



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCISCO LUAN FONSÊCA DA SILVA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA NO
PREPARO DE AMOSTRAS DE LINHAÇA E CAMARÃO PARA ANÁLISE DE
TRAÇOS POR FAAS E ICP OES**

FORTALEZA
2017

FRANCISCO LUAN FONSÊCA DA SILVA

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA NO PREPARO DE
AMOSTRAS DE LINHAÇA ECAMARÃO PARA ANÁLISE DE TRAÇOS POR FAAS E ICP
OES

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.
Orientadora: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos
Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S58e Silva, Francisco Luan Fonsêca da.
Estudo da potencialidade da radiação infravermelha no preparo de amostra de linhaça e camarão para análise de traços por FAAS e ICP OES / Francisco Luan Fonsêca da Silva. – 2017.
77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos .
Coorientação: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.
1. Preparo de Amostra. 2. FAAS. 3. ICP OES. 4. Radiação Infravermelha . I. Título.

CDD 540

FRANCISCO LUAN FONSECA DA SILVA

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA NO PREPARO DE
AMOSTRAS DE LINHAÇA ECAMARÃO PARA ANÁLISE DE TRAÇOS POR FAAS E ICP
OES

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.
Orientadora: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos
Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes

Aprovada em: 21/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Sandro Thomaz Gouveia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Invictus

Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu - eterno e espesso,
A qualquer deus - se algum acaso existe,
Por mi'alma insubjugável agradeço.

Nas garras do destino e seus estragos,
Sob os golpes que o acaso atira e acerta,
Nunca me lamentei - e ainda trago
Minha cabeça - embora em sangue - ereta.

Além deste oceano de lamúria,
Somente o Horror das trevas se divisa;
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.

Por ser estreita a senda - eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou dono e senhor de meu destino;
Eu sou o comandante de minha alma.

Willian Ernerst Henley

AGRADECIMENTOS

Ao Universo ou a força que o mantém.

Aos meus pais, em especial a minha mãe por acreditar em mim em todos os momentos e nunca me pressionar ou me deixar abater, ela foi e é meu porto seguro que sempre vou recorrer durante as tempestades que nos assolam durante a vida.

Aos meus avós pelo apoio incondicional, os pedidos de proteção e por me acalmarem sempre que precisei e sempre terem um prato de comida quentinha quando requisitei.

A minha família de Família de Fortaleza, em especial A Bebel e Mary Ann por me receberem tão bem na cidade nova e me fazerem sentir realmente parte da família; ao Gerente Jackson por me mostrar que a vida é simples e você deve ser grato todos os dias; a Vó Villany que mesmo não estando nesse mundo na matéria a qual conhecemos tenho certeza que está em espírito.

A todos meus amigos da graduação que ainda estão pela Universidade Federal do Ceará por sempre me escutarem e gastarem aquele tempinho comigo nas nossas conversas e brincadeiras em especial aos PICIcopatas: Fernando, Bárbara Brasil, Bárbara Nobre, Josiane, Camila Ellert e Taynara por sempre estarem disponíveis e alegrarem meus dias com nossas discussões infundadas.

Aos amigos de Independência: Lucas, Maciel, Gustavo, Camila Aparecida, Valesca, por entenderem meus tempos curtos e nunca desistirem de mim.

À Professora Doutora Nilce Gramosa pela ajuda na interpretação de espectros de infravermelho e RMN e a sua disponibilidade junto ao CENAUREM-UFC.

A todos os amigos do Laboratório de Estudos em Química Aplicada (LEQA): Victor, Tamyres, Renato, Fábria e Rogislane pelos momentos de discussão e companheirismo.

À Débora e à Nandressa pelos momentos de descontração, brincadeiras e trabalho no laboratório onde pude extravasar um pouco de mim.

À professora Lívia Paulia pelos bons momentos de discussão e brincadeira e por estar sempre disponível quando precisei.

Ao Professor Sandro pela confiança, amizade e as ideias que trocamos sempre que nos vemos, além de ter sido a primeira pessoa a me fazer querer ser químico e por um jogo do destino entrei no seu laboratório e é o lugar onde me encontrei mais feliz.

À Professora Gisele por todos os anos de amizade, companheirismo, discussões e confiança em mim e por fazer saber que ela sempre estará lá quando precisar.

À Professora Wladiana pela orientação e pela amizade, por me aceitar no laboratório todos esses anos e por estar sempre disponível para uma boa conversa.

Ao João Gabriel pelos momentos que me fez desestressar com a conversa, as brincadeiras ou até mesmo as brigas.

Ao João Pedro que muito mais que um amigo é um irmão e sempre esteve presente em todos os dias do mestrado e sem a sua ajuda, puxão de orelha e momentos de brincadeira esse trabalho não teria sido concluído.

RESUMO

O preparo de amostras é uma etapa crítica da sequência analítica, portanto busca-se o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras mais rápidos, eficientes e de baixo custo. Sistemas que utilizam radiação infravermelha como fonte de aquecimento têm-se mostrado como uma boa alternativa para alcançar tais objetivos. A extração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça e As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e V em amostras de camarão par a posterior quantificação por FAAS e ICP OES, respectivamente, foi realizada em um sistema usando radiação infravermelha. Planejamento fatorial completo em dois níveis e a função de desejabilidade foram aplicados para avaliar a melhor condição de extração dos analitos para as amostras estudadas. Para amostra de linhaça, as condições experimentais foram: massa de amostra de 2,0 g, 8 mL de HNO₃ e 8 min de tempo de aquecimento no sistema de Infravermelho (IR) com 500 W de potência. E, para amostra de camarão: 1,0 g de massa de amostra, 8 mL de HNO₃, 8 min de preparo de amostras e 500 W de potência da lâmpada. Nessas condições, resultados com boa exatidão e precisão < 10% RSD para linhaça e < 17% RSD para camarão foram obtidos. A exatidão foi verificada através da análise de amostras de material de referência certificado de farelo de arroz e tecido de ostra. A eficiência de decomposição do sistema de IR foi avaliada pela análise de %RCC em material de referência certificada de tecido de ostra em comparação com os resultados obtidos em digestão usando bloco digestor. Ambos os sistemas de preparo de amostras apresentaram valores de %RCC similares. Realizou-se também a análise de matérias padrões de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico utilizando o sistema IR e bloco digestor onde pode se observar valores semelhantes de % carbono residual (%RCC) para amostra de glicina, mas comportamento inverso para as amostras de fenilalanina e ácido nicotínico. Observou-se também a influência positiva na inserção de glicose na decomposição desses compostos diminuindo a %RCC de todos. O sistema de extração por IR se apresentou como uma alternativa rápida, de baixo custo e eficiente na extração de elementos inorgânicos em amostras de alimentos de origem vegetal e animal, com capacidade de acomodar massas relativamente grandes de amostra, aliviando possíveis problemas de homogeneidade da amostra, além de aumentar o poder de detecção.

Palavras-Chaves: Preparo de amostra. Radiação infravermelha. Linhaça. Camarão. ICP-OES. FAAS

ABSTRACT

The sample preparation is a critical step of the analytical sequence, so the development of faster, more efficient and cheaper sample preparation methods is important. Sample preparation systems that use infrared radiation as a source of heating have been shown as a good alternative to achieve such objectives. The extraction of Cu, Fe, Mn and Zn in flax samples and As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se and V in shrimp samples for subsequent quantification of these elements using FAAS and ICP OES, respectively, was studied. Full factorial planning at two levels and desirability function were applied to evaluate the best extraction condition of the analytes from the samples studied. For flaxseed sample, the experimental conditions were: 2.0 g sample mass, 8 mL HNO₃, and 8 min of heating time at 500 W infrared (IR) lamp power. For shrimp sample preparation: 1.0 g of sample mass, 8 mL of HNO₃, 8 min of heating time at 500 W of IR lamp power. In these conditions, results with good accuracy and precision <10% RSD for flaxseed and <17% RSD for shrimp were obtained. The accuracy of the methods was verified by analysis of rice bran and oyster tissue certified reference materials. The efficiency of IR extraction system was evaluated by %RCC obtained to certified reference material (oyster tissue) analysis in comparison with those when was used digester block. Both sample preparation methods showed similar % RCC values. Standard samples of glycine, phenylalanine and nicotinic acid were also submitted to IR system and digester block, and, both systems presented similar % RCC values for glycine. However, the inverse behavior was obtained for phenylalanine and nicotinic acid. It was also observed the positive effect of the presence of glucose on digestion of these compounds, reducing the %RCC for all of them. The IR-assisted sample preparation system provides a quick and inexpensive alternative to other conventional techniques for the analysis of trace elements in samples of food of plant and animal origin. It had the capacity to accommodate relatively large sample masses, avoiding homogeneity problems, as well as increasing the detection power.

KEY-WORDS: Sample preparation. Infrared radiation. Flaxseed. Shrimp. ICP-OES. FAAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectro da radiação eletromagnética.....	23
Figura 2 – Esquema de uma lâmpada de tungstênio.....	23
Figura 3 – Protótipo de sistema de preparo de amostras utilizando radiação infravermelha (IR) como fonte de aquecimento	33
Figura 4 – Gráficos de desejabilidade obtidos do planejamento experimental para extração de Cu, Fe, Mn e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de linhaça. (4A: Volume de HCl X Massa; 4B: Tempo X Volume de HCl; 4C: Tempo X Massa).....	41
Figura 5 – Espectro de infravermelho para a amostra de linhaça dourada desengordura antes e depois do preparo de amostras usando IR como fonte de aquecimento	48
Figura 6 – Gráficos de desejabilidade obtidos no planejamento experimental para a extração de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de camarão. (6A: Massa X Tempo; 6B: Tempo X Potência; 6C: Potência X Massa)	50
Figura 7 – Espectro de infravermelho da amostra de camarão antes e depois da digestão assistida por radiação infravermelha	56
Figura 8 – Estruturas dos compostos orgânicos utilizados nos experimentos	60
Figura 9 – Gráficos de desejabilidade obtidos no planejamento experimental para análise do teor de carbono residual em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico após digestão usando sistema IR (8A: Potência X Volume de HNO ₃ ; 8B: Tempo X Volume de HNO ₃ ; 8C: Massa X Potência)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Parâmetros operacionais utilizados no equipamento de absorção atômica com chama para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça.....	33
Tabela 2	– Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES para a determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn em amostras de camarão.....	34
Tabela 3	– Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para otimização do método de preparo de amostras de linhaça.....	38
Tabela 4	– Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para otimização do método de preparo de amostras de camarão.....	39
Tabela 5	– Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para avaliação das variáveis significativa na decomposição de aminoácidos por radiação IR.....	41
Tabela 6	– Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça marrom e dourada quantificados por FAAS em mg kg ⁻¹ (média ± sd, n=3)	46
Tabela 7	– Teores de Cu, Fe, Mn e Zn (mg kg ⁻¹) quantificados por FAAS em material de referência 15: Farelo de Soja após digestão em sistema utilizando IR como fonte de aquecimento (média ± IC; n=3, 95 % de confiança).....	48
Tabela 8	– Teores de Cu, Fe, Mn e Zn (mg kg ⁻¹) em amostra de linhaça desengordurada após decomposição em sistema utilizando IR como fonte de aquecimento (média ± sd; n=3).....	49
Tabela 9	– Limites de quantificação para Cu, Fe, Mn e Zn analisados em amostras de linhaça por FAAS após extração assistida por radiação infravermelha.....	51
Tabela 10	– Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn em amostra de camarão por ICP OES após digestão assistida por radiação infravermelha. (média ± sd, n=3).....	56

Tabela 11 – Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em material de referência certificado NIST 1566b Oyster Tissue após preparo de amostra assistido por radiação infravermelha. (média ± IC, n=3, 95 % de confiança).....	57
Tabela 12 – Limites de quantificação para determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em camarão, após preparo de amostra assistido por radiação infravermelha.....	59
Tabela 13 – Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em amostra de referência certificado NIST 1566b Oyster Tissue, após digestão em bloco digestor. (média ± IC, n=3; 95% de confiança).....	62
Tabela 14 – Determinação de C e N em amostras de NIST 1566b e camarão após decomposição em bloco digestor e pelo sistema IR.....	63
Tabela 15 – Determinação do teor de carbono residual (%RCC) em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico após digestão no sistema IR e bloco digestor. (média ± sd, n=2.....	66
Tabela 16 – Teores de %RCC em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico utilizando sistema de decomposição IR na presença de glicose. (média ± sd, n=3).....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Métodos ópticos de análise	18
3.2	Preparo de amostra	19
3.2.1	<i>Digestão assistida por radiação micro-ondas</i>	19
3.2.2	<i>Radiação Micro-ondas Focalizada</i>	20
3.2.3	<i>Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC) e por Micro-ondas Focalizado (FMIC)</i>	20
3.2.4	<i>Preparo de amostras em câmara única de reação (SRC)</i>	21
3.2.5	<i>Extração assistidas por ultrassom</i>	22
3.3	A radiação infravermelha	23
3.3.1	<i>Uso da Radiação infravermelha no preparo de amostras</i>	24
3.4	O HNO₃ no preparo de amostras	26
3.5	Como avaliar a eficiência do preparo de amostras orgânicas	27
3.6	Linhaça	27
3.7	Camarão	28
4	EXPERIMENTAL	30
4.1	Reagentes e soluções	30
4.2	Amostras	30
4.3	Instrumentação	31
4.4	Construção do protótipo de sistema de decomposição por radiação infravermelha (IR – do inglês infrared)	33

4.5	Digestão das amostras de linhaça no sistema de preparo de amostra assistido por IR.....	34
4.6	Digestão das amostras de camarão no sistema de preparo de amostras assistido por IR.....	35
4.7	Planejamento experimental	35
4.8	Preparo de amostras para análise por Espectrometria de Infravermelho	37
4.9	Decomposição de amostra de tecido de ostra SRM NIST 1566b – Oyster Tissue por bloco digestor	37
4.10	Avaliação dos parâmetros que influenciam na eficiência de decomposição utilizando radiação infravermelha.....	37
4.11	Modelo de superfície de resposta: função desejabilidade	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Avaliação do planejamento experimental para a amostra da linhaça	41
5.2	Aplicação do método de preparo de amostras assistido por radiação infravermelha para amostras de linhaça.....	43
5.3	Validação do método proposto para a amostra de linhaça.....	44
5.4	Avaliação da remoção da fase lipídica na extração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça submetidas à decomposição utilizando IR.....	45
5.5	Avaliação dos limites de quantificação do método proposto para amostras de linhaça	46
5.6	Análise dos espectros de infravermelho nas amostras de linhaça	47
5.7	Avaliação do planejamento experimental para a amostra de camarão.	49
5.8	Aplicação do método de preparo de amostra assistido por radiação infravermelha para amostras de camarão	51
5.9	Validação do método proposto para a decomposição de amostras de camarão.....	52
5.10	Avaliação dos limites de quantificação do método de preparo de amostra proposto para camarão	54
5.11	Análise dos espectros de infravermelho nas amostras de camarão	55

5.12	Análise de C dissolvido e carbono residual em amostras NIST 1566b – Oyster Tissue	58
5.13	Avaliação dos parâmetros de influência na digestão utilizando radiação infravermelha como fonte de aquecimento	60
6	CONCLUSÕES	64
	Referências	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A etapa de preparo de amostra em uma sequência analítica é comumente chamada de “calcanhar de Aquiles”, uma vez que é a etapa que requer maiores custos, demanda mais tempo e é responsável pela maior inserção de erros na análise química (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2013; ELLISON; HARDCASTLE, 2012). No entanto, é normalmente indispensável para a análise de metais traços por técnicas espectroanalíticas, visto que o alto teor de carbono orgânico pode causar interferências químicas e/ou espectrais na análise por essas técnicas e/ou diminuir a vida útil do equipamento (KRUG; ROCHA, 2016).

A digestão de amostras orgânicas empregando forno de micro-ondas com cavidade é um método bastante utilizado em análises de elementos traços por técnicas espectroanalíticas. Nesse sistema é possível alcançar altas pressões e temperaturas, os quais permitem a decomposição completa da matéria orgânica disponibilizando os elementos na sua forma inorgânica mais simples (BARANOWSKA, 2016). Devido às altas pressões atingidas no equipamento, a massa de amostra a ser decomposta é limitada em aproximadamente 250 mg, dependendo do teor de carbono presente na amostra, para evitar explosões do sistema. Essa limitação de massa pode prejudicar a sensibilidade do método, além de produzir altos desvios nas medidas quando se utilizam amostras de matriz heterogênea.

Com o objetivo de aumentar a massa de amostra submetida ao processo de decomposição, o uso de radiação micro-ondas focalizada em frascos abertos é uma boa alternativa. Nessa técnica, podem ser utilizadas massas de até 5,0 g de amostra e, uma vez que o sistema não é pressurizado, a possibilidade de explosões é minimizada. Contudo, um grande volume de ácido é requerido nessa análise, o que aumenta as chances de contaminação da amostra e por consequência valores de brancos mais elevados são obtidos, além disso o digerido requer diluições excessivas antes da quantificação (NÓBREGA et al., 2002).

Sistemas utilizando combustão iniciada por micro-ondas também foram propostas como alternativa para o aumento de massa de amostra a ser decomposta com boa eficiência de decomposição (DE MORAES FLORES et al., 2004). Contudo, o equipamento comercial para essa técnica tem elevado custo e a necessidade de analistas capacitados para sua utilização. Além disso, a pressurização com inserção de oxigênio é necessária para esse método, o que deixa o analista sujeito a maiores riscos de acidente.

Além da sensibilidade do método, baixos custos e rapidez são fatores relevantes no desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras. Mínimo consumo de reagentes com

o propósito de reduzir a geração de resíduos, seguindo os princípios da química verde, também se destaca como meta para novos procedimentos. Avanços no preparo de amostras buscam por técnicas que agreguem essas qualidades sem negligenciar a eficiência de decomposição.

A radiação infravermelha não é comumente utilizada no preparo de amostras, sendo mais utilizada na subdestilação de ácidos em sistemas abaixo do ponto de ebulição e na secagem de amostras (KRUG; ROCHA, 2016). Contudo, trabalhos recentes na literatura reportam o uso de radiação infravermelha na decomposição efetiva de amostras orgânicas (DANTAS et al., 2013; GOUVEIA; FATIBELLO-FILHO; NÓBREGA, 2000; WANG; BRINDLE, 2014a; ZHANG et al., 2017).

A literatura reporta boa eficiência de decomposição de matéria orgânica utilizando radiação infravermelha, com capacidade de pré-digestão em torno de 80% da massa original, o que torna o método atraente para a combinação em forno de micro-ondas com cavidade (DANTAS et al., 2013) no intuito de aumento de massa de amostra a ser digerida com segurança em um sistema pressurizado. Há também tentativas do uso da radiação infravermelha sozinha no preparo da amostra, sendo GOUVEIA; FATIBELLO-FILHO; NÓBREGA, 2000, pioneiros no seu uso, obtendo recuperações acima de 80% para diversos elementos em amostras certificadas de fígado bovino e folha de maçã.

Métodos utilizando radiação infravermelha no preparo de amostra, até o momento, não utilizam sistemas pressurizados e, portanto, a temperatura máxima do sistema de decomposição restringe-se à temperatura de ebulição da mistura oxidante. O meio oxidante exerce um papel importante em sistemas de decomposição por via úmida à pressão ambiente. O ácido nítrico é o reagente mais utilizado no preparo de amostras devido a sua fácil obtenção e purificação, alta eficiência na decomposição de matéria orgânica e por formar sais de nitrato solúveis (GONZALEZ et al., 2009). Contudo, a temperatura de ebulição da sua forma azeotrópica comumente empregada (65% m m⁻¹) é de 121°C. A literatura reporta que digestões com ácido nítrico são pouco eficientes para a decomposição de proteínas e gorduras quando em temperaturas abaixo de 280 °C (KRUG; ROCHA, 2016; WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989). Apesar disso, estudos com a radiação infravermelha demonstram uma boa oxidação da matéria orgânica à pressão atmosférica (DANTAS et al., 2013; GOUVEIA; FATIBELLO-FILHO; NÓBREGA, 2000).

Dessa forma, o presente trabalho propõe estudar a eficiência de um sistema de tratamento de amostra que utiliza radiação infravermelha como fonte de aquecimento na

decomposição de amostras orgânicas para quantificação de elementos inorgânicos por técnicas espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a potencialidade do uso da radiação infravermelha como fonte de aquecimento na extração de elementos inorgânicos em amostras de alimentos para determinação desses analitos por FAAS e ICP OES.

2.2 Objetivos específicos

- Confeccionar um sistema de extração de elementos inorgânicos utilizando radiação infravermelha como fonte de aquecimento;
- Estudar as variáveis que afetam a extração de elementos inorgânicos em amostras de linhaça e camarão quando se emprega radiação infravermelha como fonte de aquecimento;
- Quantificar os elementos inorgânicos extraídos pelo sistema de tratamento de amostra com radiação infravermelha por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES);
- Avaliar a eficiência do sistema de extração assistido por radiação infravermelha através da análise de carbono residual em soluções obtidas de digestões de padrões de compostos orgânicos com diferentes estruturas orgânicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Métodos ópticos de análise

Os métodos ópticos são os principais métodos para a quantificação de elementos inorgânicos em níveis traço. São assim chamados por utilizarem os processos de interação entre a radiação eletromagnética visível e matéria como princípio para fornecer informações qualitativas e quantitativas na análise química. As regiões do infravermelho e ultravioleta, mesmo não sendo parte do espectro visível, são comumente englobadas nos detectores dos métodos ópticos.

Na espectrometria óptica de absorção e emissão atômica, os elementos presentes em uma amostra são devidamente convertidos à forma gasosa e separados em seus átomos. Na fase gasosa, os átomos podem sofrer processos de absorção de radiação (espectrometria de absorção atômica) ou a fonte de atomização fornece energia suficiente para os átomos se excitarem e ao retornarem ao estado fundamental, a energia liberada é detectada (espectrometria de emissão atômica). (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2013)

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é uma técnica monoelementar que se baseia no princípio da absorção de radiação proveniente de uma fonte pelos átomos na fase gasosa. Apresenta limites de detecção na ordem de mg kg^{-1} , sendo uma técnica de fácil operação e baixos custos em relação a outros métodos ópticos.

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) é uma técnica multielementar e baseia-se na emissão atômica dos elementos quando submetidos a altas temperaturas provenientes do atomizador, um plasma que atinge temperaturas próximas a 10.000 K (GINÉ, 1998). Na posição radial do plasma, o limite de detecção dessa técnica é semelhante aos alcançados no FAAS; na posição axial, o limite de detecção é geralmente menor, mas permanecendo ainda na faixa de mg kg^{-1} .

As duas técnicas citadas acima apresentam sistema de introdução de amostras que requer que a amostra esteja na forma de solução. Soluções aquosas geralmente apresentam resultados mais confiáveis, são de fácil manipulação e calibração, uma vez que a maioria das soluções padrão são encontradas na forma de solução (KRUG; ROCHA, 2016). Portanto, em geral, uma etapa de preparo de amostra é necessária para análise elementar por técnicas espectrométricas.

3.2. Preparo de amostra

O preparo de amostra é a etapa mais crítica de uma sequência analítica e é essencial para a maioria dos métodos que empregam espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) como técnicas de detecção (KRUG; ROCHA, 2016). Esta etapa da sequência analítica requer maiores custos, demanda mais tempo e insere a maior quantidade de erros em uma análise química. Com o avanço na instrumentação analítica, há disponível no mercado técnicas muito rápidas de análise; portanto, os métodos de preparo de amostras precisam acompanhar esse avanço na mesma velocidade (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2013; ELLISON; HARDCASTLE, 2012).

Em geral, uma completa decomposição da matéria orgânica é necessária para bons resultados na análise espectrométrica, uma vez que o carbono pode causar atomização incompleta, gerando sinais de fundo ou mesmo problemas de deposição de compostos de carbono na parte interna dos instrumentos. Os métodos de preparo por via úmida são os mais empregados para esse fim, pois operam em temperaturas mais baixas e tempos menores de preparo de amostra comparado aos métodos por via seca. Isso garante aos métodos de preparo por via úmida maior rapidez e segurança para o analista.

3.2.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas

Digestão assistida por radiação micro-ondas em fornos com cavidade é um dos métodos mais aplicados em preparo de amostras. A radiação micro-ondas tem interação direta com a amostra, o que confere um aquecimento localizado, diminuindo o tempo de preparo. Essa radiação interage com a matéria por dois fenômenos principais: migração iônica e rotação de dipolo, tendo como resultado o aquecimento da amostra (BARANOWSKA, 2016). Além disso, por usar um sistema pressurizado, temperaturas superiores à ebulição da mistura ácida é possível. As perdas de analitos por volatilização e contaminação externa são reduzidas ou mesmo eliminadas em sistemas fechados.

Devido ao uso de alta pressão, a massa de amostra utilizada em sistemas de micro-ondas fechado é limitada à aproximadamente 250 mg. Contudo, amostras com presença de elevada quantidade de carbono orgânico, como óleos e combustíveis, a quantidade de massa limite é reduzida para cerca de 100 mg para minimizar o risco de explosões. De modo que, quando se trabalha com amostras de difícil homogeneização, quantidades pequenas de amostra podem não ser suficientemente representativas, além de prejudicar a sensibilidade do método analítico (DANTAS et al., 2013).

3.2.2. Radiação Micro-ondas Focalizada

Novas técnicas foram desenvolvidas com o intuito de aumentar a massa de amostra a ser decomposta. A técnica de micro-ondas com radiação focalizada utiliza um sistema à pressão ambiente, o que permite a decomposição de massas superiores a 5,0 g (NÓBREGA et al., 2002). Uma vez que o sistema não é pressurizado, risco de explosões são minimizados. Outra vantagem dessa técnica é a possibilidade da inserção da mistura oxidante durante o programa de aquecimento (BRESSANI et al., 2006; COSTA et al., 2006; NÓBREGA et al., 2002). BRESSANI *et al.*, 2006, relata a digestão de amostras de óleo combustível utilizando radiação micro-ondas focalizado com inserção da amostra em reagente pré-aquecido, obtendo teores de carbono residual menores que 3,7%. A maior desvantagem dessa técnica é a necessidade do uso de grande quantidade de mistura oxidante, 15 mL em média, o que requer maior diluição da solução resultante para evitar elevada acidez final e provoca aumento de contaminação. Além disso, em decomposições simultâneas, alguns sistemas abertos assistidos por radiação micro-ondas tendem a não ter distribuição homogênea da radiação em todos os tubos reacionais, o que pode ocasionar desvios maiores entre as replicatas (COSTA et al., 2001).

3.2.3. Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC) e por Micro-ondas Focalizado (FMIC)

Uma técnica de preparo de amostras recente utiliza a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) agregando as vantagens do uso da combustão com as das decomposições por via úmida em frascos fechados (DE MORAES FLORES *et al.*, 2004). Na MIC, massas de até 500 mg podem ser decompostas. As cinzas resultantes são dissolvidas em uma solução absorvedora especial para cada analito em estudo. Essa técnica é bastante utilizada na determinação de

halogênios, uma vez que o vapor contido nos tubos de decomposição é absorvido em soluções especiais para esse tipo de analito. Geralmente, em métodos por via úmida os halogênios são perdidos nas suas formas ácidas voláteis (DA SILVA, SABRINA VIEIRA *et al.*, 2016). Contudo, o MIC requer equipamento especializado e necessita de inserção de oxigênio ao tubo de reação, o que aumenta os riscos para o analista. Além disso, algumas cinzas formadas são de difícil solubilização, com a necessidade de uma solução absorvedora diferente para cada tipo de analito, ou, grupos de analitos.

O forno de micro-ondas com radiação focalizada também pode ser utilizado para iniciar a combustão (combustão iniciada por radiação micro-ondas focalizada - FMIC), aumentando o limite de quantidade de amostra digerida para até 3,0 g (PEREIRA *et al.*, 2013). Contudo, nessa técnica a solução absorvedora só pode ser adicionada após o fim do processo de combustão, visto que evapora quando colocada ao início da combustão. Por esse motivo, alguns elementos voláteis podem ser perdidos durante o processo.

3.2.4. Preparo de amostras em câmara única de reação (SRC)

Recentemente, foram propostos sistemas de decomposição por micro-ondas fechado em câmara única de reação (SRC, single reaction chamber). Nesse tipo de sistema, as amostras e reagentes são introduzidos em uma câmara de reação abastecida com uma solução levemente ácida ($\sim 4\% \text{ v v}^{-1}$), a câmara é então pressurizada com um gás inerte e aquecida através de radiação micro-ondas (MILESTONE, 2015). Esse sistema alcança temperatura de 300 °C e pressão de 199 bar, possibilitando a decomposição de até 5 g de amostra (KRUG; ROCHA, 2016). A literatura, até o momento, reporta uso de massas entre 500 mg a 1000 mg para amostras farmacêuticas (MULLER *et al.*, 2015), petróleo (DRUZIAN *et al.*, 2016) e alimentos (MULLER *et al.*, 2014), dentre outros. E, assim como o MIC e o FMIC, o SRC é também uma técnica de preparo com equipamento de elevado custo e que exige analistas capacitados para sua operação.

3.2.5. *Extração assistidas por ultrassom*

Muitas vezes uma decomposição completa da amostra não é necessária para a disponibilização dos analitos inorgânicos em solução. A realização apenas de uma extração dos analitos da matriz pode apresentar resultados satisfatórios. As ondas ultrassônicas são bem estudadas na literatura para esse fim.

Ultrassons são ondas mecânicas com frequências maiores que 20 kHz e se caracterizam por se propagarem através de meios materiais em sucessivos ciclos de compressão e rarefação. A aplicação de ondas ultrassônicas entre 10 e 1000 kHz leva ao aquecimento do meio podendo ocorrer cavitação acústica, que é um fenômeno caracterizado pelo surgimento, crescimento e explosão de microbolhas no líquido (KRUG; ROCHA, 2016).

Os efeitos químicos observados em soluções submetidas a esse tipo de ondas são intrinsecamente relacionados à migração de moléculas para dentro das bolhas de cavitação onde são submetidas a elevadas temperaturas e pressões alcançadas no momento da explosão dessas bolhas. Temperaturas em torno de 5200 K na fase gasosa e 1900 K na interface gás/líquido são alcançadas no momento da explosão das microbolhas com pressões de até 1000 atm (CARVALHO et al., 1995).

O uso de ultrassom em extração de elementos traços possui resultados bem contraditórios, principalmente nos métodos que utilizam banhos ultrassônicos (CAPELO; MADURO; VILHENA, 2005). Esses equipamentos possuem dissipação de energia afetada por diversos fatores como: a frequência, a posição dos tubos de reação e volume de água. SANTOS, CATALINA *et al.*, 2000, relatam diferentes percentuais de extração de As em amostras de alimentos marinhos mesmo utilizando o mesmo banho ultrassônico.

Uma vez que os ultrassons não são aplicados diretamente nas amostras, outras variáveis devem ser observadas ao se trabalhar com essa técnica. Parte da energia é absorvida pelas paredes dos tubos de reação, o que causa uma cavitação menor no interior dos fracos que no interior da cuba do banho.

Devido a esses problemas, a literatura reporta muitos trabalhos discordantes sobre a técnica de ultrassom para o preparo de amostras. BERMEJO-BARRERA *et al.*, 2001; EL AZOUZI; CERVERA; DE LA GUARDIA, 1998; MINAMI; HONJYO; ATSUYA, 1996., desenvolveram métodos utilizando ultrassom para a extração de elementos traços em tecidos animais obtendo resultados completamente diferentes. EL AZOUZI; CERVERA; DE LA

GUARDIA, 1998 utilizaram uma mistura de HNO_3 1,6 mol L^{-1} , HCl 2 mol L^{-1} e H_2O_2 0,1 mol L^{-1} com 120 min de sonicação obtendo recuperações acima de 95% de Cu e Cd. MINAMI; HONJYO; ATSUYA, 1996 utilizam também tecido animal, mas utilizando uma solução menos oxidante (HNO_3 1 mol L^{-1}) obtendo recuperações quantitativas de Cu e Cd com apenas 5 min de sonicação. BERMEJO-BARRERA *et al.*, 2001, no entanto, afirmam que no período entre 10 e 120 min não é observada recuperação quantitativa de nenhum elemento em tecido de animais utilizando soluções de HNO_3 entre 0,5 e 4,5 mol L^{-1} , associado ou não com HCl , com exceção de Se no qual obteve-se boas recuperações com 30 min de sonicação a 90°C.

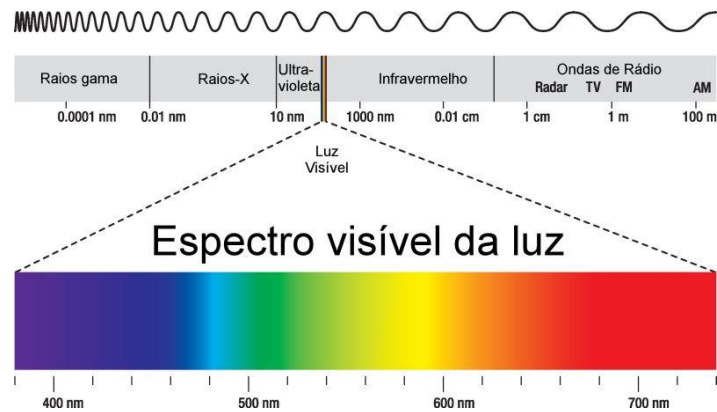
Outra dificuldade encontrada em extrações por ultrassom está relacionada à realização do branco analítico. O meio reacional é um fator importante para a formação das bolhas de cavitação, que são os principais mecanismos que causam o aquecimento no ultrassom. Contudo, essas se comportam diferentes em meios com e sem partículas sólidas (KRUG; ROCHA, 2016).

3.3. A radiação infravermelha

Na tentativa de desenvolver novos métodos de preparo de amostra, a radiação infravermelha começou a ser investigada como fonte de aquecimento. Esse tipo de radiação é amplamente utilizada para a secagem de sólidos (RIADH *et al.*, 2015) e destilação de ácidos abaixo da temperatura de ebulição no processo conhecido como *sub-boiling* (KRUG; ROCHA, 2016). Contudo, é pouco explorada como fonte de aquecimento para preparo de amostras.

A radiação infravermelha compreende a faixa do espectro eletromagnético entre 1 mm e 700 nm (figura 1). É uma radiação não ionizante e possui energia em torno de 0,0012 a 1,5580 eV, não sendo suficiente portanto para o rompimento das ligações químicas. Entretanto, é capaz de provocar aumento dos movimentos vibracionais e rotacionais das moléculas, o que lhe confere a capacidade de aquecer os corpos. Por isso, a radiação infravermelha é conhecida como a “região quente do espectro eletromagnético” como definiu Willian Herschel em 1880 ao descobrir essa faixa espectral (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2013).

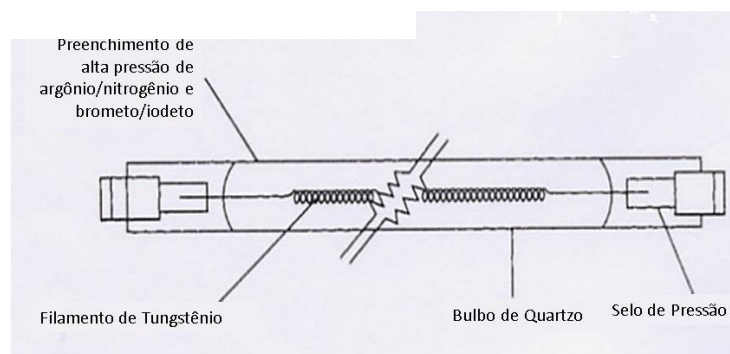
Figura 1 - Espectro da radiação eletromagnética



Disponível em: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2007/12/espectro-visivel-da-luz.jpg> acessado em 06/09/16

As fontes de radiação infravermelha (IR) são constituídas por um sólido inerte que é aquecido eletricamente a uma temperatura compreendida entre 1500 e 2200 K. As lâmpadas halógenas (figura 2) são constituídas de um filamento de tungstênio e a energia emitida corresponde a cerca 90% dentro da região do infravermelho. O filamento de tungstênio é posicionado em um bulbo de quartzo preenchido com um gás, junto com uma quantidade controlada de halogênio (iodo ou bromo) (LOGERAIS; BOUTEVILLE, 2010).

Figura 2 - Esquema de uma lâmpada de tungstênio



Fonte: (LOGERAIS; BOUTEVILLE, 2010)

3.3.1. *Uso da Radiação infravermelha no preparo de amostras*

Ainda que a radiação infravermelha não seja comumente utilizada para preparo de amostras, nos últimos anos alguns trabalhos vêm descrevendo o seu uso para esse fim.

E. C. MAGALHÃES *et al.*, 1997, utilizaram três lâmpadas de infravermelho sob uma corrente de ar quente para atingir temperaturas de 1110°C em uma câmara de pirólise para

a decomposição de amostras de sedimentos e quantificação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV AAS).

GOUVEIA; FATIBELLO-FILHO; NÓBREGA, 2000, utilizaram três lâmpadas de halogênio para a decomposição parcial de amostras de material certificado de fígado bovino e folha de maçã (200 – 1400 mg) em meio de HNO₃ e H₂O₂. No extrato, os pesquisadores determinaram Cu, Mn, Zn e Sr por GFAAS obtendo recuperações acima de 80% para todos os analitos quando comparado com os teores obtidos desses elementos após digestão completa em forno de micro-ondas com cavidade.

DANTAS *et al.*, 2013, utilizaram um sistema combinado que associava a radiação infravermelha com radiação micro-ondas, chamado de IR-MW, para decomposição de 1,0 g de amostra de ração humana em meio de HNO₃ e H₂O₂. Nesse método, a amostra era pré-decomposta com auxílio da radiação infravermelha e então levado ao forno de micro-ondas com cavidade para a completa oxidação da matriz. Determinação de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de ração humana por ICP OES foi possível com o emprego do método. A exatidão do método foi verificada usando material de referência certificado de leite em pó, obtendo valores estatisticamente iguais aos valores certificados. Além disso, o trabalho demonstrou a potencialidade da radiação infravermelha obtendo redução de 80% de massa de amostra na pré-digestão.

WANG; BRINDLE, 2014, utilizaram um sistema chamado de ColdBlockTM para a decomposição de amostras ambientais utilizando material de referência certificado de solo contaminado e bio-solos. Nesse método há a simulação de um bloco digestor convencional, onde na base do tubo de decomposição é posicionado duas argolas com radiação infravermelha ligadas a um potenciômetro o qual regula a potência de IR em torno de 250 W. O método apresentou boa recuperação de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Ti, V e Zn (89-108%) com desvios padrões relativos em torno de 0,7-3,6%, usando tempo de preparo de amostra em torno de 20 min com 250 mg de amostras, utilizando uma mistura de HNO₃, HCl e H₂O₂. Nesse trabalho, os autores conseguem recuperações quantitativas de elementos com características voláteis como As, Se e Sb. Os mesmos autores também propuseram um método utilizando esse sistema na dissolução de amostras geológicas com alto teor de S²⁻ com uma mistura de HNO₃ – HBr para a determinação de Au por ICP-MS, conseguindo recuperações superiores a 94%, mesmo sendo formado espécies voláteis de Au (WANG; BRINDLE, 2014b).

Recentemente, ZHANG *et al.*, 2017, utilizaram a radiação infravermelha para decomposição por via seca de amostras botânicas em um sistema denominado FILA (do inglês, Focused Infrared Lighthwave Ashing) conseguindo recuperações entre 80 e 114% de Be, Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Mo, Cs, Ba, Pb, Bi, Th, U e terras raras utilizando 250 mg de material de referência certificado. O método de decomposição proposto foi comparado com a decomposição em micro-ondas com cavidade, obtendo valores estatisticamente semelhantes.

Diante dos trabalhos citados, a radiação IR mostra resultados promissores como fonte de aquecimento a ser utilizada em preparo de amostra. Contudo, seu mecanismo ainda não foi bem estudado, assim como sua capacidade de degradação de diversos materiais orgânicos.

3.4. O HNO_3 no preparo de amostras

O HNO_3 é o ácido inorgânico mais utilizado em preparo de amostras porque é de fácil purificação, manipulação e um excelente oxidante, além de que os produtos formados são em sua maioria solúveis (WÜRFELS; JACKWERTH, 1989; WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989). HNO_3 concentrado se decompõe quando submetido a alta temperatura em diversos compostos solúveis em água como NO , NO_2 , NO_3^- , N_2O , N_2O_3 , N_2O_4 , N_2O_5 , N_2O_6 , HNO e HNO_2 , todos com características oxidantes. Em sistemas fechados de decomposição, a pressão do tubo reacional se eleva devido a formação de gases propiciando o aumento da temperatura do sistema.

Utilizando apenas HNO_3 na decomposição de amostras orgânicas em sistemas abertos, os carboidratos podem ser decompostos, visto que temperatura de 140°C é suficiente para degradar completamente essas moléculas. Contudo, proteínas necessitam de temperaturas em torno de 150°C e lipídeos cerca de 160°C (PRATT; et al., 1988).

As proteínas correspondem a um grupo grande de substâncias que são formadas pela união de aminoácidos através de uma ligação peptídica. A presença de algumas proteínas em matrizes orgânicas dificulta a decomposição das amostras, em especial a histidina e a fenilalanina (WÜRFELS; JACKWERTH, 1989). A correlação entre carbono residual e teor proteico em amostras submetidas a decomposição utilizando radiação micro-ondas não foi encontrada na literatura. Contudo, CARRILHO *et al.*, 2001 correlacionou o conteúdo de

lipídeos ao teor de carbono residual e observou um coeficiente de correlação em torno de 0,9173. Assim, a quantidade de proteínas em uma amostra não se mostrou como fator de previsão de quantidade de carbono residual.

3.5. Como avaliar a eficiência do preparo de amostras orgânicas

Em geral, técnicas de espectrometria de absorção atômica não são afetadas por resíduos orgânicos dissolvidos mesmo em concentrações elevadas de carbono (10-30%) (GOUVEIA et al., 2001; KRUG; ROCHA, 2016). Contudo, em determinações por ICP OES, altos teores de carbono, fósforo e enxofre podem causar interferências espectrais (aumento ou supressão do sinal de emissão dos analitos) devido a reações de transferências de carga (GRINDLAY et al., 2008; WILTSCHE et al., 2015). Ressalta-se também que elevadas concentrações de carbono podem causar depósitos na tocha do equipamento, variação da quantidade de aerossol introduzido no plasma de argônio, instabilidade do plasma entre outros problemas instrumentais.

Dessa forma, a avaliação do teor de carbono residual (RCC, do inglês Residual Carbon Content) é um importante parâmetro a ser analisado juntamente com a acidez residual na avaliação da eficiência de digestão de matrizes orgânicas (GOUVEIA et al., 2001; KRUG; ROCHA, 2016)

O RCC pode ser calculado pela equação abaixo:

$$\% \text{ RCC} = (C_R / C_0) \times 100$$

Onde C_R a quantidade de carbono remanescente após a digestão e C_0 a quantidade de carbono inicial.

A acidez residual é um parâmetro importante na eficiência de decomposição de amostras inorgânicas e não deve ser superior a 10% v v⁻¹, para evitar problemas de introdução da amostra e danos ao equipamento.

3.6. Linhaça

A linhaça (*Linum usitatissimum L*) é da família das Linaceae e pode ser encontrada em duas variedades, linhaça marrom e dourada, dependendo do local em que são cultivadas. A linhaça marrom encontrada em locais mais quentes como países da América Latina e a linhaça

dourada em países de temperaturas mais amenas como América do Norte e Europa, sendo o Canadá o seu maior produtor (OOMAH, 2001). A ingestão do seu óleo diminui os riscos de problemas cardiovasculares, além de acreditar-se que, a presença de fitoquímicos biologicamente ativos podem ter função de prevenção para o câncer (OOMAH; MAZZA, 1993).

Ambos os tipos de linhaça possuem características semelhantes quanto sua composição, cerca de 35% de proteínas, sendo uma excelente fonte de arginina, glutamina e histidina, aminoácidos conhecidos por suas funções imunológicas. Também apresentam altos teores de cisteína e metionina que contribuem na atividade antioxidante humana, auxiliam na estabilização do DNA durante a divisão celular e reduzem os riscos de câncer de colo (OOMAH, 2001).

A matriz da linhaça mostra-se de composição complexa. Além da alta quantidade de proteínas, é composta por 40% de lipídios, sendo 51-55% dos lipídeos composto de ácido alfa linolênico e 15-18% é ácido linoleico (CARTER, 1993). Ressalta-se que aproximadamente um terço das proteínas e enzimas contêm metais que se ligam fortemente as mesmas, especialmente metais de transição como cobre, cobalto, ferro, manganês, molibdênio e zinco (BITTENCOURT *et al.*, 2014).

Mesmo sendo uma amostra exaustivamente descrita na literatura (CARLI; CAMPINAS, 2012; CARTER, 1993; DOIRON *et al.*, 2009; MARTHE; AUGUSTI; COSTA, 2015; OOMAH, 2001; OOMAH; DER; GODFREY, 2006; OOMAH; MAZZA, 1993), a composição mineral da linhaça é pouco conhecida.

3.7. Camarão

O consumo mundial de camarão vem crescendo rapidamente no mundo (DA SILVA, CRISTIANE PEREIRA *et al.*, 2017). O cultivo de camarão é um dos setores da aquacultura mais importante no nordeste brasileiro que é responsável pela maior produção desse tipo de crustáceo no país. (VALENTI *et al.*, 2000)

A composição nutricional do camarão é muito dependente da sua alimentação e produção. A tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos) (NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2011) descreve a composição apenas da espécie *Penaeus brasiliensis*, espécie nativa do país. (SANTOS *et al.*, 2016). Nessa tabela é apresentada a concentração de proteína no camarão de cerca de 90% m m⁻¹ (em peso seco) da

parte comestível e 4,5 % de lipídeos. A espécie de carcinicultura (*Litopenaeus vannamei*) não tem sua composição nutricional descrito na tabela TACO, mas a literatura reporta valores de proteína em torno de 75 % m m⁻¹ e de lipídeos próximo de 5,5 % m m⁻¹(BRAGAGNOLO, 2001; GAO et al., 2016). Mesmo a composição proteica entre a espécie de camarão selvagem e criado em cativeiro ter bastante diferença, a concentração de lipídeos das duas espécies é aproximadamente a mesma.

A proteína de camarão é constituída principalmente por aminoácidos essenciais como leucina e lisina e em menor quantidade por fenilalanina, metionina e histidina além de alguns aminoácidos não essenciais como ácido aspártico, glicina e arginina (DA SILVA et al., 2017; GAO et al., 2016; PINTO; HIRDES; SANCHES FILHO, 2013; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991).

4 EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura (resistividade 18.2 M Ω cm), purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). As vidrarias e frascos foram previamente descontaminados imergindo-os em banho de HNO₃ 10% v v⁻¹ por 24 horas e enxaguados com água ultrapura antes do uso.

Na extração de elementos traços das amostras, utilizou-se HNO₃ 65% m m⁻¹ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), H₂O₂ 30% m m⁻¹ (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e HCl 37% m m⁻¹ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Para as extrações da fase lipídica utilizou-se clorofórmio, CHCl₃, 98% m m⁻¹ (Vetec) e metanol, CH₃OH, 95,5 % m m⁻¹ (Vetec).

As curvas analíticas para análise de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES foram preparadas a partir de diluições sucessivas de soluções padrão estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ desses elementos (Across Organics, Geel, Bélgica). A curva analítica para análise de carbono residual (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 % m v⁻¹ C) foi feita por diluições sucessivas, em HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ e usando água ultrapura fervida, de uma solução estoque 5,0 % m v⁻¹ C preparada a partir do reagente Ureia, CH₄N₂O (99% m m⁻¹) (Vetec) como fonte de carbono. Para análise de carbono residual, empregou-se Y como padrão interno na concentração de 1,0 mg L⁻¹, adicionado em todos os pontos da curva e digeridos das amostras.

4.2. Amostras

Os experimentos foram realizados utilizando amostras de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e linhaça (*Linum usitatissimum L*) comprados no mercado local da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, no período de Agosto-Setembro de 2015. As amostras foram liofilizadas, utilizando um liofilizador L202 (LIOBRAS, São Carlos, SP), em seguida foram trituradas utilizando um moedor de café caseiro, uma amostra de sacrifício foi realizada para eliminar possíveis contaminações. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno antes dos experimentos.

Material de referência certificado SRM 1566b Oyster Tissue (NIST, EUA) e o material de referência RM 15 Farelo de soja (EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, SP,

Brasil) foram utilizados para verificar a exatidão dos métodos de preparo de amostras desenvolvidos.

Padrões de glicose (>98% m m⁻¹), glicina (98% m m⁻¹), fenilalanina (98% m m⁻¹) e ácido nicotínico (>95% m m⁻¹) (Sigma Aldrich), foram submetidos ao preparo de amostras assistido por IR com o objetivo de avaliar a eficiência do sistema de digestão proposto.

4.3. Instrumentação

Para a quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça, utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) (Varian AS 240FS, Mulgrave, Austrália), equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo. As medidas foram obtidas usando lâmpada de cátodo oco (HCL) para cada analito. Utilizou-se uma chama de ar/acetileno com fluxo de 13,0 e 2,0 L min⁻¹, respectivamente. Na tabela 1, estão descritas as condições operacionais do FAAS nas determinações dos analitos em amostras de linhaça.

Tabela 1 - Parâmetros operacionais utilizados no equipamento de absorção atômica com chama para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça.

Elemento	Linha (nm)	Abertura de fenda (nm)	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Corrente da lâmpada (mV)
Cu	324,7	0,5	0,03 – 10	10,0
Fe	372,0	0,2	1 – 100	8,0
Mn	279,5	0,2	0,02 – 5	10,0
Zn	213,9	1,0	0,01 – 2	12,0

Fonte: O autor

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) Perkin Elmer 4200 DV (Perkin Elmer, EUA) foi utilizado para a determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn em amostras de camarão e para as determinações de carbono residual usando Y como padrão interno. Os parâmetros operacionais empregados no ICP OES estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES para a determinação de As, C, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn em amostras de camarão

Parâmetros operacionais ICP OES	
Câmara de nebulização	Duplo Passo
Nebulizador	Cross-Flow
Potência de radiofrequência (W)	1300
Taxa de fluxo de argônio para o plasma (L min ⁻¹)	15,0
Taxa de fluxo de argônio para a nebulização (L min ⁻¹)	0,8
Taxa de fluxo de gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Taxa de fluxo de amostra (mL min ⁻¹)	1,4
Comprimento de onda (nm)	Visão Axial
As	197,197
C	193,030
Cd	226,502
Co	228,600
Cu	327,393
Fe	239,562
Mn	257,610
Ni	231,604
Se	196,026
V	290,880
Y	371,029
Zn	206,200

Uma chapa aquecedora QUIMIS (Piracicaba, São Paulo, Brasil) foi utilizada nos procedimentos de evaporação da amostra para análise por infravermelho.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das amostras de linhaça e camarão foram obtidos utilizando um espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR/NIR. Utilizou-se um acessório de ATR (Pike Technologies) modelo MIRacle acoplado com um cristal de ZnSe com resolução de 4 cm⁻¹.

Para as análises de carbono e nitrogênio dissolvido na amostra de tecido de ostra e camarão utilizou-se um analisador elementar 2400 CHNS/O Serie II System (Perkin Elmer).

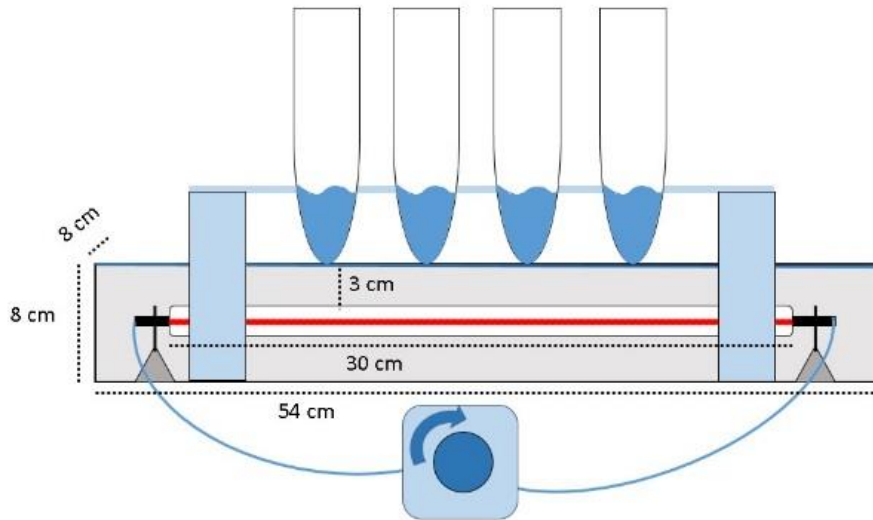
Um bloco digestor TECNAL (Piracicaba, São Paulo, Brasil) equipado com 12 tubos de teflon com tampa foi utilizado na decomposição de amostras de tecido de ostra certificado (NIST 1566b – *Oyster Tissue*).

Um sistema de extração usando radiação infravermelha, confeccionado no laboratório, foi utilizado para a extração dos analitos nas amostras de linhaça e camarão. A descrição desse sistema está no item 4.4 da seção experimental.

4.4. Construção do protótipo de sistema de decomposição por radiação infravermelha (IR – do inglês infrared)

O protótipo do sistema de decomposição (Figura 3), utilizado nesse experimento foi construído utilizando uma lâmpada de halogênio (Philco) de 30 cm, 220V e potência máxima de 1000 W. A lâmpada foi acoplada em um suporte de alumínio de 54 cm de comprimento por 8 cm de largura e 8 cm de altura. Associou-se à lâmpada um potenciômetro para possibilitar a variação da potência da lâmpada durante os estudos. Um suporte de vidro temperado foi colocado para alocação dos frascos de reação de vidro que se mantinham presos por uma chapa de alumínio com 4 orifícios com distância de 2 cm entre eles. Na figura 3, pode-se observar o esquema do protótipo com suas especificações.

Figura 3 - Protótipo de sistema de preparo de amostras utilizando radiação infravermelha (IR) como fonte de aquecimento.



Fonte: O Autor

4.5. Digestão das amostras de linhaça no sistema de preparo de amostra assistido por IR

Para o método de preparo de amostra de linhaça utilizando radiação infravermelha, Pesou-se 2,0 g de amostra e adicionou-se 8 mL de HNO_3 65 % m m^{-1} . Essa mistura foi submetida a aquecimento por radiação infravermelha por 8 min (500 W) em frasco de vidro. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o filtrado foi diluído para 25 mL com água ultrapura. Os elementos Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados por FAAS.

O mesmo procedimento citado no parágrafo anterior foi realizado para a amostra de linhaça sem a fase lipídica. Para a extração da fase lipídica, fez-se uma adaptação do método proposto por BITTENCOURT *et al.*, 2014. Nesse método, pesou-se 1,0 g de amostra seca e triturada, adicionou-se 5,0 mL da solução extratora, que consistiu em uma mistura 1:2 v v^{-1} de metanol e clorofórmio. A mistura foi agitada manualmente por 15 min e então centrifugada à 3000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado. O procedimento foi realizado 3 vezes e para evaporação do solvente residual, a amostra foi levada à estufa a 90°C por 1 h.

O material de referência MR 15 Farelo de soja foi submetido ao mesmo procedimento de preparo das amostras assistido por IR de linhaça para averiguar a exatidão do método de extração de elementos inorgânicos em amostra de linhaça proposto.

4.6. Digestão das amostras de camarão no sistema de preparo de amostras assistido por IR

Para o método de preparo de amostra de camarão utilizando radiação infravermelha, adicionou-se 8 mL de HNO₃ 65% m m⁻¹ a 1,0 g de amostra de camarão em frasco reacional de vidro. Essa mistura foi submetida a aquecimento por radiação infravermelha por 10 min (500 W). A mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o filtrado foi diluído para 25 mL com água ultrapura. Analisou-se os elementos As, C, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES. Análise elementar de C e N dissolvido também foram realizadas nessas amostras.

Material de referência certificado NIST 1566b Oyster Tissue foi submetido ao mesmo procedimento de preparo da amostra de camarão para verificar a exatidão do método de extração de elementos inorgânicos assistida por IR proposto.

4.7. Planejamento experimental

Os procedimentos de preparo de amostras foram otimizados utilizando planejamento fatorial completo com dois níveis e ponto central para observar a influência de cada variável, assim também como a influência da interação entre as variáveis. Para a otimização do método de decomposição da amostra de linhaça, escolheu-se como variáveis massa de amostra, volume de HCl e tempo de aquecimento, sendo considerada a concentração dos minerais Cu, Fe, Mn e Zn como resposta. Todos os pontos foram realizados em triplicatas. As variáveis e seus níveis encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para otimização do método de preparo de amostras de linhaça.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
Massa de amostra (g)	1,0	2,0	3,0
Volume HCl (mL)	0	2	4
Tempo de aquecimento (min)	5	10	15

Fonte: O Autor

Nesse planejamento, o volume final de ácido foi de 8 mL, completado com HNO₃ sempre que necessário. Não foi possível variar a potência da lâmpada de infravermelho nesse planejamento, pois com a maior potência (1000 W) e menor tempo (5 min) inicia-se a carbonização da amostra, então optou-se por utilizar a potência de 500 W tendo como referência trabalhos anteriores do grupo.

Para a otimização do método de preparo de amostra de camarão, utilizou-se como variáveis a massa de amostra, tempo de aquecimento e potência da lâmpada. As variáveis e seus níveis encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para otimização do método de preparo de amostras de camarão.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
Massa de amostra (g)	1,0	1,5	2,0
Tempo de aquecimento (min)	5	10	15
Potência da lâmpada (W)	500	750	1000

Fonte: O Autor

O software STATISTICA® 6.0 (StarSoft, Tulsa, OK, USA) foi usado para análise do procedimento experimental. A função desejalidade foi aplicada utilizando 60 passos para formação do gráfico da função.

4.8. Preparo de amostras para análise por Espectrometria de Infravermelho

O resíduo resultante do filtrado após a extração da amostra de linhaça desengordurada assistida por IR foi seco em estufa a 90°C por 6h e então levado para análise no infravermelho com ATR e varredura entre 500 e 4500 cm^{-1} . Analisou-se também a amostra sem qualquer tratamento prévio.

Como a amostra de camarão e o material certificado NIST 1566b – Oyster Tissue, submetidos aos processos de extração com infravermelho não obtiveram resíduos de decomposição; para análise por FT-IR, 5,0 mL da amostra após o preparo com IR foi evaporada até a secura em uma chapa aquecedora (80 °C) e o sólido resultante foi analisado por FT-IR.

4.9 Decomposição de amostra de tecido de ostra SRM NIST 1566b – Oyster Tissue por bloco digestor

Para avaliar a eficiência do método de preparo de amostra assistido por IV desenvolvido, utilizou-se o método de digestão em bloco digestor como método comparativo; uma vez que apresenta as mesmas limitações do método proposto, ou seja, alcança apenas temperaturas de ebulição da mistura oxidante.

Nesse procedimento, à aproximadamente 250 mg da amostra de tecido de ostra (NIST 1566b) adicionou-se 5 mL de HNO_3 65 % m m^{-1} , a amostra foi então levada a bloco digestor durante 3h a 120 °C. A solução resultante da decomposição foi diluída para 25 mL com água ultrapura e determinou-se As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V, Zn por ICP OES e; C e N dissolvido por análise elementar.

4.10. Avaliação dos parâmetros que influenciam na eficiência de decomposição utilizando radiação infravermelha

Para avaliar os parâmetros que influenciam na decomposição assistida por radiação infravermelha realizou-se um planejamento fatorial completo em dois níveis

utilizando amostras padrão de açúcar (glicose), aminoácidos (glicina e fenilalanina) e vitamina (ácido nicotínico), usando como resposta do planejamento a porcentagem de carbono residual (% RCC), em todos os experimentos utilizou-se massas de 250 mg. As variáveis do planejamento experimental estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Níveis e variáveis do planejamento fatorial completo em 2 níveis para avaliação das variáveis significativa na decomposição de aminoácidos por radiação IR.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
Volume de HNO ₃ (mL)	4,0	6,0	8,0
Tempo de aquecimento (min)	5	10	15
Potência da lâmpada (W)	500	750	1000

Fonte: O Autor

A porcentagem de carbono residual foi avaliada pela quantificação por ICP OES.

Os padrões de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico também foram decompostos em bloco digestor empregando o mesmo procedimento aplicado às amostras de material de referência certificado (NIST 1566b), descrito na seção 4.9. A %RCC nos digeridos desses padrões foram analisados e comparados com a %RCC obtida pelo sistema de preparo de amostras assistido por IR.

A influência da presença de carboidrato na eficiência de digestão do método de preparo usando IV como fonte de aquecimento foi estudada. Para isso, os padrões de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico foram digeridos no sistema proposto usando a condição ótima de 250 mg de amostra, 8 mL de HNO₃, 8 min de aquecimento com potência da lâmpada de IR de 1000 W. Nessas condições experimentais, em cada frasco contendo amostra-padrão foi adicionado glicose em concentrações de 50, 100 e 150 mg a cada amostra individualmente, todas as soluções foram diluídas com água ultrapura para 25 mL. A eficiência de digestão foi avaliada pela análise de %RCC.

4.11. Modelo de superfície de resposta: função desejabilidade

Para a otimização dos dois planejamentos experimentais utilizou-se metodologia de superfície de resposta função desejabilidade, que é capaz de avaliar múltiplas respostas. A função desejabilidade foi proposta por HARRINGTON, 1965 e modificada por DERRINGER; SUICH, 1980. Essa função propõe uma relação entre respostas e variáveis dependentes com suas respostas desejáveis, com isso é possível encontrar a melhor condição para todas as variáveis resposta convertendo-as para uma faixa entre 0 (representa um valor indesejável) e 1 (representando um valor de resposta ideal).

Diferentes funções podem ser obtidas dependendo do critério adotado pelo analista. Um limite aceitável de valores de resposta pode ser expresso por $(U_i - L_i)$, onde: U_i é o máximo valor de resposta e L_i o mais baixo. Então a resposta pode ser dada pela equação em função de $d_i(y)$ (VERA CANDIOTI et al., 2014):

Equação 1 -

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{se } y_i(x) < L_i \\ \left(\frac{y_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{se } L_i < y_i(x) < U_i \\ 1 & \text{se } y_i(x) = T_i \\ \left(\frac{y_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^t & \text{se } T_i < y_i(x) < U_i \\ 0 & \text{se } y_i(x) > U_i \end{cases}$$

Na equação 1, s é o peso determinado pelo analista que determina o quão importante é a variável para se aproximar ao valor máximo, t está relacionado ao valor mínimo e T_i é o valor desejável.

Cada valor individual de desejabilidade é agrupado em uma nova equação chamada de desejabilidade global, onde as desejabilidades individuais são utilizadas para encontrar a melhor resposta. A equação 2 descreve esse processo:

Equação 2 -

$$D = (d1^{r1} * d2^{r2} * ... * dn^{rn})^{\frac{1}{\sum n}} = \left(\prod_{i=1}^{\wedge} d1^{r1} \right)^{\frac{1}{\sum n}}$$

Onde D é a desejabilidade global do sistema, d as desejabilidades individuais de cada resposta, n o número de respostas submetidas ao design da superfície de resposta e r a resposta de cada desejabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do planejamento experimental para amostra de linhaça

Para a otimização do processo de preparo de amostra por infravermelho na amostra de linhaça, realizou-se um planejamento fatorial completo em dois níveis com ponto central utilizando massa de amostra, volume de ácido clorídrico e tempo de aquecimento como variáveis. A concentração de Cu, Fe, Mn e Zn nos digeridos foram usados como resposta.

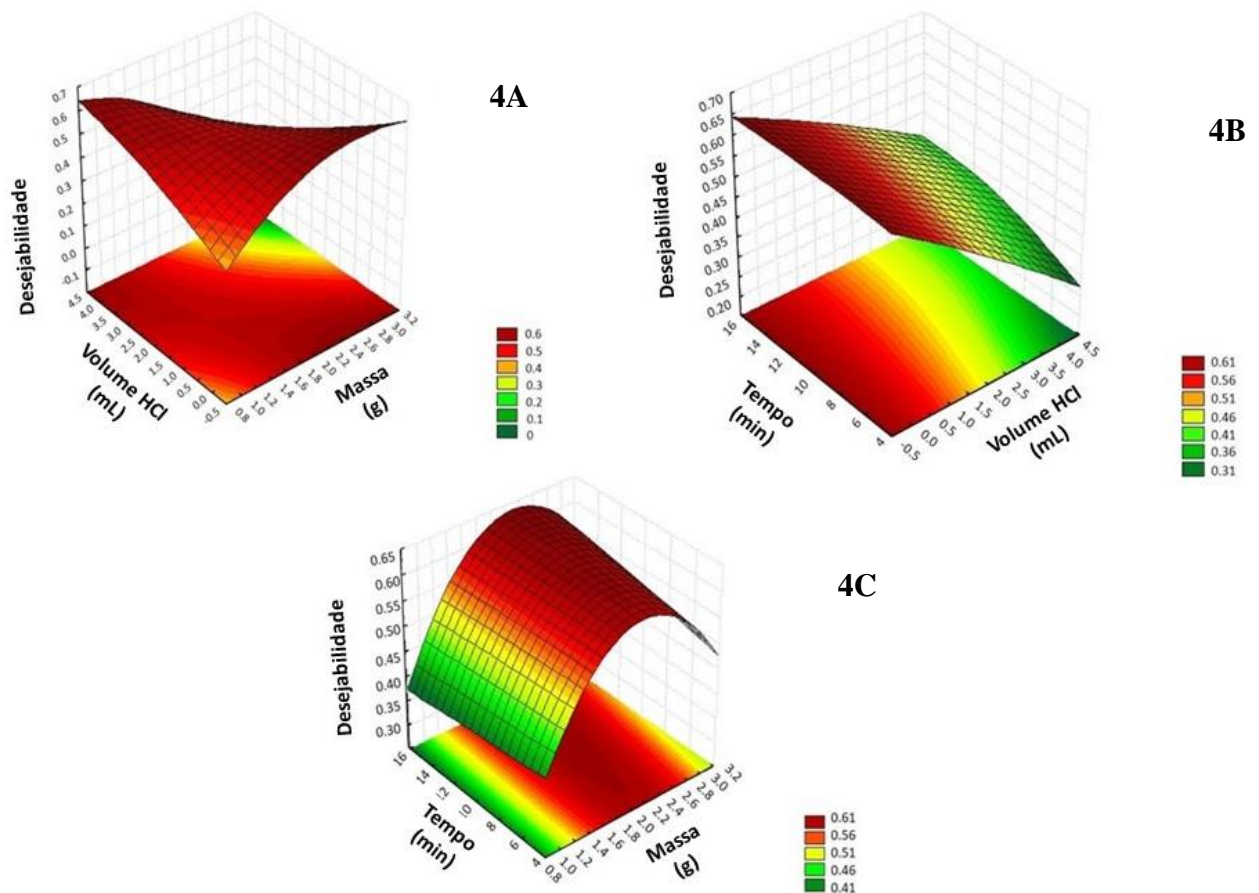
A massa da amostra mostrou-se importante como variável devido à heterogeneidade da amostra de linhaça, massas pequenas provocam desvios maiores entre as replicatas. Além disso, os minerais estudados nessas amostras encontram-se em teores traço, portanto, massas pequenas poderiam produzir um extrato com concentrações dos analitos abaixo do limite de detecção da técnica FAAS. Em contrapartida, massas elevadas necessitam de maior quantidade de ácido, o que geraria mais resíduos.

O tempo de aquecimento implica no tempo em que a amostra ficará em contato com a solução extratora na temperatura máxima alcançada pelo sistema, que é de 120°C. Curto período de extração pode significar ineficiência de extração, enquanto que maior tempo de extração pode causar carbonização da amostra, necessidade de maior volume de ácido, além de perdas de elementos voláteis.

Em geral, usa-se ácidos oxidantes fortes para total solubilização de amostras orgânicas, sendo HNO₃ o mais amplamente utilizado (KRUG; ROCHA, 2016). Contudo, para o preparo de amostra de linhaça, optou-se pela utilização de um ácido de características complexantes, na tentativa de extrair os analitos na forma de complexos solúveis. Além disso, o HCl é empregado em métodos padrão de decomposição/extração de amostras de alimentos (LUTZ, 2008). O volume final de ácido foi de 8,0 mL completando-se o volume com HNO₃ sempre que necessário.

Os gráficos de superfície de resposta (figura 4) obtidos do planejamento experimental para extração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça, foram plotados usando função desejabilidade, uma vez que foram utilizadas múltiplas respostas para a otimização do método.

Figura 4 - Gráficos de deseabilidade obtidos do planejamento experimental para extração de Cu, Fe, Mn e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de linhaça. (4A: Volume de HCl X Massa; 4B: Tempo X Volume de HCl; 4C: Tempo X Massa)



Fonte: O Autor

Observando os gráficos na figura 4, pode-se notar a influência do tempo sobre o preparo da amostra. Os resultados mostram a necessidade de tempos intermediários de exposição da amostra à radiação IV em relação à quantidade de massa utilizada. Assim, optou-se pelo uso de 2,0 g de amostra e tempo de aquecimento de 8 min, o que representa a parte central do gráfico da figura 5C. A utilização de elevadas massas de amostra é importante quando deseja-se analisar elementos que estão em baixas concentrações na matriz estudada, que é o caso do elemento Cu em matrizes de cereais.

Em relação ao volume de HCl, pode-se notar que em todos os casos a ausência do reagente mostrou melhores resultados, o que demonstra de forma indireta a necessidade de uso de volume maior de ácido oxidante, nesse caso HNO_3 . Assim, a oxidação da matéria orgânica

se mostra mais importante do que a possível complexação dos analitos pelo íon Cl^- .

De acordo com os dados da função desejabilidade, as melhores condições para extração de Cu, Fe, Mn e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de linhaça foram: massa de amostra de 2,0 g, volume de HCl de 0,0 mL (8,0 mL de HNO_3), tempo de aquecimento de 8 min.

5.2. Aplicação do método de preparo de amostras assistido por radiação infravermelha para amostras de linhaça

Amostras de duas variedades de linhaça foram submetidas ao método proposto e seus valores, assim como seus desvio-padrões podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça marrom e dourada quantificados por FAAS em mg kg^{-1} (média \pm sd, n=3).

Elementos				
Amostras	Cu	Fe	Mn	Zn
Linhaça	10,55 \pm	47,60 \pm	20,75 \pm	52,89 \pm
Dourada	0,14	0,74	0,12	0,32
Linhaça	12,73 \pm	38,94 \pm	18,31 \pm	49,92 \pm
Marrom	0,68	1,06	0,23	4,08

Fonte: O Autor

A linhaça contém cerca de 31% de proteína, das quais cerca de 60% são compostas por moléculas de alto peso molecular e 20% de baixo peso molecular (OOMAH; MAZZA, 1993). Como a maioria dos íons metálicos está presente ligados a proteínas ou enzimas em organismos vivos (BITTENCOURT et al., 2014), supõe-se que seja necessário a quebra das ligações entre os metais e as proteínas para a disponibilização desses metais em solução. A temperatura atingida em sistemas abertos é limitada à temperatura de ebulição do ácido ou mistura ácida, o que se torna improvável a total decomposição de proteínas em sistemas abertos utilizando apenas HNO_3 (T.E.: 120°C), pois de acordo com a literatura, temperaturas superiores a 150°C são necessárias para a decomposição de proteínas (WÜRFELS; JACKWERTH, 1989). Contudo, com os resultados de recuperação dos analitos extraídos da linhaça com radiação IV em sistema aberto, supõe-se que alterações na conformação da molécula proteica podem ter liberado os metais em solução.

5.3. Validação do método proposto para a amostra de linhaça

Para a validação do método de extração de elementos inorgânicos usando radiação infravermelha em amostra de linhaça, empregou-se material de referência (MR) de farelo de soja, por não haver material de referência certificado para linhaça disponível comercialmente. O MR foi decomposto seguindo os mesmos procedimentos da amostra de linhaça e os analitos foram quantificados por FAAS. As concentrações dos analitos estudados no MR, assim como o intervalo de confiança estão descritos na tabela 7.

O uso de intervalo de confiança (IC) é o ideal ao se avaliar as recuperações utilizando materiais de referência (RUKHIN, 2014). O IC foi calculado usando a equação 3:

$$\text{Equação 3} - X \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

Onde X é a média das replicatas, t o valor de t tabelado para a incerteza desejada, s o desvio padrão das replicatas e n o número de replicatas. Em todos os casos admitiu-se uma distribuição normal de dados, assim a incerteza da medida é igual ao desvio-padrão.

Tabela 7 - Teores de Cu, Fe, Mn e Zn (mg kg⁻¹) quantificados por FAAS em material de referência 15: Farelo de Soja após digestão em sistema utilizando IR como fonte de aquecimento (média ± IC; n=3, 95 % de confiança).

Elementos	Embrapa Pecuária Sudeste MR 15: Farelo de soja	
	Valor experimental (mg kg ⁻¹)	Valor referência (mg kg ⁻¹)
Cu	20,30 ± 3,28	21,00 ± 1,22
Fe	253,53 ± 27,82	274,06 ± 22,30
Mn	30,22 ± 0,57	31,37 ± 2,38
Zn	56,39 ± 1,17	58,81 ± 2,88

Fonte: O Autor

Os teores de Cu, Fe, Mn e Zn obtidos na amostra de MR submetida ao método de preparo de amostra desenvolvido são estatisticamente semelhantes aos valores de referência, de acordo com teste t de Student com 95% de confiança. Esses dados comprovam a exatidão

do método de extração utilizando radiação infravermelha desenvolvido para determinação desses elementos em amostras de linhaça por FAAS.

4.5. Avaliação da remoção da fase lipídica na extração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça submetidas à decomposição utilizando IR

As amostras de linhaça foram submetidas a uma extração da fase lipídica e a amostra desengordurada foi então submetida à decomposição auxiliada por IR. Os teores de Cu, Fe, Mn e Zn, assim como seus respectivos desvio-padrão são descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Teores de Cu, Fe, Mn e Zn (mg kg^{-1}) em amostra de linhaça desengordurada após decomposição em sistema utilizando IR como fonte de aquecimento (média \pm sd; n=3).

Linhaça dourada desengordurada		
Elementos	Concentração Amostra desengordurada (mg kg^{-1})	Concentração Amostra sem extração de lipídeos (mg kg^{-1})
Cu	18,5 \pm 0,8	11,7 \pm 0,6
Fe	80,5 \pm 7,1	50,7 \pm 2,3
Mn	48,7 \pm 2,0	20,7 \pm 1,1
Zn	59,5 \pm 2,2	39,5 \pm 0,5

Em trabalho recente, MARTHE; AUGUSTI; COSTA, 2015 descreve a influência da remoção da fase lipídica na quantificação de elementos traço ligados à proteína, observando um aumento da concentração de Cu, Fe e Zn ao se retirar a fase lipídica o que pode significar a efetiva ligação desses metais a fase proteica (BITTENCOURT *et al*, 2014; LOPES *et al*, 2016).

Após a remoção da fase lipídica, um aumento na concentração dos elementos em estudo é observado. Em recente estudo, LOPES *et al.*, 2016, reporta pré-concentração de elementos traços em amostras de nozes submetidas a solubilização com ácido fórmico após a extração da fase lipídica indicando uma pré-concentração desses elementos na fase proteica.

De acordo com NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007, os íons metálicos têm alta afinidade com aminoácidos que contenham enxofre ou grupos carregados como metionina, cisteína, ácido glutâmico, arginina, ácido aspártico e lisina. OOMAH, B. D.; MAZZA, 1993, reporta altas concentrações desses constituintes na linhaça o que pode ser o indicativo de que esses elementos estão ligados a fase proteica.

Após realizado o balanço de massa percebeu-se que para Cu, Fe e Mn as concentrações são similares a amostra total, contudo houve perda de Zn durante o processo de extração. NAOZUKA; MARANA; OLIVEIRA, 2010; SANTOS, FELIPE A. *et al.*, 2011 determinaram zinco em amostras de castanha do brasil, coco babaçu e plasma de tilápia do Nilo e correlacionaram com a fração proteica. Nesse trabalho. Zn foi encontrado em seis frações proteicas de alto peso molecular, sendo a fração de 43 kDA solúvel em água. Portanto, durante o processo de extração lipídica, pode ter ocorrido a perda dessa fração. Além disso, MARTHE; AUGUSTI; COSTA, 2015, conseguiram determinar uma pequena quantidade de Zn (cerca de 10% da concentração inicial) na fase lipídica.

4.6. Avaliação dos limites de quantificação do método proposto para amostras de linhaça

O limite de quantificação do método proposto foi realizado utilizando a equação 4, de acordo com a IUPAC (da sigla em inglês de União Internacional de Química Pura e Aplicada), onde obteve-se a medida de 10 brancos independentes.

$$\text{Equação 4: - } LQ = 10 \times RSD / s$$

Onde LQ é o limite de quantificação, RSD é o desvio relativo dos brancos e s é o coeficiente angular da curva analítica.

Os valores de LQ são mostrados na tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Limites de quantificação para Cu, Fe, Mn e Zn analisados em amostras de linhaça por FAAS após extração assistida por radiação infravermelha.

Elemento	Limite de Quantificação (mg kg⁻¹)
Cu	0,28
Fe	1,4
Mn	0,35
Zn	3,4

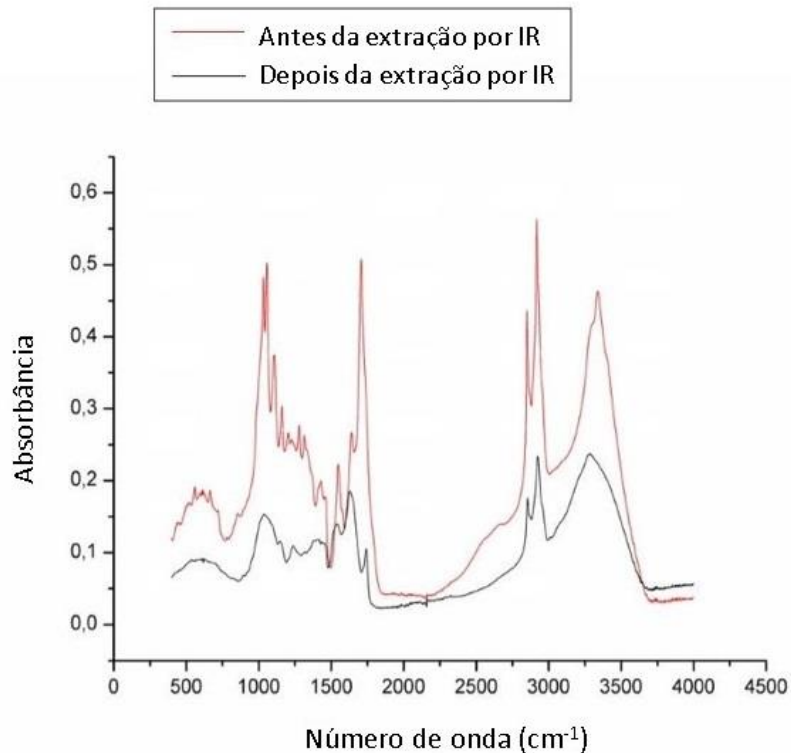
Fonte: O Autor

Os limites de quantificação encontrados são bem inferiores às concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn determinadas em amostras de linhaça pelo método de preparo de amostra proposto. Isso demonstra que o método de preparo de amostra foi adequado para a determinação desses minerais em amostras de linhaça por FAAS.

4.7. Análise dos espectros de infravermelho nas amostras de linhaça

O espectro de infravermelho da amostra de linhaça dourada desengordurada após a extração dos minerais assistida por IR foi obtido na tentativa de elucidar as mudanças que ocorrem na matriz após o processo de preparo de amostras usando IR como fonte de aquecimento. O espectro obtido foi comparado com o espectro da amostra antes do processo de extração. Os espectros podem ser observados na figura 5.

Figura 5 - Espectro de infravermelho para a amostra de linhaça dourada desengordura antes e depois do preparo de amostras usando IR como fonte de aquecimento.



Fonte: O Autor

Podemos observar que os dois espectros apresentam bandas semelhantes, contudo, para a amostra submetida à radiação infravermelha tem-se a diminuição da absorbância no infravermelho. Observa-se uma banda intensa em 3250 cm^{-1} que teve sua intensidade reduzida na amostra após extração. Bandas nesse comprimento de onda estão relacionados com deformações axiais de NH presentes em aminoácidos, as estruturas básicas de proteínas (BARTH, 2007; SARVER; KRUEGER, 1991). A deformação observada pode ser atribuída às cadeias laterais de arginina e resíduos de aspargina e glutamina (CHUNG, 2005). Esses aminoácidos são os principais constituintes da fração maior de proteínas em linhaça (CHUNG, 2005; OOMAH; MAZZA, 1993). Os comprimentos de onda entre $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ demonstraram um estiramento C-H. O estiramento C-S é observada entre $500\text{ e }770\text{ cm}^{-1}$, que inclui proteínas com pontes de enxofre (CHUNG, 2005).

Uma banda intensa perto de 1000 cm^{-1} sugere um agregado natural de proteínas provavelmente determinado por estiramentos entre C-C e C-N que são típicos esqueletos de proteínas e vibrações intermoleculares (BARTH, 2007). Depois do procedimento de decomposição na lâmpada de infravermelho pode-se observar que todas essas bandas

mostraram diminuição na intensidade da absorção, provavelmente, devido à solubilização da proteína das amostras de linhaça.

A linhaça é composta principalmente por proteínas de alto peso molecular, que apresentam temperaturas de desnaturação inferiores a 115 °C (OOMAH; DER; GODFREY, 2006). Como o presente sistema de decomposição atinge temperaturas acima de 120 °C, essas proteínas estão sendo desnaturadas e possivelmente estão liberando os íons metálicos ligados às suas estruturas em solução. Isso conduziu a recuperações totais na extração de Cu, Fe, Mn e Zn pelo método de extração proposto, a temperaturas mais baixas do que a necessária para a decomposição completa das proteínas.

4.8. Avaliação do planejamento experimental para a amostra de camarão

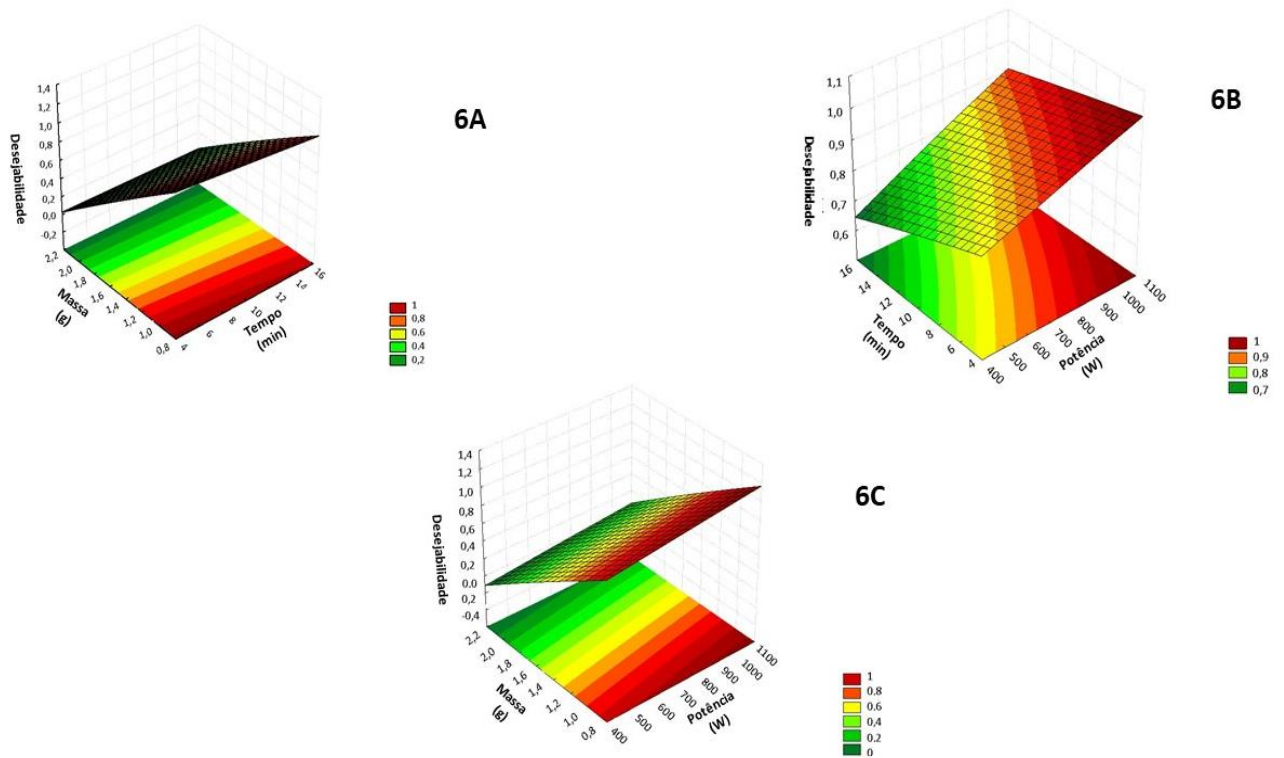
Para a otimização das condições de extração de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de camarão, realizou-se um planejamento experimental utilizando massa de amostra, tempo de aquecimento e potência da lâmpada de infravermelho como variáveis, e a concentração dos analitos como resposta.

O volume de HNO₃ não foi estudado no sistema uma vez que um volume mínimo era necessário quando se empregava massas maiores de amostra para evitar a carbonização. Por esse motivo, fixou-se o volume do ácido em 8 mL para todos os experimentos.

Variou-se a potência da lâmpada com o objetivo de investigar se o aumento da potência e, conseqüentemente, da energia transferida para o sistema, afetaria a recuperação dos analitos.

Utilizou-se a função desejabilidade para avaliar a melhor condição experimental para a extração de todos os analitos da amostra de camarão. Os gráficos obtidos podem ser observados na figura 6.

Figura 6 - Gráficos de desejabilidade obtidos no planejamento experimental para a extração de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn assistida por radiação infravermelha em amostras de camarão. (6A: Massa X Tempo; 6B: Tempo X Potência; 6C: Potência X Massa)



Fonte: O Autor

Na figura 6, pode-se observar a obtenção de valores de desejabilidade bem próximos de 1. Vê-se que grandes massas de amostras prejudicam a eficiência de decomposição. E, mesmo com o aumento da potência da lâmpada e tempo de aquecimento, quando massas superiores a 1,0 g foram utilizadas, não se obteve boas recuperações dos analitos. Muito provavelmente isso se deve à limitação da quantidade de ácido o qual manteve-se constante.

Outra variável importante para ser examinada é a potência da lâmpada. Podemos observar pelos gráficos da figura 6, principalmente no gráfico 6B que relaciona a potência e o tempo, que com maior potência aplicada à lâmpada de infravermelho menores tempos de extração são necessários. O aumento da potência da lâmpada de infravermelho promove uma maior transferência de energia para a amostra, uma vez que o aquecimento da amostra pela radiação infravermelha é realizado de forma direta, ou seja, pela interação da radiação

diretamente com as moléculas da amostra. De acordo com os valores de desejabilidade alcançados, potências de 500 W já são suficientes para uma efetiva disponibilização dos analitos em solução (~0,9 de desejabilidade). Assim, visando aumentar a vida útil da lâmpada, potências menores podem ser utilizadas.

Considerando os gráficos de desejabilidade, escolheu-se como ponto ótimo desse planejamento o uso de 1,0 g de amostra, 8 min de aquecimento e 500 W de potência.

4.9. Aplicação do método de preparo de amostra assistido por radiação infravermelha para amostras de camarão

A amostra de camarão foi submetida ao método otimizado de preparo de amostra e os teores de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn foram quantificados por ICP OES. As amostras, após o processo de digestão, apresentaram coloração amarelada, possivelmente devido aos óxidos de nitrogênio dissolvidos durante a extração. Terminada a etapa de digestão, as amostras foram filtradas e o sólido remanescente da amostra foi inferior a 5 % da amostra original, ou seja, a amostra foi solubilizada quase que completamente. As concentrações em mg kg^{-1} encontradas dos analitos na análise por ICP OES estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 - Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn em amostra de camarão por ICP OES após digestão assistida por radiação infravermelha. (média \pm sd, n=3)

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)
As	4,84 \pm 1,73
Cd	0,80 \pm 0,01
Co	1,05 \pm 0,18
Cu	67,14 \pm 4,70
Fe	209,39 \pm 11,22
Mn	24,11 \pm 1,90
Ni	1,11 \pm 0,13
Se	3,05 \pm 0,38
V	1,40 \pm 0,07
Zn	76,14 \pm 4,33

Fonte: O Autor

Observando os dados da tabela 10, pode-se notar que a maioria dos elementos em estudo tiveram desvios-padrão abaixo de 10%, com exceção para Co (17,14%), Ni (11,71%) e Se (12,45%) que pode estar relacionado a interferências nas linhas de emissão escolhidas e à baixa concentração do analito na amostra.

Pode-se observar que foi possível a determinação de elementos de características voláteis (As, Cd, Cu e Se) mesmo sem o auxílio de um sistema de refluxo. Ressalta-se que em geral elementos como As e Se estão ligados em amostras de frutos do mar nas suas formas orgânicas as quais podem ser menos voláteis que suas formas inorgânicas (ALTUNAY; GÜRKAN, 2016; YANG et al., 2009). WANG; BRINDLE, 2014a também relatam a recuperação de elementos de características voláteis (As, Sb e Se) em amostras ambientais submetidas a decomposição em sistema aberto utilizando radiação infravermelha como fonte de aquecimento.

4.10. Validação do método proposto para a decomposição de amostras de camarão.

Para avaliar a exatidão do método de digestão de camarão proposto, optou-se pela decomposição do material de referência certificado (SRM) NIST 1566b Oyster Tissue por ter

a matriz que mais se aproxima da amostra de camarão. Os teores certificados e experimentais podem ser observados na tabela 11 com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 11 - Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em material de referência certificado NIST 1566b Oyster Tissue após preparo de amostra assistido por radiação infravermelha. (média \pm IC, n=3, 95 % de confiança)

NIST SRM 1566b: Oyster Tissue		
Elementos	Valor experimental (mg kg⁻¹)	Valor referência (mg kg⁻¹)
As	6,16 \pm 2,73	7,65 \pm 0,16
Cd	2,91 \pm 0,45	2,48 \pm 0,08
Co	0,380 \pm 0,01	0,371 \pm 0,002
Cu	73,4 \pm 18,8	71,6 \pm 1,6
Fe	217,9 \pm 43,5	205,8 \pm 6,8
Mn	18,2 \pm 0,7	18,5 \pm 0,2
Ni	1,02 \pm 0,07	1,04 \pm 0,9
Se	1,95 \pm 0,35	2,06 \pm 0,14
V	0,580 \pm 0,198	0,577 \pm 0,022
Zn	1408 \pm 119,2	1424 \pm 92

Fonte: O Autor

Podemos verificar na tabela 10 que os valores experimentais obtidos dos elementos estudados no material de referência certificado são estatisticamente semelhantes aos valores certificados, segundo o teste t de Student com 95 % de confiança.

Como as recuperações dos elementos voláteis também foram alcançadas, podemos inferir que os compostos orgânicos com os quais esses elementos estão ligados possuem baixa volatilidade sendo possível a determinação desses elementos mesmo com a digestão da amostra empregando radiação infravermelha em sistema aberto.

4.11. Avaliação dos limites de quantificação do método de preparo de amostra proposto para camarão

Os limites de quantificação para amostra de camarão submetida à digestão assistida por infravermelho foram calculados seguindo a equação 5, seus valores podem ser observados na tabela 12.

$$\text{Equação 5 - } \mathbf{BEC = I_{branco}/s}$$

$$\mathbf{LQ = 10 \times BEC \times RSD/s}$$

Onde: BEC é a sigla em inglês para concentração de fundo equivalente, I_{branco} é média de intensidade de 10 brancos independentes, s é o coeficiente angular da curva de calibração, LQ é o Limite de quantificação e RSD é o desvio padrão relativo de 10 amostras em branco independentes.

Tabela 12 - Limites de quantificação para determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em camarão, após preparo de amostra assistido por radiação infravermelha.

Elementos	Limites de Quantificação (mg kg⁻¹)
As	2,50
Cd	0,20
Co	0,17
Cu	0,59
Fe	0,30
Mn	0,80
Ni	0,33
Se	0,35
V	0,30
Zn	0,17

Fonte: O Autor

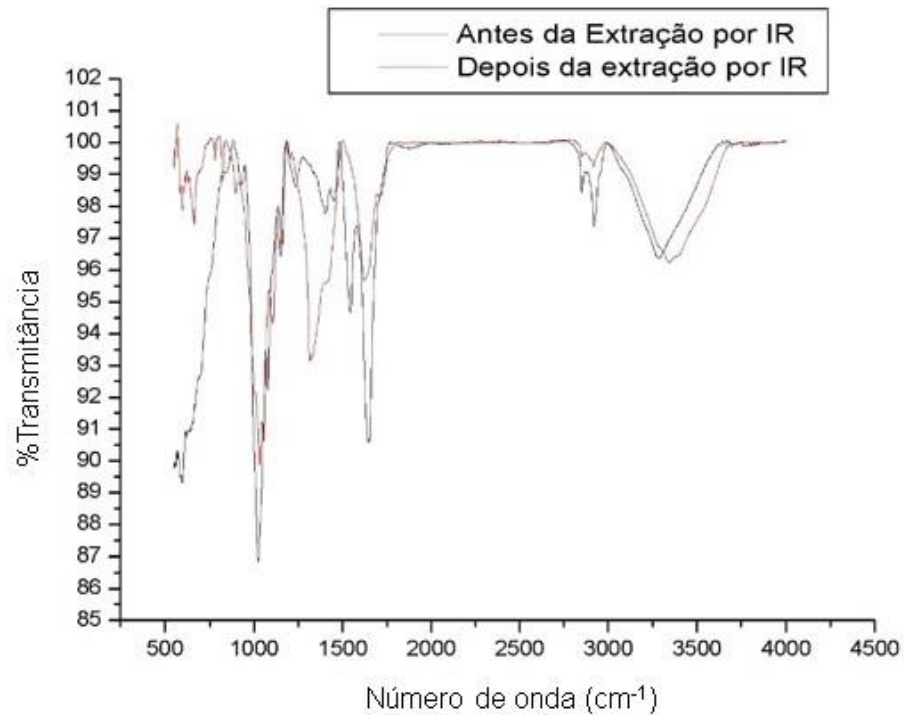
Pode-se observar que o método apresentou baixos limites de quantificação para os elementos estudados, com valores inferiores aos teores obtidos na amostra real. Os resultados mostram que o método tem limites de quantificação adequados para análise desses elementos na amostra real.

4.12. Análise dos espectros de infravermelho nas amostras de camarão

O espectro de infravermelho da amostra de camarão depois da digestão assistida por IR foi obtido na tentativa de elucidar os compostos presentes na solução final da amostra, uma vez que o resíduo sólido resultante após a filtração foi praticamente inexistente (~0,05g).

O espectro foi comparado com a amostra antes do processo de digestão. Os espectros podem ser observados na figura 7.

Figura 7 - Espectro de infravermelho da amostra de camarão antes e depois da digestão assistida por radiação infravermelha



Fonte: O Autor

Cerca de 45 a 50% da massa seca de camarão é composto por proteínas (DA SILVA, CRISTIANE PEREIRA *et al*, 2017; GAO *et al*, 2016) e, como já discutido, a maior parte dos elementos inorgânicos estão ligadas a essas estruturas em sistemas biológicos.

Pode-se observar que os dois espectros apresentam perfis bem semelhantes, antes e após a digestão assistida por radiação infravermelha. Observa-se uma banda em aproximadamente 3250 cm^{-1} que está relacionada a estiramentos da ligação N-H que constituem os aminoácidos, não é observado uma diminuição da banda depois do processo de extração. Isso indica que não há uma completa destruição da proteína, mas uma solubilização dos aminoácidos em solução. Uma banda a 1630 cm^{-1} próxima a outra em 1690 cm^{-1} no espectro antes da digestão por IR está relacionada às bandas I de amidas vindo do estiramento C=O. Essa banda pode corresponder à estrutura secundária das proteínas, e não sofrem grandes variações

das cadeias laterais, dependendo apenas da estrutura da proteína original (BARTH, 2007). Essa banda sofre uma diminuição de intensidade, o que pode estar relacionado a uma quebra dessa estrutura pela ação das condições de digestão, não havendo mais um esqueleto de proteína, mas o aminoácido solubilizado em solução.

Uma banda próxima a 1250 cm^{-1} sofre um aumento no sinal após a digestão por IR. Nessa região, encontram-se as bandas de amida III em proteínas, que estão relacionadas às interações NH com CN e possuem pouca contribuição dos estiramentos C=O.

Discutiu-se anteriormente que a temperatura atingida pelo sistema de decomposição utilizando IR (120°C) é insuficiente para uma decomposição completa de proteína. Porém, em trabalho recente, GAO *et al.*, 2016 descrevem a mudança nas propriedades das proteínas de camarão branco submetidas a desnaturação termal. Nesse trabalho, as amostras de camarão foram submetidas a tempos de aquecimento entre 10 e 30 min a temperatura de 50°C e espectros RAMAN foram obtidos em cada caso. Observou-se uma diminuição das estruturas de α -hélices das proteínas com consequente aumento de estruturas β -hélices. Essa mudança está relacionada a uma desnaturação da proteína com consequente rearranjo para uma nova conformação 3D. Assim, mesmo que a temperatura do sistema não consiga a decomposição completa da amostra, a desnaturação proteica e a sua nova conformação podem liberar os metais em solução. Além disso, os experimentos realizados por Gao, 2016, utilizaram apenas água, o uso do HNO_3 e temperaturas superiores podem acelerar esse processo e a possível quebra de proteínas mais suscetíveis.

Estudos dos aminoácidos presentes em camarão estimam uma grande concentração de leucina, lisina, arginina e fenilalanina (DA SILVA, CRISTIANE PEREIRA *et al.*, 2017; PINTO; HIRDES; SANCHES FILHO, 2013; SANTOS, MARIA DO CARMO FERRÃO *et al.*, 2016). No espectro da figura 8 pode-se observar um pico próximo de 1000 cm^{-1} que não sofre variação após o uso de radiação infravermelha, essa banda pode estar relacionada com a fenilalanina (GAO *et al.*, 2016) que não sofre desnaturação com a temperatura, além de ser de difícil decomposição. A p-nitrofenilalanina é também um composto comumente encontrado em resíduos de decomposição de proteínas utilizando HNO_3 (WÜRFELS; JACKWERTH, 1989).

Mais estudos devem ser realizados para compreender o efeito da interação da radiação infravermelha com a matriz de amostras orgânicas. A determinação de carbono residual e de nitrogênio orgânico na solução pode ajudar a comprovar a suposição de solubilização dos aminoácidos na solução final.

4.13. *Análise de C dissolvido e carbono residual em amostras NIST 1566b – Oyster Tissue*

As amostras de tecido de ostra, decompostas em bloco digestor, foram analisadas por ICP OES. Os teores de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn obtidos experimentalmente e os teores de referência, podem ser vistos na tabela 13.

Tabela 13 - Determinação de As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES em amostra de referência certificado NIST 1566b Oyster Tissue, após digestão em bloco digestor. (média \pm IC, n=3; 95% de confiança)

NIST SRM 1566b: Oyster Tissue		
Elementos	Bloco Digestor (mg kg⁻¹)	Valor referência (mg kg⁻¹)
As	7,84 \pm 1,88	7,65 \pm 0,16
Cd	2,77 \pm 0,55	2,48 \pm 0,08
Co	<LD	0,371 \pm 0,002
Cu	80,0 \pm 10,22	71,6 \pm 1,6
Fe	200,9 \pm 7,3	205,8 \pm 6,8
Mn	18,0 \pm 0,2	18,5 \pm 0,2
Ni	<LD	1,04 \pm 0,9
Se	<LD	2,06 \pm 0,14
V	<LD	0,577 \pm 0,022
Zn	1380 \pm 122	1424 \pm 92

Fonte: O Autor

Como podemos observar alguns elementos encontraram-se em valores abaixo do limite de detecção da técnica, sendo que esses mesmos elementos puderam ser quantificados quando utilizou-se o sistema de preparo de amostra IR (Tabela 11), uma vez que a quantidade de amostra era superior (1,0 g no método de IR e 250 mg no método de bloco digestor).

O carbono orgânico dissolvido e o nitrogênio dissolvido do material de referência certificado após decomposição em bloco digestor e após digestão usando sistema IR, e da

amostra de camarão após digestão pelo sistema IR foram quantificados por análise elementar. Os resultados da análise elementar estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 - Determinação de C e N em amostras de NIST 1566b e camarão após decomposição em bloco digestor e pelo sistema IR.

Elementos	NIST 1566b: Oyster Tissue		Camarão
	Método Bloco Digestor	Método IR	Método IR
C (%RCC)	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,2
N (%RNC)	41,1 ± 0,3	50,2 ± 0,2	38,1 ± 0,3

*%RCC = Porcentagem de carbono residual; % NC = Porcentagem de Nitrogênio Residual

Fonte: O Autor

Podemos notar pelos valores de %RCC que os dois métodos apresentam valores semelhantes, o que representa boa eficiência de digestão para os dois métodos. Contudo, o método que utiliza radiação infravermelha é bem mais rápido (8 min) comparado ao tempo requerido para a decomposição das amostras em bloco digestor (3 h). Mesmo o bloco digestor tendo uma alta frequência analítica em relação ao método de infravermelho, a rapidez com que a decomposição é realizada com IR compensa o número de amostras que podem ser digeridas simultaneamente em bloco digestor.

Os teores de nitrogênio apresentaram-se elevados nos digeridos dos dois métodos, isso corrobora as bandas observadas no espectro de infravermelho na região de aminoácidos (estiramentos NH), e podem estar relacionados a proteínas de mais difícil decomposição. A diferença entre os teores de nitrogênio e carbono pode ser relacionado a proteínas de difícil decomposição como a histidina e a cistina, por exemplo, possuem mais de 1 mol de nitrogênio na sua estrutura, representando assim maiores contribuições em massa desse elemento.

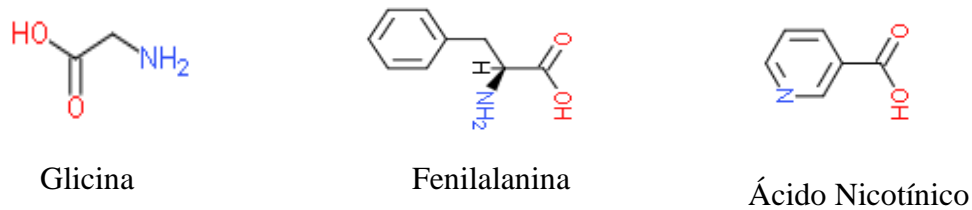
Com os resultados da análise elementar podemos inferir que mesmo a radiação infravermelha não conseguindo decompor completamente amostras de proteína, suas soluções apresentam baixos teores de carbono residual, comparável ao obtido pelo bloco digestor que é um método clássico de digestão na literatura. Além disso, o teor alto de nitrogênio explica algumas bandas encontradas no espectro de infravermelho.

4.14. Avaliação dos parâmetros de influência na digestão utilizando radiação infravermelha como fonte de aquecimento

Para avaliar a eficiência de digestão empregando o sistema IR, foram digeridas diferentes substâncias orgânicas com estruturas e dificuldades de decomposição variadas: glicina, fenilalanina e ácido nicotínico (LINHARES MARQUES *et al*, 2015; WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989).

Os compostos orgânicos estudados apresentam diferentes estruturas orgânicas, o que faz com que a sua reação com o ácido nítrico seja diferente. Não há qualquer trabalho na literatura que estude o comportamento dessas substância em digestão assistida por radiação infravermelha. Na figura 8 pode ser visto as estruturas orgânicas desses compostos:

Figura 8 - Estruturas dos compostos orgânicos utilizados nos experimentos



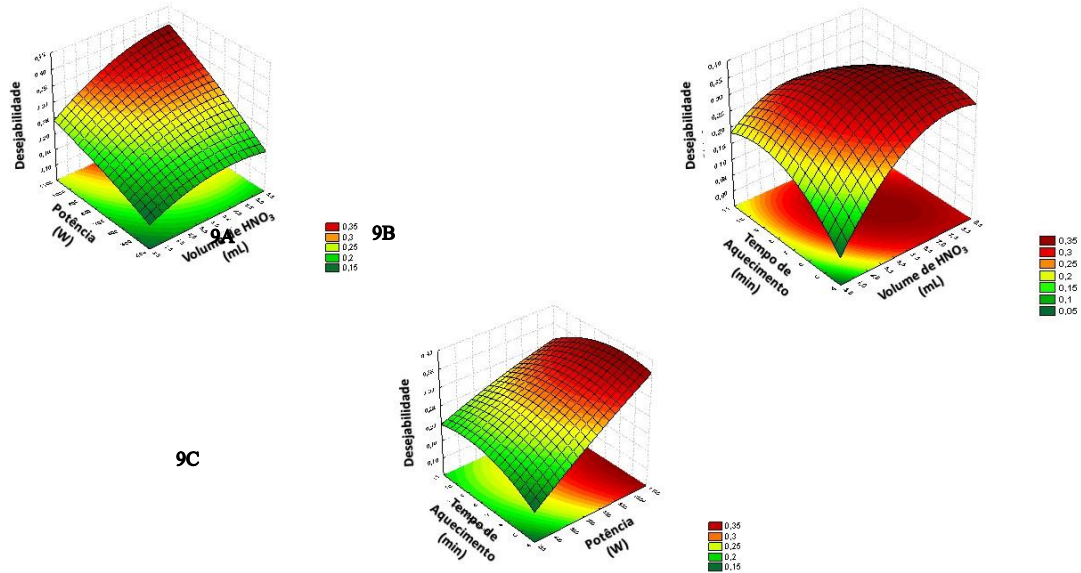
Fonte: O Autor

As amostras foram submetidas a um planejamento fatorial completo em dois níveis e aplicou-se a função desejabilidade para determinar o ponto ótimo para os três compostos em conjunto.

Os gráficos podem ser observados na figura 9.

Figura 9 - Gráficos de desejabilidade obtidos no planejamento experimental para análise do teor de carbono residual em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico após digestão usando

sistema IR (8A: Potência X Volume de HNO₃; 8B: Tempo X Volume de HNO₃; 8C: Massa X Potência)



Fonte: O Autor

Podemos observar a necessidade de um alto volume de HNO₃, assim como elevadas potências em tempos medianos de aquecimento. As condições experimentais requeridas para a decomposição desses compostos foram semelhantes àquelas requeridas para as amostras de linhaça e camarão. Um meio oxidante forte é importante na decomposição de compostos orgânicos, mesmo que não se alcance temperaturas elevadas, limitando-se a 120°C. Alta potência da fonte de radiação corresponde a maior quantidade de energia transmitida à amostra em menor tempo. Assim, escolheu-se como ponto ótimo: 8 mL de HNO₃, 1000 W de potência da lâmpada e 8 min de aquecimento.

Aplicou-se o método ótimo novamente nas amostras e avaliou-se o teor de carbono residual comparando-se com a digestão em bloco digestor descrito acima para as amostras de material certificado de tecido de ostra.

Os teores de carbono residual (%RCC) para amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico nos dois métodos são descritos na tabela 15.

Tabela 15 - Determinação do teor de carbono residual (%RCC) em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico após digestão no sistema IR e bloco digestor. (média \pm sd, n=2)

Amostra	%RCC	
	Decomposição usando IR	Decomposição em bloco digestor
Glicina	62,4 \pm 1,0	50,7 \pm 0,2
Fenilalanina	68,5 \pm 0,2	82,9 \pm 0,1
Ácido Nicotínico	77,8 \pm 0,6	95,0 \pm 0,3

Fonte: O Autor

O teor de carbono residual apresentados pelos compostos estudados após digestão em bloco digestor foi coerente com os dados da literatura. De acordo com alguns trabalhos, a fenilalanina e o ácido nicotínico são compostos de difícil decomposição (LINHARES MARQUES et al., 2015; WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989), portanto já era esperado que maiores valores de carbono residual seriam encontrados nos digeridos desses compostos comparados à glicina. Contudo, não foi isso que ocorreu com as digestões usando o sistema IR. No sistema de preparo utilizando-se a radiação infravermelha observou-se valores de carbono residual menores nas amostras de fenilalanina e ácido nicotínico do que os valores obtidos no bloco digestor.

Provavelmente a interação da radiação infravermelha com a amostra seja mais efetiva para determinados compostos, uma vez que esse tipo de radiação interage diretamente com as moléculas que compõem a amostra. O aquecimento com a radiação infravermelha é causada pela interação dessa radiação eletromagnética através da vibração e rotação das ligações químicas, diferente do aquecimento condutivo do bloco digestor. Mesmo sendo uma radiação não-ionizante como a radiação micro-ondas, ela é bem mais energética. Estudos mais detalhados da interação radiação infravermelha com a amostra deve ser melhor estudada.

Na tentativa de se entender o mecanismo de reação da radiação infravermelha, amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico foram submetidas à decomposição no sistema IR com diferentes concentrações de um carboidrato de fácil decomposição, no caso, glicose. Os dados de %RCC obtidos para cada adição pode ser observado na tabela 16.

Tabela 16 - Teores de %RCC em amostras de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico utilizando sistema de decomposição IR na presença de glicose. (média \pm sd, n=3)

Glicose (mg)	Amostra		
	Glicina %RCC	Fenilalanina %RCC	Ácido Nicotínico %RCC
0	62,43 \pm 0,32	68,53 \pm 0,20	77,81 \pm 0,61
50	64,60 \pm 0,52	67,91 \pm 0,12	78,18 \pm 0,77
100	61,83 \pm 0,35	61,87 \pm 0,55	63,77 \pm 2,0
150	61,51 \pm 1,1	58,60 \pm 1,9	57,69 \pm 1,5

Fonte: O Autor

Pode-se observar através desses resultados que a adição de glicose ajuda na eficiência de decomposição das amostras em estudo utilizando o sistema de decomposição com IR, esse mesmo fenômeno é observado e bem descrito por WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989. Como a glicose é um composto de fácil decomposição ele funciona como um iniciador da reação fazendo com que ocorra a produção de NO_x, em sistemas fechados. A formação desse gás aumenta a pressão do sistema, aumentando a eficiência de decomposição, além de renovar a concentração de HNO₃ no frasco de reação. Em sistema aberto uma parte desse gás é perdido, contudo a fração solubilizada pode ajudar na decomposição dos compostos já que os gases NO_x possuem capacidades oxidantes. WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989, determinaram que uma concentração de 90 mg de glicose é suficiente para garantir uma boa decomposição, no presente trabalho concentrações de 150 mg apresentaram resultados muito próximos daqueles encontrados para 100 mg seguindo a tendência proposta por esses autores.

Esse fenômeno é muito importante, uma vez, que em amostras reais há uma concentração elevada de carboidratos de fácil decomposição. Esses compostos servem como iniciadores da reação fazendo com que a reação ocorra com mais eficiência o que pode explicar os valores de carbono residual baixos encontrados nas amostras reais em estudo nesse trabalho.

6 CONCLUSÕES

O sistema de extração de elementos inorgânicos utilizando radiação infravermelha como fonte de aquecimento desenvolvido mostrou-se viável e uma alternativa de baixo custo para o preparo de amostras de alimentos de origem vegetal e animal estudados para posterior análise elementar empregando FAAS e ICP OES.

A massa de amostra, o volume de ácido e o tempo foram variáveis importantes no sistema de extração usando IR. Foi possível usar elevadas massas de amostra, 2 g de linhaça e 1 g de camarão, pequenos volumes de mistura oxidante e apenas 8 min para a extração eficiente dos analitos nas amostras de linhaça e camarão. Assim, foi possível quantificar Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de linhaça usando FAAS e As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e V em amostras de camarão usando ICP OES com boa precisão e exatidão.

A eficiência de decomposição do sistema IR foi avaliada pela digestão de padrões de glicina, fenilalanina e ácido nicotínico. A %RCC da digestão desses compostos foram diferentes daqueles encontrados na literatura, sendo a fenilalanina e ácido nicotínico com digestões mais eficientes pelo sistema IR do que quando se empregou bloco digestor. Verificou-se também que glicose apresenta uma influência positiva na decomposição dos compostos submetidos a IR, principalmente para o ácido nicotínico e a fenilalanina.

Mais experimentos devem ser realizados a fim de se encontrar o real mecanismo de interação entre a radiação eletromagnética e a amostra para se entender os produtos de oxidação formados a fim de elucidar os mecanismos de decomposição.

Preparo de amostras assistido por radiação infravermelha é uma alternativa simples, rápida e de baixo custo, comparada a métodos tradicionais de decomposição completa de amostras. Outra vantagem é a possibilidade de trabalhar com grandes massas de matrizes orgânicas, o que garante boa precisão e exatidão para amostras heterogêneas, além de ser um atrativo para análises de traço, pois dispensa a necessidade de técnicas mais sensíveis de detecção.

REFERÊNCIAS

- ALTUNAY, N.; GÜRKAN, R. Separation/preconcentration of ultra-trace levels of inorganic Sb and Se from different sample matrices by charge transfer sensitized ion-pairing using ultrasonic-assisted cloud point extraction prior to their speciation and determination by hydride gener. **Talanta**, v. 159, p. 344–355, 2016.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, A. N. What causes most errors in chemical analysis? **Analytical Methods**, v. 5, n. 12, p. 2914–2915, 2013.
- BARANOWSKA, I. **Handbook of Trace Analysis**. [s.l: s.n.].
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- BERMEJO-BARRERA, P. et al. The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 439, n. 2, p. 211–227, 2001.
- BITTENCOURT, L. et al. Determination of metal associated with proteins of wheat seed samples after sequential extraction procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 264–270, 2014.
- BRAGAGNOLO, N. Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 359–369, 2001.
- BRESSANI, F. A. et al. Digestão de óleo lubrificante encapsulado em forno de microondas com radiação focalizada por adição de amostra ao reagente pré-aquecido. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1210–1214, 2006.
- CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 3, p. 225–232, 2005.
- CARLI, B. V.; CAMPINAS, U. E. DE. Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (*Linum Usitatissimum* L .) Golden and brown flaxseed (*Linum Usitatissimum* L .) physicochemical and microbiological characterization. v. 71, n. 2, p. 291–300, 2012.

- CARRILHO, E. N. V. M. et al. An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 371, n. 4, p. 536–540, 2001.
- CARTER, J. Flax seed as a source of alpha linolenic acid. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 551–551, 1993.
- CARVALHO, L. R. F. et al. Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 317, n. 1, p. 171–179, 1995.
- CHUNG, M. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 271–279, 2005.
- COSTA, L. M. et al. 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. et al. Factorial design employed for microwave-assisted digestion of bean samples. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 149–152, 2006.
- DA SILVA, C. P. et al. Biological value of shrimp protein hydrolysate by-product produced by autolysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 456–461, 2017.
- DA SILVA, S. V. et al. Evaluation of bromine and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination. **Food Chemistry**, v. 190, p. 364–367, 2016.
- DANTAS, A. N. S. et al. The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES. **Talanta**, v. 107, p. 292–296, 2013.
- DE MORAES FLORES, É. M. et al. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3525–3529, 2004.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variable. **The Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214–219, 1980.
- DOIRON, K. J. et al. Detecting molecular changes in Vimy flaxseed protein structure using synchrotron FTIRM and DRIFT spectroscopic techniques: Structural and biochemical characterization. **Spectroscopy**, v. 23, n. 5–6, p. 307–322, 2009.
- DRUZIAN, G. T. et al. Rare earth element determination in heavy crude oil by USN-ICP-MS after digestion using a microwave-assisted single reaction chamber. **Journal of Analytical**

Atomic Spectrometry, v. 31, p. 1185–1191, 2016.

E. C. MAGALHÃES, C. et al. Direct Determination of Mercury in Sediments by Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 10, p. 1231–1234, 1997.

EL AZOUZI, H.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Multi-elemental analysis of mussel samples by atomic absorption spectrometry after room temperature sonication. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. June, p. 533–538, 1998.

ELLISON, S. L. R.; HARDCASTLE, W. A. Causes of error in analytical chemistry: Results of a web-based survey of proficiency testing participants. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 17, n. 4, p. 453–464, 2012.

GAO, R. et al. Changes in Properties of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Protein during Thermal Denaturation. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 21–26, 2016.

GINÉ, M. F. Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente ICP-AES. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 1998.

GONZALEZ, M. H. et al. 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. et al. 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.

GOUVEIA, S. T.; FATIBELLO-FILHO, O.; NÓBREGA, J. A. Infra-red Heating as an Alternative Technique for Fast Sample Preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 3, p. 261–265, 2000.

GRINDLAY, G. et al. Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 2, p. 234–243, 2008.

HARRINGTON, E. C. The desirability function. **Industrial Quality Control**, v. 21, p. 494–498, 1965.

HOLLER, J. F.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. São Paulo: Bookman, 2013.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de Preparo de Amostras para análise Elementar**. 1^a ed. São Paulo: EditSBQ, 2016.

LINHARES MARQUES, T. et al. High pressure microwave-assisted flow digestion system

using a large volume reactor-feasibility for further analysis by inductively coupled plasma-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 9, p. 1898–1905, 2015.

LOGERAIS, P. O.; BOUTEVILLE, A. Modelling of an infrared halogen lamp in a rapid thermal system. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 49, n. 8, p. 1437–1445, 2010.

LOPES, G. S. et al. An evaluation of the use of formic acid for extraction of trace elements from Brazil nut and babassu coconut and its suitability for multi-element determination by ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1229–1235, 2016.

LUTZ, A. **Métodos Físicos para análise de Alimentos**. [s.l.] Instituto Adolf Lutz, 2008.

MARTHE, D. DE B.; AUGUSTI, R.; COSTA, L. M. Influence of the Lipid Phase Removal on the Quantification of Cu, Fe and Zn Bound to Proteins from Golden Flaxseed (. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 8, p. 1718–1724, 2015.

MILESTONE. **The Milestone Ultrawave®**. Disponível em: <www.milestonesci.com/ultrawave acessado em 28/09/2016.>.

MINAMI, H.; HONJYO, T.; ATSUYA, I. A new solid-liquid extraction sampling technique for direct determination of trace elements in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 2, p. 211–220, 1996.

MULLER, A. L. H. et al. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v. 136, p. 161–169, 2015.

MULLER, C. C. et al. Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP-OES. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 255–260, 2014.

NAOZUKA, J.; MARANA, S. R.; OLIVEIRA, P. V. Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 1, p. 78–85, 2010.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1547–1553, 2007.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, p. 161, 2011.

NÓBREGA, J. A. et al. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation.

Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy, v. 57, n. 12, p. 1855–1876, 2002.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 889–894, jul. 2001.

OOMAH, B. D.; DER, T. J.; GODFREY, D. V. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 733–741, 2006.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Flaxseed proteins-a review. **Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 109–114, 1993.

PEREIRA, J. S. F. et al. Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 29–35, 2013.

PINTO, A.; HIRDES, I.; SANCHES FILHO, P. Determinação de metais pesados nos camarões (*Farfantepenaeus paulensis*) consumidos na cidade de Pelotas-RS. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 129–134, 2013.

PRATT, K. W. et al. Voltammetric and Liquid Chromatographic Identification of Organic Products of Microwave-Assisted Wet Ashing of Biological Samples. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 2024–2027, 1988.

RIADH, M. H. et al. Infrared Heating in Food Drying: An Overview. **Drying Technology**, v. 33, n. 3, p. 322–335, 17 fev. 2015.

RUKHIN, A. L. Compatibility verification of certified reference materials and user measurements. **Metrologia**, v. 51, n. 1, p. 11–17, 2014.

SANTOS, C. et al. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted di. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 987–994, 2000.

SANTOS, F. A. et al. Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 1–2, p. 43–49, 2011.

SANTOS, M. DO C. F. et al. Caracterização da pesca e dos pescadores artesanais de camarões penaeidae em salina no município de Macau - Rio Grande do Norte. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 2, p. 465–478, 2016.

SARVER, R. W.; KRUEGER, W. C. Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: a data base analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 194, n. 1, p. 89–100,

1991.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1527–1532, ago. 1991.

VALENTI, W. C. et al. **Aquicultura no brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília - DF: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

WANG, Y.; BRINDLE, I. D. Rapid high-performance sample digestion for ICP determination by ColdBlock™ digestion: part 2: gold determination in geological samples with memory effect elimination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 10, p. 1904–1911, 2014a.

WANG, Y.; BRINDLE, I. D. Rapid high-performance sample digestion for ICP determination by ColdBlock™ digestion: part 1: environmental samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 10, p. 1904–1911, 2014b.

WILTSCHE, H. et al. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 10, p. 2223–2234, 2015.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. RESIDUES FROM BIOLOGICAL MATERIALS AFTER PRESSURE DECOMPOSITION WITH NITRIC ACID Part 2”. Identification of the Reaction Products. **Analytica Chimica Acta**, v. 226, p. 17–30, 1989.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Analytica Chimica Acta**, v. 226, n. C, p. 1–16, 1989.

YANG, G. et al. Speciation analysis of arsenic in *Mya arenaria* Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 471–476, 2009.

ZHANG, N. et al. Multielemental analysis of botanical samples by ICP-OES and ICP-MS with focused infrared lightwave ashing for sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 68–77, 2017.