



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara**



Dissertação de Mestrado

**APERFEIÇOAMENTO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA DE DIGESTÃO
ASSISTIDA POR AQUECIMENTO CONDUTIVO EM FRASCO FECHADO PARA
PREPARAR AMOSTRAS DE CARNE “IN NATURA” PARA ANÁLISE ELEMENTAR**

Alan Lima Vieira

Araraquara – SP

2016

Alan Lima Vieira

**APERFEIÇOAMENTO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA DE DIGESTÃO
ASSISTIDA POR AQUECIMENTO CONDUTIVO EM FRASCO FECHADO PARA
PREPARAR AMOSTRAS DE CARNE “IN NATURA” PARA ANÁLISE ELEMENTAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

Co-orientador: Dr. Kelber dos Anjos de Miranda

Araraquara - SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

V657a Vieira, Alan Lima
Aperfeiçoamento e avaliação de um novo sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para preparar amostras de carne "in natura" para análise elementar / Alan Lima
Vieira – Araraquara - SP : [s.n], 2016
80 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: José Anchieta Gomes Neto
Coorientador: Kelber dos Anjos de Miranda

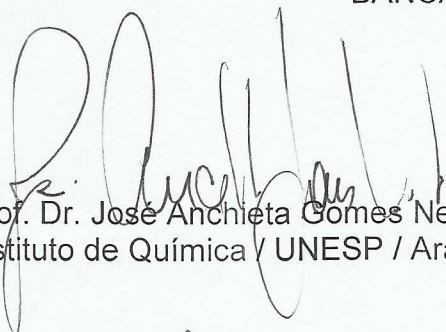
1. Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente.
2. Preparo de amostras. 3. Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. 4. Microondas. 5. Carne - Inspeção.
I. Título.

ALAN LIMA VIEIRA


Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 04 de março de 2016.

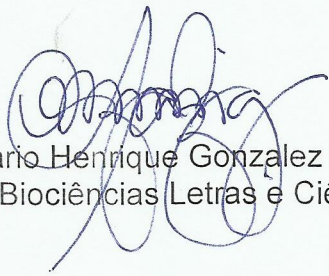
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. Mirian Cristina dos Santos
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas / UNESP / São José do Rio Preto - SP

Alan Lima Vieira

1. Dados pessoais

- 1.1. Data de nascimento: 12/12/1991
- 1.2. Nacionalidade: Brasileiro
- 1.3. Naturalidade: Patos de Minas – MG
- 1.4. Filiação: Sebastião Donizete Vieira
 Geralda de Fátima Vieira
- 1.5. Profissão: Químico

2. Formação acadêmica

- 2.1. Graduação em Química - Bacharelado
Universidade Federal de Viçosa, Câmpus Rio Paranaíba – UFV-CRP, Rio Paranaíba - MG.
Período: 09/2009 – 02/2014.

3. Artigos aceitos para publicação

- 3.1. Kelber Miranda, **Alan Lima Vieira**, José Anchieta Gomes Neto; *High-throughput sugarcane leaf analysis using a low cost closed-vessel conductively heated digestion system and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*. **Anal. Methods**, 2014, 6, 9503-9508. DOI: 10.1039/C4AY01841A
- 3.2. Kelber Miranda, **Alan Lima Vieira**, Marcos André Bechlin, Felipe Manfroi Fortunato, Alex Virgilio, Edilene Cristina Ferreira, José Anchieta Gomes Neto; *Determination of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Se, and Zn in Foodstuffs by Atomic Spectrometry After Sample Preparation Using a Low-Cost Closed-Vessel Conductively Heated Digestion System*. **Food Anal. Methods**. 2015. DOI:10.1007/s12161-015-0371-8

4. Trabalhos apresentados em congressos

- 4.1. **VIEIRA, A. L.**, MIRANDA, A. M., GOMES NETO, J. A. Avaliação de um sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para preparar amostras de carne visando à análise elementar. 4º Congresso Analítica Latin America, 2015, São Paulo – SP.
- 4.2. **VIEIRA, A. L.**, RIBEIRO, L. L., SANTANA, M. V., SOARES, M. S., BABOS, D. V., CASTRO, J. P., RESENDE, M. O. Análise por injeção em fluxo empregando materiais alternativos e de baixo custo. 3º Congresso Analítica Latin America, 2013, São Paulo – SP.
- 4.3. CASTRO, J. P., RESENDE, M. O., BABOS, D. V., **VIEIRA, A. L.**, SOARES, M. S., SOARES, F. S. C. Remoção de Cr (VI) de soluções aquosas utilizando adsorventes naturais. 3º Congresso Analítica Latin America, 2013, São Paulo – SP.

DEDICATÓRIA

À minha namorada **Stela** e aos meus pais **Sebastião e Fátima**, ao meu irmão **Alex**, à minhas avós **Claudina e Isaura**, e à toda minha família, pelo apoio, incentivo e carinho.

É com grande satisfação que lhes dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por todas as graças realizadas em minha vida.

Aos meus pais Fátima e Sebastião e às minhas avós Claudina e Isaura pelos ensinamentos ao longo de minha vida e pelo forço incondicional para que não me faltasse nada.

Ao meu irmão Alex pela amizade e companheirismo ao longo de toda minha vida.

Ao Prof. Dr. José Anchieta pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo, oportunidade de crescimento profissional e pessoal, além da amizade.

Ao Dr. Kelber Miranda por sua co-orientação e contribuição durante todo o desenvolvimento das atividades de mestrado, além da paciência, incentivo e amizade.

Aos meus amigos os quais considero minha segunda família, Felipe, Carol, Marcos, Luciana, Tiago, Juliana, Ariane, Mário, Carla, Jaqueline, Ana e Alex, que conheci ao dar início a essa etapa. Muito obrigado por todo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos de república Rodrigo e Diego, pela ajuda e amizade desde a época da graduação.

Ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” e ao Grupo de Espectroanalítica e Automação pela possibilidade de execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e o Grupo de Análise Instrumental Aplicada pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alex Vigilio pela ajuda nas análises por ICP OES e ICP-MS.

Às pessoas que sempre me incentivaram e conseguiram me ajudar diretamente e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Obrigado a todos!

***“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original”***

Albert Einstein

RESUMO

Estabelecer procedimentos simples, rápidos, eficientes e com preparo de amostras de baixo custo para determinar elementos em amostras de carne é um aspecto relevante para fins nutricionais e de saúde. Por esta razão, um sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS), foi avaliado recentemente para a decomposição de amostras “in natura” de músculo, fígado e rim (bovino, suíno e frango) visando a determinação de macronutrientes (Ca, Mg, Na, K, S e P), micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn) e contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr e Pb) por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O aperfeiçoamento feito no CHDS foi planejado para melhorar a segurança, a praticidade e a robustez do sistema. Entre elas destaca-se a adaptação de um pistão a gás na tampa do gabinete de digestão; isolamento dos frascos no interior do gabinete de digestão; tampa de Teflon com sistema simples de alívio de pressão ao fim da decomposição sem manuseio do frasco. A precisão foi avaliada analisando três materiais de referência certificados digeridos pelo CHDS. As recuperações para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K, S, P e Zn determinados por ICP OES, variaram entre 85 a 106%. Para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se determinados por ICP-MS, foram obtidas recuperações entre 92 a 110%. A eficiência da digestão também foi avaliada pela determinação do teor de carbono residual, que variou de 10 a 12% m m⁻¹. Quando as amostras de carne foram digeridas usando o CHDS, os resultados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K, S, P e Zn determinados por ICP OES e para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se determinados por ICP-MS foram concordantes com aqueles obtidos após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado (MW-AD). Ao utilizar o CHDS, os limites de quantificação foram similares aos obtidos com a MW-AD para todos os analitos. O CHDS é capaz de digerir 800 mg de amostra de carne “in natura” utilizando 2 mL de HNO₃ e 1 mL H₂O₂. O procedimento proposto foi capaz de atender a Instrução Normativa da Secretária de Defesa Agropecuária (SDA) nº 13 que trata do monitoramento de resíduos e contaminantes em carnes para As, Cd e Pb. Os resultados obtidos neste estudo estendem as aplicações do CHDS para amostras com maior teor de gordura, tais como músculo, fígado e rim. Este sistema de digestão simples e de baixo custo pode ser utilizado para preparar amostras para determinação subsequente de um grande número de elementos por espectrometria de ICP, incluindo espécies voláteis, tais como, As, Cd e Se.

Palavras-chave: Aquecimento condutivo em frasco fechado. CHDS. ICP OES. ICP-MS. Carne.

ABSTRACT

Establishing simple, fast, efficient and low-cost sample preparation procedures to determine elements in meat samples is a relevant aspect for nutritional and health purposes. For this reason, the recently proposed closed-vessel conductively-heated digestion system (CHDS) was evaluated for the decomposition of muscle, liver and kidney (cattle, pigs and chickens) samples fresh aiming for the determination of macronutrients (Ca, Mg, Na, K, S and P), micronutrients (Cu, Fe, Mn, Mo, Se and Zn) and inorganic contaminants (As, Cd, Cr and Pb) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The optimization of the CHDS was planned to improve safety, practicality and robustness such as adaptation of a gas piston in the digestion cabinet cover, isolation of vessels inside the digestion cabinet and a Teflon cap with a simple pressure relief system in the end of the decomposition without handling the vessel. The accuracy was evaluated by analyzing three certified reference materials digested by the CHDS. Recoveries for Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K, S, P and Zn determinations by ICP OES varied from 85 to 106%. For As, Cd, Cr, Mo, Pb and Se determinations by ICP-MS, recoveries within the 92-110% were obtained. The digestion efficiency was also evaluated by determining the residual carbon content, which varied from 10 to 12% m m⁻¹. When fresh meat samples were digested using the CHDS, results for Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K, S, P and Zn determinations by ICP OES and for As, Cd, Cr, Mo, Pb and Se determinations by ICP-MS were in agreement with those obtained after closed-vessel microwave-acid digestion (MW-AD). When using the CHDS, limits of quantification were similar to those obtained with the MW-AD for all analytes. The CHDS enabled the digestion of 800 mg of fresh meat with 2 mL of HNO₃ and 1 ml of H₂O₂. The proposed procedure was able to attend the normative instruction of agricultural defense secretary SDA N°. 13 for As, Cd and Pb. The results obtained in this study extend the applications of the CHDS to samples with higher contents of fat such as muscle, liver and kidney. This simple and low-cost digestion system can be used to prepare samples for subsequent determination of a large number of elements by ICP spectrometry, including volatile species such as As, Cd and Se.

Keywords: Closed-vessel conductively heated. CHDS. ICP OES. ICP-MS. Meat.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Transição de um elétron entre camadas eletrônicas. (a) elétron absorvendo energia e saltando de um estado de menor energia para um estado de maior energia. (b) elétron retornando para um estado de menor energia emitindo radiação eletromagnética.....**24**
- Figura 2** - Representação esquemática de um equipamento de ICP OES.....**26**
- Figura 3** - Processos físicos que o aerossol sofre ao ser introduzido ao plasma.....**28**
- Figura 4** - Diferentes formas de observação do plasma. (a) observação axial e radial; (b) radial; (c) axial.....**29**
- Figura 5** - Nebulizadores pneumáticos: (a) modelo de Meinhard e (b) fluxo cruzado.**30**
- Figura 6** - Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS.....**31**
- Figura 7.** Ilustração esquemática da remoção da interferência causada pelo $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ na quantificação de ^{80}Se em um ICP-MS/MS.**33**
- Figura 8** - Ilustração do sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado juntamente com o frasco de vidro borossilicato e componentes para fechamento.**43**
- Figura 9** - Ilustração do CHDS juntamente com os frascos de quartzo e componentes para o fechamento. (a) tampa de teflon; (b) trava inferior; (c) trava superior; (d) pino de teflon; (e) tampa de baquelite.....**45**
- Figura 10** - Ilustração do CHDS; (a) gabinete de digestão fechado, (b) aberto e (c) vista interna do gabinete de digestão.**53**
- Figura 11** - Frasco de digestão de quartzo (a) e componentes utilizados (b) para a vedação do mesmo.....**55**

Figura 12 - Etapas do procedimento para vedação do frasco de digestão. (a) Tampa de Teflon com parede interna de 1,0 mm; (b) Expansão da parede da tampa de Teflon; (c) Introdução da tampa de Teflon no frasco de quartzo; (d) Pressão produzida pelos gases durante a digestão.....	56
Figura 13 - Sistema de alívio de pressão. (a) Válvula de escape fechada; (b) ferramenta para abertura da válvula; (c) Abertura da válvula com ferramenta.....	57
Figura 14 - Placa de proteção de acrílico com orifícios para introdução da ferramenta de alívio de pressão.....	58
Figura 15 - Ilustração do alívio de pressão do frasco de digestão.....	58
Figura 16 - Amostras processadas com um processador de alimentos.....	59
Figura 17 - Ilustração: (a) gradiente de temperatura ao longo do frasco de digestão após o bloco digestor permanecer por 15 min em 220 °C; (b) reações envolvidas na regeneração do ácido HNO ₃	60
Figura 18 - Concentrações de carbono nos digeridos (<i>n</i> = 3) dos materiais de referência certificados e amostras obtidas com CHDS	64
Figura 19 - Correlação entre os valores obtidos pela MW-AD e os valores obtidos pelo CHDS para (■) Fe, (●) Cu, (▲) Mn, (◆) Zn, (◀) Ca, (▲) K, (■) Mg, (◆) Na, (●) S, (●) P nas amostras analisadas.....	68
Figura 20 - Correlação entre os valores obtidos pela MW-AD e os valores obtidos pelo CHDS para (■) As, (●) Cd, (▲) Cr, (▲) Mo, (●) Pb e (○) Se nas amostras analisadas.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições operacionais empregadas nas determinações por ICP OES.....	49
Tabela 2 - Condições operacionais empregadas nas determinações por ICP-MS/MS	50
Tabela 3 - Composições ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos frascos utilizados para digestão no sistema de digestão por aquecimento condutivo	55
Tabela 4 - Temperaturas de ebulição calculadas a partir da equação de Clausius-Clapeyron para o ácido nítrico em função da pressão desenvolvida no interior do frasco de reação	61
Tabela 5 - Teores de umidade das amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno).	62
Tabela 6 - Teor de carbono residual nos digeridos ($n = 3$) dos materiais de referência certificados utilizando o CHDS e nas amostras utilizando CHDS e MW-AD	63
Tabela 7 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, K, Mg, Na, P e S (mg kg^{-1}) em materiais de referência certificados digeridos ($n = 3$) com CHDS	65
Tabela 8 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para macronutrientes (mg kg^{-1}) em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.....	66
Tabela 9 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para micronutrientes (mg kg^{-1}) em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.....	67
Tabela 10 - Limites de quantificação (LOQ) obtidos com o CHDS e MW-AD ...	69
Tabela 11 - Resultados do ICP-MS (média \pm desvio padrão) para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se (mg kg^{-1}) nos materiais de referência certificados digeridos ($n = 3$) com CHDS e em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.....	70

Tabela 12 - Limites de quantificação (LOQ) obtidos com CHDS e MW-AD por ICP-MS/MS.....	72
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔH_{vap}	Entalpia de vaporização.
A	Coefficiente angular.
AAS	Do inglês <i>atomic absorption spectrometry</i> , espectrometria de absorção atômica.
B	Intercepto.
CCD	Do inglês <i>charge coupled device</i> , dispositivo de carga acoplada.
CHDS	Do inglês <i>conductively heated digestion system</i> , sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado.
CRM	Do inglês <i>certified reference material</i> , material de referência certificado.
F AAS	Do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i> , espectrometria de absorção atômica em chama.
FKM	Fluoroelastomero.
GF AAS	Do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> , espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.
HPA	Do inglês <i>high pressure asher</i> , sistema de decomposição sob alta pressão.
ICP	Do inglês <i>inductively coupled plasma</i> , plasma indutivamente acoplado.
ICP OES	Do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> , espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.
ICP-MS	Do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> , espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.

LOD	Do inglês <i>limit of detection</i> , limite de detecção.
LOQ	Do inglês <i>limit of quantification</i> , limite de quantificação.
m/m	massa por massa.
m/v	massa por volume.
m/z	razão massa/carga.
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MS	Do inglês <i>mass spectrometry</i> , espectrometria de massas.
MW-AD	Do inglês <i>microwave-acid digestion</i> , digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.
ORS³	Do inglês <i>octopole reaction system</i> , sistema de reação com octapolo.
PFA	Do inglês <i>perfluoroalkoxi</i> , perfluoralcóxido.
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.
PTFE	Do inglês <i>polytetrafluoroethylene</i> , politetrafluoretileno.
r	Coefficiente de correlação linear.
RCC	Do inglês <i>residual carbon content</i> , teor de carbono residual.
RF	bobina de radiofrequência.
RPM	Rotação por minuto.
SD	Do inglês <i>standard deviation</i> , desvio padrão.
v/v	volume por volume.
XRF	Do inglês <i>X-ray fluorescence</i> , fluorescência de raio-X.
λ	Comprimento de onda.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Técnicas espectroanalíticas	23
2.1.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	23
2.1.1.1. Plasma.....	26
2.1.1.2. Tocha.....	28
2.1.1.3. Sistema de introdução de amostra.....	29
2.1.2. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado	31
2.2. Preparo de amostras	33
2.2.1. Decomposição por via seca em forno mufla.....	33
2.2.2. Decomposição por via úmida	35
2.2.2.1. Aquecimento assistido por micro-ondas	36
2.2.2.1.1. Forno micro-ondas com radiação focalizada	37
2.2.2.1.2. Forno micro-ondas com frasco fechado.....	38
2.2.2.2. Aquecimento condutivo com frasco aberto	39
2.2.2.2.1. Sistema de digestão “ <i>cold finger</i> ”.....	40
2.2.2.3. Aquecimento condutivo com frasco fechado.....	41
2.2.2.3.1. Sistema de decomposição com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS).....	43
3. Objetivos	47
4. Materiais e métodos	48
4.1. Amostras, reagentes e soluções analíticas	48
4.2. Instrumentação	49

4.3. Preparo das amostras	51
4.3.1. Determinação dos teores de umidade nas amostras	51
4.3.2. Digestão com o CHDS	51
4.3.3. Digestão assistida por radiação micro-ondas.....	52
5. Resultados e discussão	53
5.1. Inovações introduzidas no CHDS	53
5.1.1. Frascos de digestão de quartzo	54
5.1.2. Sistema de vedação dos frascos de quartzo.....	56
5.1.3. Sistema de alívio de pressão para abertura dos frascos	56
5.2. Processamento das amostras	58
5.3. Gradiente de temperatura no frasco de digestão	59
5.4. Temperatura de ebulição do ácido nítrico em função da pressão	61
5.5. Teores de umidade nas amostras	62
5.6. Teor de carbono residual	62
5.7. Determinação de macronutrientes e micronutrientes por ICP OES ...	64
5.7.1. Materiais de referência certificados.....	64
5.7.2. Amostras de músculo, fígado e rim.....	66
5.7.3. Limite de quantificação.....	68
5.8. Determinação de As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se em materiais de referência certificados e amostras por ICP MS/MS	69
5.8.1. Limite de quantificação.....	72
5.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

6. Conclusões..... 74

Referências..... 75

1. INTRODUÇÃO

A carne é um alimento importante à nutrição humana por ser fonte de proteínas, vitaminas A e B12 e elementos químicos essenciais tais como, ferro e selênio (BIESALSKI, 2005). A carne contém aproximadamente 75% (m/m) em água (com variação de 65 a 80%) e sua composição depende da espécie animal, raça, sexo, maturidade, regime alimentar, dentre outros. As proteínas representam 19% (m/m) com variação de 16 a 22% e é um dos componentes mais importantes no aspecto nutricional. O teor de carboidratos é baixo, variando de 0,5 a 1,3% (m/m). Além disso, as carnes possuem vários compostos inorgânicos que totalizam 1% (m/m) (ZENEON, 2008).

De toda produção do Brasil, 25% são destinados à exportação, o restante é consumido no mercado interno. Em 2013, o consumo *per capita* de carnes aumentou em relação ao ano anterior chegando a 37,4 kg de carne bovina; 43,9 kg de carne de aves e 14,1 kg de carne suína. A participação do Brasil no comércio internacional de carne bovina, suína, de aves e equina vem crescendo a cada ano. Estimativas feitas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicam que a produção nacional de carnes suprirá cerca de 44,5% do mercado mundial até 2020 (BRASIL, 2015a). Deste modo, as exigências para que o país acesse os mercados externos, especialmente o da União Européia, aumentam a cada ano.

Dentre os problemas enfrentados pela indústria de carnes, um dos mais relevantes é a potencial presença de resíduos e contaminantes nos tecidos dos animais (SOFOS, 2008). Em 1961, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) estabeleceram o Codex Alimentarius para elaborar a legislação alimentar internacional.

Em 2006, a Comissão Européia estabeleceu as concentrações máximas permitidas de Cd, Hg, Pb e Sn através da legislação 1883/2006 (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). Segundo esta legislação, as concentrações máximas permitidas de contaminantes inorgânicos em carnes são de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em músculo (bovino, suíno, ovino e de aves), 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em fígado (bovino, suíno, ovino e de aves) e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em rim (bovino, suíno, ovino, equino e de aves) para Cd; 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em músculo (bovino, suíno, ovino e aves), 500 μg

kg⁻¹ em fígado e rim (bovino, suíno, ovino e de aves) para Pb. Essa legislação é mais restritiva quando comparada a de 2001 (nº 466/2001).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC/Animal) foi implementado pelo MAPA com o objetivo de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal. As diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam na Instrução Normativa SDA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999). Os procedimentos executados no âmbito do PNCRC/Animal são compostos pela amostragem homogênea e aleatória das diversas espécies monitoradas, bem como de análises laboratoriais por meio das quais são feitos os controles de contaminantes orgânicos e inorgânicos. Em 2015, foi publicada a Instrução Normativa SDA Nº 13, que atualizou o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de origem animal (BRASIL, 2015b). Segundo esta Instrução Normativa, as concentrações máximas permitidas de contaminantes inorgânicos em carnes são de 1000 µg kg⁻¹ (fígado de aves e avestruz, rim de bovinos, suínos, caprinos e ovinos) para As; 1000 µg kg⁻¹ (rim de bovinos, suínos, caprinos e ovinos), 500 µg kg⁻¹ (fígado de aves e avestruz) e 200 µg kg⁻¹ (músculo de equino) para Cd e 500 µg kg⁻¹ (rim de bovinos, equinos, suínos, caprinos, ovinos e fígado de aves e avestruz) para Pb.

O preparo de amostras de carne para análise elementar por espectrometria atômica constitui um problema analítico relevante, pois normalmente requer a conversão prévia do material orgânico sólido em solução (GOUVEIA et al., 2001; GONZALEZ et al., 2009; KRUG, 2010; BRESSY et al., 2013). Entre as diversas formas empregadas para tal conversão, as mais comuns são decomposição por via seca (com forno tipo mufla), decomposição por via úmida em frasco aberto e decomposição por via úmida em frasco fechado. Todavia, devido aos problemas relacionados às perdas de elementos voláteis (e.g. As, Cd e Pb), procedimentos de decomposição por via úmida em frasco fechado são preferencialmente utilizados (TSCHÖPEL et al., 1980; BURGUERA; BURGUERA, 1998; KRUG, 2010).

Atualmente, a tecnologia de digestão assistida por micro-ondas em frasco fechado é reconhecida como uma das melhores alternativas para decomposição de carnes visando determinações elementares. Contudo, o forno de micro-ondas possui alto custo de aquisição e manutenção, e menor frequência analítica se comparado ao sistema aberto de digestão em blocos digestores (MIRANDA, PEREIRA FILHO;

GOMES NETO, 2014). Nesse contexto, o novo sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS), já validado recentemente para amostras de plantas (MIRANDA, PEREIRA FILHO; GOMES NETO, 2014; MIRANDA, VIEIRA; GOMES NETO, 2014), leite em pó, chocolate em pó e café solúvel (MIRANDA et al., 2015), pode ser muito útil em análises de rotina para a decomposição de carnes. As principais vantagens desta proposta são o baixo custo de aquisição e de manutenção, a simplicidade operacional, a alta frequência analítica e a facilidade de manutenção corretiva por se empregar componentes facilmente encontrados no mercado nacional. Ainda, os componentes voláteis da amostra não são perdidos durante o aquecimento e a atmosfera do laboratório não é contaminada por vapores ácidos (MIRANDA; PEREIRA FILHO; GOMES NETO, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para análises dos constituintes inorgânicos em amostras de alimentos, técnicas como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) são as mais utilizadas (KORN et al., 2008). Contudo, a escolha do método de análise necessariamente depende do problema analítico a ser solucionado. Frequentemente, as principais técnicas espectroanalíticas necessitam que a amostra esteja na forma de uma solução homogênea, sendo necessário o preparo da mesma para posterior determinação dos analitos (KRUG, 2010).

O preparo de amostra é considerado o “Calcanhar de Aquiles” para quantificação de elementos traços por ser uma etapa sujeita a perdas de analitos, contaminação e decomposição incompleta da amostra (FLORES et al., 2007; ROCHA et al., 2013). Sendo assim, este capítulo será destinado a uma revisão bibliográfica das principais técnicas espectroanalíticas utilizadas para a determinação de macronutrientes, micronutrientes e elementos traços e os principais procedimentos empregados para a decomposição de amostras de carne.

2.1. Técnicas espectroanalíticas

As técnicas espectroanalíticas mais utilizadas para a determinação de macronutrientes, micronutrientes e elementos traços podem utilizar diferentes princípios físicos, tais como, absorção atômica (GF AAS e F AAS), emissão óptica (ICP OES) e espectrometria de massas (ICP-MS). Tendo em vista as características de técnicas multielementares com alta sensibilidade, será dada ênfase às técnicas de ICP OES e ICP-MS.

2.1.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

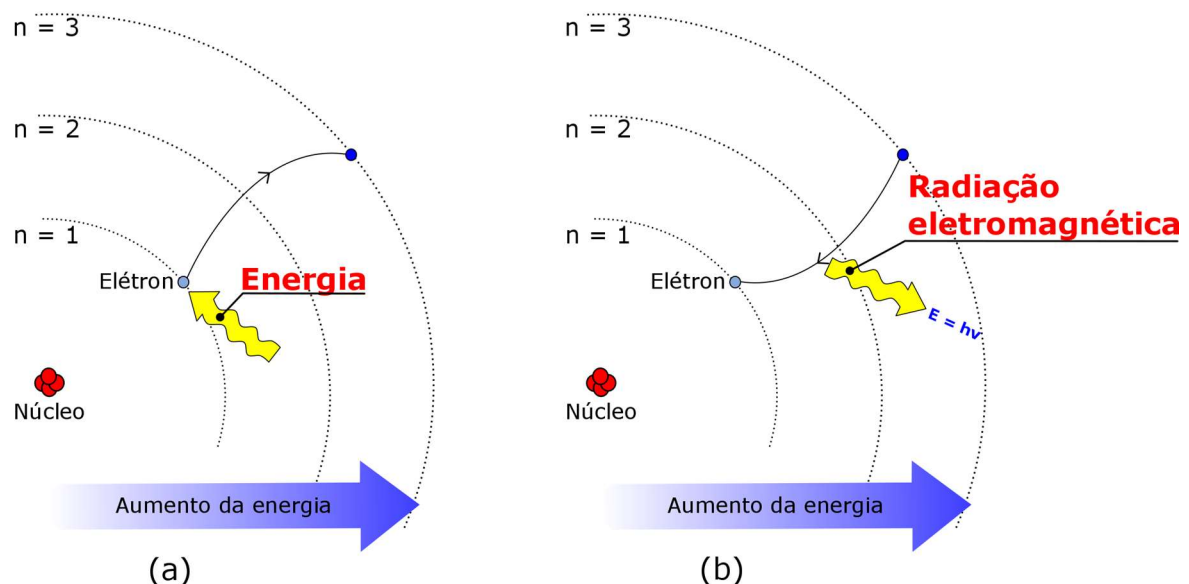
Na década de 1859, o físico Gustav Robert Kirchhoff (1824-1887) observou que os elementos químicos podem absorver radiação eletromagnética (luz) que eles mesmos emitem. Subsequentemente, Kirchhoff, juntamente com o químico Robert

Bunsen (1811-1899) elaboraram a espectroscopia analítica moderna (MOORE, 1989).

Os primeiros espectrômetros de emissão atômica com possibilidade de quantificação de alguns metais foram construídos na década de 1920. Contudo, não houve grande difusão da espectrometria de emissão atômica nos 40 anos seguintes, e com o surgimento de espectrômetros de absorção atômica desenvolvido por Alan Walsh (1955), aumentou ainda mais este declínio. Em meados da década de 60, surgiu o plasma com acoplamento indutivo (ICP) como fonte de excitação, o que possibilitou a difusão da espectrometria de emissão óptica. (MOORE, 1989).

A espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tem como princípio fornecer energia a um elétron de um átomo, promovendo-o do estado de menor energia para um estado de maior energia, quando este elétron retorna para o estado de menor energia o átomo emite a radiação eletromagnética característica como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Transição de um elétron entre camadas eletrônicas (a) elétron absorvendo energia e saltando de um estado de menor energia para um estado de maior energia. (b) elétron retornando para um estado de menor energia emitindo radiação eletromagnética.



Fonte: Autor, 2015.

A radiação emitida depende da diferença de energia entre o estado excitado e o estado inicial, como está representado na Equação 1. A frequência ν pode ser substituída pela velocidade da luz dividida pelo comprimento de onda, desta forma

fica evidente que a energia liberada é inversamente proporcional ao comprimento de onda, como é exibido na Equação 2. Cada elemento possui uma configuração eletrônica diferente dos demais, conseqüentemente, o espectro de emissão de cada elemento é único (MOORE, 1989).

$$E_2 - E_1 = h\nu \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo **h** a constante de Planck e **ν** a frequência.

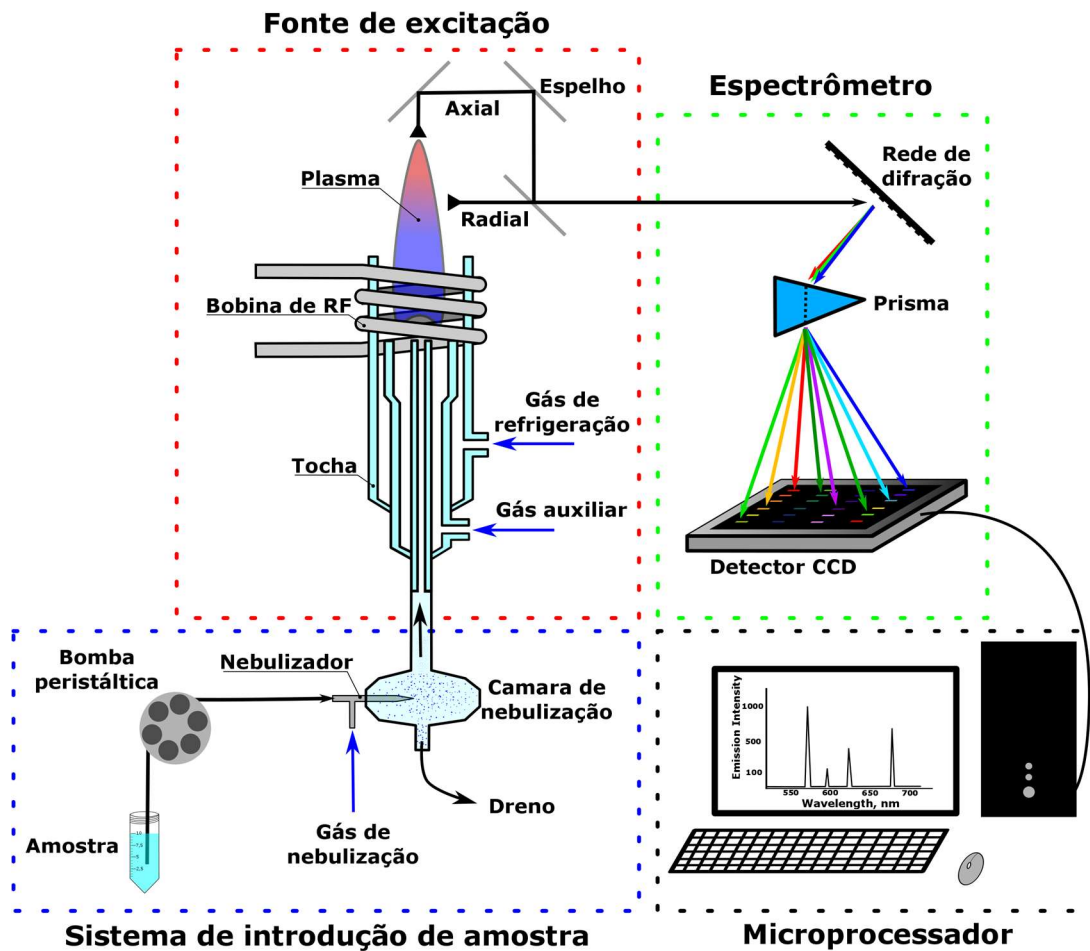
$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad \text{(Equação 2)}$$

Sendo **λ** o comprimento de onda e **c** a velocidade da luz.

A radiação eletromagnética emitida por um átomo ou íon pode ser facilmente detectada entre a região do ultravioleta até o infravermelho próximo (185 a 850 nm) (NAKAHARA, 1997). Contudo vale lembrar que comprimentos de ondas inferiores a 200 nm são absorvidos por moléculas de oxigênio e inferiores a 160 nm são absorvidos pelo quartzo. Os átomos também podem emitir radiação eletromagnética com comprimentos de onda superiores a 900 nm, porém com menor intensidade (MOORE, 1989).

Um espectrômetro de emissão óptica geralmente é composto por um sistema de introdução de amostras, fonte de atomização e excitação dos átomos, espectrômetro e um microprocessador (MOORE, 1989). Um esquema dos principais componentes de um ICP OES está exposto na Figura 2.

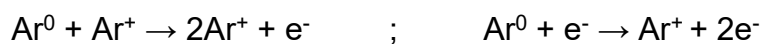
Figura 2 - Representação esquemática de um equipamento de ICP OES.



Fonte: Autor, 2015.

2.1.1.1. Plasma

O plasma é um gás parcialmente ionizado com equilíbrio de cargas negativas e positivas, sendo considerado macroscopicamente neutro. O plasma é iniciado por uma bobina de Tesla, a qual gera uma centelha carregada de elétrons capaz de ionizar alguns átomos de argônio. A bobina de radiofrequência (RF) acelera os íons e elétrons através de um campo eletromagnético alternado, que pode variar de 27,12 a 40,68 MHz (HILL, 2007). Este campo eletromagnético gera reações em cascata, tendo como produto principal a formação do íon Ar^+ , que mantém o plasma aceso. As reações de colisão estão representadas a seguir.

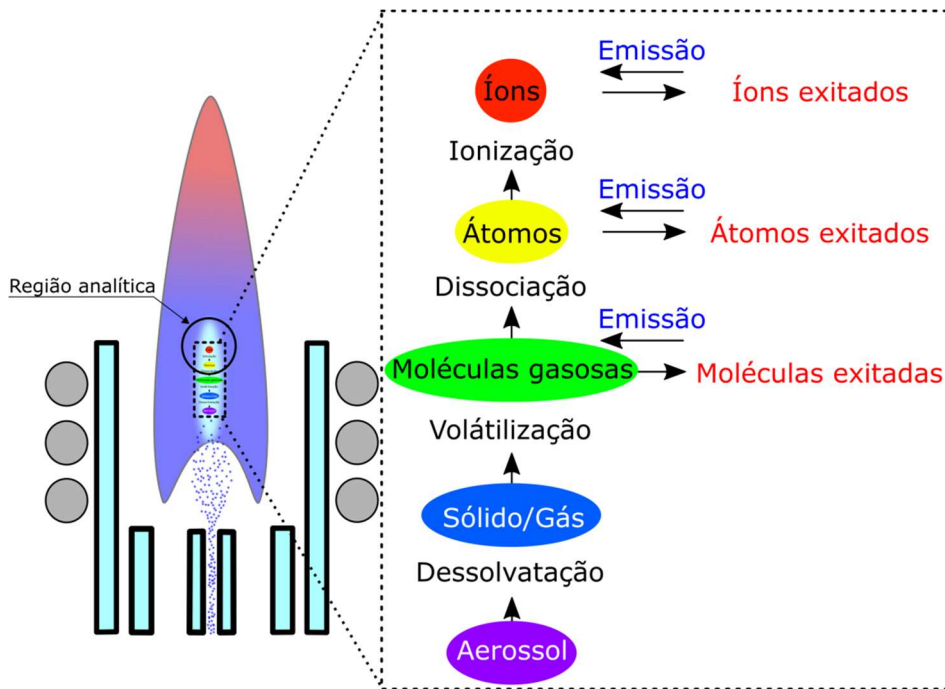


Os choques entre as espécies (e^- , Ar^0 e Ar^+) converte a energia da bobina de radiofrequência em energia cinética para o plasma, com possibilidade de atingir temperaturas entre 6.000 a 10.000 K. A alta temperatura do plasma é capaz de fazer a vaporização, dissociação, atomização e ionização, promovendo a excitação dos constituintes da amostra (MOORE, 1989; NAKAHARA, 1997). Uma representação esquemática dos processos que ocorrem no plasma após a introdução do aerossol da amostra está exposta na Figura 3. A região analítica é a aquela onde ocorre a emissão atômica e iônica.

O plasma de argônio apresenta um fundo contínuo, constituído por emissão de várias espécies. A radiação de fundo do plasma tem três principais causas: primeiramente pela emissão do íon argônio ($Ar^+ + e^- \rightarrow Ar + hv$); segundo, por emissão de espécies atômicas e moleculares presentes na matriz; e terceiro, a emissão causada pela frenagem e mudança de direção dos elétrons pelo campo elétrico alternado, conhecido como “*bremsstrahlung*” (GINÉ, 1998). Mesmo com a alta temperatura do plasma, pode ocorrer emissão de moléculas, tais como, N_2 , N_2^+ , OH, C_2 , entre outras. Portanto, o plasma emite um fundo espectral contínuo, que inicia no baixo visível e se estende até a região do ultravioleta (NAKAHARA, 1997).

Para quantificação dos elementos químicos é necessário um espectrômetro para coletar as emissões atômicas e iônicas da região analítica do plasma. O espectrômetro faz a separação espacial dos comprimentos de onda do feixe de radiação sobre um detector (NAKAHARA, 1997; GINÉ, 1998). Um dos espectrômetros mais utilizados são os espectrômetros Echelle (GINÉ, 1998). O espectrômetro Echelle foi descrito por Harrison em 1949 (MOORE, 1989). Neste espectrômetro, o feixe de radiação passa por uma rede de difração e na sequência por um prisma, separando os comprimentos de onda em uma região bidimensional sobre um detector. Um dos detectores mais utilizados é o de estado sólido CCD (*Charge Coupled Device*). Este detector contém uma área bidimensional, com vários *pixels* (e.g. 300 x 500 *pixels*), em que cada pixel envia um sinal correspondente a um dado comprimento de onda para um microprocessador. Este arranjo permite monitorar de 200 a 900 nm simultaneamente (NAKAHARA, 1997; GINÉ, 1998). Uma representação esquemática de um espectrômetro e de um microprocessador está exposta na Figura 2.

Figura 3 - Processos físicos que o aerossol sofre ao ser introduzido ao plasma.



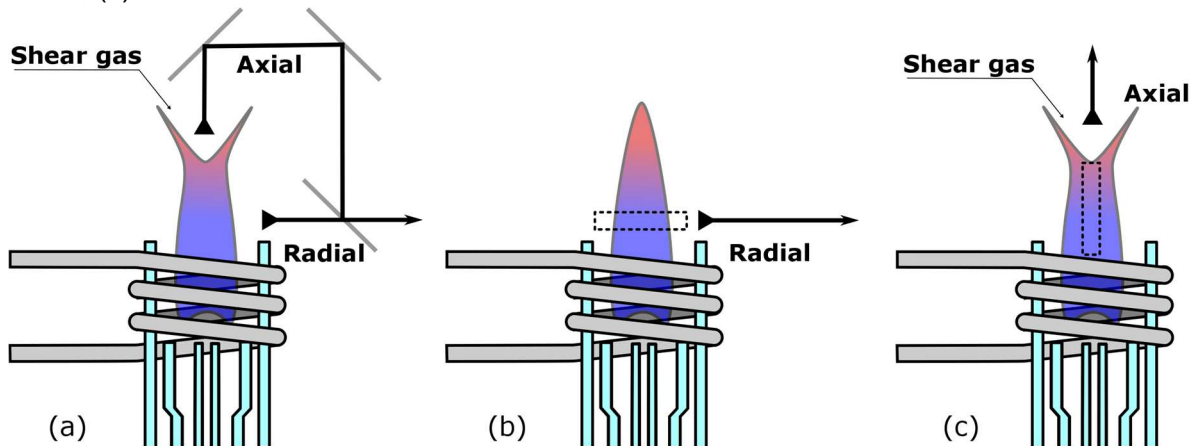
Fonte: Autor, 2015.

2.1.1.2. Tocha

Nos tempos atuais, existem basicamente dois tipos básicos de tochas para ICPs, sendo estes modelos de Greenfield e Fassel. Uma representação esquemática de uma tocha está exposta na Figura 4. As tochas para formação do plasma são confeccionadas por três tubos concêntricos de quartzo. O tubo externo contém o maior fluxo de argônio entre os demais, e é conhecido como gás de refrigeração. O tubo do meio tem um fluxo de gás conhecido como auxiliar ou intermediário. O tubo central tem um fluxo de gás conhecido como gás de nebulização ou gás injetor (HILL, 2007).

A zona analítica no plasma pode ser observada por dois modos, que são visão axial e visão radial (Figura 4b e Figura 4c). Os primeiros equipamentos continham apenas visão radial, sendo os equipamentos fabricados posteriormente com visão axial. A visão axial permite a observação da região central do plasma, contudo necessita de um gás de corte (shear gas) que remove a parte mais fria do plasma. No mercado existem equipamentos que possuem tanto visão axial quanto radial, chamados de “Dual View” (HILL, 2007) (Figura 4a).

Figura 4 - Diferentes formas de observação do plasma. (a) observação axial e radial; (b) radial; (c) axial.



Fonte: Autor, 2015.

A configuração axial é a mais sensível que a radial, cerca de 5 a 10 vezes. A maior sensibilidade é devido ao maior caminho óptico observado no plasma, o que acarreta em maior intensidade de emissão, permitindo a obtenção de menores limites de detecção. Entretanto, essa configuração está mais sujeita à interferência de matriz. A visão radial tem algumas vantagens, como a possibilidade de variar a altura de observação do plasma, podendo ser ajustada em função da região de menor interferência e/ou maior intensidade de emissão das espécies de interesse (HILL, 2007).

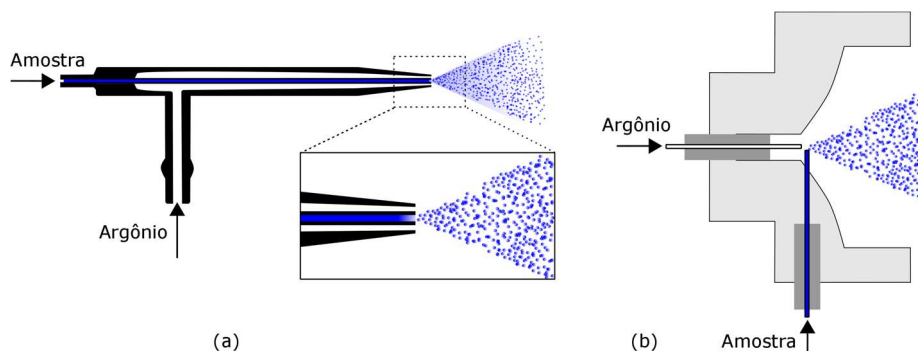
2.1.1.3. Sistema de introdução de amostra

A introdução da amostra é uma etapa primordial para um bom desempenho da análise (MOORE, 1989; GINÉ, 1998). A forma mais comum de introdução de amostra em ICP OES é na forma líquida, sendo a amostra transformada em um aerossol e dirigida ao centro do plasma. O sistema de nebulização é constituído por um nebulizador e uma câmara de nebulização, no qual o nebulizador faz da amostra um aerossol e a câmara de nebulização separa uma pequena fração contendo as gotas menores para serem introduzidas no plasma (GINÉ, 1998). Apenas gotas menores que 10 μm são transportadas com eficiência até o plasma (HILL, 2007), as gotas maiores são condensadas na câmara de nebulização e descartadas por um dreno. Os principais modelos de nebulizador são o pneumático e o ultrassônico (MOORE, 1989).

O nebulizador ultrassônico é constituído por um transdutor piezoelétrico que vibra a uma frequência de 1 a 10 MHz. Este nebulizador pode apresentar eficiência de até 20% e fornecer sensibilidade até quatro vezes maior comparado ao nebulizador pneumático. Contudo, o excesso de água do aerossol pode extinguir o plasma, o que torna necessário o uso de um sistema de dessolvatação do aerossol. Esse aparato resfria o aerossol, condensando o excesso de água antes da introdução ao plasma. Entretanto, apesar do aumento de sensibilidade, este sistema apresenta um problema relacionado com o efeito memória (MOORE, 1989; HILL, 2007).

Os nebulizadores pneumáticos podem existir de várias formas, sendo o nebulizador concêntrico de Meinhard (Figura 5a) a mais comum. Este nebulizador utiliza geralmente um fluxo de argônio de 0,5 a 1,5 L min⁻¹. O fluxo de argônio ao sair na ponta do nebulizador se expande rapidamente e cria à frente do capilar central uma zona de baixa pressão, capaz de aspirar a amostra sem o uso de bomba peristáltica. Este princípio é conhecido como efeito Venturi. Uma desvantagem deste nebulizador está relacionada ao entupimento devido ao teor de sólidos dissolvidos superior a 0,25% m/v. Para amostras com maior teor de sólidos dissolvidos é indicado o uso de nebulizadores de fluxo cruzado (cross flow) (Figura 5b). Nebulizadores pneumáticos geralmente apresentam eficiência de até 2% (HILL, 2007).

Figura 5 - Nebulizadores pneumáticos: (a) modelo de Meinhard e (b) fluxo cruzado.



Fonte: Autor, 2015.

Para maior precisão das medidas, uma bomba peristáltica é utilizada para conduzir a amostra até o nebulizador. Melhores resultados são obtidos com o uso de

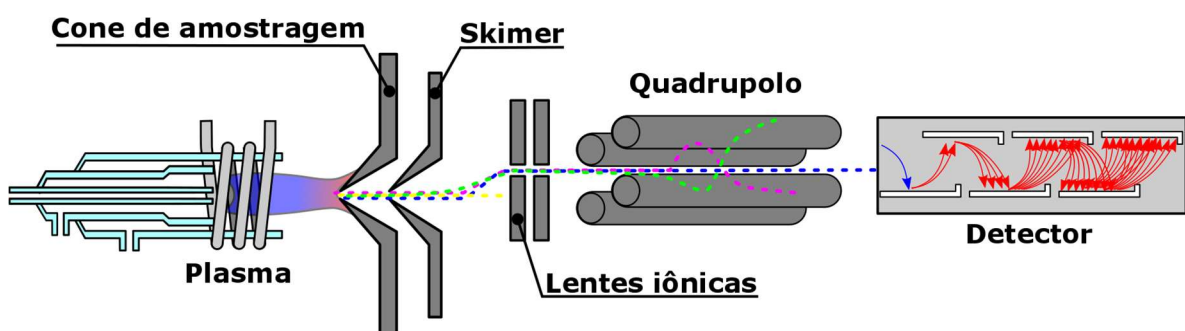
bomba peristáltica, principalmente para introdução de amostras com viscosidade e/ou densidade diferentes (GINÉ, 1998).

Como no caso dos nebulizadores, também existem vários modelos de câmara de nebulização, sendo as mais comuns, a câmara de nebulização de duplo passo e a câmara de nebulização ciclônica (HILL, 2007). A câmara de nebulização pode ser avaliada pela capacidade de separação do aerossol, homogeneidade e tamanho das gotículas selecionadas, facilidade de limpeza (efeito de memória), e estabilidade à pressão e temperatura. Quanto maior o nebulizador, maior é o volume morto, o que contribui para um maior tempo de lavagem (GINÉ, 1998).

2.1.2. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

Na década de 1980, Houk et al., (1980) demonstraram as vantagens de utilizar o plasma indutivamente acoplado (ICP) como fonte de íons para a espectrometria de massas (MS). As principais vantagens são: obtenção de espectro mais simples, menos interferências entre elementos, e alta sensibilidade frente ao ICP OES (TAYLOR, 2001). Geralmente os principais constituintes de um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS.



Fonte: Autor, 2015.

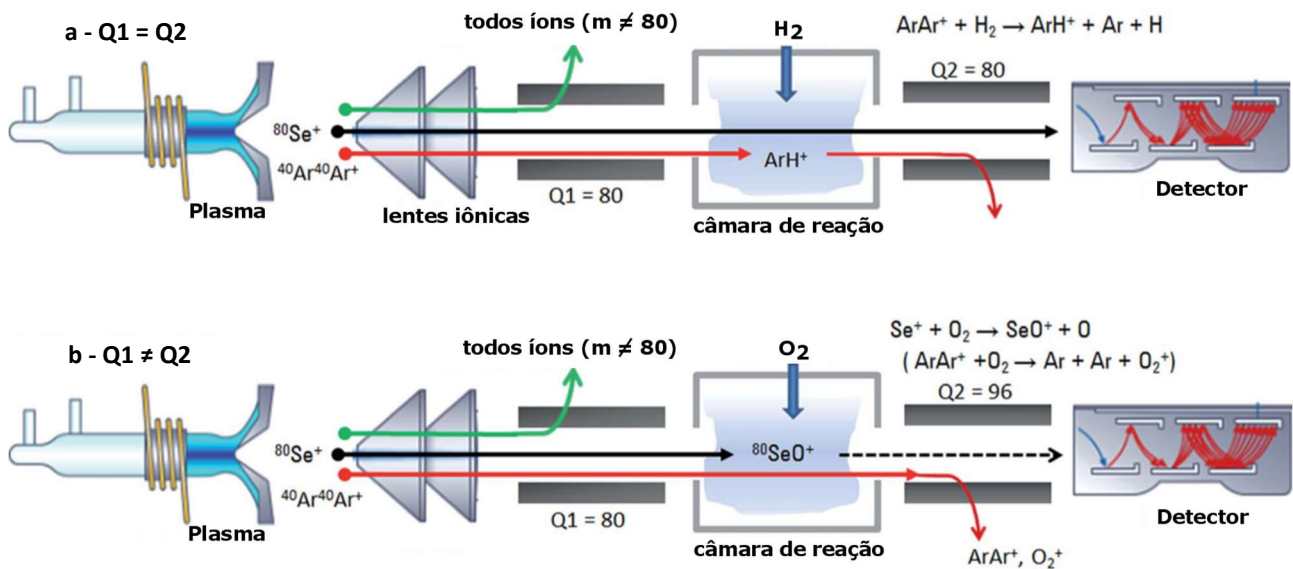
O ICP-MS tem tanto o plasma quanto o sistema de introdução de amostras similares ao ICP OES. Desta forma, a amostra geralmente é introduzida na forma de uma solução homogênea, propulsionada por uma bomba peristáltica até o nebulizador, sendo as menores gotas formadas selecionadas pela câmara de nebulização para serem introduzidas no plasma. Ao chegar ao plasma, a amostra

sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização, para que os íons sejam separados pela razão massa/carga (m/z) através de um quadrupolo (GINÉ, 1998; TAYLOR, 2001).

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado evoluiu consideravelmente na década 90, destacando-se como uma técnica capaz de quantificar quase todos os elementos da tabela periódica, incluindo os elementos refratários. Esta técnica ainda conta com grande sensibilidade e alta frequência analítica, tornando-se uma ferramenta bastante útil para a quantificação de elementos traços (TAYLOR, 2001). Contudo, a principal desvantagem para a quantificação de elementos traços em ICP-MS são as possíveis interferências de sobreposição espectrais causadas por íons com mesma razão massa/carga do analito a ser quantificado. Com a finalidade de contornar as interferências espectrais e aumentar a potencialidade desta técnica, foi proposto recentemente um espectrômetro com dois separadores de massas (ICP-MS/MS). Este equipamento é disposto com um sistema de reação octopolo (ORS³) entre os dois analisadores quadrupolo, permitindo que os íons sejam pré-selecionados pela razão massa/carga antes da câmara de reação, resultando em melhor controle no processo de colisão e reação (AMAIIS et al., 2015; MIRANDA et al., 2015; SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015). Um exemplo de como é contornada a interferência espectral causada pelo íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ durante a quantificação de $^{80}\text{Se}^+$ por ICP-MS/MS está ilustrado na Figura 7.

Como pode ser visualizado na Figura 7a, os dois quadrupolos selecionam a mesma razão massa/carga ($m/z = 80$), sendo que a espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ passa pelo primeiro quadrupolo (Q1) e ao chegar à câmara de reação, reagindo com H_2 , produzindo ArH^+ que é removido pelo segundo quadrupolo (Q2). Desta forma, apenas a massa/carga 80 proveniente do ^{80}Se atinge o detector. Outra possibilidade para a remoção da interferência $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ está ilustrada na Figura 7b. Neste caso, o primeiro separador de massas (Q1) seleciona a massa/carga 80 para chegar a câmara de reação contendo O_2 . Em seguida, o ^{80}Se reage com O_2 e o segundo separador de massas (Q2) separa a massa/carga 96 proveniente do $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$, removendo a interferência causada pelo argônio. (SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015). Logo, é possível observar grande potencialidade do ICP-MS/MS em remover interferências críticas para quantificação de elementos em baixas concentrações.

Figura 7. Ilustração esquemática da remoção da interferência causada pelo $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ na quantificação de ^{80}Se em um ICP-MS/MS.



Fonte: Adaptado de Sugiyama; Shikamori, 2015.

2.2. Preparo de amostras

As principais técnicas espectroanalíticas geralmente necessitam que a amostra esteja na forma de uma solução, como descrito anteriormente. Assim, há a necessidade de converter a amostra de carne em uma solução homogênea. Portanto, a seguir serão descritos vários métodos de digestão empregados para a decomposição de amostras de carne, tais como, digestão por via seca (forno mufla), digestão por via úmida através de aquecimento por assistido por radiação micro-ondas (forno micro-ondas focalizado e com cavidade) e digestão por via úmida empregando aquecimento condutivo utilizando frasco aberto (bloco digestor, chapa de aquecimento e "cold finger") e utilizando frasco fechado (frasco de PTFE e o CHDS).

2.2.1. Decomposição por via seca em forno mufla

A decomposição com aquecimento condutivo geralmente utiliza como fonte de aquecimento a potência dissipada por corrente elétrica ao passar por uma resistência ($P = i^2 R$). A decomposição por via seca utiliza aquecimento condutivo e baseia-se na oxidação térmica dos constituintes orgânicos da amostra utilizando

forno mufla. Neste método de decomposição geralmente utiliza-se massa de amostra de 0,1 a 1 g e temperatura entre 450 e 550 °C sob pressão atmosférica (HOENIG et al., 1998; KORN et al., 2008; KRUG, 2010; SAHAYAM et al., 2010). São gastas aproximadamente de 8 a 16 horas para obtenção de cinzas claras, sendo estas facilmente dissolvidas em ácido diluído (SMITH; ARSENAULT, 1996; KRUG, 2010).

Demirel et al. (2008) quantificaram Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS e Se e Al por GF AAS em carne bovina e de frango. Neste trabalho os autores fizeram a decomposição por via seca em forno mufla, no qual foi utilizado 1 g de amostra, temperatura máxima entre 450 a 500 °C por 16h, sendo as cinzas obtidas dissolvidas em 1 mL de HNO₃ e avolumadas para 10 mL com água deionizada. Neste trabalho os autores compararam os resultados com os métodos de decomposição por via úmida em bloco aberto e assistido por radiação micro-ondas. Os autores concluem que o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas é preferencialmente utilizado para o preparo de amostra, visto que são obtidos resultados mais precisos. Além de ocorrer perdas de Se por volatilização quando utilizado o método de decomposição por via seca.

Fecher e Ruhnke (2002) determinaram Cd e Pb por GF AAS em amostras de açúcar e material de referência certificado de tecido de ostra. Para a decomposição foram utilizados 3 g de amostra em temperatura de 450 °C por 12h. Neste trabalho foi evidenciado que parte dos elementos (Cd e Pb) são volatilizados, e dependendo da concentração nas amostras, pode ocorrer contaminação cruzada durante o aquecimento.

Szkoda e Mudzki (2005) determinaram Cd e Pb por GF AAS em material de referência certificado de músculo bovino e rim suíno. A decomposição foi feita utilizando 2 g de material de referência certificado e o aquecimento procedeu a 450 °C por "overnight". As cinzas obtidas foram solubilizadas em solução de ácido nítrico (0,2% m/v). Os autores concluíram que foi possível obter recuperação dos analitos entre 95% a 119% para Pb e de 96% a 108% para Cd.

O procedimento de decomposição de amostra por via seca apesar de ser muito simples, requer um longo tempo de aquecimento, está sujeito a contaminações e pode ser incompatível com a determinação de elementos voláteis (FECHER; RUHNKE, 2002; AYDIN, 2008; DEMIREL et al., 2008;

BENDICHO et al., 2012; AKINYELE; SHOKUNBI, 2015; RUIZ-DE-CENZANO et al., 2015).

2.2.2. Decomposição por via úmida

O método de decomposição de amostra por via úmida consiste no aquecimento da amostra em meio de ácido mineral oxidante, sendo HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 os ácidos mais empregados para oxidar a matriz orgânica de amostras biológicas. O volume do(s) reagente(s) dependerá do tipo de matriz, massa da amostra, e da técnica para a quantificação dos analitos. O H_2O_2 pode ser utilizado como agente oxidante auxiliar, aumentando a eficiência da decomposição (KORN et al., 2008; KRUG, 2010). A escolha dos reagentes influencia no sucesso da análise química, pois cada ácido possui características que devem ser consideradas para o procedimento de decomposição e método de análise.

O HNO_3 concentrado (65-69%) possui ponto de ebulição de aproximadamente $120\text{ }^\circ\text{C}$ e é um agente oxidante fraco abaixo de $200\text{ }^\circ\text{C}$ (KORN et al., 2008). Entretanto, este ácido é preferencialmente utilizado, uma vez que pode ser obtido com alta pureza facilmente através de sistemas de destilação abaixo do ponto de ebulição. Além disso, os nitratos formados com os metais de modo geral apresentam alta solubilidade em meio aquoso (KRUG, 2010). Desta forma, o HNO_3 é considerado um dos ácidos mais apropriados para técnicas de espectrometria atômica (HOENIG, 2001).

O H_2SO_4 é um ácido oxidante forte, sendo bastante eficiente para oxidação da matéria orgânica presente na amostra (KRUG, 2010). Contudo, este ácido possui alta viscosidade, o que pode interferir em técnicas que utilizam nebulizadores pneumáticos para introdução de amostras (GOUVEIA et al., 2001). Outro motivo é a baixa solubilidade de alguns sulfatos, como por exemplo, a coprecipitação do chumbo com sulfato de cálcio (HOENIG, 2001).

O HClO_4 apesar de ser um ácido com alto poder de oxidação da matéria orgânica, seu uso individual não é recomendado por questões de segurança ao operador, podendo gerar percloratos instáveis, resultando em explosões (HOENIG, 2001; KRUG, 2010).

As formas de aquecimento mais comuns utilizadas na decomposição por via úmida são o aquecimento assistido por radiação micro-ondas ou através de

aquecimento condutivo (KORN et al., 2008). Portanto, serão discutidos a seguir, os principais procedimentos de decomposição de amostras empregando o aquecimento assistido por radiação micro-ondas e por condução de térmica.

2.2.2.1. Aquecimento assistido por radiação micro-ondas

A radiação micro-ondas é uma radiação eletromagnética que pode existir de 300 a 300000 MHz. Para uso doméstico, industrial e analítico é utilizado à frequência de 2,45 GHz (KRUG, 2010). Assim, a energia da radiação micro-ondas é absorvida por íons e moléculas dipolares presentes na solução, causando migração iônica e rotação de dipolo. No mecanismo de rotação molecular os dipolos alinham e relaxam $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo. No mecanismo de migração iônica, as espécies iônicas são aceleradas em um sentido ou no sentido oposto de acordo com a carga do íon e da polaridade do campo eletromagnético. A fricção entre íons e moléculas devido à resistência ao movimento tem como consequência o aquecimento.

Os frascos de decomposição geralmente são feitos de PFA (perfluoralcói), PTFE ou quartzo (sílica fundida). Esses materiais tem absorvidade às micro-ondas muito reduzida. Desta forma, as micro-ondas aquecem diretamente a solução ácida, diferentemente do aquecimento condutivo, no qual a parede do frasco é aquecida para posterior aquecimento da solução. Assim, o aquecimento assistido por radiação micro-ondas pode ser executado em menos tempo em relação ao aquecimento condutivo (RICHTER; LINK; KINGSTON, 2001; KRUG, 2010).

O preparo de amostra biológica utilizando micro-ondas teve início em 1975 com uso de micro-ondas doméstico para aquecer a solução ácida contendo a amostra. Este procedimento foi realizado em frasco aberto com temperatura máxima restrita ao ponto de ebulição do ácido (SMITH; ARSENAULT, 1996; (RICHTER; LINK; KINGSTON, 2001). O avanço tecnológico permitiu a construção de sofisticados fornos micro-ondas para decomposição de amostras, prezando a segurança e robustez. Atualmente, os principais equipamentos para a digestão de amostras são os fornos micro-ondas com cavidade e os fornos micro-ondas com radiação focalizada. Os fornos micro-ondas com cavidade utilizam frasco fechado com pressão elevada (SMITH; ARSENAULT, 1996). Os fornos com radiação focalizada utilizam frasco aberto sob pressão atmosférica (COSTA et al., 2001,

2009; NÓBREGA et al., 2002) ou frasco fechado sob pressão elevada (NovaWAVE - SCP SCIENCE). Contudo, para este último, ainda não há relatos na literatura.

2.2.2.1.1. Forno micro-ondas com radiação focalizada

Uma grande vantagem dos fornos micro-ondas com radiação focalizada em frascos abertos é a possibilidade de decompor maior quantidade de amostra em relação aos fornos micro-ondas com cavidade, visto que fornos com cavidade utilizam frascos fechados, e a pressão atingida durante a digestão depende da quantidade de amostra (KRUG, 2010). Fornos micro-ondas com radiação focalizada geralmente possuem até 6 posições, operando sob pressão atmosférica. A denominação de “frasco aberto” não está devidamente correta, haja vista que, o frasco é fechado com sistema para coleta dos produtos gasosos liberados durante a decomposição da amostra, resultando em maior segurança ao analista e evita contaminação pelo ar do laboratório (COSTA et al., 2001, 2009). Neste sistema, as micro-ondas produzidas por um magnetron são focalizadas na parte inferior do frasco de decomposição através de um guia de onda com fenda. Além disso, esse sistema é caracterizado por alta eficiência na transferência da energia das micro-ondas para o meio reacional. Porém, à distância do magnetron até o frasco de decomposição pode causar heterogeneidade na distribuição das micro-ondas em diferentes posições do equipamento (COSTA et al., 2001).

Costa et al. (2009) quantificaram As, Cd, Pb, Se e Zn por ICP OES em material de referência certificado de tecido de ostra. Foram utilizados para decomposição 250 mg do material de referência certificado, 2,5 mL de H₂SO₄, 7 mL de HNO₃ e 10 mL de H₂O₂, a temperatura máxima atingida foi de 220 °C, os digeridos foram avolumados para 25 mL com água deionizada. Perdas por volatilização foram observadas para todos os elementos. Os autores relataram ainda a necessidade de utilizar H₂SO₄ para elevar a temperatura da fase líquida. O uso deste ácido pode causar interferência de transporte em equipamentos com nebulização pneumática, sendo necessário o uso de um padrão interno para minimizar essa interferência.

A decomposição com aquecimento assistido por radiação focalizada opera sob pressão atmosférica, necessitando de maiores volumes de reagentes e uso de ácido com ponto de ebulição elevado (p. ex. ácido sulfúrico, ponto de ebulição

330 °C). Por isso, fornos micro-ondas com frascos fechados tem ganhado maior popularidade entre os laboratórios, uma vez que faz uso de menor volume de reagentes, dispensa a utilização de ácido sulfúrico e, além disso, elementos voláteis não são perdidos durante a decomposição (KORN et al., 2008).

2.2.2.1.2. Forno micro-ondas com frasco fechado

O aquecimento assistido por radiação micro-ondas utilizando frasco fechado aquece diretamente a solução ácida, que por sua vez, reduz o tempo de aquecimento e o sistema fechado evita perda de elementos voláteis (AGAZZI; PIROLA, 2000), tornando este método preferencialmente utilizado para o preparo de amostras.

Demirezen e Uruç (2006) quantificaram Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em amostras de peixe, carne e produtos cárneos por ICP OES. As amostras analisadas foram decompostas utilizando uma massa de 500 mg, 10 mL HCl com um programa de aquecimento com duração de 30 minutos. Segundo os autores, as concentrações de Fe em todas as amostras analisadas encontravam-se acima dos valores recomendados.

Tizioto et al. (2014) determinaram Ca e K em amostras de carne bovina e material de referência certificado de músculo bovino e fígado bovino por ICP OES. Para o procedimento de digestão foram utilizados 100 mg de amostra, 2 mL de HNO₃, 2 mL de H₂O₂ e 6 mL de H₂O. O tempo de digestão foi de 50 minutos. As recuperações obtidas em relação aos valores certificados variaram entre 98 a 114%.

Gonzalez et al. (2009) avaliaram a decomposição de 200 mg de amostras de origem animal e vegetal utilizando 2 mL de solução de HNO₃ (2,0, 7,0, 14,0 mol L⁻¹) e 1 mL de H₂O₂. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a solução 7,0 mol L⁻¹ de HNO₃, tendo em vista as melhores recuperações dos analitos com menor quantidade de carbono residual. Desta forma foi possível decompor amostras de tecido animal utilizando ácido nítrico diluído, reduzindo o volume de reagentes.

Bizzi et al. (2014) quantificaram Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn por ICP OES em amostras de gordura animal e fígado bovino e material de referência certificado de fígado bovino. Para as digestões foram utilizados 500 mg de amostras, 6 mL de HNO₃ (2 mol L⁻¹) e 7.5 bar oxigênio pressurizado. Os autores fizeram a avaliação do fluxo de ar de exaustão (60, 125 e 190 m³ h⁻¹) do forno micro-ondas

durante o procedimento de digestão. Os autores concluíram que digestões mais eficientes são obtidas com maior fluxo de exaustão e todos os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados.

A possibilidade de utilizar ácido diluído para a decomposição da amostra é condizente com os princípios da química verde, no qual preza a minimização do uso de reagentes tóxicos (BENDICHO et al., 2012; ROCHA et al., 2013). Outra vantagem é a menor diluição dos digeridos, que por sua vez diminui os limites de quantificação.

É notório que o forno micro-ondas com frasco fechado é uma das melhores opções para o preparo de amostras biológicas. No entanto, este equipamento necessita de vários componentes eletrônicos sofisticados que são responsáveis por agregar alto custo ao produto. Por esse motivo, muitos laboratórios recorrem a métodos clássicos de preparo de amostras, tais como, os sistemas com aquecimento condutivo, devido ao menor custo da instrumentação analítica e de manutenção.

2.2.2.2. Aquecimento condutivo com frasco aberto

O sistema de decomposição em frasco aberto com aquecimento condutivo, geralmente emprega bloco digestor ou chapa de aquecimento sobre pressão atmosférica (KORN et al., 2008). Em sistemas abertos, o HNO_3 geralmente não é empregado sozinho para decomposição da matéria orgânica porque a temperatura da fase líquida fica restrita ao ponto de ebulição do mesmo ($120\text{ }^\circ\text{C}$), sendo necessário o uso de misturas com ácido de ponto de ebulição mais elevado (KRUG, 2010).

Demirel et al. (2008) quantificaram Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS e Se e Al por GF AAS em material de referência certificado de fígado bovino. O procedimento de decomposição da amostra foi feito através da digestão por via úmida com aquecimento em chapa aquecedora. Foi utilizado 1 g de amostra, 6 mL de HNO_3 , 2 mL de H_2O_2 . A digestão foi realizada em temperatura de $130\text{ }^\circ\text{C}$ por 4h e os digeridos foram avolumados para 10 mL com água deionizada. As recuperações foram satisfatórias para todos os elementos, exceto para Se. Os autores justificaram a baixa recuperação deste elemento devido à sua alta volatilidade.

Iwegbue (2008) quantificou Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Pb em amostras de fígado e rim de bovinos por GF AAS. As amostras foram decompostas utilizando 5 g de amostra e 35 mL de uma mistura de HNO₃ e HClO₄ (6:1) em chapa de aquecimento a 135 °C por 2 horas. Os resultados para todas as amostras mostraram-se abaixo dos limites estipulados pela legislação internacional.

Demirbas (1999) avaliou a concentração de Cd, Ca, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, K, Na e Zn em tecidos e carne de frango por GF AAS. As amostras foram digeridas em um bloco digestor utilizando 4 g de amostras e 20 mL de HNO₃, H₂SO₄ e HClO₄ (4:1:1) com 7 horas de aquecimento. O autor concluiu que existe uma grande variação na concentração dos metais em diferentes tecidos de frango.

Wurfels e Jackwerth (1985) avaliaram o carbono residual em amostra de fígado bovino após a decomposição em frasco aberto utilizando apenas HNO₃. Os teores de carbono residual nos digeridos ficaram entre 24 - 32% com resíduos orgânicos não dissolvidos.

A decomposição por via úmida em frasco aberto é uma das técnicas clássicas para o preparo de amostras para análise inorgânica. Este procedimento é considerado mais rápido em relação às técnicas de decomposição por via seca. No entanto, devido a limitação para atingir temperaturas elevadas, algumas amostras com matrizes complexas podem não ser decompostas adequadamente, resultando em alto teor de carbono residual. Concentrações elevadas de carbono podem causar interferências espectrais em ICP OES devido à emissão de moléculas de carbono, tais como, CN e C₂ (YOUNG et al., 2011), principalmente para As e Se em baixas concentrações (KNAPP et al., 1998). Em ICP-MS o carbono em altas concentrações causa a obstrução dos cones de amostragem e depósito sobre nas lentes iônicas, provocando interferência no sinal (NELMS, 2005), além de causar interferências poliatômicas (MAY; WIEDMEYER, 1998)

Para obtenção de melhores decomposições foi desenvolvido um sistema simples utilizando um bloco digestor. Este sistema é chamado de "*cold finger*" e conta com um dispositivo para condensação dos vapores ácidos durante a digestão.

2.2.2.2.1. Sistema de digestão "*cold finger*"

A digestão ácida pode ser feita utilizando um procedimento chamado de "*Cold Finger*", apesar do frasco não ser "aberto" este sistema opera em pressão

atmosférica. Este sistema é constituído por um bloco digestor com um tubo com circulação de água encaixado na parte de superior do frasco de digestão, reduzindo a temperatura e causando a condensação dos vapores ácidos (FERREIRA et al., 2013).

Oreste et al. (2013) quantificaram Cd, Pb e Sn por GF AAS em amostras de carne fresca e carne processada e em materiais de referência certificados de fígado e músculo bovino. A decomposição foi feita utilizando 500 mg de amostras e de 2 a 4 mL de HNO₃. Os resultados obtidos para os materiais de referência certificados ficaram entre 94 a 109% em relação aos valores certificados. Os resultados obtidos para as amostras ficaram abaixo do limite de detecção do método.

Nano et al. (2009) determinaram As, Cd, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em material de referência certificado de tecido de ostra por ICP OES. Os autores fizeram a otimização as proporções de HNO₃, HCl e H₂O₂, obtendo a melhor proporção de 30,8%, 21,4% e 47,8% respectivamente. Para a decomposição foram utilizados 500 mg de tecido de ostra. As digestões foram realizadas a 140 °C por 4 horas. Os resultados obtidos variaram entre 90 a 100% em relação aos valores certificados.

O sistema "*cold finger*" pode evitar a perda de elementos voláteis e reduzir o volume de ácidos empregados na digestão. Entretanto, este sistema contém algumas desvantagens, como o longo tempo de digestão e a temperatura que está restrita ao ponto de ebulição do ácido (FERREIRA et al., 2013). Outros sistemas com aquecimento condutivo utilizando frasco fechado são recomendados para melhor eficiência de decomposição e quantificação de elementos voláteis.

2.2.2.3. Aquecimento condutivo com frasco fechado

Desenvolvido em 1860, o método de Carius consistiu em selar um tubo de vidro com parede resistente contendo amostra e ácido nítrico (RICHTER; LINK; KINGSTON, 2001). As temperaturas atingidas variaram de 250 a 300 °C com tempo de 1 hora para amostras de matrizes mais facilmente decompostas e de 3 a 5 horas para amostras com matrizes de difícil decomposição. Nessas condições de temperatura, a matéria orgânica é totalmente decomposta (KRUG, 2010).

A bomba de digestão com frasco de politetrafluoretileno (PTFE) envolto por um cilindro de aço foi outro sistema de digestão com aquecimento condutivo muito utilizado. O frasco de PTFE permite que a temperatura máxima atingida seja em

torno de 180 °C. Diferente do método de Carius, a bomba de digestão contém uma tampa com dispositivo de segurança que permite o alívio da pressão interna em caso de pressão excessiva (KRUG, 2010).

Ellen e Van Loon, (1990) comparam a digestão por via seca em forno mufla e digestão utilizando frascos de PTFE aquecidos em estufa. Os autores quantificaram Cd e Pb em materiais de referência certificados de rim suíno e músculo e fígado bovino por GF AAS. Frascos de PTFE foram utilizados para a decomposição de 200 mg do material de referência certificado e 3 mL de HNO₃. O frasco foi fechado e aquecido em estufa a 150 °C por 6 horas. O método de decomposição por via seca utilizou 1 g de material de referência certificado, 3 mL H₂O e 2 mL de H₂SO₄ (20% m/v). O aquecimento foi feito em forno mufla por um período de 18 h, a temperatura máxima atingida foi de 500 °C. Os autores relataram que alguns resultados obtidos apresentaram diferenças superiores a 10% entre os dois procedimentos de digestão. Contudo os autores concluíram que ambos os procedimentos são simples e que foram capazes de fornecer limites de detecção baixos.

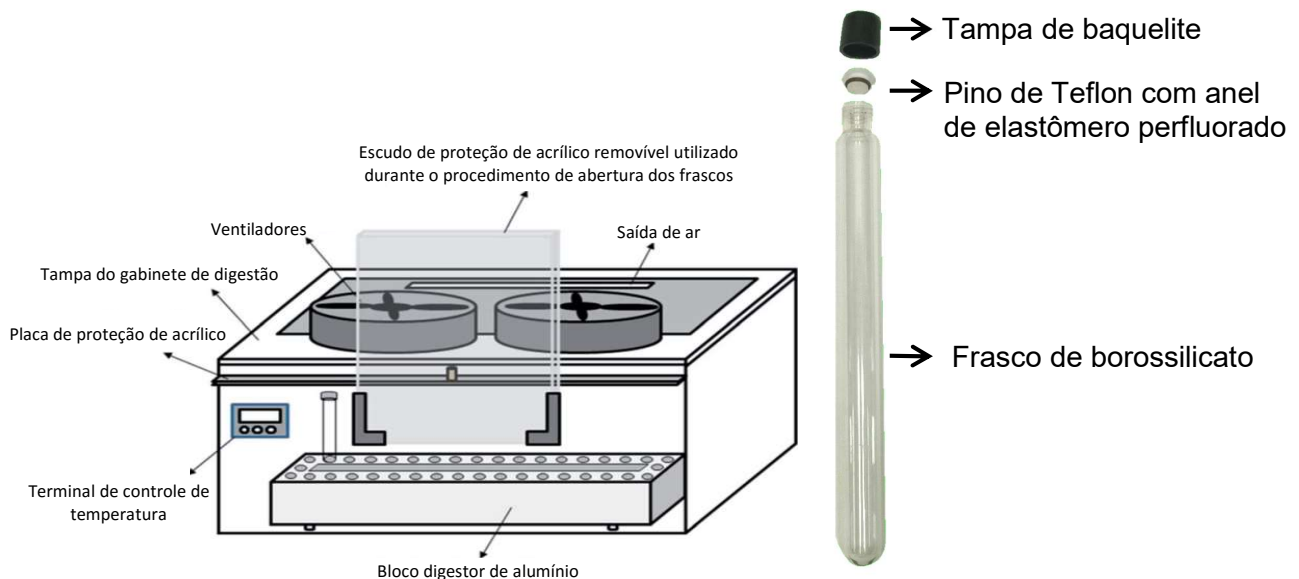
Okamoto e Fuwa (1984) determinaram as concentrações de Cu e Zn por F AAS, Fe, Mn e Sr por ICP OES, Ag, As, Cd, Co, Cr, Ni e Pb por GF AAS e Hg por CV AAS em material de referência certificado de tecido de ostra. O procedimento de digestão utilizou frascos de PTFE aos quais foram adicionados 300 mg de tecido de ostra e 3 mL de HNO₃. O aquecimento foi feito através de um forno mufla a 90 °C por 2 horas seguido por 140 °C por mais 4 horas. Para as análises com ICP OES foi necessário mais uma etapa de aquecimento utilizando HF. Os autores concluíram que este sistema de decomposição foi capaz de fornecer resultados concordantes com os valores certificados, não constatando perda de elementos voláteis como As e Hg.

O procedimento de decomposição utilizando frasco de PTFE, apesar da simplicidade apresenta grande risco de explosão, visto que a fase líquida e a fase gasosa encontram-se em equilíbrio térmico, resultando em pressão muito elevada no interior do frasco. Além do mais, são necessárias várias horas de aquecimento, tornando-se a etapa de preparo de amostra um passo lento no processo analítico. Portanto, o desenvolvimento de métodos mais rápidos e confiáveis para o preparo de amostras é oportuno (SMITH; ARSENAULT, 1996).

2.2.2.3.1. Sistema de decomposição com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS)

Haja vista o alto custo dos equipamentos para a decomposição de amostras em frasco fechado utilizando radiação micro-ondas e o longo tempo de digestão dos sistemas com aquecimento condutivo em frasco aberto, um novo sistema de decomposição de amostras em frasco fechado foi desenvolvido por Miranda, Pereira Filho e Gomes Neto (2014). Uma ilustração do sistema de decomposição de amostras está representado na Figura 8.

Figura 8 - Ilustração do sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado juntamente com o frasco de vidro borossilicato e componentes para fechamento.



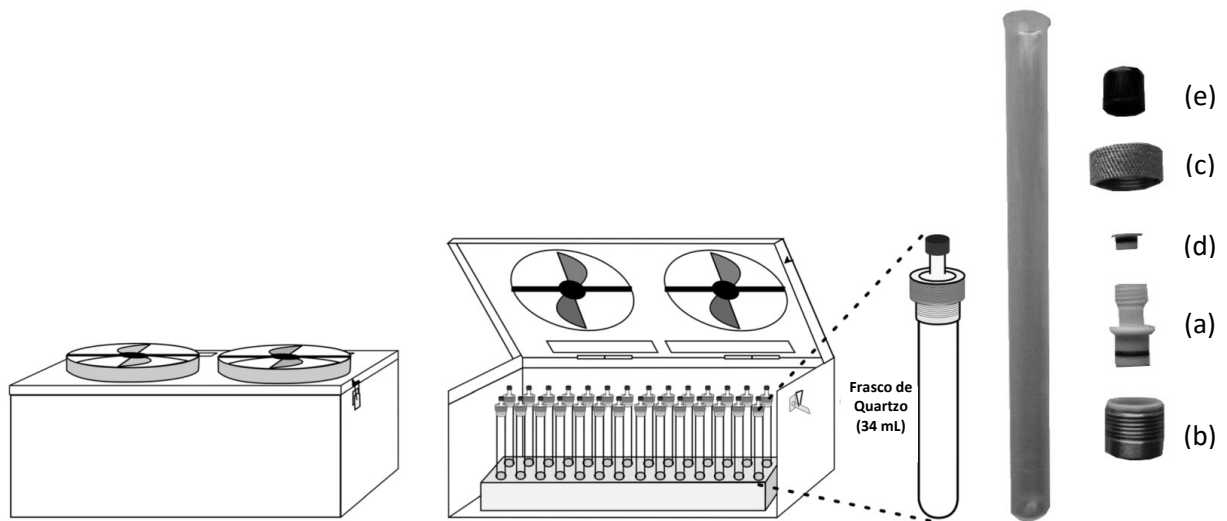
Fonte: adaptado de Miranda; Pereira Filho; Gomes Neto, 2014.

Como pode ser observado nesta figura, o CHDS é composto por um gabinete de aço, no qual contém em seu interior um bloco digestor de alumínio, sendo este disposto de 38 orifícios para inserção dos frascos de digestão. O frasco de digestão dispõe de um pino de teflon e uma tampa de baquelite para fechamento do mesmo. Na parte superior do gabinete há dois ventiladores para auxiliar na etapa de resfriamento dos frascos. Durante a digestão uma proteção de acrílico é inserida abaixo da tampa do gabinete para maior segurança. Na parte frontal há um terminal de controle de temperatura e uma proteção de acrílico ao centro para proteger o analista no momento da abertura do frasco.

Este sistema inicialmente foi empregado por Miranda, Pereira Filho e Gomes Neto (2014) para a decomposição de 200 mg de amostras de folhas de alface, almeirão, arruda, chicória, couve, espinafre e repolho branco e de materiais de referência certificados de folhas de maçã, pêssego, tomate e agulhas de pinheiro. Os autores quantificaram Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP OES. Os reagentes utilizados para a digestão foram 2 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. O programa de aquecimento utilizado partiu da temperatura ambiente até 195 °C em 20 min e permanência em 195 °C por 15 minutos, seguido por 40 minutos de resfriamento. Os digeridos obtidos foram diluídos com 20 mL água deionizada. Para fins comparativos as amostras foram decompostas por um forno micro-ondas em frasco fechado. Os resultados obtidos com CHDS foram concordantes com os resultados obtidos pelo forno micro-ondas. As recuperações obtidas pelo CHDS variaram entre 75% a 114% em reação aos valores certificados. Os limites de detecção para Al, B, Ca e Zn foram de 3 a 6 vezes maiores para o CHDS devido a impurezas presente no vidro borossilicato.

Com a finalidade de obter melhores brancos analíticos Miranda, Vieira e Gomes Neto (2014) desenvolveram frascos de quartzo, os quais são representados na Figura 9. Os autores fizeram a quantificação de Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP OES em dez amostras de cana de açúcar e três materiais de referência certificados de folhas de maçã, folhas de repolho branco e agulhas de pinheiro. Para as digestões foram utilizados massa de 200 mg de amostras, 2 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. Os digeridos obtidos foram diluídos com 20 mL água deionizada. Para fins comparativos as amostras foram decompostas por um forno micro-ondas em frasco fechado. As recuperações variam de 87 a 104% em relação aos materiais de referência certificados. Os resultados das amostras obtidos pelo CHDS foram concordantes com os obtidos pela MW-AD. Com a confecção dos frascos de quartzo possibilitou a obtenção de limites de quantificação para o CHDS próximos dos obtidos com o forno micro-ondas, demonstrando que o CHDS é uma alternativa eficiente e de baixo custo para digestão de amostras botânicas.

Figura 9 - Ilustração do CHDS juntamente com os frascos de quartzo e componentes para o fechamento. (a) tampa de teflon; (b) trava inferior; (c) trava superior; (d) pino de teflon; (e) tampa de baquelite.



Fonte: Adaptado de Miranda; Vieira; Gomes Neto, 2014; Miranda; Vieira; Gomes Neto, 2015.

Como pode ser observado nesta figura, o frasco de quartzo sofreu algumas modificações, visto que segundo os autores não foi possível confeccionar o frasco de quartzo com rosca igualmente o frasco de vidro borossilicato usado anteriormente. Portanto, foram incrementadas novas peças para o sistema de fechamento, sendo essas, uma tampa de Teflon e duas travas de alumínio Figura 9. Após o desenvolvimento do frasco de quartzo o sistema ficou restrito a 28 posições.

Miranda, Vieira e Gomes Neto (2015) estenderam as aplicações do CHDS para a decomposição de amostras de leite em pó, chocolate em pó, café solúvel e de dois materiais de referência certificados de leite em pó integral e leite em pó desnatado. Os autores quantificaram Ca, K, Mg, Na, Zn, Fe, Cu e Mn por HR-CS F AAS e Cd, Mo e Se por ICP-MS/MS. Os reagentes utilizados para a digestão foram 2 mL de HNO_3 e 1 mL de H_2O_2 . Para fins comparativos as amostras e os materiais de referência certificados foram digeridos em forno micro-ondas com frasco fechado. As recuperações dos analitos em relação aos valores certificados foram de 91 a 104% para o CHDS e 94 a 109% para o forno micro-ondas. Os resultados obtidos com o CHDS foram concordantes com os resultados obtidos com o forno micro-ondas ao nível de 95% de confiança (teste t pareado). Contudo, neste sistema, o analista necessita de extremo cuidado ao fazer o alívio da pressão do frasco, pois o mesmo é manuseado sob pressão para retirada da tampa de baquelite. Outro ponto é o não isolamento dos frascos no interior do gabinete de

digestão, de modo que uma falha destrutiva em um dos frascos haverá o comprometimento da integridade dos demais. Ainda assim, o CHDS mostrou ser um sistema eficiente para a digestão de amostras botânicas e alimentícias.

Observando as características do CHDS, alguns pontos podem ser aperfeiçoados, como, por exemplo, um sistema de alívio da pressão do frasco mais seguro e o isolamento dos frascos de digestão. Além do mais, para a decomposição de amostras de carne este sistema pode ser uma interessante alternativa aos métodos tradicionais de digestão por via úmida, oferecendo as vantagens de reduzir o tempo de digestão, riscos de perda dos analitos por volatilização e propensão a contaminação, além de ser um sistema simples, de baixo custo e de fácil manutenção (MIRANDA; PEREIRA FILHO; GOMES NETO, 2014; MIRANDA; VIEIRA; GOMES NETO, 2014; MIRANDA et al. 2015).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo consiste no aperfeiçoamento e avaliação de um sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para digestão de amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno) para a determinação de macronutrientes (Na, Ca, K, Mg, P e S), micronutrientes (Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn) e contaminantes inorgânicos (As, Cd, e Pb) utilizando ICP OES e ICP-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos as amostras, reagentes, soluções analíticas e equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, bem como os procedimentos empregados para o preparo de amostras e determinação de macronutrientes, micronutrientes e contaminantes inorgânicos por ICP OES e ICP-MS.

4.1. Amostras, reagentes e soluções analíticas

As amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno) foram adquiridas no mercado local em Araraquara, São Paulo, Brasil.

Todas as soluções empregadas durante os experimentos foram preparadas com água desionizada de alta pureza obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5TM combinado com desionizador Millipore Milli-QTM academic (18,2 M Ω cm, Millipore, Bedford, Estados Unidos).

Para a digestão das amostras foram empregados HNO₃ 69% (J.T. Baker, Deventer, Holanda) previamente purificado por um sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (Milestone) e H₂O₂ 30% m/v (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Soluções analíticas multielementares (0,005 – 10 mg L⁻¹ Fe, Cu, Mn e Zn; 0,05 – 100 mg L⁻¹ Mg, Na e S; 0,1 – 200 mg L⁻¹ Ca, K e P) foram preparadas por meio da diluição apropriada de padrões espectroscópicos monoelementares 1000 mg L⁻¹ (SpecSol, São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram acidificadas a 10% (v/v) HNO₃.

Solução estoque 10000 mg L⁻¹ de carbono foi preparada através da dissolução de 1,251 g de ureia (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 25 mL de água desionizada. Soluções analíticas de carbono (500 – 2500 mg L⁻¹) foram preparadas por meio da diluição apropriada desta solução.

Soluções analíticas multielementares (0,05 – 200 μ g L⁻¹ As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se) foram preparadas por meio da diluição apropriada de padrões espectroscópicos monoelementares 1000 mg L⁻¹ (SpecSol, São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram acidificadas a 10% (v/v) HNO₃.

Frascos plásticos e vidrarias foram descontaminados por imersão em banho 10% (v/v) HNO₃ por no mínimo 24 horas e posterior lavagem com água desionizada.

A precisão do procedimento de digestão por aquecimento condutivo foi avaliada através da análise dos materiais certificados *8414 Bovine Muscle Powder*, *1577b Bovine Liver* (National Institute of Standards and Technology, NIST) e *BCR 186 Pig Kidney* (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM).

4.2. Instrumentação

As determinações dos macronutrientes (Na, Ca, K, Mg, P e S), micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) e carbono residual foram realizadas empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado iCAP 6500 Series (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) operando nas condições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições operacionais empregadas nas determinações por ICP OES.

Parâmetros Operacionais	Configuração
Radio frequência do gerador (MHz)	40
Potência aplicada (W)	1150
Vista de observação do plasma	Axial
Gás de purga	Argônio
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	12
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Elementos	Linhas de emissão (nm)
C I	193,091
Ca I	422,673
Cu I	324,754
Fe II	238,204
K I	769,896
Mg I	285,213
Mn II	257,610
Na I	589,592
P I	178,284
S I	182,034
Zn I	213,856

I Linha atômica; II Linha iônica.

Fonte: Autor, 2015.

As determinações de As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se foram realizadas empregando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado Agilent 8800 ICP-MS/MS (Agilent technologies, Tokyo, Japão) com dois separadores de massas quadrupolos (Q1 e Q2) e câmara de reação octopolo (RCS³), operando nas condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais empregadas nas determinações por ICP-MS/MS

Parâmetros Operacionais	Configuração
Potência de RF (W)	1550
Profundidade de amostragem (mm)	8,0
Nebulizador	Concêntrico de vidro
Câmara de nebulização	Tipo scott – Duplo passo
Fluxo de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Fluxo do gás injetor (L min ⁻¹)	1,09
Tempo de integração (s)	3,0
Massa selecionada no Q1	⁷⁵ As, ¹¹⁴ Cd, ⁵² Cr, ⁹⁸ Mo, ²⁰⁸ Pb, ⁸⁰ Se
Modo de operação	MS/MS
Gás da câmara de reação	O ₂
Fluxo de O ₂ (mL min ⁻¹)	0,50
Massa selecionada no Q2	⁷⁵ As ¹⁶ O, ¹¹⁴ Cd, ⁵² Cr ¹⁶ O, ⁹⁸ Mo ¹⁶ O ₂ , ²⁰⁸ Pb, ⁸⁰ Se ¹⁶ O

Fonte: Autor, 2015.

As amostras de carne foram processadas em um processador de alimentos CUT 4 (METVISA, Brusque, Brasil) com capacidade para 4 litros, potência de 0,5 CV e rotação de 1680 RPM.

As amostras de carne previamente processadas foram secas em uma estufa com circulação e renovação de ar (TE-394/2 Tecnal, Piracicaba, SP) a 105 °C até que a massa permanecesse constante para a determinação de umidade.

O sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado equipado com 14 frascos de quartzo foi utilizado para a digestão das amostras e materiais de referência certificados.

Um termômetro infravermelho com mira laser modelo 9200-008, (Allafrance, Chelillé, França) foi utilizado para medir a temperatura ao longo do frasco de quartzo do sistema de digestão com aquecimento condutivo.

Para fins comparativos, as amostras também foram digeridas utilizando um sistema de digestão em frasco fechado assistido por radiação micro-ondas (Multiwave Sample Preparation System, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com 6 frascos de PFA.

4.3. Preparo das amostras

As amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno) foram processadas em um processador de alimentos com potência de 0,5 CV e rotação de 1680 RPM, utilizando 3 ciclos de 1 min com intervalo de 30 s. Este intervalo de tempo entre ciclos foi utilizado para evitar o aquecimento da amostra durante o processamento.

Todas as amostras foram digeridas em triplicata utilizando o sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS, do inglês *conductively heated digestion system*) e a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD, do inglês *microwave-acid digestion*).

4.3.1. Determinação dos teores de umidade nas amostras

O CHDS permite a digestão de 200 mg de amostra de carne seca. Como as digestões foram realizadas utilizando amostras “in natura”, foi necessário determinar os teores de umidade nas amostras para estimar a massa “in natura” correspondente a 200 mg de massa seca. Os teores de umidade nas amostras de carne “in natura” previamente processadas foram obtidos a partir da secagem em estufa a 105 °C até que a massa permanecesse constante.

4.3.2. Digestão com o CHDS

Para a quantificação dos macronutrientes, micronutrientes e contaminantes inorgânicos, 800 mg das amostras “in natura” previamente processadas foram pesados diretamente nos frascos de digestão de quartzo de 32 mL e 2 mL de HNO₃

e 1 mL de H₂O₂ foram adicionados. Os frascos foram fechados e o seguinte programa de aquecimento foi utilizado: (1) 20 a 220 °C, rampa de 30 min; (2) 220°C, patamar de 15 min; (3) 30 min de resfriamento até 60 °C. Após o término da digestão, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos para 20 mL com água desionizada.

4.3.3. Digestão assistida por radiação micro-ondas

Foram pesados 800 mg das amostras “in natura” previamente processadas diretamente em frascos de PFA de 50 mL e 3 mL de HNO₃, 2 mL de H₂O e 1 mL de H₂O₂ foram adicionados. Os frascos foram fechados, introduzidos no rotor e este conduzido à cavidade do equipamento. Um programa de aquecimento de 4 etapas foi utilizado: (1) 100-600 W, rampa de 5 min; (2) 600 W, patamar de 5 min; (3) 1000 W, patamar de 10 min; (4) 0 W, 20 min de resfriamento. Após o término da digestão, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos para 30 mL com água desionizada.

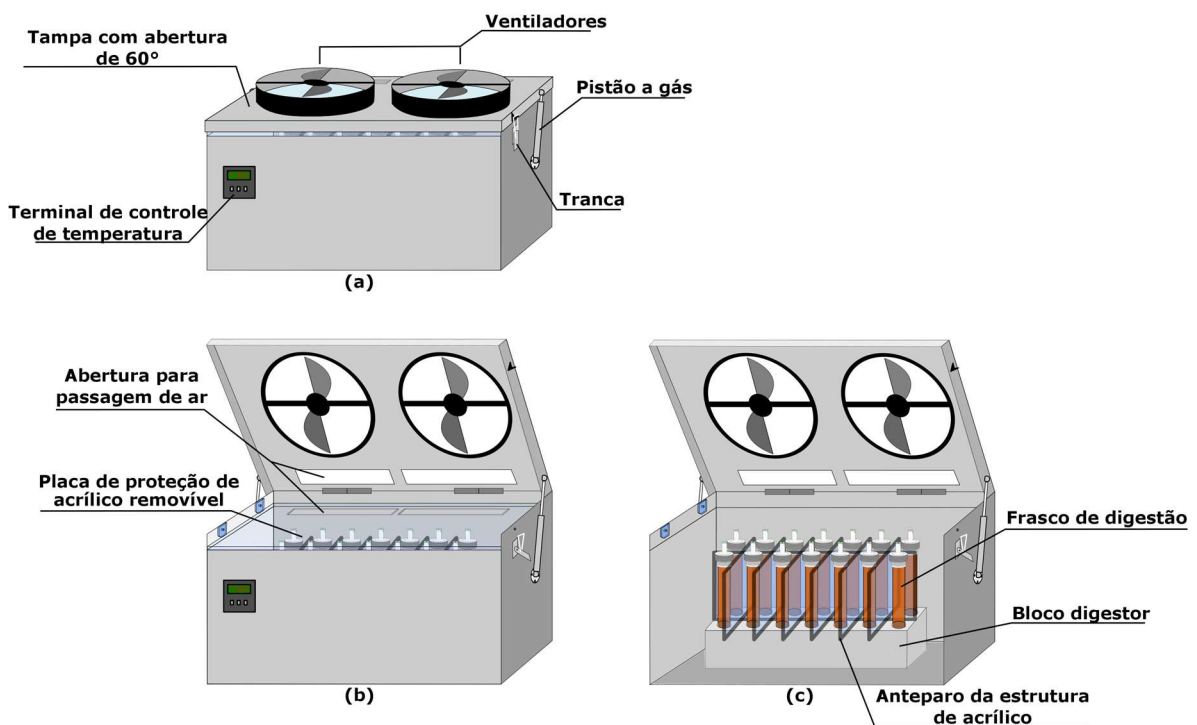
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados nos tópicos: inovações introduzidas no CHDS, gradiente de temperatura ao longo do frasco de digestão, processamento das amostras, teor de umidade das amostras, teor de carbono residual e por fim as determinações por ICP OES e ICP-MS.

5.1. Inovações introduzidas no CHDS

Com o objetivo de melhorar o desempenho e proporcionar maior segurança ao analista, algumas modificações foram realizadas no CHDS, tais como, adaptação de um pistão a gás na tampa do gabinete, isolamento dos frascos individualmente no interior do gabinete de digestão e desenvolvimento de um sistema de alívio de pressão para abertura dos frascos de digestão. O CHDS modificado está ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Ilustração do CHDS; (a) gabinete de digestão fechado, (b) aberto e (c) vista interna do gabinete de digestão.



Fonte: Autor, 2015.

O pistão a gás (figura 10a) foi adaptado no CHDS para facilitar no momento da abertura da tampa do gabinete de digestão e evitar que no fechamento a tampa feche de maneira abrupta devido ao peso dos ventiladores.

O CHDS possui um bloco de alumínio (aquecido por resistência elétrica) com 14 posições para inserção dos frascos de quartzo (Figura 10c), sendo que cada posição é isolada por anteparos de acrílico de 10 mm de espessura. Os anteparos têm como função isolar os frascos de digestão individualmente, pois em caso de uma possível falha destrutiva em um deles, não ocorra o comprometimento dos demais. Com o isolamento dos frascos houve uma redução no número de posições no CHDS, que passou de 28 para 14 posições.

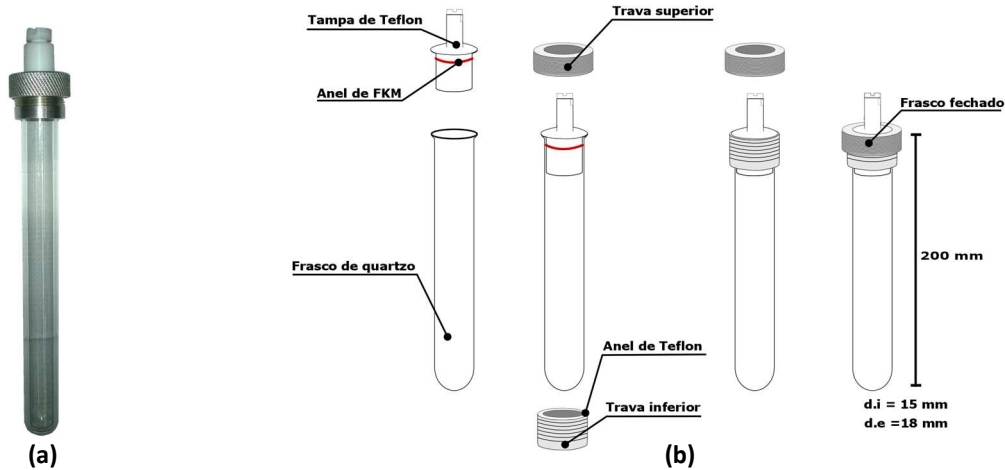
Os frascos de digestão de quartzo anteriormente eram abertos após o procedimento de decomposição através do manuseio dos frascos sob pressão. Para maior segurança e praticidade foi desenvolvida uma tampa de Teflon para vedação do frasco de quartzo com um sistema de alívio da pressão após a decomposição. O alívio da pressão é feito com o auxílio de uma ferramenta desenvolvida para essa finalidade. A seguir serão apresentados os frascos de digestão de quartzo, sistema de vedação dos frascos de quartzo e sistema de alívio de pressão para abertura dos frascos.

5.1.1. Frascos de digestão de quartzo

A constituição do material do frasco influencia diretamente as concentrações dos elementos que são lixiviados para a solução durante a digestão (KRUG, 2010). Sendo assim, frascos de quartzo foram utilizados para decompor as amostras de carne no CHDS com o objetivo de reduzir os valores do branco analítico. As composições dos frascos de vidro borossilicato e do frasco de quartzo utilizados são apresentadas na Tabela 3. O frasco de quartzo (15 mm de diâmetro interno, 18 mm de diâmetro externo e 200 mm de altura) compreende um corpo cilíndrico dotado de uma abertura superior com aba. Um novo sistema de fechamento foi desenvolvido para os frascos de quartzo. Uma ilustração contendo o frasco de quartzo e os componentes necessários para promover a vedação do mesmo durante o procedimento de digestão é apresentada na Figura 11. Duas peças de alumínio (trava superior com rosca interna e trava inferior com rosca externa) são rosqueadas para manter a tampa de Teflon inserida no frasco de quartzo mesmo com o aumento

da pressão interna durante o procedimento de digestão. Um anel de Teflon foi utilizado entre a trava inferior e a aba do frasco para distribuir a pressão uniformemente, conferindo maior resistência ao frasco.

Figura 11 - Frasco de digestão de quartzo (a) e componentes utilizados (b) para a vedação do mesmo.



Fonte: Autor, 2015.

Tabela 3 - Composições ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dos frascos utilizados para digestão no sistema de digestão por aquecimento condutivo.

Elemento	Vidro Borossilicato ¹	Quartzo ²
B	principal	<2
Na	principal	<187
Mg	6×10^5	<5
Al	principal	<25
Si	principal	principal
K	10^6	<5
Ti	3000	<10
Cr	3000	<1
Mn	6000	<1
Fe	2×10^5	<20
Co	100	<0,5
Ni	2000	<5
Cu	1000	<2
Zn	3000	<5
As	500-22000	<15
Cd	1000	<0,3
Sb	8000	<0,5
Hg	-	-

¹(KRUG, 2010)

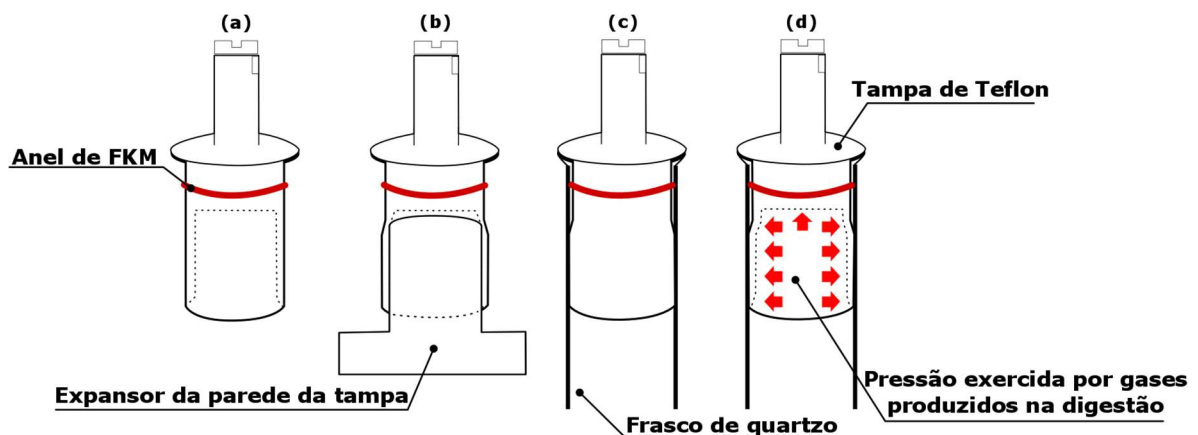
²(Technical Glass Products: Trace Impurities, 2015)

Fonte: Autor, 2015.

5.1.2. Sistema de vedação dos frascos de quartzo

A tampa de Teflon (Figura 12a) conta com um sistema de vedação do frasco de digestão no qual a parede de 1,0 mm de espessura da parte inferior da tampa é expandida (Figura 12b) antes da introdução no frasco de quartzo (Figura 12c). Os gases (CO_2 , NO_x , etc.) produzidos durante a digestão da matéria orgânica pressionam a parede da tampa de Teflon contra a parede interna do frasco de quartzo, impedindo o escape dos gases. Um anel de fluoroelastomero (FKM) impede a saída dos gases durante a etapa de resfriamento (Figura 12d).

Figura 12 - Etapas do procedimento para vedação do frasco de digestão. (a) Tampa de Teflon com parede interna de 1,0 mm; (b) Expansão da parede da tampa de Teflon; (c) Introdução da tampa de Teflon no frasco de quartzo; (d) Pressão produzida pelos gases durante a digestão.



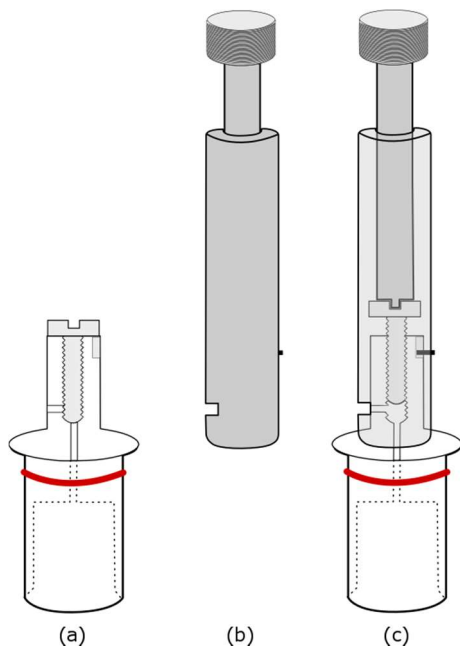
Fonte: Autor, 2015.

5.1.3. Sistema de alívio de pressão para abertura dos frascos

Após o fechamento dos frascos, os mesmos são submetidos ao programa de aquecimento. Ao término do programa, os frascos são resfriados por um fluxo de ar fornecido por 2 ventiladores instalados na tampa do gabinete de digestão. Mesmo após o resfriamento ($\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$), a pressão no interior dos frascos é elevada devido aos gases produzidos durante a digestão. Para evitar riscos ao analista, uma válvula que permite o escape dos gases foi desenvolvida na tampa de Teflon. A válvula é aberta pelo analista com o auxílio de uma ferramenta, evitando-se o manuseio do frasco sob pressão. O sistema de alívio de pressão pode ser visto na Figura 13.

Após a etapa de resfriamento, uma placa de proteção de acrílico contendo orifícios que dão acesso às tampas dos frascos é encaixada na parte superior do gabinete (Figura 14). Para abrir a válvula de alívio de pressão, a ferramenta é introduzida, encaixada na tampa do frasco e girada no sentido anti-horário (Figura 15). Os vapores ácidos liberados no interior do gabinete de digestão são rapidamente eliminados pelo sistema de exaustão da capela, local onde o equipamento fica instalado.

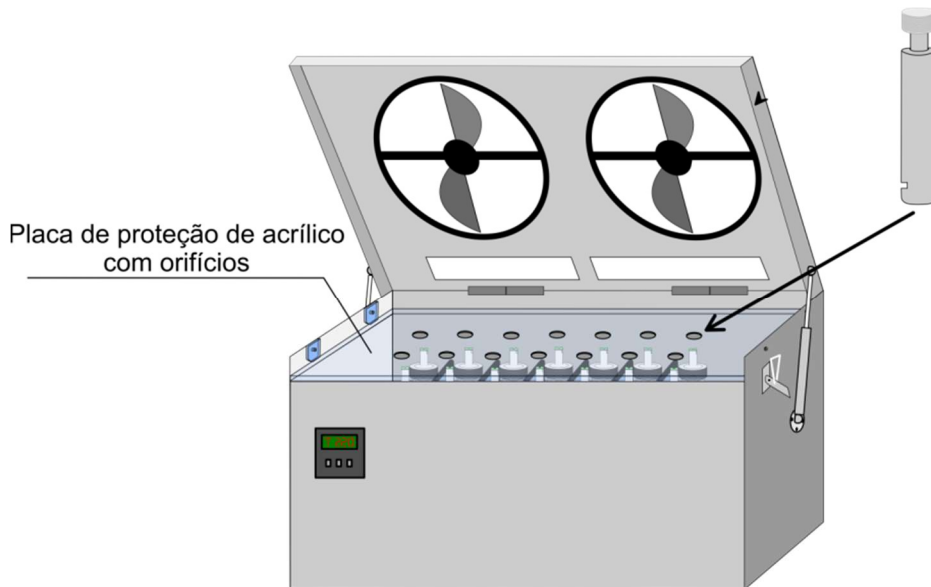
Figura 13 - Sistema de alívio de pressão. (a) Válvula de escape fechada; (b) ferramenta para abertura da válvula; (c) Abertura da válvula com ferramenta.



Fonte: Autor, 2015.

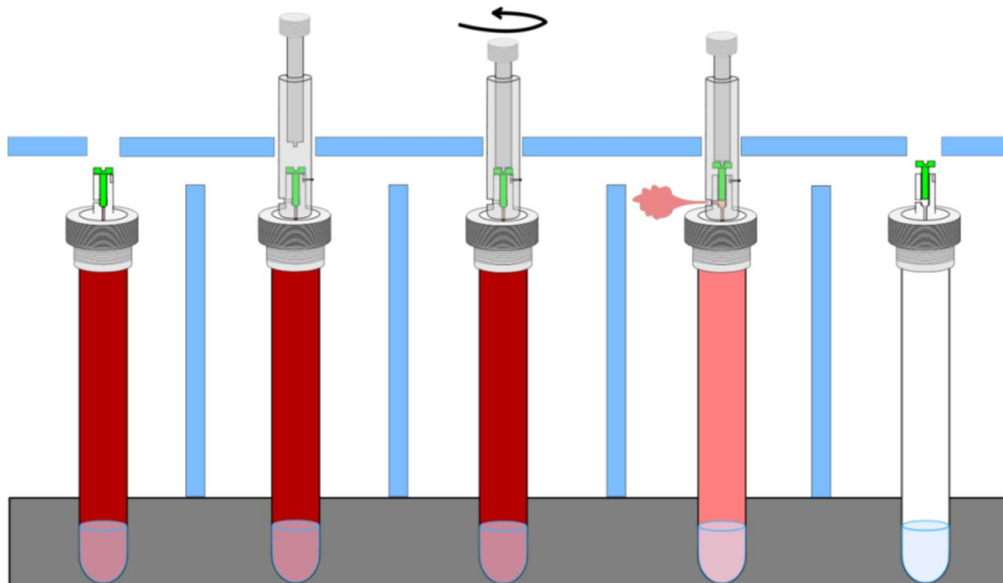
Após o alívio da pressão interna de todos os frascos, a tampa de acrílico é removida, os frascos de digestão são abertos e os digeridos são transferidos para frascos de polipropileno. Este procedimento é simples, rápido e seguro.

Figura 14 - Placa de proteção de acrílico com orifícios para introdução da ferramenta de alívio de pressão.



Fonte: Autor, 2015.

Figura 15 - Ilustração do alívio de pressão do frasco de digestão.



Fonte: Autor, 2015.

5.2. Processamento das amostras

Para a análise das amostras “in natura” foi necessário o processamento utilizando um processador de alimentos, obtendo a amostra na forma de uma pasta homogênea. As amostras processadas estão expostas na Figura 16. O

processamento é rápido e consiste em 3 ciclos de 1 minuto intercalados por 30 segundos entre cada ciclo. Com o tempo de 30 segundos entre cada ciclo não foi observado o aquecimento significativo das amostras durante o processamento.

Figura 16 - Amostras processadas com um processador de alimentos.



Fonte: Autor, 2015.

5.3. Gradiente de temperatura no frasco de digestão

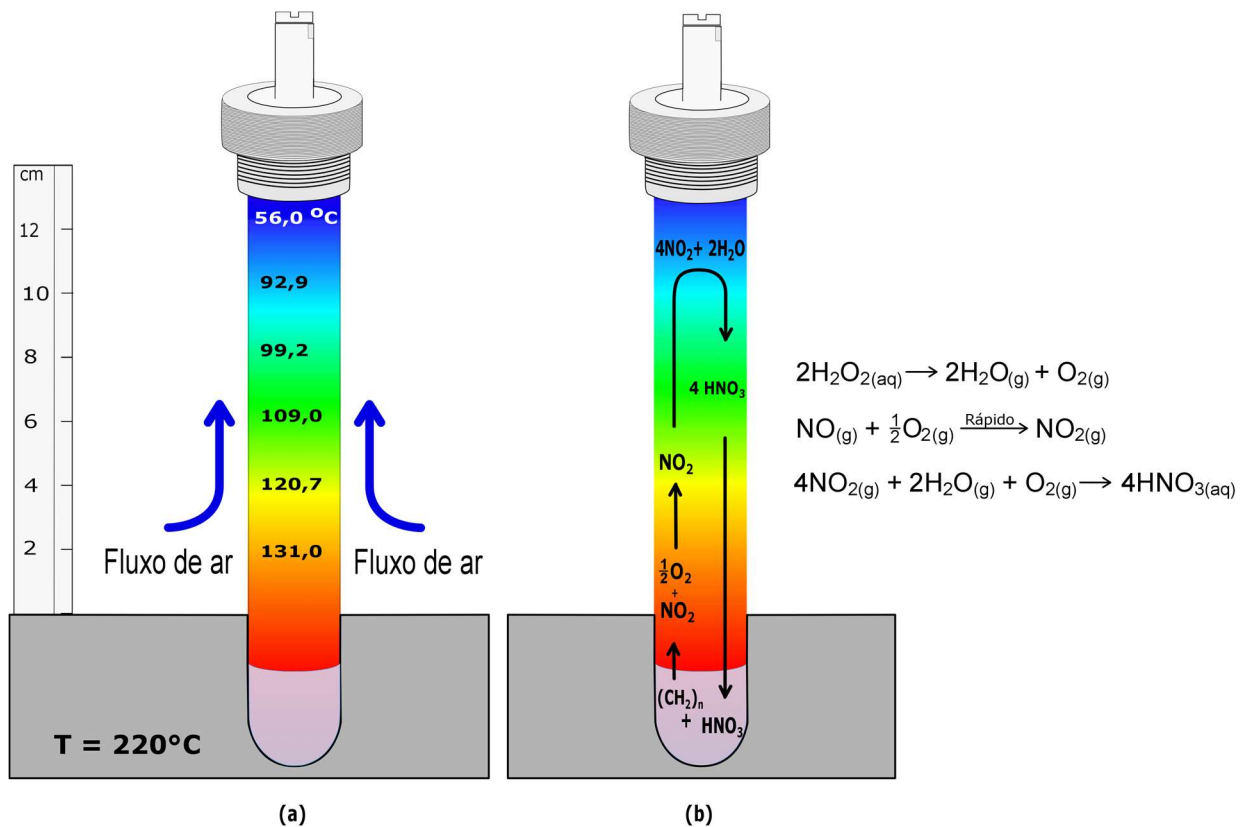
Os frascos de quartzo utilizados para as digestões das amostras apresentam parede de 1,5 mm de espessura, diâmetro interno de 15 mm, 200 mm de altura e volume interno de 32 mL. Apenas 5 cm do frasco ficam inseridos no orifício do bloco digestor. O restante do frasco é levemente resfriado pelo fluxo de ar gerado pela capela de exaustão devido a uma abertura no fundo do gabinete abaixo do bloco digestor. Isto causa a formação de um gradiente de temperatura na parte superior do frasco.

A temperatura ao longo do frasco de digestão foi monitorada durante a digestão de 800 mg de fígado bovino úmido, utilizando 2 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. Os valores de temperatura foram obtidos em 6 pontos equidistantes com intervalos de 2 cm após a temperatura do bloco digestor permanecer em 220 °C por 15 min. As temperaturas obtidas na parede do frasco são apresentadas na Figura 17(a). A regeneração do HNO₃, confirmada visualmente por Miranda; Pereira Filho e Gomes Neto (2014), ocorre pela reação entre o NO₂, H₂O e O₂. Como pode

ser observado na Figura 17(b), o gradiente de temperatura gerado ao longo do frasco de digestão favorece a regeneração do HNO_3 . A remoção de NO_2 da fase gasosa promovida pela regeneração do HNO_3 resulta na redução da pressão interna do frasco durante o procedimento de decomposição da matéria orgânica, possibilitando o uso de frasco com parede menos espessa sem que haja a ruptura do mesmo. Ao utilizar aquecimento condutivo, um frasco com parede menos espessa permite o rápido aquecimento da solução, reduzindo o tempo de digestão da amostra.

A adição de H_2O_2 é indispensável para a regeneração do HNO_3 , visto que ele se decompõe em O_2 e H_2O para reagirem com o NO_2 . Com a regeneração do HNO_3 durante a digestão, é possível utilizar menor volume de ácido concentrado, contribuindo para menor acidez residual dos digeridos e menor geração de resíduos no laboratório (MIRANDA; PEREIRA FILHO; GOMOS NETO, 2014).

Figura 17 - Ilustração: (a) gradiente de temperatura ao longo do frasco de digestão após o bloco digestor permanecer por 15 min em $220\text{ }^\circ\text{C}$; (b) reações envolvidas na regeneração do ácido HNO_3 .



Fonte: Autor, 2015.

5.4. Temperatura de ebulição do ácido nítrico em função da pressão

Em sistemas fechados é possível elevar a temperatura de ebulição do ácido nítrico em função do aumento da pressão no interior do frasco. Por exemplo, a temperatura de ebulição do ácido nítrico 65% a 1 atm é 120 °C, mas a 5 atm passa para 176 °C (KINGSTON et al., 1988). A partir desses valores de temperatura de ebulição e pressão é possível prever a temperatura de ebulição do ácido nítrico em função da pressão desenvolvida no interior do frasco utilizando-se a equação de Clausius-Clapeyron (GEROLA et al., 2010).

$$\ln\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = \frac{\Delta H_{vap}}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \quad \text{(Equação 3)}$$

Calcula-se inicialmente ΔH_{vap} (entalpia de vaporização do ácido nítrico), onde $P_1 = 1$ atm, $P_2 = 5$ atm, $T_1 = 393,15$ K (120 °C), $T_2 = 449,15$ K (176 °C) e $R = 8,31447$ J/mol.K (constante dos gases ideais). O valor encontrado para ΔH_{vap} é 42196 J/mol. Em seguida, utiliza-se o valor calculado da ΔH_{vap} , 1 atm para P_1 e emprega-se valores arbitrários para P_2 . Os resultados das temperaturas de ebulição previstas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Temperaturas de ebulição calculadas a partir da equação de Clausius-Clapeyron para o ácido nítrico em função da pressão desenvolvida no interior do frasco de reação.

Pressão no frasco (atm)	Temperatura de ebulição (°C)
6,0	183
8,0	195
10,0	205
12,0	214
14,0	221
16,0	228
18,0	233
20,0	239

Fonte: Autor, 2015.

De acordo com os dados da Tabela 4, a pressão mínima necessária para elevar o ponto de ebulição para 220 °C é de aproximadamente 14,0 atm. Isto significa que é possível realizar digestões em frasco fechado a 220 °C sob pressão moderada. Contudo, vale ressaltar que a digestão da matéria orgânica presente na amostra produz CO₂ juntamente com NO_x, contribuindo para o aumento da pressão no interior do frasco. Desta forma, durante a digestão das amostras espera-se que a pressão no interior do frasco seja superior a 14 atm.

5.5. Teores de umidade nas amostras

Os teores de umidade obtidos para as amostras de carne são apresentados na Tabela 5. Os teores foram utilizados para calcular a massa “in natura” correspondente a 200 mg de massa seca. O valor médio obtido foi de 800 mg de massa “in natura”. Sendo assim, a massa empregada para digestão de amostra “in natura” foi de 800 mg.

Tabela 5 - Teores de umidade das amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno).

Amostra	Teor de umidade (%)
Músculo bovino	71,3
Músculo suíno	76,2
Músculo de frango	73,6
Fígado bovino	72,7
Fígado suíno	70,1
Fígado de frango	78,9
Rim bovino	78,5
Rim suíno	77,4

Fonte: Autor, 2015.

5.6. Teor de carbono residual

Os digeridos obtidos utilizando CHDS e MW-AD apresentaram aspecto incolor, indicando decomposição adequada da matéria orgânica. Contudo, informações adicionais como teor de carbono residual (RCC, em inglês *residual*

carbon content) é um parâmetro importante para avaliar a eficiência de decomposição da amostra (GONZALEZ et al., 2009; GOUVEIA et al., 2001; KRUG, 2010). Sendo assim, a eficiência de digestão foi avaliada em termos do RCC. Os valores de RCC obtidos para os materiais certificados e as amostras de carne são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teor de carbono residual nos digeridos ($n = 3$) dos materiais de referência certificados utilizando o CHDS e nos digeridos das amostras utilizando CHDS e MW-AD.

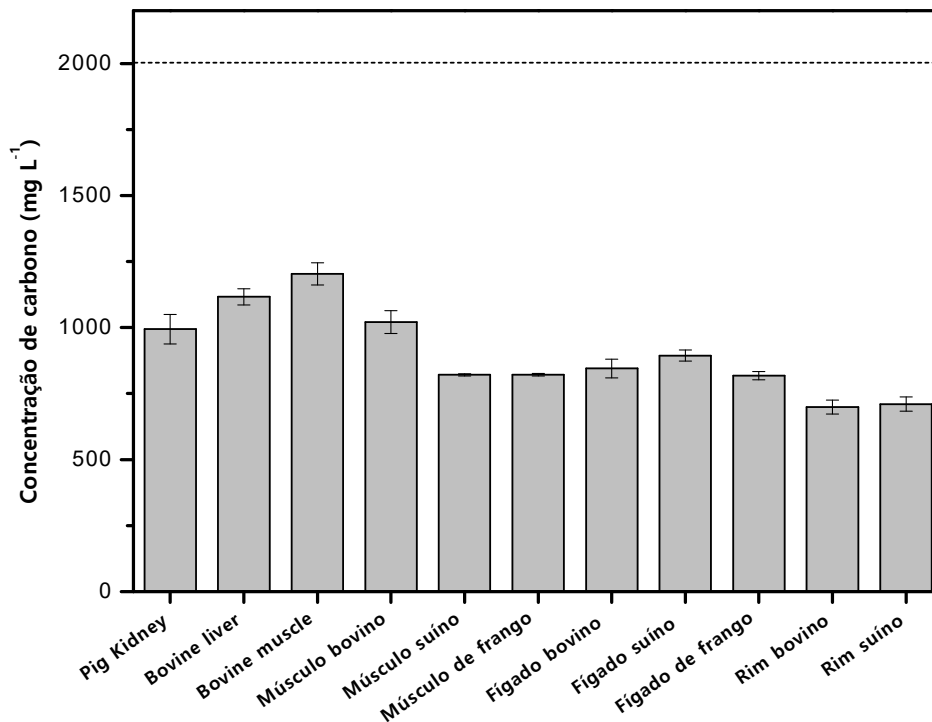
CRMs	Carbono Residual (mg C/100 mg amostra)	
	CHDS	MW-AD
Pig kidney	10,87	-
Bovine Liver	12,17	-
Bovine Muscle	12,49	-
Amostras	CHDS	MW-AD
Músculo bovino	12,33	3,70
Músculo suíno	12,09	3,64
Músculo de frango	11,30	3,53
Fígado bovino	11,06	5,34
Fígado suíno	10,70	4,95
Fígado de frango	10,35	6,55
Rim bovino	11,25	3,23
Rim suíno	11,40	5,02

Fonte: Autor, 2015.

A análise dos resultados contidos nesta tabela revela que os teores de carbono residual para as digestões com o CHDS foram de 2 a 3 vezes maiores que os obtidos quando se utilizou a MW-AD. Essa maior eficiência na decomposição da matéria orgânica quando se utilizou a MW-AD pode estar relacionada com as condições de temperatura e pressão atingidas pelo forno micro-ondas empregado (230 °C e 70 bar). Todavia, as concentrações de carbono nos digeridos obtidos com o CHDS variaram de 710 ± 27 a 1203 ± 42 mg L⁻¹. Segundo Bizzi et al. (2011), soluções com concentrações de carbono inferiores a 2000 mg L⁻¹ são adequadas para realizar determinações por ICP OES e ICP-MS para uma gama de elementos. Como pode ser visto na Figura 18 os materiais de referência certificados e as

amostras digeridas com o CHDS apresentaram concentrações de carbono inferiores a 2000 mg L⁻¹.

Figura 18 - Concentrações de carbono nos digeridos ($n = 3$) dos materiais de referência certificados e amostras obtidas com CHDS.



Fonte: Autor, 2015.

O teor de carbono residual está relacionado com a temperatura atingida durante o procedimento de digestão (WASILEWSKA et al., 2002). Assim, como representado na Figura 18, foram obtidos baixos desvios padrões entre as triplicatas digeridas simultaneamente em diferentes posições no bloco digestor, indicando assim, boa distribuição da temperatura nas diferentes posições do bloco.

5.7. Determinação de macronutrientes e micronutrientes por ICP OES

5.7.1. Materiais de referência certificados

A avaliação da exatidão do procedimento de digestão proposto com o CHDS foi feito através da digestão de materiais de referência certificados de músculo bovino (*Bovine Muscle Powder NIST 8414*), fígado bovino (*Bovine Liver NIST 1577b*)

e rim suíno (*Pig Kidney IRMM BCR 186*). Os resultados obtidos para macronutrientes e micronutrientes por ICP OES são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, K, Mg, Na, P e S (mg kg^{-1}) em materiais de referência certificados digeridos ($n = 3$) com CHDS.

	Pig kidney			Bovine Liver			Bovine Muscle		
	Certificado	Determinado	Rec (%)	Certificado	Determinado	Rec (%)	Certificado	Determinado	Rec (%)
Cu	31,9	29,0 \pm 0,1	91	160	148 \pm 2	93	2,84	2,42 \pm 0,05	85
Fe	299	284 \pm 1	95	184	180 \pm 1	98	71,2	66 \pm 2	93
Mn	8,5	9,0 \pm 0,1	106	10,5	10,5 \pm 0,1	100	0,37	nc	-
Zn	128	124 \pm 1	97	127	120 \pm 1	94	142	132 \pm 1	93
Ca	295	292 \pm 8	99	116	124 \pm 4	106	145	140 \pm 2	97
K	12600	13006 \pm 74	103	9940	9885 \pm 49	99	15170	14455 \pm 126	95
Mg	829	858 \pm 20	104	601	600 \pm 5	100	960	936 \pm 12	98
Na	7100	7279 \pm 55	103	2420	2245 \pm 17	93	2100	1960 \pm 20	93
S	nc	8552 \pm 6	-	7850	7505 \pm 75	96	7950	7405 \pm 74	93
P	12200	11920 \pm 170	98	11000	11682 \pm 219	106	8360	8145 \pm 136	97

nc = não certificado

Fonte: Autor, 2015.

A análise desta tabela mostra que os resultados obtidos nos materiais de referência certificados digeridos com o CHDS foram muito próximos dos valores certificados para todos os analitos. No entanto, apenas 32% dos resultados foram concordantes ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste t não pareado. Isto ocorreu devido aos pequenos desvios padrões obtidos para as réplicas, sendo estes da ordem de 1%. Como exemplo, temos a concentração de Fe determinado pelo CHDS no material de referência certificado de fígado bovino, nota-se que ambos os valores foram próximos, obtendo uma recuperação de 98%, mesmo assim, este valor não foi concordante ao nível de 95% com o teste t não pareado. Todavia, as recuperações ficaram entre 85 e 106% em relação ao valor certificado.

5.7.2. Amostras de músculo, fígado e rim

Amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno) foram digeridas utilizando o CHDS. Para fins comparativos, as mesmas amostras foram digeridas com a MW-AD. Os resultados obtidos por ICP OES para macronutrientes (Ca, K, Mg, Na, S e P) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) utilizando os dois sistemas de preparo de amostra são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para macronutrientes (mg kg^{-1}) em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.

Amostras		Elementos (mg kg^{-1})					
		Ca	K	Mg	Na	S	P
Músculo bovino	MW-AD	54 \pm 5	3566 \pm 193	262 \pm 10	512 \pm 16	2174 \pm 83	2181 \pm 62
	CHDS	56 \pm 5	3432 \pm 25	250 \pm 3	514 \pm 3	2253 \pm 31	2216 \pm 11
Músculo suíno	MW-AD	63 \pm 1	3845 \pm 144	238 \pm 9	578 \pm 15	1879 \pm 92	2304 \pm 76
	CHDS	59 \pm 2	3703 \pm 62	230 \pm 4	587 \pm 3	1921 \pm 31	2337 \pm 64
Músculo de frango	MW-AD	46 \pm 1	3448 \pm 48	329 \pm 3	297 \pm 4	2090 \pm 6	2498 \pm 15
	CHDS	45 \pm 2	3568 \pm 22	328 \pm 1	309 \pm 1	2164 \pm 11	2667 \pm 17
Fígado bovino	MW-AD	61 \pm 4	3150 \pm 10	187 \pm 1	655 \pm 5	2290 \pm 12	3654 \pm 46
	CHDS	58 \pm 6	3140 \pm 24	176 \pm 2	642 \pm 7	2250 \pm 26	3612 \pm 136
Fígado suíno	MW-AD	63 \pm 1	2839 \pm 1	188 \pm 1	699 \pm 7	2257 \pm 12	3503 \pm 32
	CHDS	64 \pm 7	2903 \pm 20	180 \pm 4	705 \pm 6	2293 \pm 8	3727 \pm 46
Fígado de frango	MW-AD	57,0 \pm 0,3	2275 \pm 15	188 \pm 1	604 \pm 6	1830 \pm 14	2939 \pm 63
	CHDS	55,2 \pm 0,9	2380 \pm 10	192 \pm 3	638 \pm 2	1880 \pm 5	3031 \pm 25
Rim bovino	MW-AD	123 \pm 4	2317 \pm 13	178 \pm 1	1976 \pm 29	1890 \pm 16	2883 \pm 28
	CHDS	123 \pm 5	2396 \pm 20	173 \pm 1	2031 \pm 19	1903 \pm 10	2841 \pm 22
Rim suíno	MW-AD	96 \pm 2	2513 \pm 46	187 \pm 3	1443 \pm 23	1871 \pm 34	3023 \pm 56
	CHDS	96 \pm 3	2594 \pm 27	184 \pm 4	1455 \pm 18	1872 \pm 6	2899 \pm 33

Fonte: Autor, 2015.

A análise das Tabelas 8 e 9 mostram que os resultados obtidos para macro e micronutrientes utilizando os dois sistemas de digestão foram próximos para todos os analitos. No entanto, apenas 64% dos resultados obtidos pelos dois sistemas de

digestão foram concordantes entre si ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* pareado. Isto ocorreu devido aos pequenos desvios padrões obtidos para as réplicas, sendo estes da ordem de 1,3% para o CHDS e 2,0% para a MW-AD. No entanto, os valores determinados nas amostras utilizando o CHDS variaram entre 94 a 107% e 101 a 108% em relação aos valores determinados por MW-AD para macronutrientes e micronutrientes, respectivamente.

Tabela 9 - Resultados do ICP OES (média \pm desvio padrão) para micronutrientes (mg kg^{-1}) em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.

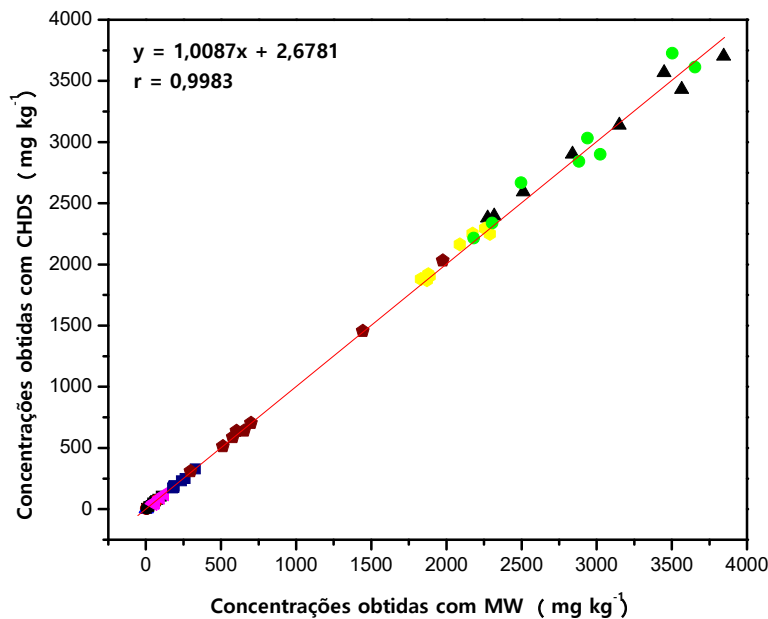
Amostras		Elementos (mg kg^{-1})			
		Fe	Cu	Mn	Zn
Músculo bovino	MW-AD	20,6 \pm 0,5	< 0,5	< 0,10	27,9 \pm 0,7
	CHDS	19,5 \pm 0,4	< 0,78	< 0,17	28,8 \pm 0,7
Músculo suíno	MW-AD	5,3 \pm 0,2	< 0,5	< 0,10	15,1 \pm 0,9
	CHDS	5,6 \pm 0,1	< 0,78	< 0,17	15,3 \pm 0,1
Músculo de frango	MW-AD	2,41 \pm 0,06	< 0,5	< 0,10	6,17 \pm 0,04
	CHDS	< 2,49	< 0,78	< 0,17	6,2 \pm 0,3
Fígado bovino	MW-AD	81,1 \pm 0,8	73,8 \pm 0,7	2,75 \pm 0,02	34,6 \pm 0,1
	CHDS	80,6 \pm 0,4	70,5 \pm 0,5	2,70 \pm 0,01	33,8 \pm 0,3
Fígado suíno	MW-AD	59,1 \pm 0,4	6,2 \pm 0,2	3,92 \pm 0,05	45,2 \pm 0,1
	CHDS	60,6 \pm 0,9	5,93 \pm 0,09	3,91 \pm 0,06	45,6 \pm 0,4
Fígado de frango	MW-AD	104 \pm 1	3,11 \pm 0,07	2,20 \pm 0,03	28,8 \pm 0,2
	CHDS	104,6 \pm 0,3	3,07 \pm 0,04	2,26 \pm 0,02	29,1 \pm 0,1
Rim bovino	MW-AD	64,6 \pm 0,6	3,4 \pm 0,1	1,01 \pm 0,02	21,8 \pm 0,1
	CHDS	67,4 \pm 0,8	3,16 \pm 0,05	1,10 \pm 0,01	21,9 \pm 0,2
Rim suíno	MW-AD	47 \pm 1	6,6 \pm 0,1	1,82 \pm 0,05	26,1 \pm 0,5
	CHDS	50,3 \pm 0,7	6,5 \pm 0,2	1,68 \pm 0,04	26,2 \pm 0,1

Fonte: Autor, 2015.

Para melhor visualização dos resultados foi feito a interpolação entre as concentrações obtidas pelo CHDS versus as obtidas pela MW-AD. A correlação entre os resultados obtidos pelo CHDS e a MW-AD está representada na Figura 19. Neste caso, o ideal é que o coeficiente de correlação linear (*r*) e o coeficiente angular (*A*) sejam igual a 1 e o intercepto (*B*) igual a 0. Porém, na prática nunca será

obtido $r = 1$, $A = 1$ e $B = 0$, isso é devido aos erros aleatórios presentes nos dois métodos comparados (MILLER; MILLER, 2010). Assim, os métodos de digestão aqui comparados apresentaram ótima correlação, obtendo-se $r = 0,9983$, $A = 1,0087$ e $B = 2,6781$.

Figura 19 - Correlação entre os valores obtidos pela MW-AD e os valores obtidos pelo CHDS para (■) Fe, (●) Cu, (▲) Mn, (●) Zn, (▼) Ca, (▲) K, (■) Mg, (●) Na, (●) S, (●) P nas amostras analisadas.



Fonte: Autor, 2015.

5.7.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) foi calculado seguindo as recomendações da IUPAC, sendo a concentração correspondente a 10 vezes o desvio padrão de 10 brancos independentes dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (CURRIE, 1995). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, os limites de quantificação obtidos pelo CHDS foram um pouco superiores aos limites de quantificação obtidos com MW-AD para os elementos Ca, Cu, Fe, Mg e Mn. Isso pode estar relacionado com os frascos de quartzo, a tampa de Teflon e o anel de FKM. Os frascos utilizados para decomposição assistida por radiação micro-ondas são totalmente de PFA, resultando em brancos analíticos menores para esses elementos. No entanto, os

limites de quantificação foram próximos para ambos os métodos de decomposição, não comprometendo a determinação destes elementos quando se utiliza o CHDS.

Tabela 10 - Limites de quantificação (LOQ) obtidos com CHDS e MW-AD.

Elementos	LOQ (mg kg ⁻¹)	
	CHDS	MW-AD
Ca	3,65	2,40
Cu	0,78	0,5
Fe	2,49	1,42
K	0,90	1,18
Mg	0,66	0,40
Mn	0,17	0,10
Na	3,15	6,26
P	3,80	3,93
S	3,50	3,73
Zn	0,85	0,96

Fonte: Autor, 2015.

5.8. Determinação de As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se em materiais de referência certificados e amostras por ICP MS/MS

A avaliação da exatidão do procedimento de digestão proposto com o CHDS foi feito através da digestão de materiais de referência certificados de músculo bovino (Bovine Muscle Powder NIST 8414), fígado bovino (Bovine Liver NIST 1577b) e rim suíno (Pig Kidney IRMM BCR 186). Amostras de músculo (bovino, suíno e de frango), fígado (bovino, suíno e de frango) e rim (bovino e suíno) foram digeridas utilizando o CHDS. Para fins comparativos, as mesmas amostras foram digeridas com a MW-AD. Os resultados obtidos para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se por ICP-MS/MS são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados do ICP-MS (média \pm desvio padrão) para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se (mg kg^{-1}) nos materiais de referência certificados digeridos ($n = 3$) com CHDS e em amostras digeridas ($n = 3$) com CHDS e MW-AD.

CRM		Elementos (mg kg^{-1})					
		As	Cd	Cr	Mo	Pb	Se
Pig kidney	Certificado	0,063 \pm 0,009	2,71 \pm 0,15	nc	nc	0,306 \pm 0,011	10,3 \pm 0,5
	CHDS	0,058 \pm 0,003 (92%)	2,58 \pm 0,07 (95%)	0,058 \pm 0,004	3,2 \pm 0,1	0,31 \pm 0,01 (101%)	10,2 \pm 0,3 (99%)
Bovine liver	Certificado	0,05*	0,50 \pm 0,03	nc	3,5 \pm 0,3	0,129 \pm 0,004	0,73 \pm 0,06
	CHDS	0,046 \pm 0,003 (92%)	0,46 \pm 0,02 (92%)	0,22 \pm 0,01	3,70 \pm 0,1 (106%)	0,133 \pm 0,005 (103%)	0,80 \pm 0,03 (110%)
Bovine Muscle	Certificado	0,009 \pm 0,003	0,013 \pm 0,011	0,071 \pm 0,038	0,08 \pm 0,06	0,38 \pm 0,24	0,076 \pm 0,010
	CHDS	0,0097 \pm 0,0003 (108%)	0,013 \pm 0,001 (100%)	0,074 \pm 0,003 (104%)	0,073 \pm 0,003 (91%)	0,36 \pm 0,01 (95%)	0,078 \pm 0,002 (103%)
Amostras							
Músculo bovino	MW-AD	0,0025 \pm 0,0001	< 0,0001	0,029 \pm 0,002	0,0051 \pm 0,0001	< 0,002	0,044 \pm 0,003
	CHDS	0,0028 \pm 0,0002	< 0,0004	0,026 \pm 0,001	0,00493 \pm 0,00007	< 0,002	0,0430 \pm 0,0007
Músculo suíno	MW-AD	0,00098 \pm 0,00008	< 0,0001	0,025 \pm 0,002	0,01157 \pm 0,00005	< 0,002	0,076 \pm 0,005
	CHDS	0,00111 \pm 0,00003	< 0,0004	0,022 \pm 0,001	0,0120 \pm 0,0003	< 0,002	0,074 \pm 0,002
Músculo de frango	MW-AD	0,00088 \pm 0,00006	< 0,0001	0,014 \pm 0,001	0,0271 \pm 0,0008	< 0,002	0,060 \pm 0,001
	CHDS	0,00100 \pm 0,00006	< 0,0004	0,013 \pm 0,001	0,029 \pm 0,001	< 0,002	0,063 \pm 0,004
Fígado bovino	MW-AD	0,00197 \pm 0,00007	0,0030 \pm 0,0003	0,0090 \pm 0,0005	0,76 \pm 0,04	0,0049 \pm 0,0002	0,167 \pm 0,004
	CHDS	0,0023 \pm 0,0002	0,0034 \pm 0,0002	0,0099 \pm 0,0003	0,81 \pm 0,01	0,0056 \pm 0,0004	0,163 \pm 0,001
Fígado suíno	MW-AD	0,0012 \pm 0,0001	0,00155 \pm 0,00006	0,0041 \pm 0,0003	1,09 \pm 0,01	< 0,002	0,41 \pm 0,01
	CHDS	0,00129 \pm 0,00004	0,00172 \pm 0,00009	0,0038 \pm 0,0003	1,14 \pm 0,04	< 0,002	0,38 \pm 0,02
Fígado de frango	MW-AD	0,0014 \pm 0,0001	< 0,0001	0,0158 \pm 0,0004	0,662 \pm 0,006	0,0025 \pm 0,0002	0,41 \pm 0,02
	CHDS	0,00148 \pm 0,00006	< 0,0004	0,0173 \pm 0,0009	0,668 \pm 0,009	0,0030 \pm 0,0003	0,381 \pm 0,008
Rim bovino	MW-AD	0,0076 \pm 0,0002	0,0480 \pm 0,0009	< 0,012	0,343 \pm 0,008	0,013 \pm 0,005	1,09 \pm 0,04
	CHDS	0,0083 \pm 0,0004	0,0495 \pm 0,0008	< 0,009	0,356 \pm 0,006	0,011 \pm 0,002	1,03 \pm 0,04
Rim suíno	MW-AD	0,0028 \pm 0,0002	0,0228 \pm 0,0002	0,011 \pm 0,001	0,705 \pm 0,001	0,0125 \pm 0,0003	1,5 \pm 0,1
	CHDS	0,00304 \pm 0,00006	0,0240 \pm 0,0008	0,0123 \pm 0,0007	0,73 \pm 0,02	0,0134 \pm 0,0005	1,41 \pm 0,03

nc = não certificado; *Valor de referência.

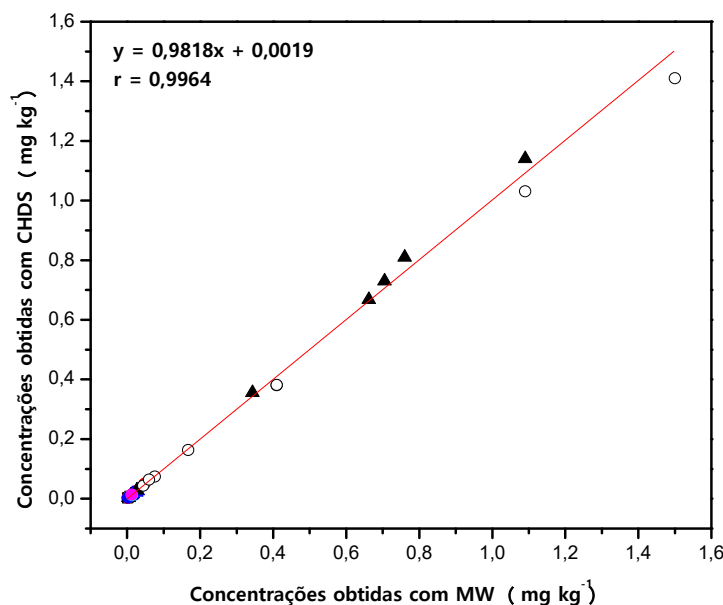
Fonte: Autor, 2015.

A análise da Tabela 11 mostra que a concentração de As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se nos materiais de referência certificados digeridos com o CHDS ficaram próximos dos valores certificados, obtendo-se recuperações entre 92 a 110%. Além disso, todos os valores obtidos foram concordantes com os valores certificados ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* não pareado.

A análise da Tabela 11 mostra que os resultados obtidos para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se utilizando os dois sistemas de digestão ficaram próximos e de acordo com o teste *t* pareado, todos os valores obtidos para os dois sistemas de digestão foram concordantes ao nível de 95% de confiança. Os valores determinados nas amostras utilizando o CHDS variaram entre 88 a 118% para As, Cd e Pb e 95 a 114% Cr, Mo e Se em relação aos valores determinados pela MW-AD. As amostras foram digeridas em triplicata utilizando os dois sistemas de digestão (CHDS e MW-AD) e o desvio padrão relativo (RSD) dos resultados obtidos para os analitos de interesse variaram de 0,2 a 10%.

A correlação entre as concentrações obtidas utilizando a MW-AD e as concentrações obtidas utilizando o CHDS está representada na Figura 20. Os dois métodos de digestão quando comparados, apresentaram ótima correlação dos resultados, obtendo-se $r = 0,9964$, $A = 0,9818$ e $B = 0,0019$.

Figura 20 - Correlação entre os valores obtidos pela MW-AD e os valores obtidos pelo CHDS para (■) As, (●) Cd, (▲) Cr, (▲) Mo, (●) Pb e (○) Se nas amostras analisadas.



Fonte: Autor, 2015.

5.8.1. Limite de quantificação

O cálculo do limite de quantificação foi realizado seguindo as mesmas recomendações descritas anteriormente na sessão 5.7.3. Os limites de quantificação obtidos com os dois sistemas de digestão estão expostos na Tabela 12. Ambos os métodos de digestão apresentaram valores dos brancos analíticos baixos. Apenas para o elemento Cd o CHDS obteve limite de detecção acima do limite de detecção obtido pela MW-AD. No entanto, os limites de quantificação para As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se foram próximos para ambos os métodos de decomposição, demonstrando um desempenho adequado do CHDS para o preparo de amostras visando a determinação de elementos em baixas concentrações.

Tabela 12 - Limites de quantificação (LOQ) obtidos com CHDS e MW-AD por ICP-MS/MS.

Elementos	LOQ (mg kg ⁻¹)	
	CHDS	MW-AD
As	0,0002	0,0003
Cd	0,0004	0,0001
Cr	0,009	0,012
Mo	0,0003	0,0005
Se	0,003	0,004
Pb	0,002	0,002

Fonte: Autor, 2015.

5.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aperfeiçoamento feito no CHDS tornou-o mais seguro e mais prático para análise de carne “in natura” em laboratórios dedicados a análise de rotina. O aprimoramento feito não altera significativamente o baixo custo do equipamento. Apesar de o CHDS não contar com sensor de temperatura do líquido ou sensor de pressão, isso não tornou-se limitante pois todos os frascos atingem aproximadamente a mesma temperatura do bloco digestor. Vale ressaltar que dependendo da natureza da amostra, reações exotérmicas podem ocorrer no

momento da digestão, provocando picos elevados de temperatura e pressão. Sendo assim, é necessário o conhecimento prévio das amostras.

O procedimento de decomposição proposto neste trabalho é simples e utiliza a amostra de carne “in natura” previamente processada, não sendo necessária etapa de secagem prévia. Assim, diminui-se tanto o tempo de preparo da amostra como os riscos de contaminação da mesma. Este procedimento de decomposição é relativamente rápido, sendo capaz de decompor 14 amostras em 75 minutos. O procedimento de decomposição assistido por radiação micro-ondas leva cerca de 40 minutos para decompor 6 amostras. Assim, o CHDS possui maior frequência analítica que o forno micro-ondas utilizado neste trabalho. O CHDS permite determinar elementos voláteis (por exemplo As, Cd, Pb, Se), os quais podem ser facilmente volatilizados em procedimentos de decomposição conduzidos em frasco aberto.

6. CONCLUSÕES

O CHDS é um sistema simples com baixo custo de instrumentação e manutenção, pois utiliza componentes facilmente encontradas no mercado nacional. O desenvolvimento da tampa de Teflon com o sistema de alívio de pressão permite ao analista aliviar a pressão dos frascos ao término da digestão de forma simples, prática e segura. Ainda, esse sistema digere até 14 amostras em 75 minutos, que pode ser considerado um tempo relativamente curto se comparado aos sistemas de digestão comercialmente disponíveis.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que o sistema de digestão com aquecimento condutivo em frasco fechado é uma alternativa simples, efetiva e de baixo custo para a digestão de amostras de músculo, fígado e rim visando à determinação de macronutrientes, micronutrientes e contaminantes inorgânicos. O procedimento de preparo de amostras de carne proposto mostrou-se adequado para técnicas espectroanalíticas, tais como, ICP OES e ICP-MS. O CHDS foi capaz de fornecer resultados satisfatórios, obtendo-se concordância com os três materiais de referência certificados. Os resultados para as amostras de carne digeridas com CHDS apresentaram ótima correlação com aqueles obtidos com o método de digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado. Os limites de quantificação obtidos para o CHDS foram adequados e atendem à legislação estabelecida pela União Europeia 1881/2006 para Cd e Pb e a instrução normativa SDA N°13 para As, Cd e Pb em produtos de origem animal. Além disso, o CHDS opera de acordo com as recomendações da química verde, uma vez que pequenas quantidades de reagentes são necessárias e a geração de resíduos é mínima.

REFERÊNCIAS

- AGAZZI, A.; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 67, n. 1/3, p. 337-341, 2000.
- AKINYELE, I. O.; SHOKUNBI, O. S. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. **Food Chemistry**, v. 173, p. 682-684, 2015.
- AMAI, R. S.; VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS) for overcoming molybdenum oxide interferences on Cd determination in milk. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 64-68, 2015.
- AYDIN, I. Comparison of dry, wet and microwave digestion procedures for the determination of chemical elements in wool samples in Turkey using ICP-OES technique. **Microchemical Journal**, v. 90, p. 82-87, 2008.
- BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA-PEREIRA, F.; ROMERO, V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 11, p. 1831-1857, 2012.
- BIESALSKI, H. K. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 509-524, 2005.
- BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; DRESSLER, L. V.; FORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 394-398, 2011.
- BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica Chimica Acta**, v. 837, n. 1, p. 16-22, 2014.
- pBRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2042-1999.pdf>. Acesso em: 14 dez 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Exportação**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 04 ago. 2015a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 13, de 15 julho de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 jul. 2015b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2013-2015%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20do%20PNCRC%20Animal%202015.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2015.

BRESSY, F. C.; BRITO, G. B.; BARBOSA, I. S.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. **Microchemical Journal**, v. 109, n. 1, p. 145-149, 2013.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1/3, p. 63-80, 1998.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Dec. 2006. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol_Reg1881_2006.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2016.

COSTA, L. M.; SILVA, F. V.; GOUVEIA, S. T.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 10, p. 1981-1985, 2001.

COSTA, L. M.; SANTOS, D. C. M. B.; HATJE, V.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Focused-microwave-assisted acid digestion: evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 3, p. 238-241, 2009.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 1699-1723, 1995.

DEMIRBAS, A. Proximate and heavy metal composition in chicken meat and tissues. **Food Chemistry**, v. 67, p. 27-31, 1999.

DEMIREL, S.; TUZEN, M.; SARACOGLU, S.; SOYLAK, M. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1020-1026, 2008.

DEMIREZEN, D.; URUÇ, K. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. **Meat Science**, v. 74, n. 2, p. 255-260, 2006.

ELLEN, G.; VAN LOON, J. W. Determination of cadmium and lead in foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction: test with certified reference materials. **Food Additives and Contaminants: Chemistry, Analysis, Control, Exposure e Risk Assessment**, v. 7, n. 2, p. 265-273, 1990.

FECHER, P.; RUHNKE, G. Cross contamination of lead and cadmium during dry ashing of food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 8, p. 787-791, 2002.

FERREIRA, S. L. C.; SILVA, L. O. B.; SANTANA, F. A. de.; SILVA JUNIOR, M. M. da; MOTOS, G. D.; SANTOS, W. N. L. dos. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307-310, 2013.

FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1051-1064, 2007.

GEROLA, A. P.; PELOI, L. S.; HIOKA, N.; SANTIN FILHO, O.; KATO, L. A. Determinação da entalpia de vaporização de líquidos pelo método do isotenisópio de Smith e Menzies. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 482-488, 2010.

GINÉ, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente**: (ICP AES). Piracicaba: CENA/USP, 1998. 144 p.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 2, p. 269-275, 2001.

HILL, S. J. **Inductively coupled plasma spectrometry and its applications**. Sheffield: Blackwell, 2007. 427 p.

HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps. **Talanta**, v. 54, n. 6, p. 1021-1038, 2001.

HOENIG, M.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, S.; VASSILEVA, E.; QUEVAUVILLER, P. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 85-94, 1998.

HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCH, G. D.; SVEC, H. J. Inductively coupled argon plasma as anion source for mass spectrometric determination of trace elements. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 2283-2289, 1980.

IWEGBUE, C. Heavy metal composition of livers and kidneys of cattle from Southern Nigeria. **Veterinarski Arhiv**, v. 78, n. 5, p. 401-410, 2008.

KNAPP, G.; MAICHIN, B.; BAUMGARTNER, U. Interferences in ICP-OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion. **Atomic Spectroscopy**, v. 19, n. 6, p. 220-222, 1998.

KORN, M. das G. A.; BOA MORTE, E. S. da; SANTOS, D. C. M. B. dos; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C. dos; SANTOS, E. B. G. M, dos. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, 2008.

KRUG, F. J. (Org). **Método de preparo de amostras**: fundamentos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba, 2010. 340 p.

MAY, T. W.; WIEDMEYER, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, v. 19, n. 5, p. 150-155, 1998.

MILLER, J.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6th ed. Harlow: Ellis Horwood, 2010. 278 p.

MIRANDA, K.; PEREIRA FILHO, E. R.; GOMES NETO, J. A. A new closed-vessel conductively heated digestion system: fostering plant analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 5, p. 825-831, 2014.

MIRANDA, K.; VIEIRA, A. L.; GOMES NETO, J. A. High-throughput sugarcane leaf analysis using a low cost closed-vessel conductively heated digestion system and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 6, n. 23, p. 9503-9508, 2014.

MIRANDA, K.; VIEIRA, A. L.; BECHLIN, M. A.; FORTUNATO, M. F.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A. Determination of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Se, and Zn in foodstuffs by atomic spectrometry after sample preparation using a low-cost closed-vessel conductively heated digestion system. **Food Analytical Methods**, 2015. doi:10.1007/s12161-015-0371-8.

MOORE, G. L. **Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 340 p.

NAKAHARA, T. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 1997.

NANO, R. M. W.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L. C.; BACCAN, N.; CADORE, S. Statistical mixture design development of digestion methods for oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 559-564, 2009.

NELMS, S. M. (Ed.). **Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook**. Oxford: Blackwell, 2005. 485 p.

NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C.; ARAÚJO, G. C. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1855-1876, 2002.

OKAMOTO, K.; FUWA, K. Low-contamination digestion bomb method using a teflon double vessel for biological materials. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 1758-1760, 1984.

ORESTE, E. Q.; OLIVEIRA, R. M. de; NUNES, A. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. **Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1590-1595, 2013.

RICHTER, R. C.; LINK, D.; KINGSTON, H. M. Microwave-enhanced chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 31A-37A, 2001.

ROCHA, D. L.; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 79-92, 2013.

RUIZ-DE-CENZANO, M.; ROCHINA-MARCO, A.; RUIZ, J.; CERVERA, M. L.; GUARDIA, M. de la. A comparative study on sample preparation procedures for supplementary foods by ICP-OES: green chemistry considerations. **Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 3637-3644, 2015.

SAHAYAM, A. C.; CHAURASIA, S. C.; VENKATESWARLU, G. Dry ashing of organic rich matrices with palladium for the determination of arsenic using inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 17-19, 2010.

SCP SCIENCE. **NovaWAVE FA**. Disponível em:
<<http://www.scpscience.com/en/products/categories?id=421&name=novawave-fa>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, n. 8, p. 1207-1268, 1996.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v. 78, n. 1/2, p. 3-13, 2008.

SUGIYAMA, N.; SHIKAMORI, Y. Removal of spectral interferences on noble metal elements using MS/MS reaction cell mode of a triple quadrupole ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30 n. 12, p. 2481-2487, 2015.

SZKODA, J.; MUDZKI, J. A. N. Ž. Determination of lead and cadmium in biological material by graphite furnace atomic absorption spectrometry method. **Bulletin Veterinary Institute in Pulawy**, n. 49, p. 89-92, 2005.

TAYLOR, E. H. **Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques**. San Diego: Academic Press, 2001. 294 p. TECHNICAL GLASS PRODUCTS: **Trace impurities**. Painesville, 2010. Disponível em: <http://www.technicalglass.com/trace_impurities.html>. Acesso em: 2 fev. 2015.

TIZIOTO, P. C.; GROMBONI, C. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, M. M.; MUDADU, M. A.; THOLON, P.; ROSA, A. N.; TULLIU, R. R.; MEDEIROS, S. R.; NASSU, R. T. REGITANO, L. C. A. Calcium and potassium content in beef: influences on tenderness and associations with molecular markers in Nellore cattle. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 436-440, 2014.

TSCHÖPEL, P.; KOTZ, L.; SCHULZ, W.; VEBER, M.; TÖLG, G. Zur ursache und vermeidung systematischer fehler bei elementbestimmungen in wäßrigen lösungen im ng/ml- und pg/ml-bereich. **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 302, n. 1, p. 1-14, 1980.

WASILEWSKA, M.; GOESSLER, W.; ZISCHKA, M.; MAICHIN, B.; KNAPP, G. Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 9, p. 1121-1125, 2002.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. Untersuchungen zur kohlenstoffbilanz beim aufschluß biologischer probenmaterialien mit salpetersäure. **Fresenius Zeitung für Analytische Chemie**, v. 322, p. 354-358, 1985.

YOUNG, C. G.; AMAIS, R. S.; SCHIAVO, D.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of sulfur in biodiesel microemulsions using the summation of the intensities of multiple emission lines. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 995-999, 2011.

ZENEBON, O. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.