientes para a pirólise total da matriz.⁴³⁻⁴⁵

Modificadores químicos como níquel e paládio estão entre os mais utilizados em determinações de elementos traços por GFAAS. A mistura desses modificadores estabiliza elementos voláteis, como o selênio, permitindo a utilização de temperaturas de pirólise da ordem de 1000°C, permitindo assim a eliminação quase que total dos componentes da matriz.⁴⁴

A utilização de níquel e cobre e a mistura de cobre com nitratos de ferro e magnésio, tem-se mostrado eficiente na estabilização de diferentes espécies químicas de selênio para posterior determinação desse analito por GFAAS. A mistura de cobre com nitrato de magnésio apresenta-se como melhor modificador, quando comparado ao níquel. Essa mistura de modificadores, proporciona melhor sensibilidade e estabilização do selênio em seus três estados de oxidação até 1100 °C.⁴⁵

O paládio quando misturado com nitrato de magnésio, proporciona a estabilidade térmica de cerca de 21 elementos a altas temperaturas, eliminando a maior parte dos componentes de várias matrizes. Essa mistura é considerada como modificador químico universal.⁴³ Essa mistura de modificadores, destaca-se principalmente na determinação de elementos voláteis (Ex. arsênio, selênio), presentes na forma de traços em amostras de água

mineralizadas utilizadas na medicina. O uso desses modificadores eliminou principalmente a alta absorção de fundo causada pela grande concentração de sódio presente nessas amostras e da contaminação do tubo de grafite devido à alta concentração de sulfato.⁴⁶

A mistura de cloreto paládio com cloreto de cádmio, permite a determinação de elementos voláteis, como selênio, em amostras de aerodispersóides (Ex. fuligem de carvão) por GFAAS. Essa mistura de modificadores permite a remoção dos concomitantes da matriz, e elimina a interferência do ferro, elemento comum presente nesse tipo de amostra.⁴⁷

A utilização de compostos orgânicos como modificadores químicos, como a glicose, tem sido proposta para determinação de antimônio e selênio em suspensões de amostras biológicas por GFAAS. Misturas da amostra com a glicose nas proporções 0,001 (m/v) e 2% (m/v), permite a estabilização térmica do selênio e antimônio até 1300 °C. A interferência espectral causada pela presença de fosfato, principalmente em relação ao selênio, é bastante minimizada.⁴⁸ Outra mistura alternativa de modificadores utilizada na determinação de selênio, é a de platina com níquel. O uso desse modificador na determinação direta de selênio em amostras de sucos de frutas silvestres por GFAAS, permite a eliminação de interferências espectrais causadas principalmente por potássio, fosfato e cálcio.⁴⁹

Um método alternativo para determinação direta de elementos voláteis em amostras biológicas por GFAAS, consiste na diluição da amostra em solução 10% de amins terciárias e a adição de nitrato de paládio como modificador químico. Nessas condições, consegue-se diminuir o tempo de análise, o consumo de reagentes, o risco de contaminação e a sensibilidade aumenta significativamente, principalmente para elementos como o selênio.⁵⁰

De uma maneira geral, a utilização de paládio como modificador de matriz, mais especificamente de nitrato de paládio, tem se mostrado mais eficiente. Mesmo em

determinações de suspensões de amostras biológicas, esse modificador proporciona na quantificação de diversos elementos, principalmente os voláteis como selênio, arsênio e antimônio, melhor estabilidade térmica e do perfil do sinal transiente, melhor exatidão e precisão, além é claro do aumento significativo da sensibilidade.⁵¹⁻⁵³ A capacidade do paládio em estabilizar elementos, como o selênio, em elevadas temperaturas de pirólise, está relacionada à formação de um composto intermetálico, que mantém o elemento estável termicamente em temperaturas superiores a 900 °C.^{54,55}

1.4. Fundamentos do processo de extração por ultra-som

Ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 20 kHz. Os ultra-sons respondem por uma região do espectro acústico, o qual é subdividido em três regiões principais – a faixa do infra-sons ($\nu < 20$ Hz); a faixa sons ($20 \text{ Hz} < \nu < 20 \text{ kHz}$), perceptíveis aos humanos e a faixa dos ultra-sons ($\nu > 20 \text{ kHz}$). Para os ultra-sons pode ser assumida, ainda, uma subdivisão de faixas: a dos ultra-sons de baixa frequência ($20 \text{ kHz} < \nu < 1 \text{ MHz}$) e de alta frequência ($\nu > 1 \text{ MHz}$). As ondas ultra-sônicas de baixas frequências são aquelas que podem apresentar alta potência, enquanto que as ondas ultra-sônicas de alta frequência têm baixa potência, podendo ser aplicadas principalmente para fins de diagnóstico, tanto na medicina como na engenharia. Na extração de nutrientes metálicos são utilizadas ondas ultra-sônicas de baixa frequência (portanto de alta potência), que levam a alterações químicas e físicas no meio líquido onde são aplicadas.⁵⁶⁻⁵⁸

Geradores de ondas ultra-sônicas de baixa frequência são comumente empregados em laboratórios de química e de biologia, seja para a limpeza de materiais ou para o

rompimento das paredes celulares. Esses equipamentos usualmente empregam a sonda ultra-sônica.⁵⁷

1.4.1. Atuação das ondas de ultra-som no meio líquido

Em meio líquido, as ondas ultra-sônicas de alta potência produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação, no qual, dependendo da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação, as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso.⁵⁸

Os resultados obtidos em diferentes ensaios realizados com sistemas heterogêneos (líquido-sólido) sob sonificação indicaram que os efeitos dessas ondas acústicas não deveriam ser considerados como um mero e eficaz sistema de agitação, mas sim, relacionados aos jatos de alta velocidade produzidos pela cavitação acústica nas proximidades das superfícies dos metais já que essas ondas mecânicas, ao interagirem com a superfície de sólidos, levam a alterações significativas na morfologia das superfícies dos sólidos. Caso os ultra-sons sejam aplicados em líquidos contendo material particulado em suspensão, as cavidades deixam de ser simétricas de forma que, quando de seu colapso, os microjatos são direcionados para o sólido.⁵⁹

Porém, a energia resultante da ação direta dos ultra-sons não seria capaz de provocar efeitos como aqueles observados durante a sonificação, como o rompimento de ligações inter e intramoleculares. Estudos realizados com líquidos puros e soluções aquosas

demonstraram outras potencialidades da aplicação da energia acústica.⁶⁰ A influência dos ultra-sons no aumento da reatividade química é devido às evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas ondas em sistemas químicos. A principal causa desses efeitos é a cavitação que pode ser considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonificação. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio, proporcionando o aumento da temperatura e da pressão na microrregião onde ocorreu o colapso.^{56,58,60}

As ondas de ultra-sons têm sido empregadas em diferentes etapas para diversos fins analíticos, como por exemplo: extração sólido-líquido; extração líquido-líquido; separação granulométrica; desgaseificação; degradação de matéria orgânica; co-precipitação e geração de reagentes.⁵⁶⁻⁷⁰

1.4.2 Ultra-sons no preparo de amostras e tratamento de efluentes

A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras e para a descontaminação de efluentes. No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes. No tratamento de efluentes, as elevadas temperaturas e pressões proporcionam a degradação térmica de espécies orgânicas contaminantes, levando à completa mineralização das espécies para tempos prolongados de sonificação.^{61,62}

As modificações físicas e químicas resultantes da cavitação acústica têm impulsionado novas estratégias de preparo de amostras e, em sistemas heterogêneos, o tratamento é favorecido por alguns fenômenos como: produção de emulsão nas interfaces de

sistemas líquido-líquido; lixiviação na superfície em sistemas sólido-líquido; erosão, fragmentação e aumento da área superficial de partículas sólidas em decorrência das ondas de choque originadas da implosão das microbolhas e diminuição do gradiente de concentração pelo aumento do transporte de massa ocasionado pela turbulência e microjatos.^{63,64}

A redução do tamanho de partícula é um dos benefícios mais notórios da sonificação nos procedimentos de lixiviação e dissolução. Isso porque, muitas reações são limitadas pela área superficial efetiva exposta aos reagentes, resultando em perdas de reprodutibilidade e rendimento da extração do analito. A ruptura das partículas e o consequente aumento da área superficial são provocados pelo colapso de microbolhas nos interstícios do sólido ou pelos violentos choques entre partículas que chegam a alcançar velocidade superior a 500 m s^{-1} , promovendo até a fusão de fragmentos metálicos. Por outro lado, bolhas formadas nas proximidades das partículas tornam-se assimétricas e, ao implodirem, originam microjatos de líquido com velocidade superior a 100 m s^{-1} . Estes jatos são sempre direcionados para a superfície do sólido, resultando na erosão e, conseqüentemente, na renovação da superfície, aumentando a reatividade entre solvente e amostra.⁶⁵

A principal vantagem do ultra-som em extrações reside na diminuição do tempo de processamento e na utilização de soluções diluídas de ácidos minerais. Caso as determinações sejam conduzidas para a obtenção da quantidade total do analito, eventuais modificações na forma original do íon metálico não são consideradas, já que a eficiência de extração de íons metálicos depende da matriz, natureza e concentração da espécie extratora.

Pérez-Cid et al. empregaram o ultra-som para extrair sequencialmente Cu, Cr, Ni, Pb e Zn em diferentes frações de lodo obtidas de estações de tratamento de efluentes, conseguindo uma diminuição do tempo de extração de 51 h para 22 min.⁶⁶

Entre as várias outras aplicações dos ultra-sons para as determinações de metais, destacam-se a formação de suspensões para análise direta em sólidos, descontaminação de recipientes para armazenamento de amostras e favorecimento cinético de reações de complexação. Nestas situações, a integridade e identidade das espécies de interesse foram mantidas seguindo o critério de rastreabilidade.⁶⁷

No âmbito da proteção ambiental, a energia ultra-sônica apresenta efeitos interessantes para o tratamento de águas e efluentes aquosos, já que leva à destruição de microorganismos patogênicos e promove a degradação térmica de diferentes classes de poluentes. Adicionalmente, a eficácia do ultra-som na descontaminação de efluentes quanto à presença de microorganismos é atribuída à ruptura das células microbianas, ocasionando o escoamento do líquido citoplasmático.⁶⁸

A aplicação de formas não usuais de energia, como as oriundas de ultra-sons de baixa frequência e alta potência, para assistir procedimentos de análise química devem ser consideradas como promissoras. A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo de amostras, bem como para algumas etapas acessórias ao processamento analítico, como podem ser considerados a geração de reagentes e o tratamento de resíduos de análises químicas.^{69,70}

2. Objetivos

O trabalho de pesquisa teve como objetivo otimizar um método de extração por ultra-sonificação de cobre, manganês e selênio de amostras de polpa de abóbora, de beterraba, de cenoura e de folhas de couve de culturas convencionais e orgânicas certificadas para posterior determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes, soluções de referência e amostras

Água deionizada de alta pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic, ácido nítrico e clorídrico (Merck) de pureza analítica e/ou suprapuros foram utilizados em todo o trabalho. As soluções estoque dos analitos e dos concomitantes foram preparadas por diluições de padrões Titrisol Merck.

As demais soluções, incluindo as soluções extratoras padrões foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno.

3.2. Equipamentos

Foram utilizados equipamentos comuns a um laboratório de química analítica: (pHmetro, balanças analítica (Mettler AE-100), agitador magnético, bomba de vácuo, centrifuga, banho-maria).

Além dos equipamentos citados, seguintes equipamentos específicos foram utilizados: forno de microondas PROVECTO ANALÍTICA (Campinas-SP) modelo DGT 100 *plus*, espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, moinho criogênico SPEX – FREEZER modelo 6750, disruptor de célula ultra-sônica UNIQUE modelo USC-DC e estufa de circulação forçada de ar TECNAL modelo TE-394/1.

3.3. Preparo e obtenção das amostras

Os vegetais foram obtidos de produtores convencionais da região de Botucatu/SP e de produtores orgânicos certificados (Instituto Biodinâmico - IBD), também da região de Botucatu/SP (Latitude 22°53 09”sul e 48°26 42” longitude oeste).

As amostras foram coletadas no período da manhã, sendo levadas ao laboratório, lavadas para retirada de resíduos e posteriormente preparadas para as análises. Foi feito um total de seis amostragens em diferentes plantas, da seguinte forma: Amostras de abóbora – foram coletados frutos de seis plantas diferentes; Amostras de beterraba – foram coletados raiz de seis plantas de canteiros diferentes; amostras de cenoura – foram coletadas raiz de seis plantas diferentes; amostras de couve - foram coletados folhas de seis plantas diferentes.

As amostras dos vegetais (polpa de abóbora, de beterraba, de cenoura e folhas de couve) foram desidratadas a 50°C em estufa de circulação forçada de ar, até peso constante e moídas inicialmente em moinho de facas. Em seguida, essas amostras foram submetidas à moagem utilizando almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido. Após este tratamento, as amostras apresentaram granulometria menor que 60 µm, sendo então submetidas aos processos de ultra-sonificação e/ou mineralização por microondas.^{71,72}

3.3.1. Mineralização das amostras em forno de microondas

Aproximadamente 100 mg de polpa e/ou folhas dos vegetais, tratados conforme descrito em 3.3., foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,50 mL de ácido nítrico 14 mol L⁻¹ e 0,50 mL de

peróxido de hidrogênio 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado foi o descrito no manual do fabricante do equipamento com algumas modificações.⁷¹⁻⁷³

3.3.2. Extração dos analitos por ultra-sonificação

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostra e 10 mL de solução de ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹ foram transferidas para frascos de teflon de 25 mL. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som para extração dos analitos. Adotando este procedimento foram avaliados diferentes tempos de sonificação e potências do ultra-som no processo de extração dos analitos. Os extratos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação, para posterior determinação da concentração dos analitos.

3.4. Determinação dos analitos nas amostras de vegetais

As determinações de cobre, manganês e selênio foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), utilizando soluções padrão de pureza espectroscópica no preparo das curvas analíticas. Foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6400. Foi utilizada lâmpadas de cátodo oco de cobre (comprimento de onda = 324,7 nm), manganês (comprimento de onda = 275,9 nm) e selênio (comprimento de onda = 190,0 nm), operadas com 23 mA de corrente e utilizou-se resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo

constante de 3 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Foram otimizados programas de aquecimento e modificadores químicos para conseguir o máximo de eficiência nas etapas de pirólise e na atomização dos analitos. As leituras de absorvância foram feitas por área de pico.⁷³⁻⁷⁶

3.4.1. Preparo do tubo de grafite

Os tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada utilizados nas determinações dos analitos tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio metálico. Para isso, alíquotas de 50 µL de solução contendo 1000 mg L⁻¹ do modificador tungstato de sódio foram injetadas dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido às etapas do programa de aquecimento descrito na Tabela 2.⁷³⁻⁷⁵ Esse procedimento foi repetido 5 vezes.

Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da parede interna do tubo de grafite com carbeto de tungstênio.

Etapa	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
1	110	5	25	0,30
2	150	10	25	0,30
3	600	10	20	0,30
4	1200	10	20	0,30
5	2000	3	2	0,30
6	2200	0	5	0,30

3.4.2. Preparo das curvas analíticas

As curvas analíticas foram preparadas por diluição feitas diretamente pelo amostrador automático do espectrômetro de absorção atômica. Para isso, volumes de 4, 6, 8, 10 e 12 μL de solução estoque contendo 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e manganês e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selênio, juntamente com 5 μL de solução a 20 mg L^{-1} de Pd(II), foram injetadas pela pipeta do autoamostrador diretamente para dentro do tubo de grafite recoberto com carvão de tungstênio. Utilizando esse procedimento, foram obtidas curvas analíticas nas concentrações 4 a 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o cobre e manganês e de 8 a 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o selênio.

3.4.3. Preparo das amostras

Após os procedimentos de extração dos analitos por ultra-som, 250 μL dos extratos ácidos dos vegetais, foram transferidas diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 10 μL de solução 500 mg L^{-1} de Pd(II) e 740 μL de água ultrapura. As soluções das amostras foram em seguida agitadas por sonificação (com potência de 136 W) durante 20 segundos.⁷³

3.4.4. Procedimentos analíticos

Após a etapa de preparo das amostras, um volume de 20 μL de solução de amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite pela micro pipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com cinco repetições. No programa de aquecimento do tubo de grafite, inicialmente foi fixada a temperatura de atomização (T_A), variando-se a temperatura de pirólise (T_P) em intervalos de 100 $^{\circ}\text{C}$. Depois de fixada a T_P ótima, variou-se a T_A nos

mesmos intervalos. O programa de aquecimento utilizado nesses estudos encontra-se descrito na Tabela 3.⁷³⁻⁷⁶

Tabela 3. Programa de aquecimento utilizado na otimização das temperaturas de pirólise e atomização do selênio.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	10	0	1
Secagem	150	10	5	1
Secagem	250	10	5	1
Pirólise*		10	20	1
Atomização*		1	5	0 (leitura)
Limpeza	2800	5	0	1

*Variável

3.4.5. Avaliação da exatidão e precisão dos métodos de extração

A exatidão e precisão do método de extração por ultra-som foram avaliadas por determinações dos analitos em amostra de padrão certificado Corn Bran RM 8433 do National Institute of Standards & Technology e também por comparação com os resultados obtidos nas determinações das amostras de vegetais utilizando mineralização prévia em forno de microondas.⁷¹⁻⁷⁵

4. Resultados e Discussão

4.1. Otimização do tempo de sonificação

A eficiência do processo de extração por ultra-som dos analitos nas amostras de vegetais foi avaliada variando-se o tempo de extração e a potência ultra-sônica. Na etapa de moagem da amostra procurou-se obter a menor granulometria possível, o que favorece a homogeneidade do analito no material sólido e evita possíveis erros associados à representatividade da amostra. Nessa etapa também foi evitada a manipulação excessiva das amostras, procurando-se assim evitar possíveis fontes de contaminação. Conforme já discutido na literatura, as ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos da matriz devido à atuação destas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, destruindo-as e provocando a quebra da ligação do metal com essas moléculas.⁷⁷⁻⁷⁹ Dessa forma, inicialmente foram feitos experimentos de otimização do tempo de sonificação no processo de extração dos analitos das amostras, utilizando-se extratos obtidos das amostras de polpa de abóbora de cultura orgânica. O principal objetivo nesses experimentos foi padronizar um tempo ótimo de extração para ser então utilizado nos demais experimentos, medindo-se o sinal de absorvância nessas amostras, até que se observasse uma estabilização nos valores de absorvância.

A princípio, considerou-se que as amostras em termos de efeito de matriz são semelhantes, e assim, poder-se-ia utilizar até mesmo uma única amostra de vegetal para se determinar o tempo ótimo de extração. A Figura 8 mostra os resultados obtidos nesses experimentos.

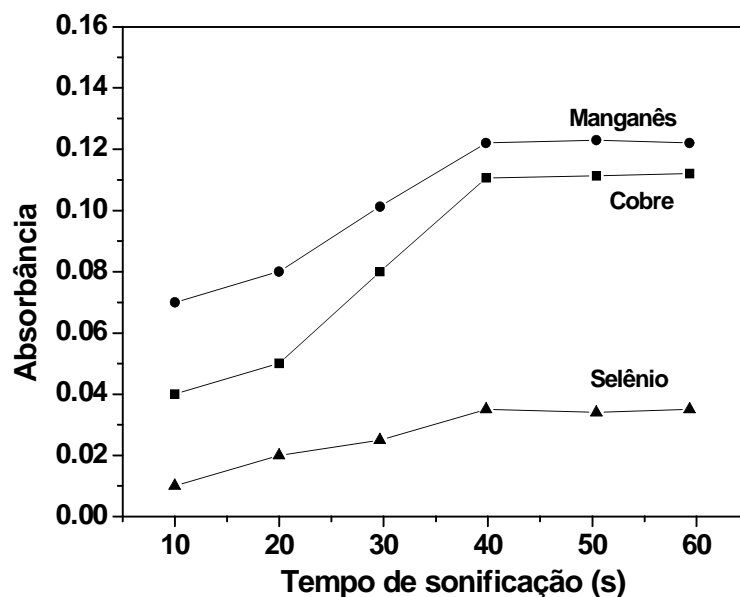


Figura 8. Influência do tempo de sonificação no processo de extração de cobre, manganês e selênio de amostra de polpa de abóbora. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 s; Potência utilizada – 136 W; Solução Extratora – Ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹.

O aumento do tempo de sonificação provoca o aumento da temperatura do meio extrator. Normalmente, observa-se que numa temperatura em torno de 50°C, a eficiência de extração é favorecida devido ao aumento do número de núcleos de cavitação acústica formada nas proximidades da superfície da fase sólida da suspensão (sistema sólido-líquido).⁸¹⁻⁸³ No entanto, quando a temperatura do meio extrator se aproxima da temperatura de ebulição da fase líquida, ocorre um decréscimo na eficiência da sonificação devido à diminuição da tensão superficial do meio e aumento da pressão de vapor dentro das microbolhas, o que provoca uma diminuição nas ondas de choque.^{84,85} Existe, dessa forma, um tempo considerado ótimo de sonificação no processo de extração de metais de uma

amostra sólida. Nesse tempo ocorre a cavitação acústica, ou o ciclo de formação, crescimento, e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas. Após o colapso das bolhas de cavitação, ocorre a liberação de grande quantidade de energia na microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando assim extração do íon metálico e em alguns casos até a dissolução do material sólido.^{82,84} Analisando-se os gráficos apresentados na Figura 8, observa-se que a partir de 5 ciclos de 40 segundos de agitação ultra-sônica (3,30 minutos), os sinais de absorbância medidos por GFAAS, permaneceram praticamente constantes e a temperatura medida no sistema sólido-líquido foi de 62°C. Dessa forma, este tempo foi considerado eficiente no processo de extração do cobre, manganês e do selênio.

4.2. Otimização da potência do ultra-som

A intensidade do ultra-som transmitida ao meio está diretamente relacionada à amplitude da vibração da ponta do sonotrodo que está em contato com a suspensão amostra sólido/extrator.^{56,57,78,82} Geralmente, um aumento na intensidade da potência favorecerá um aumento nos efeitos químicos provocados pela sonificação. Quando se utiliza amplitude vibracional muito elevada, um grande número de bolhas de cavitação são geradas na solução, o que pode desfavorecer o crescimento e o colapso dessas bolhas, tendo como consequência uma diminuição da energia liberada através da fase líquida. Com isso, o processo de rompimento das ligações dos analitos com os concomitantes orgânicos e inorgânicos da matrix é comprometido e, a extração desses para a fase líquida não é eficaz. Considerando esses efeitos, a influência da amplitude do ultra-som no processo de extração

dos analitos foi avaliada variando-se a escala 10-60% da potência total de trabalho (340 W).

Os resultados obtidos são mostrados nos gráficos apresentados na Figura 9.

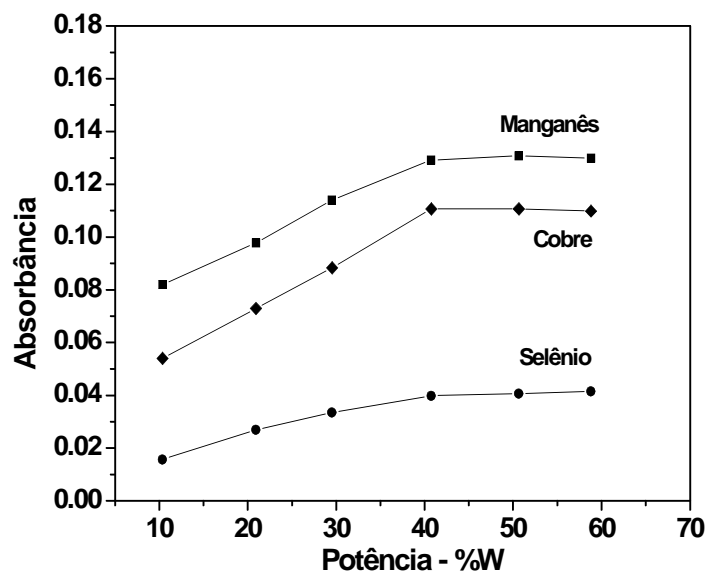


Figura 9. Influência da potência de sonificação no processo de extração de cobre, manganês e selênio de amostra de polpa de abóbora. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação - 5 ciclos de 40 s; Solução Extratora – Ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Para os três analitos estudados, a eficiência da extração conforme mostra a Figura 9, aumenta com amplitude crescente de 34 a 136 W, permanecendo constante para os valores mais elevados de amplitude. Os resultados obtidos indicaram, dessa forma, que a eficiência máxima do processo de extração foi conseguida na escala de amplitude 136-272 W de potência. Optou-se então por utilizar a amplitude de 136 W de potência em todos os demais experimentos a serem desenvolvidos, pelo fato dessa potência provocar um menor aumento de temperatura da solução extratora $62 \text{ }^\circ\text{C}$, contra 76 e $84 \text{ }^\circ\text{C}$ para as amplitudes de 204 W e 272 W de potência.^{84,85}

4.3. Determinações por GFAAS: Otimização das condições experimentais

Curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do cobre, manganês e selênio no extrato ácido da amostra de polpa de abóbora, utilizando-se tubo de grafite recoberto internamente com carbetto de tungstênio. A influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre a estabilidade dos sinais de absorbância obtidos para o cobre, manganês e selênio no extrato de amostra de abóbora, é mostrada nas Figuras 10 e 11.

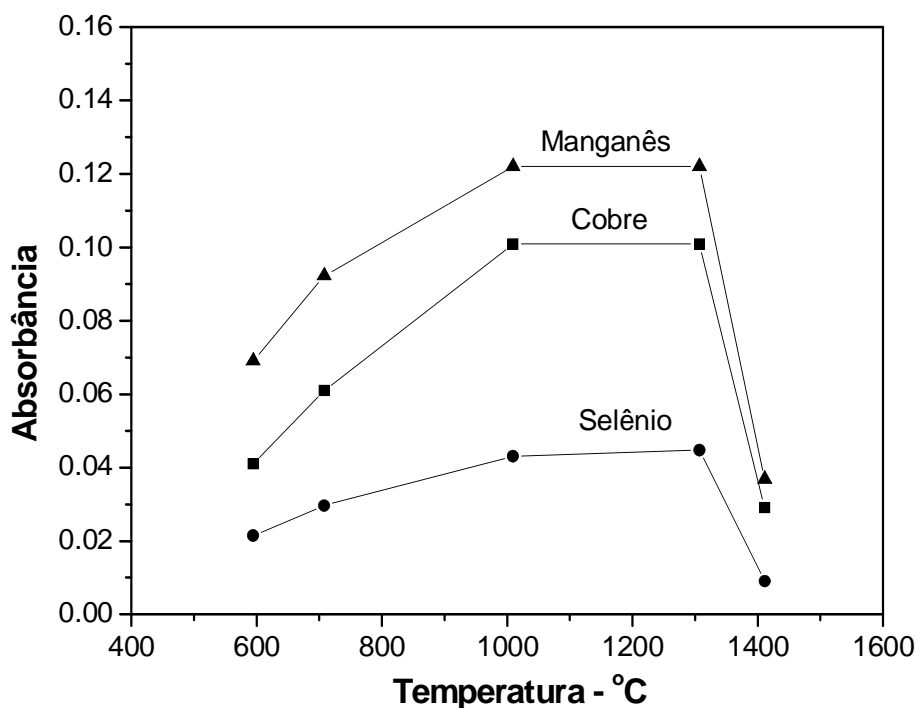


Figura 10. Influência da temperatura de pirólise dos concomitantes da amostra de extrato de abóbora sobre a estabilidade dos sinais de absorbância do cobre, manganês e selênio.

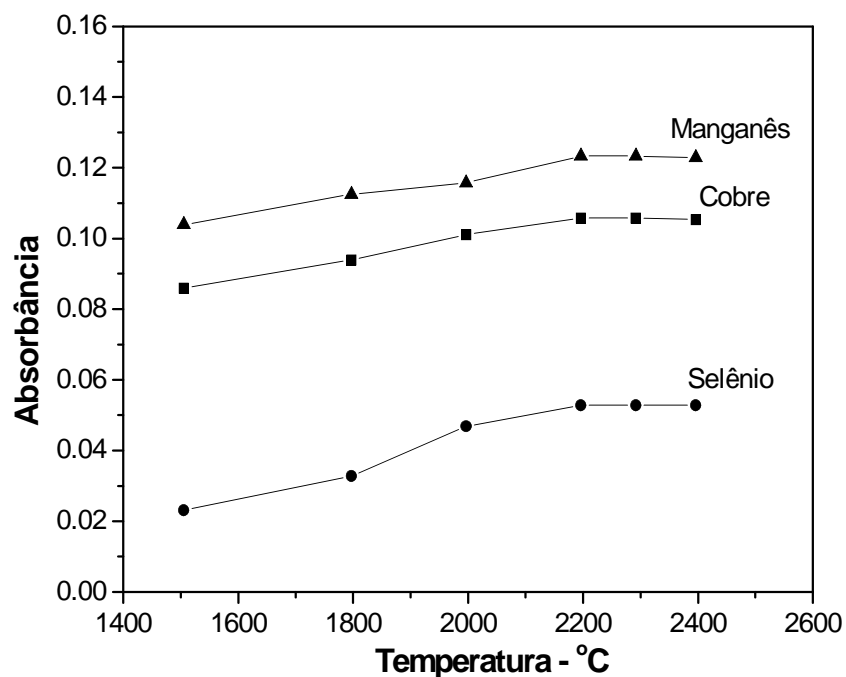


Figura 11. Influência da temperatura de atomização sobre a estabilidade dos sinais de absorbância do cobre, manganês e selênio na amostra de extrato de abóbora.

A temperatura de pirólise de 1300 °C foi escolhida, porque conforme mostra a Figura 10, os sinais de absorbância obtidos para os três analitos permanecem constantes a partir de 1000°C, sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1300 °C. Todos os demais experimentos foram feitos utilizando essa temperatura na etapa de pirólise, porque até esse valor de temperatura o manganês, o cobre e o selênio apresentam-se termicamente estável. Em relação à temperatura de atomização (Figura 11, observa-se que os sinais de absorbância obtidos para os analitos são constantes a partir de 2100 °C, considerando esse comportamento, a temperatura de atomização de 2300°C foi selecionada para todos os demais experimentos. O boa estabilidade térmica dos analitos obtida nesses experimentos

demonstra a eficiência do modificador químico Pd(II) co-injetado junto com a amostra e do carbeto de tungstênio que atuou como modificador permanente.⁷³⁻⁷⁵

4.3.1. Obtenção das curvas analíticas

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados (temperatura de pirólise e atomização), foram preparadas curvas analíticas de cobre, manganês e selênio na faixa de concentração de 2 - 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (conforme descrito no item 2.6). As Figuras 12, 13 e 14 mostram as curvas analíticas obtidas com as suas respectivas equações de reta.

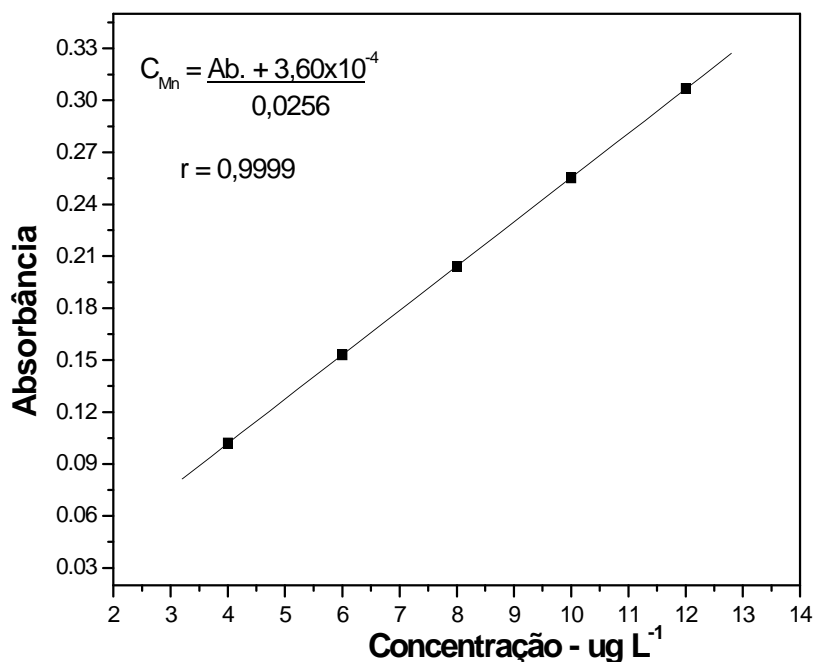


Figura 12. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 4, 6, 8, 10 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de manganês.

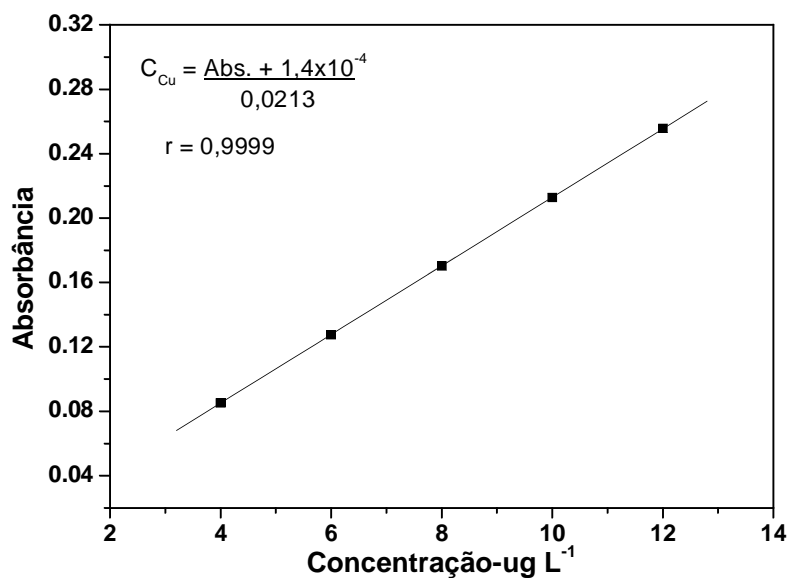


Figura 13. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 4, 6, 8, 10 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

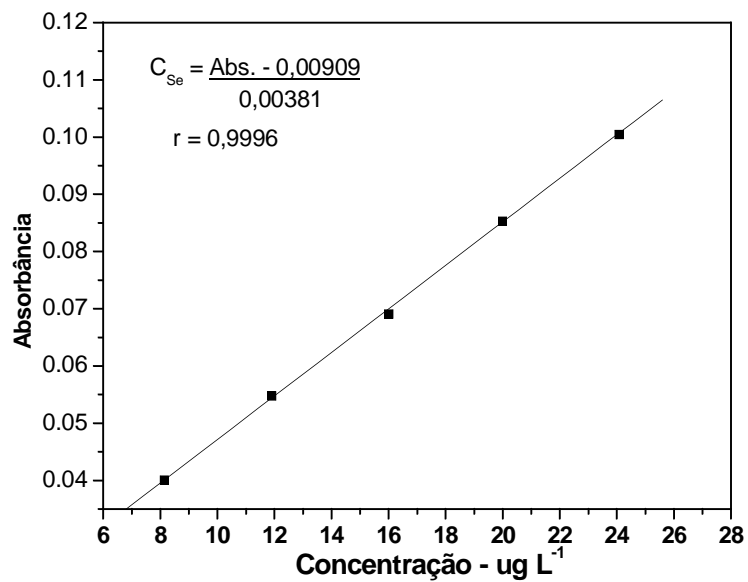


Figura 14. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 8, 12, 16, 20 e 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ de selênio.

Os valores obtidos nas leituras das absorvâncias dos padrões de cobre, manganês e selênio (n=3) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativo menores que 2%), o que reforça a eficiência dos modificares químicos, Pd(II) e carbeto de tungstênio, na estabilização térmica dos analitos durante a etapa de pirólise e atomização do programa de aquecimento utilizado. As massas características calculadas em relação ao padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e manganês e de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de selênio foram de 26, 23 e 45 pg respectivamente. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e da inclinação da curva analítica ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ e $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$), foram respectivamente $0,24$ e $0,79 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, $0,180$ e $0,59 \mu\text{g L}^{-1}$ de manganês e $0,38$ e $0,92 \mu\text{g L}^{-1}$ de selênio. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 626 queimas, o que é aceitável quando comparada com outros métodos considerando-se a complexidade das matrizes biológicas, a vida útil do tubo obtida para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura.⁷³⁻⁷⁵

4.4. Aplicação do método de extração proposto

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos que influenciam o processo de extração dos analitos das amostras de vegetais e da quantificação destes por GFAAS, a eficiência do método proposto foi avaliada na determinação de cobre, manganês e selênio em amostras de polpa de abóbora, beterraba, cenoura e folhas de couve. Para efeito de comparação de resultados, foi feita também a determinação dos analitos utilizando-se

mineralização das amostras em forno de microondas. Os resultados obtidos estão sumarizados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Concentração dos analitos nas amostras de polpas de abóbora, beterraba, cenoura e folhas de couve utilizando-se extração por ultra-som (n = 3).

Amostras	Cobre (mg kg ⁻¹)	Manganês (mg kg ⁻¹)	Selênio (µg kg ⁻¹)
Abóbora Convencional	3,22±0,06	2,10±0,03	244,00±3,20
Abóbora Orgânica	4,17±0,07	3,20±0,04	240,00±2,80
Beterraba Convencional	3,42±0,05	1,20±0,01	90,00±0,97
Beterraba Orgânica	4,12±0,08	1,60±0,01	85,00±0,91
Cenoura Convencional	2,17±0,02	3,40±0,05	120,00±1,23
Cenoura Orgânica	2,25±0,02	3,80±0,06	117,00±1,20
Couve Convencional	3,22±0,04	3,20±0,04	128,00±1,31
Couve Orgânica	3,44±0,05	4,10±0,05	125,00±1,29

Tabela 5. Concentração dos analitos nas amostras de polpas de abóbora, beterraba, cenoura e folhas de couve utilizando-se mineralização em forno de microondas (n = 3).

Amostras	Cobre (mg kg ⁻¹)	Manganês (mg kg ⁻¹)	Selênio (µg kg ⁻¹)
Abóbora Convencional	3,10±0,05	2,43±0,04	247,00±3,80
Abóbora Orgânica	3,80±0,07	3,75±0,05	243,00±3,12
Beterraba Convencional	3,62±0,07	1,50±0,03	92,00±1,11
Beterraba Orgânica	4,44±0,08	1,90±0,03	88,00±0,97
Cenoura Convencional	2,15±0,03	3,90±0,06	122,00±1,31
Cenoura Orgânica	2,54±0,04	3,25±0,05	119,00±1,26
Couve Convencional	3,15±0,05	3,40±0,04	131,00±1,42
Couve Orgânica	3,55±0,06	4,50±0,06	128,00±1,33

Analisando-se os resultados referentes às determinações dos nutrientes metálicos sumarizados nas Tabelas 4 e 5, observa-se que estes resultados obtidos utilizando extração por ultra-som estão concordantes com os resultados obtidos utilizando-se a mineralização das

amostras em forno de microondas. Os valores calculados dos desvios padrão para todos os resultados foram baixos, caracterizando desvios padrão relativos menores que 2%, o que comprova uma boa repetibilidade entre as medidas e conseqüentemente uma boa precisão dos métodos utilizados. No entanto, deve-se destacar que a metodologia proposta (extração por ultra-som), diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a velocidade analítica. A exatidão do método de extração foi avaliada determinando a concentração dos analitos em uma amostra de padrão certificado Corn Bran, RM 8433 – National Institute of Standards and Technology. Os resultados obtidos nessas determinações são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos nas determinações de cobre, manganês em selênio em padrão certificado utilizando o método de extração por ultra-som (n=3).

Nutrientes Metálicos	Valores determinados (mg kg ⁻¹)	Valores certificados (mg kg ⁻¹)
Cobre	2,43±0,03	2,47±0,40
Manganês	2,50±0,04	2,55±0,29
Selênio	0,042±0,001	0,045±0,008

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que além dos valores apresentarem desvios-padrão relativos menores que 2% para o cobre e manganês e menor que 3% para o selênio, o que caracteriza uma boa repetibilidade e/ou precisão entre as medidas, também estão bem próximos dos valores certificados, comprovando assim a exatidão do método de extração proposto.

5. Conclusões

O método proposto para determinação de cobre, manganês e selênio em amostras de vegetais utilizando-se extração por ultra-som mostrou-se equivalente ao método por mineralização ácida em forno de microondas. De uma forma geral, deve-se destacar que a metodologia proposta diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a velocidade analítica. Além disso, os resíduos tóxicos gerados nos extratos ácidos após a mineralização das amostras em forno de microondas, não ocorrem no processo de extração por ultra-som porque se utiliza nesse processo volumes pequenos de soluções ácidas diluídas. Observa-se também que não existe grande diferença nas concentrações dos nutrientes metálicos entre o cultivar tradicional e orgânico. Esse comportamento pode ser explicado, considerando que ambas as coletas foram feitas em regiões de solo de mesma característica (Fazenda Demétria/Botucatu-SP). Pode-se então sugerir, com base nos resultados obtidos, que o método de extração por ultra-som pode ser utilizado na extração de minerais de amostras biológicas para posterior determinação desses analitos em análises de rotina feitas na área de nutrição vegetal.

6. Tratamento dos resíduos químicos

O método proposto para extração de nutrientes metálicos de amostras de vegetais utilizando extração por ultra-som, se enquadra na tendência atual da química limpa, uma vez que se trabalha com volumes muito pequenos de amostras ou soluções padrão para se fazer uma determinação. No entanto, os resíduos gerados, que foram basicamente soluções ácidas de íons cobre, manganês e selênio, foram tratados utilizando-se procedimentos já adotados nos laboratórios do Departamento de Química e Bioquímica IB/UNESP-Botucatu, que essencialmente consiste em: Resíduos dos metais: descarte das soluções em frascos apropriados (bombas de 10 litros) contendo excesso de NaOH comercial. Com esse tratamento consegue-se a precipitação da maior parte dos metais impactantes na forma de óxidos/hidróxidos ou carbonatos. Os metais que não são precipitados nestas condições ficarão retidos na massa de precipitados após a evaporação do sobrenadante, considerando-se que as bombas contendo os resíduos tratados são armazenadas parcialmente fechadas para possibilitar a evaporação do sobrenadante, reduzindo o volume de resíduo, como também os riscos inerentes ao transporte até o local de destinação final. Os resíduos metálicos, assim tratados, foram encaminhados ao depósito de resíduos sólidos do campus, onde permanecerão até o encaminhamento para a empresa AMBICAMP-Campinas/São Paulo que será responsável pela destinação final dos resíduos.

7. Referências Bibliográficas

1. Malavolta, E. Manual de química agrícola: Nutrição de plantas e fertilidade do solo. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1976. 528 p.
2. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. Trace elements in soil and plants. Boca Raton: CRC Press, 1984. 315p.
3. Leschber, R.; Davies, R.D.; L'hermite, P. Chemical methods for assessing bioavailability metals in sludge and soils. London: Elsevier, 1985. 96p.
4. Lindsay, W.L., Norwel, W.A. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal, v.42, p.421-428, 1978.
5. Malvolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.
6. Oliveira, F.C. Metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com lodo de esgoto. Piracicaba, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
7. Oliveira, F.C. Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo num Latossolo Vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar. Piracicaba, 2000. 247p. Tese (Doutorado) Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
8. Van Raij, B. & Quaggio, J.A. Métodos de análise de solo para fins de fertilidade. Instituto Agronômico, Campinas, 2003. Boletim Técnico, 31p.

9. Roca, J.; Pomares, F. Prediction of available heavy metals by six chemical extractants a sewage sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.22, p.2129-2136, 1991.
10. Sarruge, J.R.; Haag, H.P. *Análises químicas em plantas*. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56p.
11. Willians, M.H.; *Nutrição para saúde, condicionamento físico e desempenho esportivo*. 5 ed. Manole, 2002. 500p.
12. Katch, F.I.; McArdle, W.D. *Nutrição, exercício e saúde*. 4 ed. Medsi :RJ, 1996. 657p.
13. Mello, J.C., Dietrich, R., Meinert, E.M., Teixeira, E., Amante, E.R. Efeitos do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americano (*Lectuca sativa* L) minimamente processada. *Ciências e tecnologia de Alimentos*. Campinas, v.23, n.3, p.418-426, 2003.
14. Siderer, Y., Maquet, A., Anklam, E. Need for research to support consumer confidence in the growing organic food market. *Trends in Food Science and Technology*, v.16, p.332-343, 2005.
15. Chitarra, M.I.F., Chitarra, A.B. *Pós-Colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio*. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, v.1500, 785p, 2005.
16. Borguini, R.G., Oetterer, M., Dilva, M.V. Qualidade nutricional de hortaliças orgânicas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.37, n.1, p.28-35, 2003.
17. Brandenburg, A. *Movimento agroecológico: trajetórias, contradições e perspectivas*. *Desenvolvimento e meio ambiente: caminhos da agricultura ecológica*. Curitiba, PR; Editora UFPR, n.6, p.11-28, 2002.

18. Azevedo, E. Alimentos orgânicos: ampliando os conceitos de saúde humana, ambiental e social. Florianópolis: Insular, 2003, 200p.
19. Rocha, S.A. Características bioquímicas em cascas, folhas e talos de vegetais pós-colheita em sistema de produção convencional e não convencional. 2005. 65p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.
20. David, D.C.Z.P. Comparação da qualidade bioquímica de vegetais, cultivados de modo convencional e não convencional. 2007. 61p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.
21. Magkos, F., Arvaniti, F. & Zampelas, A. Organic food: nutritious food or food for though. A review of evidence. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.54, p.357-371, 2003.
22. Mitchell, A.E. & Chassy, A.W. Antioxidants and the nutritional quality of organic agriculture (2006). Communiqué, In.: <http://mitchell.ucdavis.edu/Is%20Organic%20Better.pdf>.
23. KRUG, F.J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P.V Espectrometria de Absorção Atômica – Parte 1 – Fundamentos e Atomização com Chama. In: *Disciplina de Pós-Graduação Espectrometria de Absorção Atômica*, 40p. ESALQ, 2004.
24. RICHARD, D.B.; JACK, D.K. Concepts, Instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry. The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA, 1993.
25. WELZ, B.; Sperling M., *Atomic Absorption Spectrometry*, 3a ed., VCH, Weinheim, 1999.
26. LAJUNEN, L.H.J., *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.

27. JENNISS, S.W.; KATZ, S.A.; LYNCH, R.W., Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring, 2a ed., Wiley-VCH, New York, 1997.
28. BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J. A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry. New York: John Wiley & Sons, 1998, 250 p.
29. JACKSON, K. W. Eletrothermal atomization for analytical atomic spectrometry. Chichester: John Wiley, 1999. 470 p.
30. SAINT'PIERRE, T. D. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais traço em álcool combustível e gasolina por espectrometrias de absorção atômica e de massa com plasma indutivamente acoplado. 107 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
31. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of instrumental analysis. 5th ed. New York: Saunders College, 1998. 848 p.
32. PERKIN ELIMER. Recommended conditions for THGA furnaces. Uberlinguer, 1991.
33. OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; CORREIA, P. R. M.; OLIVEIRA, P. V. Determination of selenium in nutritionally relevant foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry using arsenic as internal standart. Food Chemistry, v. 93, n. 2, p. 355-360. 2005.
34. FERNADES, K. G.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P. V. Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the

- determination of lead in wines by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, v. 127, n. 1, p. 157-162, 2002.
35. RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y. Evaluation of internal standardization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytical Communication*, v. 36, n. 1, p. 13-16, 1999.
 36. TAKADA, T.; NAKANO, K. Evaluation and application of internal standardization in atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization. *Analytica Chimica Acta*, v. 107, n. 1, p. 129-138, 1979.
 37. MILLER-IHLI, N. I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. *Fres. J. Anal. Chem.*, v. 345, p.482-489, 1993.
 38. BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBERGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. *J. Anal. Spectrom.*, v. 6, p.353-538, 1991.
 39. LIANG, Y.; MI, M.; RAO, Z. Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Sci.*, v.12, p.629-635, 1996.
 40. MINAMI, H.; INOUE, Y.; SAKATA, K. Determination of traces levels of selenium in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with a solid sampling technique. Application of pre-ashing concentration technique. *Anal. Sci.*, v. 13, p.397-403, 1997.
 41. CHEM W. et. Al. Direct determination of selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry using automated ultrasonic slurry sampling. *Spectrochim. Acta*, v. 53B, p.131-139, 1998.

42. LOPES-GARCIA, I.; SANCHES-MERLOS, M.; HERNANDES-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium in soil and sediments using slurry sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, v.11, p.1003-1009, 1996.
43. VINÑAS, P. et. al. Rapid determination of selenium, lead and calcium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. *Anal. Chim Acta*, v. 412, p.121-128, 2000.
44. GRAMMELGAARD, B.; JONS, O. Comparison of palladium chemical modifiers for determination of selenium in plasma by zeeman-effect background corrected electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, v. 12, 465-671, 1997.
45. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPE, U. Influence of the valence state on the determination of selenium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta*, v.39b, p. 501-508, 1984.
46. WELZ, B. et. al. Palladium nitrate - magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry: Performance for 21 elements. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, v.7, p.1257-1262, 1992.
47. FISCHER, J. L., RADEMEYER, C. J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETAA-AAS) Part 2: selenium with palladium modifiers. *Spectrochim. Acta*, v.5B, p.549-554, 1998.
48. ALLER, A., J. Atomization characteristics of selenium from graphite tube in the presence of calcium and chemical modifier. *Anal. Sci.*, v13, 1997.
49. GARCIA-OLALLA, C. et. al. Determination of selenium in coal fly ashes by graphite atomic absorption spectrometry using a cadmium-palladium chemical modifier. *Anal. Chim. Acta*, v.247, p.19-23, 1991.

50. LIU, Y. M. et. al. Direct determination of selenium in wild fruit juice by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v.43, p.985-989, 1996.
51. BOZSAI, G. Determination of arsenic, cadmium, lead, and selenium in highly mineralized waters by graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v.37, n° 6, p.545-549, 1990.
52. ALEIXO, P. C. et. al. Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. *Quim. Nova*, v.23, n°3, p. 310-314, 2000.
53. PEREZ-CORONA, M. T. et. al. Glucose as a chemical modifier for the determination of antimony and selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, v.10, p.321-326, 1995.
54. STYRIS, D. L., et. al. Mechanisms of selenium vaporization with palladium using electrothermal atomization and mass-spectrometric detection. *Anal. Chem.*, v.63, n.5, p.508-512, 1991.
55. QUIAO, H., JAKSON, K. Mechanism by palladium in graphite furnace atomic absorption spectrometry: a physical mechanism. *Spectrochim Acta*, v 47b, n.11, p.1267-1271, 1992.
56. KORN, M.; PEREIRA, M.G.; BORGES, S.S.; Algumas aplicações analíticas dos ultrasons. *Boletim Técnico, Universidade do Estado da Bahia*, p.51-55.
57. MASON, T.J.; LORIMER, J.P.; *Sonochemistry: Theory, Applications and Users of Ultrasound in Chemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester, UK, 1988.
58. SUSLICK, K.S. *Sonochemistry*, *Science*, v.247, p.1439-45, 1990.

59. FRANCONY, A.; PÉTRIER, C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.3, p.S77-S82, 1996.
60. NASCENTES, C.C.; KORN, M.; ARRUDA, M.A.Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* v.69, p.37-43, 2001.
61. RUIZ- JIMÉNEZ, J.; LUQUE-GARCIA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.480, p.231-237, 2003.
62. FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v.53, p.433-441, 2000.
63. SHIOWATANA, J.; TANTIDANAI, N.; NOOKABKAEW, S.; NACAPRICHA, D. A flow system for the determination of metal speciation in soil by sequential extraction. *Environment International*, 2001.
64. MEEGODA, J.N.; PERERA, R. Ultrasound to decontaminate metals in dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials*, v.59, p.1-17, 2001.
65. ASHLEY, K. Ultrasonic extraction of heavy metals from environmental and industrial hygiene samples for their subsequent determination. *TrAC Trends Analytical Chemistry*, p.366-372, 1998.
66. LUQUE-GARCIA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.22, p.90-98, 2003.

67. PINO, V.; AYALA, J.H.; AFONSO, A.M.; GONZÁLEZ, V. Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments *Talanta*, v.54, p.15-23, 2001.
68. PETROVIC, M.; KASTELAN-MACAN, M.; HORVAT, A.J.M. Thin-layer chromatographic behaviour of substituted phenolic compounds on silica gel layers impregnated with Al(III) and Cu(II). *Journal of Chromatography A*, v.607, p.163-167, 1992.
69. KRUG, F.J.; *Methods of Sample Decomposition*, In: IV Workshop on Sample Preparation, Salvador-Brazil, 2003.
70. SUSLICK, K.S.; DIDENKO, Y.; FANG, M.M.; HYEON, T.; KOLBECK, K.J.; MCNAMARA, W.B.; MDLELENI, M.M.; WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences, *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v.357, p.335-353, 1999.
71. ROSA, C.R., MORAES, M., NETO, J.A.G., NÓBREGA, J.A., NOGUEIRA, A.R. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, v.79, p.517-523, 2002.
72. SILVA, F.A., PADILHA, C.C.F., PEZZATO, L.E., BARROS, M.M., PADILHA, P.M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta*, v.69, p.1025-1030, 2006.
73. SILVA, F. A.; NEVES, R. C. F.; QUINTERO-PINTO, L. G.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. O. M. A.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; PADILHA PM. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the

- bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere*, 68, p. 1542-1547, 2007.
74. LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; MORAES, P. M.; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F. ; PADILHA PM. Manganese Determination by GFAAS in Feces and Fish Feed Slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1235-1241, 2007.
75. NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; SILVA ; LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; PADILHA, C. C. F.; BARROS, M. M. ; PADILHA, P.D. Determination of copper in fish feed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using slurry sampling. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, v. 2, p. 274-279, 2008.
76. COOKBOOK SHIMADZU – OPERATION MANUAL: Atomic Absorption Spectrophotometer AA-6800, SHIMADZU, 2000.
77. AL-MEREY, R.; AL-MASRI, M.S.; BOZOU, R. Cold ultrasonic acid extraction of copper, lead and zinc from soil samples. *Analytica Chimica Acta*, v.452, p.143-148, 2002.
78. PÉREZ-CID, B.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, v.360, p.35-41, 1998.
79. SANTOS, C.; ALAVA-MORENO, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.15, p.987-994, 2000.

80. KLNSELLA, B.; WILLIX, R.L. Ultrasonic bath in container preparation for storage of seawater samples in trace metal analysis. *Analytical Chemistry*, v.54, p.2614-2616, 1982.
81. PATNAIK, U.; MURALIDHAR, J. Estimation of chromium in ores and beneficiated products: An ultrasonic approach. *Talanta*, v.42, p.553-556, 1995.
82. ELIK, A. Ultrasound assisted pseud-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 66(4), 882-888, 2005..
83. ELIK, A. Ultrasound assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. *Talanta* 71(2), 790-794, 2007.
84. NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; SALEH, M. A. D.; LOUREIRO, V. R.; SILVA, F. A.; BARROS, M. M.; PADILHA, C. C. F.; ALVESJORGE, S. M.; PADILHA PM. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v. 113, p. 679-683, 2009.
85. MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; NEVES, R. C. F.; SALEH, M. A. D.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A.; PADILHA, PM. Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Química Nova*, v. 32, p. 923-927, 2009.