



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFBA**  
**GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**DANIELE CRISTINA MUNIZ BATISTA DOS SANTOS**

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE  
OZÔNIO EM ÁGUAS E DE ELEMENTOS TRAÇO EM LEITE DE COCO**

**SALVADOR**

**2012**

**DANIELE CRISTINA MUNIZ BATISTA DOS SANTOS**

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE  
OZÔNIO EM ÁGUAS E DE ELEMENTOS TRAÇO EM LEITE DE COCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças A. Korn (UFBA)

Co- orientador: Prof. Dr. Mauro Korn (UNEB)

**Salvador**

**2012**

**DEDICATÓRIA**

*Este trabalho é dedicado com gratidão acima de tudo a Deus, por Sua fidelidade a mim, sempre dirigindo e guardando a minha vida, dando-me forças quando necessário e estando ao meu lado a cada instante, sendo este um momento difícil ou de regozijo. A Ele toda honra e toda glória! É com muita satisfação que dedico também este trabalho à minha mãe, Eronildes Muniz. Para mim um exemplo de guerreira e de pessoa que tem fé. Mãe, não tenho palavras para agradecer o seu amor incondicional, apoio, incentivo e proteção.*

*"A gratidão desbloqueia a abundância da vida.  
Ela torna o que temos em suficiente, em mais.  
Ela torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em claridade.  
Ela pode transformar uma refeição em um banquete,  
uma casa em um lar, um estranho em um amigo.  
A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje,  
e cria uma visão para o amanhã"*

*(Melody Beattie)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência.

A minha mãe, amiga, confidente, companheira, Eronildes Muniz.

A Rogério pelo amor e paciência.

A toda minha família.

À Prof<sup>a</sup>. Maria das Graças A. Korn pela oportunidade, confiança, paciência e compreensão.

Ao Prof. Mauro Korn pela orientação neste trabalho.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto: Paula Pinto, Lúcia Saraiva, Costa Lima pela orientação durante a realização do estágio sanduíche.

Às mais que amigas: Daniele, Daniela, Dayse, Elane, Jacira, Luciane e Manuela pela grande amizade e entretenimento.

Aos amigos Tiago e Mauro (*in memoriam*) pelos momentos de descontração e por sempre ensinar uma forma de encarar a vida de forma mais descontraída.

Às alunas de iniciação científica: Larissa e Thaís pela grande ajuda na execução dos experimentos, companheirismo e boas risadas.

Aos amigos que fizeram e fazem parte do GPQA: Amanda, Andrea, Aníbal, Cássia, Denilson, Edevaldo, Fernanda, Flávia, Gabriel, Geysa, Isa, Lília, Letícia, Luciene, Milena, Nila, Suzana, Taiana e Wagna.

Aos colegas do GRPQQ pela amizade e auxílio, em especial a Daniel e Danilo pela ajuda nas análises quimiométricas.

Aos professores do Departamento de Química Analítica pela convivência quer como aluna ou como colega.

À todos os professores do Instituto de Química da UFBA, pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do Instituto de Química da UFBA pela disponibilidade de sempre ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiadores do projeto PRONEX: Núcleo De Excelência em Química Analítica da Bahia: Química E Qualidade em Alimentos e Bebidas - NQA

A todos os meus amigos que torcem pelo meu sucesso.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**A todos, os meus sinceros agradecimentos!!!**

## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos espectrométricos para a determinação de ozônio em águas e elementos traço em leite de coco. A primeira etapa foi desenvolvida, no âmbito de um projeto de doutorado sanduíche, na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto em Portugal e a segunda no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, Brasil. Na primeira parte do trabalho foi proposto um sistema de análise por injeção sequencial para determinação de  $O_3$  em água baseado na quimiluminescência deste com luminol sem a presença de catalisadores. Parâmetros físico-químicos foram estudados para obter o melhor desempenho analítico. O ciclo analítico desenvolvido permitiu a determinação de ozônio em 20 segundos com um consumo de 200  $\mu\text{L}$  de amostra e 200  $\mu\text{L}$  de luminol. O método apresentou boa precisão ( $RSD < 2,9\%$ ) bons limites de detecção e quantificação foram 0,04 e 0,13  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente e a taxa de amostragem foi de cerca de 140 determinações/h. O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de ozônio residual em águas e os resultados concordam a 95% de confiança com os fornecidos pelo procedimento de referência, a espectrofotometria no UV-Vis e o teor de ozônio nas diferentes amostras variou entre 0,21 - 1,36  $\text{mg L}^{-1}$ . O método analítico proposto representou uma alternativa vantajosa, pois requer um baixo consumo de reagentes e produz um volume reduzido de resíduos. A segunda parte consistiu no desenvolvimento de estratégias para a determinação de constituintes inorgânicos em amostras de leite de coco comercializadas na cidade de Salvador, Bahia. Para a avaliação multielementar foram propostos dois procedimentos de decomposição: em bloco digestor e assistido radiação por micro-ondas. Também foi proposto um procedimento de extração assistida por energia ultrassônica (US). As técnicas espectrométricas empregadas para determinação dos analitos foram: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A eficiência de decomposição foi avaliada considerando os parâmetros acidez e teor de carbono residual. Ferramentas estatísticas, PCA e HCA, evidenciaram que há diferença entre três fornecedores de leite de coco em relação aos analitos determinados após decomposição em forno de micro-ondas, bem como o tipo de embalagem. Para avaliação do US, foram aplicados planejamentos fatorial e Doehlert. A exatidão das metodologias propostas foi verificada com materiais de referência certificados (NIST SRM 8435 e 1549) e teste de adição e recuperação. As faixas de concentração, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para os analitos foram: Ca (10 - 138); Cu (0,15 - 1,7); Fe (0,9 - 4,9); K (97 - 1773); Mg (23 - 206); Mn (0,3 - 3,2); P (116 - 701); Zn (0,4 - 2,2); Cr (0,185 - 0,211), Na (59-1186); Ni (0,113 - 0,133) e Pb (0,0220 - 0,0296). As concentrações dos elementos As, Cd e Co estavam abaixo do limite de quantificação. Os teores dos macro e micronutrientes foram comparados com os valores apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e foi possível perceber que as amostras analisadas apresentam composições diferentes, o que pode ser creditado aos diferentes tipos de solo e processamento. A concentração dos contaminantes estava abaixo do valor máximo permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

**Palavras-chave:** quimiluminescência, luminol, ozônio, água, SIA, leite de coco, preparo de amostra, ICP OES, ICP-MS.

## ABSTRACT

In this work we developed spectrometric methods for the determination of ozone in water and trace elements in coconut milk. The first stage was developed within a sandwich PhD project at the Faculty of Pharmacy, University of Porto in Portugal and the second one was developed at the Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Brazil. In the first part of the work was proposed a sequential injection analysis system for determination of O<sub>3</sub> in water on a basis of its chemiluminescence with luminol in the absence of catalysts. Physico-chemical parameters were studied to obtain the best analytical performance. The analytical cycle developed allowed the determination of ozone in 20 seconds with a consumption of 200 µL of sample and 200 µL of luminol. The limits of detection and quantification were 0.04 and 0.07 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The method presented good precision (RSD < 2.9%) and sampling rate was about 140 determinations / h. The developed method was applied to the determination of residual ozone in water and the results agree to 95% of assurance with those provided by the reference procedure, the UV-Vis spectrophotometry and the content of ozone in the different samples varied from 0.21 to 1.36 mg L<sup>-1</sup>. The proposed analytical method allowed a rapid ozone quantification, representing an advantageous alternative once it requires a low consumption of reagents and produces a low volume of waste. The second part consisted of the development of strategies for the determination of inorganic constituents in samples of coconut milk commercialized in the city of Salvador, Bahia. For multielemental evaluation they were proposed two decomposition procedures: in digester block and by microwave. It was also proposed an extraction procedure assisted by ultrasonic energy (US). The techniques employed for spectrometric determination of the analytes were: inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The decomposition efficiency was evaluated considering the parameters acidity and residual carbon content. The statistical tools, PCA and HCA, showed that there is difference between three suppliers of coconut milk on a basis of the analytes determined after decomposition in microwave oven and the type of packaging. To evaluate the US procedure, factorial and Doehlert designs were applied. The accuracy of the proposed methodologies was verified by making use of certified reference materials (NIST 8435 and 1549) and addition and recovery test. The ranges of concentration, in µg g<sup>-1</sup>, for the analytes were: Ca (10-138), Cu (0.15 - 1.7), Fe (0.9 - 4.9), K (97 - 1773), Mg (23-206), Mn (0.3 - 3.2), P (116 - 701), Zn (0.4 - 2.2), Cr (0.185 - 0.211), Na (59 - 1186), Ni (0.113 - 0.133) and Pb (0.0220 - 0.0296). The concentrations of the elements As, Cd and Co were below the quantification limit. The contents of macro and micronutrients were compared with values presentend in Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (Taco) and it was possible to notice that the analyzed samples have different compositions, which can be related to the different soil types and processing. The concentration of the contaminants was below the maximum value allowed by Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

**Keywords:** chemiluminescence, luminol, ozone, water, SIA, coconut milk, sample preparation, ICP OES, ICP-MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de reações quimiluminescentes. (Adaptado de GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G, 2001).....	22
Figura 2. Proposta mecanística para a reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição ( $M^{n+}$ ), utilizando $H_2O_2$ como agente oxidante. ....	24
Figura 3. Híbridos de ressonância do ozônio. ....	26
Figura 4. T: Tampão (transportador), BP: Bomba peristáltica, VS: Válvula solenóide, HC: Bobina de armazenamento, A: Amostra, L: Luminol, R: Reator, D: Detector (quimiluminômetro), W: Descarte, S: Padrões. ....	34
Figura 5. Componentes do sistema SIA: 1 - Bomba peristáltica; 2 - Válvula SIA; 3 - Sistema de detecção quimiluminescente; 4 - Reator; 5 - Bombina de armazenamento; 6 - Soluções padrão imersas em banho de gelo (garantir uma maior estabilidade da amostra durante a execução do ciclo analítico); 7- Registrador; 8 - Descarte; 9 - Solução transportadora.....	34
Figura 6. Reator na configuração não linear em forma de oito .....	35
Figura 7. Avaliação do volume aspirado de reagentes. ....	38
Figura 8. Avaliação do sinal para volumes de reagentes no sistema SIA. ....	39
Figura 9. Efeito da concentração do luminol no sinal analítico. ....	39
Figura 10. Ordem de aspiração dos reagentes para o SIA. L-A: Luminol-Amostra; A-L: Amostra-Luminol. ....	40
Figura 11. Efeito do comprimento do reator sobre o sinal analítico. ....	41
Figura 12. Efeito do caudal sobre o sinal analítico. ....	42
Figura 13. Avaliação do pH do transportador.....	43
Figura 14. Curva analítica de calibração para o ozônio ( $mg L^{-1}$ ). Em a: sinal analítico, em cm, obtido no registrador; b: sinal analítico convertido em mV. ....	44
Figura 15. Aspecto visual dos digeridos obtidos para os procedimentos BL1, BL2 e BL3 no bloco digestor. ....	71
Figura 16. Valores médios ( $n = 3$ ) de RCC obtidos nos procedimentos de digestão de leite de coco em bloco digestor.....	74
Figura 17. Concentração média ( $\mu g g^{-1}$ ) dos analitos para os três lotes avaliados em função dos dias de análise ( $n=3$ ).....	83
Figura 18. Estrutura química dos ácidos graxos presentes no leite de coco. ....	89



<b>Figura 19. Concentração média, em <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>, para amostras “SC” de leite de coco decompostas em forno de micro-ondas com cavidade.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 20. Concentração média, em <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>, para Cr, Ni e Pb após detecção por ICP-MS (n=3).....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 21. Gráfico de Scores PC1 x PC2 para as amostras de leite de coco analisadas. ....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 22. Dendrograma obtido para amostras de leite de coco submetidas a HCA.</b>	<b>107</b>
<b>Figura 23. Aspecto do extrato após centrifugação (a); sobrenadante sólido (a) .....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 24. Diagrama de Pareto (a) para o Mn; (b) para o Na; (c) para a RG e curvas de nível da RG (d) obtidos no planejamento Doehlert aplicado extração assistida por US em amostras de leite de coco. ....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 25. Superfície de resposta para Mn, Na e RG no planejamento Doehlert. ....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimento em fluxo para a determinação de O <sub>3</sub> em água.....	36
Tabela 2. Volumes aspirados de reagentes. ....	38
Tabela 3. Resultados da análise de amostras de água pelo SIA-CL e metodologia espectrofotométrica. ....	46
Tabela 4. Principais biofunções e sua deficiência de alguns elementos no homem....	52
Tabela 5. Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES.....	67
Tabela 6. Parâmetros operacionais para as determinações por ICP-MS. ....	68
Tabela 7. Programa de aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade .....	69
Tabela 8. Procedimentos de decomposição de leite de coco avaliados no bloco digestor. ....	71
Tabela 9. Coeficientes angulares em função do tempo de integração na determinação por ICP OES. ....	73
Tabela 10. Comparação dos dados de regressão usando soluções padrão em ácido sulfúrico e no digerido da matriz empregando-se ICP OES axial. ....	77
Tabela 11. Limite de detecção e quantificação para a determinação dos analitos após digestão em bloco digestor. ....	78
Tabela 12. Determinação da composição dos materiais de referência certificados NIST SRM 8435 e NIST SRM 1549 por ICP OES após digestão em bloco digestor (média ± IC, n=3). ....	79
Tabela 13. Teste de adição e recuperação em quatro níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES (n=3). ....	80
Tabela 14. Resultados da ANOVA fator único para os diferentes lotes de leite de coco. ....	82
Tabela 15. Concentração, em µg g <sup>-1</sup> , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (média ± desvio padrão, n=3).....	86
Tabela 16. Concentração em µg g <sup>-1</sup> para amostras de leite de coco decompostas pelos procedimentos BL1 e BL2 (média ± desvio padrão, n=3). ....	88
Tabela 17. Acidez e teor de carbono residual após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (n=3). ....	91
Tabela 18. Valores médios (n = 3) de RCC (% m m <sup>-1</sup> ) obtidos nos procedimentos de digestão de leite de coco em bloco digestor e forno de micro-ondas com cavidade...	93

Tabela 19. Coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração para o estudo do efeito de matriz usando soluções padrão em ácido nítrico e nos digeridos SC e MN empregando-se ICP OES.....	94
Tabela 20. Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP-MS.....	95
Tabela 21. Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP OES.....	95
Tabela 22. Coeficiente de variação para os analitos após detecção por ICP OES.....	96
Tabela 23. Teste de adição e recuperação em três níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES (n=3). .....	98
Tabela 24. Comparação da concentração média, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (BL) e em forno de micro-ondas com cavidade (MW) (n=3). .....	99
Tabela 25. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de macro e microelementos presentes no leite de coco com detecção por ICP OES e ICP-MS após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	101
Tabela 26. IDR de nutrientes para adultos. ....	103
Tabela 27. Pesos das variáveis para as duas primeiras componentes principais.....	105
Tabela 28. Concentração média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para os dois procedimentos em forno de micro-ondas com cavidade. (n = 3) .....	108
Tabela 29. Teores de acidez e de carbono residual para os dois procedimentos (n=3). .....	108
Tabela 30. Valores das variáveis estudadas no planejamento fatorial. ....	111
Tabela 31. Matriz do planejamento fatorial $2^4$ aplicado à extração assistida por ultrassom de leite de coco, percentuais de extração dos analitos e resposta global.113	
Tabela 32. Matriz do planejamento Doehlert e percentuais de extração assistida por US para os analitos em amostras de leite de coco. ....	116
Tabela 33. Valores críticos obtidos através da superfície de resposta do planejamento Doehlert em função da RG. ....	116
Tabela 34. Comparação dos dados de regressão usando soluções de referência preparadas em ácido nítrico e na matriz após procedimento de extração.....	118
Tabela 35. Razão para os coeficientes angulares. ....	118
Tabela 36. Estimativa de limite de detecção e quantificação com detecção por ICP OES após extração assistida por US.....	119
Tabela 37. Determinação da composição do material de referência certificado NIST SRM 1549 por ICP OES após extração com ultrassom.....	120
Tabela 38. Comparação da concentração média, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (BL) e por extração com ultrassom (US).....	121

**Tabela 39. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos analitos presentes nas amostras de leite de coco após extração assistida por US (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). ..... 123**

**Tabela 40. Comparação das características e condições experimentais dos procedimentos propostos para determinação de macro, micro e elementos traço em leite de coco. As siglas se referem aos procedimentos em bloco digestor (BL); micro-ondas (MW); ultrassom (US). ..... 125**

## SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	American Association of Official Analytical Chemists
ATN	Ácido antranílico
CA	Ácido cromotrópico fotoativado
CCD	do inglês: Charge-coupled device. Dispositivo de carga acoplada
CCT	do inglês: Collision Cell Technology. Tecnologia de Célula de Colisão
CL	Quimiluminescência
CV	Coeficiente de Variação
DPCSV	do inglês: Differential pulse cathodic stripping voltammetry. Voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET AAS	do inglês: Electrothermal atomic absorption spectrometry. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica
F AAS	do inglês: Flame atomic absorption spectrometry. Espectrometria de absorção atômica com chama
FIA	do inglês: Flow injection analysis. Análise por injeção em fluxo
GD-FIA	do inglês: Gas diffusion flow injection analysis Análise por injeção em fluxo com difusão gasosa
GF AAS	do inglês: Graphite furnace atomic absorption spectrometry. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
HCA	do inglês: Hierarchical cluster analysis. Análise de agrupamento hierárquico
HG-AFS	do inglês: Hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto
IC	Intervalo de confiança
ICP-MS	do inglês: Inductively coupled plasma mass spectrometry. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ICP OES	do inglês: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ITS	Índigo tri-sulfonato
IDR	Ingestão Diária Recomendada
LOD	do inglês: Limit of detection. Limite de detecção
LOQ	do inglês: Limit of quantification. Limite de quantificação
MSR	Metodologia de superfícies de resposta

MWCNT	do inglês: Multi-wall carbon nanotubes. Nanotubos de carbono multicamadas
PCA	do inglês: Principal components analysis. Análise de componentes principais
PTFE	Politetrafluoretileno
RCC	Teor de carbono residual
RG	Resposta global
SIA	do inglês: Sequential injection analysis. Análise por injeção sequencial
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
US	Ultrassom
WHO	do inglês: World Health Organization. Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

Capítulo I .....	19
Desenvolvimento de sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para determinação por quimiluminescência de ozônio residual em águas.....	19
1.1 - INTRODUÇÃO .....	21
1.1.1 - Quimiluminescência (CL).....	21
1.1.2 – Análises em fluxo.....	24
1.1.3 - Ozônio .....	26
1.2 – MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OZÔNIO .....	27
1.3 - OBJETIVOS .....	32
1.4 - PARTE EXPERIMENTAL.....	33
1.4.1 - Reagentes e soluções .....	33
1.4.2 - Instrumentação .....	33
1.4.3 - Método de referência .....	35
1.4.4 -Procedimento de Fluxo .....	35
1.5 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	36
1.5.1- Ozonização das amostras e otimização dos parâmetros físico-químicos.....	36
1.5.1.1- Ozonização de amostras de água.....	36
1.5.1.2 - Avaliação do volume de luminol e da amostra .....	37
1.5.1.2 – Efeito da concentração do luminol .....	39
1.5.1.3 – Efeito da ordem de aspiração dos reagentes .....	40
1.5.1.4 – Efeito do comprimento do reator .....	41
1.5.1.5 – Efeito do caudal .....	41
1.5.1.6 - Avaliação do tipo e pH do transportador .....	42
1.5.1.7 – Avaliação de interferentes.....	43
1.5.2 - Figuras de mérito.....	43
1.5.3 - Aplicação analítica.....	45
1.6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
Capítulo II .....	48

<b>Estratégias para avaliação de constituintes inorgânicos em amostras de leite de coco</b>	<b>48</b>
.....	
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>49</b>
<b>2.1- INTRODUÇÃO</b>	<b>50</b>
2.1.1- Química dos alimentos	50
2.1.2 - Leite de coco	53
2.1.3 – Procedimentos para preparo de amostras	54
2.1.4 - Ferramentas estatísticas aplicadas à Química	56
2.1.5 - Técnicas espectroanalíticas	57
<b>2.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>59</b>
<b>2.3 - OBJETIVOS</b>	<b>64</b>
2.3.1- Objetivo Geral	64
2.3.2 - Objetivos Específicos	64
<b>2.4 - PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>65</b>
2.4.1 - Reagentes e soluções	65
2.4.2 - Amostras e materiais de referência certificados	65
2.4.3 - Instrumentação e materiais	66
2.4.3.1 - Digestão das amostras em sistemas com aquecimento condutivo em bloco digestor	66
2.4.3.2 - Digestão das amostras em sistema assistido por radiação micro-ondas	66
2.4.3.3 - Extração assistida por ultrassom	66
2.4.3.4 -Determinação dos analitos	67
2.4.3.5 - Determinação da acidez e carbono residual dos digeridos	68
2.4.4 - Procedimentos experimentais	68
2.4.4.1 - Digestão das amostras em bloco digestor	68
2.4.4.2 - Digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade	69
2.4.4.3 - Extração assistida por ultrassom	69
<b>2.5 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO COM AQUECIMENTO CONDUTIVO</b>	<b>70</b>
2.5.1 - Otimização do procedimento de preparo de amostra de leite de coco em bloco digestor	70



<b>2.5.2 – Apresentação e discussão dos resultados .....</b>	<b>72</b>
<b>2.5.2.1 - Condições experimentais de operação do ICP OES .....</b>	<b>72</b>
<b>2.5.2.2 – Efeito do tempo de integração do sinal nas determinações por ICP OES.....</b>	<b>72</b>
<b>2.5.2.3 - Avaliação da eficiência dos procedimentos de digestão.....</b>	<b>74</b>
<b>2.5.2.4 - Validação do procedimento proposto empregando aquecimento condutivo .</b>	<b>75</b>
<b>2.5.2.4.1 – Avaliação do efeito de matriz .....</b>	<b>76</b>
<b>2.5.2.4.2 – Limites de detecção e de quantificação .....</b>	<b>77</b>
<b>2.5.2.4.3 – Faixa linear de trabalho .....</b>	<b>78</b>
<b>2.5.2.4.4 – Precisão.....</b>	<b>78</b>
<b>2.5.2.4.5 – Exatidão.....</b>	<b>79</b>
<b>2.5.2.5 – Aplicação do procedimento com aquecimento condutivo em bloco digestor</b>	<b>80</b>
<b>2.5.2.5.1 – Avaliação da estabilidade da amostra de leite de coco .....</b>	<b>81</b>
<b>2.5.2.5.2 – Aplicação do procedimento em amostras de leite de coco .....</b>	<b>84</b>
<b>2.5.2.6 – Avaliação de procedimento alternativo usando aquecimento em bloco digestor e ozônio como agente oxidante auxiliar.....</b>	<b>87</b>
<b>2.5.3 - Considerações Finais.....</b>	<b>89</b>
<b>2.6 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS.....</b>	<b>90</b>
<b>2.6.1 – Estudos preliminares de digestão em forno de micro-ondas com cavidade ....</b>	<b>91</b>
<b>2.6.2 – Apresentação e discussão dos resultados .....</b>	<b>91</b>
<b>2.6.2.1 – Acidez residual e teor de carbono residual.....</b>	<b>91</b>
<b>2.6.2.2 – Validação do procedimento proposto empregando forno de micro-ondas....</b>	<b>93</b>
<b>2.6.2.2.1 – Avaliação do efeito de matriz .....</b>	<b>94</b>
<b>2.6.2.2.2 – Limites de detecção e quantificação .....</b>	<b>94</b>
<b>2.6.2.2.3 – Faixa linear de trabalho .....</b>	<b>96</b>
<b>2.6.2.2.4 – Precisão .....</b>	<b>96</b>
<b>2.6.2.2.5 – Exatidão.....</b>	<b>97</b>
<b>2.6.2.3 – Aplicação do procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade .....</b>	<b>100</b>
<b>2.6.2.4 – Aplicação de ferramentas estatísticas em amostras de leite de coco após decomposição assistida por micro-ondas.....</b>	<b>103</b>

<b>2.6.2.5 – Avaliação de procedimento alternativo usando forno de micro-ondas com cavidade e ozônio como agente oxidante auxiliar .....</b>	<b>107</b>
<b>2.6.3 – Considerações Finais .....</b>	<b>109</b>
<b>2.7 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM .....</b>	<b>110</b>
<b>2.7.1 - Otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom.....</b>	<b>111</b>
<b>2.7.2 – Apresentação e discussão dos resultados .....</b>	<b>112</b>
<b>2.7.2.1 – Resultados do planejamento fatorial para otimização do procedimento de extração usando ultrassom .....</b>	<b>112</b>
<b>2.7.2.2 – Validação do procedimento de extração assistido por US .....</b>	<b>117</b>
<b>2.7.2.3 – Aplicação do procedimento assistido por US.....</b>	<b>122</b>
<b>2.7.3 – Considerações Finais .....</b>	<b>124</b>
<b>2.8 – AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DESENVOLVIDOS .....</b>	<b>125</b>
<b>3.0 - REFERÊNCIAS .....</b>	<b>127</b>

# *Capítulo I*

*Desenvolvimento de sistema de análise por  
injeção sequencial (SIA) para determinação por  
quimiluminescência de ozônio residual em águas*

## JUSTIFICATIVA

O ozônio pode ser definido como um poderoso germicida que, devido ao seu alto poder oxidante, pode ser usado para degradar compostos orgânicos que promovem cor e odor na água, reagindo direta ou indiretamente (CHIANG *et al.*, 2006). A oxidação de compostos orgânicos com oxidantes como ozônio ou radical hidroxila geralmente geram espécies que em muitos casos são mais facilmente biodegradáveis que as espécies originais (SILVA e JARDIM, 2006). Para garantir a desinfecção adequada e qualidade da água, a concentração de ozônio residual tem de ser monitorada. Este monitoramento pode ser feito através de métodos quimiluminescentes acoplados às análises em fluxo.

Como vantagem inerente às técnicas de quimiluminescência pode-se citar a boa sensibilidade e a simplificação do sistema óptico porque nenhuma fonte de radiação externa é necessária (SU *et al.*, 2007). Uma das vantagens dos sistemas de fluxo é que todas as medições são executadas sob condições definidas e reproduzíveis tais que todas as soluções são tratadas física e quimicamente na mesma maneira.

## 1.1 - INTRODUÇÃO

### 1.1.1 - Quimiluminescência (CL)

Na natureza os fenômenos de emissão de luz relacionados a substâncias químicas são conhecidos desde a Antiguidade. As primeiras observações deste fenômeno foram realizadas em organismos vivos que emitem luz, como vagalumes, bactérias, fungos, peixes ou insetos.

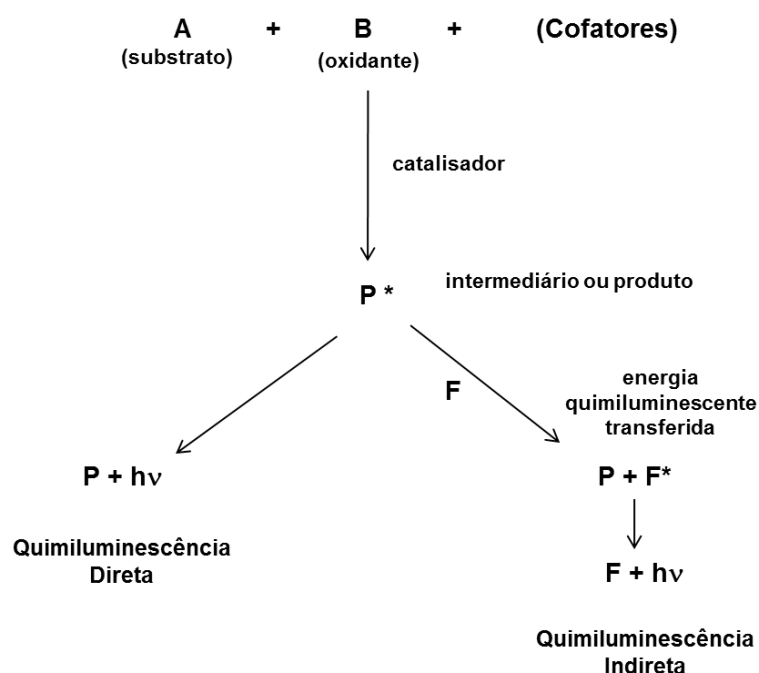
O primeiro fenômeno luminescente, baseado na emissão de luz produzida por uma reação química, foi observado por Radziszewski em 1877, ao descobrir que a lofina (2,4,5-trifenilimidazol) emitia luz verde por reação com o oxigênio, na presença de uma base forte (GARCÍA-CAMPAÑA e BAEYENS, 2000). Cinquenta anos depois, Albrecht relatou propriedades luminescentes do 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinadiona, o luminol.

Define-se a quimiluminescência como a radiação da emissão eletromagnética, usualmente no visível ou na região do infravermelho próximo, produzida por uma reação química (GARCIA-CAMPAÑA e BAEYENS, 2001; MERVAROVÁ *et al.*, 2007). Caracteriza-se por possuir ampla faixa linear de resposta, ausência de efeitos de espalhamento, uma vez que as moléculas emitem luz sem irradiação prévia, o que evita dificuldades decorrentes da luz difusa e a instabilidade da fonte (DODEIGNE *et al.*, 2000; FERREIRA e ROSSI, 2002a). Além disso, a sensibilidade e seletividade oferecidas pela espectroscopia de luminescência têm encontrado amplo uso na análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, alimentar, ambiental e industrial (GARCÍA-CAMPAÑA e BAEYENS, 2000; NERY e BAADER, 2001). A ausência de uma fonte de radiação externa para excitação diferencia a quimiluminescência de outro fenômeno muito explorado em Química, a fluorescência.

A estas características ainda devem ser adicionadas, a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos e possibilidade de se aplicar este método de detecção a um vasto número de espécies naturalmente fluorescentes ou a fluoróforos formados após reações de derivatização (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

De um modo geral, a quimiluminescência pode ser gerada por dois mecanismos distintos (GARCÍA-CAMPAÑA e BAEYENS, 2000; NERY e BAADER, 2001), a quimiluminescência direta, em que dois reagentes, normalmente um substrato e um oxidante, na presença de um cofator, reagem originando um produto, do qual uma fração será formada num estado eletronicamente excitado e que vai regressar ao estado fundamental com emissão de um fóton. Já a quimiluminescência indireta baseia-se em um processo de transferência de energia da espécie excitada para uma espécie aceptora, o

fluoróforo, que depois emite radiação. A Figura 1 esquematiza os dois mecanismos da quimiluminescência.



**Figura 1.** Esquema representativo dos mecanismos de reações quimiluminescentes. (Adaptado de GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G, 2001).

Para uma reação química emitir radiação tem que cumprir certos requisitos: i) a reação deve ser exotérmica, de maneira a produzir energia suficiente para formar uma espécie em um estado eletronicamente excitado; ii) o meio reacional tem de ser favorável de forma a canalizar a energia para a formação de um estado eletronicamente excitado; iii) a emissão de um fóton tem que ser o processo de desativação do produto excitado relativamente a outros processos competitivos não radiantes que surgem em menor proporção (GARCÍA-CAMPAÑA e BAEYENS, 2000; SU *et al.*, 2007).

As determinações quimiluminescentes são fortemente influenciadas por fatores experimentais, tais como temperatura, pH, força iônica, solvente e composição da solução, que afetam o rendimento quântico e a velocidade da reação tendo estes que ser controlados. Este tipo de reação depende essencialmente da concentração dos reagentes envolvidos podendo, por isso, ser utilizadas em análises quantitativas, já que a intensidade da emissão de radiação é proporcional à concentração de qualquer um dos reagentes envolvidos na reação (FERREIRA e ROSSI, 2002).

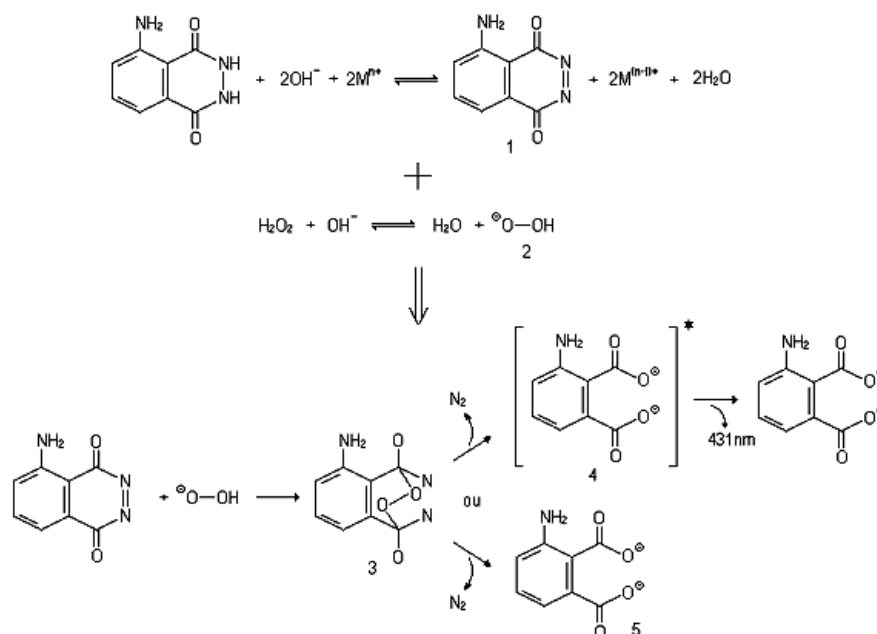
Além dos fatores mencionados anteriormente há que se considerar que um reagente de quimiluminescência não reage exclusivamente com um analito, a seletividade atribuída a esta técnica é relativamente reduzida, bem como a forte dependência temporal do sinal;

(SANTOS *et al.*, 2011). É por isso necessário garantir que a detecção seja efetuada durante um período de tempo rigorosamente definido e reproduzível.

Alguns compostos como a lucigenina, pirogalol, etanodiato de bis(2,4,6-triclofenila), luminol, isoluminol e a luciferina participam como substratos de reações quimiluminescente. No entanto, o luminol é o reagente mais comumente usado neste tipo de reação (FERREIRA e ROSSI, 2002), e produz quimiluminescência com uma grande variedade de oxidantes (McGOWAN e PACEY, 1995). A reação do luminol foi descoberta por Albrecht em 1928 e envolve a sua oxidação em meio alcalino, produzindo o 3-aminofalato no estado excitado, o qual emite radiação (NAVAS e JIMÉNEZ, 1996). A emissão da radiação ocorre na zona do visível, cerca dos 425 nm, correspondendo a uma luz azul característica.

A quimiluminescência do luminol é, hoje, uma das reações luminescentes mais empregadas na química analítica quantitativa e forense. A emissão de luz, meio alcalino, pode se intensificar grandemente sob ação catalisadora de cátions de metais de transição o que explica a sua elevada sensibilidade à microquantidades ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ ) dos constituintes da reação, ocupando assim, lugar de destaque nas análises químicas atuando em sistemas de eletroforese capilar, HPLC, cromatografia gasosa e líquida (SU *et al.*, 2007).

Os sistemas quimiluminescentes envolvendo o luminol se estendem à determinação de diversos analitos, como por exemplo, cisteína em formulação farmacêutica (LAU *et al.*, 2004); cobalto (II) em amostras de alimentos e ambientais (KHADRO *et al.*, 2009); melanina em leite (ZANG *et al.*, 2011); fenol em amostras de água (LIU *et al.*, 2012). Todavia, no que diz respeito ao mecanismo de reações envolvendo o luminol, existem etapas não totalmente elucidadas envolvendo a formação de estados eletronicamente excitados e por isso continuam sendo objeto de pesquisa. Dentre as hipóteses defendidas existem a da formação de complexos metálicos de reagentes luminescentes, de complexos entre peróxidos e metais, de radicais livres de elevado poder de oxidação; uma dessas hipóteses é apresentada na Figura 2 (ALBERTIN *et al.*, 1998)



**Figura 2.** Proposta mecanística para a reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição (M<sup>n+</sup>), utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante.

Esse mecanismo indica que a ação de um íon metálico de transição sobre a molécula de luminol, em meio alcalino, leva à formação da 3-aminodiazooquinona (estrutura 1) e que o peróxido de hidrogênio em meio alcalino apresenta-se na sua forma iônica (estrutura 2). A partir da reação dos dois produtos, 1 e 2, obtém-se o intermediário principal, luminol endoperoxido (estrutura 3), que logo se decompõe gerando o 3-amino-ftalato ou na forma eletronicamente excitada (estrutura 4) ou no estado fundamental (estrutura 5), sendo este último o produto final da reação.

A maioria das aplicações analíticas da reação quimiluminescente do luminol está relacionada ou à quantificação de metais em medicamentos, amostras de alimentos e ambientais, ou à quantificação de peróxido de hidrogênio em amostras ambientais e em reações enzimáticas (MARQUETTE e BLUM, 2006).

### 1.1.2 – Análises em fluxo

As análises químicas automatizadas implicam na substituição parcial ou completa da participação humana em uma operação ou sequência de operações.

Segundo a IUPAC (GUILBAULT e HJELN, 1998), a automatização, é o uso de dispositivos instrumentais e mecânicos para substituir, refinar, estender ou complementar o esforço humano na execução de um processo onde pelo menos uma operação principal é controlada sem intervenção humana até ocorrer uma repetição. Estas análises



automatizadas têm encontrado aplicações em diversas áreas de atuação e, ao aliar as características intrínsecas da automação com o compromisso dos méritos analíticos, implicam em resultados mais rápidos e confiáveis. Além das vantagens mencionadas acima, a implementação de metodologias automáticas ainda permite reduzir o consumo de reagentes e amostra, tendo impacto positivo sob o ponto de vista ambiental, já que é possível reduzir a produção de resíduos perigosos e diminuir a exposição dos operadores a produtos químicos tóxicos (STADEN, 1999).

Os métodos de fluxo não-segmentados foram propostos em 1975. Os analisadores são construídos e fundamentados na metodologia da “Análise em Fluxo”, termo genérico recomendado para todos os métodos analíticos automáticos que se baseiam na introdução e processamento de amostras e reagentes em fluxo em que pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, são introduzidos de forma intermitente num fluido transportador, o qual procedia ao seu encaminhamento até ao detector, sem que houvesse recurso à intercalação de bolhas de ar.

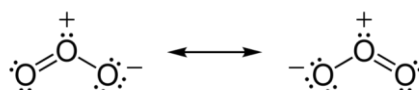
O primeiro método de fluxo não-segmentado proposto foi a Análise por Injeção em Fluxo (FIA), e tinha como principal característica o controle da dispersão de um segmento de amostra intercalada num fluxo que o transporta até ao detector. Com o acoplamento dos computadores aos sistemas de fluxo foi possível eliminar as deficiências do FIA em termos de autonomia. Surgia assim, a segunda geração da análise em fluxo, sendo designada por Análise por Injeção Sequencial (SIA) (RUZICKA e MARSHALL, 1990). Este método baseia-se no princípio de controle da dispersão e manipulação reprodutível da amostra, mas no qual o modo de funcionamento é baseado no conceito de fluxo programado.

A instrumentação de um sistema SIA consiste de uma bomba peristáltica bidirecional, uma única linha de transmissão e uma válvula seletora. Esta válvula é o componente principal do sistema, contendo de seis a dez portas, além de uma porta central, que tem acesso a cada uma das outras com a rotação da válvula. A ligação da válvula ao sistema de propulsão de líquidos é feita com uma bobina coletora conectada na porta central da válvula seletora. O controle da bomba e da válvula é feito por um computador com um software apropriado (BARNETT *et al.*, 1999)

Durante uma análise, volumes pré-determinados de reagentes e amostra são aspirados sequencialmente para o interior da bobina coletora. Revertendo-se a direção do fluxo, a zona de amostra é transportada em direção ao sistema de detecção através de uma bobina de reação, cuja função é garantir um percurso analítico mínimo para a sobreposição das zonas por efeitos de dispersão causados por difusão axial e radial (RUZICKA e MARSHALL, 1990 e ECONOMOU, 2005).

### 1.1.3 - Ozônio

O ozônio (O<sub>3</sub>), um alótropo elementar do oxigênio formado por três átomos deste elemento, unidos por ligações simples e duplas, sendo um híbrido de ressonância (Figura 3) com comprimento médio de ligação de 0,128 nm. O terceiro átomo (onde se localiza a carga negativa) muito instável pode desligar-se facilmente desta molécula para se ligar a de outras substâncias orgânicas, alterando sua composição química. É um gás incolor e de odor pungente (KUNZ *et al.*, 1999), altamente reativo que ocorre naturalmente em pequenas quantidades em duas camadas distintas da atmosfera, a estratosfera e a troposfera. Em concentrações acima de 3,0 mg L<sup>-1</sup>, o ozônio pode provocar efeitos na saúde após a inalação, tais como dores de cabeça, irritação nos olhos, nariz, garganta e na pele, problemas respiratórios, acidez na boca e anorexia.



**Figura 3.** Híbridos de ressonância do ozônio.

O ozônio é relativamente instável em solução aquosa, com tempo de meia vida de 1,65 min a uma temperatura de 20 °C. Em fase aquosa se decompõe rapidamente a espécies radicalares e oxigênio, o que é uma grande vantagem porque não gera subprodutos tóxicos. Devido a essa instabilidade, para fins comerciais, é necessário que a sua geração seja feita no ponto de aplicação. Sendo assim, pode ser produzido pela eletrólise do ácido perclórico e descarga eletroquímica, esta denominada de método de descarga de corona. O método de descarga de corona é o mais difundido e utilizado praticamente em todos os ozonizadores disponíveis comercialmente, por apresentar maior taxa de conversão de oxigênio em ozônio (KUNZ *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Uma das aplicações para o ozônio é como agente desinfetante de água e tem sido usado para esta função desde a virada do século XX para a degradação de espécies tóxicas, incluindo bactérias e vírus. O ozônio penetra na parede celular desses microorganismos, os destruindo mais rapidamente que o cloro (GURLEY, 1985).

Assim, tem havido um grande interesse no uso de ozônio como uma alternativa viável ao cloro, já que com o método mais comum utilizado para a desinfecção e purificação de água potável, a cloração, subprodutos podem ser formados, tais como compostos organoclorados, o ozônio permite uma esterilização mais eficiente, frente ao cloro (SILVA E JARDIM, 2006). Contudo, os níveis elevados de ozônio são danosos e podem ser prejudiciais à saúde humana, exigindo o monitoramento da sua concentração nas mais diversas matrizes.

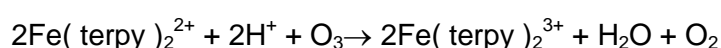
## 1.2 – MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OZÔNIO

O cheiro é um importante diagnóstico para detectar a presença de ozônio, o que implica dizer que o primeiro instrumento para a análise de ozônio é o nariz. Schönbein observou que o odor notado quando se produziam descargas elétricas na atmosfera era similar àquele notado quando a água era decomposta por uma corrente voltaica; acreditou-se que este odor poderia ser atribuído à existência de um gás atmosférico de odor peculiar. A esse gás atribuiu o nome ozônio, da palavra grega para cheiro “*ozein*” (RUBIN, 2001).

Os métodos disponíveis para a medição atmosférica de ozônio baseiam-se nas suas propriedades físicas ou na sua reatividade química considerável, dentre eles pode-se citar a iodometria, amperometria, titulação de retorno com arsênio (III), dietil-p-fenilenediamina, porém Mc Gowan e Pacey (1995) relataram que estes métodos não são confiáveis, pois são altamente susceptíveis a interferência de outros agentes oxidantes.

A iodometria é o método adotado pela Agência de Proteção Ambiental – EPA, para a determinação de ozônio. Na iodometria os íons iodeto são oxidados a iodo pelo ozônio. Após a formação do iodo, o pH tem que ser ajustado para 2. Então o iodo liberado é titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio. Alguns fatores podem interferir na reação, estes são: pH, concentração de íons iodeto e tempo de reação. Como o iodeto reage rapidamente, a decomposição do ozônio torna-se um fator que influencia na determinação. Por este motivo, antes da titulação do iodo / tiosulfato, é necessário acidificar para que qualquer íon iodato volte a iodo (GORDON, 1995).

O bis(terpiridina)ferro(II) é oxidado a bis(terpiridina)ferro(III) pelo ozônio em meio ácido. A reação pode ser representada pela equação:



Com base nesta informação Straka *et al.*, (1985) estudaram um sistema em fluxo com difusão gasosa para a determinação de ozônio residual. O ozônio é gerado por um ozonizador através do método de corona, gás este borbulhado em água a pH 2, ajustado com ácido sulfúrico concentrado. A técnica de difusão de gás pode ser realizada em um determinado período sem que o fluxo seja interrompido permitindo assim, que mais amostras gasosas sejam permeadas através da membrana. A função desta membrana no sistema é reduzir interferências como o cloro e formas oxidadas de manganês. O peróxido de hidrogênio não foi considerado interferente por não apresentar nenhuma resposta na difusão do gás a 300 mg L<sup>-1</sup>. O íon Mn (VII) não apresentou resposta a 500 mg L<sup>-1</sup>. Sendo assim, a técnica de membrana fornece um método para a eliminação de Mn (VII) como uma interferência no método proposto. Foi possível alcançar limites de detecção de 0,03 mg L<sup>-1</sup>

de ozônio. O método proposto apresentou uma frequência analítica de 65 amostras h<sup>-1</sup>. A espectrofotometria foi usada como método de referência.

O método colorimétrico do índigo tri-sulfonato (ITS) foi desenvolvido por Bader e Hoigne em 1981 (CESARINO *et al.*, 2011). É um método quantitativo e simples e substitui o método iodométrico. O método ITS baseia-se no branqueamento do corante pelo ozônio e a concentração é a diferença na absorbância entre a amostra e o branco. O ozônio reage quantitativamente com o ITS formando o ácido antranílico como um produto secundário da reação.

Um procedimento para determinação de ozônio atmosférico, através do método colorimétrico com o índigo tri-sulfonato foi desenvolvido por Li *et al.*, (2008). O ar foi amostrado em torno de um tubo de polipropileno poroso preenchido com uma solução de índigo tri-sulfonato. A evaporação da solução, que sofre influencia pelo menos da temperatura do ar, pode causar grandes erros. O problema foi resolvido adicionando um composto formado por ozônio e corante inerte que absorve em diferentes comprimentos de onda. O tubo foi preenchido com uma solução adequada enquanto a luz monocromática de um diodo emissor de luz foi lançada no líquido através de uma fibra óptica e detectada na outra extremidade por uma fibra óptica acoplada ao fotodiodo. Como o gás, por exemplo, ar ambiente é amostrado ao redor do tubo, os analitos permeados através da parede do tubo causam uma mudança de cor (formação ou branqueamento) e é monitorada durante o caminho (comprimento do tubo). A solução resultante do clareamento rápido do índigo tri-sulfonato pelo ozônio foi medida num comprimento de onda de 460 nm. O sistema desenvolvido mostrou-se totalmente passivo de automação.

Cesarino *et al.* (2011), propôs a utilização do reagente ITS, com medição do produto formado na reação realizado pelo método eletroquímico. O método apresentado é baseado na reação do ozônio com corante azul índigo produzindo o ácido antranílico (ATN). O perfil eletroquímico do ATN em um eletrodo de carbono vítreo (GC) modificado com nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) mostrou um potencial de pico de oxidação em 750 mV vs Ag/AgCl. Um método analítico foi desenvolvido utilizando voltametria de pulso diferencial (DPV) para determinar ATN em um intervalo de 50-400 nmol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção de 9,7 nmol L<sup>-1</sup>. Amostras de água ozonizada foram analisadas por GC/MWCNT e o procedimento de recuperação rendeu valores entre de 96,5 e 102,3%. A escolha de um método eletroquímico foi feita em função das suas vantagens de baixo custo, alta sensibilidade, de fácil operação, potencial para miniaturização e automação, construção simples de dispositivos portáteis para fins de triagem rápida e monitoramento *in situ*.

Mais estudos de determinação de ozônio através de análises eletroquímicas foram desenvolvidos (KNAKE e HAUSER, 2002) através de um sensor amperométrico capaz de detectar ozônio na faixa de µg L<sup>-1</sup>. Eletrodos de Pt e Au previamente preparados foram usados. O eletrodo foi montado na célula eletroquímica com o lado metalizado para frente

ao fluxo de gás, a célula foi preenchida com solução ácida ( $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ) ou básica ( $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ ). O ozônio foi gerado através de um gerador comercial e a quantidade foi medida iodometricamente, onde o mesmo era borbulhado numa solução contendo iodeto de potássio e sua concentração final foi medida por titulação com tiosulfato de sódio. A redução dos níveis de ozônio foi possível para todas as combinações de eletrodos metálicos com soluções ácidas e básicas. Os principais interferentes na determinação de ozônio são os poluentes atmosféricos NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e CO. Os autores comprovaram que o NO e CO não interferem potencialmente na determinação do ozônio, já a interferência do SO<sub>2</sub> pode ser atenuada por aplicação de um potencial mais negativo quer na solução ácida ou básica. Para o NO<sub>2</sub> isto não se aplica, sendo necessário o uso de um filtro químico para amenizar esta interferência.

A cromatografia líquida foi estabelecida como um método para a determinação simultânea de cloro e bromo livres e ozônio gerado por descargas elétricas baseado na formação de derivados orgânicos, 4-halo-2,6-dimetilfenol com 2,6-dimetilfenol (2,6-DMP) (SHIN, 2010). A reação de substituição direta entre halogênios e 2,6-DMP foi utilizada para a determinação destes analitos. Para a determinação de ozônio, foi adicionado iodeto 5 min após a adição de 2,6-DMP. Os limites de detecção foram 2,0, 3,0 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para hipobromito, hipoclorito e ozônio, respectivamente. O método foi muito simples e reprodutível o suficiente para permitir a análise simultânea de cada desinfectante na água de superfície ou água do mar, na presença do mistura de desinfectantes.

Um sistema de análises por injeção em fluxo com detecção quimiluminescente com difusão gasosa (GD-FIA) para determinação de ozônio residual foi desenvolvido por Mc Gowan e Pacey (1995). A difusão gasosa foi incorporada ao analisador em fluxo com o objetivo de aumentar a seletividade e permitir que somente espécies gasosas passem, assim, alguns produtos da reação de decomposição de ozônio não interferirão na medida. O ozônio foi gerado por um ozonizador e borbulhado em uma solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 2,12, condições essas escolhidas para minimizar a instabilidade do ozônio. O ozônio foi determinado espectrofotometricamente em 260 nm. Os reagentes testados foram o dissulfonato índigo, trissulfonato índigo e luminol. O método do luminol apresentou menores limites de detecção ( $5,20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), menos interferências, tempo de resposta muito rápido e volumes muito pequenos de amostras necessárias para a análise. Para contornar problemas com a seletividade, os autores utilizaram uma membrana de difusão de gás. Embora essa abordagem seja aplicável, em princípio, a eficiência na transferência de membrana, depende da temperatura e mudanças ao longo do tempo e calibração com soluções padrão de ozônio que não é uma tarefa trivial.

Baeza *et al.*, (2005) também propuseram um sistema GD-FIA para determinação de ozônio em águas. O ozônio se difunde através de uma membrana microporosa; o processo

de difusão de gás depende de dois fatores principais: características físicas da membrana, tais como porosidade e geometria, e das condições experimentais tais como vazão, tempo de troca, temperatura, pressão e principalmente volatilidade do gás. O ozônio neste trabalho foi gerado por um ozonizador baseado no método de descarga de corona e soluções padrões foram obtidas pela diluição de uma solução saturada de ozônio, preparado por borbulhamento de ozônio através da água Milli-Q previamente acidificada com ácido sulfúrico a pH 2, afim de minimizar a decomposição do ozônio. Devido à rápida decomposição do ozônio e à sua volatilidade, a concentração real nas soluções analíticas de calibração foi determinada antes de ser usada. Portanto, as medidas de absorvância no UV em 260 nm foram usadas como um método de referência. O ozônio foi determinado indiretamente pela exploração das suas propriedades oxidantes. Este foi difundido através da membrana para um acceptor contendo íons nitrito, oxidando-os a nitrato correlacionando com a absorvância do corante azóico formado com a concentração de ozônio no fluxo de doadores. A fim de avaliar o sistema proposto, duas amostras de águas dopadas com ozônio foram analisadas: água potável e água Milli-Q, ambas acidificadas a pH 2 com ácido sulfúrico. As concentrações determinadas espectrofotometricamente foram 1,67 e 1,75 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, enquanto que para o sistema proposto foi de 1,50 ± 0,16 e 1,65 ± 0,16 mg L<sup>-1</sup> não apresentando diferença significativa a 95% de confiança. O limite de detecção para ozônio foi de 0,044 mg L<sup>-1</sup> e com frequência analítica de 60 determinações por hora. O sistema proposto pode ser utilizado em uma ampla faixa de concentrações com o risco mínimo de interferência de modo que não é necessária a diluição da amostra, tornando-se particularmente útil para sistemas de monitorização contínua por controle simples do tempo de residência da amostra na célula de difusão gerando assim, resposta rápida, alta frequência de análise, e acima de tudo, aumento da seletividade.

Um método quimiluminescente rápido e sensível, para a determinação de ozônio, foi desenvolvido por Takayanagi e Dasgupta (2005) através da reação deste com ácido cromotrópico fotoativado (CA) (ácido 4,5-dihidroxi-naftaleno-2,7 dissulfônico). A água ozonizada entra em contato com o CA em fluxo numa célula em formato de espiral e, de acordo com as características desta célula (0,05 mm diâmetro interno e 100 cm de comprimento) produz um tempo de residência de aproximadamente 50 segundos então a mistura é transportada para a célula CL. A concentração máxima dissolvida ozônio gerado neste estudo foi de 1,4 mg L<sup>-1</sup>. A fotoativação, feita por uma lâmpada ultravioleta, da solução de CA produziu um sinal quimiluminescente cem vezes maior quando comparada a mesma solução sem fotoativação, aumentando assim a sensibilidade. A principal preocupação de interferência é, portanto, a partir de oxidantes secundários, nomeadamente MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Uma solução de permanganato de potássio, nas concentrações 0,1 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>, foram introduzidas na célula de detecção em vez da solução aquosa ozônio e não observado sinal quimiluminescente. Logo, a reação do CL com ácido cromotrópico

fotoativado não tem interferência de  $\text{MnO}_4^-$ , fornecendo uma abordagem atraente para determinação de ozônio. Um limite de detecção de  $3 \mu\text{g}^{-1}$  foi atingido. O ozônio foi determinado espectrofotometricamente em 260 nm para validação do método proposto e esta era feita em paralelo com o método quimiluminescente.

Metodologias quimiluminescentes baseadas em técnicas de fluxo foram efetivamente desenvolvidas nos últimos anos (MICHAŁOWSKI *et al.*, 2001, COSTIN *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2003, COSTIN *et al.*, 2004, MOTYKA *et al.*, 2007; LATTANZIO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; MING *et al.*, 2011; ).

Análise por injeção sequencial (SIA) tem sido utilizado para a implementação de procedimentos quimiluminescentes baseados na oxidação de luminol para a detecção de substratos de enzimas oxidase que geram peróxido de hidrogênio (PANOUTSOU e ECONOMOU, 2005). Para aumentar a produção de radicais luminol, cátions de metais de transição funcionando como catalisadores foram aplicados, por exemplo,  $\text{Co}^{2+}$  (ECONOMOU *et al.*, 2006; MEI *et al.*, 2007) ou em suas formas complexada (por exemplo, ferroceno, ferricianeto) (TUCKER *et al.*, 1994; MIN *et al.*, 1996). Analitos foram também avaliados através da reação luminol/peróxido de hidrogênio catalisada por Mg (GAO e FAN, 2008) ou efeito de extinção da reação entre o luminol e iodo (MIN *et al.*, 1996) ânion superóxido ou óxido nítrico (MIYAMOTO *et al.*, 2007). A biocatálise de oxidação de luminol com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e p-iodofenol também foi descrita em imunoensaios em que peroxidase foi utilizado como analito-label (ZHANG *et al.* 2005).

Alguns métodos são reportados na literatura para determinação de ozônio. No entanto, as publicações sobre a determinação de ozônio em fase líquida são bastante limitadas quando comparadas à determinação em fase gasosa. A espectrofotometria é mais comumente empregada para a validação de métodos propostos devido à disponibilidade dos instrumentos, a simplicidade dos procedimentos, velocidade, precisão e exatidão da técnica que ainda fazem desses métodos atraentes.

### **1.3 - OBJETIVOS**

A proposta deste trabalho foi desenvolver um método de análise por injeção sequencial com detecção por quimiluminescência para determinação de ozônio residual em águas, que fosse rápido, econômico e se adequasse aos princípios da Química Verde. O método desenvolvido baseou-se na quimiluminescência do ozônio com luminol



## 1.4 - PARTE EXPERIMENTAL

### 1.4.1 - Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade < 0,1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) usando reagentes de grau analítico.

Uma solução estoque de ozônio foi obtida de acordo com o DIN EN ISO 7393 (Merck) pela mistura, em um balão volumétrico de 100 mL, de 20,0 mL de uma solução de KI/KIO<sub>3</sub> (1:67 m v<sup>-1</sup>) com 2,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida a solução foi mantida em repouso por um minuto. Então uma solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> foi adicionada gota a gota (aproximadamente 1 mL) até que a solução perdesse a coloração amarela (Anexo I). A concentração esperada desta solução era de 2,00 mg L<sup>-1</sup> e foi avaliada por espectrofotometria ( $\lambda = 259 \text{ nm}$ ). Esta solução estoque era preparada imediatamente antes da análise. As soluções padrões de ozônio (0,05; 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas por apropriada diluição da solução estoque em água.

A solução de luminol  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em tampão fosfato  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 12,4. Esta foi estocada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração.

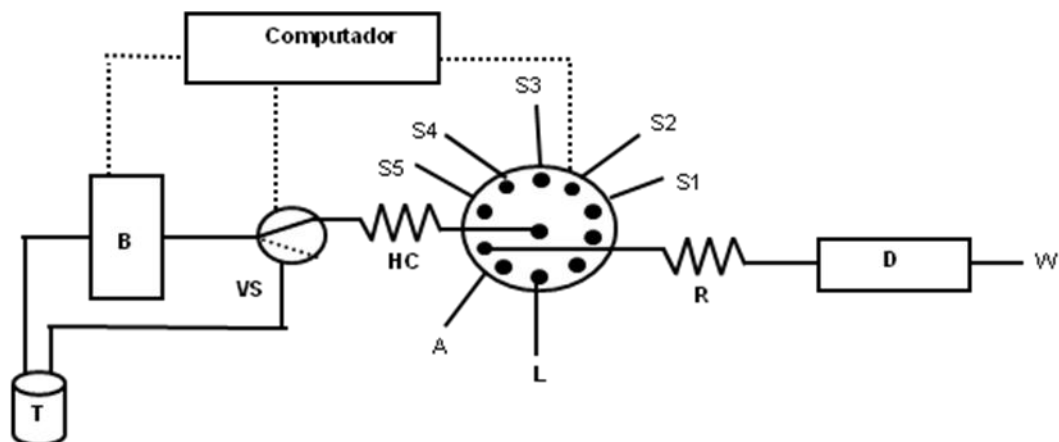
### 1.4.2 - Instrumentação

O sistema SIA empregado para o estudo do método analítico está esquematizado na Figura 4 e a Figura 5 mostra o sistema real, que consistia de bomba peristáltica Gilson Minipuls 3, equipada com um tubo de PVC de bombeamento (1,2 mm de diâmetro interno) e uma válvula de seleção (Vici) com 8 portas de multi-posições. Nas ligações entre os diferentes dispositivos das montagens, utilizou-se tubo de PTFE, da marca Omnifit, com diâmetro interno de 0,8 mm. As medidas de quimiluminescência foram realizadas em um sistema de detecção (40  $\mu\text{L}$  de célula de fluxo) similar aos já descritos (MIRÒ *et al.*, 2005 e OMS *et al.*, 1996). Sinais analíticos foram registrados em um registrador de agulhas BD Kipp & Zonen 111 (Delft, The Holanda).

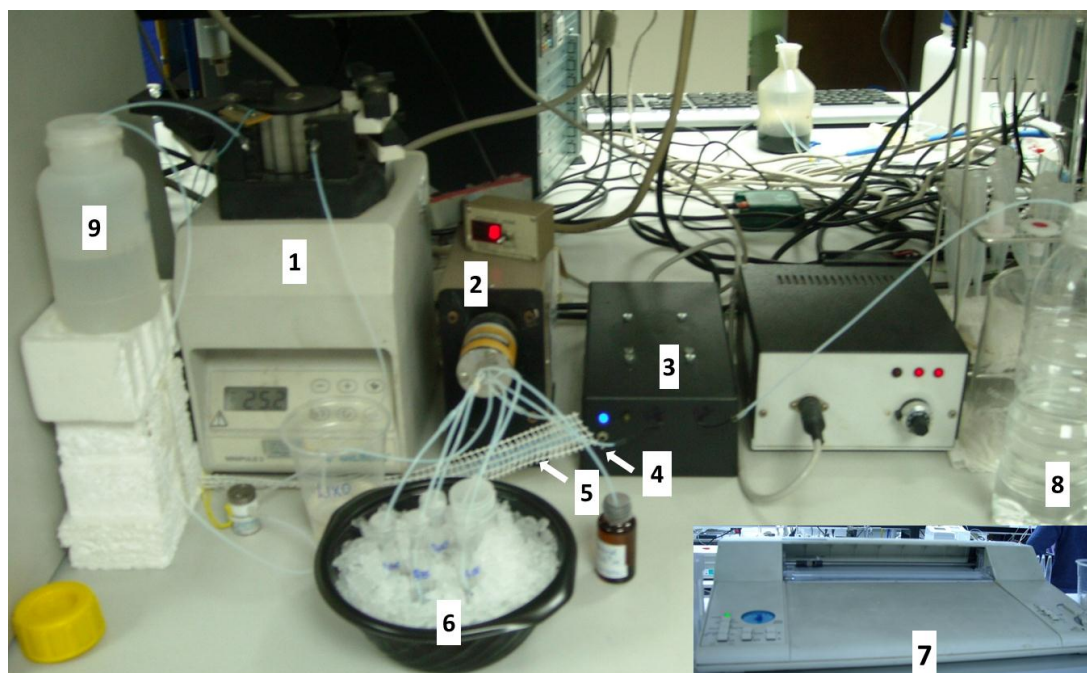
O controle do sistema analítico, incluindo o funcionamento da bomba peristáltica e válvula de seleção, foi realizado por meio de um microcomputador Pentium I e uma placa de interface (Advantech Corp, PCL 711B, San Jose, CA). O software foi desenvolvido em Quick-Basic 4.5 (Microsoft) que permitiu o controle da vazão, direção de fluxo, posição da válvula, volume de amostra e reagente bem como a aquisição de dados e processamento.

Um espectrofotômetro Perkin Elmer, Lambda 45 UV/Vis foi utilizado para realizar as determinações pelo método de comparação. Neste caso, uma célula de quartzo com 1 cm

de comprimento do percurso óptico foi usada. Ozônio foi gerado por um ozonizador modelo Hailea HLO-100.



**Figura 4.** T: Tampão (transportador), BP: Bomba peristáltica, VS: Válvula solenóide, HC: Bobina de armazenamento, A: Amostra, L: Luminol, R: Reator, D: Detector (quimiluminômetro), W: Descarte, S: Padrões.



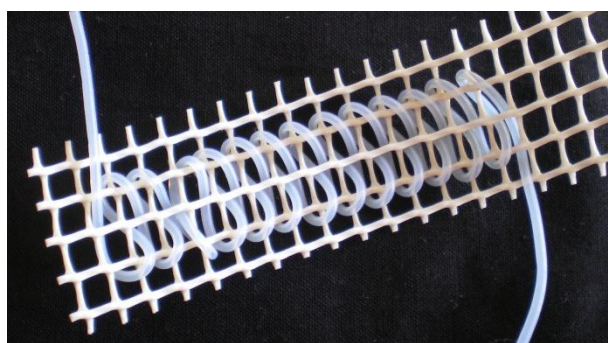
**Figura 5.** Componentes do sistema SIA: 1 - Bomba peristáltica; 2 - Válvula SIA; 3 - Sistema de detecção quimiluminescente; 4 - Reator; 5 - Bombina de armazenamento; 6 - Soluções padrão imersas em banho de gelo (garantir uma maior estabilidade da amostra durante a execução do ciclo analítico); 7- Registrador; 8 - Descarte; 9 - Solução transportadora.

### 1.4.3 - Método de referência

Para avaliar a exatidão dos resultados obtidos com o procedimento desenvolvido, o ozônio foi determinado por espectrofotometria no UV em 259 nm. Após a ozonização das amostras parte dela era analisada no sistema SIA proposto e a outra no espectrofotômetro tendo o cuidado de serem analisadas simultaneamente. Para o cálculo das concentrações de ozônio uma absorvidade molar de  $3300 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usada (HART *et al.*, 1983).

### 1.4.4 -Procedimento de Fluxo

Componentes do sistema foram dispostos como mostrado esquematicamente na Figura 4. A bobina de armazenamento (HC) tinha 1,5 m de comprimento. Tubos de PTFE também foram utilizados numa configuração não linear em forma de oito (Figura 6), para evitar uma menor dispersão e assim obter uma maior sensibilidade. Esta configuração era obtida por entrelaçamento do tubo em forma de sucessivos oitos ao longo de uma malha plástica com 2 cm de largura. A primeira etapa do ciclo compreendia a aspiração do transportador (tampão fosfato pH= 12,4) para enchimento do sistema. O ciclo prosseguiu com a aspiração sequencial do luminol seguido da amostra ou padrão para a bobina de armazenamento. Então, por inversão de fluxo, a zona de reação foi impulsionada para o detector quimiluminométrico e um sinal analítico proporcional à concentração de ozônio foi registrado. O sistema foi então limpo com a passagem da solução transportadora. O procedimento para determinação de ozônio em amostras de águas está sumarizado na Tabela 1.



**Figura 6.** Reator na configuração não linear em forma de oito

**Tabela 1.** Procedimento em fluxo para a determinação de O<sub>3</sub> em água.

<b>Etapa</b>	<b>Solução</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Caudal (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Sentido</b>
1*	Tampão fosfato	-	-	-	-
2	Luminol	3	30	200	Aspiração
3	Amostra	3	30	200	Aspiração
4	Detector**	15	40	-	Propulsão

\* Etapa de enchimento do sistema com a solução transportadora; \*\* Solução de mistura propulsada ao detector.

O ciclo de análise começou com a aspiração sequencial de 200 µL de luminol e 200 µL da amostra para a bobina de armazenamento.

## **1.5 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

Como referido anteriormente, a metodologia desenvolvida para a determinação de ozônio em água baseado na quimiluminescência deste com luminol sem a presença de catalisadores foi apresentada.

A fim de obter a intensidade máxima e constante, as condições da metodologia SIA foram otimizadas. Parâmetros físico-químicos como volumes de amostra e reagente, ordem de aspiração, pH, concentração do luminol, tamanho do reator e tipo de tampão foram estudados pelo método univariado, a fim de alcançar a melhor sensibilidade, reprodutibilidade, frequência de amostragem e economia de reagentes. A avaliação da variação dos parâmetros foi feita através da construção de curvas analíticas.

Nesta seção também serão descritas e discutidas a aplicação da metodologia desenvolvida para a análise de amostras de água, bem como a validação dos resultados obtidos.

### **1.5.1- Ozonização das amostras e otimização dos parâmetros físico-químicos**

#### **1.5.1.1- Ozonização de amostras de água**

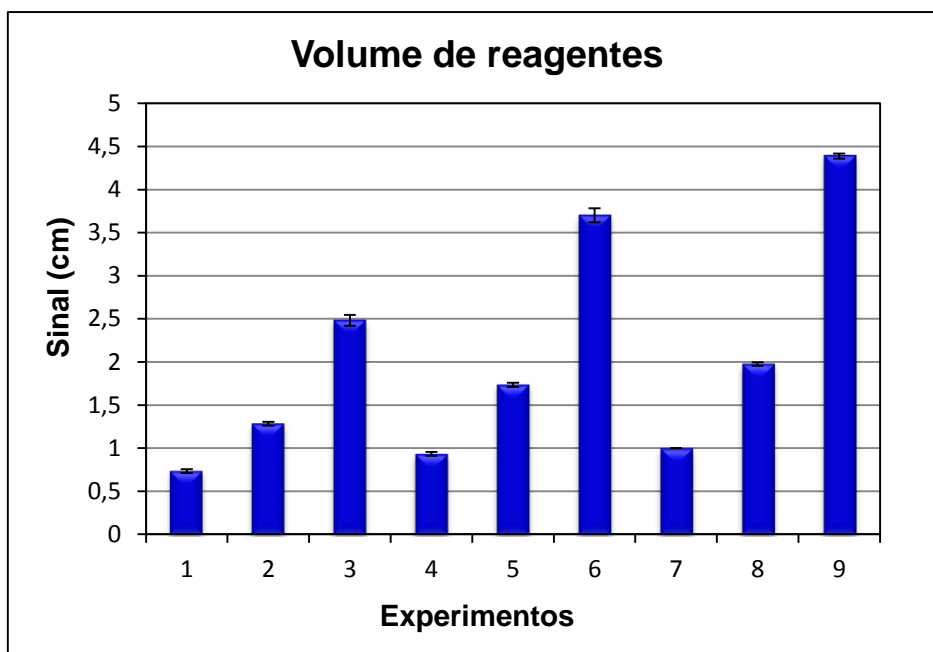
Alguns fatores afetam a decomposição do ozônio na água e assim alguns estudos envolvendo o uso de um ozonizador foram realizados, a fim de definir as melhores condições de ozonização. Considerando que o ozônio apresenta a máxima estabilidade em água em pH 2 (Mc GOWAN E PACEY, 1995), um estudo inicial comparativo foi realizado envolvendo a ozonização de amostras de água não acidificadas e acidificadas. O conteúdo

de ozônio em ambas as amostras foi monitorado espectrofotometricamente, e observou-se que a acidificação da amostra resultou em um aumento da concentração de ozônio de cerca de 85%, confirmando a influência do pH sobre a estabilidade do ozônio. Uma amostra de água acidificada foi então ozonizada em períodos distintos de tempo de até duas horas, e notou-se que a concentração de ozônio aumentou muito ligeiramente com o aumento do tempo de ozonização até uma hora. Períodos mais longos de ozonização não resultaram em uma mudança significativa na concentração de ozônio devido à sua rápida decomposição. De fato, sabe-se que o ozônio é pouco solúvel em água e se decompõe muito rapidamente em ambientes aquosos de modo que, no ponto de vista analítico, apenas o ozônio residual pode ser considerado. Nas condições descritas a concentração máxima de ozônio foi de cerca de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  uma confirmação que em meio aquoso esta espécie é instável e que as concentrações mais elevadas só pode ser alcançado em condições específicas ou seja, com ozonização sob pressão. Assim, as amostras para análise foram obtidos por ozonização instrumental (30 minutos) de amostras de água Milli-Q acidificada a pH 2, com ácido fosfórico. A fim de obter amostras com concentração de ozônio superior a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  um lote de amostras foi enriquecido com solução estoque de ozônio. As amostras obtidas por ambos os procedimentos foram analisadas no sistema SIA e por espectrofotometria.

#### **1.5.1.2 - Avaliação do volume de luminol e da amostra**

Volumes de amostra e do tamanho das zonas de reagentes diferentes têm claramente um impacto direto sobre o desempenho de um procedimento baseado em fluxo. Uma descrição clara das zonas relevantes é necessária. O tamanho das zonas de reagente é muitas vezes dependente da composição e concentração do reagente (ZAGATTO *et al.*, 2002).

A oxidação do luminol foi o passo fundamental da metodologia quimiluminescente desenvolvida, então os primeiros testes foram feitos com luminol e a solução padrão de ozônio a fim de verificar o melhor volume de aspiração para que ocorresse a reação de quimiluminescência. Três valores de volumes de aspiração (12,5; 25,0 e 50,0  $\mu\text{L}$ ), foram combinados dois-a-dois. Através da Figura 7 a seguir pode-se observar que o sinal analítico foi maior quando se aspirou 50,0  $\mu\text{L}$  de cada reagente. A Tabela 2 mostra o volume de luminol e ozônio para cada experimento.

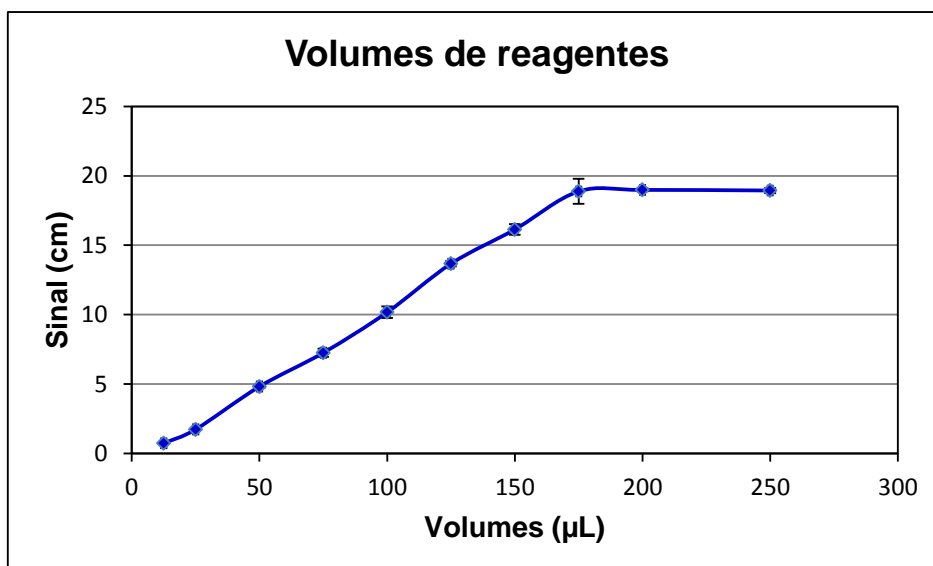


**Figura 7.** Avaliação do volume aspirado de reagentes.

**Tabela 2.** Volumes aspirados de reagentes.

Experimentos	Volume ( $\mu\text{L}$ )	
	Luminol	Ozônio
1	12,5	12,5
2	12,5	25,0
3	12,5	50,0
4	25,0	12,5
5	25,0	25,0
6	25,0	50,0
7	50,0	12,5
8	50,0	25,0
9	50,0	50,0

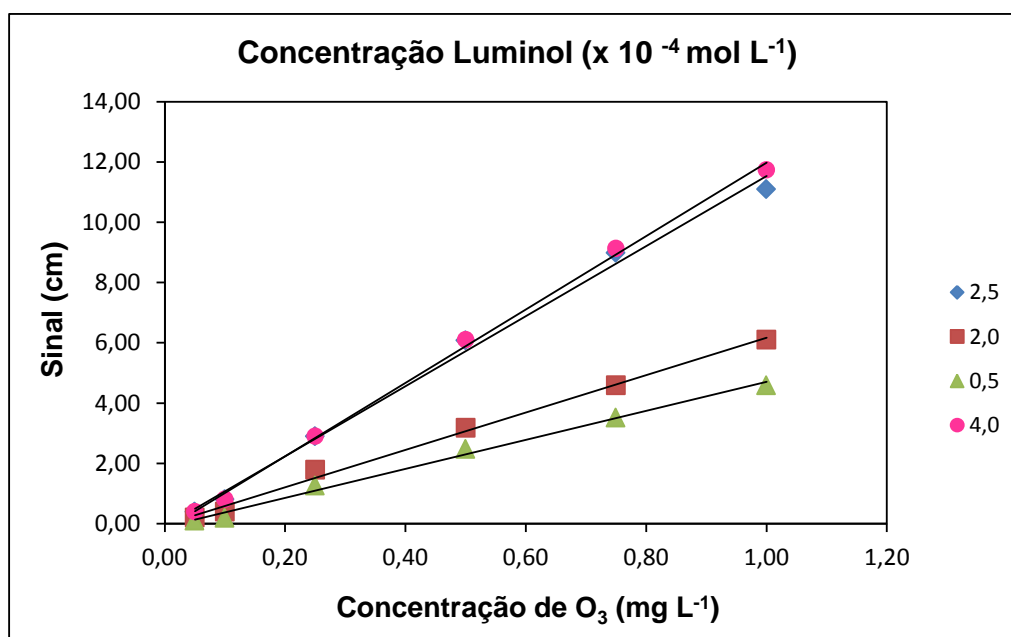
Ao observar que o sinal analítico foi maior ao aspirar o maior volume do oxidante e do luminol, a influência do volume de luminol e solução estoque de ozônio sobre o sinal foi estudada na faixa entre 12,5 e 250  $\mu\text{L}$ , salientado que os volumes aspirados para ambos os reagentes foram os mesmos. Os estudos prosseguiram, com 200  $\mu\text{L}$  para cada reagente, pois observou-se que os sinais analíticos acima desse volume não variaram de forma significativa (Figura 8).



**Figura 8.** Avaliação do sinal para volumes de reagentes no sistema SIA.

### 1.5.1.2 – Efeito da concentração do luminol

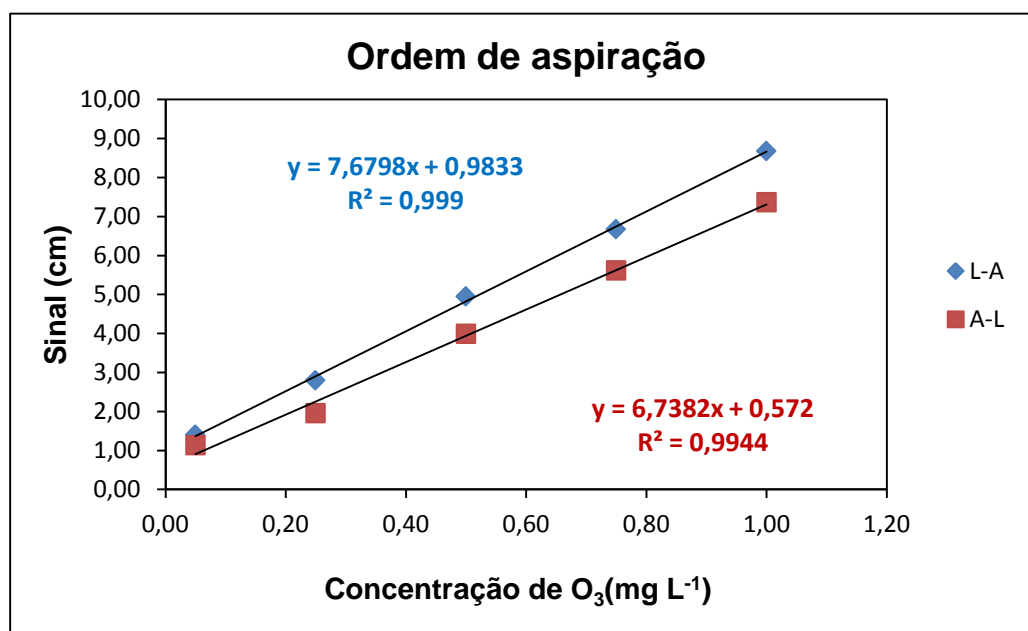
A emissão de luz após a oxidação do luminol é iniciada por um forte agente oxidante em meio alcalino produzindo o 3-aminoftalato no estado excitado (NAVAS e JIMÉNEZ, 1996). Logo o luminol foi preparado em tampão fosfato  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , pH 12,4. Em relação à sua concentração os estudos de otimização foram realizados entre  $5,0 \times 10^{-5}$  e  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados mostraram que a utilização de uma solução de luminol com concentrações acima de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  não conduziu a uma melhoria significativa na sensibilidade (Figura 9). Assim, a determinação foi realizada com luminol  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , como possibilidade de garantir uma melhor oxidação do luminol.



**Figura 9.** Efeito da concentração do luminol no sinal analítico.

### 1.5.1.3 – Efeito da ordem de aspiração dos reagentes

Em reações envolvendo penetrações de zonas múltiplas, é importante investigar a ordem aspiração dos reagentes e amostra. A sequencia de aspiração das zonas de amostra e reagentes envolvidas na reação influencia diretamente o grau de sobreposição das mesmas e, ao mesmo tempo, a forma como estas se dispersam uma nas outras, com repercussão final na intensidade e forma do sinal analítico obtido (BEYENE *et al.*, 2004). Os estudos relacionados com a sequência de aspiração foram conduzidos por alterar a ordem de aspiração de amostra e alíquotas luminol.



**Figura 10.** Ordem de aspiração dos reagentes para o SIA. L-A: Luminol-Amostra; A-L: Amostra-Luminol.

O procedimento otimizado envolveu a aspiração sequencial de luminol e da amostra uma vez que esta situação se mostrou mais favorável em termos de sensibilidade, provavelmente devido à dispersão reduzida da zona de exemplo associado a sua aspiração antes da mudança de direção do fluxo (Figura 10).

A aspiração foi subdividida em partes (luminol/amostra/luminol/amostra). Na sua forma mais simples o reagente é injetado, por aspiração, seguido da amostra, em um fluxo transportador formando uma zona de mistura, o objetivo de dividir a aspiração em partes era proporcionar uma maior zona de mistura. Porém isto não foi possível ser observado, o que pode ser creditado ao fato de se tratar de uma reação rápida ao ponto que a segunda zona de mistura formada ao chegar ao detector já tenha sido extinta.



#### 1.5.1.4 – Efeito do comprimento do reator

Outro parâmetro que afeta a dispersão e, portanto, a medição é o comprimento da bobina de reação (reator). Para se ter uma melhor sensibilidade e maior altura de pico, uma bobina de reação de dimensão que resulte em menor dispersão é necessária. Foi avaliada a influencia do comprimento do reator sobre a dispersão da zona reacional testando-se reatores de 5, 10 e 15 cm, na configuração de oito enrolado sobre uma rede plástica (Figura 11).

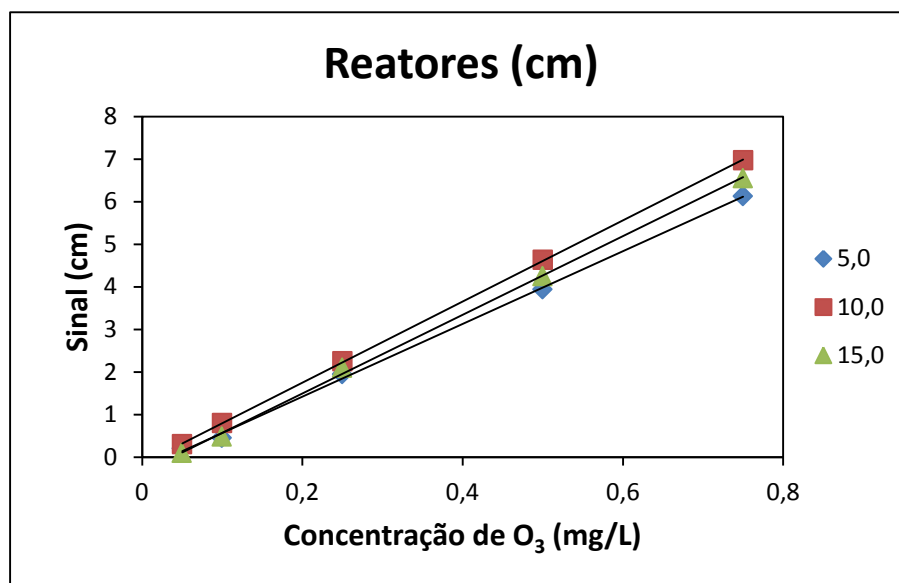


Figura 11. Efeito do comprimento do reator sobre o sinal analítico.

O reator inserido imediatamente antes do detector era usado para propiciar uma mistura final entre reagente e amostra. Inicialmente foi registrada uma maior intensidade CL quando o reator foi aumentado o que pode ser creditado a uma mistura mais eficaz das zonas, ao longo deste. Entretanto, para reatores com comprimento maior que 10 cm, um decréscimo foi observado o que foi atribuído à perda mais acentuada da luz emitida antes da amostra atingir a célula de detecção.

#### 1.5.1.5 – Efeito do caudal

No que diz respeito ao dispositivo propulsor, este deve permitir a reprodutibilidade das aspirações e propulsões, na medida em que os volumes utilizados são definidos pelo caudal e tempo de aspiração ou propulsão. Isto significa que todos os movimentos conferidos por este dispositivo de início, paragem e inversão do sentido do fluxo tem que ser bastante precisos para garantir a reprodutibilidade supracitada. Para a otimização deste parâmetro o volume da amostra e do reagente aspirado foi mantido constante alterando o tempo de aspiração, de acordo com a caudal. Testou-se três combinações envolvendo

tempo e caudal. As combinações para tempo, em segundos e, caudal em mL min<sup>-1</sup>, respectivamente foram: 3 e 30; 2 e 40; 4 e 20. De acordo com a Figura 12 é possível observar ganho de sensibilidade quando foram usados um tempo de 3s e um caudal de 30 mL min<sup>-1</sup>. Este aumento da intensidade quimiluminescente pode ser atribuído ao fato das zonas de misturas serem transportadas mais rapidamente para o detector, logo, menos radiação foi perdida durante o percurso na bobina de mistura. Nesta vazão a taxa de amostragem foi de 140 determinações /hora.

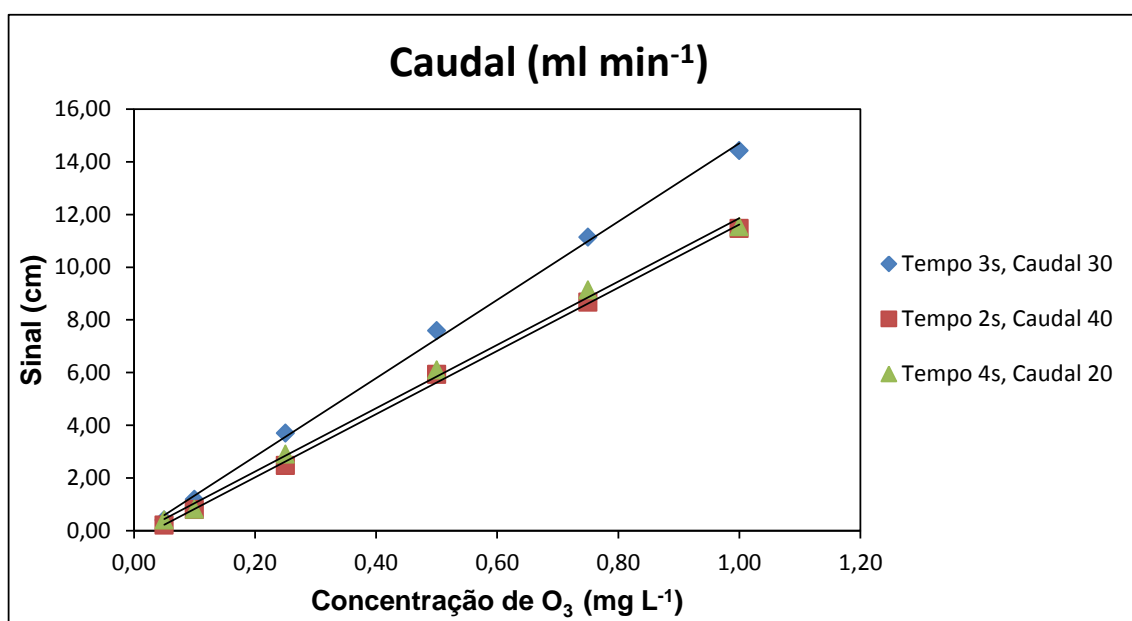
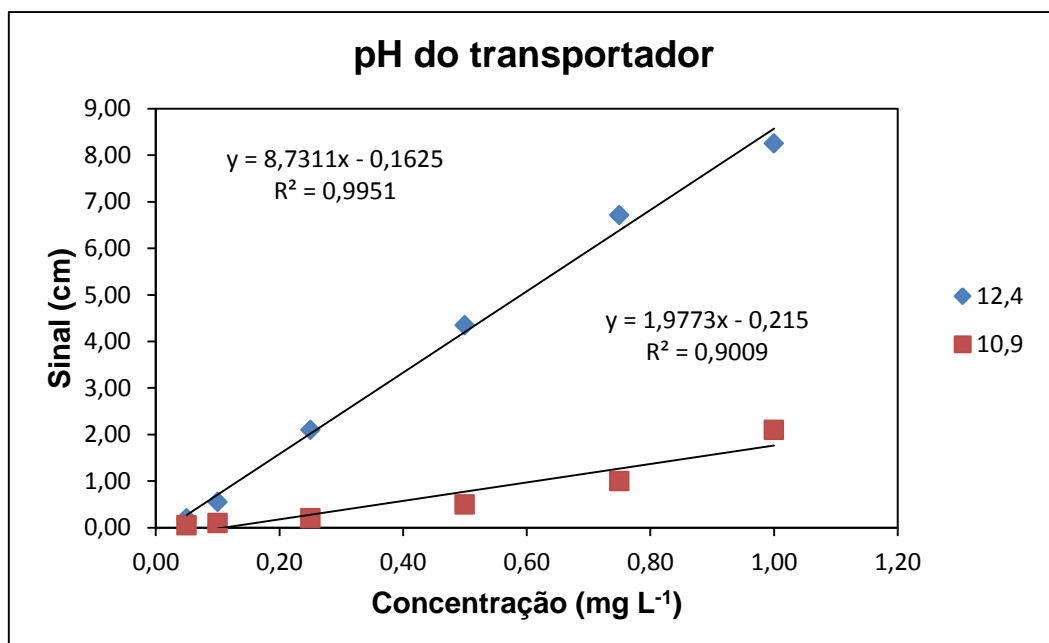


Figura 12. Efeito do caudal sobre o sinal analítico.

#### 1.5.1.6 - Avaliação do tipo e pH do transportador

Uma vez que a oxidação do luminol para o 3-aminofalato com emissão de luz só ocorre em meio alcalino, uma solução de fosfato com pH 12,4 foi testado como solução transportadora no sistema SIA. Esta possibilidade foi considerada como uma alternativa à utilização de água, que resultou em uma perda total de sinal analítico porque o pH do meio de reação não foi suficiente para a oxidação do luminol. Em referência ao pH, observou-se que a sensibilidade da determinação diminuiu cerca de 7 vezes quando foi mudado 12,4 para 10,9 unidades (Figura 13). Assim, uma solução de fosfato  $5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> com pH 12,4 foi usado como transportadora no sistema SIA. Também foi testada uma solução de hidróxido de potássio (0,04 mol L<sup>-1</sup>) como solução transportadora, no entanto os resultados foram análogos aos da solução de fosfato. Optou-se pela utilização desta haja visto que o luminol foi preparado na mesma solução.



**Figura 13.** Avaliação do pH do transportador.

#### 1.5.1.7 – Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia foi desenvolvida para ser aplicada na análise de amostras de água ozonizada avaliou-se o efeito potencial de interferência de várias espécies oxidantes que podem estar presentes nessa matriz.

Para esta investigação, soluções analíticas de trabalho preparadas com concentração fixa de ozônio de 2,0 mg L<sup>-1</sup> com diferentes concentrações das espécies potencialmente interferentes foram analisados pela metodologia SIA. A espécie foi considerada como não-interferência quando a variação do sinal em relação ao obtido na sua ausência foi menor do que 3%.

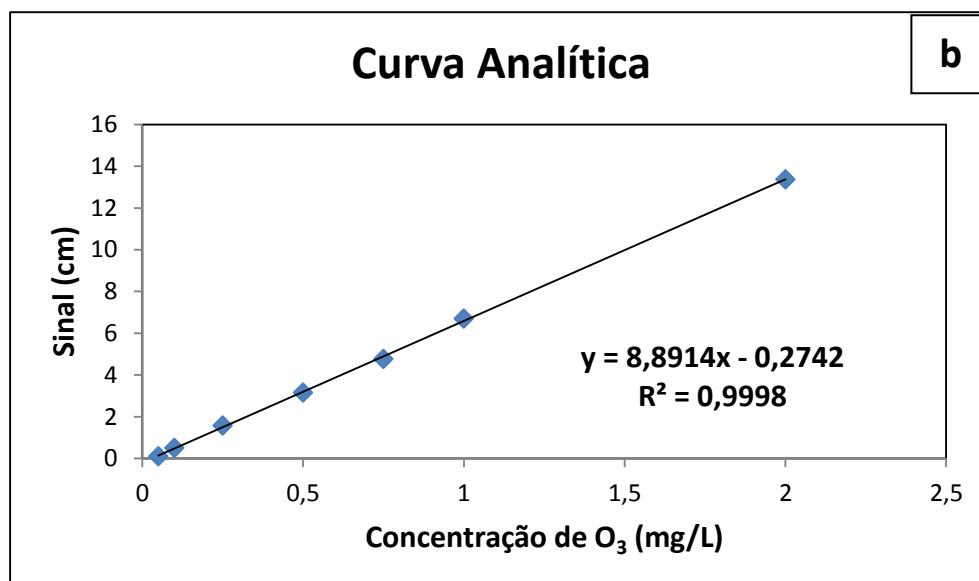
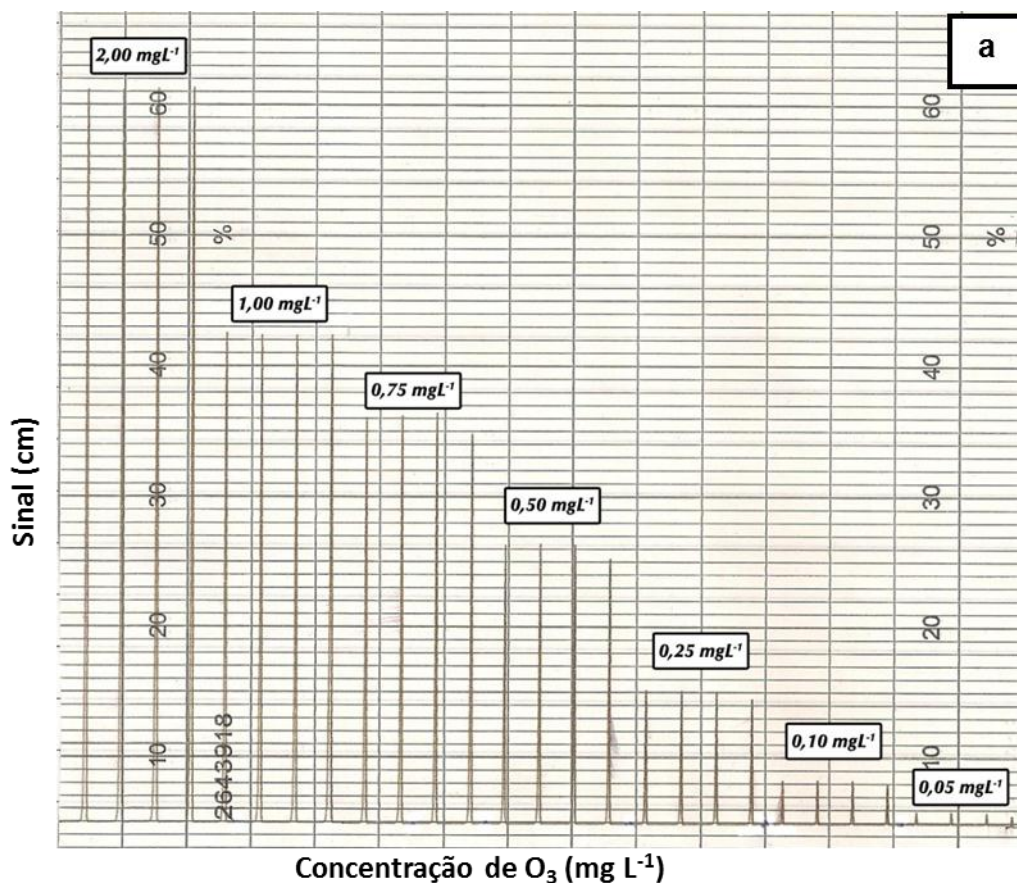
Os resultados mostraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é um interferente, mesmo em concentrações em torno de 5 mg L<sup>-1</sup> e que Mn (VII) apresentou um limite de tolerância de 0,001 mg L<sup>-1</sup>. Os principais componentes da solução de ozônio, KI e KIO<sub>3</sub>, também foram estudados, e observou-se que nenhuma das espécies afetava os sinais analíticos nas concentrações em que eles foram usados para preparar a solução estoque.

#### 1.5.2 - Figuras de mérito

Após a otimização de todos os parâmetros analíticos do sistema, a metodologia desenvolvida foi avaliada para as concentrações de ozônio entre 0,05 e 2,00 mgL<sup>-1</sup> e a curva analítica de calibração foi obtida (Figuras 14 a e b). A equação da curva de calibração é:

$$CL \text{ (mV)} = 8.8914(\pm 0.0058) C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} - 0.2742(\pm 0.1380), R^2 = 0.9998$$

(CL: sinal de quimiluminescência; C: concentração de ozônio)



**Figura 14.** Curva analítica de calibração para o ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Em **a**: sinal analítico, em cm, obtido no registrador; **b**: sinal analítico convertido em mV.

Os limites de detecção e quantificação da determinação foram  $0,04$  e  $0,13 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores são semelhantes aos obtidos pela maioria das metodologias em fluxo para o mesmo fim (STRAKA *et al.*, 1985; BAEZA *et al.*, 2005) sendo aplicável em sistemas de monitoramento contínuo desde concentração de ozônio residual seja geralmente superior a  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ .

A precisão da metodologia foi avaliada calculando a repetibilidade dos sinais analíticos obtidos pelo ensaio de uma amostra durante um dia de trabalho e foi menor que 2,9 % (n=15).

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, foi estimado tendo em conta o tempo necessário para a realização de um ciclo analítico e foi de 140 determinações/h.

### **1.5.3 - Aplicação analítica**

O método desenvolvido foi então aplicada para a análise de amostras de água potável e água ozonizada. Quinze amostras foram preparadas por adição com a solução química do ozônio ou por ozonização instrumental com o objetivo de imitar águas de aquário e aquicultura, em que a monitorização de ozônio residual pode ser importante para o controle e a eficiência do processo de ozonização.

A análise de amostras de água potável mostrou, como esperado, que o conteúdo de ozônio neste tipo de amostra está abaixo do limite de quantificação da metodologia.

Para avaliar a exatidão do método, os resultados da análise das amostras foram comparados a aqueles fornecidos pelo método de referência, a espectrofotometria (Tabela 3). Os desvios relativos, expresso em porcentagem, foram menores do que 6,3%. Aplicando teste t pareado para um nível de confiança de 95%, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados fornecidos por ambos os métodos ( $t_{\text{calculado}} = 0,23$ ;  $t_{\text{tabulado}} = 2,16$ ).

**Tabela 3.** Resultados da análise de amostras de água pelo SIA-CL e metodologia espectrofotométrica.

<b>Amostras</b>	<b>UV (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SIA (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
1	0,188 ± 0,010	0,191 ± 0,004	1,4
2	0,188 ± 0,008	0,200 ± 0,008	6,3
3	0,129 ± 0,002	0,123 ± 0,003	-5,0
4	0,276 ± 0,014	0,290 ± 0,008	5,0
5	0,240 ± 0,010	0,235 ± 0,006	-1,9
6	0,371 ± 0,010	0,383 ± 0,003	3,4
7	0,208 ± 0,008	0,215 ± 0,008	2,9
8	0,451 ± 0,001	0,460 ± 0,006	2,1
9	0,647 ± 0,010	0,638 ± 0,006	-1,4
10	0,807 ± 0,010	0,764 ± 0,006	-5,3
11	0,400 ± 0,010	0,379 ± 0,003	-5,1
12	0,749 ± 0,010	0,715 ± 0,025	-4,6
13	1,304 ± 0,008	1,361 ± 0,003	4,4
14	0,412 ± 0,008	0,428 ± 0,009	3,9
15	0,926 ± 0,022	0,892 ± 0,009	-3,7

## 1.6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação da reação de quimiluminescência do luminol, sem o uso de catalisadores em um sistema SIA confirmou, mais uma vez, a possibilidade de associar, com bons resultados, SIA com detecção de quimiluminescência. O método proposto resultou em uma redução drástica no consumo de reagentes e geração de efluentes quando comparada com os métodos existentes (STRAKA *et al.*, 1985; MCGOWAN e PACEY, 1995; BAEZA *et al.*, 2005).

Em cada ciclo de análise 0,014 mg de luminol foram consumidos e apenas 1,2 ml de efluente foram produzidos sendo a metodologia empregada em boa concordância com as preocupações atuais da química verde. O procedimento SIA proposto mostrou-se mais rápido (140 determinações por hora) do que a maioria das metodologias de fluxo existente

para o monitoramento de ozônio residual que realizam entre 60 e 120 determinações por hora (STRAKA *et al.*, 1985; McGOWAN e PACEY, 1995; BAEZA *et al.*, 2005).

O sistema SIA resultante foi simples e robusto e permitiu a análise em tempo real do ozônio residual de uma forma totalmente automatizada, com intervenção mínima do operador. Assim, é uma boa opção para a análise de águas de aquário e aquicultura, em que as águas são normalmente desinfectadas por ozonização como uma alternativa para cloração que está associado à formação de subprodutos (como halogenados, trihalometanos e ácidos haloacéticos) prejudiciais para os organismos vivos. Nestes casos, a metodologia parece ser adequada para monitorização *on-line* de ozônio residual com o objetivo de controlar as condições de ozonização.

Deve-se considerar que em sistemas de fluxo todas as medições são executadas sob condições definidas e reprodutíveis tais que todas as soluções são tratadas física e quimicamente na mesma maneira. A principal vantagem do sistema SIA é o fato de dispensar a diluição da amostra para ajustar o sinal analítico à faixa linear do detector. É possível bombear precisamente diferentes volumes de amostra mediante associação entre tempo e caudal. Cada porta da válvula pode ser ajustada a uma finalidade específica, e as combinações de amostra, padrões, reagentes, e detectores ao redor da válvula pode ser facilmente modificada para se adequar a uma análise particular.

# *Capítulo II*

*Estratégias para avaliação de constituintes inorgânicos em amostras de leite de coco*



## JUSTIFICATIVA

Os produtos industrializados ocupam uma parcela cada vez maior do mercado de alimentos. Eles são bem práticos, pois já vêm prontos ou semi-prontos. Além da praticidade, os alimentos industrializados também possuem um prazo de validade bem maior do que os produtos "in natura", tornando fácil o armazenamento. Assim, o desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados para o monitoramento de nutrientes e/ou possíveis contaminantes neste tipo de alimento é de fundamental importância. Os produtos derivados do coco tem grande relevância na indústria alimentícia e, dentre eles pode-se citar o leite de coco, que é um dos principais ingredientes na culinária nordestina especialmente na Bahia, inexistem dados na literatura sobre o perfil da composição química do leite de coco. Embora haja grande interesse nutricional sobre a composição, poucas pesquisas vêm sendo realizadas visando detectar as possíveis alterações que este pode sofrer quando o alimento é processado industrialmente.

## 2.1- INTRODUÇÃO

### 2.1.1- Química dos alimentos

O corpo humano necessita de uma série de substâncias para a manutenção do equilíbrio de todas as suas funções vitais. Dentre estas substâncias estão as vitaminas e os minerais que embora representem uma porcentagem muito pequena do peso corporal total desempenham papéis importantes nos diferentes processos metabólicos e enzimáticos (ONG, 1992).

O número de nutrientes inorgânicos necessários para humanos é impressionante, quando comparado aos orgânicos. Alguns nutrientes inorgânicos são armazenados em um reservatório que pode ser aproveitado durante os períodos de carência alimentar. Estes são o ferro, cálcio e fosfato. A Portaria 31 de 13/01/98 do Ministério da Saúde define como nutriente essencial toda substância normalmente consumida para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que não é sintetizada pelo organismo ou é sintetizada, porém em quantidade insuficiente.

Parte dos elementos químicos está presente no organismo humano. Tais elementos aparecem de forma combinada nas mais variadas substâncias, desempenhando diferentes funções. Um homem adulto, de 70 kg, apresenta em seu organismo cerca de 7 kg de hidrogênio, 12,6 kg de carbono, 2,1 kg de nitrogênio, 45,5 kg de oxigênio (este é o elemento químico mais abundante no nosso corpo), 700 g de fósforo, 175 g de enxofre, 105 g de sódio, 140 g de potássio, 1,0 kg de cálcio, 35 g de magnésio, 2,3 g de zinco e 4,2 g de ferro. Tratando-se particularmente dos metais e de suas funções no corpo humano, destaca-se o cálcio, presente nas estruturas ósseas e no esmalte dos dentes, na forma de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . A função mais óbvia de cálcio é como um componente do esqueleto. Este cálcio é não metabolicamente inerte. Cerca de 0,5 g deste elemento deixa os ossos e é repostado a cada dia. Os elementos sódio e potássio contribuem para o balanço osmótico em membranas celulares, sendo que o segundo é também usado como um cofator por diversas enzimas. A necessidade de ferro como um nutriente é universalmente apreciado. Seu papel como um componente do sangue e como um nutriente necessário para prevenir a anemia é de conhecimento comum; está presente na estrutura de uma molécula conhecida como hemoglobina, responsável pela absorção e transporte de oxigênio no sangue. O elemento manganês age como parte essencial das enzimas celulares que catalisam reações metabólicas importantes; cromo está associado com o metabolismo da glicose enquanto que cobre está associado à produção de energia; zinco é constituinte de enzimas celulares e selênio faz parte da enzima glutationala-peroxidase, que tem a função de proteger as membranas celulares eliminando os radicais peróxidos do organismo. Há que ressaltar, ainda, vários outros metais, sem os quais a vida humana não existiria. Entre eles estão

cobalto, níquel, cobre e molibdênio, envolvidos em processos metabólicos que regulam a produção de energia e o bom funcionamento do corpo humano (LINDER, 1991; BRODY, 1999; CHEDL, 2009).

A Tabela 4 mostra, para alguns elementos, as principais biofunções e consequências em função de sua deficiência. Pode-se observar que as consequências das deficiências ou excessos de qualquer outro elemento químico pode promover danos ao organismo humano, de modo que um desequilíbrio na concentração de algum destes pode até mesmo causar a morte. Uma alimentação adequada se mostra uma alternativa eficaz para a manutenção do equilíbrio e bom funcionamento do organismo humano sem escassez ou acúmulo de elementos essenciais.

Nutrientes inorgânicos, como por exemplo, Ca, K, Mg, Na e P perdidos na urina devem ser consumidos na dieta para manter o equilíbrio destes. Os íons metálicos que são secretados nos sucos gástricos e intestinais não são necessariamente perdidos do corpo. Eles são eficientemente reabsorvidos pelo trato intestinal (BRODY, 1999).

Alguns elementos tais como arsênio, cádmio e chumbo, não são considerados nutrientes por não apresentarem nenhuma função conhecida no metabolismo dos vegetais, tão pouco de animais, se destacam pela potencial toxicidade. Arsenio é amplamente distribuído na natureza pois pode se originar do intemperismo de rochas e solos, porém, também pode ser inserido no ambiente através da ação antrópica. Cádmio e seus compostos são altamente tóxicos e classificam-se como carcinogênicos. Chumbo é responsável por efeitos adversos à saúde humana, sendo suas principais fontes as emissões industriais, gases de exaustão de veículos, solos e alimentos contaminados (OYMAK *et al.*, 2009; TUZEN *et al.*, 2010).

**Tabela 4.** Principais biofunções e sua deficiência de alguns elementos no homem.

<b>Elemento</b>	<b>Funções</b>	<b>Deficiência</b>
Na	Principal cátion extracelular	Alterações na pressão arterial
K	Principal cátion intracelular	Alterações na pressão arterial
Mg	Funções enzimáticas e clorofila	Paralisia de determinados músculos
Ca	Constituinte dos ossos, importante em funções enzimáticas	Crescimento retardado do esqueleto
Al	Não essencial	-
Pb	Não essencial, tóxico	-
Fe	Transporte do oxigênio, hemoglobina	Anemia e desordem do sistema imunológico
Zn	Função estrutural e enzimática	Danos na pele, impede o crescimento e maturação sexual retardada.
Cu	Transporte do oxigênio e função enzimática	Enfraquecimento das artérias, desordem no fígado e anemia secundária
Mn	Função enzimática	Infertilidade e diminuição do esqueleto
Mo	Função enzimática e fixação de nitrogênio	Retardamento de crescimento celular e propensão a cáries
Cd	Não essencial, tóxico	-
Co	Vitamina B <sub>12</sub>	Anemia perniciosa
Ni	Função ainda não estabelecida	Crescimento depressivo e dermatite
Cr	Provavelmente envolvido no metabolismo da glucose	Sintomas de diabete
Hg	Não essencial, tóxico	-

Fonte: adaptado de LINDER, 1991; BRODY, 1999 e CHEDL, 2009.

A determinação de nutrientes orgânicos e inorgânicos pode revelar o potencial nutricional dos alimentos, bem como contribuir para a formulação de tabelas de composição alimentar utilizadas no âmbito científico. Devido a sua essencialidade, os alimentos têm sido objeto de diversos estudos. A composição química destes é uma informação importante no que tange a uma população. Alguns metais são essenciais para a nutrição humana, outros são encontrados como contaminantes nos gêneros alimentícios e, a presença de ambos ocorre simultaneamente (ROJAS *et al.*, 1999). A detecção de As, Cd e Pb é particularmente

importante, porque não são biodegradáveis e podem se acumular nos órgãos vitais humano, produzindo toxicidade progressiva (ALAM *et al.*, 2003).

No Brasil, o projeto de elaboração da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), desenvolvido com o intuito de gerar dados sobre a composição dos principais alimentos consumidos no país, vem contribuindo significativamente para a construção desse banco de dados que atualmente contempla 597 alimentos e estabelece valores de referência para uma série de nutrientes dos quais se destacam os macroatomados Ca, K, Mg, Na e P e os microatomados Cu, Fe, Mn e Zn (TACO, 2011).

### **2.1.2 - Leite de coco**

O fruto do coqueiro, o coco, é uma drupa de grandes dimensões que se compõe basicamente de quatro partes: (i) invólucro espesso e fibroso (mesocarpo); (ii) casca do caroço (endocarpo), quando maduro apresenta casco ósseo; (iii) amêndoa ou polpa albuminosa recoberta por tegumento que juntamente com a água constituem o endosperma; (iv) embrião.

A amêndoa do coco (polpa) é rica em lipídios, vitaminas (A, B1, B2, B5 e C), sais minerais, carboidratos, tendo quantidades razoáveis de proteínas. As proteínas do coco são ricas em lisina, metionina e triptofano. A composição química das frutas pode variar em função da variedade, fertilidade do solo, época do ano, grau de maturação ou desenvolvimento e porção do fruto (CARVALHO, 2007).

O conteúdo de óleo varia com o estado de maturação, sendo de 0,59% para 24,07%, do coco verde para o coco maduro. Portanto, ao mesmo tempo vai havendo perda de água e elevação do conteúdo de óleo. O conhecimento destas transformações é de grande importância para que se possa saber o ponto de colheita, tendo-se em vista a utilização da água de coco ou a sua industrialização. O coco que se destina a industrialização deve ser colhido no período mais próximo possível da maturação completa do endosperma (CARVALHO, 2007).

O leite de coco é definido como uma emulsão aquosa procedente do endosperma do fruto do coqueiro (*cocos nucífera L.*) maduros e são por processos mecânicos adequados (ANVISA, 1978; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004), formado de gorduras, proteínas, açúcares, sais minerais e água, sendo os lipídios e a água os componentes predominantes. A acidez é no máximo de 5% e a emulsão é viscosa, branca leitosa, com cheiro e sabor peculiares.

Ao sair da prensa, o leite de coco é um líquido branco, viscoso, com muito ar incorporado pela própria prensagem e um teor de gordura na faixa de 35 a 45 %. Dessa forma este deve ser formulado de maneira a que se obtenha um produto final com teor de

gordura em valores determinados para cada tipo: alto teor de gordura (mínimo 25%), baixo teor de gordura (13 - 16 %) e desengordurado (máximo 5%).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de coco verde e a região Nordeste destaca-se pela produção e consumo, sendo responsável por 75% da produção nacional. O país produziu uma quantidade de 1,9 bilhões de coco verde em 2004, ficando atrás da Índia, terceiro maior produtor mundial. O agronegócio do produto no Brasil destaca-se principalmente pelo consumo do líquido do fruto *in natura*, porém são conhecidas mais de 360 modalidades de aproveitamento industrial (NETO *et al.*, 2002).

No Brasil, o coco é usado verde para beber a água, que é a mais pura, nutritiva e completa bebida que a natureza produz nos trópicos. A polpa do coco maduro é um alimento importante na culinária dos países tropicais. O leite ou creme obtido do coco fresco ralado, serve como base no preparo de diversos pratos, tanto na culinária doméstica, quanto na comercial. A Bahia é o estado brasileiro onde o coco encontra sua maior expressão.

Do ponto de vista nutricional, a análise dos componentes químicos no leite de coco é limitada e restrita a certos constituintes (SANTOSO *et al.*, 1996).

### **2.1.3 – Procedimentos para preparo de amostras**

Idealmente, no desenvolvimento de métodos analíticos, os procedimentos de preparação da amostra e as técnicas analíticas empregadas para a determinação de macro, micro e elementos traço devem estar em consonância com exigências atuais da química. Por exemplo, ser capazes de propiciar a obtenção de resultados com maior confiabilidade, menor consumo de reagentes e minimização da quantidade e do impacto ambiental de resíduos. Além destes aspectos é necessário também levar em consideração a técnica analítica a ser empregada, a matriz da amostra, os analitos de interesse e da disponibilidade de materiais no laboratório. Em geral, se aplicam dissolução, extração, derivatização e decomposição (PRIEGO-CAPOTE e CASTRO, 2004).

A maioria das técnicas analíticas empregadas para determinação elementar utilizam uma solução da matriz, na qual o analito esteja numa forma disponível para a determinação. Assim, em geral, deve-se utilizar procedimentos de preparo de amostra que levem a total ou parcial destruição da matéria orgânica existente em grandes proporções na maioria das matrizes de alimentos (OLIVEIRA, 2003). A decomposição pode ocorrer por via seca ou úmida, sendo a primeira também chamada de calcinação ou incineração e a segunda, comumente chamada de digestão.

A calcinação corresponde à eliminação da matriz orgânica mediante oxidação da amostra em um forno mufla à temperatura controlada (MOMEN *et al.*, 2008). As temperaturas típicas de incineração são 450 a 550°C à pressão atmosférica, e as cinzas são dissolvidas em um ácido adequado. O grau de perda por volatilização é um fator limitante e

depende (i) da temperatura aplicada, (ii) a forma em que o analito está presente na amostra, e (iii) o ambiente químico na fase de incineração (KORN *et al.*, 2008) . Os tempos podem ser bastante longos, podendo levar de 2 a 3 dias a depender do procedimento (DOLAN e CAPAR, 2002). Uma grande vantagem do procedimento de digestão por via seca está na possibilidade de pré-concentração, isto é, digerir grandes quantidades de amostra e dissolver a cinza resultante num pequeno volume de ácido, o que é útil quando concentrações muito baixas são determinadas. A cinza resultante é completamente livre de matéria orgânica, o que é um pré-requisito para algumas técnicas analíticas, como o ICP-MS ou a voltametria (KARADJOVA, 2000).

A digestão por via úmida pode ser realizada em sistemas fechados (forno de micro-ondas, bombas de digestão) e/ou em sistemas abertos (placa de aquecimento, bloco digestor) por um ácido ou pelas misturas de ácidos (KORN *et al.*, 2008). A digestão da amostra por via úmida em sistema aberto (à pressão atmosférica) é uma das técnicas mais antigas e usadas para a decomposição de matéria orgânica e inorgânica (KNAPP, 1991).

Nos sistemas abertos, o aquecimento ocorre por condução e a temperatura da decomposição está limitada à temperatura de ebulição dos agentes oxidantes utilizados. Já nos sistemas fechados, há uma associação entre temperatura e pressão para degradar a matéria orgânica. No uso desses sistemas é preciso levar em consideração erros inerentes ao sistema como, por exemplo, impureza dos reagentes utilizados que conduz a altos valores dos brancos analíticos, manipulação do analista e perdas por volatilização dos analitos.

Em geral, os procedimentos para digestão completa por via úmida convencional são lentos, tediosos e perigosos quando se usa oxidantes fortes. Além disso, necessita de grande quantidade de reagentes e supervisão constante do analista. Por outro lado, procedimentos de digestão assistida por micro-ondas são amplamente utilizados no tratamento de amostras orgânicas.

Os ácidos normalmente empregados para solubilização de amostras são HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e HF, sendo as propriedades como força do ácido, ponto de ebulição, poder oxidante, poder complexante, solubilidade dos sais e segurança na manipulação consideradas na elaboração do programa de aquecimento. Em alguns casos deve-se fazer uso de oxidantes como peróxido de hidrogênio e de sais para auxílio na solubilização das amostras. O uso de ácidos oxidantes, como HNO<sub>3</sub> e/ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é importante especialmente para digestão das amostras de alimentos com alto teor de carboidratos e / ou de gordura. Além disso, as misturas de ácidos nítrico/perclórico ou nítrico/clorídrico ou combinação de mais de dois ácidos são geralmente empregadas em digestões úmidas e o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser necessária quando o material da amostra é de difícil decomposição (MOMEN *et al.*, 2006).

O peróxido de hidrogênio é agente oxidante auxiliar que pode sofrer combustão espontânea em contato com matéria orgânica ou alguns metais, através de catálise, e pode ser convertido em radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (MATTOS *et al.*, 2003). Uma alternativa, ao uso do peróxido de hidrogênio é o uso do ozônio como agente oxidante na etapa de preparo de amostra, uma vez que pode ser facilmente obtido a partir da conversão de  $\text{O}_2$  e ter o mesmo como produto da sua decomposição. A aplicação de ozônio parece apresentar vantagens neste aspecto, porém poucos trabalhos são reportados na literatura.

Devido à multiplicidade de matrizes de alimentos não é possível utilizar uma única técnica de preparo de amostra, para tanto, vários métodos devem ser propostos, a fim de atender a todas as demandas (BULDINI, 2002). Esta etapa de preparo é essencial para o emprego das técnicas espectrométricas na quantificação de macro e micronutrientes em alimentos (COELHO, 2001; OKADA *et al.*, 2007).

Outro procedimento bastante utilizado no tratamento de amostras para fins analíticos é a extração ultrassônica, por se tratar de uma alternativa simples, rápida, eficiente e de baixo custo aplicada à determinação de elementos em diversos tipos de amostras empregando técnicas espectroscópicas. A extração é decorrente do efeito causado pela cavitação acústica, em que as ondas ultrassônicas atravessam o meio material gerando ciclos de expansão e compressão. Os ciclos de expansão produzem pressão negativa no líquido, podendo levar à formação de cavidades na fase líquida e consequentes bolhas. Com os ciclos de compressão, gases e moléculas na fase vapor podem ser expelidos das bolhas. Os sucessivos ciclos de expansão e compressão conduzem a um diâmetro crítico das bolhas de cavitação resultando no colapso destas, o que gera temperaturas (5000 K) e pressões (1000 atm) extremamente altas (KORN *et al.*, 2003; SANTOS JR *et al.*, 2006).

#### **2.1.4 - Ferramentas estatísticas aplicadas à Química**

O planejamento experimental é uma importante ferramenta estatística e, devido a sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizada pelos químicos analíticos para diferentes amostras e propósitos que possam conferir, ou não, as hipóteses da pesquisa. Um conjunto de resultados ou observações é necessário para que as hipóteses possam ser verificadas ou testadas. Com o uso de planejamento de experimentos baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos (NETO *et al.*, 2010). Além do planejamento experimental, a estatística multivariada aplicada à química é frequentemente utilizada no tratamento de dados analíticos (CORREIA e FERREIRA, 2007).

Em um sistema, os fatores podem ou não influenciar na resposta desejada. Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que possam ou não



influenciar no sistema, é necessário avaliar o domínio experimental e as que não influenciam devem ser fixadas durante o experimento (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Neste contexto a aplicação da quimiometria facilita a interpretação de forma mais rápida e eficiente da crescente gama de dados originados de um sistema.

A quimiometria pode ser definida como a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química na análise de dados de natureza multivariada. Esta abrange um grande número de temas, tais como, tratamento de sinais, planejamento experimental, otimização de processos de análises e sínteses, reconhecimento de padrões, calibração, dentre outros (BEEBE *et al.*, 1998; BRERETON, 2002).

O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). O uso desses algoritmos tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou ausência de agrupamentos naturais entre as amostras. Ambos são classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (BEEBE *et al.*, 1998; CORREIA e FERREIRA, 2007).

### **2.1.5 - Técnicas espectroanalíticas**

Dentre os diversos métodos aplicados à determinação de constituintes inorgânicos em alimentos, os que fazem uso das técnicas espectroanalíticas, baseadas nos fenômenos de absorção e emissão, são mais comuns devido às altas sensibilidade e seletividade características dessas técnicas, dentre elas destacam-se a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma poderosa técnica de análise. O plasma é fonte de alta temperatura que minimiza efeitos de matriz e produz sensibilidade adequada à maioria dos metais e alguns não-metais, em diversas ordens de grandeza de concentração (de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a %) e é amplamente utilizado em análises de matrizes complexas como é o caso dos alimentos.

A técnica ICP OES oferece como características: elevada sensibilidade, análise multielementar simultânea, rapidez, ampla faixa dinâmica linear, elevadas precisão e exatidão e baixos limites de detecção.

O sucesso da espectrometria atômica depende, frequentemente, do procedimento de introdução da amostra, sendo que o modo mais comum baseia-se na formação de um aerossol líquido, por meio de nebulizadores pneumáticos. Para tanto, as amostras devem estar na sua forma líquida, ou, dependendo do tipo do nebulizador, a introdução pode ser feita com o uso de suspensões.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite separar espécies iônicas pela razão entre a massa e a carga. Essa técnica pode ser empregada em análises qualitativas e quantitativas e é considerada universal uma vez que se aplica a misturas de substâncias sólidas, líquidas e gasosas. Os espectros gerados durante as análises são obtidos de forma rápida, facilitando a sua aplicação no controle de processos em tempo real (GINÉ, 1999).

A técnica ICP-MS é altamente sensível e permite detecções multi-elementares e multi-isotópicas em amplas faixas dinâmicas que chegam a nove ordens de grandeza. Outra característica desta técnica é que o processo de ionização é praticamente independente da composição da matriz da amostra (MONTASER, 1998). Entretanto, algumas amostras podem conter espécies que interferem nas análises e para que esse problema seja contornado, pode-se fazer uso das células de colisão e reação dos equipamentos, ou de instrumentos de alta resolução.

## 2.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos envolvendo a determinação de espécies inorgânicas, incluindo micronutrientes minerais devem ser considerados, pois estas espécies possuem um valor tóxico ou essencial, dependendo da concentração em que se encontram (DE SOUSA *et al.*, 2006), e o leite de coco, que é um alimento rico em minerais, precisa ser inserido nestas pesquisas.

Devido à restrição de base literária sobre tratamento de amostras de leite de coco, esta revisão será feita com base no preparo de amostra de alimentos com alto teor de matéria orgânica, por exemplo, o leite bem como oleaginosas. Nesse contexto também serão inseridos trabalhos em que a matriz de estudo é a água de coco natural ou industrializada. O Brasil é o único país produtor onde o coco é tratado somente como uma fruta e não como uma oleaginosa (EMBRAPA).

Santoso *et al.* (1996) analisaram cocos maduros quanto à sua composição em termos de minerais, vitaminas, fibras dietéticas, açúcares, ácidos orgânicos, composição em ácidos graxos e aminoácidos. Os autores constataram que o constituinte chefe da água de cocos verdes é sacarose (cerca de 92% do total açúcar); em contraste, a polpa contém glicose e frutose como os principais açúcares. O conteúdo total de aminoácido na água foi maior para os cocos maduros e pareceu ser uma boa fonte de minerais, como por exemplo, o potássio que é o constituinte predominante. A sacarose, glicose, frutose e ácidos cítrico e málico, conteúdos relativamente elevados nesta matriz, podem contribuir para dar o sabor da polpa do coco. O conteúdo lipídico de uma espécie de coco foi menor, mas os perfis de ácidos gordos eram similares. Antes da determinação foi feita uma digestão úmida com ácido nítrico. Santana *et al.*, (2001) relataram que a polpa do coco verde substituiu a gordura, emulsificante, leite e estabilizador em um sorvete de chocolate, uma vez que a composição centesimal foi de 92,70% e 8,01% de umidade; 0,39% e 27,95% de gordura; 0,97% e 19,9% de proteína; 0,75% e 10,72% de cinzas; e 5,19% e 33,42% carboidratos, respectivamente, para a polpa do coco verde e seco. A composição de ácido graxo é consistente com os valores da literatura para o coco verde anão com predominância de ácido láurico (38,05%).

Os constituintes inorgânicos de diferentes oleaginosas; avelãs, nozes, amêndoas, castanha de caju, castanha do Pará, pistache, amendoim, coco e sementes de abóbora e girassol comercializados na Suécia, foram avaliadas (RODUSHKIN *et al.*, 2008). O procedimento analítico otimizado consistiu de digestão assistida por radiação micro-ondas utilizando uma mistura de 10 mL de HNO<sub>3</sub> e 50 µL de HF para uma massa de 1g de amostra atingindo uma temperatura máxima de 170°C, seguido por análise multielementar por ICP-MS. A veracidade dos resultados foi avaliada através de análises interlaboratoriais e de materiais de referência certificados de origem vegetal. Concentrações, assim, obtidas foram

comparadas com os dados dos rótulos dos produtos (quando disponível) e tabelas de composição de alimentos, demonstrando diferenças consideráveis, a depender dos elementos em questão.

No Brasil, Aleixo *et al.* (2000) determinaram Se em água e leite de coco por GF AAS usando suspensão em uma mistura de aminas terciárias solúvel em água e empregando Pd como modificador químico e as temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 1400 e 2200 °C, respectivamente. A concentração de selênio em água de coco variou 6,5 a 21,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e no leite de coco de 24,2 a 25,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foi possível obter recuperações na faixa entre 99,5 e 102,3%. As amostras foram apenas diluídas e inseridas no tubo de grafite, não havendo acúmulo de gordura no capilar do auto amostrador e também evitando o acúmulo de resíduos de material orgânico depois da queima, melhorando dessa forma a repetibilidade do sinal analítico. Os teores de selênio determinados nas amostras de água de coco e leite de coco indicam que esses alimentos podem ser úteis como fontes de selênio facilmente disponíveis à população.

De Sousa *et al.* (2005), avaliaram o teor de Ca, Mg, Mn, Fe, Zn e Cu em água de coco engarrafadas, consumidas no Brasil, sem uma etapa de mineralização usando ICP OES. A presença desses elementos nesta bebida foi investigada, considerando a falta de informações apresentadas pelos fabricantes. As determinações mostraram baixa interferência de matriz e CV geralmente menor que 2%. A faixa de concentração em  $\text{mg L}^{-1}$  para os analitos foi: Ca (178 - 232), Mg (87 - 129), Mn (1,8 - 3,8), Fe (0,08 - 0,18), Zn (0,2 - 0,36) e Cu (0,09 - 0,19). Considerando os valores médios pode-se estimar que a ingestão de 300 mL de água de coco engarrafada contribui 6% de Ca, 8% de Mg, 56% de Mn, 0,5% de Fe, 0,6% de Zn e 2% de Cu numa referência de ingestão diária desses nutrientes.

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado foi empregada para determinar Ca, Mg, Mn, Fe, Zn e Cu em amostras processadas e naturais de água de coco (DE SOUSA *et al.*, 2006). O preparo da amostra consistiu em uma etapa de filtração seguida por uma diluição. Os resultados mostraram valores comuns de concentração para os analitos presentes em amostras processadas e natural. Análise de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos (HCA) indicaram que as amostras diferem estatisticamente quando as concentrações de todos os analitos foram consideradas simultaneamente. Os valores médios para a concentração dos analitos foram diferentes, exceto do Mn. Além disso, os elementos Fe e Cu foram encontrados apenas nas amostras processadas, o que é uma possível evidência de contaminação inerente ao processo.

Amostras de amendoim foram efetivamente digeridas por tratamento com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio em aproximadamente 30 min para a determinação rápida de ferro e cobre por FAAS (ANZANO e GONZALEZ, 2000). O procedimento constou da pesagem de 0,5 g de amostra em um frasco Kjeldhal de 100 mL, então alíquotas de 1,0 a

3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionadas e a mistura foi aquecida por 20 min. Em seguida 8,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30% foram adicionados gota a gota até descolorir a solução. A mistura foi aquecida vigorosamente para remover o peróxido de hidrogênio em excesso. Sob condições ótimas, os resultados do método proposto concordaram com aqueles obtidos pelo método AOAC. Recuperações variaram de 99 a 101% e o desvio padrão relativo foi de aproximadamente 1%.

O leite de soja é uma emulsão coloidal extraída a partir da soja e, portanto, quase todos os constituintes (proteínas, lipídios e sacarídeos) das sementes estão presentes no leite. As concentrações de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e P nesta matriz foram determinadas por ICP OES. As amostras líquidas e em pó da formulação, foram digeridas usando um programa convencional em placa de aquecimento. As amostras em pó foram preparadas de acordo com as instruções da etiqueta para consumo humano. Uma alíquota de 5,0 mL da emulsão proteica de soja foi transferida para um erlenmeyer e foram acrescentados ácidos nítrico e sulfúrico. Depois de um tempo de digestão de 50 min, peróxido de hidrogênio foi adicionado e aquecimento foi mantido até um volume final de 5 mL. Boa concordância entre os valores medidos e certificados para todos os analitos no CRM de leite em pó desnatado (NIST SRM 1549) indicaram que o método era adequado para determinação dos principais elementos e traços em formulações de proteína de soja (MORTE *et al.*, 2007).

Ferreira *et al.*, (2005) desenvolveram um procedimento de digestão ácida para a determinação de cobre em diversos alimentos de origem animal e vegetal. A mistura de  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$  (3:1 v v<sup>-1</sup>) foi utilizada para a digestão das amostras em uma placa de aquecimento até que a oxidação total da matéria orgânica ocorresse. As concentrações de cobre foram determinadas por FAAS e a faixa de recuperação variou de 98 a 102%. Níveis mais elevados de cobre foram detectados em alimentos proteicos, como feijão. Em amostras de frutas, legumes, grãos, raízes e tubérculos, o teor de cobre variou de 0,02 - 0,31 mg/100 g do produto. O maior teor de cobre foi detectado em uma amostra de fígado bovino (6,06 mg/100 g de peso úmido).

Um total de 54 amostras de leite foram coletadas de fontes comerciais no Vale do Paraíba (SOARES *et al.*, 2010). Como alternativa para o método de decomposição da amostra por micro-onda, a metodologia utilizada, consistiu da introdução de 1,0 mL de leite em um frasco de teflon. Então 3,0 mL de HCl 20% v v<sup>-1</sup> e 1,0 mL de solução de  $\text{HNO}_3$  20% v v<sup>-1</sup> foram adicionados. Depois disso, frasco foi introduzido em uma camisa de aço inoxidável permitindo que o processo fosse realizado sob pressão. Tempo total de digestão foi de 3h a uma temperatura 110° C. As concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn foram determinados por FAAS e Cd, Cr, Mn, Ni, Pb e Se foram determinados ETAAS. Os testes foram realizados em material de referência certificado de leite em pó para validar a confiabilidade dos dados analíticos obtidos. O teor para o Ca foi encontrado abaixo do

recomendado pelos padrões internacionais ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ) para todas as amostras, possivelmente, devido a heterogeneidade da matriz e perdas na pasteurização. Resultados significativos para Pb foram encontradas em todas as amostras de leite, com valores médios de  $0,230 \text{ mg L}^{-1}$ .

Digestão úmida a pressão atmosférica bem como uma análise direta para a determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni e Pb em leite, queijo e chocolate foram descritos e comparados (KARADJOVA *et al.*, 2000). A determinação foi feita por voltametria catódica pulso diferencial (DPCSV) e espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). A digestão úmida utilizando uma mistura de  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  foi proposta para a decomposição completa da matriz. A mistura de  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$  foi usada para o preparo da suspensão. A confiabilidade dos procedimentos foi verificada através da análise de materiais de referência certificado. Os resultados obtidos estão de acordo com os valores certificados e os desvios padrão relativos estavam no intervalo de 5-10% para a digestão úmida e 3 - 9% para amostragem de suspensão.

Um procedimento simples e rápido foi desenvolvido por Cava-Montesinos *et al.* (2004) para a determinação de As, Sb, Se, Te e Bi em amostras de leite por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto (HG-AFS). Amostras foram tratadas com água régia por 10 min em um banho de ultrassom e pré-reduzidas com KBr para a determinação total de Se e Te, ou com ácido ascórbico e KI para As e Sb. A determinação de Bi foi possível ser feita com ou sem pré-redução. Os resultados obtidos pelo procedimento desenvolvido concordaram com aqueles encontrados depois da digestão completa assistida por micro-ondas. O método proposto mostrou-se simples e rápido, e apenas 1,0 mL de leite foi necessário. Os valores obtidos para limite de detecção são 2,5; 1,6; 3,6 e  $7,0 \text{ ng L}^{-1}$  para As, Sb, Se, Te e Bi, respectivamente. O procedimento desenvolvido ofereceu uma alternativa a aqueles baseados na digestão completa da amostra com boa precisão para a determinação dos analitos em amostra de leite.

Formulações infantis desenvolvidas por fabricantes exige um controle rigoroso de composição, nomeadamente os elementos adicionados rotineiramente em uma tentativa de imitar a composição mineral do leite humano. Um total de 97 tipos de fórmulas para lactentes em pó foram estudados por Sola-Larrañaga e Navarro-Blasco (2009). O desenvolvimento de um método de suspensão rápido, simples e direto para a determinação destes micronutrientes essenciais por ICP OES e FAAS foi realizado. Amostras foram solubilizadas usando diferentes quantidades de vários solventes diferentes. Cerca de 0,4g de amostras foram pesadas e então transferidas para frascos de polietileno onde foram dissolvidas utilizando os solventes: água ultrapura, Triton X-100, TMAH ou  $\text{NH}_4\text{OH}$  adicionados em quantidades diferentes de acordo com o experimento, em alíquotas de 25 a  $500 \mu\text{L}$ . As suspensões foram sonicadas na faixa de 2 a 5 min. A exatidão da metodologia

foi feita através de material de referência certificado NIST 1549 e por comparação com o método de digestão assistida por micro-ondas utilizando uma massa de 0,4 g e 7 mL ácido nítrico, atingindo a temperatura de 170°C. Houve boa concordância nos resultados. Os autores notaram grandes diferenças entre os conteúdos encontrados e listados em informações do rótulo.

Um procedimento de decomposição simples para a determinação de Na, K, Ca e Mg em goma xantana foi proposto por Klaic *et al.*, (2011). Dois procedimentos foram realizados para se decompor as amostras usando a digestão ácida. No primeiro procedimento as amostras foram tratadas com HNO<sub>3</sub> concentrado a 100°C por cerca de 3 h. No segundo procedimento, as amostras foram tratadas como descrito anteriormente. No entanto, após 2 h de aquecimento na presença de HNO<sub>3</sub> (altura em que apenas o material que é mais difícil para oxidar permanece), a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, e 2,0 mL de HClO<sub>4</sub> foram adicionados cuidadosamente para promover a oxidação mais eficiente de material orgânico. A mistura foi novamente aquecida a 100 °C por mais 1 h, e a digestão completa foi observada com a remoção total do material orgânico. Os analitos foram determinados por FAAS. A precisão do método foi verificada comparando os resultados com aqueles obtidos a partir da decomposição pelo método convencional de calcinação, e não houve diferenças significativas entre os resultados no nível de confiança de 95%. Os limites de detecção na amostra foram 0,011; 0,004; 0,45 e 0,001 mg g<sup>-1</sup> de Na, K, Ca e Mg, respectivamente. Os desvios padrão relativos foram inferiores a 10%. O método proposto é simples, rápido, reprodutível e necessitou de menos amostra do que o método de calcinação.

Momen *et al.*, (2006) relataram que a mistura HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficiente para a decomposição em amostras de leguminosas quando comparada à mistura HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e calcinação em forno mufla com Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/HNO<sub>3</sub>.

É possível observar que para a decomposição de amostras com alto teor de matéria orgânica é necessário um ataque ácido mais enérgico; seja pela adição de um agente oxidante mais forte e/ou com ponto de ebulição mais elevado quando se trabalha em sistemas operam a pressão atmosférica; ou aumentando o poder oxidante quando se trabalha em sistemas que operam em altas pressões.

## **2.3 - OBJETIVOS**

### **2.3.1- Objetivo Geral**

Propor estratégias analíticas para a determinação de macro e microelemento em amostras de leite de coco industrializado empregando diferentes técnicas de preparo da amostra e determinação multielementar por técnicas espectrométricas, a fim de estabelecer um protocolo analítico e contribuir para a tabela de composição de alimentos a nível regional.

### **2.3.2 - Objetivos Específicos**

- Propor procedimento analítico de preparo de amostras de leite de coco empregando aquecimento condutivo, em bloco digestor, visando determinação multielementar simultânea de macro-elementos (Ca, Mg, Na, K e P) e elementos traço (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn) empregando ICP OES.
- Propor procedimento analítico de preparo de amostras de leite de coco empregando aquecimento assistido por micro-ondas visando determinação multielementar simultânea de macro-elementos (Ca, Mg, Na, K e P) e elementos traço (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn) empregando ICP OES e ICP-MS.
- Propor procedimento analítico de preparo de amostras de leite de coco empregando ultrassom visando determinação multielementar simultânea de macro-elementos (Ca, Mg, Na, K e P) e elementos traço (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn) empregando ICP OES.
- Caracterizar o leite de coco, em função do tipo de embalagem e fornecedor, a partir da análise da composição mineral empregando ferramentas quimiométricas.
- Contribuir para a tabela de composição de alimentos a nível regional.



## **2.4 - PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.4.1 - Reagentes e soluções**

Foram preparadas soluções multielementares de trabalho a partir de soluções estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Se e Zn (Merck, Alemanha) e 4000 mg L<sup>-1</sup> de Ca, Fe, K, Mg, Na e P (Merck, Alemanha). Foi preparada uma solução multielementar para As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Se e Zn na concentração de 50,0 mg L<sup>-1</sup> e os demais de 500 mg L<sup>-1</sup>. Para a determinação dos teores de carbono residual, após os procedimentos de decomposição, foi preparada uma solução de referência de 20000 mg L<sup>-1</sup> em carbono a partir do ácido cítrico.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>, de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA). Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido nítrico 65% m m<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha), este foi destilado antes do uso, ácido sulfúrico 98% (Merck, Alemanha), peróxido de hidrogênio 30% v v<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (Reagen, Brasil) e ácido cítrico (Merck, Alemanha).

A descontaminação de vidrarias, frascos plásticos e materiais em geral, foi realizada em banho ácido contendo HNO<sub>3</sub> 10% v v<sup>-1</sup>, por no mínimo 12 h. Posteriormente, os materiais eram lavados abundantemente com água deionizada. Quando necessário, os frascos de TFM<sup>®</sup>, utilizados no forno de micro-ondas com cavidade, eram submetidos à descontaminação em estufa a 180 °C por 3 h.

### **2.4.2 - Amostras e materiais de referência certificados**

As amostras de leite de coco foram adquiridas junto a estabelecimentos comerciais na cidade de Salvador, BA. Apesar de comercializadas neste estado a sua origem é proveniente de outros estados. O conjunto de amostra compreendeu 13 marcas, as quais foram designadas pelos seguintes códigos (estado de fabricação): MC, QL, SC, TQ (Alagoas); DC, SB, MN (Espírito Santo); SN, CV (Paraíba), KC, BP (Pernambuco); BC e SY (Sergipe).

Foram usados dois materiais de referência certificados do NIST (Gaithersburg, Maryland, USA) SRM 8435, leite bovino integral e SRM 1549 leite desnatado. Como não se encontram disponíveis no mercado materiais de referência certificados para a matriz estudada, esses materiais foram usados para avaliar a exatidão dos procedimentos analíticos propostos. O leite bovino assim como o leite de coco são ricos em carboidrato, proteínas e lipídios.

As amostras não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento. As análises foram feitas diretamente nas amostras, para que o resultado final representasse o teor dos constituintes nas amostras da forma que elas são ingeridas pelo consumidor.

### **2.4.3 - Instrumentação e materiais**

#### **2.4.3.1 - Digestão das amostras em sistemas com aquecimento condutivo em bloco digestor**

As digestões das amostras usando sistemas condutivos abertos foram efetuadas empregando-se bloco digestor (TECNAL, São Paulo, Brasil), modelo TE-040/25 com controlador de temperatura analógico e capacidade para 40 tubos micro em borossilicato com dimensões de 25 x 250 mm.

#### **2.4.3.2 - Digestão das amostras em sistema assistido por radiação micro-ondas**

Os procedimentos de digestão em fornos de micro-ondas foram conduzidos em um forno com cavidade modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália), que possui rotor para 10 frascos de 100 mL confeccionados em TFM<sup>®</sup> (PTFE modificado) e opera sob altas temperaturas e pressões. Esse sistema permite o acoplamento de sensores de temperatura e pressão que possibilitam o acompanhamento do sistema de digestão e promovem uma maior segurança operacional.

As soluções obtidas após digestão, para todos os procedimentos de preparo de amostra utilizados, foram transferidos para frascos de polietileno de 50,0 ou 15,0 mL.

#### **2.4.3.3 - Extração assistida por ultrassom**

Para a extração ultrassônica aplicada a determinação dos constituintes inorgânicos em leite de coco foram empregados banho ultrassônico VWR modelo 75D (Cortland, New York, USA) e centrífuga Marconi modelo MA-1810 (Piracicaba, Brasil). Além destes equipamentos utilizou-se papel de filtro quantitativo.

#### 2.4.3.4 -Determinação dos analitos

Para a determinação dos analitos foi empregado o espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália) simultâneo com arranjo axial e equipado com detector de estado sólido com arranjo CCD (dispositivo de carga acoplada) e opera em comprimentos de onda na faixa de 167 a 785 nm. Possui interface *end-on gas*, que com o fluxo frontal contracorrente de gás protege a região pré-óptica de superaquecimento e remove a zona mais fria do plasma. O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar e o alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e sensibilidade adequada para a determinação de elementos em baixas e altas concentrações. A Tabela 5 ilustra as características e as condições experimentais do ICP OES.

**Tabela 5.** Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES.

Características e parâmetros	
Rádio-freqüência do gerador (MHz)	40
Detector	CCD
Diâmetro interno do tubo central da tocha (mm)	2,3
Policromador	Grade de difração <i>Echelle</i> e prisma de dispersão de CaF <sub>2</sub>
Faixa de comprimento de onda (nm)	167 – 785
Câmara de nebulização	<i>Sturman-Masters</i>
Nebulizador	Ranhura em V
Potência de medida (W)	1300
Tempo de integração do sinal (s)	2,0
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Vazão gás de nebulização (L/ min)	0,70
Elementos e comprimentos de onda (nm)	As 188,980; C 193,027; Ca 396,366; Cd 226,502; Co 238,892; Cu 324,754; Cr 267,716; Fe 238,204; K 766,491; Mg 279,553; Mn 257,611; Ni 216,555; Na 589,602; P 213,618; Pb 220,353; Se 196,026; Zn 213, 857; Y <sup>(a)</sup> 371,029

<sup>(a)</sup> elemento utilizado com padrão interno (1,0 mg L<sup>-1</sup>) em todas as análises com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Foi utilizado também um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado modelo X Series 2 (Thermo Scientific). A configuração do instrumento utilizou uma câmara de nebulização Peltier com pérola de impacto, tocha de quartzo de parte única com injetor de 1,5 mm e nebulizador concêntrico. O instrumento foi operado nos modos padrão e

CCT (Collision Cell Technology, célula de colisão que utiliza 8,0% (v/v) H<sub>2</sub> em He como gás da colisão) com comutação automática. Os isótopos estudados foram determinados pelos modos de operação: padrão (Cd e Pb) e CCT (As, Co, Cr, Cu, Ni e Se). Uma solução contendo Sc, Rh, Tl, In, Ge e Bi foi usada como padrão interno para normalização de resultados. As condições operacionais do instrumento são mostradas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros operacionais para as determinações por ICP-MS.

<b>Características e parâmetros</b>	
Potência incidente (W)	1350
Vazão argônio nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	0,87
Vazão argônio plasma (L min <sup>-1</sup> )	13,0
Vazão argônio auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,7
Modo de análise	Peak jump
Sweeps	100
Dwell time	10
Fluxo gás CCT (mL min <sup>-1</sup> )	6,5
Isótopos	<sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>59</sup> Co, <sup>58</sup> Ni, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>80</sup> Se, <sup>111</sup> Cd*, <sup>208</sup> Pb*

\* Isótopos determinados sem CCT.

#### 2.4.3.5 - Determinação da acidez e carbono residual dos digeridos

Para determinar a acidez final, foram feitas titulações ácido-base dos digeridos para os procedimentos propostos. A titulação foi realizada com uma solução padronizada de hidróxido de sódio (0,1077 mol L<sup>-1</sup>) e indicador fenolftaleína (1,0 % m v<sup>-1</sup> em etanol). Os padrões da curva analítica de calibração foram preparados com a mesma concentração ácida para cada procedimento de digestão. O teor de carbono residual foi determinado por ICP OES usando solução de ácido cítrico para o preparo das soluções analíticas de calibração para carbono.

#### 2.4.4 - Procedimentos experimentais

##### 2.4.4.1 - Digestão das amostras em bloco digestor

O procedimento consistiu na pesagem de aproximadamente 5,0 g de amostra seguida da adição de 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado; 4,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e destilado, antes de submetê-las ao aquecimento. As amostras foram aquecidas a uma temperatura máxima de 200 °C, sendo que durante esta etapa as mesmas permaneciam por

30 minutos a cada temperatura programada (100, 150 e 200°C) totalizando assim um tempo médio do procedimento de duas horas e trinta minutos. Ao atingir a temperatura máxima programada foram adicionados 15,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup>, em alíquotas de 1,0 mL. A mistura permaneceu em aquecimento até redução de volume (~ 5 mL). Os digeridos foram aferidos com água ultra-pura até 20,0 mL.

#### 2.4.4.2 - Digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade

Foram pesadas cerca de 500 mg de amostra diretamente nos frascos de PTFE do forno de micro-ondas com cavidade. Antes de iniciar o programa de aquecimento foram adicionados 3,5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 3,5 mL de água ultra-pura, esperando aproximadamente 30 min para que ocorra uma reação prévia e após esta etapa adicionou-se 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v v<sup>-1</sup>. Os frascos foram selados e colocados dentro da cavidade e o programa de aquecimento usado está descrito na Tabela 7. Os digeridos foram aferidos com água ultra-pura até 20,0 mL.

**Tabela 7.** Programa de aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade

<b>Etapa</b>	<b>t (min)</b>	<b>P (W)</b>	<b>T<sub>externa</sub> (°C)</b>
<b>1</b>	5	500	120
<b>2</b>	3	750	120
<b>3</b>	10	1000	210
<b>4</b>	20	1000	210
<b>Ventilação</b>	10	-	-

#### 2.4.4.3 - Extração assistida por ultrassom

Aproximadamente 1,0 g de amostra de leite de coco foram pesadas em tubos de centrífuga em seguida avolumou-se para 20,0 mL com ácido nítrico 4% v v<sup>-1</sup> e esta mistura foi sonicada por 10 min. Após a sonicação a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm e filtrada.

## **2.5 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO COM AQUECIMENTO CONDUTIVO**

A decomposição por via úmida se destaca pela alta eficiência e empregabilidade nos laboratórios de Química Analítica e esta pode ser feita sob aquecimento condutivo à pressão atmosférica em chapa elétrica ou bloco digestor.

A decomposição por via úmida em frascos abertos para a digestão de matéria orgânica é um dos procedimentos mais antigos e utilizados. Nesses sistemas, a temperatura da decomposição está limitada a temperatura de ebulição dos agentes oxidantes utilizados. Há que se considerar que o uso de apenas um ácido muitas vezes pode não ser suficiente para decomposição de algumas substâncias, logo a combinação de dois ou mais ácidos é geralmente utilizada, uma vez que a interação em misturas ácidas podem gerar compostos intermediários instáveis que venham acelerar a decomposição (KRUG, 2008).

A digestão de materiais orgânicos por via úmida é comumente feita com o aquecimento da amostra em um meio ácido mineral oxidante com peróxido de hidrogênio. Assim é possível oxidar completamente a maioria das amostras deixando os elementos em formas inorgânicas simples e fáceis de serem determinadas. Geralmente, o ácido nítrico pode ser utilizado, considerando que este possui um forte poder oxidante. Porém a limitação do uso deste ácido é o seu baixo ponto de ebulição, em torno de 120°C. Para que a digestão ocorra em frascos que operam a pressão atmosférica, recomenda-se a adição de uma alíquota de ácido sulfúrico, que tem ponto de ebulição de 330 °C, aumentando assim a temperatura do meio reacional, possibilitando a decomposição de glóbulos de gordura (KRUG, 2008; KORN *et al.*, 2008).

O aquecimento condutivo, empregando chapa ou bloco digestor, apresenta a vantagem do baixo custo.

### **2.5.1 - Otimização do procedimento de preparo de amostra de leite de coco em bloco digestor**

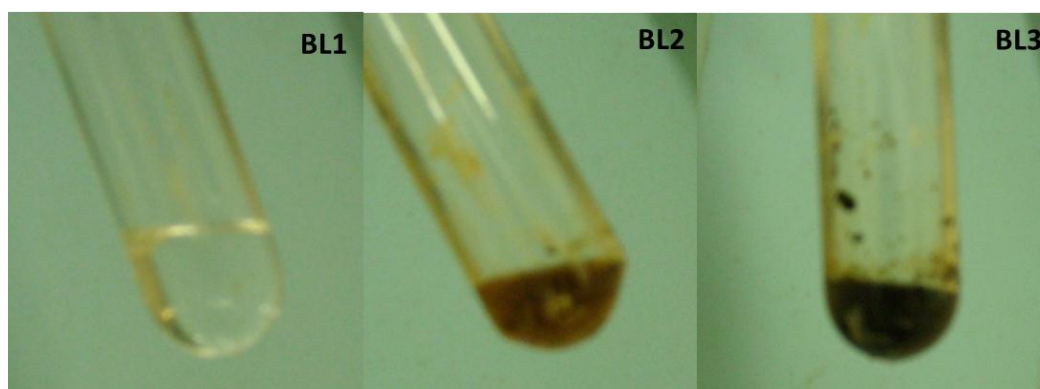
Foram avaliados três procedimentos de digestão em bloco digestor. Para o desenvolvimento dos procedimentos e posteriormente sua otimização foi usada a amostra “SC”.

Os procedimentos investigados utilizaram ácido nítrico e sulfúrico e posterior adição de peróxido de hidrogênio. Cerca de 5 g de amostras foram submetidas ao programa de aquecimento como descrito item 2.4.4.1. Os procedimentos foram codificados por BL1, BL2 e BL3, e diferenciaram entre si pelas quantidades de reagentes usadas. Na Tabela 8 são apresentadas as quantidades de reagentes usadas nos procedimentos de decomposição de 5 g das amostras.

**Tabela 8.** Procedimentos de decomposição de leite de coco avaliados no bloco digestor.

Procedimento	HNO <sub>3</sub> (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)
BL1	4,0	3,0	15,0
BL2	3,0	2,0	10,0
BL3	2,0	2,0	10,0

A eficiência dos procedimentos de decomposição foi avaliada pelo aspecto visual do digerido, teor de carbono residual e acidez residual. A reprovação na avaliação do aspecto visual do digerido desobrigava a avaliação dos parâmetros de eficiência de decomposição. A digestão do leite de coco pelos procedimentos BL2 e BL3 não foi adequada, devido à presença de material fuliginoso em suspensão, enquanto que foram obtidos digeridos límpidos com o procedimento BL1. A Figura 15 o aspecto visual destes digeridos.



**Figura 15.** Aspecto visual dos digeridos obtidos para os procedimentos BL1, BL2 e BL3 no bloco digestor.

Diante do exposto o procedimento BL1 foi adotado como o procedimento no bloco digestor.

## **2.5.2 – Apresentação e discussão dos resultados**

### **2.5.2.1 - Condições experimentais de operação do ICP OES**

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado é uma técnica analítica robusta, porém erros sistemáticos podem comprometer os resultados das análises desenvolvidas por esta técnica. Esses erros podem estar associados a alterações instrumentais como problemas no transporte, nebulização e erros associados às amostras como diferenças entre os padrões e as amostras, principalmente quando associados à viscosidade (PROJAHN *et al.*, 2004) . O método da padronização interna baseia-se na medida da razão de um ou mais sinais analíticos do(s) analito(s) em questão) dividido(s) por um ou mais sinais de referência de elementos previamente selecionados (padrão interno). O objetivo principal do padrão interno é melhorar a exatidão e precisão das medidas analítica (GROTTI *et al.*, 2003).

O padrão interno escolhido deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes às do analito, ser solúvel nas soluções analíticas e amostras e não deve interferir na determinação do analito (PROJAHN *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2003). Estudos feitos relacionando o uso de ítrio como padrão interno indicaram uma diminuição nas concentrações dessas soluções em que o padrão interno não foi adicionado. O uso do padrão interno é essencial nos digeridos que contêm ácido sulfúrico, porque sua alta viscosidade afeta a eficiência no transporte de solução para o plasma, resultando em uma diminuição da intensidade da emissão do analito (SANTOS, 2006; KORN *et al.*, 2010). Deste modo, a todos os digeridos obtidos em meio de ácido sulfúrico foi adicionado ítrio (Y) como padrão interno de modo que a sua concentração final fosse de 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

As linhas espectrais (Tabela 5) foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e do sinal de fundo, o desvio padrão das medidas e a sensibilidade adequada para a determinação de elementos presentes em altas e baixas concentrações nas amostras.

### **2.5.2.2 – Efeito do tempo de integração do sinal nas determinações por ICP OES**

Aumentando-se o tempo de integração do sinal espera-se um aumento na sensibilidade. Três tempos de integração do sinal (1, 2 e 3 s) foram investigados objetivando avaliar a influência desta variável sobre o desempenho do equipamento empregado neste trabalho. Para tal estudo foi utilizada uma curva analítica para As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e Zn em meio de ácido sulfúrico 3,0 mol L<sup>-1</sup>. Na Tabela 9 estão os coeficientes angulares para estes analitos nos tempos avaliados no presente trabalho.



**Tabela 9.** Coeficientes angulares em função do tempo de integração na determinação por ICP OES.

Tempo de integração	1s		2s		3s	
	a	R <sup>2</sup>	a	R <sup>2</sup>	a	R <sup>2</sup>
<b>As</b>	391	0,9996	401	0,9998	352	1,000
<b>Cd</b>	32722	1,000	33660	1,000	29435	1,000
<b>Co</b>	7131	0,9998	7255	0,9998	6479	0,9998
<b>Cr</b>	3737	1,000	3933	0,9999	3749	1,000
<b>Cu</b>	18315	1,000	19049	0,9999	16676	1,000
<b>Fe</b>	22177	0,9999	22642	1,000	19826	1,000
<b>Ni</b>	4136	1,000	4273	0,9999	3765	1,000
<b>Mn</b>	88387	1,000	90418	1,000	79467	1,000
<b>Pb</b>	887	0,9985	1028	0,9986	821	0,9965
<b>Se</b>	361	0,9993	378	0,9998	332	0,9999
<b>Zn</b>	18315	1,000	19049	0,9999	16676	1,000

Pode-se observar que as inclinações das curvas apresentam a seguinte ordem decrescente na sensibilidade com a variação do tempo de integração do sinal: 2s>1s>3s. Porém não foi verificada diferença significativa para a sensibilidade a 95% de confiança, o que implica também dizer que não houve mudança significativa para o sinal dos elementos. Apenas a linha mais sensível foi apresentada, no entanto o comportamento é análogo para as demais linhas. Apesar de não ter havido diferença significativa para a sensibilidade e os sinais optou-se por usar o tempo de integração de 2 s, pois este foi o que apresentou menor coeficiente de variância. Os coeficientes de variância obtidos foram nas faixas de 3,0 a 7,0 para 1s; 2,7 a 4,1 para 2s e 3,4 a 6,5 para 3s de integração. Arsênio, Cd, Co, Cr, Pb e Se estavam abaixo do limite de quantificação.

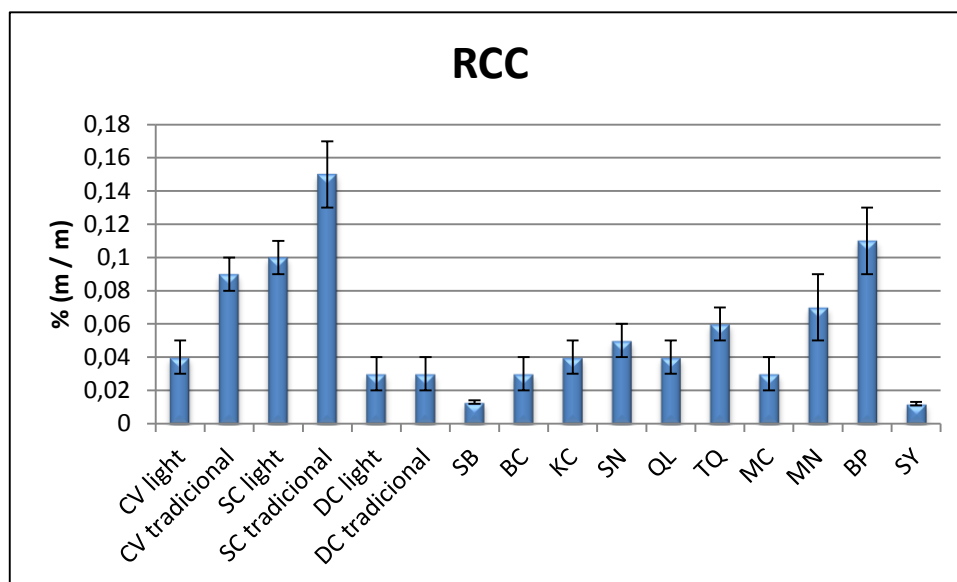
Um estudo semelhante foi desenvolvido por Gonzalez *et al.*( 2010), em que na construção de espectrômetro de emissão atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio verificou-se quatro tempos de integração do sinal: 100, 200, 300 e 500 ms para determinação de cálcio. Com esse estudo foi possível observar que para 100 ms a intensidade do sinal de emissão para Ca foi inferior aos demais tempos de integração e, que a intensidade do sinal de emissão foi duplicada para tempo de integração de 200 ms e diminuiu para tempos superiores de integração.

### 2.5.2.3 - Avaliação da eficiência dos procedimentos de digestão

A eficiência do processo de digestão realizado no bloco digestor foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual (RCC) e da acidez residual.

Nos procedimentos onde se utiliza ácidos minerais inorgânicos, estes devem ser oxidantes o suficiente para destruir a matéria orgânica das amostras deixando os analitos disponíveis em solução representativa, e essa etapa pode ser demorada e complexa utilizando um grande volume de ácido. A digestão consiste basicamente na eliminação do carbono sob a forma de  $\text{CO}_2$  quebrando a cadeia carbônica. O teor de carbono residual é um importante parâmetro para a avaliação da eficiência de um procedimento de digestão ácida para a digestão de matéria orgânica, pois a depender do procedimento a ser seguido, a oxidação não é completa, ou até mesmo alguns compostos orgânicos que sejam estáveis ou se formem, podem ainda estar presentes nos digeridos (GOUVEIA *et al.*, 2001; NÓBREGA *et al.*, 2001; KRUSHEVSKA *et al.*, 1992).

Para determinação do teor de carbono residual normalmente usa-se soluções de uréia como padrão, pois se trata de um composto alifático (GOUVEIA *et al.*, 2001), no entanto, a uréia pode ser substituída pelo ácido cítrico (FLORES *et al.*, 2008). Após a digestão das amostras o teor de carbono residual foi determinado por ICP OES e os resultados estão na Figura 16.



**Figura 16.** Valores médios ( $n = 3$ ) de RCC obtidos nos procedimentos de digestão de leite de coco em bloco digestor.

O estabelecimento de uma metodologia adequada para a determinação de carbono residual é fundamental para a investigação de um procedimento para digestão de amostras que contenham alto teor de matéria orgânica. O percentual médio de carbono residual nas amostras de leite de coco investigadas foi de  $0,06 \pm 0,04\%$  m m<sup>-1</sup>, deste modo, o procedimento investigado mostrou-se eficiente para a decomposição da amostra avaliada, considerando os baixos valores obtidos para o teor de carbono residual.

A acidez residual titulada (digerido após diluição para 20,0 mL com água ultrapura) para a digestão em bloco foi, em média, de  $2,59 \pm 0,04$  mol L<sup>-1</sup>. A acidez final também foi determinada antes da aferição e a média para esta foi  $11,64 \pm 0,45$  mol L<sup>-1</sup>.

Digeridos com baixa acidez residual são recomendáveis para determinações elementares empregando técnicas espectrométricas, tendo como consequência ganho no poder de detecção, uma vez que não se faz necessária uma diluição adicional das amostras. Para a técnica ICP OES é aconselhável a introdução de soluções com acidez menor que 10% v v<sup>-1</sup>, principalmente quando se trabalha com equipamentos com visão axial. Vale salientar que soluções com acidez residual elevada podem danificar os componentes do equipamento, como por exemplo, o sistema de introdução de amostras. Além disso, soluções com diferentes viscosidade e tensão superficial, levam às mudanças nas taxas de aspiração e nebulização, enquanto a densidade e volatilidade afetam o transporte do aerossol através da câmara de nebulização (TODOLÍ e MERMET, 1999). Pode-se inferir que a acidez residual para os digeridos em bloco digestor, está expressa em termos de ácido sulfúrico, pois praticamente quase todo ácido nítrico adicionado já não está mais presente em solução, uma vez que este procedimento atingiu temperaturas acima de 200 °C.

#### **2.5.2.4 - Validação do procedimento proposto empregando aquecimento condutivo**

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, exatidão e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), validação consiste em se confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT NBR ISO, 2005). As principais características de desempenho de um método analítico incluem: seletividade e especificidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão. Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio.

#### 2.5.2.4.1 – Avaliação do efeito de matriz

Um dos erros mais frequente de um método é o devido aos efeitos de matriz. Os resultados analíticos podem ser influenciados pela composição da matriz determinações empregando ICP OES (TODOLÍ *et al.*, 2002). Os componentes da matriz podem modificar as características térmicas do plasma e a distribuição espacial das espécies emitidas. Os efeitos físicos mais importantes estão relacionados às propriedades como densidade, viscosidade, tensão superficial e volatilidade da matriz.

Os efeitos de matriz causados por concomitantes podem ser identificados de acordo com as variações no processo de nebulização; no transporte do aerossol, e na excitação do analito (TODOLÍ e MERMET, 1999; PAREDES *et al.*, 2006). O teste de efeito da matriz pode ser realizado aplicando a técnica de adição de analito, também chamada de adição padrão, para uma solução teste derivada do material típico investigado (THOMPSON, 2002). A avaliação é feita por comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas usuais e os coeficientes das curvas de adição de analito empregando testes estatísticos (VOGEL, 2002).

A investigação do efeito da matriz resultante do procedimento de digestão sobre o sinal dos analitos foi realizada para as determinações por ICP OES. Avaliou-se a influência dos digeridos da matriz digerida de leite de coco sobre o sinal dos elementos As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn. A comparação das inclinações obtidas com as curvas analíticas usuais e as curvas que usam a adição do analito (Tabela 10) não indicou nenhuma diferença significativa, a 95% de confiança; o que implica que a determinação dos constituintes em amostras de leite de coco pode ser realizada com curvas analíticas de calibração preparadas em meio do ácido sulfúrico diluído.

**Tabela 10.** Comparação dos dados de regressão usando soluções padrão em ácido sulfúrico e no digerido da matriz empregando-se ICP OES axial.

Elemento	Curva em meio de ácido sulfúrico diluído		Adição de analitos na solução da matriz	
	Equações	r <sup>2</sup>	Equações	r <sup>2</sup>
<b>As</b>	y = 344x + 23	0,9992	y = 341x + 27	0,9993
<b>Cd</b>	y = 28569x + 100	0,9993	y = 27470x + 158	1,000
<b>Co</b>	y = 6582x - 147	0,9992	y = 6530x - 126	0,9991
<b>Cr</b>	y = 3468x - 13	0,9993	y = 3231x - 20	0,9993
<b>Cu</b>	y = 11796x + 507	0,9998	y = 11246x + 3870	0,9996
<b>Fe</b>	y = 20330x + 1382	0,9995	y = 19832x + 17329	0,9994
<b>Mn</b>	y = 15478x + 181	0,9994	y = 15112x + 11240	0,9999
<b>Ni</b>	y = 3295x + 4	0,9992	y = 3436x + 234	0,9998
<b>Pb</b>	y = 771x + 72	0,9997	y = 779x + 81	0,9993
<b>Se</b>	y = 300x + 40	0,9998	y = 319x + 33	0,9993
<b>Zn</b>	y = 15603x - 364	0,9995	y = 15735x + 10860	0,9996

#### 2.5.2.4.2 – Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração de substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida (ABNT, 2005).

Foram obtidas as estimativas dos limites de detecção considerando o desvio padrão das intensidades de 10 ensaios do branco analítico. Os valores dos LOD e LOQ, expressos em mg L<sup>-1</sup> e em µg g<sup>-1</sup>, referentes o procedimento empregando bloco digestor para os elementos determinados estão na Tabela 11.

**Tabela 11.** Limite de detecção e quantificação para a determinação dos analitos após digestão em bloco digestor.

<b>Analitos</b>	<b>LOD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (µg g<sup>-1</sup>)</b>
<b>As</b>	0,037	0,123	0,147	0,491
<b>Ca</b>	0,065	0,215	0,258	0,858
<b>Cd</b>	0,010	0,033	0,040	0,132
<b>Co</b>	0,015	0,050	0,061	0,200
<b>Cu</b>	0,011	0,036	0,043	0,145
<b>Cr</b>	0,014	0,046	0,055	0,184
<b>Fe</b>	0,053	0,177	0,212	0,706
<b>K</b>	0,049	0,164	0,197	0,656
<b>Mg</b>	0,013	0,043	0,051	0,170
<b>Mn</b>	0,010	0,033	0,039	0,130
<b>Na</b>	0,017	0,057	0,068	0,226
<b>Ni</b>	0,013	0,044	0,052	0,175
<b>P</b>	0,086	0,286	0,342	1,142
<b>Pb</b>	0,021	0,069	0,082	0,274
<b>Se</b>	0,043	0,143	0,172	0,573
<b>Zn</b>	0,015	0,051	0,061	0,205

#### **2.5.2.4.3 – Faixa linear de trabalho**

A faixa linear de trabalho para os elementos As, Cd, Cu, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn considerando detecção por ICP OES correspondeu a 0,1 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Para os macroelementos correspondeu a 0,5 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> para K, Mg, Na e P; 0,5 a 30,0 mg L<sup>-1</sup> para Ca e 250 a 2000 mg L<sup>-1</sup> para carbono.

#### **2.5.2.4.4 – Precisão**

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, realizando-se dez ensaios dos procedimentos propostos para a digestão de leite de coco. A amostra SC foi empregada nestes ensaios. No procedimento de digestão em bloco a estimativa do coeficiente de variância (CV) para macroelementos variou entre 1,3 e 2,2 %, para os microelementos esta variação foi entre 1,3 a 3,2%.

Os resultados indicam que, a precisão do procedimento de digestão em bloco aplicado à determinação de macro e microelementos em leite de coco por ICP OES apresentam CV baixos.

#### 2.5.2.4.5 – Exatidão

Define-se exatidão do método como sendo o grau de concordância entre o resultado de uma ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificado, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2006).

Devido à falta de material de referência certificado de leite de coco a exatidão do procedimento em bloco digestor nas condições otimizadas foi verificada com materiais de referência certificados de leite bovino integral e desnatado SRM NIST 8435 e 1549, respectivamente. Amostras do CRM foram tratadas com o procedimento proposto em bloco digestor. As concentrações médias dos analitos são mostradas na Tabela 12. O teste t pareado, ao nível de 95% de confiança, foi aplicado para comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos. O teste estatístico revelou não haver diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as médias de micro e macroelementos.

**Tabela 12.** Determinação da composição dos materiais de referência certificados NIST SRM 8435 e NIST SRM 1549 por ICP OES após digestão em bloco digestor (média  $\pm$  IC, n=3).

Elementos	NIST SRM 8435		NIST SRM 1549	
	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido
<b>Ca (%)</b>	0,922 $\pm$ 0,049	0,947 $\pm$ 0,096	1,300 $\pm$ 0,050	1,302 $\pm$ 0,002
<b>K (%)</b>	1,363 $\pm$ 0,047	1,393 $\pm$ 0,012	1,69 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,02
<b>Mg (%)</b>	0,0814 $\pm$ 0,0076	0,0813 $\pm$ 0,0004	0,120 $\pm$ 0,003	0,119 $\pm$ 0,002
<b>Na (%)</b>	0,356 $\pm$ 0,040	0,386 $\pm$ 0,011	0,497 $\pm$ 0,01	0,519 $\pm$ 0,04
<b>P (%)</b>	0,780 $\pm$ 0,049	0,814 $\pm$ 0,062	1,06 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,007
<b>Cu (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	0,46 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,05
<b>Fe (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	1,80 $\pm$ 1,10	1,73 $\pm$ 0,05	1,78 $\pm$ 0,10	1,62 $\pm$ 0,64
<b>Mn (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	0,17 $\pm$ 0,05	< 0,13	0,26 $\pm$ 0,01	< 0,13
<b>Zn (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	28,0 $\pm$ 3,1	27,0 $\pm$ 1,3	46,1 $\pm$ 2,2	42,5 $\pm$ 1,3

A exatidão do procedimento também foi avaliada pelo teste de adição e recuperação do analito para a estimativa de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas

dos mesmos, em quatro níveis de concentração: 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para determinação por ICP OES de forma a abranger a faixa de concentração dos analitos na matriz.

**Tabela 13.** Teste de adição e recuperação em quatro níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES (n=3).

Elemento	Níveis de concentração mg L <sup>-1</sup>			
	0,5	1,0	2,0	5,0
Recuperação %				
As	97 ± 1	97 ± 2	102 ± 1	103 ± 1
Cd	105 ± 1	105 ± 1	102 ± 1	101 ± 1
Co	100 ± 1	102 ± 1	98 ± 1	98 ± 1
Cr	102 ± 1	103 ± 1	100 ± 1	99 ± 1
Cu	104 ± 1	103 ± 1	92 ± 1	93 ± 1
Fe	103 ± 2	108 ± 2	109 ± 1	103 ± 2
Mn	103 ± 2	104 ± 1	96 ± 1	97 ± 2
Ni	104 ± 1	105 ± 1	98 ± 1	98 ± 2
Pb	99 ± 1	100 ± 2	103 ± 3	99 ± 3
Se	102 ± 1	99 ± 5	96 ± 3	98 ± 1
Zn	106 ± 1	107 ± 2	108 ± 1	105 ± 2

Os valores obtidos para o percentual de recuperação nos quatro níveis de concentração para as determinações por ICP OES estão mostrados na Tabela 13. Pode-se constatar a alta eficiência do procedimento, considerando que foram obtidos percentuais de recuperação na faixa de 92 a 108%.

#### 2.5.2.5 – Aplicação do procedimento com aquecimento condutivo em bloco digestor

Uma vez validada a metodologia proposta, partiu-se então para a aplicação analítica nas amostras de leite de coco comercializadas na cidade de Salvador, Bahia. Antes, porém, foram feitos estudos preliminares de estabilidade da amostra.



#### **2.5.2.5.1 – Avaliação da estabilidade da amostra de leite de coco**

Os alimentos perecíveis são aqueles que devem ser mantidos em condições especiais de temperatura para a sua conservação, pois pode ocorrer o desenvolvimento de germes se não forem guardados na temperatura recomendada pelo fabricante (ANVISA). Apesar dos aditivos presentes no leite de coco, este se encaixa na categoria de perecível. Os fabricantes recomendam que a embalagem depois de aberta seja mantida sob refrigeração e que o conteúdo seja consumido em até sete dias.

É de suma importância levar em consideração que o objetivo deste estudo é apenas avaliar a estabilidade da amostra na otimização do procedimento proposto, uma vez que a amostra refrigerada tem sua consistência alterada e que estes dois fatores, temperatura e viscosidade, podem afetar os resultados. Durante este período não houve mudança aparente no aspecto visual do leite de coco, porém é importante destacar que apenas a avaliação visual não é suficiente para concluir que este alimento, mantido sem refrigeração após abertura da embalagem, possa ser consumido sem que ofereça algum risco à saúde humana. Um segundo objetivo deste estudo é avaliar se há variação na composição elementar entre as amostras de diferentes lotes.

Foram adquiridas três amostras de lotes diferentes da marca “SC”. Após abertas, as embalagens foram mantidas a temperatura ambiente por 10 dias. Os três lotes, denominados de A, B e C, tinham datas de fabricação distanciando em média de 30 dias. A data de fabricação mais antiga é a amostra do lote A.

As amostras foram submetidas ao procedimento de digestão empregando bloco digestor, descrito no item 2.4.4.1, no 1º, 2º, 3º, 4º e 10º dias após a sua abertura e os constituintes nutricionais Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn foram determinados por ICP OES. O resultado está na Figura 17.

De posse dos dados aplicou-se a análise de variância (ANOVA) fator único com um nível de 5%, para avaliar uma possível diferença significativa das concentrações dos analitos nos diferentes dias de análise para um mesmo lote e em um mesmo dia para os diferentes lotes.

De acordo com a ANOVA, para um mesmo lote não foi observada diferença significativa entre os cinco dias diferentes para todos os analitos, exceto para Fe, nos três lotes analisados, a 95% de confiança. A Tabela 14 a seguir mostra o resultado para os testes estatísticos comparando a concentração dos elementos para um mesmo dia entre os três lotes.

**Tabela 14.** Resultados da ANOVA fator único para os diferentes lotes de leite de coco.

Variável	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
Ca	34,47	5,13. 10 <sup>-4</sup>	5,14
Cu	9,54	0,0137	5,14
Fe	0,52	0,624	5,14
K	2,73	0,158	5,14
Mg	36,19	1,06. 10 <sup>-3</sup>	5,14
Mn	28,13	0,0019	5,14
Na	15,40	0,0132	5,14
P	18,91	0,0046	5,14
Zn	44,04	2,59. 10 <sup>-4</sup>	5,14

Através da decomposição das variâncias, é possível se constatar que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  para todos os elementos, exceto Fe e K, é maior que o valor de  $F_{\text{crítico}}$ , assim como o p-valor foi inferior a 0,05, indicando que existe diferença significativa para a concentração destes elementos para as diferentes amostras analisadas. Estes resultados podem corroborar com informação que diz que a composição da água de coco e da polpa depende de fatores como a variedade da palmeira, grau de maturação e natureza do solo no qual o fruto cresceu (SANTOSO *et al.*, 1996).

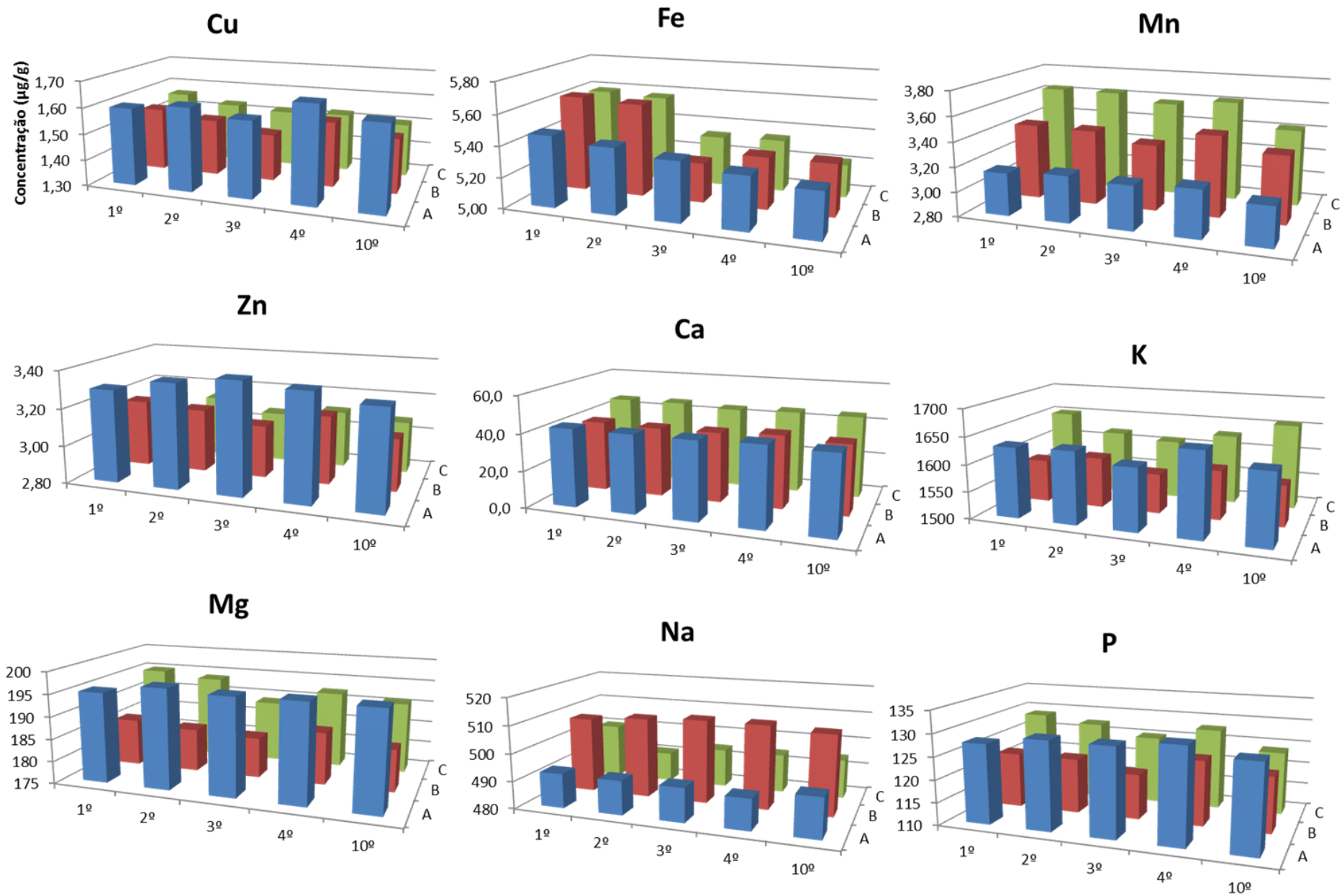


Figura 17. Concentração média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos analitos para os três lotes avaliados em função dos dias de análise ( $n=3$ ).

### 2.5.2.5.2 – Aplicação do procedimento em amostras de leite de coco

Para aplicação do procedimento de decomposição proposto empregando bloco digestor, foram utilizadas 15 amostras de leite de coco. Os digeridos foram diluídos com água ultrapura em frascos volumétricos até 20,0 mL e aplicada correção por padrão interno com ítrio para a determinação de macro, micro e elementos traço. Os resultados estão na Tabela 15 bem como as faixas de concentração para todas as amostras.

O valor nutritivo do coco varia de acordo com seu estado de maturação, apresentando de maneira geral bom teor de sais minerais, como por exemplo, K, Na e P. O elemento predominante em todas as amostras foi o K, seguido de Na, P, Mg e Ca. Segundo a literatura, as concentrações de K nos alimentos vegetais são muito mais elevados do que de Na (BRODY, 1999).

O leite de coco industrializado se encaixa na categoria de alimentos com baixo teor de Na (< 200mg/100g). Na etapa de produção do leite de coco é permitido o uso de conservadores, espessantes, acidulantes, estabilizantes e antioxidantes de acordo com a legislação federal específica. Porém, há que se considerar que o teor de sódio neste alimento pode ser proveniente dos aditivos a base de sódio permitidos que são, de acordo com o rótulo de alguns fornecedores, o espessante, carboximetilcelulose sódica; os conservantes benzoato de sódio e metabissulfito de sódio. Atualmente, tais substâncias vêm sendo cada vez mais utilizadas pela indústria alimentícia, uma vez que é crescente a demanda por alimentos quimicamente estáveis e seguros, de maior durabilidade. A amostra SN apresentou um teor de sódio cerca de duas vezes maior que a média das demais amostras.

Para avaliar a origem do teor de sódio, duas amostras de leite de coco (A e B) obtidas a partir do coco seco, foram processadas de maneira artesanal. O teor de sódio obtido foi pelo menos cinco vezes inferior comparado às amostras industrializadas. As concentrações médias dos demais analitos estão expressas, juntamente com as outras amostras, na Tabela 15.

Foi possível observar que há uma pequena diferença na composição inorgânica de uma amostra tradicional para light. Isto pode ser creditado ao fato de não se tratar de amostra de um mesmo lote e, alimentos light são aqueles que apresentam a quantidade de algum nutriente ou valor energético reduzido quando comparado a um alimento convencional. São definidos os teores de cada nutriente e ou valor energético para que o alimento seja considerado light (ANVISA).

A determinação de Pb e Cd em amostras de alimentos é difícil devido a fatores como baixa concentração e efeito de matriz (OYMAK *et al.*, 2009). Dentre os elementos As, Cd, Co, Cr, Ni, Pb e Se, só foi possível quantificar Ni em algumas amostras e, a sua concentração estava na faixa de 0,20 a 0,23  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Considerando a temperatura máxima

adotada no procedimento propostos, perdas por volatilização são esperadas para elementos voláteis. Como mencionado por Sturgeon e Mester (2002) perdas de elementos voláteis estão relacionadas com a complexidade da amostra, por exemplo, o tipo de ligação entre os compostos de matriz e elementos. Para este estudo em especial não houve perda por volatilização, uma vez que foi possível obter boas faixas de recuperação ao fazer o teste de adição.

Santoso *et al.* (1996) avaliaram o teor de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de coco verdes e maduros e em outra espécie amplamente consumida na Indonésia. O teor de todos os analitos variou em função do estágio de maturação, e faixa de concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) foi (300 a 2900) Ca; (6,19- 36,2) Cu; (25,6 - 43,6) Fe; (6800 - 44700) K; (1200 - 4300) Mg; (16,4 - 42,9) Mn; (200 - 1000) Na; (1800 - 3900) P e (17,5 - 36,5) Zn . Os autores relatam que essencialmente, a composição da água de coco ou da carne varia, dependendo de fatores como a variedade do coqueiro (palma), grau de maturidade e da natureza do solo sobre o qual o de coco é cultivado.

A composição química de oleaginosas, dentre elas o coco, foi avaliada por Rodushkin *et al.*, (2008). A concentração média, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para cada elemento determinado foi de 80 para Ca; 11 para Cu; 31 para Fe; 9300 para K; 1550 para Mg; 30 para Mn; 380 para Na; 0,25 para Ni; 1900 para P e 18 para Zn.

Os resultados desses dois estudos são compatíveis entre si e, mostram mais uma vez que o potássio é o elemento majoritário no coco. No entanto, para as amostras de leite de coco do presente estudo, os resultados foram inferiores, o que era de se esperar uma vez que o coco é prensado para retirar o sumo e a fibra (bagaço) é destinada à fabricação de outro produto.

**Tabela 15.** Concentração, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Amostras	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
<b>BC</b>	90,5 $\pm$ 1,6	0,25 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,07	463 $\pm$ 7	43,8 $\pm$ 0,8	0,64 $\pm$ 0,02	365 $\pm$ 4	116 $\pm$ 2	0,41 $\pm$ 0,01
<b>BP</b>	45,3 $\pm$ 2,9	1,64 $\pm$ 0,01	4,23 $\pm$ 0,10	1655 $\pm$ 14	213 $\pm$ 2	1,83 $\pm$ 0,02	528 $\pm$ 1	353 $\pm$ 10	2,22 $\pm$ 0,04
<b>CV<sub>L</sub></b>	61,4 $\pm$ 0,14	0,691 $\pm$ 0,004	1,88 $\pm$ 0,03	738 $\pm$ 16	87,1 $\pm$ 1,9	1,278 $\pm$ 0,003	572 $\pm$ 28	340 $\pm$ 8	0,55 $\pm$ 0,06
<b>DC<sub>L</sub></b>	10,11 $\pm$ 1,50	0,52 $\pm$ 0,08	2,14 $\pm$ 0,28	551 $\pm$ 9	77,2 $\pm$ 0,8	1,20 $\pm$ 0,04	387 $\pm$ 9	96 $\pm$ 1	0,99 $\pm$ 0,13
<b>DC<sub>T</sub></b>	20,4 $\pm$ 0,31	0,99 $\pm$ 0,02	3,13 $\pm$ 0,10	932 $\pm$ 11	130 $\pm$ 2	2,60 $\pm$ 0,03	365 $\pm$ 4	208 $\pm$ 6	0,93 $\pm$ 0,01
<b>KC</b>	15,6 $\pm$ 0,6	0,15 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,04	105 $\pm$ 2	25,6 $\pm$ 1,2	0,35 $\pm$ 0,02	326 $\pm$ 7	125 $\pm$ 1	0,37 $\pm$ 0,02
<b>MN</b>	9,46 $\pm$ 0,34	0,309 $\pm$ 0,007	1,669 $\pm$ 0,006	335 $\pm$ 5	40,0 $\pm$ 1,0	0,84 $\pm$ 0,01	427 $\pm$ 6	187 $\pm$ 5	0,68 $\pm$ 0,02
<b>QL</b>	44,5 $\pm$ 0,35	0,97 $\pm$ 0,02	5,70 $\pm$ 0,10	1540 $\pm$ 27	199 $\pm$ 2	2,60 $\pm$ 0,03	484 $\pm$ 8	332 $\pm$ 3	2,99 $\pm$ 0,10
<b>SB</b>	14,0 $\pm$ 1,1	0,60 $\pm$ 0,04	1,40 $\pm$ 0,22	418 $\pm$ 11	76,6 $\pm$ 3,8	1,14 $\pm$ 0,07	376 $\pm$ 18	276 $\pm$ 11	1,16 $\pm$ 0,07
<b>SC<sub>L</sub></b>	53,9 $\pm$ 0,7	0,84 $\pm$ 0,03	3,07 $\pm$ 0,13	1141 $\pm$ 43	126 $\pm$ 4	1,67 $\pm$ 0,02	507 $\pm$ 11	189 $\pm$ 2	1,80 $\pm$ 0,03
<b>SC<sub>L</sub></b>	53,1 $\pm$ 2,0	0,94 $\pm$ 0,01	3,20 $\pm$ 0,19	1067 $\pm$ 52	121 $\pm$ 4	1,63 $\pm$ 0,02	468 $\pm$ 14	180 $\pm$ 6	1,75 $\pm$ 0,04
<b>SC<sub>T</sub></b>	44,6 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,01	4,88 $\pm$ 0,18	1789 $\pm$ 1	199 $\pm$ 1	3,239 $\pm$ 0,019	489 $\pm$ 3	209 $\pm$ 2	3,091 $\pm$ 0,004
<b>SC<sub>T</sub></b>	50,3 $\pm$ 0,9	1,57 $\pm$ 0,01	4,90 $\pm$ 0,03	1970 $\pm$ 35	199 $\pm$ 3	3,14 $\pm$ 0,02	669 $\pm$ 6	226 $\pm$ 1	2,59 $\pm$ 0,04
<b>SN</b>	88,9 $\pm$ 0,4	0,448 $\pm$ 0,002	1,49 $\pm$ 0,04	654 $\pm$ 5	67,3 $\pm$ 3,0	0,754 $\pm$ 0,003	1186 $\pm$ 17	144 $\pm$ 2	1,075 $\pm$ 0,006
<b>SY</b>	107 $\pm$ 1	0,59 $\pm$ 0,02	3,00 $\pm$ 0,12	874 $\pm$ 1	84,1 $\pm$ 0,6	1,48 $\pm$ 0,02	378 $\pm$ 1	287 $\pm$ 2	1,31 $\pm$ 0,02
<b>TQ</b>	57,1 $\pm$ 0,5	0,96 $\pm$ 0,01	3,84 $\pm$ 0,18	1237 $\pm$ 14	106 $\pm$ 1	1,86 $\pm$ 0,01	563 $\pm$ 6	193 $\pm$ 2	2,07 $\pm$ 0,01
<b>A</b>	30,8 $\pm$ 1,4	1,37 $\pm$ 0,04	4,05 $\pm$ 0,09	1183 $\pm$ 57	167 $\pm$ 7	1,64 $\pm$ 0,04	59,3 $\pm$ 1,4	262 $\pm$ 18	1,87 $\pm$ 0,05
<b>B</b>	17,6 $\pm$ 0,2	1,45 $\pm$ 0,04	5,77 $\pm$ 0,24	968 $\pm$ 8	261 $\pm$ 9	4,43 $\pm$ 0,09	172 $\pm$ 2	300 $\pm$ 1	2,89 $\pm$ 0,07
<b>FAIXA</b>	9,46 - 107	0,15 - 1,45	0,91 - 5,77	105 - 1970	25,6 - 261	0,35 - 3,24	59,3 - 1186	96 - 353	0,37 - 3,09

Os índices L e T significam *light* e tradicional respectivamente

De acordo com Tabela TACO (2011) a composição química média do leite de coco industrializado por 100 g de parte comestível é 6,0 mg para Ca; 0,16 mg para Cu, 0,5 mg para Fe; 144 mg para K; 17,0 mg para Mg; 0,24 mg para Mn; 44,0 mg para Na; 26,0 mg para P e 0,3 mg para Zn. Com os resultados obtidos constata-se que há uma variação grande na composição química entre as amostras, sendo que, de um modo geral, amostra SC é que apresenta maior teor dos elementos, seguida da amostra BP e as amostras MN e KC apresentaram os menores teores para a maioria dos analitos. Entretanto, a média da concentração de todas as amostras está de acordo com os dados desta tabela.

#### **2.5.2.6 – Avaliação de procedimento alternativo usando aquecimento em bloco digestor e ozônio como agente oxidante auxiliar**

O ozônio pode ser empregado como agente oxidante auxiliar em procedimentos de preparo de amostra, apresentando-se como uma alternativa, ao uso do peróxido de hidrogênio. Porém é um agente oxidante ainda pouco empregado na decomposição de amostra, apesar de seu poder oxidante, de ser rapidamente obtido e com elevado nível de pureza e ser ambientalmente amigável (SANTOS, 2009). O objetivo deste procedimento alternativo foi avaliar o efeito da ozonização na decomposição ácida das amostras leite de coco com aquecimento condutivo em bloco digestor. Este procedimento foi testado nas amostras SC<sub>T</sub> e SC<sub>L</sub>.

O procedimento BL2 com as quantidades de reagentes (Tabela 8) foi retomado, sendo que antes de submeter a amostra ao procedimento de aquecimento, como descrito no item 2.4.4.2 deste capítulo, eram ozonizadas pela passagem de ar por um ozonizador Hailea HLO-100, cujo fluxo era endereçado diretamente a 50 mL da amostra durante 1 h.

Com este procedimento alternativo foi possível obter digeridos límpidos, ao contrário do que foi apresentado na Figura 12. O teor dos analitos desta amostra foi comparado àqueles obtidos pelo BL1. Os resultados estão mostrados na Tabela 16.

Estes resultados demonstraram efeitos benéficos da inclusão de etapa preliminar de ozonização para a decomposição da amostra, visto que os procedimentos BL1 e BL2 diferiam apenas pela ocorrência dessa etapa. Por outro lado, o consumo de reagentes para BL1 foi significativamente maior que para BL2. Os teores de carbono e acidez residual para BL1 foram, respectivamente, de  $0,105 \pm 0,009$  % e  $3,30 \text{ mol L}^{-1}$ ; enquanto que para BL2 esses foram de  $0,088 \pm 0,009$  % e  $1,85 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados não diferiram de forma significativa a 95% de confiança.

**Tabela 16.** Concentração em  $\mu\text{g g}^{-1}$  para amostras de leite de coco decompostas pelos procedimentos BL1 e BL2 (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

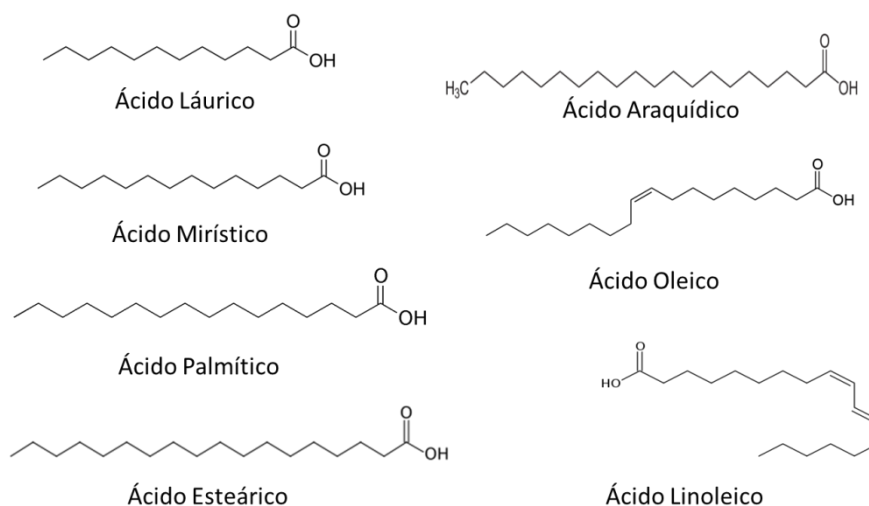
Elementos	SC <sub>T</sub>		SC <sub>L</sub>	
	BL1	BL2	BL1	BL2
	(com ozônio)		(com ozônio)	
<b>Ca</b>	56,8 $\pm$ 5,4	58,4 $\pm$ 1,0	53,9 $\pm$ 0,7	53,6 $\pm$ 1,4
<b>K</b>	1098 $\pm$ 51	1053 $\pm$ 25	1141 $\pm$ 143	1058 $\pm$ 24
<b>Mg</b>	129 $\pm$ 2	122 $\pm$ 8	126 $\pm$ 4	120 $\pm$ 3
<b>Na</b>	525 $\pm$ 24	543 $\pm$ 10	507 $\pm$ 11	510 $\pm$ 15
<b>P</b>	202 $\pm$ 5	199 $\pm$ 4	189 $\pm$ 2	186 $\pm$ 2
<b>Cu</b>	0,89 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,03
<b>Fe</b>	3,29 $\pm$ 0,10	3,48 $\pm$ 0,30	3,12 $\pm$ 0,19	3,07 $\pm$ 0,13
<b>Mn</b>	1,80 $\pm$ 0,02	1,83 $\pm$ 0,03	1,64 $\pm$ 0,02	1,67 $\pm$ 0,02
<b>Zn</b>	1,92 $\pm$ 0,01	1,95 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,03	1,83 $\pm$ 0,06

Entretanto este procedimento não pode ser validado devido às dificuldades relacionadas à repetibilidade. Os digeridos obtidos em estudos posteriores apresentaram, ao final do procedimento, material fuliginoso e aglomerados de gorduras, ou durante a digestão foi verificada projeção das amostras, o que inviabilizou a continuidade desta investigação. Estudos complementares estão em andamento de forma a se obter uma condição adequada para este procedimento.

Espera-se que a oxidação de compostos orgânicos com oxidantes como o ozônio gere espécies mais facilmente biodegradáveis. O ozônio reage de forma direta com moléculas orgânicas ou inorgânicas por adição eletrofílica. O ataque eletrofílico pode acontecer a átomos com uma densidade de carga negativa ou a ligações duplas ou triplas do tipo C-C, C-N, N-N (CHIANG, 2006).

De acordo com a Tabela TACO (2011), a cada 100 g de leite coco contém 13,09 g de ácidos graxos saturados e 1,09 g de insaturados, ou seja, cerca de 1% dessa matriz é constituída por compostos insaturados os quais o ozônio poderia estar atacando. A Figura 18 traz a estrutura química dos ácidos graxos presentes no leite de coco.





**Figura 18.** Estrutura química dos ácidos graxos presentes no leite de coco.

Com o uso do ozônio como agente oxidante auxiliar previamente antes de submeter às amostras aos procedimentos de decomposição não é esperado que o teor de matéria orgânica diminua, no entanto, espera-se que grandes cadeias carbônicas sejam convertidas em espécies de menor cadeia, sendo assim, mais susceptíveis ao ataque ácido.

### 2.5.3 - Considerações Finais

O procedimento para digestão por via úmida em bloco digestor de amostras de leite de coco apresentou desempenho adequado, considerando o baixo teor de carbono residual e, devido a sua simplicidade e baixo custo, é um procedimento alternativo que pode ser aplicado à determinação de macro e micro elementos empregando técnicas espectroscópicas. O procedimento proposto se mostrou, preciso e exato quando aplicado à material de referência certificado.

Foi necessária adição de ácido sulfúrico para aumentar a temperatura do meio reacional e poder decompor essa matriz em sistemas abertos que contém um alto teor de açúcar e gordura.

A composição inorgânica diferiu entre as amostras analisadas o que pode ser creditado ao fato de serem produzidas em diferentes estados, e deve-se considerar a influência do tipo, estágio de maturação do coco, bem como solo no qual foi cultivado. Outro aspecto para se levar em consideração na diferença dessa composição é qualidade do leite de coco comercializado. Dentre as amostras estudadas, as que tiveram maior teor nutricional foram as que apresentaram maior valor agregado e o inverso também se aplica.

## 2.6 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS

O uso da radiação micro-ondas veio acelerar a etapa de pré-tratamento de matrizes orgânicas e inorgânicas. A primeira utilização da energia micro-ondas na área de preparo de amostras foi em 1975 (ABU-SAMRA *et al.*, 1975). Com a utilização da radiação micro-ondas como fonte de aquecimento, o tempo de digestão de amostras é reduzido, pois nos sistemas convencionais, a energia é transferida para a amostra por condução e como os frascos são pobres condutores o processo de transferência é lento e, somado a isso ainda tem o fato de que as correntes de convecção dentro da solução fazem com que, apenas parte do líquido se encontre na temperatura ideal. No caso do sistema assistido por micro-ondas, a transferência de energia ocorre quase que simultaneamente para todas as moléculas da solução, acelerando o processo (OLIVEIRA, 2003).

A tecnologia voltada para o emprego das micro-ondas no preparo de amostra visando à determinação elementar por espectroscopia atômica tem se mostrado bastante interessante devido ao maior controle sobre o sistema (SNEDDON *et al.*, 2006). Atualmente os sistemas podem ser identificados como: fornos de micro-ondas em cavidade e com micro-ondas focalizadas. Frequentemente os sistemas pressurizados são associados aos fornos com cavidade e os sistemas à pressão atmosférica, aos sistemas com micro-ondas focalizadas.

A execução de procedimentos de digestão sob pressão e temperaturas elevadas permite a utilização de ácidos diluídos sem perda na eficiência de digestão (BIZZI *et al.*, 2010). No entanto, essa eficiência depende da composição química original da amostra e da temperatura utilizada durante o processo de digestão. Quando ácido nítrico concentrado é empregado carboidratos são rapidamente decompostos a 140 °C, enquanto as moléculas de proteína são decompostos em 150 °C e lipídicas requerem cerca de 160 °C (GONZALEZ *et al.*, 2009). A utilização de ácidos diluídos em procedimentos de decomposição por via úmida em sistemas fechados tem despertado o interesse da comunidade científica (BIZZI *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2009).

Acredita-se que o produto principal de reação, quando empregado ácido nítrico concentrado é o NO<sub>2</sub>. Por outro lado, em soluções de ácido nítrico diluído há uma produção preferencial de NO. Neste caso, durante a oxidação da matéria orgânica pelo ácido nítrico, NO é produzido e reage com O<sub>2</sub> na fase gasosa gerando NO<sub>2</sub>. Depois, o NO<sub>2</sub> formado pode ser reabsorvido na fase líquida levando à formação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e HNO<sub>2</sub>. Este ciclo de reação prossegue até o completo consumo do O<sub>2</sub> na fase gasosa (KRUG, 2008).

Uso de ácidos diluídos para digestão de materiais de plantas em forno de micro-ondas com cavidade foi avaliado por Araújo *et al.* (2002). Uma vantagem adicional é a menor quantidade de resíduo gerado quando se trabalha com soluções de ácido diluído. Vários parâmetros são relevantes quando um sistema fechado assistido por micro-ondas é

promovido a: massa da amostra, tipo de ácido, o volume de reagentes, as concentrações mistura oxidante, temperatura, pressão e tempo de aquecimento. Procedimentos em que se usa baixo volume de ácidos ou soluções diluídas de ácido geralmente exigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante auxiliar. A adição de peróxido de hidrogênio tem sido investigada, e uma diminuição em ambos os resíduos sólidos e o RCC foi observado para digeridos de amostras obtidas usando um maior volume deste reagente.

### 2.6.1 – Estudos preliminares de digestão em forno de micro-ondas com cavidade

Neste trabalho foi estudado o efeito de duas concentrações ácidas no programa de digestão de amostras de leite de coco em forno de micro-ondas com cavidade. Os estudos preliminares foram feitos com a amostra SC. Testou-se duas concentrações para o ácido nítrico (12,2 e 6,2 mol L<sup>-1</sup>) sendo considerada a diluição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Em todos os frascos foi adicionado 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v v<sup>-1</sup>) de modo que volume total de reagentes foi fixado em 8,0 mL para todos os experimentos. O programa de aquecimento descrito na Tabela 7 do item 2.4.4.2 foi aplicado para as duas condições investigadas. As determinações de C, Ca, Cu Fe, K, Mg, Mn Na, P e Zn foram realizadas empregando ICP OES. A acidez residual foi determinada através de titulação ácido-base, utilizando uma solução de NaOH padronizada.

O forno de micro-ondas com cavidade empregado nos experimentos usa alta pressão e recipientes fechados e é adequado para os procedimentos de lidar com massas de amostra orgânica normalmente inferior a 0,5 g para evitar a pressão excessiva e efeitos indesejáveis (COSTA *et al.*, 2009).

### 2.6.2 – Apresentação e discussão dos resultados

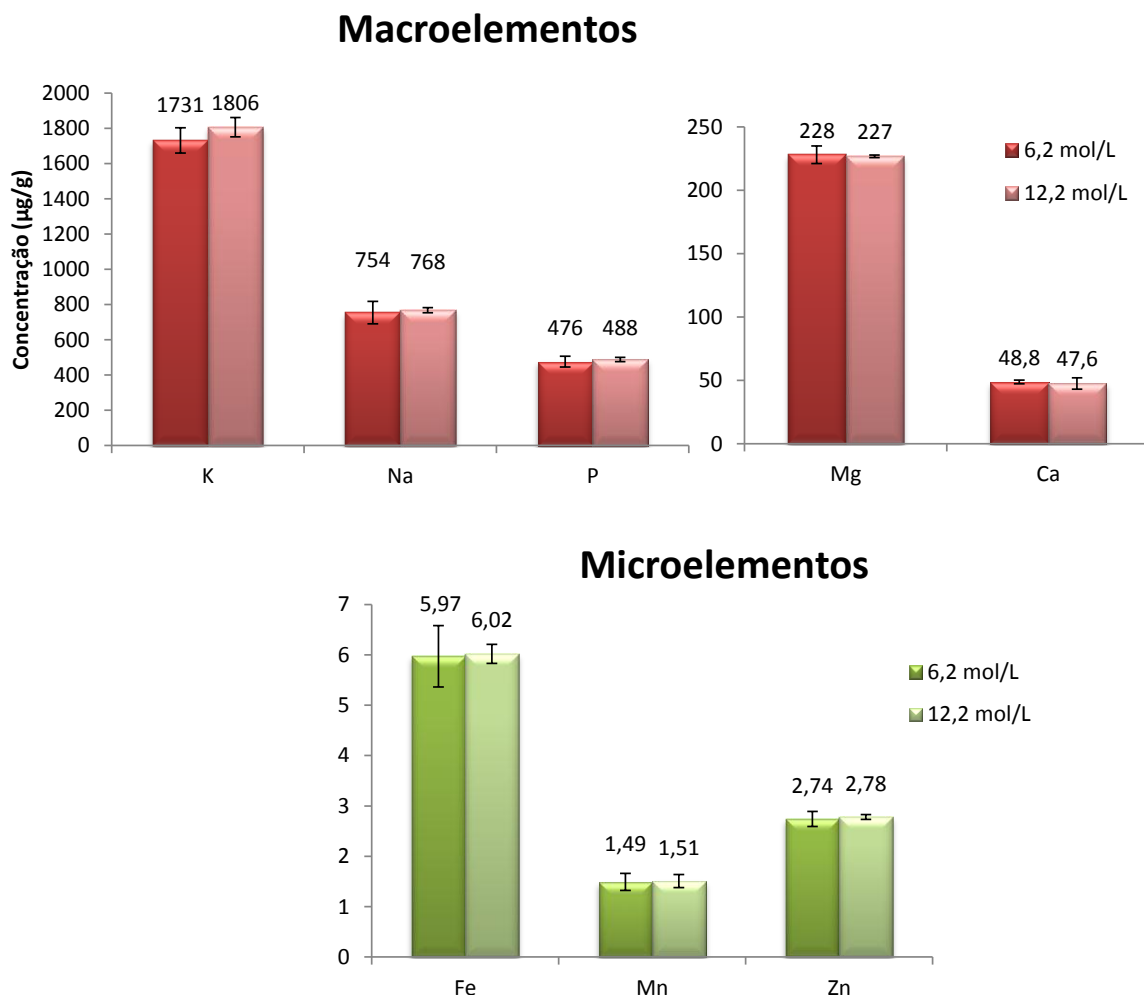
#### 2.6.2.1 – Acidez residual e teor de carbono residual

A eficiência do procedimento foi avaliada através da acidez e do teor de carbono residual dos digeridos e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Acidez e teor de carbono residual após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (n=3).

Acidez inicial (mol L <sup>-1</sup> )	RCC (% m m <sup>-1</sup> )	Acidez residual (mol L <sup>-1</sup> )	Consumo de HNO <sub>3</sub> (%)
12,2	11,24 ± 2,33	6,04 ± 0,08	49,5
6,2	16,16 ± 1,10	3,56 ± 0,56	57,8

A acidez titulável residual média do procedimento de digestão com  $\text{HNO}_3$   $6,2 \text{ mol L}^{-1}$  foi cerca de 40% menor que o valor obtido para o procedimento com ácido concentrado  $12,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Os teores médios,  $\% \text{ m m}^{-1}$ , de RCC não variaram significativamente. Apesar da maior concentração de carbono nos digeridos do procedimento com  $\text{HNO}_3$   $6,2 \text{ mol L}^{-1}$ , aplicando-se o teste t pareado, não foi observada diferença significativa para a determinação multielementar nas duas concentrações ácidas estudadas (Figura 19).



**Figura 19.** Concentração média, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras “SC” de leite de coco decompostas em forno de micro-ondas com cavidade.

A redução de volumes de amostra e de reagente é uma tendência na análise instrumental. Isto é útil para evitar ataque químico de peças dos equipamentos, como por exemplo, o nebulizador, câmara de nebulização e tocha em ICP OES. Assim, a digestão da amostra deve ser adequada de acordo com a técnica analítica empregada (ARAÚJO *et al.*, 2002). Para a digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade foi adotada a concentração de  $6,2 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ .

Idealmente, um procedimento mostra-se eficiente para a decomposição considerando que baixos valores para o teor de carbono residual sejam obtidos. Levando-se em consideração o percentual de carbono residual obtido para as amostras digeridas no bloco digestor esse foi na faixa de 100 a 500 vezes menor comparado àquele obtido no procedimento com forno de micro-ondas com cavidade (Tabela 18), entretanto, os teores de RCC obtidos na digestão assistida por micro-ondas não foram interferentes na quantificação dos analitos.

**Tabela 18.** Valores médios ( $n = 3$ ) de RCC (%  $m\ m^{-1}$ ) obtidos nos procedimentos de digestão de leite de coco em bloco digestor e forno de micro-ondas com cavidade.

Amostras	RCC	
	MW	BL
BC	3,37 ± 0,23	0,03 ± 0,01
BP	15,40 ± 1,26	0,11 ± 0,02
CV <sub>L</sub>	10,08 ± 0,27	0,04 ± 0,01
DC	14,34 ± 0,95	0,03 ± 0,01
KC	3,41 ± 0,27	0,04 ± 0,01
MC	9,88 ± 0,54	0,03 ± 0,01
MN	6,95 ± 1,26	0,07 ± 0,02
QL	10,80 ± 1,48	0,04 ± 0,01
SB	3,45 ± 0,35	0,013 ± 0,001
SC	15,81 ± 0,98	0,15 ± 0,02
SN	9,76 ± 0,62	0,05 ± 0,01
SY	5,67 ± 1,30	0,012 ± 0,001

Gouveia *et al.*, (2001) relatam que concentrações elevadas de carbono residual podem causar interferência nas medidas do ICP OES, devido aos efeitos de auto-absorção, entretanto, digestões assistidas por micro-ondas de amostras de fígado bovino e soja resultaram em digestões parciais da fração orgânica, mesmo assim não foi verificado este tipo de interferência.

#### 2.6.2.2 – Validação do procedimento proposto empregando forno de micro-ondas

Para a validação do procedimento proposto foram determinados os seguintes parâmetros de desempenho: efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

### 2.6.2.2.1 – Avaliação do efeito de matriz

A presença de compostos orgânicos na amostra afeta imediatamente as condições de equilíbrio do plasma (THOMPSON, 2002). Portanto, os efeitos de matriz podem influenciar a seletividade da técnica. A avaliação é feita por comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas usuais e os coeficientes das curvas de adição de analito empregando testes estatísticos.

Foram preparadas curvas analíticas em  $\text{HNO}_3$  3,5 mol  $\text{L}^{-1}$  na faixa de concentração de 0,1 a 4,0 mg  $\text{L}^{-1}$  para os microelementos e 0,5 a 30,0 mg  $\text{L}^{-1}$  para os macroelementos. A comparação das inclinações obtidas com as curvas analíticas usuais e as curvas que usam a adição do analito não indicou nenhuma diferença significativa, no nível da confiança de 95%, não sugerindo efeito de matriz para o Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. Os coeficientes angulares estão mostrados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração para o estudo do efeito de matriz usando soluções padrão em ácido nítrico e nos digeridos SC e MN empregando-se ICP OES.

Analitos	Solução padrão em ácido nítrico	Adição de analitos na solução da matriz	
		SC	MN
Ca	2 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>
Cu	23733	24298	22742
Fe	31453	32413	31539
K	9224	9609	9455
Mg	366713	328368	375654
Mn	132369	134768	129307
Na	89166	89820	88030
P	1060	1094	1089
Zn	27891	28607	27670

### 2.6.2.2.2 – Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados considerando o desvio padrão relativo para as intensidades de 10 ensaios do branco analítico submetidos aos procedimento de preparo tal qual como as amostras. Os valores de LOD e LOQ para a determinação por ICP-MS e ICP OES e estão nas Tabelas 20 e 21, respectivamente.

**Tabela 20.** Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP-MS.

<b>Analitos</b>	<b>LOD (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (ng g<sup>-1</sup>)</b>
<b>As</b>	1,5	5,2
<b>Cd</b>	0,7	2,2
<b>Co</b>	3,8	12,7
<b>Cr</b>	15,3	50,9
<b>Cu</b>	3,6	12,1
<b>Mn</b>	13,3	44,1
<b>Ni</b>	2,7	8,9
<b>Pb</b>	4,9	16,2
<b>Se</b>	0,8	2,6
<b>Zn</b>	32,5	108,4

**Tabela 21.** Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP OES.

<b>Analitos</b>	<b>LOD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (µg g<sup>-1</sup>)</b>
<b>As</b>	0,009	0,031	0,366	1,221
<b>Ca</b>	0,043	0,142	1,708	5,695
<b>Cd</b>	0,003	0,008	0,100	0,334
<b>Co</b>	0,006	0,018	0,220	0,734
<b>Cu</b>	0,001	0,004	0,040	0,155
<b>Fe</b>	0,006	0,021	0,248	0,825
<b>K</b>	0,079	0,264	3,160	10,54
<b>Mg</b>	0,026	0,086	1,029	3,430
<b>Mn</b>	0,002	0,006	0,075	0,250
<b>Na</b>	0,028	0,094	1,125	3,750
<b>Ni</b>	0,001	0,004	0,045	0,150
<b>P</b>	0,058	0,195	2,336	7,787
<b>Pb</b>	0,004	0,013	0,158	0,526
<b>Se</b>	0,022	0,073	0,880	2,933
<b>Sn</b>	0,016	0,055	0,656	2,187
<b>Zn</b>	0,005	0,017	0,200	0,669

Estes limites, em mg L<sup>-1</sup>, foram menores que aqueles obtidos pelo procedimento de decomposição em bloco digestor. Isto se deve ao fato de que, quanto menor a quantidade de reagentes utilizados, menor será o branco analítico podendo alcançar assim menores limites de detecção e quantificação.

### 2.6.2.2.3 – Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn considerando detecção por ICP OES correspondeu desde o limite de quantificação para cada analito a 5,0 mg L<sup>-1</sup> e para Ca, K, Mg, Na e P a faixa linear de trabalho foi até 50,0 mg L<sup>-1</sup>. Para os elementos As, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb esse, considerando a detecção por ICP-MS a faixa linear correspondeu a faixa entre o limite de quantificação a 20,0 µg L<sup>-1</sup>.

### 2.6.2.2.4 – Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, realizando-se dez ensaios dos procedimentos propostos para a digestão de leite de coco e avaliando coeficientes de variação em percentual. As amostras SC e MN foram empregadas nestes ensaios. Foram obtidos valores de CV menores que 4,5% para todos os analitos nas amostras analisadas, com exceção do Mn (6,2%) para a amostra MN considerando a detecção por ICP OES (Tabela 22).

**Tabela 22.** Coeficiente de variação para os analitos após detecção por ICP OES.

Analitos	CV (%)	
	SC	MN
Ca	2,9	4,1
Cu	4,1	2,3
Fe	3,6	4,5
K	2,6	4,4
Mn	3,7	6,2
Mg	2,7	2,7
Na	2,7	2,5
P	3,0	2,8
Zn	3,1	2,7



### 2.6.2.2.5 – Exatidão

É possível avaliar a exatidão de um método através das comparações com método independente. A exatidão do método proposto foi verificada por comparação com os resultados obtidos por decomposição em bloco digestor e testes de adição e recuperação dos analitos para a estimativa de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas dos mesmos, em três níveis de concentração: 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de forma a abranger a faixa de concentração dos analitos na matriz.

No capítulo anterior, de acordo com testes estatísticos, percebeu-se que há uma possível diferença na composição química do leite de coco em diferentes lotes, sendo assim, tomou-se o cuidado de usar a mesma amostra nos dois procedimentos para a validação.

Seis amostras de leite de coco foram digeridas em forno de micro-ondas como descrito no item 2.4.4.2 e os resultados foram comparados com aqueles obtidos na decomposição em bloco digestor. Os analitos foram determinados por ICP OES para ambos os procedimentos. A Tabela 24 mostra o teor médio para os analitos determinados e, de acordo com testes estatísticos não houve diferença significativa na concentração de todos os elementos, exceto Mn para as amostras BP e MC, a 95% de confiança.

A amostra selecionada para os testes de adição e recuperação foi a SC. As alíquotas das soluções estoque dos analitos foram adicionadas ao meio reacional antes da execução do procedimento de decomposição, de forma a fazer um acompanhamento de todas as etapas do processo analítico.

A Tabela 23 contém os valores obtidos para o percentual de recuperação nos três níveis de concentração para as determinações por ICP OES. De acordo com os percentuais obtidos, 92 a 107%, pode-se concluir que o procedimento proposto é eficiente e adequado para a determinação destes elementos em amostras de leite de coco.

**Tabela 23.** Teste de adição e recuperação em três níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES (n=3).

Analitos	Recuperação (%)		
	Níveis de concentração (mg L <sup>-1</sup> )		
	0,5	1,0	2,0
<b>As</b>	101 ± 3	106 ± 4	103 ± 1
<b>Cd</b>	99 ± 2	104 ± 1	102 ± 1
<b>Co</b>	99 ± 2	105 ± 1	98 ± 1
<b>Cr</b>	100 ± 2	106 ± 1	100 ± 1
<b>Cu</b>	101 ± 1	107 ± 1	92 ± 1
<b>Fe</b>	102 ± 1	107 ± 2	102 ± 1
<b>Mn</b>	101 ± 2	103 ± 1	96 ± 1
<b>Ni</b>	100 ± 1	104 ± 1	98 ± 1
<b>Pb</b>	101 ± 1	107 ± 1	102 ± 3
<b>Se</b>	99 ± 2	104 ± 1	96 ± 3
<b>Zn</b>	108 ± 1	104 ± 1	102 ± 1

**Tabela 24.** Comparação da concentração média, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (BL) e em forno de micro-ondas com cavidade (MW) (n=3).

Amostras	Proc.	Elementos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )									
		Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Se	Zn
BP	BL	45,3 ± 2,9	1,64 ± 0,01	4,23 ± 0,10	1655 ± 14	213 ± 2	1,83 ± 0,02	528 ± 1	353 ± 10	< 0,57	2,22 ± 0,04
	MW	44,7 ± 1,7	1,57 ± 0,12	3,81 ± 0,19	1688 ± 8	214 ± 8	3,57 ± 0,10	523 ± 7	349 ± 8	<b>&lt; 2,60*</b>	2,41 ± 0,12
CV <sub>L</sub>	BL	61,4 ± 0,14	0,691 ± 0,004	1,88 ± 0,03	738 ± 16	87,1 ± 1,9	1,278 ± 0,003	572 ± 28	340 ± 8	< 0,57	0,55 ± 0,06
	MW	62,5 ± 0,01	<b>0,612 ± 0,013</b>	1,44 ± 0,14	734 ± 14	86,5 ± 3,8	1,351 ± 0,024	576 ± 11	344 ± 2	<b>&lt; 2,60*</b>	<b>0,59 ± 0,01</b>
DC <sub>T</sub>	BL	20,4 ± 0,31	0,99 ± 0,02	3,13 ± 0,10	932 ± 11	130 ± 2	2,60 ± 0,03	365 ± 4	208 ± 6	< 0,57	0,93 ± 0,01
	MW	20,1 ± 0,53	0,94 ± 0,04	3,11 ± 0,06	943 ± 14	125 ± 2	3,03 ± 0,07	376 ± 4	210 ± 3	<b>&lt; 2,60*</b>	1,02 ± 0,01
MC	BL	51,5 ± 0,3	0,80 ± 0,05	2,67 ± 0,18	1090 ± 24	113 ± 4	1,73 ± 0,01	591 ± 14	208 ± 7	< 0,57	0,77 ± 0,02
	MW	51,4 ± 1,4	<b>0,77 ± 0,01</b>	2,76 ± 0,04	1041 ± 13	107 ± 3	2,10 ± 0,01	574 ± 3	211 ± 4	0,052 ± 0,002	0,73 ± 0,05
MN	BL	9,46 ± 0,34	0,309 ± 0,007	1,669 ± 0,006	335 ± 5	40,0 ± 1,0	0,84 ± 0,01	427 ± 6	187 ± 5	< 0,57	0,68 ± 0,02
	MW	9,95 ± 1,05	<b>0,265 ± 0,022</b>	< 0,82	343 ± 22	40,7 ± 2,2	0,86 ± 0,06	428 ± 3	186 ± 6	<b>&lt; 2,60*</b>	< 0,67
SC <sub>T</sub>	BL	44,6 ± 0,2	1,50 ± 0,02	4,88 ± 0,18	1789 ± 2	199 ± 1	3,23 ± 0,03	490 ± 3	209 ± 2	< 0,57	3,86 ± 0,09
	MW	45,1 ± 0,5	1,54 ± 0,04	4,87 ± 0,48	1781 ± 12	202 ± 4	3,88 ± 0,45	490 ± 6	213 ± 6	0,351 ± 0,039	3,79 ± 0,04

Em destaque os analitos que foram quantificados por ICP-MS.

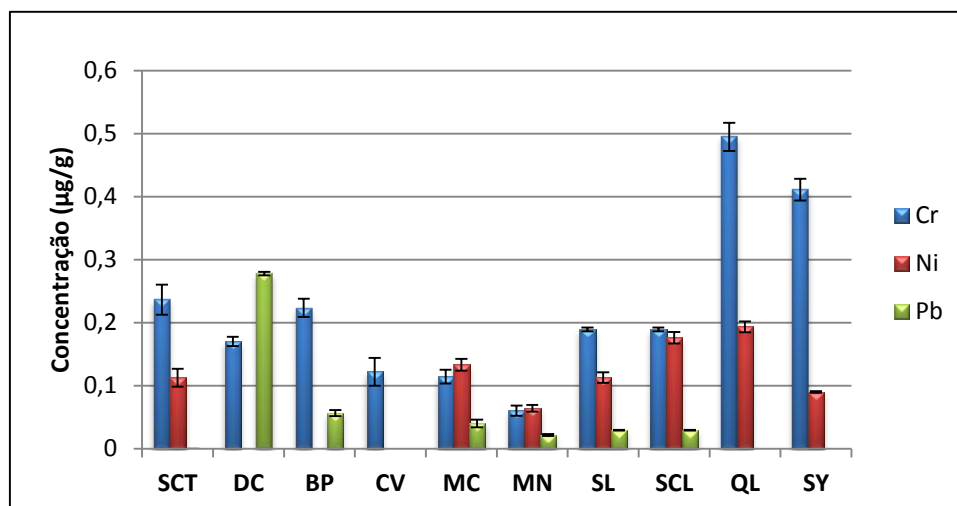
Os índices L e T significam *light* e tradicional respectivamente.

\* Este limite está expresso em  $\text{ng g}^{-1}$ .

### 2.6.2.3 – Aplicação do procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade

O procedimento para decomposição de amostras de leite de coco industrializado em forno de micro-ondas com cavidade utilizando ácido nítrico diluído ( $6,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi empregado para avaliar a composição multielementar de 25 amostras, além das seis amostras que foram empregadas para a validação do método, comercializadas na cidade de Salvador, BA. No conjunto das 25 amostras, 18 foram aplicadas na análise quimiométrica considerando a disponibilidade comercial de embalagens diferentes para um mesmo fornecedor.

Os resultados para as concentrações dos analitos, expressos como média e desvio padrão de três replicatas, considerando detecção por ICP OES e ICP-MS, estão mostrados na Figura 20 e na Tabela 25 a seguir.



**Figura 20.** Concentração média, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para Cr, Ni e Pb após detecção por ICP-MS (n=3).

**Tabela 25.** Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de macro e microelementos presentes no leite de coco com detecção por ICP OES e ICP-MS após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Amostras	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Se	Zn
BC	118 $\pm$ 1	< 0,14	< 0,82	768 $\pm$ 4	76,0 $\pm$ 2,0	< 0,25	471 $\pm$ 4	206 $\pm$ 2	< 2,93	< 0,67
BP	44,7 $\pm$ 1,7	1,57 $\pm$ 0,12	3,81 $\pm$ 0,19	1688 $\pm$ 8	214 $\pm$ 8	3,57 $\pm$ 0,10	523 $\pm$ 7	349 $\pm$ 8	<b>&lt; 2,60*</b>	2,41 $\pm$ 0,12
CV <sub>L</sub>	62,5 $\pm$ 0,01	<b><u>0,612 <math>\pm</math> 0,013</u></b>	1,44 $\pm$ 0,14	734 $\pm$ 14	86,5 $\pm$ 3,8	1,351 $\pm$ 0,024	576 $\pm$ 11	344 $\pm$ 2	<b>&lt; 2,60*</b>	<b><u>0,59 <math>\pm</math> 0,01</u></b>
DC <sub>T</sub>	20,1 $\pm$ 0,53	0,94 $\pm$ 0,04	3,11 $\pm$ 0,06	943 $\pm$ 14	125 $\pm$ 2	3,03 $\pm$ 0,07	376 $\pm$ 4	210 $\pm$ 3	<b>&lt; 2,60*</b>	1,02 $\pm$ 0,01
KC	< 5,70	< 0,14	< 0,82	310 $\pm$ 1	55,4 $\pm$ 2,4	0,899 $\pm$ 0,054	420 $\pm$ 1	168,5 $\pm$ 0,5	< 2,93	< 0,67
MC	51,4 $\pm$ 1,4	<b><u>0,77 <math>\pm</math> 0,01</u></b>	1,38 $\pm$ 0,01	1028 $\pm$ 23	110 $\pm$ 1	0,27 $\pm$ 0,01	574 $\pm$ 3	211 $\pm$ 4	<b><u>0,052 <math>\pm</math> 0,002</u></b>	0,75 $\pm$ 0,02
MN	9,95 $\pm$ 1,05	<b><u>0,265 <math>\pm</math> 0,022</u></b>	< 0,82	343 $\pm$ 22	40,7 $\pm$ 2,2	0,86 $\pm$ 0,06	428 $\pm$ 3	186 $\pm$ 6	<b>&lt; 2,60*</b>	<b>&lt;108*</b>
QL	40,6 $\pm$ 2,5	1,51 $\pm$ 0,04	6,2 $\pm$ 0,3	1835 $\pm$ 33	291 $\pm$ 4	3,03 $\pm$ 0,05	574 $\pm$ 7	287 $\pm$ 4	<b><u>0,161 <math>\pm</math> 0,023</u></b>	2,65 $\pm$ 0,08
SB	< 5,70	< 0,14	< 0,82	549 $\pm$ 9	89,5 $\pm$ 1,0	0,65 $\pm$ 0,03	514 $\pm$ 11	288 $\pm$ 4	< 2,93	< 0,67
SC <sub>L</sub>	53,9 $\pm$ 0,7	0,96 $\pm$ 0,02	3,09 $\pm$ 0,49	998 $\pm$ 30	125 $\pm$ 4	1,03 $\pm$ 0,04	545 $\pm$ 16	194 $\pm$ 6	<b><u>0,351 <math>\pm</math> 0,039</u></b>	1,58 $\pm$ 0,08
SC <sub>T</sub>	45,9 $\pm$ 0,14	1,54 $\pm$ 0,04	4,87 $\pm$ 0,48	1781 $\pm$ 7	201 $\pm$ 2	3,881 $\pm$ 0,003	490 $\pm$ 6	213 $\pm$ 6	<b><u>0,108 <math>\pm</math> 0,007</u></b>	3,00 $\pm$ 0,48
SN	89,2 $\pm$ 1,8	< 0,14	1,22 $\pm$ 0,04	754 $\pm$ 13	63,0 $\pm$ 0,2	< 0,25	1275 $\pm$ 29	145 $\pm$ 3	< 2,93	< 0,67
SY	106 $\pm$ 2	<b><u>0,548 <math>\pm</math> 0,006</u></b>	1,62 $\pm$ 0,14	1110 $\pm$ 7	132 $\pm$ 2	1,04 $\pm$ 0,03	587 $\pm$ 7	236 $\pm$ 5	<b><u>0,168 <math>\pm</math> 0,036</u></b>	<b><u>0,330 <math>\pm</math> 0,005</u></b>

Em destaque os analitos que foram quantificados por ICP-MS.

Os índices L e T significam *light* e tradicional respectivamente.

\* Limites expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ .

As concentrações obtidas para os analitos estudados estiveram nas faixas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ): Ca (20,1 – 118), Cu (0,265 – 1,57), Cr (0,061 – 0,493), Fe (1,22– 6,2), K (310 – 1835), Mg (40,7 – 201), Mn (0,27 – 3,88), Na (376 – 1275), Ni (0,06 – 0,19), P (145 – 349), Pb (0,022 – 0,27), Se (0,052 – 0,351) e Zn (0,33 – 3,00). As concentrações para As, Cd e Co estiveram abaixo do LOQ obtido para o método proposto. Na amostra SN o teor de sódio foi cerca de duas vezes maior que a média encontrada nas demais amostras.

Arsênio, Pb e Cd são elementos tóxicos e causam efeitos adversos à saúde humana e sua presença generalizada no ambiente vem de atividades antrópicas (VINAS *et al.*, 2000). No Brasil, em 1990, o Ministério da Saúde reviu os níveis de tolerância para chumbo em alimentos; diminuiu os níveis de aceitabilidade de chumbo de 8,0 mg Kg<sup>-1</sup> para 0,8 mg Kg<sup>-1</sup> para a maioria dos alimentos (Brasil, 1990). Para o cádmio a legislação brasileira estabelece como limite máximo de tolerância 1,0 mg Kg<sup>-1</sup> (ANVISA, 1998). Todavia as concentrações encontradas para estes elementos nas amostras de leite de coco não oferecem risco à saúde dos consumidores. A presença de contaminantes inorgânicos no leite de coco pode ser explicada por uma potencial contaminação durante o cultivo, transporte, condições de armazenamento e/ou durante o processamento industrial.

A maioria das frutas e os vegetais são fontes pobres de selênio, mas o coco pode ser uma boa fonte deste elemento. Na determinação de Se um problema frequentemente encontrado é a sua baixa concentração, sendo necessário o uso de técnicas sensíveis e seletivas (ALEIXO *et al.*, 2000). Na maioria das amostras analisadas o teor de selênio estava abaixo do limite de quantificação tanto do ICP OES quanto do ICP-MS.

A ANVISA define valores constantes para a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais que devem ser consumidos para atender às necessidades nutricionais (ANVISA, 2004). Os valores de IDR para alguns elementos em adultos estão mostrados na Tabela 26.

**Tabela 26.** IDR de nutrientes para adultos.

<b>Elementos</b>	<b>IDR para adultos</b>
<b>Ca</b>	1000 mg
<b>Cu</b>	900 µg
<b>Cr</b>	35 µg
<b>Fe</b>	14 mg
<b>Mg</b>	260 mg
<b>Mn</b>	2,3 mg
<b>P</b>	130 mg
<b>Se</b>	34 µg
<b>Zn</b>	7 mg

Avaliação de quanto o leite de coco pode contribuir para esta ingestão diária não é trivial, pois este alimento não é consumido separadamente, ainda assim uma porção de aproximadamente 200 gramas, embalagem mais comumente comercializada, contribui para o IDR com 1% de Ca; 1,4% de Cr; 30% de Cu; 7% de Fe; 13% de Mg; 21% de Mn; 40% de P; 1% de Se e 9% de Zn.

#### **2.6.2.4 – Aplicação de ferramentas estatísticas em amostras de leite de coco após decomposição assistida por micro-ondas**

A aplicação de ferramentas estatísticas como, por exemplo, a análise por componentes principais e a análise hierárquica de agrupamentos é de fundamental importância para melhor explorar e entender a grande quantidade de dados numéricos que vêm sendo gerados com o aperfeiçoamento das técnicas instrumentais. Desta forma, análises quimiométricas exploratórias utilizando dados obtidos por técnicas espectrométricas como o ICP OES, têm sido amplamente empregadas como ferramenta para a discriminação entre conjuntos de amostras.

Os métodos quimiométricos para reconhecimento de padrões não supervisionados têm como objetivo identificar classes ou agrupamentos naturais dos dados sem a imposição prévia de relações entre estes, independente do alvo da modelagem, a exemplo a PCA e HCA. Nos métodos supervisionados o conhecimento das classes é usado para desenvolver um modelo, com o objetivo de classificar futuras

amostras (BEEBE *et al.*,1998). Os métodos multivariados PCA e HCA possuem fundamentos teóricos bem diferentes, podendo ser aplicadas independentemente e de forma complementar. Podem ser empregadas quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, isto é, o quanto as amostras se assemelham, segundo as variáveis selecionadas. Muitos trabalhos recentes empregaram estes métodos para a classificação de alimentos usando a composição mineral em termos de macro, micro e elementos traço (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2005; DE SOUSA *et al.*, 2006; FILHO *et al.*, 2007; ANUNCIACÃO *et al.*, 2011).

Foram adquiridas 18 amostras com a seguinte distribuição: 6 amostras de cada marca, três no total e, dentro desse conjunto, 3 tinham embalagem tetra pak e 3 de garrafas de vidro. Todas as 18 amostras eram de diferentes lotes. Uma vez que não houve diferença significativa, em termos de concentração dos analitos, para o procedimento executado no bloco digestor em relação forno de micro-ondas com cavidade; optou-se por fazer o estudo estatístico neste em função das vantagens de menor quantidade de amostra bem como reagentes.

Neste trabalho foi empregada a análise exploratória preliminar dos dados obtidos, utilizando-se da análise de componentes principais para indicar a existência de alguma separação das amostras de leite de coco de diferentes fornecedores e embalagens. Cada amostra foi caracterizada por um conjunto de variáveis: concentração dos metais analisados, os quais constituem seus descritores químicos.

A determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn foi realizada por ICP OES. Esses nove analitos foram selecionados como variáveis. Para as amostras, foi construída uma matriz de dados de 9 colunas e 54 linhas. Para os conjuntos de amostras cada réplica foi considerada como amostra a fim de aumentar a representatividade das amostras e diminuir erros que são gerados aleatoriamente. Os resultados foram separados de acordo com o fornecedor de cada amostra e a análise de dados foi executada usando o software *Statistica 7.0*. O método empregado para o pré-processamento foi o auto-escalamento uma vez que havia diferentes ordens de magnitude de concentração dos elementos, além de todas as variáveis possuírem igual importância em se tratando da possibilidade de discriminar as amostras.

A Tabela 27 representa os pesos das variáveis originais nas três primeiras componentes principais e as variâncias explicadas por cada componente. De acordo com os dados pode-se observar que as duas primeiras componentes descrevem 94,25% da variância total dos dados.

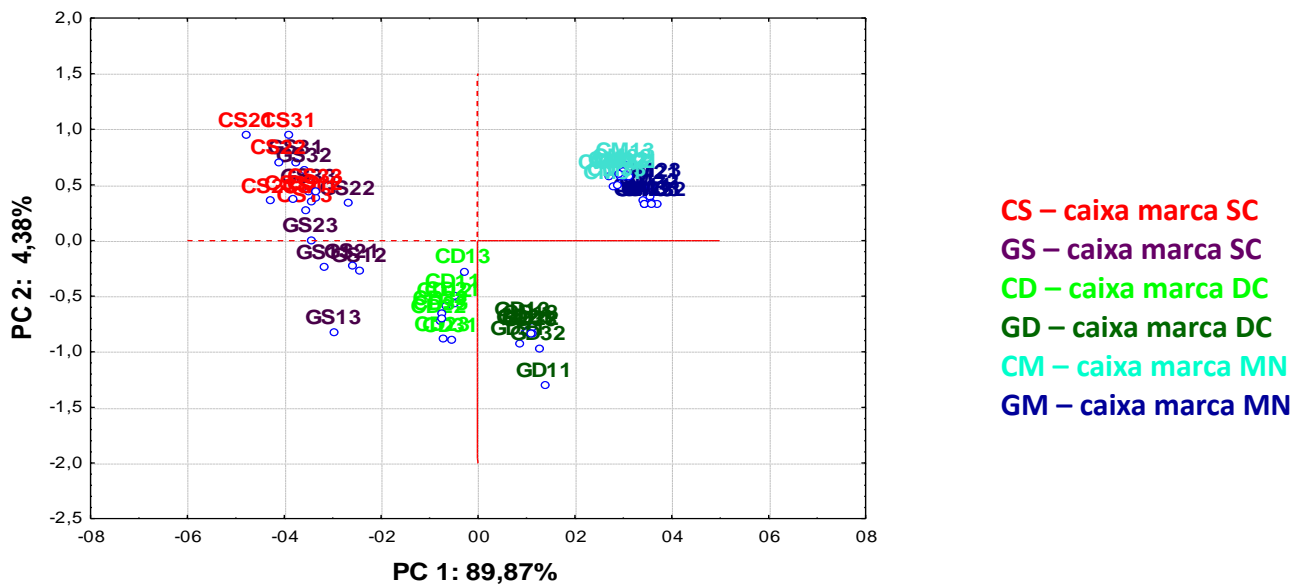


**Tabela 27.** Pesos das variáveis para as duas primeiras componentes principais.

Variável	PC 1	PC 2
Ca	-0,943314	0,144740
Cu	-0,960440	-0,203374
Fe	-0,933541	-0,254713
K	-0,972933	0,099292
Mg	-0,972036	-0,195006
Mn	-0,904713	0,208550
Na	-0,926658	0,336891
P	-0,969769	-0,223572
Zn	-0,946086	0,111490
<b>Variância total (%)</b>	<b>89,87</b>	<b>4,38</b>
<b>Variância acumulada (%)</b>	<b>89,87</b>	<b>94,25</b>

Todos os elementos analisados são variáveis dominantes na primeira componente principal (PC1) que representa 89,87% da variância total. Tais elementos estão correlacionados e apresentam peso negativo. Tendo como base a segunda componente principal (PC2), observa-se, na Tabela 27, que esta componente é responsável por apenas 4,38% da variância total. De acordo com a informação obtida a partir desta componente, verifica-se que as variáveis Ca, K, Mn, Na e Zn apresentam peso positivo estando correlacionados. Já os elementos Fe, Mg, P e Cu estão correlacionados apresentando peso negativo e estão anticorrelacionados com os anteriores. A segunda componente principal não apresenta habilidade classificatória, logo as informações a seguir serão abordadas em relação a primeira componente principal.

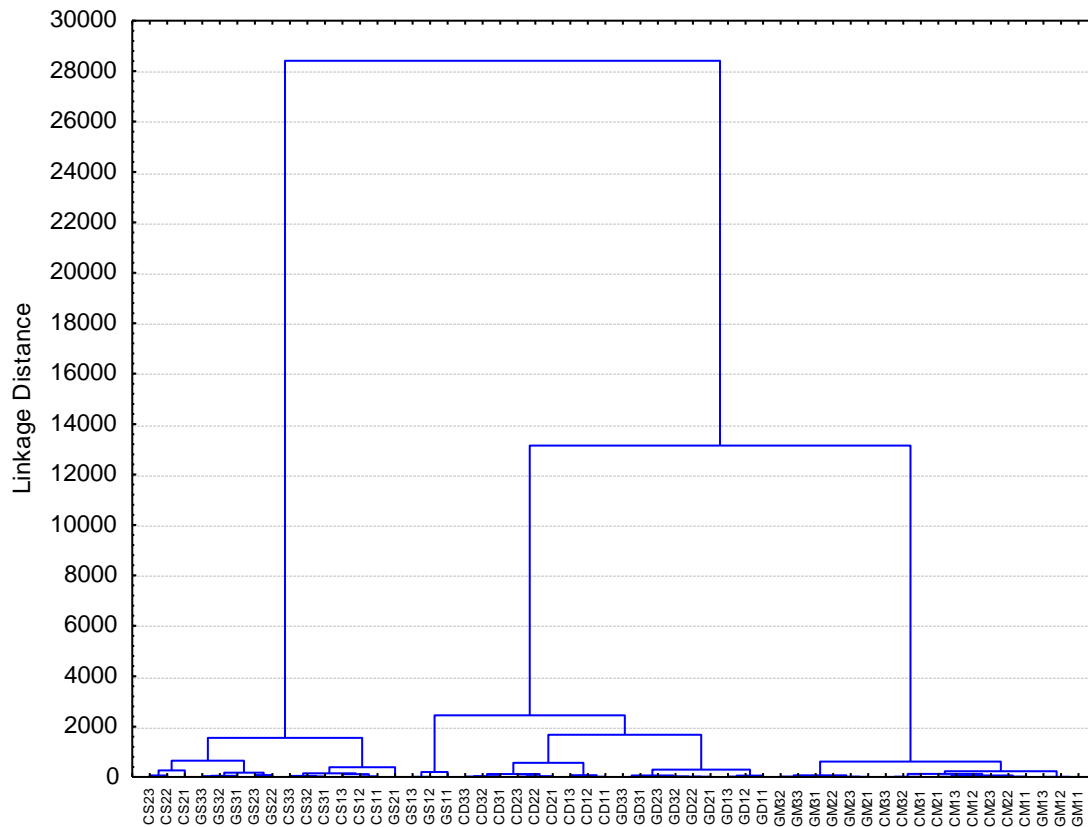
O gráfico de escores apresentado na Figura 21 representa as duas primeiras componentes principais (PC1 x PC2). Verifica-se que há uma formação de três grupos. Fazendo-se uma interpretação simultânea dos gráficos de pesos e escores, tem-se que quanto mais negativos forem os valores de escores para as amostras, maiores serão os teores dos analitos de peso negativo. Desta forma, observa-se que as amostras “SC” apresentam maiores concentrações dos elementos estudados, seguida pelas amostras “DC” e depois “MN”. É possível perceber uma separação sutil no tipo de embalagem para as três marcas. As amostras de garrafa apresentam uma tendência de uma menor concentração dos analitos, uma vez que as amostras GS e GD tendem para o lado de score positivo em PC1. A este comportamento pode ser creditado que haja uma possível adsorção dos elementos no vidro.



**Figura 21.** Gráfico de Scores PC1 x PC2 para as amostras de leite de coco analisadas.

A avaliação dos dados obtidos neste trabalho através da análise de agrupamento hierárquico foi realizada com base nos dados auto-escalonados, assim como na PCA. Empregou-se o método de Ward's com distâncias Euclidianas para calcular as distâncias entre os pontos e as similaridades entre as amostras. O procedimento de aglomeração hierárquica foi empregado para estabelecer os grupos de amostras. A Figura 22 apresenta o dendrograma obtido a partir da HCA das amostras analisadas.

Os resultados obtidos a partir da PCA foram corroborados pela HCA onde se observa a formação de três grupos, cada um deles correspondente a um fornecedor. As amostras MN se assemelham às amostras da marca DC e, que quanto menor for a distância entre as amostras maior a similaridade entre elas.



**Figura 22.** Dendrograma obtido para amostras de leite de coco submetidas a HCA.

Os valores de concentração determinados, bem como a ferramenta estatística utilizada foram capazes de demonstrar tendência de separação das amostras. As técnicas de PCA e HCA demonstraram que, em relação aos elementos determinados, há diferença da composição mineral do leite de coco em função da marca e tipo de embalagem.

#### **2.6.2.5 – Avaliação de procedimento alternativo usando forno de micro-ondas com cavidade e ozônio como agente oxidante auxiliar**

O objetivo deste procedimento alternativo foi avaliar a utilização de ozônio em substituição ao peróxido de hidrogênio, uma vez que o produto da decomposição deste é atrativo no aspecto ambiental e pode levar a um nível menor de contaminação. A ozonização prévia de 30 mL de amostra de leite de coco foi feita por um ozonizador durante 15 minutos. Após esta etapa cerca de 500 mg desta amostra foram submetidas ao programa de aquecimento como descrito no item 2.4.4.2 em forno de micro-ondas com cavidade. Os resultados foram comparados com os obtidos

empregando o procedimento com ácido nítrico diluído validado neste capítulo, em termos da capacidade de extração dos analitos e estão mostrados na Tabela 28. Este procedimento foi aplicado na amostra SC. Os digeridos obtidos apresentaram-se límpidos. Os teores de acidez e de carbono residual para ambos os procedimentos estão na Tabela 29.

**Tabela 28.** Concentração média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para os dois procedimentos em forno de micro-ondas com cavidade. (n = 3)

<b>Analitos</b>	<b>HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>HNO<sub>3</sub> + O<sub>3</sub></b>
<b>Ca</b>	49 ± 3	50 ± 2
<b>Cu</b>	1,18 ± 0,01	1,31 ± 0,04
<b>Fe</b>	5,7 ± 0,4	5,20 ± 0,08
<b>K</b>	(178 ± 2)x10	(160 ± 5)x10
<b>Mg</b>	224 ± 4	224 ± 3
<b>Mn</b>	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,1
<b>Na</b>	522 ± 7	500 ± 7
<b>P</b>	(53 ± 1)x10	(48 ± 2)x10
<b>Zn</b>	3,4 ± 0,1	3,64 ± 0,08

**Tabela 29.** Teores de acidez e de carbono residual para os dois procedimentos (n=3).

<b>Parâmetros</b>	<b>HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>HNO<sub>3</sub> + O<sub>3</sub></b>
<b>RCC % (m m<sup>-1</sup>)</b>	8,8 ± 0,6	16 ± 1
<b>Acidez (mol L<sup>-1</sup>)</b>	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,4

Foi possível quantificar os analitos de interesse com o procedimento onde se aplicou o ozônio. Testes estatísticos indicaram que houve diferença significativa entre os dois procedimentos para Cu, Fe, K e P, a 95% de confiança. Esta diferença pode ser creditada a heterogeneidade da amostra de leite de coco; definida na literatura como uma emulsão, e que na trata-se uma suspensão, uma vez que cerca de 5 g de sólidos estão presentes a cada embalagem de 200 g. Desta maneira, o ozônio pode ser usado para substituir de forma eficiente o peróxido de hidrogênio para determinação de Ca, Mg, Mn, Na e Zn. No entanto, mais estudos são necessários para se estabelecer procedimento alternativo usando forno de micro-ondas com cavidade e ozônio como agente oxidante auxiliar.

Santos (2009) avaliou o efeito da associação de ozônio a soluções de  $\text{HNO}_3$  para a decomposição de diferentes matrizes biológicas em sistema fechado e auxiliado por micro-ondas. Soluções de ácido nítrico foram ozonizadas por 10 minutos e em seguida repousadas pelo mesmo intervalo de tempo, estas por sua vez foram empregadas para a digestão de cerca de 250 mg de amostras em forno de micro-ondas com cavidade onde o volume final da mistura oxidante, quer com  $\text{O}_3$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi de 8 mL. Como forma de avaliar a eficiência de decomposição da matéria orgânica aspectos visuais dos digeridos e teor de metais extraídos em diferentes condições de digestão foram empregados. Este trabalho foi aplicado a amostras de alimentos para avaliar o teor de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Os resultados indicaram que a extração dos metais foi eficiente para 95% de confiança, exceto para Zn e, que o ozônio substituiu com vantagens o  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante auxiliar, quando se comparou os teores dos elementos traço e acidez residual.

### **2.6.3 – Considerações Finais**

O sistema desenvolvido para digestão de amostras de leite de coco com ácido nítrico diluído em forno de micro-ondas com cavidade mostrou-se exato, preciso e robusto para a determinação multielementar de macro e micro-elementos por ICP OES e ICP-MS. É uma alternativa promissora ao preparo de amostras, uma vez que promove um menor consumo de reagente, uma maior segurança operacional e minimiza a geração de resíduos, considerando a menor acidez residual dos digeridos.

A utilização das técnicas de reconhecimento de padrões PCA e HCA para os resultados obtidos nas amostras de leite de coco comercializadas em estabelecimentos da cidade de Salvador, BA, permitiu observar diferenças entre os três fornecedores em termos da concentração dos constituintes inorgânicos.

## 2.7 – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A busca por novos procedimentos que sejam rápidos, de fácil execução e que demandem menores quantidades de reagentes, tem sido um dos grandes propulsores da pesquisa na área de Química Analítica nos últimos anos. Neste aspecto, processos de lixiviação baseados na extração de um ou mais elementos por um ácido e/ou por um agente oxidante são úteis, pois implicam na solubilização dos analitos no solvente de lixiviação, sem a decomposição total da matriz da amostra. Assim, ácidos concentrados não precisam ser usados, o que conduz a um baixo consumo destes reagentes, a uma redução dos vapores nocivos gerados e a um menor gasto de tempo no tratamento da amostra, devido a eliminação das etapas de manipulação.

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta estatística, porque possibilita investigar o efeito das variáveis experimentais e de suas interações sobre a resposta analítica. Devido a sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizada pelos químicos analíticos para diferentes amostras e propósitos (NETO *et al.*, 2010). A metodologia de superfícies de resposta (MSR) consiste em um grupo de técnicas matemático-estatísticas utilizado para análise e modelagem de problemas nos quais uma resposta particular é função de diversas variáveis, sendo o principal objetivo otimizar esta resposta. As superfícies representam uma boa maneira de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas, oferecendo valiosas informações sob o comportamento destas variáveis na região estudada. A MSR é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Estas etapas devem ser repetidas tantas vezes quanto forem necessárias e possíveis, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície estudada, geralmente um ponto de máximo ou mínimo (NETO *et al.*, 2010).

As matrizes de planejamento mais conhecidas e usadas em metodologia de superfície de resposta são as do composto central, Box-Behnken e Doehlert (FERREIRA *et al.*, 2007a). Os planejamentos Doehlert e Box-Behnken requerem um número menor de experimentos (N). Para o planejamento Doehlert ( $N = k^2 + k + 1$ ) e Box-Behnken ( $N = 2k(k - 1) + C_0$ ), onde k é o número das variáveis em estudo e  $C_0$  o número de pontos centrais (FERREIRA *et al.*, 2007b).

Neste trabalho foram desenvolvidos planejamentos experimentais visando à otimização da extração ultrassônica. As determinações de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn foram realizadas empregando ICP OES. Foram aplicados planejamento fatorial completo de dois níveis com quatro variáveis e planejamento Doehlert com

duas variáveis. Em todos os processos de otimização foi utilizada a amostra de leite de coco MC.

### 2.7.1 - Otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom

A princípio testou-se diluições de 0,25; 0,5 e 1,0 g de amostra de leite de coco com ácido nítrico 2% v v<sup>-1</sup> para 20,0 mL. Estas amostras foram introduzidas diretamente no ICP OES com o intuito avaliar o quanto plasma resistia de forma estável à quantidade de matéria orgânica introduzida. Não houve extinção do plasma para as massas testadas, sendo que para a massa de 1,0 g os resultados foram mais concordantes com os obtidos em digestão ácida. Sendo assim, adotou-se essa massa e essa diluição para o desenvolvimento dos estudos posteriores.

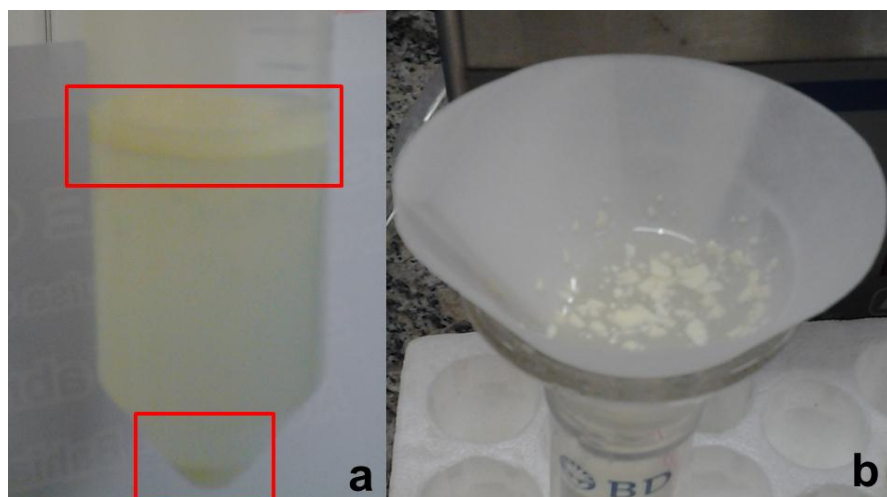
Para avaliação da extração foi proposto um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> com réplicas no ponto central. As variáveis estudadas, baseadas em estudos desenvolvidos dentro do grupo de pesquisa, foram: concentração de ácido nítrico, tempo de sonicação, tempo e velocidade de centrifugação. Os níveis superior (+), inferior (-) e central (0) para cada uma estão na Tabela 30.

**Tabela 30.** Valores das variáveis estudadas no planejamento fatorial.

Variáveis	(-)	(0)	(+)
HNO <sub>3</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	2	3	4
Tempo de sonicação (min)	5	7,5	10
Tempo de centrifugação (min)	5	10	15
Velocidade de centrifugação (rpm)	2000	3000	4000

Depois de centrifugadas as amostra formavam três fases o que impossibilitava em alguns casos a retirada da fase líquida, portanto, optou-se por mais esta etapa de filtração. A formação das três fases pode ser vista na Figura 23.

Após execução do planejamento fatorial, foi desenvolvido planejamento Doehlert, a fim de que pudessem ser obtidas as condições ótimas para a determinação dos analitos empregando-se ICP OES.



**Figura 23.** Aspecto do extrato após centrifugação (a); sobrenadante sólido (a)

Percentuais de extração dos analitos foram usados como resposta dos planejamentos experimentais. Os percentuais de extração foram calculados tomando-se como referência os teores dos analitos obtidos no procedimento de decomposição em bloco digestor. Os dados experimentais foram processados empregando-se o programa *Statística 7.0*.

## **2.7.2 – Apresentação e discussão dos resultados**

### **2.7.2.1 – Resultados do planejamento fatorial para otimização do procedimento de extração usando ultrassom**

Após execução dos experimentos do planejamento fatorial  $2^4$ , a concentração dos analitos foi determinada empregando ICP OES. A Tabela 31 traz a percentagem de extração para os elementos avaliados, que encontram-se nas seguintes faixas: Ca (73 a 107%); Cu (74 a 92%); Fe (58 a 83%); K (81 a 101%); Mg (78 a 99%); Mn (72 a 87%); Na (85 a 110%); P (91 a 106%) e Zn (67 a 86%). Os maiores percentuais de extração para a maioria dos elementos foram obtidos no nível superior das variáveis concentração ácida e tempo de sonicação; adicionalmente ao menor tempo e velocidade de centrifugação. Esta informação é confirmada pela resposta global (RG), que expressa, de forma cumulativa e normalizada, as eficiências de extração considerando a resposta individual de todos os analitos.

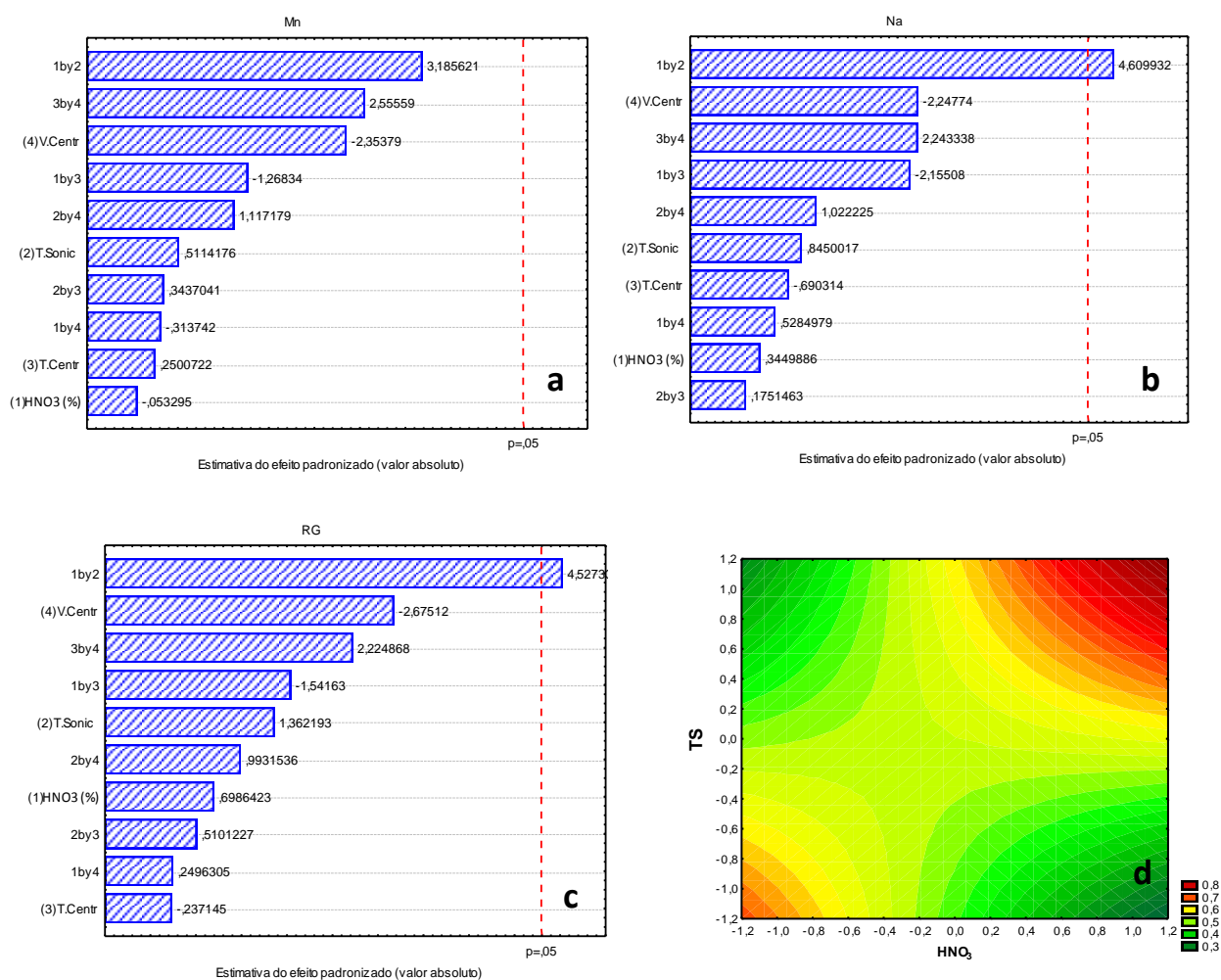


**Tabela 31.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> aplicado à extração assistida por ultrassom de leite de coco, percentuais de extração dos analitos e resposta global.

Exp.	HNO <sub>3</sub>	TS	TC	VC	Extração (%)									RG
					Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	P	Mg	Na	
1	(-)	(-)	(-)	(-)	90	70	87	85	101	101	101	99	108	8,67
2	(+)	(-)	(-)	(-)	91	66	86	85	88	93	93	91	100	8,20
3	(-)	(+)	(-)	(-)	83	66	79	78	90	90	93	88	96	7,90
4	(+)	(+)	(-)	(-)	92	83	88	86	94	99	105	99	110	8,84
5	(-)	(-)	(+)	(-)	86	65	83	82	87	92	95	91	100	8,07
6	(+)	(-)	(+)	(-)	83	74	77	76	84	87	93	86	95	7,79
7	(-)	(+)	(+)	(-)	85	62	80	81	95	93	98	92	99	8,07
8	(+)	(+)	(+)	(-)	84	71	81	79	107	89	95	88	96	8,15
9	(-)	(-)	(-)	(+)	82	69	78	76	86	90	95	88	96	7,85
10	(+)	(-)	(-)	(+)	74	64	68	67	78	82	88	80	88	7,11
11	(-)	(+)	(-)	(+)	76	58	71	70	73	81	85	78	85	6,98
12	(+)	(+)	(-)	(+)	87	82	83	82	96	96	106	97	107	8,63
13	(-)	(-)	(+)	(+)	87	62	85	84	85	94	100	94	102	8,19
14	(+)	(-)	(+)	(+)	76	65	73	71	76	85	91	82	88	7,30
15	(-)	(+)	(+)	(+)	83	68	79	78	87	89	94	88	96	7,87
16	(+)	(+)	(+)	(+)	88	81	85	83	84	94	104	93	102	8,43
17	0	0	0	0	78	62	72	72	86	83	90	81	88	7,35
18	0	0	0	0	83	73	79	77	83	89	99	89	95	7,94
19	0	0	0	0	83	67	79	77	80	88	98	88	95	7,80

TS: tempo de sonicação; TC: tempo de centrifugação; VC: velocidade de centrifugação; RG: resposta global

No domínio experimental estudado, as variáveis investigadas não foram significativas ( $P > 0,05$ ) para a extração de Fe, Mn, Mg e P, a Figura 24a traz o diagrama de Pareto para o Mn. A interação concentração ácida e tempo de sonicação foi significativa ( $P < 0,05$ ) para Ca, Cu, K, Na e Zn, isto pode ser confirmado para o Na através do diagrama de Pareto (Figura 24b). Os resultados também foram analisados considerando a RG. Como resultado da análise observou-se que a interação concentração ácida e tempo de sonicação foi significativa ( $P < 0,05$ ), com valor positivo associado (Figura 24c). Ou seja, maior concentração ácida e tempo de sonicação, próximas ao nível superior, indica que a extração dos analitos, de um modo geral, é favorecida (Figura 24d).



**Figura 24.** Diagrama de Pareto (a) para o Mn; (b) para o Na; (c) para a RG e curvas de nível da RG (d) obtidos no planejamento Doehlert aplicado extração assistida por US em amostras de leite de coco.

De acordo com os resultados do planejamento fatorial, foram selecionadas as variáveis e respectivos níveis para o planejamento Doehlert. A escolha das variáveis,

concentração de  $\text{HNO}_3$  e tempo de sonicação, teve como base o fato de que, para a maioria dos elementos, a interação entre elas teve efeito significativo. Com respeito a estas variáveis o domínio experimental do planejamento Doehlert foi deslocado em relação ao planejamento fatorial  $2^4$ , porque os resultados indicavam melhores recuperações para o nível máximo dessas duas variáveis. Por motivos operacionais, o volume inicial de  $\text{HNO}_3$  foi o fator estudado em cinco níveis e o tempo de sonicação, em três níveis. A matriz do planejamento e os percentuais de extração obtidos para os analitos estão descritos na Tabela 32. O tempo e velocidade de centrifugação foram 5 min e 2000 rpm, respectivamente.

A execução de um novo planejamento depende, sobretudo, dos resultados obtidos pela aplicação do critério de Lagrange para a função da resposta estimada. A localização de um ponto ótimo (máximo ou mínimo) com a zona experimental inclusa no planejamento deve necessitar do deslocamento do planejamento inicial para a região onde a resposta ótima é esperada (ZOUAGH *et al.*, 2000).

Diante dos resultados, foram definidas as condições experimentais para validação e aplicação do procedimento de extração dos analitos em 1,0 g de amostra de leite de coco empregando US. As condições de concentração ácida e tempo de sonicação, do meio extrator, foram respectivamente: 4% v v<sup>-1</sup> e 10 min (Tabela 33). Ou seja, optou-se pelos valores intermediários das variáveis investigadas no planejamento. Os percentuais de extração estiveram na faixa de: 91 a 127% para Ca; 73 a 93% para Cu; 85 a 98% para Fe; 91 a 104% para K; 100 a 112% para Mg; 81 a 91% para Mn; 92 a 108% para Na; 93 a 121% para P e 82 a 93% para Zn. Maiores recuperações foram obtidas para a maioria dos analitos nas condições do experimento 1 do planejamento Doehlert. Os resultados deste planejamento também foram avaliados em termos da resposta global e a observação dos percentuais de extração é mais visível quando se utiliza RG (Tabela 32).

**Tabela 32.** Matriz do planejamento Doehlert e percentuais de extração assistida por US para os analitos em amostras de leite de coco.

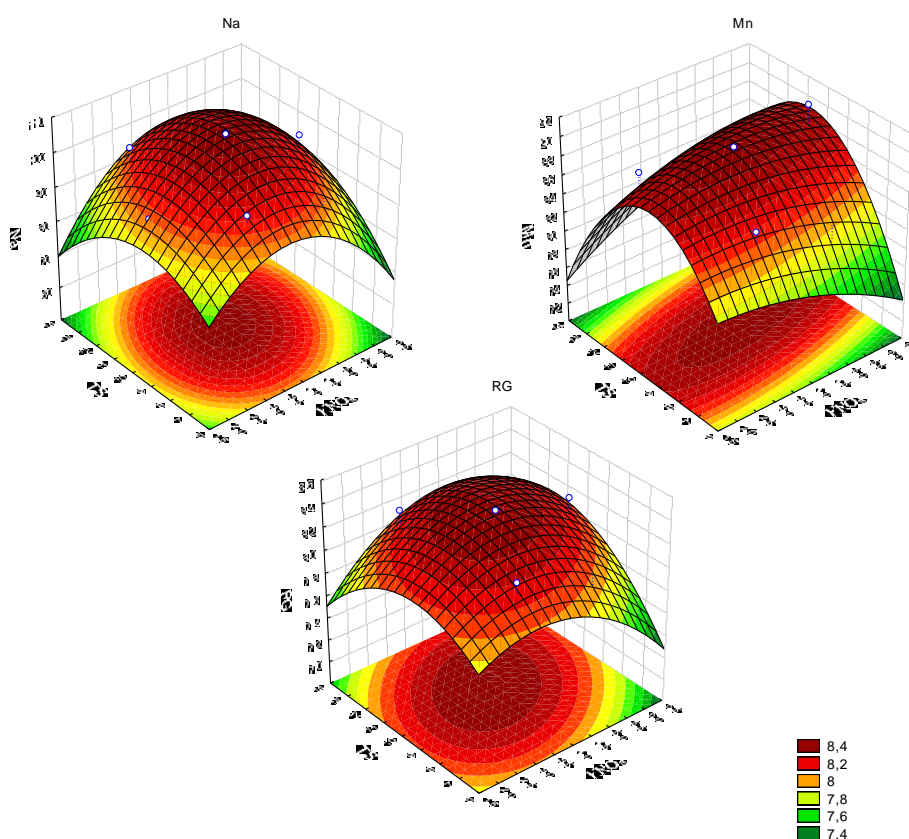
Exp.	HNO <sub>3</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	TS (min)	Extração (%)									
			Ca	K	Mg	Na	P	Cu	Fe	Mn	Zn	RG
1	4	10	109	104	112	108	93	73	98	90	93	8,41
2	6	10	91	96	103	98	100	93	95	91	91	8,25
3	5	13	127	95	102	98	97	78	89	83	86	8,14
4	2	10	108	94	101	93	107	82	86	87	90	8,08
5	3	7	95	98	106	100	113	85	91	87	89	8,26
6	5	7	107	91	100	92	112	77	85	81	82	7,86
7	3	13	98	96	104	98	121	84	89	85	88	8,24

TS: tempo de sonicação; RG: resposta global

**Tabela 33.** Valores críticos obtidos através da superfície de resposta do planejamento Doehlert em função da RG.

	Valor mínimo	Valor crítico	Valor máximo
Concentração HNO <sub>3</sub> (% v v <sup>-1</sup> )	2,0	3,98	6,0
Tempo Sonicação (min)	7,0	10,4	13,0

As superfícies de resposta para Mn e Na em termos de percentual de extração e considerando a resposta global estão apresentadas na Figura 25.



**Figura 25.** Superfície de resposta para Mn, Na e RG no planejamento Doehlert.

Uma característica importante do planejamento Doehlert é a possibilidade de variar os fatores estudados em diferentes níveis, aplicando-se, da forma mais conveniente, o número maior de níveis para o fator mais significativo, ou mesmo, para aquele que, operacionalmente, apresenta maior facilidade de variação, além de apresentar vantagens como necessidade de poucos pontos experimentais para sua aplicação e alta eficiência (FERREIRA *et al.*, 2002b, 2003, 2004).

### 2.7.2.2 – Validação do procedimento de extração assistido por US

Para avaliar o efeito de matriz na determinação dos analitos foram preparadas curvas analíticas em meio de ácido nítrico 4% v v<sup>-1</sup>, assim como foram preparadas curvas de adição de analito no meio de seis amostras após o procedimento de extração. As faixas de concentrações estudadas foram de 0,1 a 3,0

mg L<sup>-1</sup> para Cu, Fe, Mn e Zn; e 1,0 a 20,0 mg L<sup>-1</sup> para Ca, K, Mg, Na e P. Os coeficientes angulares (*a*) estão mostrados na Tabela 34. No total de 13 marcas de leite de coco disponível, foram escolhidas seis marcas para realizar esse estudo, que apresentam composição química semelhante às demais, seguindo informações que constam nos rótulos.

**Tabela 34.** Comparação dos dados de regressão usando soluções de referência preparadas em ácido nítrico e na matriz após procedimento de extração.

Coeficientes angulares das curvas analíticas									
Meios	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	P	Mg	Na
AC	22656	33755	138142	30543	2,00E+06	11083	594	345696	110586
KC	22041	34583	138646	30240	2,00E+06	11771	595	354789	100925
MN	20923	31503	129721	28670	2,00E+06	11939	560	332168	107748
SB	21593	32891	133976	29546	2,00E+06	11968	565	339826	100697
SY	22528	33980	139118	30541	2,00E+06	11719	605	347438	102352
BC	21714	33549	135245	29578	2,00E+06	11365	598	338660	104622
SC	20263	30232	124674	27166	2,00E+06	7674	474	239050	93015

AC: meio ácido; demais siglas equivalem às amostras avaliadas.

A Tabela 35 a seguir mostra a razão para os coeficientes angulares nos meios investigados considerando a solução ácida (AC) como base.

**Tabela 35.** Razão para os coeficientes angulares.

Razão									
	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	P	Mg	Na
KC	0,97	1,02	1,00	0,99	1,00	1,06	1,00	1,03	0,95
MN	0,97	0,95	0,94	0,97	1,00	1,08	0,94	0,96	0,97
SB	0,95	0,97	0,97	0,97	1,00	1,08	0,95	0,98	0,97
SY	0,99	1,01	1,01	1,00	1,00	1,06	1,02	1,01	0,97
MC	0,96	0,99	0,98	0,97	1,00	1,03	1,01	0,98	0,95
SC	0,89	0,90	0,90	0,89	1,00	0,69	0,80	0,69	0,84

Segundo a literatura, (RAMOS e ÁLVAREZ-COQUE, 2001), para que a matriz não interfira na determinação dos elementos a razão entre as inclinações das curvas

preparadas no meio da matriz e em solução ácida tem que ser próxima à unidade. Com os dados da Tabela 35 percebe-se que há um maior efeito de matriz para a amostra SC para todos os elementos, com exceção do Ca. Isto pode ser creditado ao fato desta amostra ser mais concentrada visualmente. Para o cálcio a inclinação foi a mesma para todos os meios avaliados. Os coeficientes angulares para as curvas analíticas em meio HNO<sub>3</sub> 4% v v<sup>-1</sup> e em meio da matriz foram comparados ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada diferença significativa para os elementos avaliados.

Os limites de detecção e quantificação, para a maioria dos elementos, foram relativamente próximos, quando se compara com os procedimentos de digestão. Os valores de LOD e LOQ obtidos estão na Tabela 36.

**Tabela 36.** Estimativa de limite de detecção e quantificação com detecção por ICP OES após extração assistida por US.

<b>Analitos</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
<b>Ca</b>	0,738	2,461
<b>Cu</b>	0,080	0,266
<b>Fe</b>	0,251	0,836
<b>K</b>	0,374	1,248
<b>Mg</b>	0,296	0,987
<b>Mn</b>	0,032	0,107
<b>Na</b>	1,031	3,502
<b>P</b>	0,353	1,178
<b>Zn</b>	0,220	0,735

A precisão, em termos de repetitividade dos procedimentos nas condições otimizadas, foi avaliada considerando dez ensaios da amostra. Os valores de CV % obtidos foram, em geral, compatíveis com os obtidos pelos procedimentos de digestão: Ca (4,1); Cu (1,7); Fe (3,6); K (2,6); Mg (2,2); Mn (4,0); Na (4,3); P (3,1) e Zn (3,9).

Para checar a exatidão do procedimento proposto foi utilizado material de referência certificado de leite bovino desnatado NIST SRM 1549. As concentrações médias dos analitos estão na Tabela 37. O teste estatístico revelou não haver diferenças significativas a 95% de confiança entre as médias de micro e macroelementos. Os elementos Cu, Fe e Mn não puderam ser determinadas uma vez

que, nas condições utilizadas para a extração (0,25 g/20 mL), as concentrações finais destes analitos estavam abaixo dos limites de quantificação do método.

**Tabela 37.** Determinação da composição do material de referência certificado NIST SRM 1549 por ICP OES após extração com ultrassom.

<b>NIST SRM 1549</b>		
<b>Elementos</b>	<b>Valor certificado</b>	<b>Valor obtido</b>
<b>Ca (%)</b>	1,300 ± 0,050	1,243 ± 0,028
<b>K (%)</b>	1,69 ± 0,03	1,68 ± 0,06
<b>Mg (%)</b>	0,120 ± 0,003	0,110 ± 0,005
<b>Na (%)</b>	0,497 ± 0,01	0,485 ± 0,06
<b>P (%)</b>	1,06 ± 0,02	0,85 ± 0,01
<b>Cu (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	0,7 ± 0,1	< LOQ
<b>Fe (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	1,78 ± 0,10	< LOQ
<b>Mn (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	0,26 ± 0,01	< LOQ
<b>Zn (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	46,1 ± 2,2	41,3 ± 0,9

A exatidão do método proposto também foi verificada por comparação com os resultados obtidos por decomposição de quatro amostras em bloco digestor. Os resultados estão na Tabela 38. Não houve diferença significativa a 95% de confiança para os elementos avaliados.



**Tabela 38.** Comparação da concentração média, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para amostras de leite de coco decompostas em bloco digestor (BL) e por extração com ultrassom (US).

Amostras	Proc.	Elementos							
		Ca	Cu	Fe	K	Mg	Na	P	Zn
BP	BL	38,7 ± 1,0	1,34 ± 0,01	5,44 ± 0,06	1544 ± 12	196 ± 1	518 ± 1	335 ± 9	3,50 ± 0,09
	US	36,8 ± 1,2	1,31 ± 0,06	5,38 ± 0,07	1545 ± 49	195 ± 5	516 ± 3	324 ± 24	3,23 ± 0,24
CV <sub>L</sub>	BL	78,4 ± 0,1	0,634 ± 0,003	1,98 ± 0,03	623 ± 31	83,5 ± 4,7	586 ± 40	133 ± 6	1,44 ± 0,05
	US	76,3 ± 0,9	< 0,266	1,99 ± 0,12	608 ± 1	86,1 ± 0,7	596 ± 11	139 ± 1	1,29 ± 0,12
QL	BL	44,5 ± 0,35	0,97 ± 0,02	5,70 ± 0,10	1540 ± 27	199 ± 2	484 ± 8	332 ± 3	2,99 ± 0,10
	US	44,0 ± 1,56	0,92 ± 0,06	5,52 ± 0,03	1545 ± 34	195 ± 4	480 ± 12	334 ± 7	2,80 ± 0,15
SB	BL	5,79 ± 0,77	0,52 ± 0,02	1,54 ± 0,09	406 ± 18	56,9 ± 3,1	360 ± 34	95 ± 9	0,96 ± 0,06
	US	5,81 ± 0,54	< 0,266	1,53 ± 0,14	410 ± 8	56,8 ± 2,5	373 ± 17	98 ± 4	< 0,735

O índice L significa *light*.

### 2.7.2.3 – Aplicação do procedimento assistido por US

O procedimento de extração foi aplicado em 14 amostras de leite de coco ressaltando, porém, que as amostras aplicadas pertenciam a lotes diferentes daquelas aplicadas aos procedimentos de digestão (Tabela 39).

As melhores condições para extração ultrassônica são dependentes das interações analito-matriz, do tipo de matriz e da técnica de quantificação usada (TADEO *et al.*, 2010).

O procedimento proposto assistido por US e usando, como meio extrator, solução diluída de ácido nítrico, foi adequado para a determinação dos analitos nas amostras investigadas. O perfil das amostras, em termos da composição química inorgânica, se repete como revelado nos procedimentos de decomposição ácida.

Foi necessária uma etapa adicional, a filtração, pois no final da centrifugação observou-se a formação de um sobrenadante sólido para todas as amostras, o que dificultava a retirada da fase líquida. Nesta etapa adicional tem-se a retenção de glóbulos de gordura da matriz, o que se torna atrativo uma vez que evita um possível depósito de matéria orgânica na tocha durante a análise dessas amostras.

Os planejamentos fatorial e Doehlert foram satisfatórios para se avaliar o sistema e se definir as condições experimentais otimizadas, no domínio estudado.

**Tabela 39.** Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos analitos presentes nas amostras de leite de coco após extração assistida por US (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Amostras	Elementos								
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
<b>BC</b>	131 $\pm$ 9,10	< 0,266	0,86 $\pm$ 0,01	649 $\pm$ 2	55,5 $\pm$ 1,4	< 0,107	385 $\pm$ 4	81,4 $\pm$ 0,5	2,42 $\pm$ 0,05
<b>BP</b>	36,8 $\pm$ 1,23	1,31 $\pm$ 0,06	5,38 $\pm$ 0,07	1545 $\pm$ 49	195 $\pm$ 5	1,84 $\pm$ 0,08	516 $\pm$ 3	324 $\pm$ 24	3,23 $\pm$ 0,24
<b>CV<sub>L</sub></b>	76,3 $\pm$ 0,92	< 0,266	1,99 $\pm$ 0,12	608 $\pm$ 1	86,1 $\pm$ 0,7	0,22 $\pm$ 0,01	596 $\pm$ 11	139 $\pm$ 1	1,29 $\pm$ 0,12
<b>CV<sub>T</sub></b>	52,9 $\pm$ 1,94	0,77 $\pm$ 0,07	5,35 $\pm$ 0,36	1367 $\pm$ 25	189 $\pm$ 7	1,54 $\pm$ 0,10	495 $\pm$ 7	341 $\pm$ 14	3,07 $\pm$ 0,18
<b>DC<sub>L</sub></b>	7,63 $\pm$ 0,83	< 0,266	1,72 $\pm$ 0,12	455 $\pm$ 13	61,9 $\pm$ 1,5	0,30 $\pm$ 0,01	334 $\pm$ 7	105 $\pm$ 3	0,77 $\pm$ 0,08
<b>DC<sub>T</sub></b>	24,4 $\pm$ 1,02	0,41 $\pm$ 0,10	2,64 $\pm$ 0,14	772 $\pm$ 6	112 $\pm$ 1	1,00 $\pm$ 0,03	316 $\pm$ 1	193 $\pm$ 4	1,32 $\pm$ 0,25
<b>KC</b>	10,7 $\pm$ 0,34	< 0,266	0,99 $\pm$ 0,08	272 $\pm$ 8	42,2 $\pm$ 1,3	< 0,107	361 $\pm$ 10	67,1 $\pm$ 2,2	< 0,735
<b>MC</b>	42,1 $\pm$ 2,67	0,28 $\pm$ 0,02	2,27 $\pm$ 0,04	914 $\pm$ 9	102 $\pm$ 3	0,67 $\pm$ 0,05	459 $\pm$ 15	160 $\pm$ 3	1,27 $\pm$ 0,20
<b>MN</b>	40,0 $\pm$ 2,51	< 0,266	2,20 $\pm$ 0,04	345 $\pm$ 27	50,4 $\pm$ 0,9	< 0,107	355 $\pm$ 12	84,3 $\pm$ 2,9	1,65 $\pm$ 0,28
<b>SB</b>	5,81 $\pm$ 0,54	< 0,266	1,53 $\pm$ 0,14	410 $\pm$ 8	56,8 $\pm$ 2,5	0,54 $\pm$ 0,04	373 $\pm$ 17	98 $\pm$ 4	< 0,735
<b>SN</b>	76,4 $\pm$ 1,94	< 0,266	1,18 $\pm$ 0,06	429 $\pm$ 14	58,7 $\pm$ 2,0	< 0,107	625 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3	1,26 $\pm$ 0,22
<b>SY</b>	115 $\pm$ 1,12	0,366 $\pm$ 0,001	2,64 $\pm$ 0,19	925 $\pm$ 4	96,1 $\pm$ 0,3	0,58 $\pm$ 0,01	512 $\pm$ 3	156 $\pm$ 1	1,16 $\pm$ 0,10
<b>QL</b>	44,0 $\pm$ 1,56	0,92 $\pm$ 0,06	5,52 $\pm$ 0,03	1545 $\pm$ 34	195 $\pm$ 4	1,84 $\pm$ 0,10	480 $\pm$ 12	334 $\pm$ 7	2,80 $\pm$ 0,15
<b>TQ</b>	56,7 $\pm$ 2,81	0,29 $\pm$ 0,04	2,68 $\pm$ 0,20	961 $\pm$ 40	104 $\pm$ 3	0,44 $\pm$ 0,04	446 $\pm$ 15	180 $\pm$ 5	2,09 $\pm$ 0,15

### **2.7.3 – Considerações Finais**

A utilização da energia ultrassônica em procedimentos de extração caracteriza-se por ser simples, eficiente, de fácil operação e baixo custo, promovendo recuperações quantitativas para vários elementos. Entretanto, a extração quantitativa depende fortemente da interação dos analitos com a matriz. Contudo, embora os métodos assistidos por ultrassom sejam promissores, há que considerar que as variáveis que influenciam na extração dos analitos sejam avaliadas visando extrações quantitativas. Neste contexto, a otimização multivariada é uma potente ferramenta, uma vez que as variáveis que afetam à extração de macro e micro-elementos, bem como suas interações podem ser estudadas de forma a se obter os valores ótimos de cada variável para todos os analitos investigados.

## 2.8 – AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DESENVOLVIDOS

Todas as estratégias de preparo de amostra empregadas neste trabalho possibilitaram uma melhor compreensão sobre a digestão de amostras de leite de coco, sendo desenvolvidos procedimentos versáteis para este tipo de matriz. Na Tabela 40 são comparadas as condições experimentais e alguns parâmetros dos procedimentos de preparo de amostra propostos para determinação de macro, microelementos em leite de coco industrializado por técnicas espectroscópicas.

**Tabela 40.** Comparação das características e condições experimentais dos procedimentos propostos para determinação de macro, micro e elementos traço em leite de coco. As siglas se referem aos procedimentos em bloco digestor (BL); micro-ondas (MW); ultrassom (US).

Parâmetros	BL	MW	US
<b>Massa de amostra (g)</b>	5,0	0,5	1,0
<b>HNO<sub>3</sub> (mL)</b>	4,0	3,5	0,8
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>	3,0	-	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	15,0	1,0	-
<b>Temperatura (°C)</b>	200	210	~ 30
<b>Tempo de preparo da amostra</b>	3h	38 min	15 min
<b>Operação antes da medida</b>	diluição para os macroelementos	-	filtração
<b>Conc. ácida final (mol L<sup>-1</sup>)</b>	3,0 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4,0 (HNO <sub>3</sub> )	0,8 (HNO <sub>3</sub> )
<b>Diluição final (mL)</b>	20,0	20,0	20,0
<b>Carbono residual médio (% m m<sup>-1</sup>)</b>	0,05	9,08	-

O sistema de digestão utilizando aquecimento condutivo em bloco digestor é uma alternativa simples e de baixo custo para a decomposição de amostras de leite de coco, porém foi o procedimento que teve o maior consumo de reagentes e mais demorado. O consumo de reagentes, neste caso, estava diretamente ligado à massa de amostra usada. O bloco digestor suporta até 40 tubos o que poderia ser vantajoso em termos de frequência analítica, no entanto, usar o número total de tubos torna-se inviável em termos de praticidade principalmente no que tange à adição de peróxido de hidrogênio.

A digestão assistida por micro-ondas reduz significativamente o tempo de preparo de amostra, quando comparado aos procedimentos convencionais. Vantagens no procedimento

em forno de micro-ondas com cavidade e uso de ácido nítrico diluído, quando comparado ao procedimento tradicional (ácido concentrado) foram observadas. Apesar dos digeridos obtidos por este procedimento apresentarem maior teor de carbono residual, isto não foi um fator limitante para as determinações dos analitos por ICP OES. Em contrapartida, foi necessário o emprego de duas técnicas espectroanalíticas para a quantificação dos elementos uma vez que a limitação da massa afetou a sensibilidade na determinação de alguns analitos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Há que se considerar também a limitação quanto a massa de amostra a ser aplicada neste tipo de procedimento, uma vez que a pressão gerada está associada ao volume de gás produzido durante a decomposição da amostra .

A minimização da etapa de preparo de amostra é outra vantagem adicional da técnica de análise direta. Em adição, outras vantagens como o baixo consumo de reagente em condições mais brandas de temperatura e pressão, diminui contaminação das amostras, bem como resíduos laboratoriais. O baixo custo de equipamentos de ultrassons e seu uso simples também são levados em consideração. Uma possível fonte de contaminação no procedimento desenvolvido neste trabalho é a etapa de filtração apresentando-se como uma desvantagem.

Sabe-se que as tabelas de composição de alimentos são importantes instrumentos para nutricionistas e profissionais de áreas afins. Entretanto, existem variações significativas entre os valores reportados por diferentes países, diferentes regiões e diferentes localidades, portanto é adequado que os países/regiões envidem esforços para construir suas próprias tabelas, haja visto que a importância dos alimentos e de uma dieta equilibrada à saúde humana tem sido enfatizada nos últimos tempos. De um modo geral, a população, tem-se preocupado cada vez mais com a qualidade dos alimentos consumidos, tanto em relação ao seu aspecto nutricional quanto aos possíveis efeitos que possam afetar diretamente a qualidade de vida.

Para traçar um perfil de um determinado tipo de matriz, seja ela alimentícia ou não, o ideal é que se aplique um maior número possível de amostras. Neste trabalho foram avaliadas 13 marcas de leite de coco. Um total de 73 amostras foram analisadas englobando os três procedimentos propostos indicando que o leite de coco pode ser uma boa fonte de micronutrientes. De acordo com um levantamento feito, no Brasil, são comercializadas 17 marcas de leite de coco. Apesar das amostras serem comercializadas na cidade de Salvador e a Bahia ser o maior produtor de coco no Brasil, nenhuma marca tem sua fabricação realizada neste estado.

### 3.0 - REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT NBRT ISO/IEC 17025, 2005.

ABU-SAMRA, A.; MORRIS, J. S.; KOIRTYOHANN, S. R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven, **Analytical Chemistry**, v. 47, n.8, p. 1475-1477, 1975.

ALAM, M.G.M.; SNOW, E.T.; TANAKA, A., Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. **The Science of the Total Environment**, v. 308, p.83–96, 2003.

ALBERTIN, R., *et al.*, Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para sala de aula. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 772-779, 1998.

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A.; JÚNIOR, D. S.; MULLER, R. C. S., Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 310-312, 2000.

ALMEIDA, E.; ASSALIN M. R.; ROSA, M. A.; DURÁN, N., Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.818-824, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Consulta Pública nº 80, de 13 de dezembro de 2004. D.O.U de 17/12/2004. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em 12 de Dezembro de 2011.

ANUNCIAÇÃO, D. S.; LEÃO, D. J.; JESUS, R. M.; FERREIRA, S. L. C. Use of multivariate analysis techniques for evaluation of analytical data—determination of the mineral composition of cabbage (*Brassica Oleracea*). **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 286-292, 2011.

ANVISA. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/manual\\_consumidor.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/manual_consumidor.pdf). Acesso em 23 de Janeiro de 2012.

ANVISA. Portaria n<sup>o</sup> 685, de 27 de agosto de 1998. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm). Acesso em 27 de Janeiro de 2012.

ANVISA. Resolução - CNNPA n<sup>o</sup> 12, de 1978. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_78\\_leite\\_coco.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_leite_coco.htm). Acesso em 08 de Novembro de 2010.

ANZANO, J. M.; GONZALEZ, P., Determination of iron and copper in peanuts by flame atomic absorption spectrometry using acid digestion. **Microchemical Journal**, v. 64, p. 141-145, 2000.

ARAUJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NOBREGA, J. A., Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta B**, v. 57, p. 2121–2132, 2002.

BAEZA M.; ALONSO, J.; BARTROLÍ, J., Residual aqueous ozone determination by gas diffusion reverse flow injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 388 –395, 2005.

BARNETT, N. W.; LENEHAN, C. E.; LEWIS, S. W., Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 346-353, 1999.

BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N.B.; Chemometric: A practical guide. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1998.

BEYENE, N. W.; STADEN, J. F. V.; STEFAN, R. I., Determination of fenoterolhydrobromide by sequential injection analysis with spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 521, p. 223–229, 2004.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLATO, R. S.; BARI, J. S.; NOBREGA, J. A., Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v. 2, p. 734-738, 2010.

BRASIL. Leis, etc. Portaria nº 16 de 13 de março de 1990: Fixa Limites Máximos de Tolerância de Chumbo em Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 15. mar. 1990. Seção I, p. 5436.

BRERETON, R.G., Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, New York, 2002.

BRODY, T.; Nutritional Biochemistry, Second Edition, p. 693-878, 1999.

BULDINI, P.L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. Review. **Journal of Chromatography**, v. 975, p. 47-70, 2002.

CARVALHO, R. F., Dossiê técnico - Industrialização do côco - beneficiamento (produção de côco ralado e leite de côco), Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA, 2007. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTA0>. Acesso 08 de Novembro de 2010.

CAVA-MONTESINOS, P.; CERVERA, M.L.; PASTOR, A.; LA GUARDIA, M., Determination of As, Sb, Se, Te and Bi in milk by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 62, p. 173-182, 2004.

CESARINO, I.; MORAES, F. C.; MACHADO, S. A. S.; FILHO, J. P.; CARDOSO A. A., A new indirect electrochemical method for determination of ozone in water using multiwalled carbon nanotubes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 6, p. 1512 – 1517, 2011.

CHEDL - Chemical Education Digital Library. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/blog/?s=tabela>. Acesso em 28 de Dezembro de 2011.

CHIANG, Y.; LIANG, Y.; CHANG, C.; CHAO, A. C., Differentiating ozone direct and indirect reactions on decomposition of humic substances, **Chemosphere**, v. 65, p. 2395–2400, 2006.



COELHO, N. M. M., Digestão em micro-ondas - uma nova proposta para o tratamento de amostras, Em: Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG - Ciência para o desenvolvimento, 2001. Belo Horizonte, Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG. Belo Horizonte. FAPEMIG, 2001.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C., Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

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

COSTIN, J. W.; FRANCIS, P.S.; LEWIS, S. W., Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 67-77, 2003.

COSTIN, J. W.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S.W., Determination of proline in wine using flow injection analysis with tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 64, p. 894-898, 2004.

DE SOUSA, R. A.; NETO, W. B.; POPPI, R. J.; BACCAN, N.; CADORE, S., Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES, **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654-656, 2006.

DE SOUSA, R. A.; SILVA, J. C. J.; BACCAN, N.; CADORE, S., Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 399-408, 2005.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R., Review - Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. **Talanta**, v. 51, p. 415 - 439, 2000.

DOLAN, S. P.; CAPAR, S. G., Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p. 593-615, 2002.

ECONOMOU, A., Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 416-425, 2005.

ECONOMOU, A., PANOUTSOU, P.; D. THEMELIS, G., Enzymatic chemiluminescent assay of glucose by sequential-injection analysis with soluble enzyme and on-line sample dilution. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 140 -147, 2006.

EMBRAPA. Disponível em: [http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_1943.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_1943.pdf). Acesso em 28 de Dezembro de 2011.

EPA - Environmental Protection Agency, Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, April 1999.

FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; GOMES, J. A. N.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P., Padronização interna em espectrofotometria de absorção atômica. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 249-252, 2003.

FERNÁNDEZ-TORRES, R.; PEREZ-BERNAL, J. L.; BELLO-LOPEZ, M. A.; CALLEJON-MOCHON, M.; JIMENEZ-SANCHEZ, J. C.; GUIRAUM-PEREZ, A., Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. **Talanta**, v. 65, p. 686–691, 2005.

FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V.; A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise., **Química Nova** v. 25, n. 6, p. 1003-1011, 2002a.

FERREIRA, S. L. C.; QUEIROZ, A.S.; FERNANDES, M.S.; DOS SANTOS, H.C., Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of variables associated with preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta B**, v. 57, p. 1939-1950, 2002b.

FERREIRA, S. L. C.; BEZERRA, M. A.; SANTOS, W. N. L.; NETO, B. N. Application of Doehlert designs for optimisation of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 61, p. 295-303, 2003.

FERREIRA, S.L.C.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; NETO, B.B.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - a review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E. ; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L. DOS; QUINTELLA, C. M ; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO, B., Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography**, v. 1158, p. 2-14, 2007a.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E. ; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D. ; DAVID, J. M.; BRANDAO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SANTOS, A. S.; SANTOS, W. N. L. DOS. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods- Review. **Analytical Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007b.

FERREIRA, K.S., GOMES, J.C., CHAVES, J.B.P., Copper content of commonly consumed food in Brazil. **Food Chemistry**, v. 92, p. 29-32, 2005.

FILHO, V. R.A.; POLITO, W. L. ;GOMES NETO, J. A. Comparative studies of the sample decomposition of green and roasted coffee for determination of nutrients and data exploratory analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 47-53, 2007.

GAO, C. Y.; FAN, S. H., Influence of zone stacking sequences on CL intensity and determination of histidine in sequential injection analysis. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1335–1347, 2008.

GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G., Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. **Analisis**, v. 28, p. 686-698, 2000.

GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G. Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.

GINÉ, M. F. Espectrometria de massas com fonte de plasma. Piracicaba: Piracicaba-SP: CENA, 1999.

GONZALEZ, M. H.; SANTOS, L. N.; NÓBREGA, J. A.; ROCHA, F. R. P., Construção de espectrômetro de emissão atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio (WCAES). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2266-2271, 2010.

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

GORDON, G., The chemistry and reactions of ozone in our environment. **Progress in Nuclear Energy**, v. 29 (Supplement), p. 89-96, 1995.

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

GROTTI, M.; MAGI, E.; LEARDI, R., Selection of internal standards in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry by principal component analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 274-281, 2003.

GUILBAULT, G. G.; HJELN, M.; Nomenclature for automation and mechanised analyses. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p. 1657-1664, 1998.

GURLEY, B., Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 39, p. 256-261, 1985.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C., Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v.37, p. 453 - 460, 2004.

HART, E. J.; SEHESTED, K.; HOLCMAN, J., Molar absorptivities of ultraviolet and visible bands of ozone in aqueous-solutions. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 46–49, 1983.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e qualidade industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - 4ª Edição, São Paulo, 2004, 1032 p.

KARADJOVA, I.; GIROUSI, S.; ILIADOU, E.; STRATIS, I., Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. **Microchimica Acta**, v. 134, p. 185-191, 2000.

KHADRO, B. *et al.*, Chemiluminescence of luminol for the determination of cobalt(II) adsorbed on a chitosan membrane. **Sensor Letters**, v. 7, p. 833-838, 2009.

KLAIC, P. M. A.; NUNES, A. M.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; RIBEIRO A. S., Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: sample treatment by acid digestion. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1895–1900, 2011.

KNAKE, R.; HAUSER, P. C., Sensitive electrochemical detection of ozone, **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 199–207, 2002.

KNAPP, G., Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration. **Microchimica Acta**, v. 104, p. 445-455, 1991.

KORN, M; ANDRADE, M. V. A. S; BORGES, S. S., Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som. **Analytica**, n. 3, p. 34-39, 2003.

KORN, M. G. A.; SANTOS, D. C. M. B; GUIDA, M. A. B.; BARBOSA, I. S.; PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C., Evaluation of digestion procedures for simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2278-2284, 2010.

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

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas**: VI Workshop sobre preparo de amostras, 6<sup>a</sup> edição, Santa Maria, 2008. 282p.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. J.; FONER, H.; MARTINES, L., Determination of the Residual Carbon Content by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry After Decomposition of Biological Samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, p. 845-850, 1992.

KU, Y.; SU, W.; Shen, Y., Decomposition Kinetics of Ozone in Aqueous Solution. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 3369-3374, 1996.

KUNZ, A.; FREIRE, R. S.; ROHWEDDER, J. J. R.; DURAN, N.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J., Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório, **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 425 – 428, 1999.

LATTANZIO, G. *et al.*, Chemiluminescence determination of sulphadiazine in drugs by flow injection analysis using the peroxyoxalate reaction in micellar medium. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 381–385, 2008.

LAU, C.; QIN, X.; LIANG, J.; LU, J., Determination of cysteine in a pharmaceutical formulation by flow- injection analysis with a chemiluminescence detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 45–49, 2004.

LI, J.; LI, Q.; DYKE, J. V.; DASGUPTA, P. K., Atmospheric ozone measurement with an inexpensive and fully automated porous tube collector-colorimeter. **Talanta**, v. 74, p. 958–964, 2008.

LINDER, M.C., Nutritional biochemistry and metabolism with clinical application. 2. ed. International Edhion. East Norwalk: CT. Prentice-Hall International Inc., 1991. cap. 6, nutrition and metabolism of the major minerals - cap. 7, nutrition and metabolism of the trace elements, p. 191-276.

LIU, W.; CAO, W.; LIU, W.; DU, K.; GONG, P., Determination of phenol by flow-injection with chemiluminescence detection based on the hemin-catalysed luminol–hydrogen peroxide reaction. **Spectrochimica Acta A**, v. 85, p. 283 – 287, 2012.

LIU, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y., Chemiluminescence micro-flow system for rapid determination of chemical oxygen demand in water. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 141–146, 2008.

MARQUETTE, C. A.; BLUM, L. J., Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 546–554, 2006.

MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R., Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

McGOWAN, K. A.; PACEY, G. E., Flow-injection analysis chemiluminescence detection of residual ozone, **Talanta**, v. 42, p. 1045–1050, 1995.

MEI, Y.; *et al*, A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 871–876, 2007.

MICHAŁOWSKI, J.; HAŁABURDA, P.; KOJTO, A., Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 438. p. 143–148, 2001.

MIN, R. W.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J., On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 320, p. 199–205, 1996.

MING, C.; XIUHUA, W.; YIFENG, T., A luminol-based micro-flow-injection electrochemiluminescent system to determine reactive oxygen species. **Talanta**, v. 85 p. 1304–1309, 2011.

MIRÓ, M.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V., Potentials of multisyringe flow injection analysis for chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 541, p. 57-68, 2005.

MIYAMOTO, A. *et al*, Quasi-simultaneous determination of antioxidative activities against superoxide anion and nitric oxide by a combination of sequential injection analysis and flow injection analysis with chemiluminescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1809–1814. 2007.

MOMEN, A.A., ZACHARIADIS, G.A., ANTHEMIDIS, A.N., AND STRATIS, J.A., Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, p. 81–88, 2006.

MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A., Optimization and comparison of two digestion methods for multi-element analysis of certified reference plant materials by I CP-A E S. Application of Plackett-Burman and central composite designs. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 397-403, 2008.

MONTASER, A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Wiley, NY, 1998.

MORTE, E.S.B.; COSTA, L.M.; NÓBREGA, J.A.; KORN, M.G.A., Multi-element determination in acid-digested soy protein formulations by inductively coupled plasma–optical emission spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v.25, p.616–621, 2008.

MOTYKA, K.; ONJIA, A.; MIKUŠKA, P.; VEČEŘA, Z., Flow-injection chemiluminescence determination of formaldehyde in water. **Talanta**, v. 71, p. 900-905, 2007.

NAVAS, M.J.; JIMÉNEZ, A. M., Review of chemiluminescent methods in food analysis. **Food Chemistry**, v. 55 , n. 1, p. 7-15, 1996.

NERY, A. L. P; BAADER, W. J., Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição de 1,2 – Dioxetano. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 626-636, 2001.

NETO, M. F.; GHEYI, H. R.; HOLANDA, J. S.; MEDEIROS, J. F.; FERNANDES, P. D.; Qualidade do fruto verde de coqueiro em função da irrigação com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 69-75. 2002.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E., Como Fazer Experimentos, Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Editora da Unicamp, 4ª Ed., Campinas, 2010.

NÓBREGA, J. A.; CARRILHO, E. N. V. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; CRUZ, G. An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 371, p. 536-540, 2001.

OKADA, I. A.; DURAN, M. C.; BUZZO, M. L.; DOVIDAUSKAS, S.; SAKUMA, A. M.; ZENEBON, O., Validation and application of an analytical method for determining inorganic nutrients in milled rice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 27, n. 3, p. 492-497, 2007.

OLIVEIRA, E., Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

OMS, M.T.; CERDÀ, A.; CLADERA, A.; CERDS, V.; FORTEZA, R., Gas diffusion techniques coupled sequential injection analysis for selective determination of ammonium. **Analytica Chimica Acta**, v. 318, p. 215-260, 1996.

ONG, C.C., Direct analysis of plant minerals and comparison of extraction process using ICP-AES. **Food Chemistry**, v. 45, p. 145-149, 1992.

OYMAK, T., TOKALIOGLU, S., YILMAZ, V., KARTAL, S., AYDIN, D., Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method. **Food Chemistry**, v.113, p. 1314-1317, 2009.

PANOUTSOU, P.; ECONOMOU, A., Rapid enzymatic chemiluminescent assay of glucose by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection method, **Talanta**, v. 67, p. 603–609, 2005.

PAREDES, E. ; MAESTRE, S. E.; TODOLÍ, J. L. A new continuous calibration method for inductively coupled plasma spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 2, p. 531-541, 2006.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO M. D. L., Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 644-653, 2004.

PROJAHN, H. D.; STEEG, U.; SANDERS, J.; VANCLAY, E., Application of the reference – element technique for fast sequential flame atomic –absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p.1083-1087, 2004.

RAMOS, G. R.; ÁLVAREZ-COQUE, M. C.G. **Qumiometría**. Editorial Sintesis, Madrid, 2001, 238p.

ROJAS, E.; HERRERA, L. A.; POIRIER, L. A.; OSTROSKY-WEGMAN, P., Are metals dietary carcinogens? **Mutation Research**, v. 443, p.157–181, 1999.

RODUSHKIN, I.; ENGSTRÖM, E.; SÖRLIN, D.; BAXTER, D., Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 290-304, 2008.

ROTH, J. A.; SULLIVAN, D. E., Solubility of Ozone in Water. **Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 20, n. 2, p.137-140, 1981.

RUBIN, M. B., The history of ozone. The Schönbein period, 1839-1868. **Bulletin for the History of Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 40-56, 2001.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D., Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 237, p. 329-343, 1990.

SANTANA, I. A.; RIBEIRO, E. P.; IGUTI, A. M., Evaluation of green coconut (*Cocos nucifera* L.) pulp for use as milk, fat and emulsifier replacer in ice cream. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1447 – 1453, 2011.

SANTOS, D. C. M. B., **Avaliação de sistemas de preparo de amostras de biodiesel visando determinação de metais e fósforo por ICP OES**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SANTOS et al., Sequential injection chemiluminescence methodology for ozone evaluation. **Analytical Letters**, v. 44, p. 117–126, 2011.

SANTOS, E. B. G. N., **Estudos da aplicação de soluções ozonizadas de ácido nítrico para o preparo de amostras em recipiente fechado auxiliado por micro-ondas**. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade Estadual da Bahia, Salvador, 2009.

SANTOS JR, D.; KRUG, F.J.; PEREIRA, M. G.; KORN, M., Currents on ultrasound-assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, p. 305-321, 2006.

SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MACKAWA, A., Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 299-304, 1996.

SHIN, H. S., Simple and simultaneous determination of free chlorine, free bromine and ozone in water by LC. **Chromatographia**, v. 71, p. 647-651, 2010.

SILVA; L. M., JARDIM; W. F., Trends and strategies of ozone application in environmental problems. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 310-317, 2006.

SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K. K.; REDDY, A. K., Sample Preparation of Solid Samples for Metal Determination by Atomic Spectroscopy - An Overview and Selected Recent Applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 1 p. 1 – 14, 2006.

SOARES, V.A. *et al.*, Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). **Food Control**, v. 21, p. 45–49, 2010.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I., Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1048–1055, 2009.

SONG, Z.; HOU, S.; Sub-picogram determination of vitamin B12 in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, p. 71–79, 2003.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

STADEN, J. F.V., Analytical aspects of chemical process control. Part 1.Fundamentals. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 2303-2308, 1999.

STRAKA, M. R.; GORDON, G.; PACEY, G. E., Residual aqueous ozone determination by gas diffusion flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1799-1803, 1985.

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

SU, Y.; CHEN, H.; WANG, Z.; LV, Y., Recent Advances in Chemiluminescence. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 139 – 176, 2007.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos / NEPA –UNICAMP.- 4ª edição revisada e ampliada. Campinas-SP: NEPA-UNICAMP, 2011, 161 p.

TADEO, J.L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I., Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples - review. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2415–2440, 2010.

TAKAYANAGI, T.; DASGUPTA, P.K., A chemiluminescence-based continuous flow aqueous ozone analyzer using photoactivated chromotropic acid. **Talanta** v. 66, p. 823–830, 2005.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M.M.C., Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THOMPSON, M *et al.*, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M.; OWEN, L.; WILKINSON, K.; WOOD, R.; DAMANT, A. A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. **Analyst**, v. 127, n. 12, p. 1666-1668, 2002.

TODOLI, J. L.; GRAS, L.; HERNANDIS, V.; MORA, J., Elemental matrix effects in ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, p.142–169, 2002.

TODOLÍ, J. L.; MERMET, J. M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. **Spectrochimica Acta B**, v. 54, p. 895-929, 1999.



TOMIYASU, H.; FUNKUTOMI, H.; GORDON, G., Kinetics and mechanism of ozone decomposition in basic aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 2962-2966, 1985.

TUCKER, D. J. et al., The fountain cell – a new tool for chemiluminescence analysis by flow-injection. **Analyst**, v. 119, p. 975–979, 1994.

TUZEN, M. ; SAYGI, K. O. ; KARAMAN, I. ; SOYLAK, M., Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 41–46, 2010.

VINAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M., Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 121–130, 2000.

VOGEL. **Análise química quantitativa**. 6 ed. LTC. Rio de Janeiro. 2002, 462p.

ZAGATTO, E. A. G.; STADEN, J. F. V.; MANIASSO, N.; STEFAN, R. I.; MARSHALL, G. D., Information essential for characterizing a flow-based analytical system. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 585–592, 2002.

ZHANG, R. Q. *et al.*, Sequential injection chemiluminescence immunoassay for anionic surfactants using magnetic microbeads immobilized with an antibody. **Talanta**, v. 68, p. 231–238, 2005.

ZHANG, J.; WU, M.; CHEN, D.; SONG, Z., Ultrasensitive determination of melamine in milk products and biological fluids by luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1038–1042, 2011.

ZOUGAGH, M; RUDNER, P.C.; TORRES, A.G.; PAVON, J.M., Application of Doehlert matrix and factorial designs in the optimization of experimental variables associated with the on-line preconcentration and determination of zinc by flow injection inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, p. 1589-1594, 2000.