

**SISTEMAS MECANIZADOS ACOPLADOS A FORNO DE  
MICROONDAS PARA A MINERALIZAÇÃO EM LINHA  
DE AMOSTRAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO:  
DETERMINAÇÃO DE FERRO E COBALTO**

**EDENIR RODRIGUES PEREIRA FILHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração: Química Analítica.

**CAMPINAS**

**Estado de São Paulo - Brasil**

**Março - 1999**

**SISTEMAS MECANIZADOS ACOPLADOS A FORNO DE  
MICROONDAS PARA A MINERALIZAÇÃO EM LINHA  
DE AMOSTRAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO:  
DETERMINAÇÃO DE FERRO E COBALTO**

**EDENIR RODRIGUES PEREIRA FILHO**

**Químico**

**Orientador: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Instituto de Química, da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do  
título de Mestre em Química, Área de  
Concentração: Química Analítica.**

**CAMPINAS**

**Estado de São Paulo - Brasil**

**Março - 1999**

**Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meu pais, Maria do Carmo e Edenir, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida e do meu trabalho.**

**Às minhas irmãs, Eliene e Elaine pelo estímulo.**

**Agradeço ao amigo, orientador e Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela impecável orientação e apoio diário.**

**Agradeço à Universidade Estadual de Campinas e, em especial, ao Instituto de Química pelas estimulantes oportunidades de estudo oferecidas.**

**Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.**

**Agradeço aos companheiros do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM): Flávia, Carlos, Clésia, Maria do Carmo, Ângela e Luciana.**

**Agradeço aos colegas do laboratório: Alex, Aline, Billy, Cláudio, Lilian, Heloísa, Alessandra e Prof. Dr. Renato Atílio Jorge.**

**Agradeço aos professores Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder, Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, Prof. Dr. Célio Pasquini, Prof. Dr. João Carlos de Andrade, Prof. Dr. Francisco José Krug, ao Dr. Cesar Mello, ao Sr. Paulo Augusto da Costa Filho e ao Sr. Luís Fernando Rebel Machado, pelas contribuições que enriqueceram imensamente este trabalho.**

**Agradeço aos funcionários do Instituto de Química pela colaboração e pela atenção.**

**Os homens fariam muitas coisas,  
se não julgassem tantas coisas  
impossíveis.**

**Malecherbes**

# SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | VII |
| LISTA DE TABELAS.....  | X   |
| RESUMO .....   | XI  |
| ABSTRACT .....   | XII |
| CAPÍTULO 1.....  | 1   |
| I. INTRODUÇÃO .....  | 2   |
| II. OBJETIVOS .....  | 3   |
| III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 3   |
| A. <i>TEORIA DAS MICROONDAS</i> .....  | 3   |
| B. <i>EMPREGO DE FORNOS DE MICROONDAS PARA PREPARO DE AMOSTRAS..</i>                                 | 4   |
| C. <i>ACOPLAMENTO DE SISTEMAS DE FLUXO A FORNOS DE MICROONDAS</i> .....                              | 9   |
| D. <i>IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO FERRO</i> .....   | 16  |
| IV. PARTE EXPERIMENTAL.....  | 17  |
| A. <i>MATERIAL</i> .....   | 17  |
| B. <i>REAGENTES E SOLUÇÕES</i> .....   | 18  |
| C. <i>AMOSTRAS</i> .....   | 19  |
| D. <i>DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA: SISTEMA DE FLUXO ACOPLADO A FORNOS DE MICROONDAS CASEIRO</i> ..... | 19  |
| E. <i>DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FERRO</i> .....  | 21  |
| V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 22  |
| A. <i>CONSIDERAÇÕES DE SEGURANÇA</i> .....   | 22  |
| B. <i>CALIBRAÇÃO DO FORNO</i> .....  | 23  |
| C. <i>INVESTIGAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MICROONDAS DENTRO DO FORNO</i>                                | 25  |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>D.</b>   | <b>INVESTIGAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E ESTABILIZAÇÃO DA SUSPENSÃO .....</b> | <b>26</b> |
| <b>E.</b>   | <b>INVESTIGAÇÃO DA ALÇA DE AMOSTRAGEM.....</b>                                 | <b>27</b> |
| <b>F.</b>   | <b>INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MINERALIZAÇÃO.....</b>                        | <b>27</b> |
| <b>G.</b>   | <b>DETERMINAÇÃO DE FERRO .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>H.</b>   | <b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>I.</b>   | <b>ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....</b>  | <b>32</b> |
|             | <b>CAPÍTULO 2.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>I.</b>   | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>II.</b>  | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>A.</b>   | <b>IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO COBALTO .....</b>                                | <b>34</b> |
| <b>B.</b>   | <b>DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO .....</b>                       | <b>35</b> |
| <b>C.</b>   | <b>RECURSOS QUIMIOMÉTRICOS: REDE NEURAL E ALGORITMO GENÉTICO ..</b>            | <b>37</b> |
| <b>III.</b> | <b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>A.</b>   | <b>MATERIAL .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>B.</b>   | <b>REAGENTES E SOLUÇÕES .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>C.</b>   | <b>AMOSTRAS .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>D.</b>   | <b>DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO .....</b>                       | <b>43</b> |
| <b>E.</b>   | <b>OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETERMINAÇÃO DE COBALTO.....</b>                | <b>44</b> |
| <b>1.</b>   | <b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>2.</b>   | <b>EXPERIMENTOS DEFINITIVOS .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>F.</b>   | <b>ACOPLAMENTO DO FORNO DE MICROONDAS AO COMPUTADOR.....</b>                   | <b>45</b> |
| <b>G.</b>   | <b>INFLUÊNCIA DOS CONCOMITANTES.....</b>                                       | <b>45</b> |
| <b>H.</b>   | <b>DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO .....</b>                       | <b>46</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>I.</b>  | <b>CONFIGURAÇÃO DAS VÁLVULAS.....</b>                                | <b>46</b> |
| <b>IV.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                   | <b>46</b> |
| <b>A.</b>  | <b>OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA A DETERMINAÇÃO DE COBALTO .....</b> | <b>46</b> |
| <b>1.</b>  | <b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....</b>                               | <b>46</b> |
| <b>2.</b>  | <b>EXPERIMENTOS DEFINITIVOS .....</b>                                | <b>48</b> |
| <b>B.</b>  | <b>PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA O CONTROLE DO SISTEMA .....</b>       | <b>52</b> |
| <b>C.</b>  | <b>CONCOMITANTES .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>D.</b>  | <b>INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MINERALIZAÇÃO.....</b>              | <b>64</b> |
| <b>1.</b>  | <b>MEXILHÃO .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>2.</b>  | <b>FÍGADO BOVINO .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>3.</b>  | <b>PEIXE .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>E.</b>  | <b>DETERMINAÇÃO DE COBALTO .....</b>                                 | <b>69</b> |
| <b>F.</b>  | <b>SUPERFÍCIE DA BOBINA DE MINERALIZAÇÃO .....</b>                   | <b>69</b> |
| <b>G.</b>  | <b>CONFIGURAÇÃO DAS VÁLVULAS.....</b>                                | <b>73</b> |
| <b>H.</b>  | <b>REAVLIAÇÃO DAS MINERALIZAÇÕES.....</b>                            | <b>77</b> |
| <b>1.</b>  | <b>MEXILHÃO .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>2.</b>  | <b>FÍGADO BOVINO .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>3.</b>  | <b>PEIXE .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>4.</b>  | <b>AMOSTRAS NÃO CERTIFICADAS .....</b>                               | <b>81</b> |
| <b>I.</b>  | <b>CARBONO RESIDUAL .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>J.</b>  | <b>COMPARAÇÃO DE RESULTADOS.....</b>                                 | <b>82</b> |
|            | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>84</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                               | <b>87</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Esquema de um forno de microondas convencional.....  | 4  |
| Figura 2: Sistema de fluxo acoplado a fornos de microondas.....  | 10 |
| Figura 3: Sistema utilizado na mineralização de amostras .....   | 20 |
| Figura 4: Válvula empregada para o aprisionamento de suspensões.....   | 21 |
| Figura 5: Sistema de fluxo empregado na determinação de ferro.....   | 22 |
| Figura 6: Curva da potência real obtida para o forno de microondas caseiro. ....   | 24 |
| Figura 7: Posições dos béqueres (A-J) no interior do forno de microondas caseiro.....  | 25 |
| Figura 8: Superfície de resposta obtida devido a influência da atuação das microondas nas diferentes posições dos béqueres (eixos x e y) na perda de massa. .... | 26 |
| Figura 9: Resposta para o ferro em amostras de ostra preparadas em $\text{HNO}_3$ 6 mol $\text{L}^{-1}$ . ....   | 28 |
| Figura 10: Resposta para o ferro em amostras de ostra preparadas em $\text{HNO}_3$ 8 mol $\text{L}^{-1}$ . ....  | 29 |
| Figura 11: Sinais analíticos obtidos quando o sistema tampão era insuficiente para manter o pH da zona de amostra em 3,7. ....                                   | 30 |
| Figura 12: Sinais analíticos obtidos para a determinação espectrofotométrica de ferro, após a mineralização em forno de microondas.....                          | 31 |
| Figura 13: Reação de oxidação de Tiron por $\text{H}_2\text{O}_2$ .....  | 35 |
| Figura 14: Sistema de fluxo proposto por Isshiki <i>et al</i> para a determinação de cobalto .....   | 36 |
| Figura 15: Diagrama de fluxo. ....   | 37 |
| Figura 16: Representação operacional de uma rede neural. ....  | 38 |
| Figura 17: Esquema de funcionamento de um algoritmo genético. ....   | 39 |
| Figura 18: Sistema de fluxo monossegmentado empregado na determinação de cobalto.....  | 43 |
| Figura 19: Análise por componentes principais (PCA) dos experimentos executados no planejamento fatorial. ....   | 49 |
| Figura 20: Erro médio das previsões em função do número de neurônios empregados para a etapa de calibração. ....   | 50 |
| Figura 21: Configuração da rede neural utilizada na otimização dos experimentos.....   | 51 |
| Figura 22: Codificação das variáveis Tiron, $\text{H}_2\text{O}_2$ e tempo em números binários. ....   | 51 |
| Figura 23: Cartão de controle do forno de microondas caseiro.....  | 52 |
| Figura 24: Funcionamento da chave lógica 4016. ....  | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25: Página de controle do programa computacional.....  | 54 |
| Figura 26: " <i>Frame Control</i> " da página de controle do programa.....  | 54 |
| Figura 27: " <i>Frame Microwave</i> " da página de controle do programa.....  | 55 |
| Figura 28: " <i>Frame Digestion</i> " da página de controle do programa.....  | 55 |
| Figura 29: " <i>Frame Determination</i> " da página de controle do programa.....  | 56 |
| Figura 30: Curva analítica na determinação de cobalto.....  | 56 |
| Figura 31: " <i>Frame Graphic</i> " da página de controle do programa.....  | 57 |
| Figura 32: Técnicas do programa.....  | 57 |
| Figura 33: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo ferro como<br>concomitante em concentrações menores.....  | 58 |
| Figura 34: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo ferro como<br>concomitante em concentrações maiores.....  | 59 |
| Figura 35: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo cobre como<br>concomitante.....   | 59 |
| Figura 36: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo níquel como<br>concomitante.....  | 59 |
| Figura 37: (a) Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo manganês<br>como concomitante. (b) Interferência para outras proporções investigadas.....   | 60 |
| Figura 38: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo magnésio<br>(a) e cálcio (b) como concomitantes.....  | 60 |
| Figura 39: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo alumínio<br>(a) e zinco (b) como concomitantes.....   | 61 |
| Figura 40: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo crômio (III)<br>(a) e crômio (VI) (b) como concomitantes.....                                   | 61 |
| Figura 41: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo chumbo como<br>concomitante.....  | 62 |
| Figura 42: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo fosfato como<br>concomitante.....   | 62 |
| Figura 43: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo EDTA<br>(a) e citrato (b) como concomitantes.....   | 63 |
| Figura 44: Resposta para cobalto empregando (a) $\text{HNO}_3$ 1 mol $\text{L}^{-1}$ ; e (b) $\text{HNO}_3$ 3 mol $\text{L}^{-1}$ .....                                 | 65 |
| Figura 45: Resposta empregando (a) $\text{HNO}_3$ 3 mol $\text{L}^{-1}$ ; (b) $\text{HNO}_3$ 6 mol $\text{L}^{-1}$ e<br>(c) $\text{HNO}_3$ 12 mol $\text{L}^{-1}$ ..... | 66 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 46: Resposta para o cobalto em amostra de fígado bovino, variando-se a concentração de $H_2O_2$ .   | 67 |
| Figura 47: Resposta para determinação de o cobalto em peixe empregando: (a) $HNO_3$ 3 mol $L^{-1}$ ; (b) $HNO_3$ 3 mol $L^{-1}$ e variando-se a concentração de $H_2O_2$ . | 68 |
| Figura 48: Resposta para o cobalto em amostras de peixe com diferentes fatores de diluição.  | 68 |
| Figura 49: Cortes efetuados na bobina de mineralização.  | 70 |
| Figura 50: Micrografia realizada a partir de um Teflon® novo.  | 71 |
| Figura 51: Micrografia realizada a partir da porção inicial, de acordo com a figura 49.  | 71 |
| Figura 52: Micrografia realizada a partir da porção mediana, de acordo com figura 49.  | 72 |
| Figura 53: Micrografia realizada a partir da porção central, de acordo com a figura 49.  | 72 |
| Figura 54: Válvula para a mineralização de suspensões, confeccionada em Teflon®.   | 73 |
| Figura 55: Diferentes vistas da válvula para a mineralização das suspensões, confeccionada em Teflon®.   | 74 |
| Figura 56: Diferentes vistas da válvula para introdução das suspensões, confeccionada em acrílico.   | 74 |
| Figura 57: (a) Vista superior do quarto modelo de válvula proposto para a mineralização das amostras e (b) vista lateral.  | 75 |
| Figura 58: Disposição das bobinas de mineralização no interior do forno de microondas.   | 76 |
| Figura 59: Disposição das linhas de transmissão no forno de microondas.  | 76 |
| Figura 60: Vista superior do sistema de mineralização.   | 77 |
| Figura 61: Sistema para coleta das amostras mineralizadas.   | 77 |
| Figura 62: Resposta para a amostra de mexilhão.  | 78 |
| Figura 63: Resposta na análise de mexilhão para cada bobina de mineralização utilizada.  | 78 |
| Figura 64: Resposta na análise de fígado bovino para cada bobina de mineralização utilizada.   | 79 |
| Figura 65: (a) Resposta em amostras não filtradas e (b) amostras filtradas.  | 79 |
| Figura 66: Resposta para a amostra de peixe com o emprego de $HNO_3$ 12 mol $L^{-1}$ .   | 80 |
| Figura 67: Comportamento da potência, temperatura e pressão durante a mineralização da amostra certificada de peixe.   | 82 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1: Sistemas de fluxo acoplados a fornos de microondas para o preparo de amostras... | 15 |
| Quadro 2: Níveis de Potência do forno de microondas caseiro.....                           | 23 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Resultados obtidos para as amostras certificadas e as amostras não certificadas de peixe. ....   | 32 |
| Tabela 2: Impressões obtidas para os primeiros experimentos preliminares. ....   | 47 |
| Tabela 3: Resultados obtidos para o segundo experimento preliminar.....  | 47 |
| Tabela 4: Características do experimento fatorial executado. ....  | 48 |
| Tabela 5: Funções do forno de microondas e suas respectivas "trilhas" de controle. ....  | 53 |
| Tabela 6: Resumo dos resultados obtidos nos testes com concomitantes. ....   | 63 |
| Tabela 7: Concentrações dos metais estudados nas amostras certificadas. ....   | 64 |
| Tabela 8: Tratamento estatístico para os testes efetuados nas diferentes amostras certificadas. ....   | 69 |
| Tabela 9: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras certificadas. ....   | 69 |
| Tabela 10: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras certificadas. ....  | 80 |
| Tabela 11: Programa utilizado para a mineralização das amostras.....   | 82 |
| Tabela 12: Programa de aquecimento do forno de grafite. ....   | 83 |
| Tabela 13: Resultados obtidos para cobalto na comparação na comparação das metodologias.....   | 83 |
| Tabela 14: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras de ostra, peixe e mexilhão para posterior determinação de ferro. ....           | 85 |
| Tabela 15: Resumo da otimização efetuada para a determinação de cobalto. ....  | 86 |
| Tabela 16: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras de mexilhão, fígado bovino e peixe para posterior determinação de cobalto. .... | 86 |

# SISTEMAS MECANIZADOS ACOPLADOS A FORNO DE MICROONDAS PARA A MINERALIZAÇÃO EM LINHA DE AMOSTRAS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO: DETERMINAÇÃO DE FERRO E COBALTO

**Autor: Edenir Rodrigues Pereira Filho**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda**

## RESUMO

A simplificação das operações prévias no processo analítico é caracterizada como um fator essencial para minimizar o tempo requerido no preparo de uma amostra. Neste sentido, um sistema mecanizado para a mineralização em linha de suspensões de alimentos foi desenvolvido para a determinação de ferro e cobalto.

Uma suspensão estabilizada é introduzida em um fluxo carregador de ar até uma bobina de mineralização localizada dentro da cavidade de um forno de microondas caseiro. Um *software* escrito em Visual Basic® 3.0 foi desenvolvido para permitir o transporte da suspensão, programar o forno de microondas, e controlar a válvula de mineralização.

O sistema proposto foi otimizado para a determinação de ferro e cobalto em amostras certificadas, tais como, mexilhão, ostra, fígado bovino e peixe e amostras não certificadas de peixe. Na determinação de ferro, as suspensões de ostra foram preparadas em HNO<sub>3</sub> conc. mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6% (v/v), para as amostras de peixe e mexilhão, foi utilizada água régia mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (v/v). O método proposto apresentou uma faixa linear de 50 a 200 µg L<sup>-1</sup> ( $r > 0,999$ ) e precisão, expressa como RSD, de 3,7% (n=10) para a repetibilidade e 5,0% (n=30) para a reprodutibilidade.

No método espectrofotométrico para a determinação catalítica de cobalto, o processo de otimização explorou recursos quimiométricos (redes neurais e algoritmo genético), e os parâmetros da mineralização foram estabelecidos como HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> para o mexilhão, HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,16% (v/v) para o fígado bovino, e HNO<sub>3</sub> 12 mol L<sup>-1</sup> para o peixe. O método proposto apresentou uma faixa linear de 10 a 50 ng L<sup>-1</sup> ( $r > 0,994$ ) e limite de detecção e quantificação de 1,7 e 5,5 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A exatidão dos métodos propostos foi investigada com a utilização de amostras certificadas e técnicas alternativas (FAAS e ETAAS).

# MECHANIZED SYSTEMS CONNECTED TO MICROWAVE OVEN FOR ON LINE MINERALIZATION OF FOOD SAMPLES: DETERMINATION OF IRON AND COBALT

**Author: Edenir Rodrigues Pereira Filho**

**Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda**

## ABSTRACT

The simplification of the usual steps in an analytical process is characterized as an essential factor to minimize the time required for sample preparation. In this way, a mechanized system for on-line mineralization of slurry food samples was developed in order to determine iron and cobalt.

The stabilized slurry sample is introduced into an air carrier stream until reaching the mineralization coil located inside a household microwave oven. A software written in Visual Basic<sup>®</sup> 3.0 was developed in order to permit the transport of the slurry samples and the programming of the microwave oven as well as the control of the mineralization valve.

The proposed system was optimized for determination of iron and cobalt in certified samples such as mussels, oysters, bovine liver and fish as well as uncertified fish samples. In the iron determination, the oyster slurries were prepared in conc. HNO<sub>3</sub> plus 6% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas for fish and mussels, *aqua regia* plus 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were employed. The proposed method features a linear range from 50 to 200 µg L<sup>-1</sup> (r>0.999) and presents a precision, expressed as RSD, of 3.7% (n=10) for repeatability and 5.0% (n=30) for reproducibility.

In the spectrophotometric method for catalytic determination of cobalt, an optimization process exploiting chemometrics (neural networks and a genetic algorithm) was applied and the parameters of the mineralization were established as 3 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for mussel, 3 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> plus 0.16% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for bovine liver and 12 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for fish. The proposed method features a linear range from 10 to 50 ng L<sup>-1</sup> (r>0.994) and presents detection and quantification limits of 1.7 and 5.5 ng L<sup>-1</sup>, respectively.

The accuracy of both the proposed methods was assessed by using certified samples and alternative techniques (FAAS and ETAAS).

---

## **CAPÍTULO 1**

# **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE FLUXO PARA A MINERALIZAÇÃO DE AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS: DETERMINAÇÃO DE FERRO**

---

## I. INTRODUÇÃO

A sociedade moderna tem buscado cada vez mais na química analítica, respostas para problemas de ordens científicas, ambientais, médicas, agrícolas, econômicas e judiciais, entre outros. Devido a isso, a química analítica desempenha um papel de destaque pois, diariamente, milhares de análises são realizadas em todo o mundo, quer no controle de qualidade e desenvolvimento de novos produtos, na gestão do meio ambiente ou no controle de contaminantes em indústrias alimentícias, por exemplo.

Diversas técnicas analíticas passam por um processo de desenvolvimento tecnológico, onde a automação é cada vez maior e os limites de detecção chegam a valores antes impensáveis [1-2]. Entretanto, a etapa de preparo de amostras, tais como mineralização ou extração, não passou por esse processo de desenvolvimento no contexto analítico criando, às vezes, um significativo obstáculo, pois o preparo de amostras representa uma etapa crítica, já que o tempo consumido equivale de 60 a 90% do tempo total do processo analítico [3].

O preparo das amostras pode ser executado em vasos abertos, onde são empregadas grandes quantidades de reagentes, em comparação com o preparo em vasos fechados. Ainda, durante o processo de tratamento da amostra, podem ocorrer perdas de compostos mais voláteis e contaminação [4].

Na tentativa de minimizar ou até mesmo evitar os problemas associados à etapa de preparo de amostras, o uso de sistemas mecanizados se apresenta como uma alternativa extremamente atrativa [5]. A mecanização do processo analítico visa reduzir os erros provenientes da atuação humana e de contaminações, diminuir a periculosidade e o tempo total do processo analítico barateando o custo da análise principalmente quando fornos de microondas são empregados.

A hifenação de fornos de microondas à sistemas de análises em fluxo contínuo, pode ser de grande ajuda na mineralização em linha, de forma a obter-se em maiores e melhores informações analíticas com menos material, tempo, esforços e recursos. Além disso, o tempo total da mineralização pode ser diminuído de horas para minutos,

principalmente pelo fato de não haver necessidade de esfriamento do reator de mineralização, como ocorre com frascos fechados [5].

No tocante à área alimentícia, são objetivos prioritários o controle de qualidade tanto no processo de fabricação, como na distribuição dos alimentos. Neste sentido, a análise de alimentos desde o ponto de vista de essencialidade e/ou toxidez para o homem, é de vital importância [6].

## II. OBJETIVOS

No primeiro capítulo dessa dissertação, foi desenvolvido um sistema de fluxo acoplado a um forno de microondas caseiro para a mineralização de amostras alimentícias. As melhores condições para a mineralização de amostras de peixe, ostra e mexilhão, foram determinadas e posteriormente o ferro foi detectado.

## III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A. TEORIA DAS MICROONDAS

As microondas são definidas como a radiação eletromagnética de faixa do espectro eletromagnético que compreende comprimentos de onda entre 0,1 a 100 cm. As microondas constituem uma radiação eletromagnética não-ionizante que provoca movimentos das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna (em um forno de microondas caseiro, por exemplo, isso ocorre  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo). Devido a esse mecanismo de "stress" induzido, ocorre o aquecimento, sendo que o mesmo não é produzido por fonte externa, mas sim, pela interação entre as microondas e as moléculas da amostra. Fica claro que, para que haja aquecimento, é necessário a presença de moléculas polares e íons em solução. A polaridade, portanto, é um aspecto fundamental no aquecimento por microondas. No aquecimento de 100 mL de água a temperatura aumenta 70 °C em 80 segundos, porém para 100 mL de tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) há um aumento de 2 °C em 140 segundos, a uma potência de 700 W [7].

As microondas possuem frequências que variam de 300 a 300.000 MHz. Quatro delas são utilizadas nas áreas industrial e científica:  $915\pm 25$ ;  $2450\pm 13$ ;  $5800\pm 75$  e  $22125\pm 125$  MHz. Destas, a frequência de  $2450\pm 13$  MHz é a mais comum, inclusive, sendo usada nos fornos de microondas caseiros, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [3]. A energia típica que um sistema de microondas irradia é de 600 a 700 W. Desta forma, em cinco minutos, aproximadamente, 43 kcal podem ser fornecidas por um forno de microondas a um sistema [3].

Um aparelho de microondas típico, usado no aquecimento de amostras para as diversas aplicações analíticas, consiste de seis componentes básicos: o gerador de microondas (chamado de magnetron), o guia de ondas, a cavidade das microondas, o agitador (para espalhar as ondas), um circulador e um exaustor de ar. As microondas são produzidas pelo magnetron, propagadas através do guia de ondas, e inseridas diretamente dentro da cavidade do forno onde o espalhador as distribui em diferentes direções sendo, então, absorvidas pelas moléculas de amostras e solventes [3]. A figura 1 mostra alguns detalhes de um forno de microondas convencional utilizado em laboratório para a mineralização de amostras.

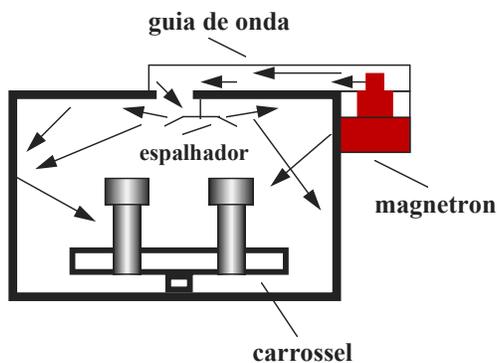


Figura 1: Esquema de um forno de microondas convencional.

## **B. EMPREGO DE FORNOS DE MICROONDAS PARA PREPARO DE AMOSTRAS**

Um grande número de amostras requer algum tipo de preparo, e a grande maioria não é solúvel em água ou em solventes orgânicos, devido à presença de silicatos contidos em amostras inorgânicas e proteínas e lipídeos presentes em amostras biológicas. As melhores condições para a mineralização de uma amostra



dependem da sua natureza. Geralmente, alguns mililitros de ácido e algumas horas de aquecimento (100 a 200 °C) são suficientes para decompor 1 g de qualquer tipo de amostra mineral. Um procedimento ideal para a mineralização de amostras seria aquele que reunisse as seguintes qualidades: 1) determinação de vários elementos em um mesmo processo de mineralização; 2) decomposição rápida e simples de amostras; 3) mínimo volume de ácidos; 4) aplicabilidade a uma grande variedade de amostras e 5) obtenção de resultados precisos e exatos [8]. A grande maioria das técnicas como espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) e espectrofotometria (UV-Vis) utilizam amostras na forma líquida homogênea para a determinação de metais e não-metais [8]

Hesek e Wilson [9] utilizaram a energia das microondas (550 W e tempo de irradiação de 15 minutos) para a secagem de diversos materiais, tais como, carbonatos de bário, cobalto, chumbo, magnésio, manganês, níquel e zinco, bem como sulfatos de bário, cálcio e chumbo. Este trabalho é de fundamental importância, pois nele foi descrita a primeira utilização de fornos de microondas em química analítica.

Um dos maiores problemas na determinação de traços de metais em amostras biológicas é a dissolução da matéria orgânica. Amostras biológicas (botânicas e alimentícias) são, primordialmente, constituídas por 3 componentes básicos: carboidratos, proteínas e lipídeos. Tais componentes se decompõem a aproximadamente 140, 150 e 160 °C, respectivamente. Com a utilização de fornos de microondas foi possível empregar ácidos a temperaturas superiores ao seu ponto de ebulição como, por exemplo, o ácido nítrico. Este, à pressão normal, entra em ebulição a 120°C, porém, à 5 atm, em um frasco fechado, seu ponto de ebulição chega a 176°C [10].

Em 1975, Abu-Samra *et al* [11] utilizaram, pela primeira vez, a energia das microondas para o preparo de amostras biológicas. Nas mineralizações foi aplicado um forno de microondas de potência igual a 600 W e a mistura mineralizadora era constituída de ácido nítrico e ácido perclórico na proporção de 4:1 (v/v) e, em alguns casos, empregou-se peróxido de hidrogênio a 30% (v/v). As mineralizações eram executadas em frascos erlenmeyer de 125 mL, onde a 0,5 g de amostra seca eram adicionados a 10 mL da mistura de ácidos. Tempos de 5 a 15 minutos foram suficientes

para preparar um conjunto de 20 amostras. Para uma maior durabilidade do forno de microondas, os autores empregaram um lavador de gases construído em fibra de vidro e o forno não era acionado por um longo período de tempo para não danificar o magnetron e os componentes eletrônicos.

Comparando-se este sistema com uma mineralização em chapa aquecedora, o mesmo apresenta certas vantagens, como: 1) a atenção do operador poderia ser aproveitada em outras funções dentro do laboratório; 2) riscos associados com os fumos de ácido perclórico e explosão, foram eliminados; 3) o tempo para o preparo das amostras foi drasticamente reduzido, pois, no preparo em chapa aquecedora, o tempo necessário é de 1 a 2 horas (ou mais).

Nadkarni [12] empregou um forno de microondas caseiro para o preparo de carvão, amostras biológicas, óleos, rochas e sedimentos. A potência utilizada foi de 625 W. Na eliminação dos vapores ácidos, que potencialmente poderiam danificar os componentes eletrônicos do forno, o autor efetuou as mineralizações em frascos de Teflon<sup>®</sup> tampados e localizados dentro de um dessecador (sem o agente dessecante). Um vácuo parcial foi criado e o dessecador introduzido na cavidade do forno de microondas. Nas mineralizações empregaram-se 200 mg de amostra, 5 mL de água régia e 2 mL de ácido fluorídrico. Para evitar danos ao magnetron foi introduzido um béquero com aproximadamente 50 mL de água na cavidade do forno. As amostras eram aquecidas por 3 minutos na potência máxima. Após este tempo, o dessecador era retirado do forno, aberto, adicionava-se 1 grama de ácido bórico e os frascos de Teflon<sup>®</sup> eram novamente aquecidos por mais 10 minutos em banho maria para eliminar o HF. As amostras mineralizadas eram levadas a um ICP-AES para a determinação de 22 elementos. O chumbo e o cromo apresentaram perdas de 20 e 26%, respectivamente, e para os outros elementos essa perda foi < 5%. Um dos pontos de destaque deste trabalho, refere-se ao estudo do melhor tamanho de partícula para a execução das mineralizações. Foram estudados tamanhos de partículas entre 8 a 325 "mesh" para o carvão, e os melhores resultados foram obtidos quando partículas com 150 "mesh" eram empregadas. Outro aspecto relevante foi a observação de que em amostras não porosas, como coque ou óleos pesados, a extração de metais por microondas não foi bem sucedida. Nadkarni propôs um mecanismo para a mineralização de carvão por

microondas devido a água trapeada no interior dos poros das partículas de carvão. Devido a isso, a pressão aumentaria e fraturaria a amostra sólida e a fragmentação possibilitaria que novas porções fossem expostas à ação dos ácidos utilizados.

O uso de vasos abertos para a mineralização de amostras por microondas potencializa os riscos de contaminação da amostra, e a corrosão do equipamento. Kingston e Jassie [13], propuseram o emprego de frascos de Teflon<sup>®</sup> PFA (perfluoroalcoxi etileno) fechados para o tratamento de amostras; desta forma a temperatura de trabalho não estaria limitada ao ponto de ebulição dos ácidos utilizados, pois a pressão adquirida é bastante superior quando comparada à obtida com vasos abertos. Outro ponto a ser destacado é a diminuição do tempo de preparo das amostras com a associação da alta pressão e alta temperatura. Os autores utilizaram termopares para o controle da temperatura e pressão, pois, desta forma pôde-se assegurar a eficiência e a reprodutibilidade das mineralizações. Empregando-se um forno de microondas com potência de 600 W e um tubo de PVC para efetuar a exaustão do sistema, foram preparadas amostras de tecido de ostra, farinha de arroz, farinha de trigo, fígado bovino e urina humana. As mineralizações foram executadas obedecendo-se o seguinte procedimento, adição de 5 mL de ácido nítrico concentrado e aquecimento em placa aquecedora até próximo a secagem. Adição de mais 5 mL de HNO<sub>3</sub> e fechamento dos frascos com a ajuda de um torquimetro (24 Nm). Em seguida as amostras eram levadas ao forno de microondas por 1,5 minutos, à potência máxima.

Aysola *et al* [14], empregaram um forno de microondas caseiro para o tratamento de amostras de fígado bovino. Pesaram 0,25 g de amostra em um frasco de Teflon<sup>®</sup>, adicionaram 1,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1,5 mL de HNO<sub>3</sub>. Os frascos foram fechados e levados ao forno de microondas por 60 segundos, a 700 W. Em seguida as amostras foram resfriadas e o volume ajustado para 25 mL. Cobre, ferro, zinco, cádmio, crômio e chumbo foram determinados por espectroscopia de absorção atômica (AAS).

Alvarado *et al* [15], determinaram ferro, níquel e vanádio em amostras de carvão por espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). Foi efetuada uma comparação entre a mineralização por microondas e pelo método convencional. Na mineralização convencional os autores empregaram uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> concentrados (1+2 v/v). O procedimento total para mineralização

consumiu aproximadamente 11 horas. Na mineralização por microondas empregou-se um aparelho caseiro (600W) e tubos de vidro Pyrex com tampas rosqueáveis de polipropileno. Uma mistura de 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 2 mL de HCl concentrado era adicionada a cada tubo, juntamente com 0,1-1,15 g de amostra. Os tubos eram fechados e levados ao forno por 1 minuto. Visualmente, a amostra não apresentava nenhuma mudança, porém, este tempo era suficiente para extrair os metais de interesse.

Ybáñez *et al* [16], compararam a mineralização por via seca com a mineralização por microondas, onde empregaram amostras de mexilhão para a determinação de arsênio. Foram utilizados frascos de Teflon<sup>®</sup>, com tampa rosqueável e um forno de microondas caseiro (120-750 W) para a execução das mineralizações. O tempo necessário para a decomposição por via seca foi de aproximadamente 2 a 3 dias. A mineralização por microondas foi realizada medindo-se 250 mg de amostra seca, adicionando-se 2 mL de HNO<sub>3</sub> a 65% m/v e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v. Os frascos foram fechados e levados ao forno de microondas por 1 minuto a 555 W e, em seguida, por 4 minutos a 300 W. Este processo demandou aproximadamente 20 minutos.

A utilização de fornos de microondas têm alcançado as mais variadas aplicações, como por exemplo, a extração de compostos orgânicos. A energia das microondas pode ser canalizada para a extração de compostos nas mais diversas matrizes, como solo, plantas, tecido vegetal, vidros, catalisadores, resinas e tintas, com o emprego de pequena quantidade de solvente. Llompert *et al* [17], extraíram fenol, o-cresol, m-cresol e p-cresol em amostras de solos, utilizando uma mistura de hexano-acetona. As extrações foram executadas em frascos fechados de Teflon<sup>®</sup>. Foram estudados o volume de solvente, porcentagem de acetona e temperatura de extração.

Deaker e Maher [18], mineralizaram amostras certificadas de peixe para a especificação de selênio: Se (IV), Se (VI), seleniometionina, seleniocisteína, trimetil selênio, seleniocistamina. As mineralizações foram preparadas em frascos de Teflon<sup>®</sup> com capacidade para 7 mL, onde eram adicionados 1 mL de HNO<sub>3</sub> a 0,1 g de amostra seca. Os frascos eram fechados e acondicionados em frascos maiores de Teflon<sup>®</sup> que por sua vez eram levados para o forno de microondas.

### C. ACOPLAMENTO DE SISTEMAS DE FLUXO A FORNOS DE MICROONDAS

Apesar de todo o avanço adquirido com o uso de fornos de microondas no preparo de amostras, algumas etapas podem oferecer algum tipo de limitação. Estas limitações dizem respeito a contaminações durante a pesagem da amostra e adição de reagentes (ácidos), tempo de resfriamento dos frascos de Teflon<sup>®</sup> (1 a 2 horas), diluição da amostra após a mineralização e, principalmente, ao trabalho do operador. Com o advento do acoplamento de sistemas de fluxo a fornos de microondas algumas dessas limitações foram superadas.

A análise por injeção em fluxo – FIA, é um processo que utiliza a introdução da amostra em um fluido transportador não segmentado, produzindo uma região onde se estabelecem gradientes de concentrações. Esta região, chamada de zona da amostra, vai sendo transportada até a detecção, onde se dará a quantificação do analito. Deve-se destacar quatro partes principais do processo FIA: introdução da amostra, propulsão dos fluidos, reações e detecção [19]. Evidentemente que, quando acoplado a um forno de microondas, a detecção do analito de interesse deve ser feita posteriormente, com a utilização de alguma técnica analítica (espectrometria, espectrofotometria, entre outras).

A mineralização por microondas, quando realizada com o emprego de sistemas de fluxo, permite a mistura de um volume adequado de ácidos e amostra. Esta mistura é levada até a cavidade do forno e, posteriormente, introduzida no sistema de detecção. Para esta proposta, são utilizados sistemas de fluxo que incluem um forno de microondas acoplado em linha com espectrômetros de absorção atômica com chama (FAAS), com atomização eletrotérmica (ETAAS) e com espectrometria de emissão atômica com plasma induzido de argônio (ICP-AES) [8].

O primeiro trabalho de acoplamento de sistemas de fluxo para o preparo de amostras em fornos de microondas foi proposto por Burguera *et al* [20], onde foram mineralizadas amostras de sangue para posterior determinação de cobre, zinco e ferro por AAS. A mistura mineralizadora empregada foi constituída por HNO<sub>3</sub> 0,4 mol L<sup>-1</sup> e HCl 0,3 mol L<sup>-1</sup>. A figura 2 mostra o diagrama de fluxo utilizado.

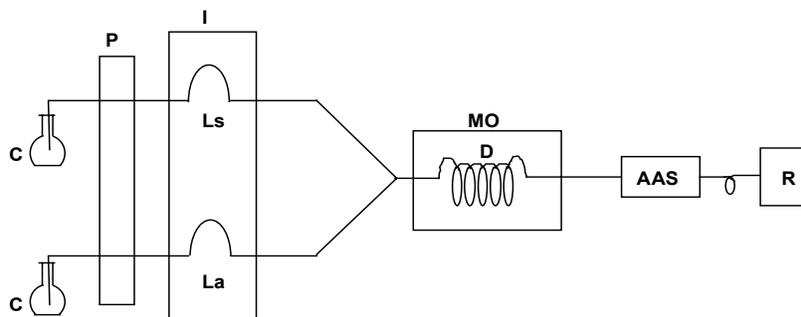


Figura 2: Sistema de fluxo acoplado a fornos de microondas para mineralização de amostras. C: solução transportadora; P: bomba peristáltica; I: injetor; D: tubo de mineralização; MO: forno de microondas; AAS: espectrofotômetro de absorção atômica; R: registrador; Ls: alça de amostragem para a amostra; La: alça de amostragem para os reagentes.

Em outro trabalho, Burguera *et al* [21], propuseram um sistema de fluxo acoplado a um forno de microondas caseiro para a determinação de zinco e cádmio por AAS em amostras de fígado e rins. Com o sistema, foi possível preparar simultaneamente seis amostras e uma das principais vantagens do mesmo, foi a diminuição da contaminação por fatores externos.

Amostras de lodo de esgoto foram mineralizadas para a determinação de chumbo por Carbonell *et al* [22] em um sistema de fluxo. No sistema proposto, a amostra era continuamente reciclada no forno de microondas. Após a ação das microondas, 100  $\mu\text{L}$  da amostra mineralizada eram injetados no sistema de determinação. O procedimento recomendou a adição de 150 a 500 mg de amostra em 25 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Após 5 minutos a 650 W, a amostra já estava pronta para a etapa de determinação. Uma limitação do processo proposto diz respeito ao tamanho das partículas utilizadas, onde os autores afirmam que tamanhos de partícula superiores à metade do diâmetro interno das linhas de transmissão, provocavam problemas de entupimentos.

Karanassios *et al* [23], propuseram um sistema de fluxo para a mineralização de amostras biológicas. Uma suspensão contendo 350 mg de amostra era preparada em 20 mL de água e, posteriormente, ocorria a mescla com 20 mL de água régia por confluência de zonas. A mistura era mineralizada por 2 minutos à potência de 720 W e, posteriormente, o volume era ajustado para 50 mL. Os metais de interesse (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) foram determinados por ICP-AES. Os autores relatam a

existência de partículas não mineralizadas após a passagem da amostra pelo forno de microondas. A formação dessas partículas se deve à presença de aminoácidos que, tipicamente, não contêm elementos traços.

Para a grande maioria das técnicas por espectrometria de absorção atômica, a mineralização completa das amostras não é necessária para a obtenção de resultados reprodutíveis e respostas adequadas [8].

A concentração da amostra na suspensão para a mineralização por sistemas de fluxo é um parâmetro de fundamental importância. Haswell e Barclay [24], determinaram Ca, Fe, Mg e Zn em diversas amostras biológicas utilizando uma bobina de mineralização com 20 metros de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno. Foram pesadas de 50 a 500 mg de amostra (<180  $\mu\text{m}$ ), obtendo-se suspensões de concentrações iguais a 0,005 e 0,5% m/v, respectivamente. Ao sistema de fluxo, eram injetados 1 mL da suspensão e, após 3 minutos de ação das microondas, a amostra já estava pronta para a detecção dos metais de interesse por AAS. Uma das limitações do sistema consistia na utilização de suspensões com concentração inferior a 1%, pois valores maiores provocavam obstruções no sistema de fluxo.

Welz *et al* [25], determinaram oito compostos de mercúrio em urina e água por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS). A potência empregada foi de 72 W e a velocidade analítica foi de 30 a 40 amostras  $\text{h}^{-1}$  para amostras não amalgamadas e 24 amostras  $\text{h}^{-1}$  para as amostras amalgamadas. O limite de detecção encontrado foi de 10  $\text{ng L}^{-1}$ . Ainda, segundo os autores, o tratamento de amostras utilizando sistemas de fluxo acoplados a fornos de microondas é particularmente interessante para a determinação de mercúrio, pois não ocorrem problemas associados à mobilidade do metal, riscos de contaminações e perda do analito.

Matusiewicz e Sturgeon [26], compararam a mineralização efetuada em microondas focalizado e vaso fechado, com a mineralização executada em fluxo e forno focalizado. O parâmetro escolhido para a comparação foi a concentração de carbono residual após as mineralizações. Os autores utilizaram amostras certificadas de urina e lodo de esgoto e o  $\text{HNO}_3$  concentrado. Tipicamente, após a ação das microondas, restam de 2 a 30% de carbono orgânico, porém, a destruição completa da matéria orgânica de amostras biológicas é total a 320 °C e, aproximadamente, 100 bar. A

mineralização por microondas focalizadas permitiu uma eficiência de 99,6% na destruição da matéria orgânica, porém, com a mineralização em fluxo, essa eficiência foi de 67,7% para a amostra de urina e 66,7% para o lodo de esgoto. Os autores do trabalho salientam que o emprego de sistemas de fluxo em fornos focalizados permite uma maior reprodutibilidade e maior aproveitamento das microondas, pois o volume da cavidade é de aproximadamente 42 mL. Os autores abordam, também, que com o uso de técnicas como AAS ou ICP-AES, não é necessário destruir toda a matéria orgânica para obter resultados confiáveis e reprodutíveis.

Cabrera *et al* [27], determinaram chumbo por geração de hidretos em amostras de vinhos, sucos de frutas e outras bebidas. As amostras de vinho não necessitaram de mineralização, porém, as de cerveja e sucos requereram um tratamento prévio com  $\text{HNO}_3$ . As amostras de suco, previamente desgaseificadas em ultra-som, foram introduzidas no sistema de fluxo na forma de uma suspensão. O tempo de exposição às microondas variou de 45 a 14 segundos e o  $\text{HNO}_3$  empregado, de 30 a 40% (v/v), para as cervejas e frutas, respectivamente. O chumbo foi determinado por geração de hidretos (HG-AAS) e os resultados comparados com atomização eletrotérmica (ETAAS). O limite de detecção foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para o vinho e outras bebidas e  $1,0 \text{ ng L}^{-1}$  para as amostras de frutas.

Arruda *et al* [28], determinaram alumínio em mariscos utilizando mineralização por microondas. O sistema foi otimizado levando-se em consideração a concentração do ácido empregado ( $\text{HNO}_3$ ), a potência do forno e o tempo de mineralização. Um dos pontos de destaque deste trabalho foi a introdução de uma amostra sólida sob a forma de uma suspensão no sistema de fluxo. A suspensão foi preparada medindo-se determinada massa de amostra seca e dissolvendo-se em  $\text{HNO}_3$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  desta suspensão era introduzida no sistema e confluía com  $200 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$ . O líquido transportador foi constituído por  $\text{HNO}_3$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e bombeado a  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ . A amostra mineralizada foi posteriormente levada ao copo do auto-amostrador e o volume ajustado para 2 mL. As determinações se deram por ETAAS e o limite de detecção obtido foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . A bobina de mineralização possuía 2 metros, pois comprimentos maiores contribuíam para a dispersão da amostra

e seria necessário um grande volume de transportador para proceder a limpeza do sistema de fluxo, com conseqüente diminuição da velocidade de mineralização.

Sturgeon *et al* [29] determinaram alguns metais de interesse em amostras ambientais. As mineralizações foram conduzidas em um sistema de fluxo comercial proposto pela empresa CEM. As mineralizações se davam em uma bobina de Teflon<sup>®</sup> (PFA) com 30 metros de comprimento e 0,92 mm de diâmetro interno, tendo o ar como transportador. A potência máxima do forno foi de 550 W e permitia pressões de até 2.413 KPa. As amostras foram preparadas em uma mistura de 4 partes de água destilada desionizada, 3 partes de HNO<sub>3</sub> concentrado, 1 parte de HCl concentrado e 2 partes de HF concentrado. Uma alíquota contendo 10 mL desta suspensão era introduzida no sistema de fluxo e, após 4 minutos de irradiação, a amostra mineralizada era recolhida no auto-amostrador de um ICP-AES. O sistema proporcionou uma taxa de mineralização de 6 a 8 amostras h<sup>-1</sup>.

Arruda *et al* [30] determinaram selênio em amostras de mariscos. No sistema de fluxo empregado, a amostra na forma de uma suspensão, era introduzida em um fluxo transportador de ar. O sistema de fluxo foi constituído por uma bobina com 550 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno. A amostra foi preparada misturando-se de 200 a 500 mg em 5 mL de HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e a suspensão foi estabilizada em banho de ultra-som, por 10 minutos. Duzentos µL eram introduzidos no sistema de fluxo e para auxiliar a mineralização, 300 µL de HNO<sub>3</sub> 6 mol L<sup>-1</sup> também eram introduzidos em um fluxo de ar e mesclados com a amostra. Após 1 minuto, a bomba peristáltica foi parada e o forno ligado por 4 minutos.

É muito pequeno o número de publicações para a determinação de metais por espectrofotometria, quando as mineralizações são efetuadas em fornos de microondas, pois a maioria dos trabalhos utilizam espectrometria de absorção ou emissão atômica. Balconi *et al* [31], propuseram um sistema de fluxo para a mineralização de amostras de água e posterior determinação de oxigênio dissolvido. O sistema de fluxo era composto por um transportador de água destilada e os reagentes eram constituídos por uma mistura de dicromato de potássio e ácido sulfúrico. A bobina de reação possuía 10 metros de comprimento e o preparo de uma amostra completava-se em 3 minutos, e a

leitura se dava a 445 nm. Acoplado ao sistema, havia um desgaseificador constituído por uma membrana de Teflon<sup>®</sup>.

Oliveira *et al* [32], empregaram um sistema com injeção sequencial para proceder a mineralização de amostras de suco de laranja, vinhos, vegetais e leite. No sistema proposto a amostra na forma de uma suspensão, era transportada até uma bomba de mineralização localizada no interior de um forno de microondas. Após a exposição às microondas e mineralização com HNO<sub>3</sub>, o fluxo transportador era revertido, e a amostra mineralizada direcionada para a detecção espectrofotométrica de fósforo total.

Desde a sua primeira aplicação por Abu-Samra *et al* [11], o uso de fornos de microondas têm crescido de maneira exponencial. Na década de 70 foram publicados apenas 7 artigos referentes ao uso de microondas em química analítica, na década de 80 publicaram-se 132 trabalhos e nos anos 90 até 1994 já haviam sido publicados 166 trabalhos [10]. Na literatura são encontradas 5 revisões sobre o tema [8,10, 33-35] o que mostra a grande disseminação da técnica no meio laboratorial. Desta forma, o número de trabalhos sobre a utilização de fornos de microondas em sistemas de fluxo para a mineralização de amostras é expressivo, sendo que no quadro 1 são listados alguns trabalhos com as suas principais características analíticas.

Quadro 1: Sistemas de fluxo acoplados a fornos de microondas para o preparo de amostras.

| Matriz  | Analito                  | Técnica*      | Condições de mineralização  | Ref |
|---|--------------------------|---------------|---|-----|
| Biológica   | TiO <sub>2</sub>         | ETAAS         | HCl + HNO <sub>3</sub> ; 2 m de bobina; 10 amostras h <sup>-1</sup>   | 36  |
| Sangue  | Zn, Cu                   | FAAS          | HNO <sub>3</sub> + HCl; 10-30 µL amostra tomada in vivo; bobina 2 m; 30 amostras h <sup>-1</sup>  | 37  |
| Terra diatomácea  | Hg                       | AFS           | 100 µL amostra; 1 min. - 30W; microondas focalizado   | 38  |
| Sangue, materiais certificados compostos orgânicos e inorgânicos    | Hg                       | CVAAS         | Mistura oxidante: KMnO <sub>4</sub> com KBr/KBrO <sub>3</sub> ; Bobina: 20 m; 45 amostras h <sup>-1</sup>   | 39  |
| Águas, efluentes sedimentos   | Hg total                 | CVAAS         | HCl; água régia, KMnO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , persulfato; 500µL; bobina 1 m; 12 amostras h <sup>-1</sup>                                | 40  |
| Ambiental   | Hg                       | CVAFS         | 400 µL amostra; 4 m bobina; 50 s - 20 W; microondas focalizado  | 41  |
| Sangue  | Co                       | ETAAS         | HNO <sub>3</sub> ; 2 mL amostra; bobina 5 m.  | 42  |
| Cabelo  | Pb                       | ETAAS         | 100 mg amostra + 2 mL de mistura 1:1 HNO <sub>3</sub> :HClO <sub>4</sub> ; tempo: 15 min.   | 43  |
| Geológicas  | Mg                       | FAAS          | amostra em suspensão com HF+HNO <sub>3</sub>  | 44  |
| Águas   | Uréia e amônia           | UV-Vis        | Mistura: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /HgSO <sub>4</sub> ; 5 amostras h <sup>-1</sup>   | 45  |
| Águas   | P                        | UV-Vis        | Mistura: HNO <sub>3</sub> /HClO <sub>4</sub> ; bobina: 6 m; 7 amostras h <sup>-1</sup>  | 46  |
| Efluentes líquidos  | P total                  | UV-Vis        | HNO <sub>3</sub> ; 2 mL amostra; bobina de 7,2 m; desborbulhador; 30 amostras h <sup>-1</sup>   | 47  |
| Biológicas  | Cu, Mn, Pb, Zn           | FAAS          | HNO <sub>3</sub> conc. + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v)  | 48  |
| Biológicas  | Cu, Mn                   | FAAS          | 5 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% v/v) + 5 mL HNO <sub>3</sub> conc.  | 49  |
| Leite   | Cu, Fe                   | FAAS          | 3 mL amostra + 1 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O; 5 min. - 700 W  | 50  |
| Tecido adiposo  | Fe, Zn                   | ETAAS         | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> 4:1 (v/v)   | 51  |
| Águas, urina e materiais certificados                               | Bi, Sn, Pb, As           | HG-AAS        | Mistura oxidante: KBr/KBrO <sub>3</sub> /HCl; bobina: 10,2 m; 13-30 amostras h <sup>-1</sup>  | 52  |
| Águas, urina compostos orgânicos e inorgânicos                      | Hg                       | CVAAS         | Mistura oxidante: KMnO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; bobina: 10,2 m; 24 amostras h <sup>-1</sup> | 53  |
| Sangue  | Fe, Cu, Zn               | FAAS          | bobina: 50 cm; 20 s; mistura: HCl/HNO <sub>3</sub>  | 54  |
| Carvão, suspensões de CRM**   | Cu, Fe                   | ICP-AES       | bobina: 10 m; 5 min; suspensões em Triton X-100 e HNO <sub>3</sub>  | 55  |
| Solo  | Pb                       | FAAS          | 5 min - 250 W; mistura: HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 56  |
| Água  | DQO, Cr                  | UV/Vis, FAAS  | bobina: 15 m; mistura: K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /HgSO <sub>4</sub>   | 57  |
| Lodo de esgoto  | Zn, Cu, Pb, Cd, Ni, Cr   | ICP-AES       | 6 min; suspensão em HNO <sub>3</sub> 1,5 mol L <sup>-1</sup>  | 58  |
| Água de torneira  | Se                       | HGAAS         | 1 min; mistura: HBr/KBrO <sub>3</sub> ; bobina: 4 m   | 59  |
| Rocha, solo, sedimento, lodo, tecido de mexilhão e farinha de arroz | Ni                       | ETAAS         | Mistura: água régia/HF/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 10 min.  | 60  |
| Água  | Pb, Co, Mn (II) Fe (III) | UV/Vis        | 4-6 min; mistura: HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 61  |
| Vegetais  | Cr, Co, Ni               | ETAAS         | 2 min; mistura: HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; bobina: 4 m   | 62  |
| Água  | P total                  | Amperométrica | Mistura: 0,08 mol L <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> + 0.05 mol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ; 20 amostras h <sup>-1</sup> .     | 63  |
| Carvão  | Cu, Fe                   | FAAS          | Suspensão em HNO <sub>3</sub> 10% (v/v); bobina 156 cm  | 64  |
| Leite, sangue e urina   | Ca, Mg, Zn               | ICP-AES       | Mistura: HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; microondas focalizado  | 65  |
| Peixe   | Pb                       | ETAAS         | 300 µL de suspensão + 400 µL HNO <sub>3</sub> 6 mol L <sup>-1</sup> ; bobina 150 cm; 9 min  | 66  |
| Urina, lodo, e ar   | Pb                       | ICP-AES       | bobina: 30 m - 0,7 mm d.i.; 2,5 min   | 67  |
| Amostras farmacêuticas  | Paracetamol              | UV-Vis        | bobina: 6 m - 200 W; mistura: KIO <sub>4</sub> /NaOH  | 68  |

\* ETAAS – Espectrometria de Absorção com Atomização Eletrotérmica; FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama; AFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica; CVAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio; CVAFS - Espectrometria de Absorção de Fluorescência Atômica com Vapor Frio; UV-Vis – Espectrofotometria; HG-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos; ICP-AES – Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado; \*\*CRM - Certified Reference Material

#### **D. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO FERRO**

O ferro é um metal de importância fundamental na nutrição humana. No Brasil as consequências devido à anemia custam, a cada ano, aproximadamente US\$ 605 milhões. Esta quantia está diretamente relacionada a 5% do absenteísmo escolar e 20% de perda de produtividade dos trabalhadores rurais. O Brasil é um dos poucos países do mundo onde não há leis obrigando o enriquecimento com ferro e/ou vitaminas dos alimentos de amplo consumo de massas. Recentes pesquisas revelaram que 35% da população infantil da cidade de São Paulo é anêmica, sendo 10% com anemia severa. Países tais como Estados Unidos e Chile enriquecem leite e farinha de trigo com ferro e vitaminas do complexo B, há mais de 40 anos [69]. Desta forma, a determinação de ferro e o desenvolvimento de metodologias para a mineralização de amostras alimentícias, se reveste de extrema importância para a caracterização do valor nutricional dos alimentos.

A quantidade de ferro no corpo humano varia em função do sexo, idade e nutrição. Em adultos do sexo masculino, a presença de ferro varia de 4 a 5 g [70]. A deficiência nutricional do ferro, além de provocar anemia, tem também como consequências principais, pequeno crescimento, letargia, baixo rendimento no trabalho e reduzida imunidade. Sua deficiência em crianças é especialmente problemática, provocando anorexia e baixo desenvolvimento mental.

A demanda diária de ferro é de 0,6 mg, porém, nos primeiros anos de vida são recomendadas doses de 1 mg dia<sup>-1</sup>, devido ao rápido crescimento. A concentração de ferro em diversos alimentos depende das condições climáticas e do tipo de solo. As principais fontes de ferro são: fígado, rins, ovos, legumes, chocolate, cana e salsa [70].

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### A. MATERIAL

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento desta etapa do trabalho:

- Espectrofotômetro equipado com célula de fluxo de 18 mm de caminho ótico e 300  $\mu\text{L}$  de capacidade, marca Femto, modelo 432.
- Bomba peristáltica com oito canais e velocidade variável, marca Ismatec, modelo IPC.
- Injetor comutador confeccionado em acrílico.
- Registrador potenciométrico, marca Kipp & Zonen, modelo BD 111.
- Tubos de Tygon de diversos diâmetros para o transporte dos reagentes e amostras, nos sistemas de mineralização e determinação.
- Forno de microondas caseiro marca CCE, modelo MW 1350 *Turn Table*, com potência nominal de 800 W.
- Tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,7 mm para a confecção de reatores, linhas de transmissão e alças de amostragem dos sistemas de fluxo empregados.
- Tubos de Teflon<sup>®</sup> com diâmetro interno de 2,0 mm para a confecção da bobina de mineralização e linhas de transmissão do sistema de mineralização.
- Válvula de Teflon<sup>®</sup> para o aprisionamento da suspensão no interior do forno de microondas.
- Banho de ultra-som, marca Cole-Parmer, modelo 8890R-MT.
- Detector de vazamentos de microondas, marca Micronta (Hong-Kong/China).
- Computador Pentium 166 MHz, com 16 Mbites de memória RAM e 1,2 Gbites de memória ROM.
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE 200.
- Desionizador de água, marca Sybron/Barnstead, modelo D2782.
- Destilador sub-ebulição, marca Marconi, modelo MA 075.
- Liofilizador, marca Labconco, modelo Freeze Dryer 8.
- Peneira com malha que permite a passagem de partículas < 53  $\mu\text{m}$ . Marca Bertel.
- Moedor de alimentos, marca Arno.

- Interface PCL 711S, fabricante PC Multilab.
- Vidrarias e outros materiais, comuns a um laboratório analítico.

## **B. REAGENTES E SOLUÇÕES**

Os reagentes listados foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho e possuem grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada/desionizada.

- 1,10 – Fenantrolina Monohidratado ( $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$ ), P. M. 198,22. Marca Merck.
- Acetato de Amônio ( $CH_3COONH_4$ ), P. M. 77,08. Marca Merck.
- Nitrato de Ferro (III) nanohidratado [ $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ], P. M. 404,00. Marca Merck.
- Ácido Nítrico concentrado, densidade  $1,40 \text{ g mL}^{-1}$ , 65% (m/v) e P. M. 63,01. Marca Merck.
- Ácido Acético concentrado, densidade  $1,01 \text{ g mL}^{-1}$ , 99% (m/v) e P. M. 60,05. Marca Merck.
- Ácido Clorídrico concentrado, densidade  $1,19 \text{ g mL}^{-1}$ , 36% (m/v) e P. M. 36,46. Marca Merck.
- Peróxido de hidrogênio, densidade  $1,11 \text{ g mL}^{-1}$ , 30% (v/v) e P. M. 34,01. Marca Merck.

Todas as soluções foram preparadas diariamente em água destilada/desionizada e acondicionadas em frascos de polietileno. A relação das soluções empregadas nesta parte do trabalho encontram-se a seguir.

- Soluções de ácido nítrico nas seguintes concentrações:  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $6 \text{ mol L}^{-1}$  e  $8 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução estoque de ferro:  $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ . Preparada dissolvendo-se 3,6170 g de nitrato de ferro (III) nanohidratado em 500 mL de solução de ácido nítrico  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução tampão pH 3,62: preparada misturando-se porções iguais de ácido acético  $2 \text{ mol L}^{-1}$  e acetato de amônio  $2 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de trabalho de ferro ( $50 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em ácido nítrico  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ . Preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque de ferro;
- Solução de ácido ascórbico a 1 % m/v;

- Solução de 1,10 – Fenantrolina Monohidratado a 0,25 % m/v;
- Água régia, preparada misturando-se 1 volume de HNO<sub>3</sub> concentrado e 3 volumes de HCl concentrado;
- Água régia invertida (mistura de Leffort), preparada misturando-se 3 volumes de HNO<sub>3</sub> concentrado e 1 volume de HCl concentrado;
- Mistura de soluções de HNO<sub>3</sub> 0,15 mol L<sup>-1</sup> e HCl 0,35 mol L<sup>-1</sup>, na proporção de 1:1.

### **C. AMOSTRAS**

As amostras certificadas listadas, foram utilizadas para a validação da metodologia proposta:

- Tecido de ostra - NIST (National Institute of Standards & Technology) Standard Reference Material (SRM) 1566a.
- Peixe - IAEA (International Atomic Energy Agency) Standard Reference Material (SRM) MA-A-2 1062/TM.
- Mexilhão - NIES (National Institute for Environmental Studies) Certified Reference Material (CRM), número 06.

Algumas amostras de peixe foram analisadas para a determinação de ferro: cação, pescadinha e merluza. Estas amostras foram obtidas comercialmente, e preparadas utilizando-se apenas os "filets". Posteriormente, foram trituradas, homogeneizadas e resfriadas. Após resfriadas por 3 dias, a massa homogênea foi liofilizada a 6 KPa até peso constante ( $\approx$  48 horas).

### **D. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA: SISTEMA DE FLUXO ACOPLADO A FORNOS DE MICROONDAS CASEIRO**

Nesta primeira etapa do trabalho, foi desenvolvido um sistema para a mineralização de amostras em linha. Utilizou-se uma bomba peristáltica, um forno de microondas caseiro, um computador, um injetor comutador confeccionado em acrílico e uma válvula de Teflon<sup>®</sup> para manter a amostra dentro do forno de microondas, conforme a figura 3. Foi utilizada uma interface PCL 711 S para o controle da mineralização e um programa escrito em Visual Basic<sup>®</sup> 3.0, cuja finalidade era controlar

o funcionamento da bomba peristáltica, a válvula de Teflon<sup>®</sup> e o posicionamento do injetor (amostragem ou injeção).

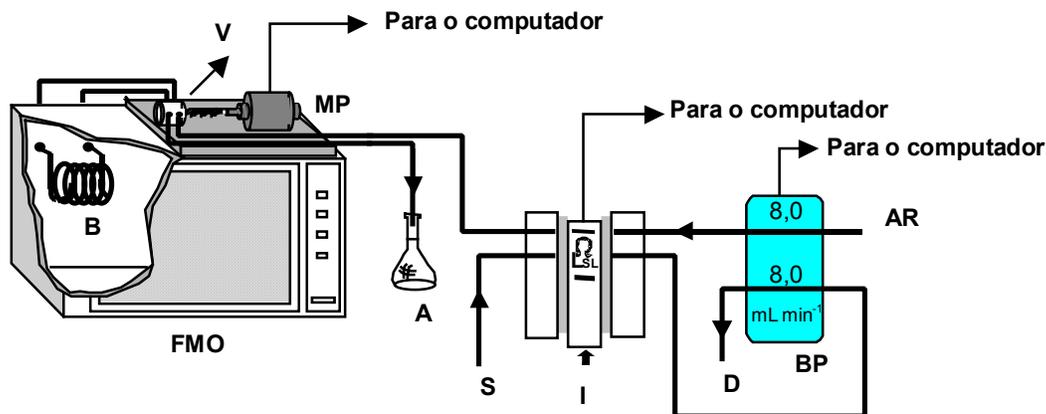


Figura 3: Sistema utilizado na mineralização de amostras onde B: bobina de mineralização; A: amostra mineralizada; MP: motor de passo; V: válvula para manter a amostra dentro do forno de microondas; FMO: forno de microondas; S: suspensão estabilizada da amostra; L<sub>SL</sub>: alça de amostragem; BP: bomba peristáltica; I: injetor comutador; e D: descarte.

Foram utilizados tubos de Teflon<sup>®</sup> (politetrafluoretileno - PTFE), com diâmetro interno de 2 mm, para a montagem dos sistemas de transmissão e bobina de mineralização com 2 metros de comprimento.

No sistema de fluxo da figura 3 a amostra, na forma de uma suspensão estabilizada, é introduzida em um fluxo transportador de ar, sendo bombeada até a bobina de mineralização, localizada na cavidade do forno de microondas. O tempo entre a injeção e o posicionamento da suspensão no interior da bobina de mineralização foi de 35 segundos.

Entre o injetor e a bobina de mineralização, foi posicionada uma válvula de pressão (figura 4) construída em Teflon<sup>®</sup> com a finalidade de interromper a passagem de fluxo e, conseqüentemente, aprisionar a amostra na cavidade do forno de microondas. Após a contagem do "tempo de residência", a válvula era acionada automaticamente pelo computador, a amostra aprisionada, e o forno de microondas era ligado manualmente. Terminado o tempo de irradiação, a válvula se abria, sendo a amostra mineralizada bombeada para um balão volumétrico. Uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,014 mol L<sup>-1</sup> foi introduzida no sistema de fluxo para limpar o sistema de transmissão e completar o volume do balão volumétrico.

Nos experimentos descritos neste capítulo, as mineralizações foram efetuadas uma a uma, através de uma válvula confeccionada em Teflon<sup>®</sup>. A figura 4 mostra os principais detalhes desta válvula. Inicialmente, temos uma peça metálica (A) para prender a válvula em um suporte de alumínio, em seguida temos a parte central e móvel da válvula (B), que por sua vez é conectada ao motor de passo. A válvula é dotada de uma parte fixa (C), que recebe as conexões de entrada e saída da suspensão.

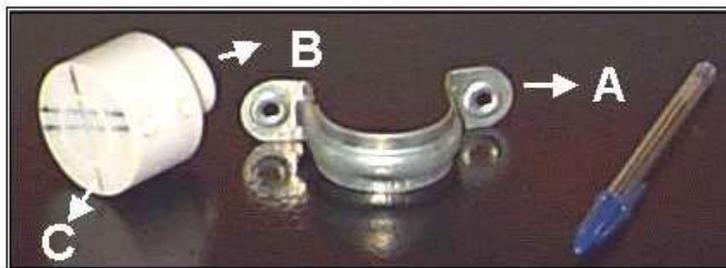


Figura 4: Válvula empregada para o aprisionamento de suspensões. A caneta ao lado dá uma noção do tamanho da mesma.

### **E. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FERRO**

O sistema de fluxo foi otimizado através da determinação de ferro em amostras certificadas (ostra, peixe e mexilhão). Primeiramente, a otimização foi iniciada com a utilização de suspensões de amostra certificada de ostra. Diversas variáveis do sistema de fluxo foram investigadas, afim de se obter os melhores resultados. A amostra de ostra foi escolhida para iniciar os trabalhos, já que possuía a maior concentração de ferro ( $539 \pm 15 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

É importante salientar que a posição da bobina de mineralização no interior do forno de microondas foi investigada, pois trata-se de uma variável determinante na obtenção de resultados mais precisos. Outras variáveis estudadas foram:

- (1) concentração e composição da mistura mineralizadora – empregaram-se soluções de  $\text{HNO}_3$  de concentrações iguais a 6, 8  $\text{mol L}^{-1}$ , e  $\text{HNO}_3$  concentrado, água régia invertida (mistura de Leffort) e água régia. Em algumas suspensões utilizou-se 2,4 ou 6,0% v/v de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- (2) tempo de exposição às microondas – testou-se a ação das microondas por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos;

- (3) tamanho de partícula das amostras utilizadas – foram executados testes com suspensões com tamanho de partícula variando de 53  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  e
- (4) volume de suspensão empregado nas mineralizações – o volume de suspensão introduzido no sistema de mineralização variou de 200 a 400  $\mu\text{L}$ .

Para a determinação de ferro, foi utilizado um sistema de fluxo proposto por Mortatti *et al* [71] (figura 5).

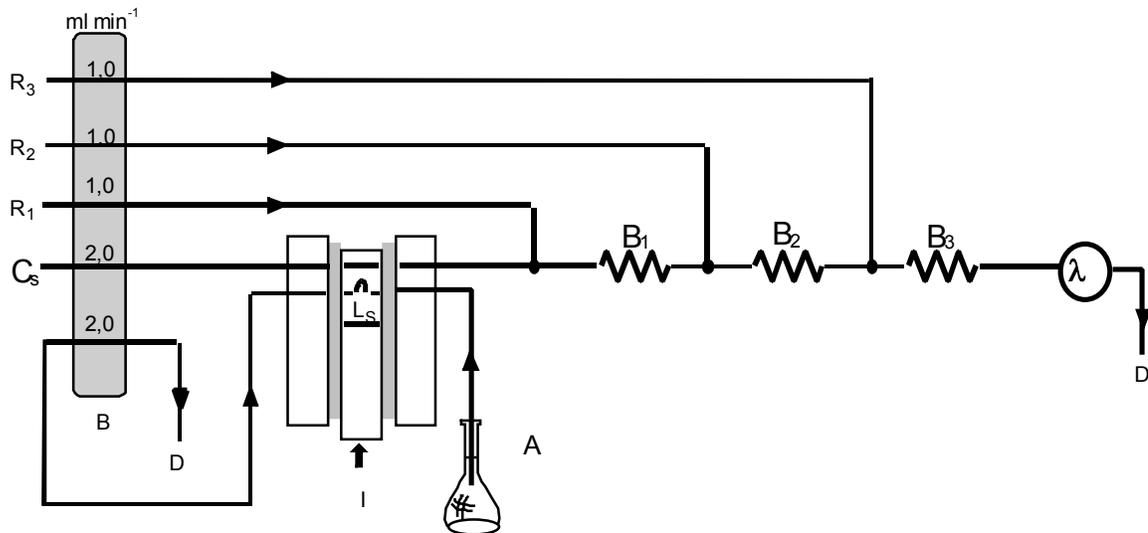


Figura 5: Sistema de fluxo empregado na determinação de ferro onde  $C_S$ : transportador;  $R_1$ : ácido ascórbico;  $R_2$ : 1,10-fenantrolina;  $R_3$ : tampão acetato;  $A$ : amostra mineralizada proveniente do sistema da figura 3;  $\lambda$ : 512 nm;  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ : bobinas de 10, 25 e 30 cm, respectivamente;  $L_S$ : alça de amostragem com 200  $\mu\text{L}$ ; e  $B$ : bomba peristáltica. Outros símbolos são iguais ao da figura 3.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### A. CONSIDERAÇÕES DE SEGURANÇA

O forno de microondas utilizado nas mineralizações não passou por nenhuma modificação em seus componentes eletrônicos e mecânicos. Foram tomadas algumas precauções de segurança para se evitar danos ao magnetron e checaram-se possíveis vazamentos de microondas.

Para se evitar danos ao magnetron do forno, foi posicionado um béquer com aproximadamente 100 mL de água no interior da cavidade de irradiação. Este procedimento foi necessário pois o volume da bobina de mineralização é muito pequeno

quando comparado com o volume da cavidade do forno ( $\approx 32$  litros). O volume do béquer (100 mL) era sempre reajustado a cada ciclo de atuação das microondas.

Para checar a ocorrência de vazamentos foi empregado um medidor de microondas e em nenhum caso ocorreu vazamento das mesmas.

## B. CALIBRAÇÃO DO FORNO

Antes do início dos experimentos para a determinação das melhores condições de mineralização das amostras de ostra, peixes e mexilhões, foi executada uma série de experimentos, afim de se determinar a real potência do forno de microondas caseiro. A calibração do forno de microondas foi feita de modo semelhante ao recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environmental Protection Agency). Para os equipamentos do tipo cavidade isto é feito através da medida da variação de temperatura de 1.000 gramas de água expostas à radiação de microondas em um determinado intervalo de tempo [3].

O forno caseiro empregado nos experimentos permite a seleção de 11 níveis distintos de potência. O quadro 2 mostra a potência em cada nível selecionado, segundo o manual de instruções fornecido pelo fabricante.

Quadro 2: Níveis de Potência do forno de microondas caseiro.

| Nível selecionado | Potência nominal (W) | Porcentagem da Potência Máxima |
|-------------------|----------------------|--------------------------------|
| P10               | 800                  | 100                            |
| P9                | 720                  | 90                             |
| P8                | 640                  | 80                             |
| P7                | 560                  | 70                             |
| P6                | 480                  | 60                             |
| P5                | 400                  | 50                             |
| P4                | 320                  | 40                             |
| P3                | 240                  | 30                             |
| P2                | 160                  | 20                             |
| P1                | 80                   | 10                             |
| Descongela        | Não informado        | Não informado                  |

O procedimento executado consistiu, basicamente, em aquecer 1.000 gramas de água por 120 segundos, e medir a temperatura inicial ( $T_i$ ) e a temperatura final ( $T_f$ ). Os

experimentos foram executados nos seguintes níveis de potência: P10, P8, P6, P4 e P2.

Na obtenção dos valores reais para a potência a fórmula a seguir foi utilizada:

$$\text{Potência (W)} = \frac{k \cdot c_p \cdot m \cdot \Delta T}{t}$$

onde:

k = fator de conversão de calorias/s para watts (= 4,184 W cal<sup>-1</sup> · s);

c<sub>p</sub> = calor específico da água (1,00 cal g<sup>-1</sup> · °C);

m = massa de água usada em gramas;

ΔT = T<sub>f</sub> – T<sub>i</sub> (°C);

t = tempo de aquecimento (s);

A figura 6 traz os resultados obtidos experimentalmente para os valores de potência.

O maior nível de potência (P10) fornece na realidade, aproximadamente 700 W e não 800 W, como descreve o fabricante. Perante este fato, em todas as mineralizações executadas selecionou-se o nível máximo de potência (P10) do forno.

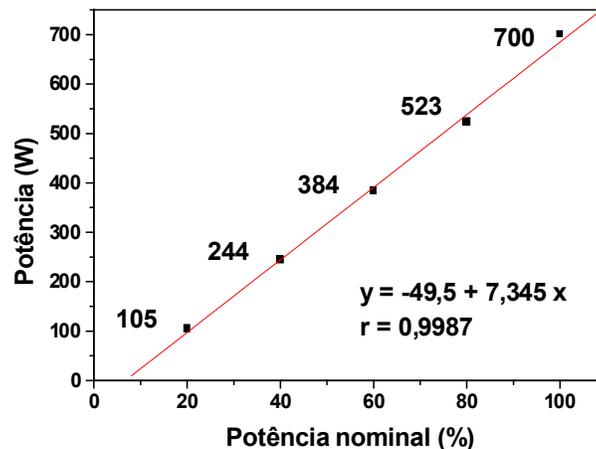


Figura 6: Curva da potência real obtida para o forno de microondas caseiro.

### C. INVESTIGAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MICROONDAS DENTRO DO FORNO

A investigação da distribuição das microondas dentro da cavidade de irradiação é um parâmetro fundamental para se obter resultados precisos e reproduzíveis [30]. Um forno de microondas caseiro não possui um dispositivo para espalhar as microondas dentro de sua cavidade e, ainda, não há como deixar as bobinas no prato giratório para uma melhor distribuição das microondas. Em fornos convencionais para laboratórios analíticos são empregados espalhadores em forma de um "ventilador" dotados com uma "antena" metálica. Para a execução desta investigação, foram empregados 10 béqueres contendo 40 mL de água em cada um deles. O prato giratório do forno foi removido e os béqueres, previamente pesados, foram distribuídos sobre a superfície da cavidade. A figura 7 mostra o posicionamento dos béqueres no forno de microondas.

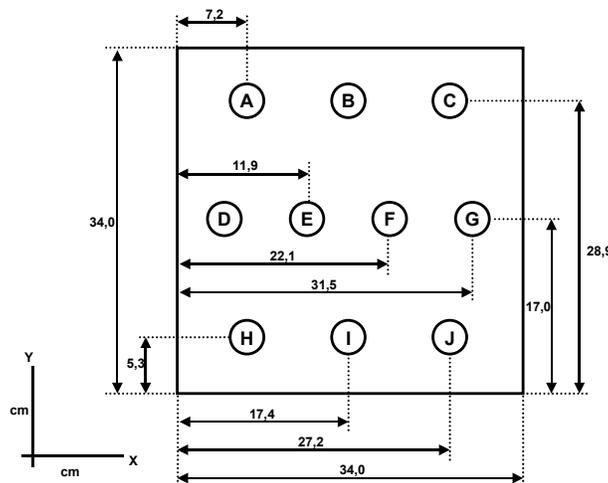


Figura 7: Posições dos béqueres (A-J) no interior do forno de microondas caseiro.

O forno foi acionado por 2 minutos a 700 W (potência máxima) e, após resfriados, os béqueres foram pesados novamente e a diferença de massa foi obtida. Este experimento foi executado em triplicata. A perda de massa nas diferentes posições variou de 0,8 a 2,2 g.

A posição que apresentou a maior diferença de massa situa-se no ponto A (Figura 7 - 7,2 e 28,9 cm para os eixos x e y, respectivamente). O gráfico a seguir (figura 8), mostra a perda de massa em função dos eixos x e y.

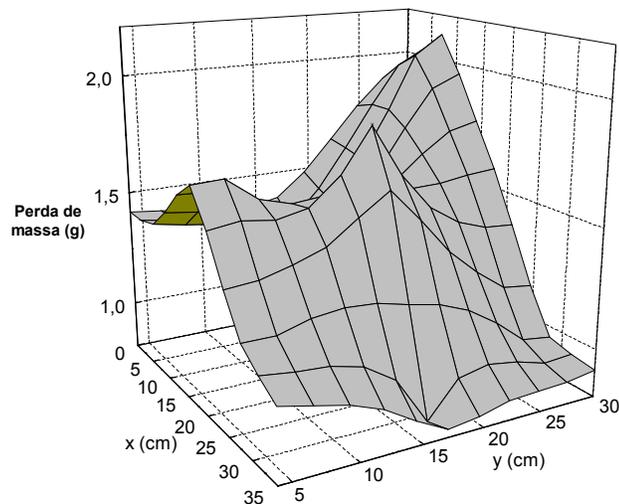


Figura 8: Superfície de resposta obtida, de acordo com a figura 7, devido a influência da atuação das microondas nas diferentes posições dos béqueres (eixos x e y) na perda de massa.

Com base nos resultados apresentados acima, a bobina de mineralização foi posicionada no ponto A (Figura 7), enquanto que no ponto C (27,2 e 28,9 cm para os eixos x e y, respectivamente) foi posicionado um béquer com aproximadamente 100 mL de água, para evitar danos ao magnetron; a cada ciclo de mineralização a água deste béquer era reposta.

#### **D. INVESTIGAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E ESTABILIZAÇÃO DA SUSPENSÃO**

O tamanho de partícula da amostra é um fator determinante para a obtenção de valores reprodutíveis [22]. Nos estudos efetuados, foram empregados tamanhos de partículas que variaram de 53 a 250  $\mu\text{m}$ .

Quando se empregaram tamanhos de partícula de 100  $\mu\text{m}$  e diâmetro interno de 0,8 mm para o sistema de transmissão e bobina de mineralização, notou-se a ocorrência de entupimentos no sistema de fluxo, com conseqüente prejuízo da etapa de mineralização. Este fato também ocorreu quando empregaram-se tamanhos de partículas menores que 53  $\mu\text{m}$  e, dependendo da amostra empregada (peixe), notou-se um aumento da pressão.

Devido aos acontecimentos descritos, as linhas de transmissão e a bobina de mineralização foram trocadas por tubos de Teflon<sup>®</sup> com 2 mm de diâmetro interno.

Utilizando-se tamanhos de partícula menores que 53  $\mu\text{m}$ , os resultados encontrados foram satisfatórios no tocante à precisão, já que o desvio padrão relativo das medidas situou-se entre 6 a 10%.

Assim, um tamanho de partícula < 53  $\mu\text{m}$  foi fixado para a execução dos demais experimentos. Utilizou-se um banho de ultra-som para promover a estabilização, homogeneização e desgaseificação das suspensões empregadas nas mineralizações. Foram testados tempos que variaram de 5 a 25 minutos. Utilizando-se intervalos de 5 a 10 minutos, a amostra não se encontrava estabilizada e, conseqüentemente, a introdução da suspensão no sistema de fluxo era muito complicada. Ao se empregar tempos de homogeneização  $\geq 15$  minutos, problemas com a introdução da suspensão foram minimizados. Portanto, o tempo de 15 minutos foi fixado a fim de se obter o melhor compromisso entre a homogeneização da amostra e a frequência analítica.

### ***E. INVESTIGAÇÃO DA ALÇA DE AMOSTRAGEM***

O volume de suspensão escolhido para a execução das mineralizações foi de 200  $\mu\text{L}$ . Este volume foi selecionado, pois apresentou suficiente sensibilidade para o método espectrofotométrico e satisfatória expansão de gases formados durante a mineralização. O uso de volumes maiores (300 a 400  $\mu\text{L}$ ) de suspensão no sistema de mineralização acarretavam em aumento da pressão interna da bobina de mineralização e, conseqüentemente, vazamentos na válvula de Teflon<sup>®</sup>. Portanto, a utilização de volumes superiores a 200  $\mu\text{L}$  proporcionavam a obtenção de valores inaceitáveis para a resposta do ferro.

### ***F. INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MINERALIZAÇÃO***

As condições de mineralização foram investigadas, primeiramente, para amostras certificadas de ostra. O ácido nítrico 6 mol L<sup>-1</sup> foi utilizado inicialmente para o preparo das suspensões. Em todos os experimentos, foi utilizada a potência máxima (700 W) do forno e o tempo de mineralização variou de 5 a 30 minutos. Tempos

superiores a 30 minutos não foram testados, pois a velocidade analítica seria prejudicada e inviabilizaria o sistema proposto.

As suspensões de ostra em ácido nítrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas pesando-se 250 mg de amostra e diluindo-as em 25 mL de ácido. Injetou-se  $200 \mu\text{L}$  de suspensão no sistema de mineralização e, posteriormente, ajustaram-se o volume para 10 mL. A figura 9, mostra a resposta em função do tempo de exposição às microondas.

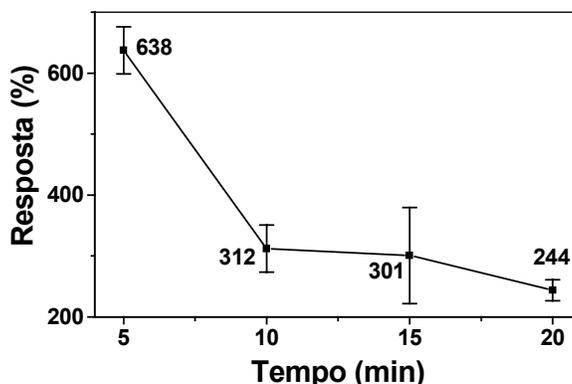


Figura 9: Resposta para o ferro em amostras de ostra preparadas em  $\text{HNO}_3$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como está evidenciado na figura 9, o ácido nítrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$  foi ineficiente para a mineralização da amostra de ostra, com valores de resposta variando de 638 a 244% para 5 e 20 minutos, respectivamente. Outro ponto relevante a ser destacado na amostra mineralizada, é o fato da sua coloração absorver no mesmo comprimento de onda do complexo ferro/fenantrolina (512 nm). Portanto, as respostas apresentaram valores superiores a 100%.

Diante do problema analítico apresentado, resolveu-se aumentar a concentração de  $\text{HNO}_3$  para  $8 \text{ mol L}^{-1}$ , porém, novamente os resultados não foram satisfatórios (figura 10). As respostas variaram de 281 a 244% para 15 e 25 minutos, respectivamente.

Como os resultados obtidos ainda não eram satisfatórios, fez-se necessária a adição de uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio, afim de aumentar o poder oxidante da mistura mineralizadora. No teste seguinte, ainda utilizando-se  $\text{HNO}_3$   $8 \text{ mol L}^{-1}$ , adicionaram-se 2 gotas de peróxido de hidrogênio. Foram testados tempos de 15, 20 e 25 minutos e os resultados obtidos foram de 280, 268 e 197%, respectivamente. Os valores apresentaram uma tendência de melhoria na resposta. Desta forma, o volume de peróxido de hidrogênio na suspensão foi aumentado. Assim,

utilizou-se uma mescla composta por 23 mL de  $\text{HNO}_3$  8 mol  $\text{L}^{-1}$  e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v), constituindo-se deste modo uma suspensão com 2,4% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

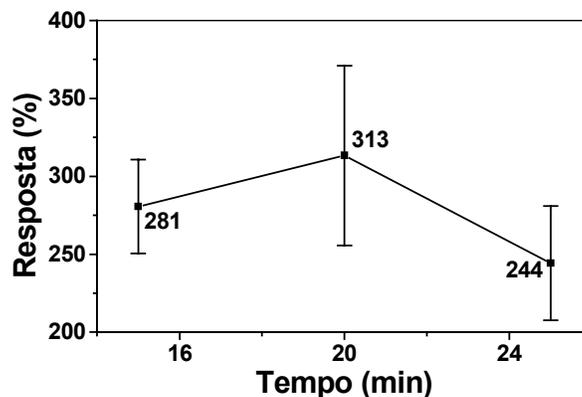


Figura 10: Resposta para o ferro em amostras de ostra preparadas em  $\text{HNO}_3$  8 mol  $\text{L}^{-1}$ .

Os tempos investigados foram de 20 e 25 minutos e os resultados obtidos foram de 205 e 170%, respectivamente. Os resultados obtidos não apresentaram uma diferença significativa quando comparados com aqueles obtidos pela adição de 2 gotas de peróxido de hidrogênio.

Na etapa seguinte, aumentou-se para 6,0% (v/v) a concentração de peróxido de hidrogênio na suspensão. Os resultados obtidos foram de 233 e 308% para 20 e 25 minutos, respectivamente. Os valores para a resposta voltaram a apresentar um aumento significativo. Este fato se deve à diminuição da concentração do  $\text{HNO}_3$  na suspensão, devido ao aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e consequente não destruição da matéria orgânica da amostra.

Assim, utilizou-se o  $\text{HNO}_3$  concentrado no preparo das suspensões e 6% (v/v) de peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos para 10 minutos de mineralização variaram de 108 a 113% em termos de resposta. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios para a amostra de ostra certificada.

Finalizada a etapa de otimização das melhores condições para mineralização das amostras de ostra, partiu-se para a mineralização das amostras certificadas de mexilhão e peixe. A mineralização das amostras de mexilhão, foram efetuadas utilizando-se a mesma mescla estabelecida para a ostra. A suspensão apresentou uma

forte formação de espuma, devido ao teor de gordura apresentado na amostra. Os resultados obtidos para a resposta foram muito ruins (ca. 600%).

O mexilhão, com certeza, apresenta características físicas distintas da ostra e, portanto, a mescla de mineralização da ostra não poderia ser utilizada para o mexilhão. Empregou-se uma mistura mineralizadora mais drástica, com a presença de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  na proporção de 3:1 (água régia invertida) e 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos foram de 241% para um tempo de 30 minutos.

Na utilização de uma mescla mineralizadora constituída por água régia e 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio, os resultados foram satisfatórios, com a obtenção de 103% para a resposta do ferro, e um tempo de mineralização de 20 minutos. Esta mescla obtida foi empregada na mineralização das amostras de peixe certificadas e não certificadas, com a obtenção de ótimos resultados que serão mostrados a seguir.

### G. DETERMINAÇÃO DE FERRO

Durante os experimentos efetuados para a otimização das condições de mineralização, o sistema de fluxo para a determinação de ferro passou por uma série de modificações em seus parâmetros físicos e químicos. O principal parâmetro químico avaliado foi a composição do tampão utilizado.

Na determinação de ferro nas amostras de ostra foi empregado  $\text{HNO}_3$  concentrado, porém, a composição do tampão descrita por Mortatti *et al* [71] era insuficiente para manter o pH em 3,7 e, conseqüentemente, houve o aparecimento de picos duplos. A presença de picos duplos durante o processo de determinação deve-se à presença de zonas de amostra com diferentes valores para o pH (figura 11).

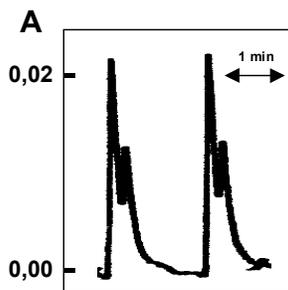


Figura 11: Sinais analíticos obtidos quando o sistema tampão era insuficiente para manter o pH da zona de amostra em 3,7.

Portanto, foi necessária uma pequena variação no sistema tampão para manter o pH em 3,7. Para as amostras de ostra, a proporção empregada possuía 1 parte de ácido acético 2 mol L<sup>-1</sup> e 1 parte de acetato de amônio 2 mol L<sup>-1</sup>. Na análise das amostras de mexilhão e peixe a proporção utilizada foi de 1:9.

A vazão do fluido transportador foi diminuída para 2 mL min<sup>-1</sup> para evitar problemas de "drift" na linha base. A figura 12 mostra um registro típico para a determinação de ferro em amostras de ostra, peixe e mexilhão.

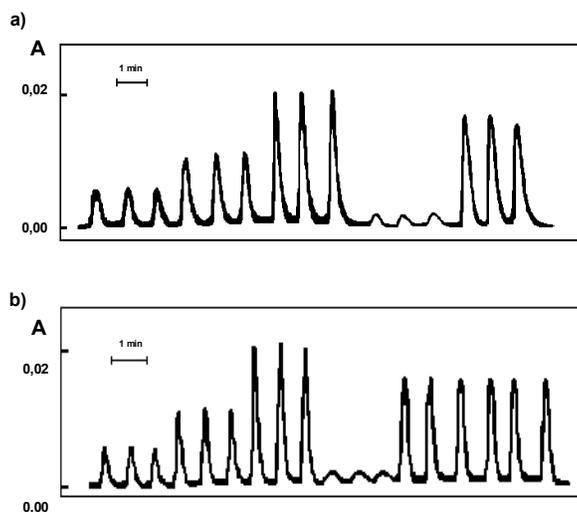


Figura 12: Sinais analíticos obtidos para a determinação espectrofotométrica de ferro, após a mineralização em forno de microondas. a) Da esquerda para a direita, curva analítica para o ferro: 50, 100, 200 µg L<sup>-1</sup>, seguida dos "brancos" e do tecido de ostra mineralizado. b) idem figura 11(a), "brancos", amostras certificadas de mexilhão e peixe.

## H. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

O método proposto permitiu a determinação de ferro, na faixa de 50 a 200 µg L<sup>-1</sup> ( $r > 0,999$ ;  $n = 3$ ) e apresenta limite de detecção e quantificação de 7,5 e 24,4 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente, de acordo com as recomendações da IUPAC [72]. A precisão, expressa como RSD, foi de 3,7% ( $n = 10$ ) para repetibilidade e 5,0% ( $n = 30$ ) para reprodutibilidade utilizando a amostra certificada de tecido de ostra.

## I. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Para validar o método proposto para mineralização de amostras, foram analisadas várias amostras de peixes. A tabela 1 traz os valores obtidos para a determinação de ferro, nas amostras certificadas e não certificadas.

Tabela 1: Resultados obtidos para as amostras certificadas e as amostras não certificadas de peixe.

| Peixe                              | Nome científico                          | Conc. (µg g <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|--|-----------------------------|
| Cação                              | <i>Mustelus canis</i> , Mitch.           | 89 ± 5                      |
| Pescadinha                         | <i>Cynoscion leiarchus</i> (Cuv. & Val.) | 162 ± 19                    |
| Merluza                            | <i>Merluccius merluccius</i> , Hubbsi    | 79 ± 3                      |
| Tecido de Ostra <sup>**</sup>      | ----                                     | 567 ± 32                    |
| Peixe homogeneizado <sup>***</sup> | ----                                     | 54 ± 2                      |
| Mexilhão <sup>****</sup>           | ----                                     | 167 ± 6                     |

\* Média ± desvio padrão (n = 5);

\*\* NIST SRM Tecido de Ostra 1566a (Valor certificado: 539 ± 15 µg g<sup>-1</sup>);

\*\*\* IAEA SRM MA-A-2 1062/TM (Valor certificado: 54 ± 1 µg g<sup>-1</sup>);

\*\*\*\* NIES CRM n° 06 Mexilhão (Valor certificado: 161 ± 12 µg g<sup>-1</sup>).

Aos resultados obtidos, para as amostras certificadas, foi aplicado teste *t* não pareado, sendo que os valores obtidos para *t*, permitiram um grau de confiança de 95%.

---

---

## **CAPÍTULO 2**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE FLUXO PARA A  
MINERALIZAÇÃO DE AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS:  
DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA  
CATALÍTICA DE COBALTO**

---

---

## I. OBJETIVOS

No segundo capítulo dessa dissertação, os objetivos primordiais foram o acoplamento do forno de microondas ao computador e inserção de mais duas bobinas de mineralização no interior do forno de microondas. Desta forma, objetivamos o desenvolvimento de metodologias rápidas para a determinação espectrofotométrica catalítica de cobalto em amostras alimentícias mineralizadas. Durante o decorrer dos trabalhos foi necessária a otimização, com o emprego de recursos quimiométricos, do método para a determinação de cobalto.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO COBALTO

O cobalto é um elemento metálico que, mesmo sem ser muito abundante, é bastante comum na crosta terrestre, sendo que a sua concentração aproximada no solo de 0,1 a 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  e em água do mar é de 0,1 a 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Sua presença é comum em rochas ígnea, águas, meteoritos, carvão, solos, plantas e animais [73].

Inicialmente, o cobalto foi utilizado para dar coloração azul a vidros e cerâmicas, porém, atualmente o seu emprego é bastante comum na manufatura de ligas com alto ponto de fusão e resistentes à corrosão, produção de metais com alta resistência mecânica, pigmentos, vidros, fertilizantes, na indústria de petróleo e química, como catalisador, e na medicina como fonte de radiação (Co-60) [74].

O cobalto apresenta caráter essencial, e é o principal constituinte da vitamina B-12 [70, 75]. A dose diária requerida para adultos é de 3 a 4  $\mu\text{g}$  desta vitamina, e a concentração normal no plasma humano é de 450  $\text{pg mL}^{-1}$ . A sua deficiência pode causar anemia perniciosa [76]. As principais fontes de vitamina B-12 incluem alguns peixes (truta, arenque, cavala, etc.), ostras, ovos e leite. Em alguns órgãos, como fígado, coração e rins a concentração de vitamina B-12 é particularmente elevada. A vitamina B-12 é amplamente indicada para o tratamento de diversas doenças, como anemia perniciosa e distúrbios relacionados à fadiga muscular. Porém, altos teores de

cobalto no organismo são extremamente perigosos, pois o mesmo prejudica a absorção do ferro [70].

A deficiência de cobalto é particularmente observada em animais de pastejo. Como resultado, os mesmos apresentam uma aparência pouco saudável, porém, sem a presença de anemia. O diagnóstico é difícil quando baseado em parâmetros clínicos e patológicos. A maneira mais segura de se estabelecer a deficiência de cobalto é observar e medir as respostas resultantes da ministração oral de cobalto ou injeção de vitamina B12, em termos de aumento de apetite e ganho de peso. Desta forma a determinação de cobalto, principalmente, em fígado bovino é de extrema importância [76].

## B. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO

O sistema reacional utilizado neste trabalho para a determinação de cobalto, baseia-se na oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio catalisada por cobalto (II), a qual foi inicialmente proposta por Bognár [77], em 1961. Bognár efetuou uma série de estudos para a determinação de cobalto por espectrometria de absorção molecular. Foram testados 47 meios reacionais, sendo a oxidação de Tiron (2% m/v) pelo peróxido de hidrogênio (0,3% v/v), catalisada por cobalto, a reação que apresentou melhores resultados. A figura 13 mostra a equação da oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio, tendo o cobalto como catalisador.

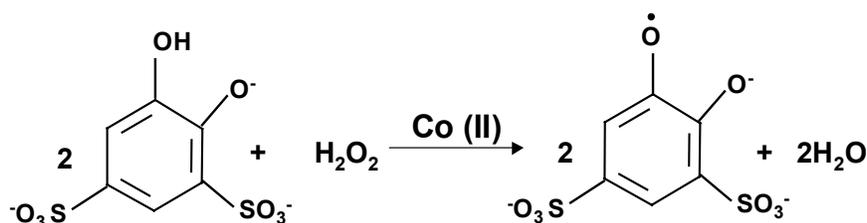


Figura 13: Reação de oxidação de Tiron por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Otto *et al* [78], otimizaram o método proposto por Bognár. O limite de detecção obtido foi de  $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$  Co e as concentrações de Tiron e  $\text{H}_2\text{O}_2$  empregadas foram de  $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ .

Em 1987, Isshiki e Nakayama [79], adaptaram o método proposto por Bognár para sistemas de fluxo. As concentrações de Tiron e peróxido de hidrogênio utilizadas

foram de  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, e o pH foi ajustado com um tampão carbonato para valores de 8,5 a 12,0. O sistema proposto permitia uma taxa de amostragem de  $40 \text{ amostras h}^{-1}$ , com um tempo de reação de 210 segundos e temperatura de  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A figura 14 mostra o sistema de fluxo proposto por Isshiki e Nakayama.

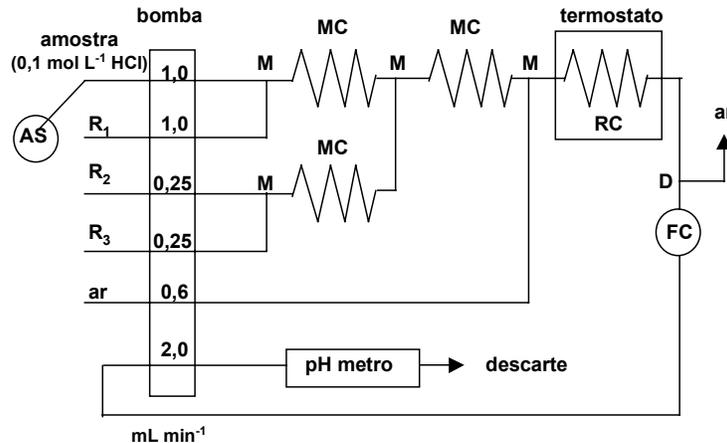


Figura 14: Sistema de fluxo proposto por Isshiki e Nakayama para a determinação de cobalto. MC: bobinas de mistura (1 mm d.i. e 0,5 m); RC: bobina de reação (1 mm d.i. e 12 m); M: pontos de confluência; FC: cela de fluxo ( $18 \mu\text{L}$ ); AS: Auto amostrador; D: desburbulhador;  $R_1$ : solução  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de carbonato de sódio-bicarbonato de sódio/  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio;  $R_2$ : Tiron  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e  $R_3$ :  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ .

Arruda *et al* [80], empregaram um sistema de fluxo para a determinação de cobalto em amostras mineralizadas de fígado bovino. Os autores estabeleceram que os reagentes poderiam ser previamente misturados no sistema de fluxo e, posteriormente, mesclados com a amostra. No sistema de fluxo proposto, foi possível o processamento de  $40 \text{ amostras h}^{-1}$ . A curva analítica mostrou-se linear entre  $0,00$  e  $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobalto, e o limite de detecção foi de  $2 \text{ ng L}^{-1}$ . A figura 15 mostra o sistema de fluxo estabelecido.

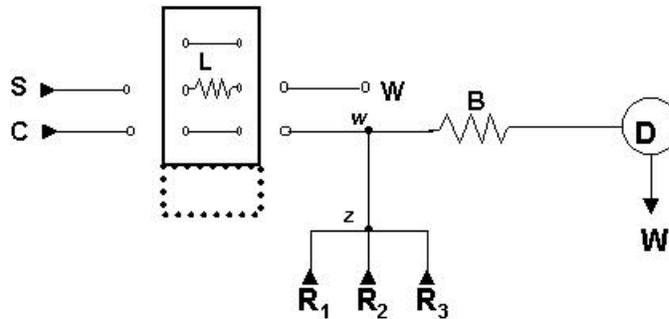


Figura 15: Diagrama de fluxo. S: amostra ( $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ); L: alça de amostragem ( $60 \mu\text{L}$ ); C: transportador ( $\text{HClO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  -  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ );  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ :  $\text{NaOH}$   $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  +  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , Tiron  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,0005 \text{ mol L}^{-1}$  a  $0,21 \text{ mL min}^{-1}$ ; B: bobina de reação ( $150 \text{ cm}$ ); D: detector ( $426 \text{ nm}$ ); w e z: pontos de confluência; W: descarte.

Malahoff *et al* [81], determinaram cobalto em água do mar utilizando um sistema de fluxo montado em uma embarcação. As concentrações de Tiron e peróxido de hidrogênio estabelecidas foram  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,3\%$  (v/v), respectivamente. O sistema permitiu uma taxa de amostragem de  $50$  amostras  $\text{h}^{-1}$  e um limite de detecção de  $1 \text{ ng L}^{-1}$ .

### C. RECURSOS QUIMIOMÉTRICOS: REDE NEURAL E ALGORITMO GENÉTICO

Recentes avanços em neurofisiologia têm desvendado vários mecanismos sobre o fluxo e o processamento de informações que ocorrem no cérebro humano. Alguns destes mecanismos foram modelados matematicamente, permitindo a elaboração de algoritmos computacionais que simulam, ainda que de modo simplificado, a mais básica das estruturas cerebrais: o neurônio [82].

A capacidade de se implementar computacionalmente versões simplificadas de neurônios biológicos deu origem a uma sub-especialidade da inteligência artificial, conhecida como redes neurais. Redes neurais é o nome dado à um conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais, especialmente projetados para simular o processamento de informações e aquisição de conhecimento do cérebro humano [83].

Uma rede neural pode ser considerada uma caixa de processamento que pode ser treinada para que, a partir de um conjunto de dados de entrada ("inputs"), possa gerar uma ou mais saídas ("outputs"), conforme representado na figura 16.

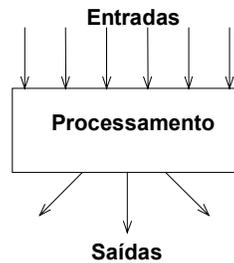


Figura 16: Representação operacional de uma rede neural.

A partir da teoria evolutiva das espécies, John H. Holland um pesquisador da Universidade de Michigan propôs, nos anos 60, a construção de um algoritmo matemático para otimização em sistemas complexos, sendo batizado de Algoritmo Genético [84].

A partir dos anos oitenta, o algoritmo genético recebeu um grande impulso em diversas áreas científicas devido, principalmente, à popularização dos computadores e consequente surgimento de sistemas computacionais cada vez mais rápidos e potentes. As áreas de maior aplicação são:

- Processamento de imagens;
- Modelagem e identificação de sistemas;
- Filtros adaptivos, para o cancelamento de ruídos;
- Robótica;
- Parâmetros de redes neurais.

A otimização por algoritmos genéticos envolve a maximização ou otimização de uma função ou uma série de variáveis num processo. De uma maneira muito simplificada o algoritmo genético trabalha de acordo com a figura 17:

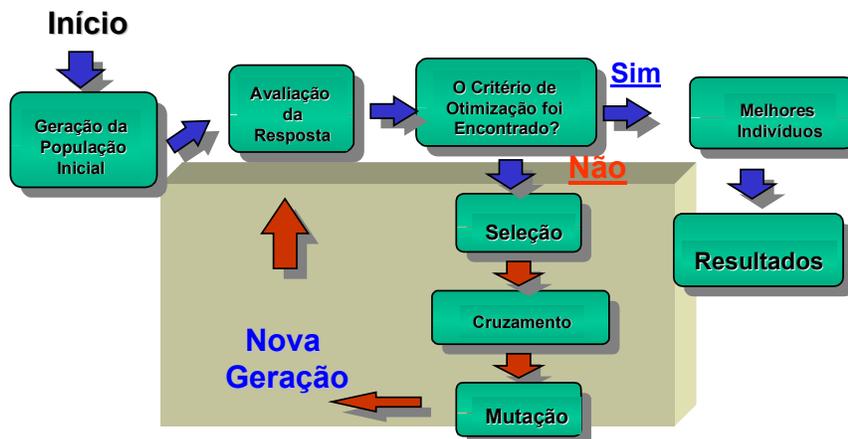


Figura 17: Esquema de funcionamento de um algoritmo genético.

Desde o primeiro trabalho escrito por MacCulloch e Pitts [82] em 1943, a utilização de recursos quimiométricos, para o equacionamento de problemas analíticos tem, alcançado um grande número de trabalhos.

Campmajó *et al* [85], utilizaram redes neurais na otimização de um sistema de fluxo para a determinação enzimática de glicose. Foram investigados a velocidade do fluido, volume injetado e comprimento da bobina de homogeneização. Os autores afirmaram que uma das grande vantagens da utilização de redes neurais, refere-se ao fato de que não é necessário nenhum conhecimento prévio sobre a estrutura e relações entre as variáveis mais importantes do sistema.

As principais aplicações de redes neurais e algoritmo genético, em química analítica, estão centradas no estudo de íons seletivos, predição de estruturas secundárias de proteínas, diagnóstico e predição de problemas durante o controle químico de um processo [86].

Weijer *et al* [87], empregaram redes neurais e algoritmo genético para estabelecer uma relação entre a estrutura do polietileno tereftalato (PET) e suas propriedades.

Bos *et al* [88], determinaram simultaneamente ferro, níquel e cromo em amostras de aço. Devido à grande interação entre estes três metais, a concentração de cada um não é proporcional ao sinal analítico, portanto, um modelo não linear apresenta grande interesse. Os autores estabeleceram um experimento fatorial e, com a utilização de

redes neurais, estabeleceram um método para a determinação destes metais por espectroscopia de fluorescência de raio-X.

A determinação simultânea de diversas espécies em diferentes matrizes, pode ser facilmente otimizada com o emprego de redes neurais, obtendo-se resultados satisfatórios. Ventura *et al* [89], Hongmei *et al* [90] e Ruisánches *et al* [91], identificaram 2 e 3-clorofenol; dióxido de enxofre e umidade relativa; e cálcio e magnésio, respectivamente.

Blanco *et al* [92], empregaram redes neurais para a determinação simultânea de benzilamina e butilamina. Nestas determinações foram utilizadas pequenas quantidades do reagente cromogênico aldeído salicílico caracterizando desta forma uma reação de pseudo primeira ordem. A utilização destas reações apresenta as seguintes vantagens: diminuição da concentração com conseqüente economia de reagentes, e utilização de reagentes pouco solúveis.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### A. MATERIAL

Aos materiais descritos no primeiro capítulo, foram acrescentados:

- Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES), marca Perkin Elmer, modelo Optima 3000 DV;
- Espectrômetro de Absorção Atômica (AAS), marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 300;
- Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (ETAAS), marca Perkin Elmer, modelo 4100 ZL;
- Forno de Microondas, marca Questron, modelo QW 3000;
- Microscópio de Varredura Eletrônica, marca Jeol, modelo JSM-T300;
- Filme fotográfico, marca Kodak, modelo Tri-X pan film TX 120;
- *Scanner* de mesa, marca Hewlett Packard, modelo Scanjet 3c;
- Papel de filtro, marca Framex, quantitativo – faixa azul.

## B. REAGENTES E SOLUÇÕES

Aos reagentes e soluções descritas no primeiro capítulo, deve-se acrescentar:

- Sulfato de Cobalto (II) heptahidratado ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), P. M. 281,10. Marca Carlo Erba.
- Hidróxido de Sódio ( $\text{NaOH}$ ), P. M. 40. Marca Merck.
- Tiron – [4,5 dihidroxi-1,3- ácido benzenodisulfônico-sal disódio monohidratado] [ $(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_2(\text{SO}_3\text{Na})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ], P. M. 332,22. Marca Aldrich Chemical Company, Inc..
- Sulfato de Cobre (II) ( $\text{CuSO}_4$ ), P. M. 159,60. Marca Merck;
- Níquel em Pó PA, P. M. 58,71. Marca Vetec Química Fina Ltda;
- Manganês em Pó PA, P. M. 54,94. Marca Vetec Química Fina Ltda;
- Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), P. M. 246,49. Marca Carlo Erba;
- Nitrato de Cálcio tetra hidratado [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ], P. M. 236,16. Marca Ecibra;
- Sulfato de Alumínio decaoctahidratado [ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ], P.M. 666,42. Marca Merck;
- Nitrato de Zinco hexahidratado [ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ], P. M. 297,49. Marca Ecibra;
- Cloreto de Crômio (III) hexahidratado ( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), P. M. 266,45. Marca Vetec Química Fina Ltda;
- Dicromato de Potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), P. M. 294,19. Marca Synth;
- Nitrato de Chumbo [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ], P.M. 331,20. Marca Ecibra;
- Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), P. M. 136,09. Marca Merck;
- Sal dissódico do ácido etilenodiamino tetraacético – EDTA, P. M. 336,2. Marca Sigma Chemical Company;
- Citrato de Sódio dihidratado, [ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ], P. M. 294,11. Marca Ecibra;
- Nitrato de Magnésio hexahidratado, [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ], P. M. 256,41. Marca Merck;

Todas as soluções foram preparadas diariamente com água destilada/desionizada e acondicionadas em frascos de polietileno. A relação das soluções encontra-se a seguir.

- Soluções de ácido nítrico nas seguintes concentrações:  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $6 \text{ mol L}^{-1}$  e  $12 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de Tiron na concentração de  $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de Peróxido de Hidrogênio na concentração de  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;

- Soluções de Ferro (III) nas seguintes concentrações:  $180 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $450 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Cobre (II) nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $90 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $135 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Níquel nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Manganês nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $4,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Magnésio nas seguintes concentrações:  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Cálcio nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Alumínio nas seguintes concentrações:  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Zinco nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $24 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Crômio (III) nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Crômio (VI) nas seguintes concentrações:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Chumbo (II) nas seguintes concentrações:  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Fosfato nas seguintes concentrações:  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e  $600 \text{ mg L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de EDTA nas seguintes concentrações:  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Soluções de Citrato nas seguintes concentrações:  $800 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  e  $80 \text{ mg L}^{-1}$  em ácido  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de Nitrato de Magnésio a  $2,6 \text{ g L}^{-1}$ , utilizada como modificador de matriz.

### C. AMOSTRAS

As amostras certificadas empregadas foram:

- Peixe - IAEA (International Atomic Energy Agency) Standard Reference Material (SRM) MA-A-2 1062/TM.
- Mexilhão - NIES (National Institute for Environmental Studies) Certified Reference Material (CRM), número 06.
- Fígado Bovino – NIST (National Institute of Standards & Technology) Standard Reference Material (SRM) 1577a.

Algumas amostras não certificados de peixe, foram analisadas para a determinação de cobalto: cação, pescadinha, bacalhau e merluza. Estas amostras foram preparadas de maneira similar à descrita no primeiro capítulo.

### D. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO

O método para a determinação de cobalto passou por um processo de otimização utilizando-se, para tanto, do auxílio de redes neurais e algoritmos genéticos.

Para a determinação catalítica de cobalto, foi empregado um sistema de fluxo monossegmentado esquematizado na figura 18. Este sistema é semelhante àquele previamente descrito por Pasquini e de Oliveira [93] e que permite a introdução simultânea dos reagentes no interior do monossegmento.

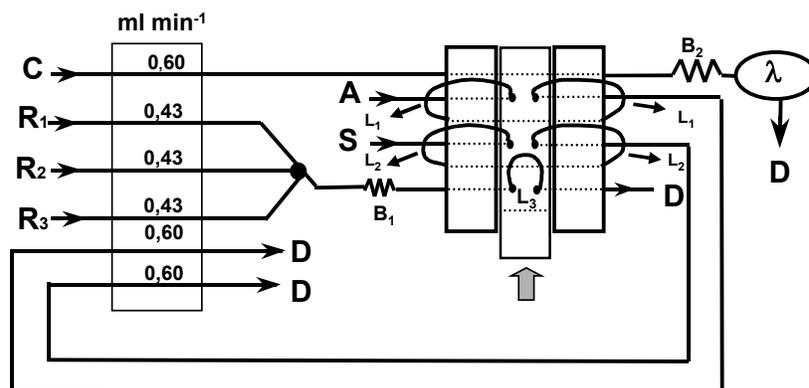


Figura 18: Sistema de fluxo monossegmentado empregado na determinação de cobalto, onde C: transportador; B<sub>1,2</sub>: bobinas para homogeneização de 40 e 100 cm, respectivamente; λ: detector (426 nm); L<sub>1,2 e 3</sub>: alça de amostragem do AR (45 µL), da amostra (45 µL) e da mescla de reagentes (180 µL), respectivamente; R1: NaOH; R2: Tiron; R3: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D: descarte; A: AR; e S: amostra.

Antes do início da otimização, foram realizados alguns experimentos preliminares para a obtenção das faixas de concentração de Tiron e do peróxido de hidrogênio, e da faixa de tempo a serem estudados.

## **E. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETERMINAÇÃO DE COBALTO**

### **1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES**

Na execução destes experimentos preliminares, primeiramente, adaptou-se as concentrações dos reagentes propostas por Bognár [77] para um sistema de fluxo monossegmentado. A solução tampão utilizada foi constituída por NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Estes testes foram chamados de experimento 1. Foram utilizadas concentrações de cobalto que variaram de 200 a 1000 ng L<sup>-1</sup>.

Baseando-se nos trabalhos descritos anteriormente [79-81], preparou-se uma série de novos experimentos preliminares (experimento 2) onde a concentração de Tiron variou de 0,5 a 16 mmol L<sup>-1</sup>, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variou de 0,25 a 8 mmol L<sup>-1</sup> e o tempo de reação englobou uma faixa de 90 a 210 segundos. A curva de calibração testada variou de 10 a 1000 ng L<sup>-1</sup>. O pH foi fixado em 13, com o emprego de uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.

A inclinação da reta de calibração "a" e o coeficiente de correlação "r" foram utilizados para avaliar o desempenho do sistema, relativo às combinações de reagentes e tempo.

O primeiro experimento fatorial foi montado (experimento 3) com 4 fatores e 3 variáveis (4<sup>3</sup>), resultando em 64 experimentos. As características estão listadas:

- Concentrações de Tiron: 0,5 - 2 - 4 - 8 mmol L<sup>-1</sup>;
- Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,25 - 1 - 2 - 4 mmol L<sup>-1</sup>;
- Tempos de residência: 120 - 140 - 160 - 180 segundos.

### **2. EXPERIMENTOS DEFINITIVOS**

Outro experimento fatorial (experimento 4) foi montado e suas principais características são listadas:

- Concentrações de Tiron: 0,5 - 1 - 2 - 4 mmol L<sup>-1</sup>;
- Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,25 - 0,5 - 1 - 2 mmol L<sup>-1</sup>;
- Tempos de residência: 120 - 180 - 240 - 300 segundos.

## **F. ACOPLAMENTO DO FORNO DE MICROONDAS AO COMPUTADOR**

Como a interface PCL-711S permite o gerenciamento de outros instrumentos, a mesma foi utilizada para coletar os dados do espectrofotômetro e controlar as funções do forno de microondas.

A seleção manual das funções do forno de microondas é feita através de um cartão de controle, localizado na parte frontal do aparelho. Neste cartão, cada função é controlada por duas "trilhas" que, quando se estabelece o contato entre elas, o acionamento desta função é executado. As funções estabelecidas para serem controladas através do computador foram: 1 minuto, 10 minutos, ligar, cancelar, potência e tempo.

Entre o forno e a PCL-711S foram posicionados duas chaves lógicas 4016, para auxiliar no gerenciamento das funções do forno de microondas.

## **G. INFLUÊNCIA DOS CONCOMITANTES**

Após a otimização do método para a determinação de cobalto, foram realizados alguns testes referentes à interferência de outros metais (macro e micronutrientes) e algumas espécies no sistema reacional. Os metais investigados foram: ferro, cobre, níquel, manganês, magnésio, cálcio, alumínio, zinco, crômio (III), crômio (VI) e chumbo (II). As espécies estudadas foram: fosfato, EDTA e citrato. Nos testes, foram empregadas soluções de concentrações variando de 3 µg L<sup>-1</sup> (manganês) a 80 mg L<sup>-1</sup> (citrato). Inicialmente, essas concentrações foram baseadas naquelas presentes nos materiais de referência certificados e aumentadas até um nível onde se produzisse, no máximo, ±10% de interferência.

## **H. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COBALTO**

Durante o processo de estudo das melhores condições para a mineralização de amostras, e posterior determinação de cobalto, foram utilizadas amostras certificadas de mexilhão, fígado bovino, ostra e peixe. No preparo das suspensões utilizou-se soluções de  $\text{HNO}_3$  nas seguintes concentrações: 1, 3, 6 e  $12 \text{ mol L}^{-1}$ , e água régia. Algumas amostras exigiram uma mistura mineralizadora mais oxidativa, portanto, foram empregadas suspensões com 0,16 - 0,30 - 0,44 - 0,59 - 0,87 - 1,2 - 4,8 e 7,2 % (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **I. CONFIGURAÇÃO DAS VÁLVULAS**

No intuito de melhorar o desempenho das mineralizações e aumentar a velocidade analítica do sistema de mineralização, foram testadas diversas configurações de válvulas para aprisionar a suspensão no interior do forno de microondas. Estas serão mostradas, e discutidas as limitações de cada uma.

## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **A. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA A DETERMINAÇÃO DE COBALTO**

#### **1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES**

A tabela 2 mostra os principais resultados para os testes executados quando as concentrações propostas por Bognár foram empregadas (experimento 1).

Tabela 2: Impressões obtidas para os primeiros experimentos preliminares.

| Amostra              | Reagentes            | Razão Amostra/Reagentes | Impressões preliminares   |
|----------------------|----------------------|-------------------------|---|
| 132,54 $\mu\text{L}$ | 44,18 $\mu\text{L}$  | 3                       | Nessas condições, o tempo foi insuficiente para a geração de cor (baixa sensibilidade).   |
| 88,36 $\mu\text{L}$  | 44,18 $\mu\text{L}$  | 2                       | Houve uma melhora para as concentrações de 200 a 400 $\text{ng L}^{-1}$ , porém, concentrações superiores apresentaram baixo sinal analítico. |
| 88,36 $\mu\text{L}$  | 88,36 $\mu\text{L}$  | 1                       | Aumento da sensibilidade analítica.   |
| 88,36 $\mu\text{L}$  | 176,72 $\mu\text{L}$ | 0,5                     | Esta condição apresentou os melhores resultados.  |

A tabela 3 mostra os resultados obtidos para o experimento 2.

Tabela 3: Resultados obtidos para o segundo experimento preliminar.

| Teste | Tiron ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) | $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) | Tempo de residência (s) | r      | a    |
|-------|--------------------------------|---|-------------------------|--------|------|
| 1     | 1                              | 0,5   | 90                      | 0,9998 | 3,40 |
| 2     | 16                             | 8   | 90                      | 0,9979 | 0,01 |
| 3     | 16                             | 8   | 120                     | 0,9849 | 0,28 |
| 4     | 4                              | 2   | 180                     | 0,9999 | 0,03 |
| 5     | 0,5                            | 0,25  | 90                      | 0,9985 | 0,04 |
| 6     | 0,5                            | 0,25  | 120                     | 0,9938 | 0,05 |
| 7     | 0,5                            | 0,25  | 150                     | 0,9869 | 0,05 |
| 8     | 0,5                            | 0,25  | 180                     | 0,9854 | 3,59 |
| 9     | 0,5                            | 0,25  | 210                     | 0,9878 | 0,04 |

Analisando-se a tabela 3, pode-se chegar às seguintes impressões sobre o sistema de determinação:

- Combinações de baixas concentrações de Tiron e  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzem curvas analíticas com excelente coeficiente de correlação e alta sensibilidade (teste 1);
- Altas concentrações de Tiron e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (teste 2) resultam em bom coeficiente de correlação e uma baixa sensibilidade;
- Concentrações médias de Tiron e  $\text{H}_2\text{O}_2$  com baixo tempo de residência (teste 4) produziam ótimos coeficientes de correlação com baixa sensibilidade;

Do experimento 3, foram executados 10 experimentos escolhidos aleatoriamente e obtidas algumas conclusões. Com a finalidade de se obter um método mais sensível,

a curva de calibração adotada variou de 10 a 50 ng L<sup>-1</sup>. A tabela 4 mostra as características dos experimentos e os seus resultados.

Tabela 4: Características do experimento fatorial executado.

| Nº | Ordem | Tiron (mmol L <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol L <sup>-1</sup> ) | Tempo de residência (s) | r      | a    |
|----|-------|-------------------------------|---|-------------------------|--------|------|
| 01 | 01    | 0,5                           | 0,25  | 120                     | 0,9963 | 0,05 |
| 02 | 02    | 0,5                           | 0,25  | 140                     | 0,9900 | 0,70 |
| 04 | 03    | 0,5                           | 0,25  | 180                     | 0,9899 | 0,52 |
| 51 | 04    | 0,5                           | 4   | 160                     | 0,9680 | 0,03 |
| 11 | 05    | 4                             | 0,25  | 160                     | 0,9996 | 0,93 |
| 41 | 06    | 4                             | 1   | 120                     | 0,9996 | 0,61 |
| 44 | 07    | 4                             | 2   | 180                     | 0,9984 | 0,39 |
| 62 | 08    | 8                             | 4   | 140                     | 0,9982 | 0,19 |
| 64 | 09    | 8                             | 4   | 180                     | 0,9978 | 0,37 |
| 57 | 10    | 2                             | 4   | 120                     | 0,9904 | 0,35 |

Os resultados tabelados, mostraram algumas tendências, tais como:

- Os resultados para a inclinação da reta apresentaram valores variando de 0,03 a 0,93;
- Para altas concentrações de Tiron, baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e maior tempo de residência (teste 11), houve a obtenção de melhores valores para o coeficiente de correlação e inclinação da reta. Portanto, o fator tempo poderia ser melhor explorado aumentando-se o tempo de residência do sistema.

## 2. EXPERIMENTOS DEFINITIVOS

Neste item são apresentados os resultados do experimento 4. O tempo de reação foi aumentado, pois com maior tempo de residência obtinha-se uma maior sensibilidade analítica. A concentração de Tiron foi diminuída para se obter curvas de calibração com um melhor coeficiente de correlação.

Após a execução de todos os 64 experimentos, os resultados obtidos para o coeficiente de correlação e a inclinação da reta alimentaram a rede neural. Inicialmente, os experimentos foram separados em 2 conjuntos distintos. Um conjunto para calibração e o outro para validação da rede neural. Desta forma os experimentos foram distribuídos da seguinte maneira: 48 para a calibração e 16 para a validação.

Para executar tal separação de modo eficiente, seria necessário a representação gráfica de todos os experimentos em um sistema bidimensional. Nesta representação é possível o reconhecimento de agrupamentos (respostas semelhantes) de experimentos. Na execução de um experimento constituído por  $n$  variáveis, cada amostra será representada por um ponto em um espaço  $n$  dimensional.

Na otimização do método para determinação de cobalto foram empregadas 3 variáveis (Tiron,  $H_2O_2$  e tempo – sistema tridimensional); desta forma, o reconhecimento de agrupamentos pelo olho humano seria praticamente impossível.

Para contornar este problema, nesta otimização foi utilizado um método matemático denominado Análise de Componentes Principais (PCA), que permite a projeção de vetores dos experimentos em um plano, sem a perda de informações relevantes [94]. Assim, foi executada a análise de componentes principais (PCA) dos resultados obtidos dos 64 experimentos.

O gráfico dos escores do primeiro componente principal PC1 "versus" os escores do segundo componente principal (PC2), permite visualizar possíveis agrupamentos dos resultados possibilitando uma seleção mais homogênea das combinações usadas na calibração e na validação. A figura 19 mostra o diagrama utilizado para a seleção dos experimentos.

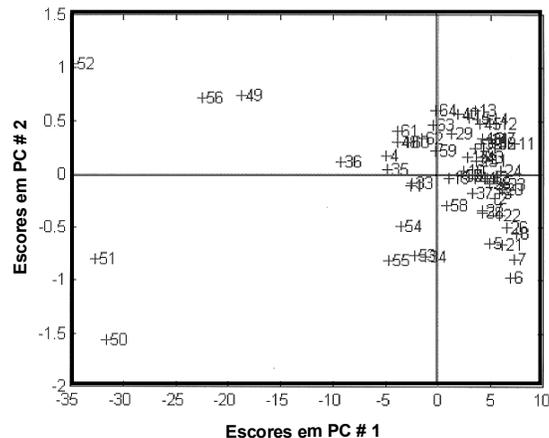


Figura 19: Análise por componentes principais (PCA) dos experimentos executados no planejamento fatorial.

Os experimentos escolhidos para a validação dos parâmetros da rede neural foram: 22,45, 2, 26, 10, 37, 29, 40, 5, 63, 15, 23, 12, 8, 33 e 48.

Para a otimização das melhores condições da rede neural, testaram-se os seguintes parâmetros: funções de transferência e número de neurônios.

O número de neurônios ideal ficou estipulado em 2 pois, desta forma, o erro médio das previsões na etapa de calibração, para a inclinação e coeficiente de correlação, seria minimizado. Na figura 20 tem-se a variação do erro médio em função do número de neurônios. O erro médio foi calculado através da média aritmética entre o erro proveniente das previsões para a inclinação da reta e coeficiente de correlação da reta.

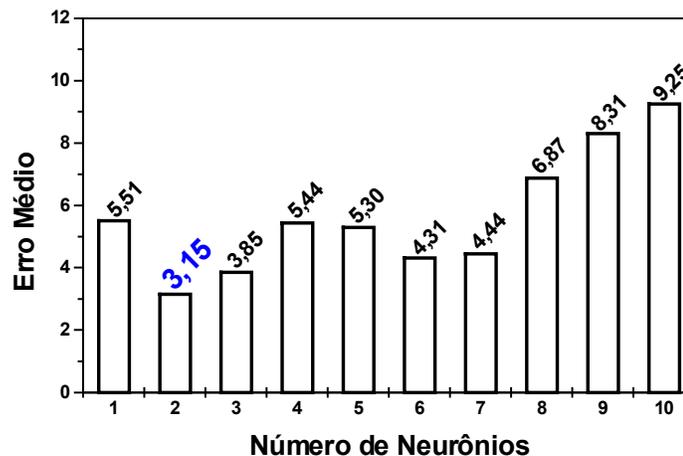


Figura 20: Erro médio das previsões em função do número de neurônios empregados para a etapa de calibração.

A saída (output), constituída pela inclinação (a) e coeficiente de correlação (r) das curvas de calibração, foi obtida em função do sinal de entrada (input), isto é:

$$\text{saída} = f(\text{entrada})$$

A função  $f(\text{entrada})$  deve possuir as propriedades: 1) não negativa, 2) contínua, 3) limitada entre zero e um. A função log-sigmoidal [95] é a mais utilizada em redes neurais, e foi escolhida como uma das funções de transferência. Matematicamente, escrevemos a função log-sigmoidal como:

$$\text{saída} = f(\text{entrada}) = \frac{1}{1 + e^{-(\text{entrada})}}$$

Desta forma, a rede neural ficou configurada de acordo com a figura 21:

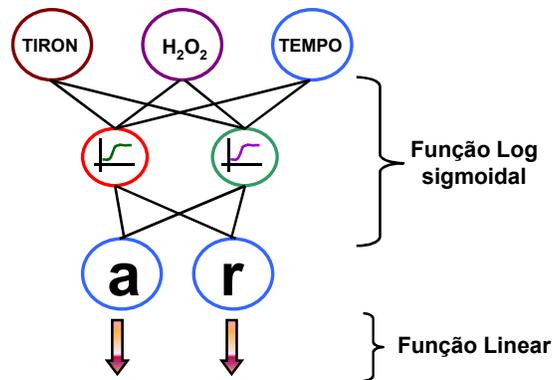


Figura 21: Configuração da rede neural utilizada na otimização dos experimentos.

Com os dados obtidos da otimização, o ótimo do sistema foi encontrado com o auxílio de algoritmo genético.

Na determinação do ótimo do sistema, o algoritmo genético foi estruturado de tal forma que as informações referentes a uma determinada variável pudessem ser codificadas de maneira similar à dos cromossomos biológicos. Através de uma analogia é possível construir um cromossomo artificial, onde cada gene representará uma determinada variável a ser otimizada [84].

A forma mais simples de representar as informações relativas a cada variável a ser otimizada, é codificando-as em números binários (0 – 1). A figura 22 ilustra um exemplo para o sistema de otimização do método para a determinação de cobalto.

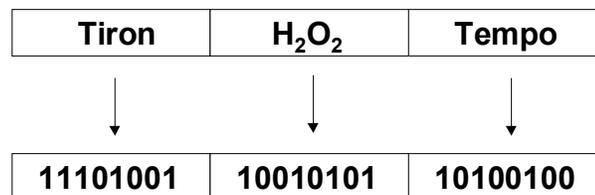


Figura 22: Codificação das variáveis Tiron, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tempo em números binários.

Após concluída esta codificação, foi gerada aleatoriamente uma população inicial, onde foram realizados sucessivos cruzamentos, com a finalidade de se obter o ótimo do sistema. Neste caso, os cruzamentos foram executados com a finalidade de se obter valores para as variáveis estudadas (concentração de Tiron e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e tempo de reação), que refletissem em um coeficiente de correlação ( $r$ ) mais próximo de 1, maior inclinação da reta ( $a$ ) e, conseqüentemente, maior sensibilidade analítica e linearidade.

Finalmente, as melhores condições de determinação encontradas foram: concentração de Tiron e  $\text{H}_2\text{O}_2$  igual a  $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, e o tempo de residência obtido foi de 300 segundos.

Seguindo-se as recomendações da IUPAC [72], o limite de detecção e quantificação para o novo método de determinação proposto foram de 1,7 e  $5,5 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente.

## B. PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA O CONTROLE DO SISTEMA

Através de um programa computacional escrito em Visual Basic<sup>®</sup> 3.0, foi possível estabelecer o controle de algumas funções do forno de microondas e adquirir os sinais analíticos do espectrofotômetro.

Na parte frontal do forno de microondas, está localizado um cartão de controle, que é responsável pelo acionamento de 16 funções. Este acionamento é feito através de um simples toque na função desejada. No gerenciamento de cada uma dessas funções estão 2 trilhas do cartão de controle. A figura 23 mostra o cartão de controle.

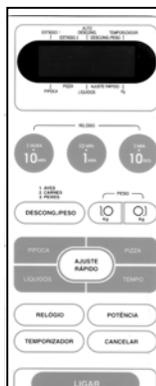


Figura 23: Cartão de controle do forno de microondas caseiro.

A tabela 5 mostra todas as funções e suas "trilhas" de comando correspondentes.

Tabela 5: Funções do forno de microondas e suas respectivas "trilhas" de controle.

| Função do forno de microondas | "Trilhas" de controle |
|-------------------------------|-----------------------|
| 0,1 Kg                        | 3 x 10                |
| 1 minuto                      | 2 x 9                 |
| 1,0 Kg                        | 2 x 7                 |
| 10 minutos                    | 2 x 10                |
| 10 segundos                   | 2 x 8                 |
| Ajuste Rápido                 | 1 x 9                 |
| Cancelar                      | 4 x 8                 |
| Descongelar                   | 3 x 9                 |
| Ligar                         | 4 x 7                 |
| Líquido                       | 5 x 7                 |
| Pipoca                        | 1 x 10                |
| Pizza                         | 1 x 8                 |
| Potência                      | 3 x 7                 |
| Relógio                       | 4 x 10                |
| Tempo                         | 3 x 8                 |
| Temporizador                  | 4 x 9                 |

Para auxiliar no controle destas funções, foram utilizadas duas chaves lógicas 4016. O funcionamento deste dispositivo pode ser explicado através da figura 24.

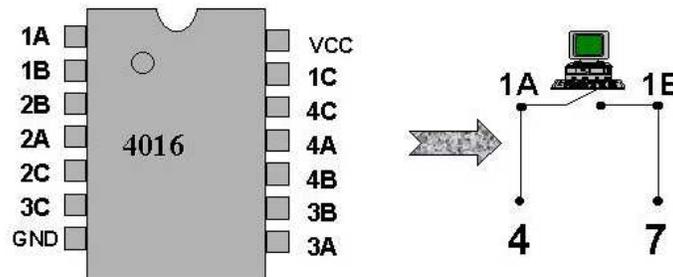


Figura 24: Funcionamento da chave lógica 4016.

No exemplo da figura 24, temos a chave lógica 4016 sendo utilizada para controlar a função Ligar ("Trilhas" 4 x 7). Neste exemplo a "trilha" 4 é conectada no pino 1A da chave 4016 e a "trilha" 7 no pino 1B, sendo o computador, por sua vez, ligado ao pino 1C. Desta forma, o computador exerce a função do operador ao acionar determinada função do forno de microondas, estabelecendo o contato entre os pinos 1A e 1B.

O programa permitiu, também, o controle de outras funções das etapas de mineralização e determinação. A figura 25 apresenta a página de controle gerada pelo programa computacional.

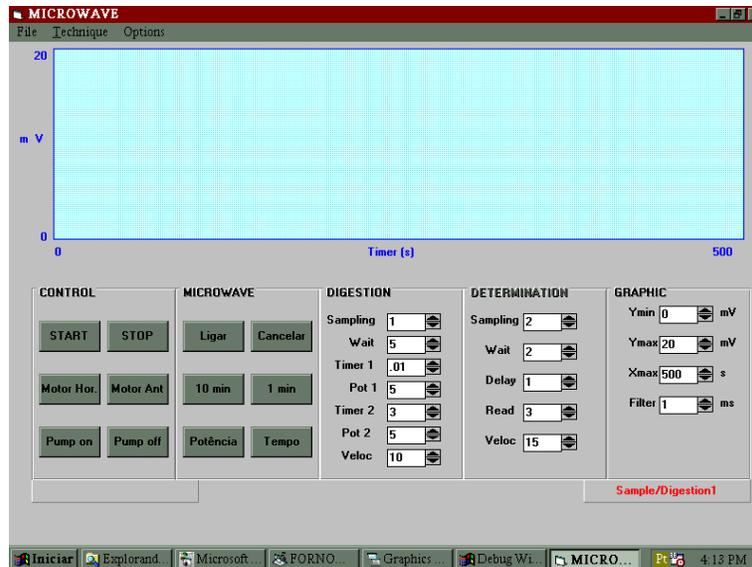


Figura 25: Página de controle do programa computacional.

Com a finalidade de explicar melhor todas as propriedades deste programa, o mesmo será desmembrado. Inicialmente, trataremos das principais funções dispostas no "frame Control" (figura 26).

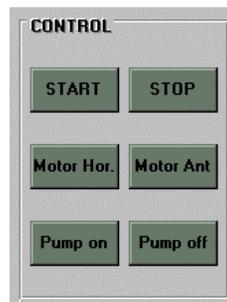


Figura 26: "Frame Control" da página de controle do programa.

Neste "frame", estão localizadas a função "START", para dar início ao programa, ou seja, iniciar a mineralização. Com a função "STOP" o processo de mineralização é interrompido. Para acionar a válvula de aprisionamento da suspensão no sentido horário e anti-horário são utilizadas as funções "Motor Hor." e "Motor Ant.", respectivamente. Para ligar e desligar a bomba peristáltica são utilizadas as funções "Pump on" e "Pump off", respectivamente.

No "frame microwave", seguinte (figura 27) estão posicionados os controles do forno de microondas.



Figura 27: "Frame Microwave" da página de controle do programa.

As propriedades mostradas na figura 27 funcionam de maneira análoga ao modo manual, ou seja, para ligar o forno, por exemplo, por 12 minutos à potência 7, temos que, inicialmente, acionar a função "Tempo" em seguida a função "10 min" e a função "1 min" por duas vezes seguidas. A potência padrão do forno é a potência P10 (700W), ou seja 100% da potência do magnetron e para modificá-la temos de acionar a função "Potência" (no visor do forno aparecerá P10), acioná-la por mais 3 vezes (aparecerá P7). Em seguida, acionar a função "Ligar" e, para cancelar, deve-se acionar a função "Cancelar".

No terceiro "frame" estão concentradas as funções que controlam de maneira mecanizada a mineralização. A figura 28 mostra os detalhes deste "frame".

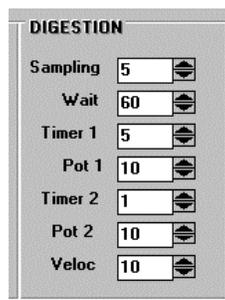


Figura 28: "Frame Digestion" da página de controle do programa.

Inicialmente, temos a função "Sampling" (tempo de amostragem), na figura 28 temos um tempo de 5 segundos. Em seguida, temos a função "Wait" (tempo de residência). Neste exemplo, após a introdução da suspensão no sistema de fluxo, a mesma ficará em movimento por 60 segundos. Este tempo é suficiente para posicionar o volume de suspensão no meio da bobina de mineralização.

Decorridos os 60 segundos do tempo de residência, a bomba peristáltica é automaticamente parada e a função "Timer 1" (primeiro tempo de mineralização) é

acionada. No exemplo da figura 28 temos um tempo de mineralização 5 minutos. Este programa permite, também, a execução de uma mineralização em rampa. Desta forma, o forno de microondas ficará acionado por 5 minutos à potência 10 (P10), pois na função "Pot 1" temos o número 10. Finalizados os 5 minutos da primeira etapa de mineralização o forno ficará ligado por 1 minuto (função "Timer 2") à potência 10 ("Pot 2"). A velocidade da bomba peristáltica, neste exemplo, foi 10 (função "Veloc").

Como foi afirmado anteriormente, este programa permite a aquisição dos sinais provenientes de um espectrofotômetro. Para controlar o processo de determinação é utilizado o "frame Determination". Na figura 29 temos um exemplo.

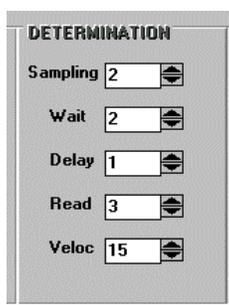


Figura 29: "Frame Determination" da página de controle do programa.

Novamente temos a função "Sampling" (tempo de amostragem), neste exemplo o tempo é de 2 segundos e o tempo de residência, também de 2 segundos (função "Wait"). Entre o tempo de residência e o início da leitura do sinal analítico, temos um tempo de espera de 1 segundo (função "Delay"), e a leitura é feita por 3 segundos (função "Read"). A velocidade da bomba peristáltica é 15.

Na figura 30 temos um exemplo de uma curva de calibração do sistema de fluxo-monossegmentado para a determinação de cobalto.

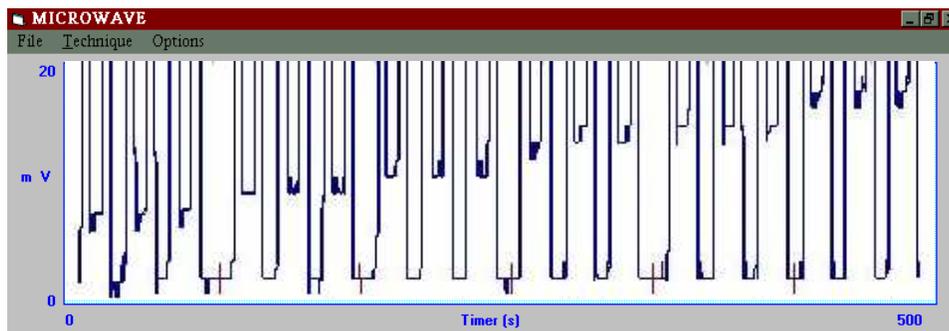


Figura 30: Curva analítica na determinação de cobalto.

Na configuração deste quadro de visualização é utilizado o "frame Graphic", mostrado na figura 31.

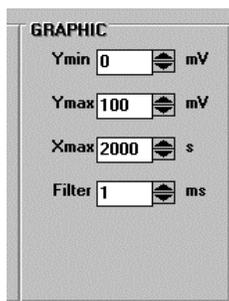


Figura 31: "Frame Graphic" da página de controle do programa.

Neste "frame", temos inicialmente as funções "Ymin" (0) e "Ymax" (100) que estipulam o menor e o maior sinal analítico (mV) apresentados no quadro de visualização (figura 30), respectivamente. A função "Xmax" refere-se ao tempo máximo (eixo x) que os dados serão registrados, no exemplo da figura 31 os dados serão registrados por 2000 segundos. A função "Filter", neste exemplo, foi configurada em 1 ms, ou seja, a cada 1 ms os dados referentes do espectrofotômetro serão registrados.

O programa escrito em Visual Basic® 3.0, pode ser utilizado em seis "técnicas" distintas, conforme a figura 32.

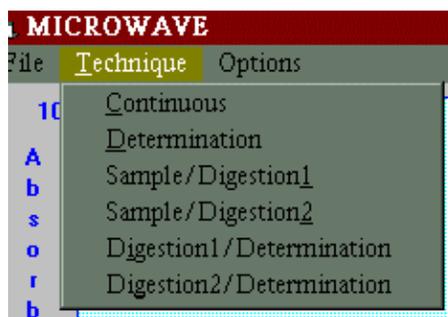


Figura 32: Técnicas do programa.

A primeira técnica, "Continuous", refere-se apenas à aquisição de dados do espectrofotômetro. A técnica "Determination" corresponde também à aquisição de dados, porém, com a utilização dos atributos do frame "Determination". As técnicas "Sample/Digestion1" e "Sample/Digestion2", correspondem à mineralização de uma amostra em uma e duas etapas, respectivamente. Finalizando, as técnicas "Digestion1/Determination" e "Digestion2/Determination", correspondem à

mineralização de uma amostra em uma e duas etapas, respectivamente, e, em seguida, é feita a determinação.

### C. CONCOMITANTES

A investigação dos concomitantes foi executada, tendo como principal referência os metais presentes nas amostras certificadas estudadas.

Na execução dos testes, foi empregada uma solução de cobalto de  $30 \text{ ng L}^{-1}$  e uma outra solução contendo a mesma concentração de cobalto mais o metal a ser estudado.

O ferro (III) foi o primeiro metal a ser investigado. Inicialmente, foi preparada uma solução mista de cobalto e ferro, onde o ferro estava em concentração 100 vezes superior à do cobalto. A figura 33 mostra os experimentos realizados.

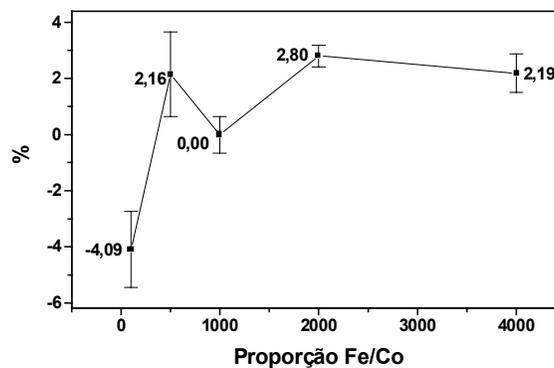


Figura 33: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo ferro como concomitante em concentrações menores. As barras indicam os erros obtidos.

A proporção ferro/cobalto foi aumentada até se obter aproximadamente 10% de interferência. Para o ferro (III) este valor foi obtido quando a proporção foi de 10.000 vezes, conforme a figura 34.

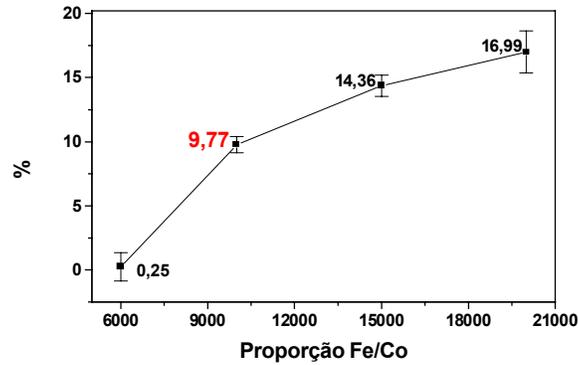


Figura 34: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo ferro como concomitante em concentrações maiores. As barras indicam os erros obtidos.

Em seguida outros metais foram estudados e os resultados são mostrados nas figuras a seguir.

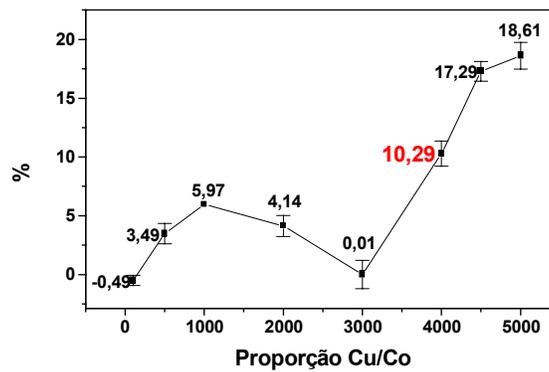


Figura 35: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo cobre como concomitante. As barras indicam os erros obtidos.

Para o cobre, a proporção crítica foi de 4.000 vezes, enquanto que para o níquel a mesma foi de 1000 vezes (figura 36)

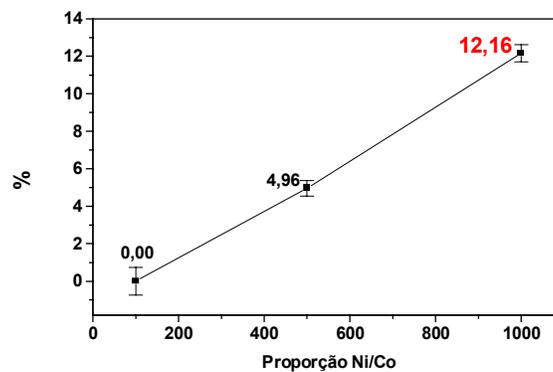


Figura 36: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo níquel como concomitante. As barras indicam os erros obtidos.

O manganês apresentou um maior nível de interferência pois, com uma proporção de 1:110 (figura 37a), foi obtido um aumento de 11,47% no sinal analítico. Outras concentrações foram investigadas (figura 37b)

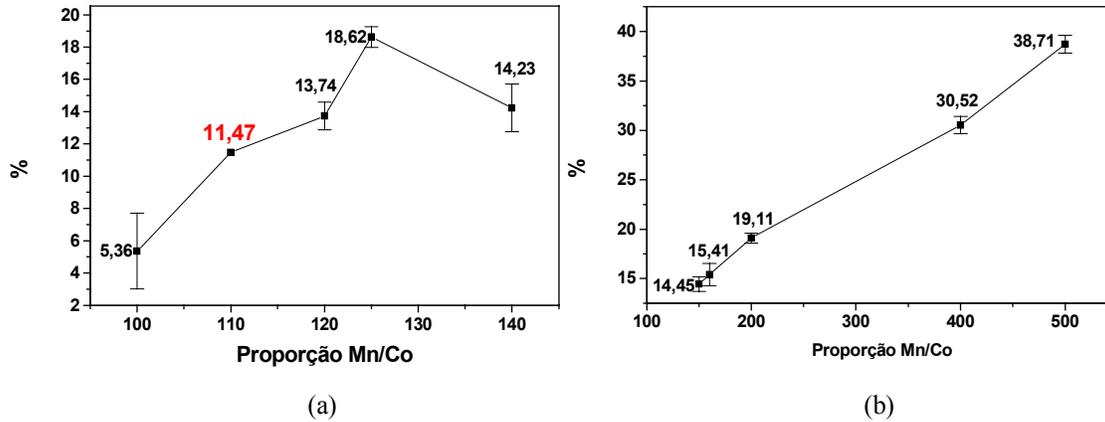


Figura 37: (a) Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo manganês como concomitante. As barras indicam os erros obtidos. (b) Interferência para outras proporções investigadas.

Para os macronutrientes magnésio e cálcio, as proporções críticas foram de 2.000 vezes.

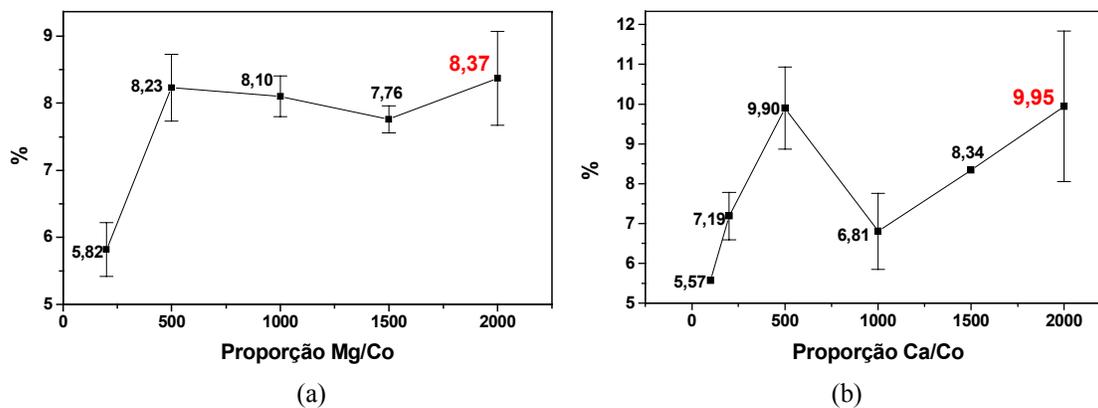


Figura 38: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo magnésio (a) e cálcio (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

Alumínio e Zinco, também, apresentaram uma proporção crítica de 2.000 vezes.

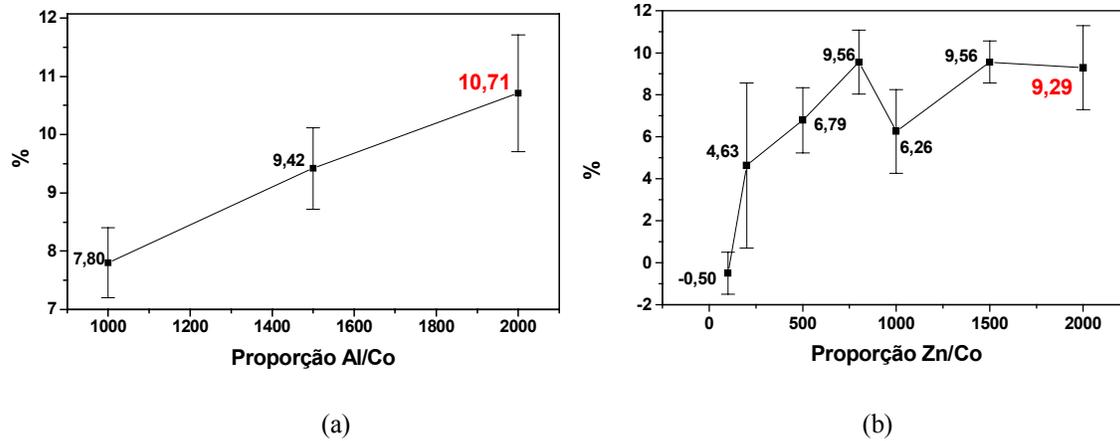


Figura 39: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo alumínio (a) e zinco (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos..

Nos estudos executados para o cromo, foi feita uma distinção para o Cr (III) e Cr (VI), onde as proporções críticas foram de 2.000 e 5.000 vezes, respectivamente.

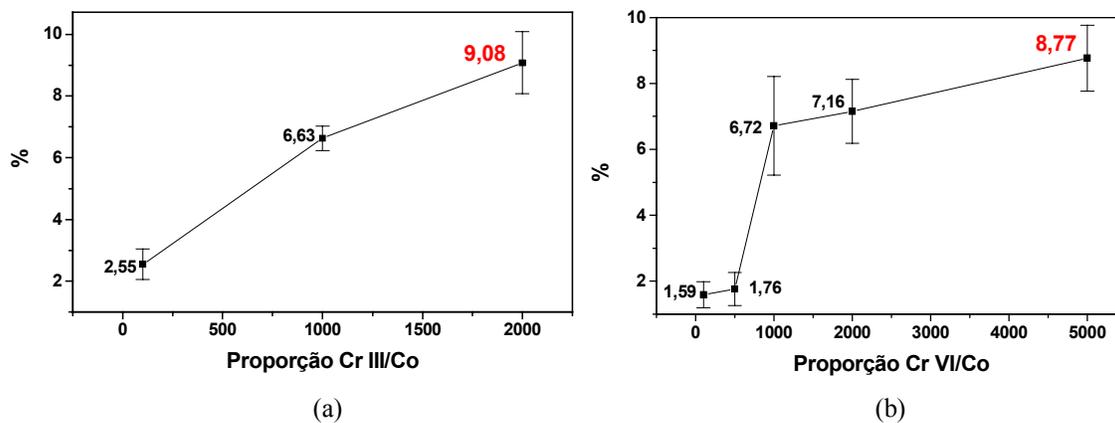


Figura 40: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo cromo (III) (a) e cromo (VI) (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

Para o chumbo iniciamos os testes com uma proporção de 500 vezes (figura 41a) e, logo a seguir, foram utilizadas outras proporções (figura 41b). A proporção crítica para o chumbo foi de 20.000 vezes.

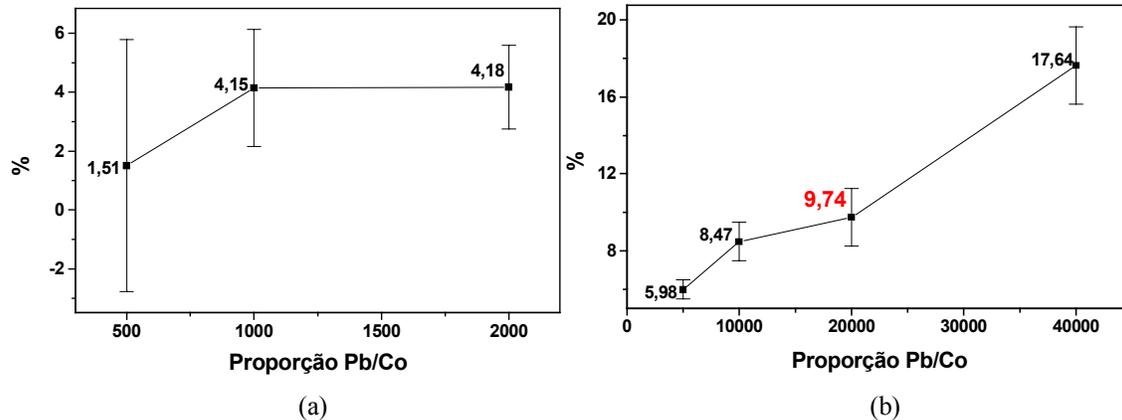


Figura 41: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo chumbo como concomitante. As barras indicam os erros obtidos.

A interferência do ânion fosfato foi praticamente insignificante, uma vez que os testes foram iniciados com uma proporção de 100 vezes (figura 42a) e finalizados com uma proporção de 2.000.000 vezes (figura 42b), apresentando uma proporção crítica de 100.000 vezes, conforme a figura 42b.

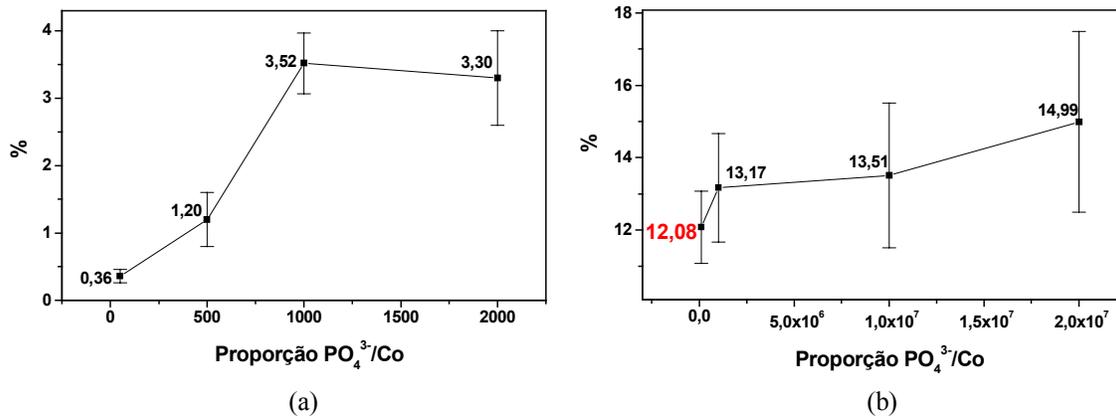


Figura 42: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo fosfato como concomitante. As barras indicam os erros obtidos.

O EDTA (figura 43a) foi a única espécie estudada que apresentou uma interferência negativa (-9,85%). Provavelmente o EDTA complexa o cobalto, deixando o metal em uma forma não disponível para o sistema de detecção. O citrato (figura 43b), a exemplo do fosfato, também apresentou uma proporção crítica insignificante (1.000.000 vezes).

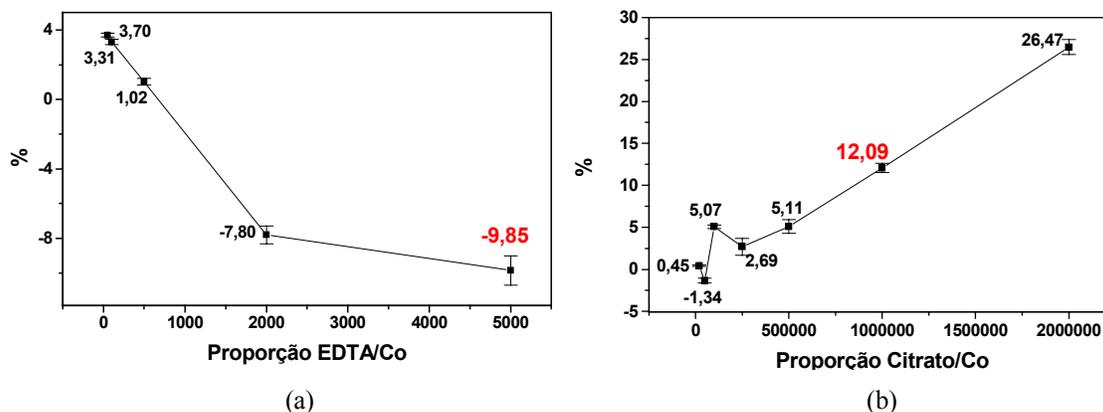


Figura 43: Resultados de seletividade na determinação de cobalto, tendo EDTA (a) e citrato (b) como concomitantes. As barras indicam os erros obtidos.

A tabela 6 mostra, resumidamente, os resultados finais para os testes com os concomitantes.

Tabela 6: Resumo dos resultados obtidos nos testes com concomitantes.

| Concomitante | Proporção [Espécie/Co] | % Interferência | SD   |
|--------------|------------------------|-----------------|------|
| Ferro        | 10000                  | 9,77            | 0,63 |
| Cobre        | 4000                   | 10,29           | 1,07 |
| Níquel       | 1000                   | 12,16           | 0,46 |
| Manganês     | 110                    | 11,47           | 0,01 |
| Magnésio     | 2000                   | 8,37            | 0,70 |
| Cálcio       | 2000                   | 9,95            | 1,89 |
| Alumínio     | 2000                   | 10,71           | 1,00 |
| Zinco        | 2000                   | 9,29            | 2,00 |
| Crômio (III) | 2000                   | 9,08            | 1,00 |
| Crômio (VI)  | 5000                   | 8,77            | 1,00 |
| Chumbo       | 20000                  | 9,74            | 1,50 |
| Fosfato      | 100000                 | 12,08           | 1,00 |
| EDTA         | 5000                   | -9,85           | 0,85 |
| Citrato      | 1000000                | 12,09           | 0,56 |

Como havia sido discutido anteriormente, o manganês apresentou o maior nível de interferência (1:110), seguido do níquel, com uma proporção crítica de 1.000 vezes. Isto se deve ao fato de o sistema reacional Tiron/Peróxido de hidrogênio também poder ser utilizado para a determinação de manganês e níquel, porém em pH diferente daquele para a determinação de cobalto.

A tabela 7, a seguir, mostra as concentrações de cada metal estudado, presente nas amostras certificadas, bem como a sua relação com a concentração de cobalto.

Tabela 7: Concentrações dos metais estudados nas amostras certificadas.

| Metal    | Amostras Certificadas      |                        |                            |                        |                            |                        |
|----------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
|          | Mexilhão                   |                        | Fígado Bovino              |                        | Peixe                      |                        |
|          | Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$ | Proporção [Metal]/[Co] | Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$ | Proporção [Metal]/[Co] | Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$ | Proporção [Metal]/[Co] |
| Ferro    | 159                        | 436                    | 194                        | 924                    | 54                         | 675                    |
| Cobre    | 4,92                       | 13                     | 158                        | 752                    | 4                          | 50                     |
| Níquel   | 0,954                      | 3                      | -                          | -                      | 1,1                        | 14                     |
| Manganês | 16                         | 44                     | 9,9                        | 47                     | 0,81                       | 10                     |
| Magnésio | 2070                       | <b>5671</b>            | 600                        | <b>2857</b>            | -                          | -                      |
| Cálcio   | 1310                       | <b>3589</b>            | 120                        | 571                    | -                          | -                      |
| Alumínio | 243                        | 666                    | -                          | -                      | -                          | -                      |
| Zinco    | 106,5                      | 292                    | 123                        | 586                    | 33                         | 413                    |
| Crômio   | 0,612                      | 2                      | -                          | -                      | 1,3                        | 16                     |
| Chumbo   | 0,79                       | 2                      | 0,135                      | 1                      | 0,58                       | 7                      |
| Cobalto  | 0,365                      | -                      | 0,21                       | -                      | 0,08                       | -                      |

Comparando-se as tabelas 6 e 7, percebe-se que, teoricamente, as amostras de Mexilhão e Fígado Bovino teriam problemas com interferência do magnésio e cálcio (números em negrito). Porém, esta interferência não foi detectada nos estudos que serão mostrados a seguir. Portanto, a utilização de um mascarante foi descartada. Isso pode ser explicado provavelmente devido ao surgimento de reações antagônicas entre os concomitantes, durante os trabalhos com as amostras certificadas e não certificadas.

#### D. INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MINERALIZAÇÃO

Finalizadas as etapas de acoplamento do forno de microondas ao computador e determinação dos principais concomitantes do método espectrofotométrico para determinação de cobalto, iniciou-se a otimização das condições de mineralização das amostras certificadas.

As novas investigações foram executadas à potência máxima do forno (700 W). Nesta etapa, apenas o tempo de mineralização, a concentração e a composição da mistura mineralizadora foram investigados. Outros parâmetros, tais como, tamanho de partícula, volume de suspensão introduzido, posição da bobina de mineralização, potência do forno, tempo de estabilização da suspensão em banho de ultra-som e diâmetro do sistema de transmissão não foram explorados, pois na etapa de otimização para o ferro (Capítulo 1), estes parâmetros foram exaustivamente investigados.

## 1. MEXILHÃO

Inicialmente, os testes foram executados com a amostra certificada de mexilhão. A mistura mineralizadora inicial foi constituída por uma solução de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Foram investigados tempos de 1, 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. Neste teste, os resultados não foram satisfatórios, com valores de resposta variando de 31 a 95 % para tempos de 1 e 20 minutos, respectivamente. Logo em seguida, a suspensão foi preparada em  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo que novos testes foram executados e os resultados considerados excelentes, para um tempo de mineralização de 5 minutos. A figura 44 mostra os resultados obtidos para os testes realizados com a amostra certificada de mexilhão.

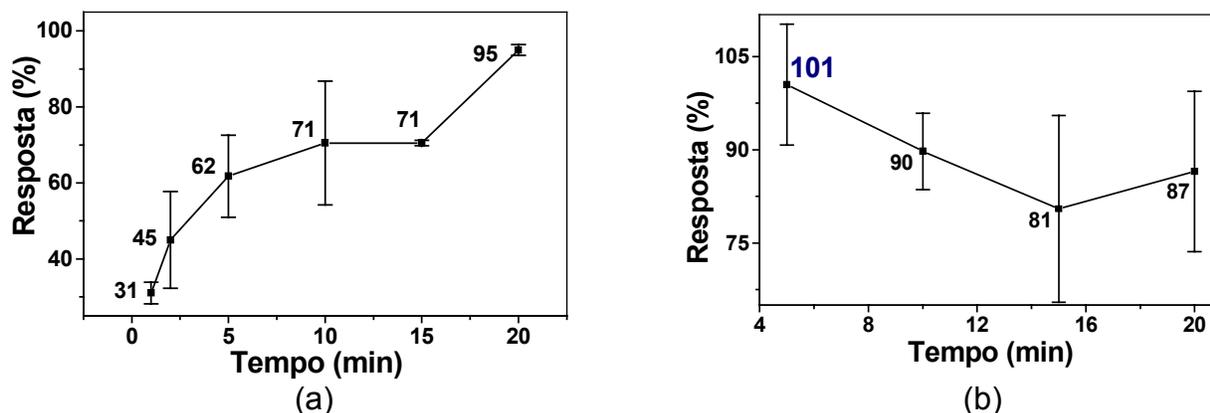


Figura 44: Resposta para cobalto empregando (a)  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ ; e (b)  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$ . As barras indicam os erros obtidos.

## 2. FÍGADO BOVINO

A amostra certificada de fígado bovino foi empregada, utilizando-se, inicialmente, o  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados não foram satisfatórios, e novas suspensões foram preparadas em  $\text{HNO}_3$   $6$  e  $12 \text{ mol L}^{-1}$ . A figura 45 mostra os resultados encontrados.

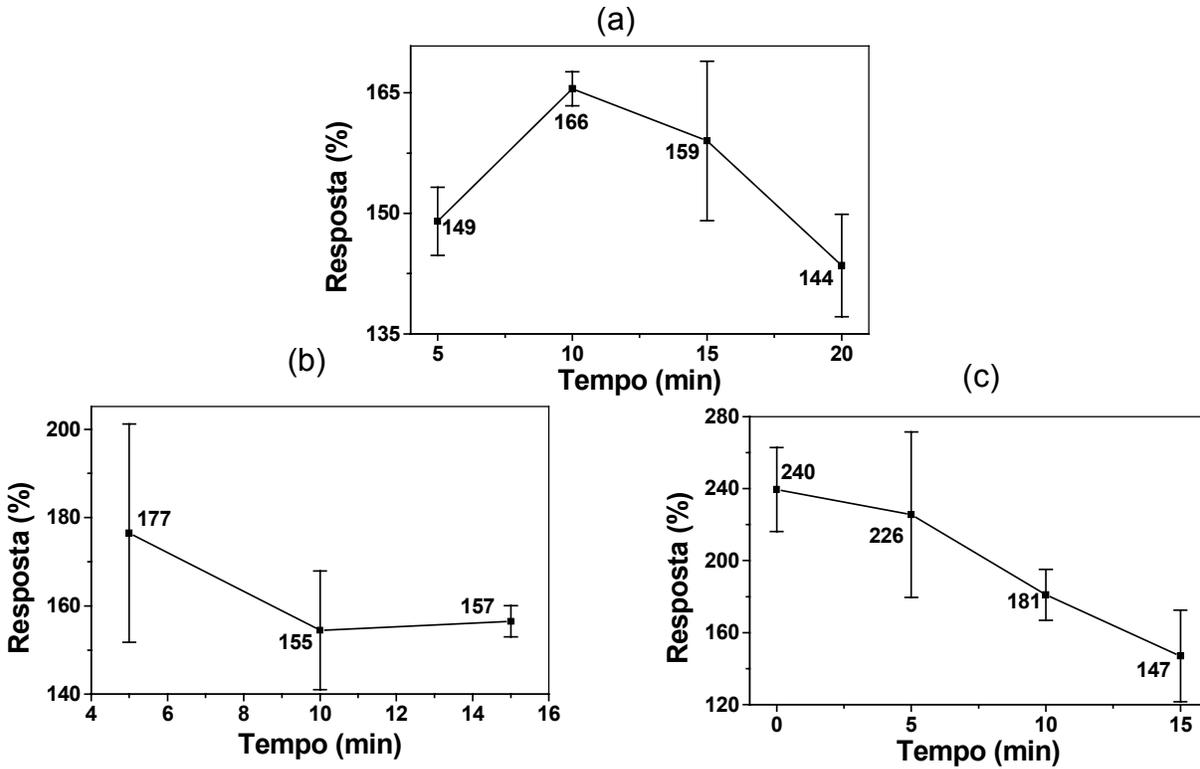


Figura 45: Resposta empregando (a)  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$ ; (b)  $\text{HNO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  e (c)  $\text{HNO}_3$  12 mol  $\text{L}^{-1}$ . As barras indicam os erros obtidos.

Como está evidenciado na figura 45, a presença do  $\text{HNO}_3$  somente, foi insuficiente para destruir a matéria orgânica presente na amostra de fígado bovino. Desta forma, foram preparadas algumas suspensões em  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$ , contendo 0,16 - 0,30 - 1,2 - 4,8 e 7,2 % (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A figura 46 mostra a variação da resposta em função da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando o tempo de mineralização foi fixado em 5 minutos.

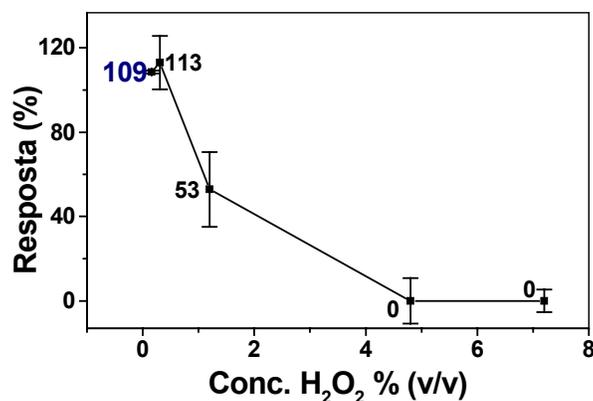


Figura 46: Resposta para o cobalto em amostra de fígado bovino, variando-se a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As barras indicam os erros obtidos.

A suspensão contendo 0,16% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi suficiente para mineralizar a amostra de fígado e estabelecer uma resposta média de 109%. Para as outras suspensões, foi observada uma queda acentuada do sinal analítico. Este fato deve-se, provavelmente, à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na amostra mineralizada, aumentando sua concentração no momento da reação e ocasionando perda em sensibilidade. Isso pode ser confirmado no item IV A 1 quando da otimização das condições de reação.

### 3. PEIXE

A terceira amostra certificada a ser investigada foi a de peixe. Novamente, os testes iniciaram-se com HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> e, logo em seguida, foram preparadas suspensões em HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup>, contendo 0,30 - 0,44 - 0,59 - 0,87, e 1,15 % (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com tempo de mineralização fixado em 5 minutos. A figura 47 mostra os valores encontrados para a resposta.

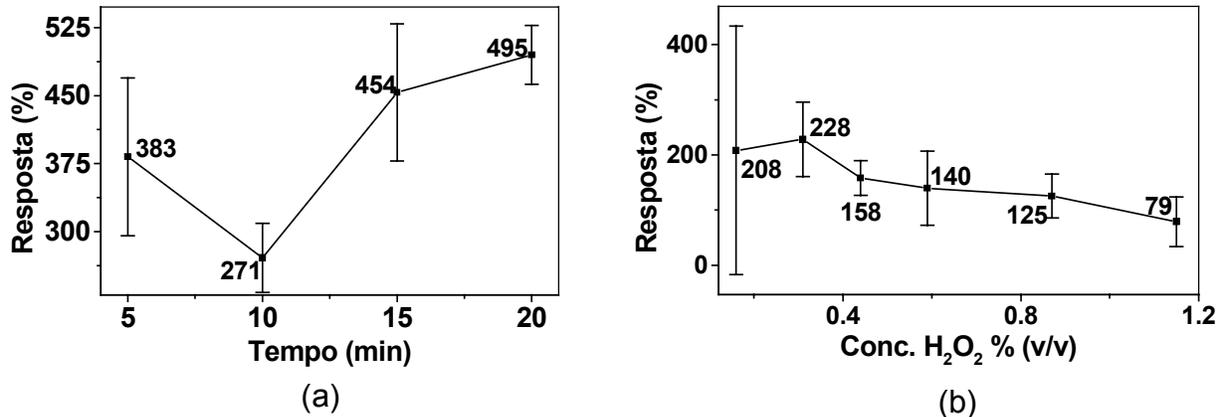


Figura 47: Resposta para determinação de o cobalto em peixe empregando: (a) HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup>; (b) HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> e variando-se a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As barras indicam os erros obtidos.

Os valores encontrados para a resposta mostraram uma variação muito grande, o que pode ser devido à presença de partículas em suspensão na amostra mineralizada. Desta forma, procurou-se aumentar o fator de diluição de 2.500 para 5.000 e estabelecer uma suspensão preparada em HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> com 0,59 % (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados encontrados para a resposta mostraram-se satisfatórios: 108 ± 6. A figura 48, mostra a respostas para o cobalto com diferentes fatores de diluição, e tempo de mineralização de 5 minutos.

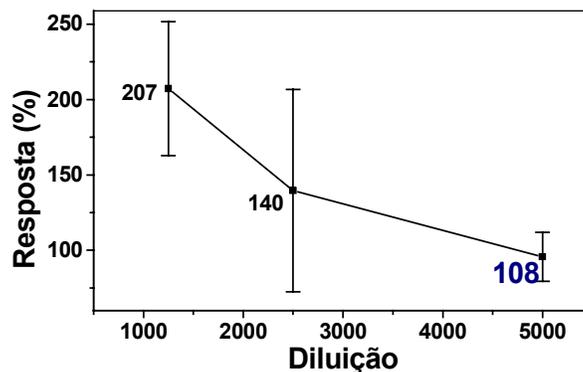


Figura 48: Resposta para o cobalto em amostras de peixe com diferentes fatores de diluição.

### E. DETERMINAÇÃO DE COBALTO

Após encontradas as melhores condições de mineralização para as amostras certificadas de mexilhão, fígado bovino e peixe, fez-se uma análise estatística para os valores encontrados.

Tabela 8: Tratamento estatístico para os testes efetuados nas diferentes amostras certificadas.

| Amostra       | Conc. de cobalto certificada ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) | Conc. <sup>a</sup> de cobalto encontrada ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) | RSD <sup>b</sup> (%) para repetibilidade | RSD (%) para reprodutibilidade |
|---------------|--|--|--|--------------------------------|
| Mexilhão      | 365 $\pm$ 51   | 368 $\pm$ 9 (n = 12)   | 2,36 (n = 12)                            | 5,20 (n = 10)                  |
| Fígado bovino | 210 $\pm$ 50   | 206 $\pm$ 4 (n = 6)  | 2,01 (n = 6)                             | 4,10 (n = 7)                   |
| Peixe         | 80 $\pm$ 10  | 86 $\pm$ 5 (n = 10)  | 5,48 (n = 10)                            | 12,00 (n = 8)                  |

<sup>a</sup> Média  $\pm$  desvio padrão; <sup>b</sup> Desvio padrão relativo.

Aos resultados obtidos, foi aplicado o teste *t* não pareado, sendo que os valores obtidos permitiram um grau de confiança de 90% para o mexilhão, 95% para o fígado bovino e 99% para o peixe.

As condições ideais de mineralização para as diferentes amostras, estão resumidas na tabela 9.

Tabela 9: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras certificadas.

| Amostra       | Tempo de mineralização | Suspensão  |
|---------------|------------------------|--|
| Mexilhão      | 5 min.                 | 250,0 mg de amostra + 25 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup><br>(15 min. em banho de ultra-som)   |
| Fígado bovino | 5 min.                 | 250,0 mg de amostra + 25 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 0,125 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%<br>(v/v) (15 min. em banho de ultra-som) |
| Peixe         | 5 min.                 | 125,0 mg de amostra + 25 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 0,500 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%<br>(v/v) (15 min. em banho de ultra-som) |

### F. SUPERFÍCIE DA BOBINA DE MINERALIZAÇÃO

O Teflon<sup>®</sup> têm sido largamente utilizado em diversos segmentos da química, em especial na química analítica. Suas propriedades principais estão relacionadas à alta estabilidade térmica, material inerte, alta pureza, resistência mecânica e, principalmente, transparência às microondas [96].

Os tipos de Teflon<sup>®</sup> mais comumente utilizados são o Politetrafluoretileno (PTFE), Perfluoroalcoxi etileno (PFA) e Tetrafluorometaxil (TFM). O PTFE é especialmente utilizado na confecção de bombas para sistemas fechados de mineralização em fornos de microondas [97].

Muñoz *et al* [97], efetuaram um série de estudos para verificar a superfície de um pequeno pedaço de Teflon<sup>®</sup> (PTFE), após a exposição a um ataque (4 horas a 110 °C) com HNO<sub>3</sub> concentrado. Os autores verificaram que houve a liberação de fluoretos proporcional à exposição às microondas. A concentração, em µg mL<sup>-1</sup>, de fluoretos em HNO<sub>3</sub> foi de 0,22 ± 0,02 e 12,3 ± 0,6 para 1 e 5 ciclos de exposição às microondas, respectivamente. Em algumas micrografias efetuadas da superfície do Teflon<sup>®</sup> foram observados alguns nódulos, que segundo os autores foram causados pela liberação de fluoretos.

Neste sentido, alguns testes foram executados para verificar as condições físicas da superfície interna da bobina de mineralização empregada nas mineralizações.

Todos os testes para a mineralização e posterior determinação de ferro, e os descritos anteriormente, foram executados na mesma bobina de mineralização. Desta forma, foram realizadas 697 mineralizações, sendo 196 para a determinação de ferro e 501 para a determinação de cobalto. O tempo total correspondente foi de 124 horas, ou seja, aproximadamente 5 dias com o forno ligado ininterruptamente.

Esta bobina foi retirada e cortada em 3 partes distintas, conforme a figura 49.

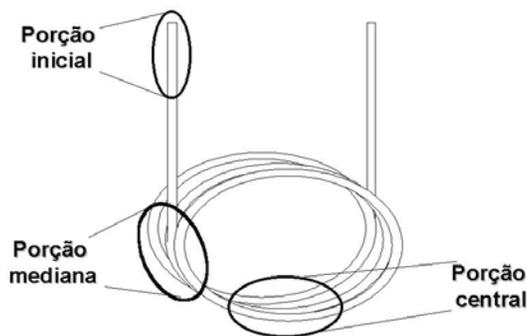


Figura 49: Cortes efetuados na bobina de mineralização.

As porções da bobina de mineralização foram cortadas transversalmente, passando por um tratamento com adesivo de prata e, em seguida, foram metalizadas

com ouro por 150 segundos. Algumas micrografias da superfície interna, foram realizadas em microscópio de varredura eletrônico, juntamente com uma porção de Teflon<sup>®</sup> nova. Os resultados são mostrados nas figuras 50-53.

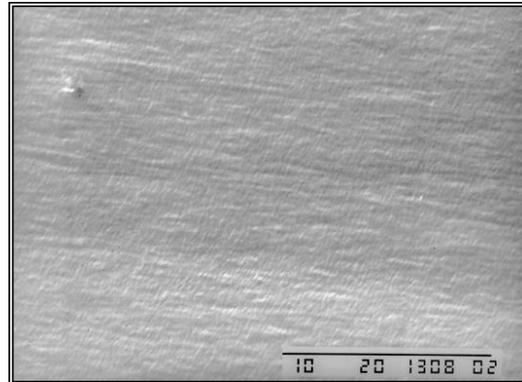


Figura 50: Micrografia realizada a partir de um Teflon<sup>®</sup> novo.

A figura 50 apresenta uma micrografia da superfície interna de uma bobina de mineralização ainda sem ser utilizada. A ampliação é de 5.000 vezes, e a amostra apresenta-se bastante homogênea e íntegra.

Na figura 51, tem-se os resultados das micrografias executadas para a porção inicial da bobina de mineralização. Como pode ser notado, há o surgimento de algumas crateras e escamações na superfície interna da bobina.

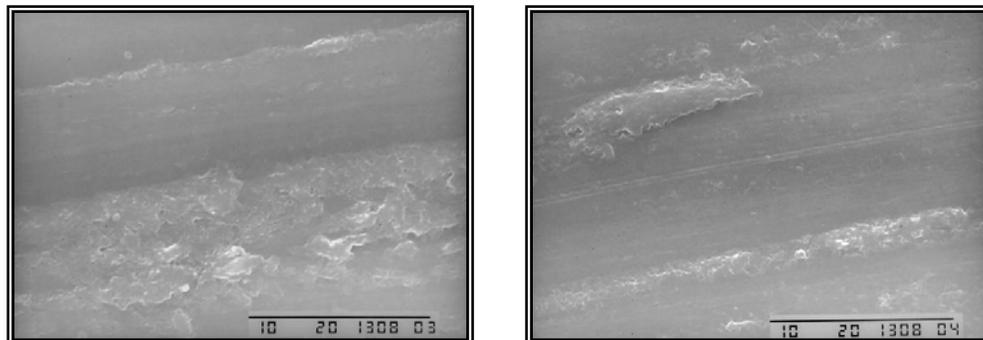


Figura 51: Micrografia realizada a partir da porção inicial, de acordo com a figura 49.

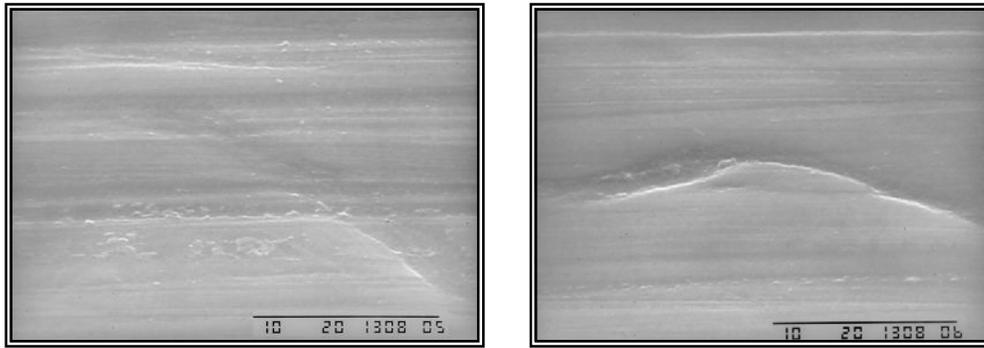


Figura 52: Micrografia realizada a partir da porção mediana, de acordo com figura 49.

A figura 52 apresenta as micrografias da porção mediana. Neste caso há a ocorrência de sulcos profundos, talvez devido à passagem do segmento de suspensão pelas linhas de transmissão. Os resultados para a porção central da bobina de mineralização estão mostrados na figura 53.

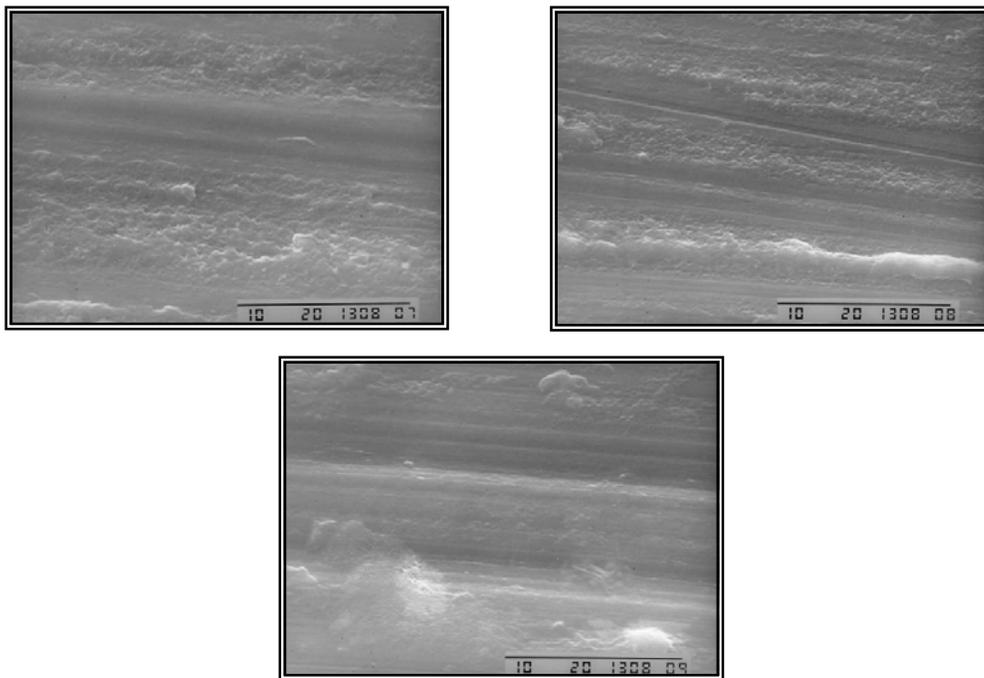


Figura 53: Micrografia realizada a partir da porção central, de acordo com a figura 49.

Para a porção central tem-se uma repetição da porção mediana, porém, os sulcos e crateras apresentam-se de maneira mais intensa.

A partir das micrografias mostradas, pode-se prever um determinado momento onde a bobina de mineralização deve ser trocada devido ao seu desgaste interno. Houve o aparecimento de sulcos profundos que podem ocasionar contaminações entre amostras, porém, tais problemas não foram detectados nos experimentos executados.

### G. CONFIGURAÇÃO DAS VÁLVULAS

Com o intuito de aumentar a velocidade de preparo das amostras, procurou-se desenvolver uma válvula capaz de aprisionar um número maior de segmentos de suspensões no interior da cavidade do forno de microondas. Foram testados uma série de modelos de válvulas.

O primeiro modelo testado para introduzir um número superior de segmentos no interior do forno de microondas, foi configurado em uma forma circular e em Teflon<sup>®</sup>. Com este modelo tentamos a introdução de até 6 segmentos no sistema de transmissão. A figura 54 mostra suas principais partes onde, A: Base em alumínio para a válvula e o motor de passo; B: Parte móvel da válvula que é acoplada ao motor de passo; C: Parte frontal e fixa; D: Parafuso para unir as partes fixa e móvel e E: Orifícios para o encaixe das tubulações de entradas e saídas.

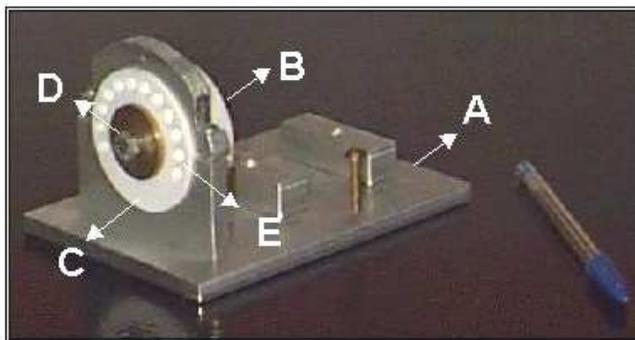


Figura 54: Válvula para a mineralização de suspensões, confeccionada em Teflon<sup>®</sup>.

Este modelo apresentou uma grande limitação, pois possui um parafuso de aperto no seu centro geométrico e, desta forma, quando apertado, as extremidades abriam-se provocando vazamentos.

O segundo modelo proposto, também em Teflon<sup>®</sup>, foi construído em uma forma cilíndrica alongada. Com este modelo tentou-se reproduzir a válvula inicial (figura 4),

porém, com a introdução de 6 segmentos de suspensão. Na figura 55, são mostradas as principais partes desta válvula onde, A: Corpo da válvula; B: Orifícios para a introdução dos sistemas de transmissão (entrada e saída da suspensão); C: Dispositivos para prender a válvula em uma base de alumínio; D: "Camisa" de alumínio para evitar que a válvula saia do seu eixo; E: Parte externa e fixa; F: Parte móvel e G: Orifício para o encaixe do motor de passo.



Figura 55: Diferentes vistas da válvula para a mineralização das suspensões, confeccionada em Teflon<sup>®</sup>

A principal deficiência deste segundo modelo refere-se ao fato de que é necessária a utilização de uma grande quantidade de lubrificante em suas partes móveis para que não ocorram vazamentos. Porém, com a lubrificação, o motor de passo, utilizado para movimentar a válvula, foi incapaz de girar a parte central da peça de Teflon<sup>®</sup>. Outra deficiência refere-se ao fato de que, devido ao seu grande comprimento, é muito difícil colocar a válvula alinhada com o motor de passo, sendo necessário o desenvolvimento de uma "camisa" de alumínio (item D da figura 55).

O Teflon<sup>®</sup> foi abandonado e o terceiro modelo construído em acrílico. Também neste modelo tentou-se introduzir 6 segmentos de suspensão no interior do forno de microondas. A figura 56 mostra esta válvula onde, A: Base de alumínio; B: Parte móvel onde é acoplado o motor de passo e C: Partes fixas da válvula.

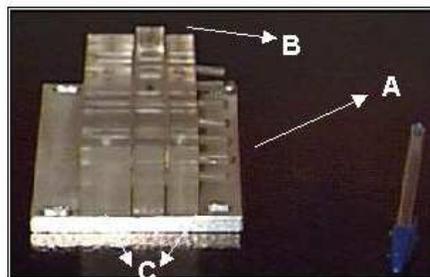


Figura 56: Diferentes vistas da válvula para introdução das suspensões, confeccionada em acrílico.

O problema descrito para a válvula anterior (figura 55), também ocorreu para este modelo, apesar da superfície de contato entre as partes móveis e fixas ter diminuído muito em relação ao modelo anterior. A força fornecida pelo motor de passo foi insuficiente para movimentar a parte central da válvula proposta na figura 56. As válvulas construídas até o momento, tinham como objetivo principal introduzir e aprisionar 6 segmentos de suspensão simultaneamente. Na construção da quarta válvula este número foi diminuído para 3. A figura 57 mostra uma vista superior e lateral desta válvula onde, A: Base de alumínio para comportar o motor de passo e a válvula em acrílico; B: Motor de passo; C: "Camisa" de alumínio para alinhar o motor com a válvula; D: Rosca sem fim que permite a ligação da parte móvel da válvula ao motor de passo; E: Partes fixas da válvula; F: Parte móvel; G: Parafusos para manter unidas as partes fixas e móvel.

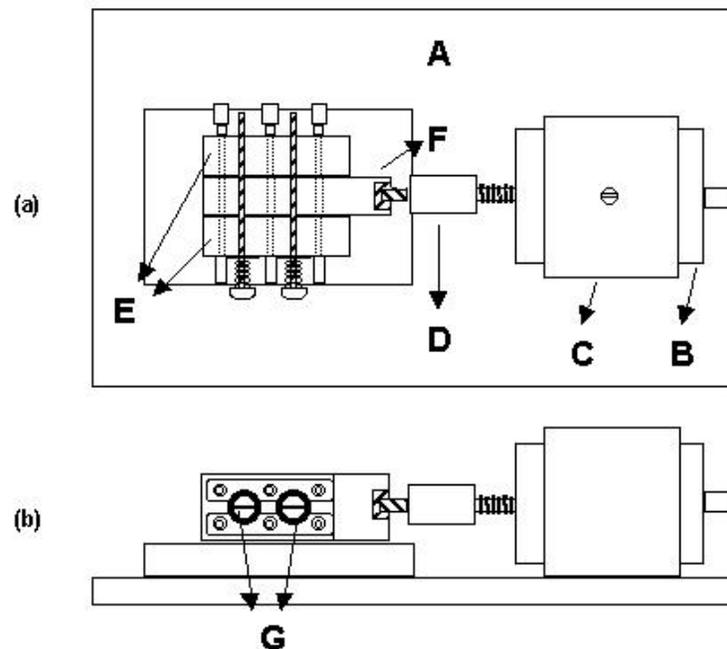


Figura 57: (a) Vista superior do quarto modelo de válvula proposto para a mineralização das amostras e (b) vista lateral.

Com este modelo, estabelece-se um equilíbrio entre a força de atrito presente no injetor de acrílico e a força motriz do motor de passo. Portanto, estabeleceu-se que seriam introduzidas 3 suspensões no forno de microondas para proceder as mineralizações. Os métodos descritos anteriormente para a mineralização de amostras

e posterior determinação de cobalto, foram reavaliados com a nova configuração de bobinas.

A figura 58 mostra a disposição das bobinas de mineralização no interior da cavidade do forno de microondas.

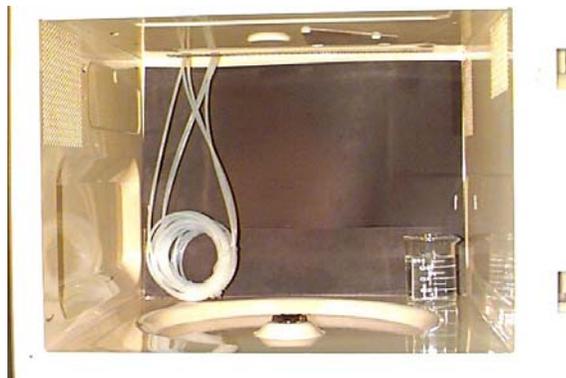


Figura 58: Disposição das bobinas de mineralização no interior do forno de microondas.

Na parte traseira do forno (figura 59) foram abertos alguns orifícios para a passagem das bobinas de mineralização.

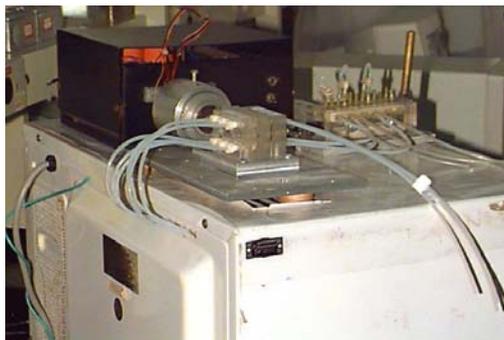


Figura 59: Disposição das linhas de transmissão no forno de microondas.

A seguir são mostradas algumas figuras do novo sistema proposto. Na figura 60, tem-se uma vista superior do sistema de mineralização onde, A: forno de microondas caseiro; B: linhas de transmissão com 2 mm de diâmetro interno; C: injetor comutador confeccionado em acrílico; D: válvula confeccionada em acrílico para aprisionar as suspensões no interior da cavidade do forno de microondas; E: motor de passo para movimentar a parte central da válvula de acrílico e F: fonte de alimentação do motor de passo.

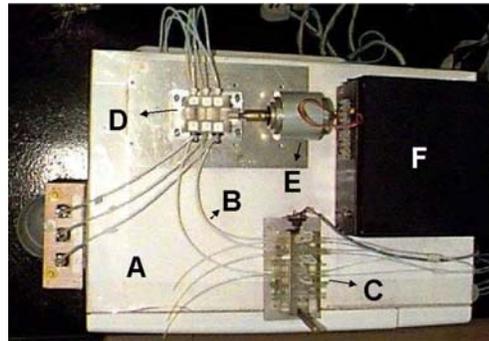


Figura 60: Vista superior do sistema de mineralização.

Abaixo (figura 61), tem-se os balões volumétricos onde as amostras mineralizadas são coletadas.

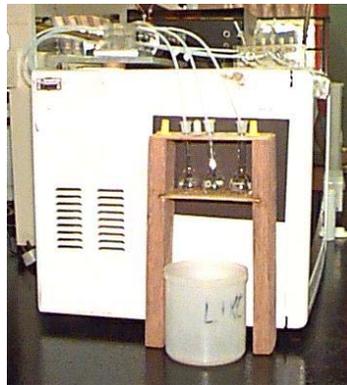


Figura 61: Sistema para coleta das amostras mineralizadas.

## **H. REAVALIAÇÃO DAS MINERALIZAÇÕES**

Definida a nova válvula para o sistema de mineralização, os métodos propostos para as amostras certificadas de mexilhão, fígado bovino e peixe foram reavaliados.

### **1. MEXILHÃO**

A primeira amostra a ser investigada foi a de mexilhão. A resposta encontrada para 5 minutos de mineralização foi de  $99\% \pm 11$ . Outros tempos foram estudados, porém, as condições de mineralização otimizadas inicialmente foram as ideais. Na figura 62 tem-se os resultados obtidos.

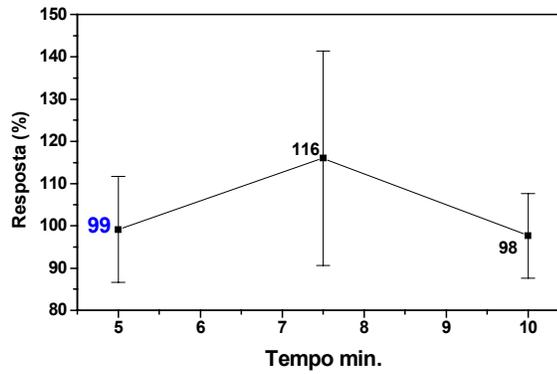


Figura 62: Resposta para a amostra de mexilhão.

Foram executados alguns experimentos para verificar se havia alguma diferença significativa entre as mineralizações ocorridas nas 3 bobinas, porém, não houve diferença significativa. A figura 63 mostra um gráfico onde o tempo foi fixado em 5 minutos.

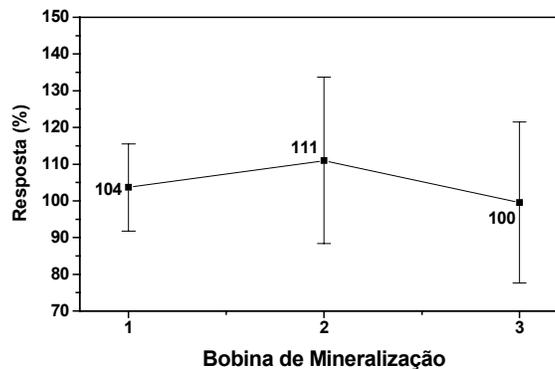


Figura 63: Resposta na análise de mexilhão para cada bobina de mineralização utilizada.

## 2. FÍGADO BOVINO

Logo a seguir, a amostra de fígado bovino foi reavaliada. Desta vez apenas o tempo de 5 minutos foi testado. A resposta encontrada foi de  $101\% \pm 5$ . Neste caso, também, não houve nenhuma diferença significativa entre as bobinas de mineralização, como está demonstrado na figura 64.

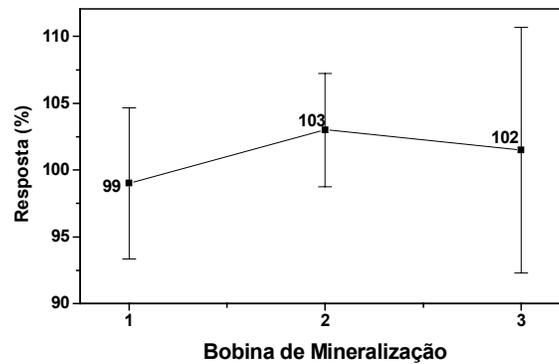


Figura 64: Resposta na análise de fígado bovino para cada bobina de mineralização utilizada.

### 3. PEIXE

A amostra de peixe certificada foi a última a ser reavaliada. Ao se repetir as mesmas condições encontradas inicialmente, os resultados foram muito ruins com uma grande variação: resposta de  $120\% \pm 69$  ( $n = 16$ ).

Perante os resultados apresentados acima, houve a necessidade de uma nova otimização. O fator de diluição foi diminuído de 5.000 para 2.500 vezes; a concentração de  $H_2O_2$  e o tempo de mineralização foram mantidos em 0,59% v/v e 5 minutos, respectivamente; novas concentrações de  $HNO_3$  foram investigadas: 6 e 12 mol  $L^{-1}$ , e algumas amostras mineralizadas foram filtradas. O resultados são apresentados na figura 65.

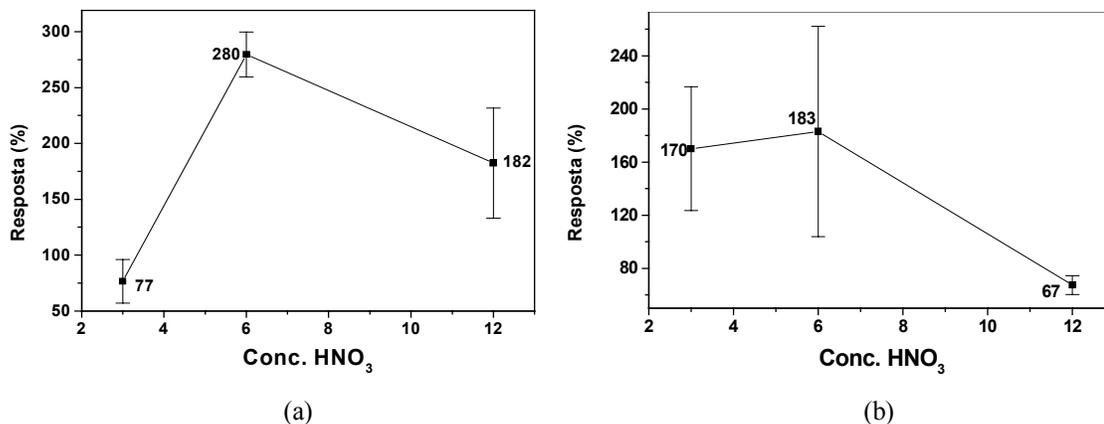


Figura 65: (a) Resposta em amostras não filtradas e (b) amostras filtradas.

Os resultados obtidos não foram os ideais. Para as amostras não filtradas os resultados apresentaram uma alta variação, e respostas de  $77\% \pm 20$ ,  $280\% \pm 20$  e

182%  $\pm$  49, para as concentrações de 3, 6 e 12 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as amostras filtradas apresentaram um pequeno desvio para o HNO<sub>3</sub> 12 mol L<sup>-1</sup>: 67%  $\pm$  7. Esta baixa resposta, provavelmente, seja devido à não total eliminação do peróxido de hidrogênio na amostra mineralizada.

Portanto, novos testes foram feitos com o emprego apenas de HNO<sub>3</sub> 12 mol L<sup>-1</sup>. Os resultados são apresentados na figura 66.

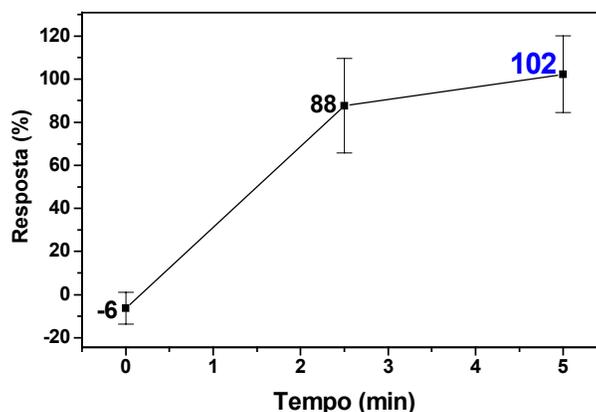


Figura 66: Resposta para a amostra de peixe com o emprego de HNO<sub>3</sub> 12 mol L<sup>-1</sup>.

Foram avaliados tempos de 0, 2,5 e 5 minutos, sendo que os melhores resultados obtidos (102%  $\pm$  17), foram para um tempo de microondas de 5 minutos.

Desta forma, as condições de mineralização para as amostras de mexilhão e fígado bovino são as mesmas relatadas na tabela 10. A concentração de HNO<sub>3</sub> 12 mol L<sup>-1</sup> foi estabelecida para a mineralização das amostras de peixe, o tempo de mineralização foi mantido em 5 minutos.

Um novo tratamento estatístico foi executado para as amostras certificadas e os resultados são mostrados na tabela a seguir.

Tabela 10: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras certificadas.

| Amostra       | Conc. de cobalto certificada ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) | Conc. <sup>a</sup> de cobalto encontrada ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) |                         | RSD <sup>b</sup> (%) para repetibilidade |                 | RSD (%) para reprodutibilidade |                   |
|---------------|--|--|-------------------------|--|-----------------|--------------------------------|-------------------|
|               |  | 1 Bobina   | 3 Bobinas               | 1 Bobina                                 | 3 Bobinas       | 1 Bobina                       | 3 Bobinas         |
| Mexilhão      | 365 $\pm$ 51   | 368 $\pm$ 9<br>(n = 12)  | 349 $\pm$ 13<br>(n = 4) | 2,36<br>(n = 12)                         | 3,80<br>(n = 4) | 5,20<br>(n = 10)               | 12,33<br>(n = 7)  |
| Fígado bovino | 210 $\pm$ 50   | 206 $\pm$ 4<br>(n = 6)   | 203 $\pm$ 7<br>(n = 6)  | 2,01<br>(n = 6)                          | 3,21<br>(n = 6) | 4,10<br>(n = 7)                | 5,57<br>(n = 6)   |
| Peixe         | 80 $\pm$ 10  | 86 $\pm$ 5<br>(n = 10)   | 76 $\pm$ 4<br>(n = 7)   | 5,48<br>(n = 10)                         | 5,85<br>(n = 7) | 12,00<br>(n = 8)               | 11,13<br>(n = 12) |

<sup>a</sup> Média  $\pm$  desvio padrão; <sup>b</sup> Desvio padrão relativo.

Os resultados apresentados para as mineralizações com 3 bobinas, foram muito concordantes com os realizados com apenas 1 bobina de mineralização.

Aos resultados obtidos, foi aplicado o teste *t* não pareado, sendo que os valores obtidos permitiram um grau de confiança de 95% para todas as amostras certificadas.

#### **4. AMOSTRAS NÃO CERTIFICADAS**

Algumas amostras não certificadas de peixe foram analisadas para a determinação de cobalto. O método de mineralização utilizado foi o mesmo para a amostra certificada e os resultados são apresentados na tabela 13.

##### ***I. CARBONO RESIDUAL***

Nas mineralizações processadas em fornos de microondas a temperatura de trabalho está restrita à aproximadamente 200 °C, devido aos componentes de Teflon<sup>®</sup>. Em alguns casos, esta temperatura é insuficiente para destruir completamente toda matéria orgânica, com conseqüente interferência na determinação de metais ao nível de traços. Esta fração de resíduo remanescente após a mineralização é chamada de Carbono Residual Total [98].

Nesta parte do trabalho foram executados alguns testes para a determinação de carbono residual em amostras mineralizadas.

Para fazer uma avaliação do carbono residual, foi utilizada uma suspensão de mexilhão, preparada pesando-se 248,2 mg. Adicionou-se 25 mL de HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup>, e levou-se a mistura a um banho de ultra-som por 15 minutos. Executou-se 9 mineralizações, com um tempo de exposição às microondas de 5 minutos. O resultado obtido para o carbono residual foi de 127 ± 2 mg Kg<sup>-1</sup>.

O resultado obtido apresentou-se animador, pois em alguns trabalhos investigados [99 - 101], onde foram utilizados sistemas convencionais para a mineralização de amostras, a concentração de carbono residual variou de 5.800 a 10.000 mg Kg<sup>-1</sup> para amostras certificadas de fígado bovino; e 5.400 a 7.000 mg Kg<sup>-1</sup> para amostras de mexilhão. Desta forma, o sistema de mineralização de amostras

alimentícias, para a determinação de ferro e cobalto, apresentou grande eficiência na destruição da matéria orgânica.

## J. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

Nesta parte do trabalho foram executadas algumas comparações de resultados. As amostras, certificadas e não certificadas, foram mineralizadas convencionalmente em um forno de microondas de alta pressão da marca Questron.

Nas mineralizações foram pesados 250 mg de amostra e adicionados 8 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. O programa de mineralização utilizado é resumido na tabela 11.

Tabela 11: Programa utilizado para a mineralização das amostras.

| Etapa | Programação   | Temp. | Pressão | Potência | Rampa | Tempo de Permanência | T lim. | P lim. |
|-------|---------------|-------|---------|----------|-------|----------------------|--------|--------|
| 1     | Tempo x Temp. | 180   | 0       | 1000     | 10:00 | 15:00                | 200    | 350    |

O programa de mineralização possuiu apenas uma etapa, onde a temperatura atingiu 180 °C em 10 minutos e se manteve neste patamar por 15 minutos. A temperatura e pressão limites foram de 200 °C e 350 psi. A figura 67 mostra o comportamento típico da potência, temperatura e pressão.

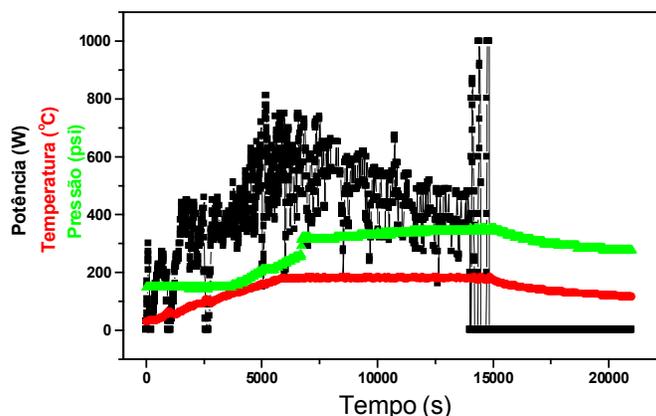


Figura 67: Comportamento da potência, temperatura e pressão durante a mineralização da amostra certificada de peixe.

As determinações de cobalto, foram realizadas utilizando-se Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS).

O programa de aquecimento é mostrado na tabela 12, e os resultados para o cobalto são apresentados na tabela 13.

Tabela 12: Programa de aquecimento do forno de grafite.

| Etapa | Temp. (°C) | Tempo (s) |      | Fluxo (mL min <sup>-1</sup> ) |
|-------|------------|-----------|------|-------------------------------|
|       |            | Ramp      | Hold |                               |
| 1     | 150        | 5         | 30   | 250                           |
| 2     | 200        | 5         | 15   | 250                           |
| 3     | 1400       | 10        | 20   | 250                           |
| 4     | 2400       | 0         | 5    | 0                             |
| 5     | 2400       | 1         | 2    | 250                           |

Tabela 13: Resultados obtidos para cobalto na comparação na comparação das metodologias.

| Amostra   | ETAAS                        |   | Procedimento Proposto        |   | Valor Certificado            |
|---|------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|
|   | Conc. (µg Kg <sup>-1</sup> ) | n | Conc. (µg Kg <sup>-1</sup> ) | n | Conc. (µg Kg <sup>-1</sup> ) |
| Cação - <i>Mustelus canis</i> , Mitch.              | 54 ± 3                       | 2 | 49 ± 3                       | 6 | -                            |
| Pescadinha - <i>Cynoscion leiarchus</i> (Cuv & Val) | 61 ± 7                       | 3 | 58 ± 6                       | 6 | -                            |
| Merluza - <i>Merluccius merluccius</i> , Hubbsi     | 71 ± 13                      | 2 | 74 ± 1                       | 6 | -                            |
| Bacalhau - <i>Gadus morrhua</i> , Lin.              | 66 ± 2                       | 3 | 57 ± 8                       | 5 | -                            |
| Peixe   | 86 ± 7                       | 2 | 76 ± 4                       | 7 | 80 ± 10                      |
| Fígado Bovino                                       | 180 ± 31                     | 3 | 203 ± 7                      | 6 | 210 ± 50                     |

As amostras não certificadas de peixe passaram por um tratamento estatístico, onde foi executado um teste *t* pareado. Os resultados obtidos apresentaram um grau de confiança de 95% para todas as amostras.

## CONCLUSÃO

O método proposto para a mineralização de amostras de ostra, peixe e mexilhão, e posterior determinação de ferro mostrou-se bastante satisfatório. Com o emprego de pequenos volumes de reagentes, foi possível obter resultados amplamente positivos do ponto de vista de precisão e exatidão, além de apresentarem uma boa correlação com os valores certificados.

Com o sistema de mineralização proposto foi possível aliar segurança com velocidade de preparo, pois a bobina de mineralização ficou confinada dentro da cavidade do forno de microondas, não representando, desta forma, nenhum risco ao operador. Os tempos de mineralização foram reduzidos de algumas horas (métodos convencionais) para alguns minutos, representando uma significativa economia de tempo e esforços. A quantidade de amostra empregada foi da ordem de 200 mg e o volume de ácido de 200  $\mu$ L.

Na otimização do método para a determinação de cobalto, tem-se um claro exemplo de como os recursos quimiométricos e computacionais podem ajudar o químico analítico no equacionamento de diversos problemas, pois, durante a execução dos experimentos, houve uma produção enorme de valiosas informações. Sem o advento dos recursos computacionais/quimiométricos, seria impossível a análise precisa dos dados gerados do experimento fatorial, com consequente perda de sensibilidade analítica. Visto que a sensibilidade foi bastante melhorada, o método tornou-se, também, mais seletivo, já que possibilitou o trabalho onde a relação analito/concomitante é ampliada e, com isso, possíveis efeitos sinérgicos foram minimizados/suprimidos.

No processo de configuração de uma nova válvula para o aprisionamento das suspensões no interior do forno de microondas, ficou evidente que com poucos recursos financeiros é possível oferecer grandes alternativas ao desenvolvimento de novos processos na química analítica. A velocidade de preparo das amostras foi multiplicada por 3, permitindo uma taxa de mineralização de 36 amostras  $h^{-1}$  (para o cobalto).

O teor de carbono residual foi reduzido para valores muito pequenos, quando comparados com os da literatura, mostrando que os métodos para a mineralização de amostras alimentícias foi muito eficiente.

O sistema de mineralização desenvolvido apresenta grande potencial, pois o mesmo pode ser acoplado diretamente a um sistema de detecção (FAAS, UV-Vis entre outros), permitindo a determinação do analito de interesse logo após a mineralização da amostra.

Para finalizar, nas tabelas 14, 15 e 16 encontra-se um resumo dos parâmetros de mineralização com posterior determinação de ferro; otimização do método para determinação de cobalto, e condições de mineralização para a determinação espectrofotométrica catalítica de cobalto, respectivamente.

Tabela 14: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras de ostra, peixe e mexilhão para posterior determinação de ferro.

| <b>Tecido de Ostra</b>              | <b>Condições de mineralização e determinação</b>  |
|-------------------------------------|---|
| Preparo da suspensão                | 250,0 mg de amostra + 20 mL de HNO <sub>3</sub> conc. + 5 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) (15 min. em banho de ultra-som) e diluído para 25mL |
| Alça de amostragem da suspensão     | 200 µL  |
| Tempo de mineralização              | 10 min.   |
| Volume final (amostra mineralizada) | 10 mL   |
| Alça de amostragem do mineralizado  | 200 µL  |
| Condições do tampão                 | Ácido acético 2 mol L <sup>-1</sup> + Acetato de amônia 2 mol L <sup>-1</sup> (1:1)   |
| Transportador                       | HNO <sub>3</sub> 0,014 mol L <sup>-1</sup>  |
| <b>Mexilhão e Peixe</b>             | <b>Condições de mineralização e determinação</b>  |
| Preparação da suspensão             | 250,0 mg de amostra + 4,5 mL de água régia + 0,5 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) (15 min. em banho de ultra-som) e diluído para 5 mL          |
| Alça de amostragem da suspensão     | 200 µL  |
| Tempo de mineralização              | 20 min.   |
| Volume final (amostra mineralizada) | Mexilhão: 10 mL e Peixe: 5 mL   |
| Alça de amostragem do mineralizado  | Mexilhão: 130 µL<br>Peixe: 200 µL   |
| Condições do tampão                 | Ácido acético 2 mol /L + Acetato de amônia 2 mol L <sup>-1</sup> (1:9)  |
| Transportador                       | HNO <sub>3</sub> 0,15 mol L <sup>-1</sup> e HCl 0,35 mol L <sup>-1</sup> , na proporção de 1:1.   |

Tabela 15: Resumo da otimização efetuada para a determinação de cobalto.

|   |
|---|
| <b>Número de experimentos executados</b> → 64   |
| <b>Parâmetros otimizados</b> → Concentração de Tiron ( $5 \times 10^{-4}$ a $4 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> ); Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $2,5 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> ) Tempo de reação (120 a 300 segundos). |
| <b>Parâmetro fixado</b> → pH da reação (pH 13)  |
| <b>Rede neural (camada de entrada)</b> → 3 neurônios na camada de entrada (concentração de Tiron, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e tempo)  |
| <b>Rede neural (camada de saída)</b> → 2 neurônios (inclinação da reta “a” e coeficiente de correlação “r”).  |
| <b>Funções utilizadas</b> → log-sigmoidal na camada intermediária e linear na camada de saída   |
| <b>Resultados obtidos</b> → Concentração de Tiron igual a $1,8 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> ; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> igual a $3,0 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> e tempo igual 300 segundos.   |
| <b>Curva analítica</b> → 10 – 50 ng L <sup>-1</sup> (r > 0,9937)  |
| <b>Limite de detecção e quantificação</b> → 1,66 ng L <sup>-1</sup> e 5,53 ng L <sup>-1</sup> , respectivamente.  |

Tabela 16: Resumo das melhores condições de mineralização das amostras de mexilhão, fígado bovino e peixe para posterior determinação de cobalto.

| <b>Mexilhão</b>                            | <b>Condições de mineralização e determinação</b>  |
|--|---|
| Preparo da suspensão                       | 250,0 mg de amostra + 25 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> (15 min. em banho de ultra-som).  |
| Volume de amostragem da suspensão          | 200 µL  |
| Tempo de mineralização                     | 5 min.  |
| Volume final (amostra mineralizada)        | 10 mL   |
| Volume total de amostragem do mineralizado | 90 µL   |
| Transportador                              | HNO <sub>3</sub> 0,014 mol L <sup>-1</sup>  |
| <b>Fígado Bovino</b>                       | <b>Condições de mineralização e determinação</b>  |
| Preparação da suspensão                    | 250,0 mg de amostra + 25 mL HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 0,125 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) (15 min. em banho de ultra-som). |
| Volume de amostragem da suspensão          | 200 µL  |
| Tempo de mineralização                     | 5 min.  |
| Volume final (amostra mineralizada)        | 5 mL  |
| Volume total de amostragem do mineralizado | 90 µL   |
| Transportador                              | HNO <sub>3</sub> 0,014 mol L <sup>-1</sup>  |
| <b>Peixe</b>                               | <b>Condições de mineralização e determinação</b>  |
| Preparação da suspensão                    | 250,0 mg de amostra + 25 mL HNO <sub>3</sub> 12 mol L <sup>-1</sup> (15 min. em banho de ultra-som).  |
| Volume de amostragem da suspensão          | 200 µL  |
| Tempo de mineralização                     | 5 min.  |
| Volume final (amostra mineralizada)        | 5 mL  |
| Volume total de amostragem do mineralizado | 90 µL   |
| Transportador                              | HNO <sub>3</sub> 0,014 mol L <sup>-1</sup>  |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welz, B., *Atomic Absorption Spectrometry*. 2. Ed. VCH, U.S.A. 1985.
2. Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 124.
3. Kingston, H. M.; Jassie, L. B., *Introduction to Microwave Sample Preparation-Theory and Practice*. American Chemical Society. Washinton, DC. 1988.
4. Knapp, G., *Mikrochim. Acta*, 1991, **2**, 445.
5. Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E., *Quím. Nova*, 1997, **20**, 638.
6. Lemieux, L.; Simard, R. E., *Lebens-Wiss. Technol.*, 1989, **22**, 254.
7. de la Guardia, M.; Salvador, A.; Burguera, J. L.; Burguera, M., *J. Flow Injection Anal.*, 1988, **5**, 121.
8. Burguera, M.; Burguera, J. L., *Quím. Anal.*, 1996, **15**, 112.
9. Heseck, J. A.; Wilson, R. C., *Anal. Chem.*, 1974, **46**, 1160.
10. Smith, F. E.; Arsenault, E. A., *Talanta*, 1996, **43**, 1207.
11. Abu-Samra, A; Morris, J. S.; Koirtiyohann, S. R., *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 1475.
12. Nadkarni, R. A., *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 2233.
13. Kingston, H. M.; Jassie, L. B., *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2534.
14. Aysola, P.; Anderson, P.; Langford, C. H., *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 1582.
15. Alvarado, J.; León, L. E.; López, F.; Lima, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1988, **3**, 135.
16. Ybáñez, N.; Cervera, M. L.; Montoro, R.; de la Guardia, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **6**, 379.
17. Llompарт, M. P.; Lorenzo, R. A.; Cela, R.; Paré, J. R. J., *Analyst*, 1997, **122**, 133.
18. Deaker, M.; Maher, W., *Anal. Chim. Acta*, 1997, **350**, 287.
19. Reis, B. F., *Quím. Nova*, 1996, **19**, 51.
20. Burguera, M.; Burguera, J. L.; Alarcón, O. M., *Anal. Chim. Acta*, 1986, **179**, 351.
21. Burguera, M.; Burguera, J. L.; Alarcón, O. M., *Anal. Chim. Acta*, 1988, **214**, 421.
22. Carbonell, V.; de la Guardia, M.; Salvador, A., *Anal. Chim. Acta*, 1990, **238**, 417.
23. Karanassios, V.; Li, F. H.; Liu, B.; Salin, E. D., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **6**, 457.
24. Haswell, S. J.; Barclay, D., *Analyst*, 1992, **117**, 117.
25. Welz, B.; Tsalev, D. L.; Sperling, M., *Anal. Chim. Acta*, 1992, **261**, 91.
26. Matusiewicz, H.; Sturgeon, R. E., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **349**, 428.
27. Cabrera, C.; Madrid, Y.; Camara, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, **9**, 1423.
28. Arruda, M. A. Z.; Gallego, M.; Valcárcel, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 501.

29. Sturgeon, R.; Willie, S. N.; Methven, B. A.; Lam, J. W. H.. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 981.
30. Arruda, M. A. Z.; Gallego, M.; Valcárcel, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 169.
31. Balconi, M. L.; Borgarello, M.; Ferraroli, R.; Realini, F., *Anal. Chim. Acta*, 1992, **261**, 295.
32. Oliveira, C. C.; Zagatto, E. A. G.; Araúdo, A. N.; Lima, J. L. F. C., *Anal. Chim. Acta*, 1998, **371**, 57.
33. Kuss, H. M., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1992, **343**, 788.
34. Burguera, M.; Burguera, J. L., *Anal. Chim. Acta*, 1998, **366**, 63.
35. Lambie, K. J.; Hill, S.. *Analyst*, 1998, **123**, 103R
36. de la Guardia, M; Carbonell, V.; Morales-Rubio, A; Salvador, A., *Talanta*, 1993, **40**, 1609.
37. Burguera, J. L.; Burguera, M.; Brunetto, M. R., *At. Spectroscopy*, 1993, **14**, 90.
38. Bryce, D. W.; Izquierdo, A.; Luque de Castro, M. D., *Anal. Chim. Acta*, 1996, **324**, 69.
39. Guo, T.; Baasner, J., *Talanta*, 1993, **40**, 1927.
40. Hanna, C. P.; McIntosh, S. A., *At. Spectroscopy*, 1995, **Mai/Junho**, 106.
41. Morales-Rubio, A; Mena, M. L.; McLeod, C. W., *Anal. Chim. Acta*, 1995, **308**, 364.
42. Burguera M.; Burguera, J. L. Rondón, C.; Rivas, C.; Carrero, P.; Gallignani, M.; Brunetto, M. R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 343.
43. Burguera, J. L.; Burguera, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 235.
44. de Almeida, M. D.; Leandro, K. C.; da Costa, C. V.; Santelli, R. E. e de la Guardia, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 1235.
45. Schmit, A.; Buttle, L.; Uglow, R.; Williams, K.; Haswell, S., *Anal. Chim. Acta*, 1993, **284**, 249.
46. Benson, R. L.; McKelvie, I. D.; Hart, B. T.; Hamilton, I. C., *Anal. Chim. Acta*, 1994, **291**, 249.
47. Williams, K. E.; Haswell, S. J.; Barclay, D. A.; Preston, G., *Analyst*, 1993, **118**, 245.
48. Burguera, M.; Burguera, J. L.. *Lab. Rob. Autom. (LRA)*, 1993, **5**, 277.
49. Carbonell, V.; Morales-Rubio, A.; Salvador, A.; de la Guardia, M.; Burguera, J. L.; Burguera, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 1085.
50. Burguera, M.; Burguera, J. L.; Garaboto, A. M. F.; Alarcón, O. M., *Quím. Anal.*, 1987, **6**, 427.
51. Burguera, J. L.; Burguera, M.; Carrero, P.; Rivas, C.; Gallignani, M.; Brunetto, M. R., *Anal. Chim. Acta*, 1995, **308**, 349.
52. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B., *Analyst*, 1992, **117**, 1729.
53. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B., *Analyst*, 1992, **117**, 1735.
54. Burguera, M.; Burguera, J. L.; Alarcón, O. M., *Anal. Chim. Acta*, 1996, **179**, 351.

55. Gluodenis, Jr., T. J.; Tyson, J. F., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 697.
56. Sooksamiti, P.; Geckeis, H.; Grudpan, K., *Analyst*, 1996, **121**, 1413.
57. Cuesta, A.; Todoli, J. L.; Canals, A., *Spectrochim. Acta, Part B*, 1996, **51**, 1791.
58. Bordera, L.; Hernandis, V.; Canals, A., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1996, **355**, 112.
59. LaFuente, J. M. G.; Sánchez, M. L. F.; Marchante-Gayón, J. M.; Uria, J. E. S.; Sanz-Medel, A., *Spectrochim. Acta, Part B*, 1996, **51**, 1849.
60. Chakraborty, R.; Das, A. K.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M., *Anal. Lett.*, 1997, **30(2)**, 283.
61. Maksimova, I. M.; Morosanova, E. I.; Kuz'min, N. M.; Zolotov, Y. A., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1997, **357**, 946.
62. Carlosena, A.; Gallego, M.; Valcárcel, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 479.
63. Hinkamp, S.; Schwedt, G., *Anal. Chim. Acta*, 1990, **236**, 345.
64. Gluodenis, Jr., T. J.; Tyson, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 301.
65. Stewart, L. J. M.; Barnes, R. M., *Analyst*, 1994, **119**, 1003.
66. Arruda, M. A. Z.; Fostier, A. H.; Krug, F. J., *J. Braz. Chem. Soc.*, 1997, **8**, 39.
67. Beary, E. S.; Paulsen, P. J.; Jassie, L. B.; Fassett, J. D., *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 758.
68. Bouhsain, Z.; Garrigues, S.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M., *Anal. Chim. Acta*, 1996, **330**, 59.
69. Angelis, R. C. de, ***Fisiologia da Nutrição***. 3 Ed. Livraria Nobel S.A., 1986.
70. Underwood, E. J., ***Trace Elements in Human and Animal Nutrition***. 4. ed. New York: Academic Press, 1977, p. 132.
71. Mortatti, J.; Krug, F. J.; Pessenda, L. C. R.; Zagatto, E. A. G., *Analyst*, 1982, **102**, 659.
72. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1987, **112**, 199.
73. Tsalev, D. L.; Zaprianov, Z. K., ***Atomic Absorption Spectrometry in Occupational Health Practice***. v. 1. CRC Press, Inc.. Boca Raton, Flórida. 1985.
74. Lauwerys, R.; Lison D., *Sci. Total Environ.*, 1994, **150**, 1.
75. Belitz, H. D.; Grosch, W., ***Food Chemistry***. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1987, p.316
76. Conrad, J. H.; Mcdowell, L. R.; Ellis, G. L.; Loosli, J. K., ***Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais***. Boletim, EMBRAPA, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 1985.
77. Bognár, J., *Mikrochim. Acta*, 1961, **6**, 903.
78. Otto, M.; Rentsch, J.; Werner, G., *Anal. Chim. Acta*, 1983, **147**, 267.
79. Isshiki, K.; Nakayama, E., *Talanta*, 1987, **34**, 277.

80. Arruda, M. A. Z.; Zagatto, E. A. G.; Jacintho, A. O.; Brienza, S. M. B., *J. Braz. Chem. Soc.*, 1991, **2**, 47.
81. Malahoff, A.; Kolotyrykina, I. Y.; Shpigun, L. K., *Analyst*, 1996, **121**, 1037.
82. MacCulloch, W. e Pitts, W., *Bull. Mathem. Bioph.*, 1943, **5**, 115.
83. Liu, Y. A.; Baughman, D. R., ***Neural networks in bioprocessing and chemical engineering***. Academic Press, San Diego, 1995.
84. Goldberg, D. E., ***Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning***. Addison-Wesley, Reading, 1989.
85. Campmajó, C.; Poch, M.; Robusté, J.; Valero, F.; Lafuente, J., *Analisis*, 1992, **20**, 127.
86. Zupan, J.; Gasteiger, J., *Anal. Chim. Acta*, 1991, **248**, 1.
87. de Weijer, A. P.; Lucasius, C. B.; Buydens, L.; Kateman, G., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1993, **20**, 45.
88. Bos, A.; Bos, M.; van der Linden, W. E., *Anal. Chim. Acta*, 1993, **277**, 289.
89. Ventura, S.; Silva, M.; Pérez-Bendito, D., *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4458.
90. Hongmei, W.; Lishi, W.; Wanli, X.; Baogui, Z.; Chengjun, L.; Jianxing, F., *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 699.
91. Ruisánchez, I.; Lozano, J.; Larrechi, M. S.; Rius, F. X.; Zupan, J., *Anal. Chim. Acta*, 1997, **348**, 113.
92. Blanco, M.; Coelho, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Redón, M.; Villegas, N., *Analyst*, 1996, **121**, 395.
93. Pasquini, C.; de Oliveira, W. A., *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 2575.
94. Miller, J. C.; Miller, J. N., ***Estadística para Química Analítica***. 2. ed. Addison-Wesley Iberoamerican, S. A., Wilmington, EUA, 1993.
95. Zupan, J.; Gasteiger, J., ***Neural Networks for chemists: an introduction***, VCH, Weinheim, 1992.
96. Kotz, L.; Henze, G.; Kaiser, G.; Pahlke, S.; Veber, M., *Talanta*, 1979, **26**, 681.
97. Muñoz, A.; Gómez, M.; Palacios, M. A.; Camara, C., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1993, **345**, 524.
98. Würfels, M.; Jackwerth, E.; Stoeppler, M., *Anal. Chim. Acta*, 1989, **226**, 1.
99. Krushevskaja, A.; Barnes, R. M.; Amarasiriwaradena, C. J.; Foner, H.; Martines, L., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 845.
100. Krushevskaja, A.; Barnes, R. M.; Amarasiriwaradena, C. J.; Foner, H.; Martines, L., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 851.
101. Krushevskaja, A.; Barnes, R. M.; Amarasiriwaradena, C. J., *Analyst*, 1993, **118**, 1175.