Universidade Federal de Sergipe

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Química

ROBSON DANTAS VIANA

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE DIGESTÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO VEGETAL EM SISTEMA FECHADO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E MATRIZ DOEHLERT

SÃO CRISTÓVÃO - SE
Junho - 2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE DIGESTÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO VEGETAL EM SISTEMA FECHADO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E MATRIZ DOEHLERT

ROBSON DANTAS VIANA

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós - Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALEXANDRE BORGES GARCIA

Co-Orientador: Prof. Dr. JOSÉ DO PATROCÍNIO HORA ALVES

SÃO CRISTÓVÃO - SE
Junho - 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Viana, Robson Dantas
V614o Otimização de métodos de digestão de amostras de tecido vegetal em sistema fechado utilizando planejamento fatorial e matriz Doehlert / Robson Dantas Viana – São Cristóvão, 2005.
112 p. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe.

Orientador: Carlos Alexandre Borges Garcia

1. Química analítica. 2. Métodos químicos de análise. 3. Quimiometria. 4. Digestão de tecido vegetal. 5. Planejamento fatorial. 6. Matriz Doehlert. I. Título.

CDU 543

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado de ROBSON DANTAS VIANA apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe, em 21/06/2005.

Prof. Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia – DQI, UFS

Prof. Dr. Edy Souza de Brito – Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. José do Patrocínio Hora Alves – DQI, UFS

Dedicatória

Aos meus três amores: Dona Gedalva, minha mãe, Cleunice, minha esposa, e Anita, minha filhinha.
Em memória, as minhas avós, Anita e Iracema, aos meus avôs Zezé e Antônio Leão e ao meu sogro Antônio Barreto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia pela orientação, incentivo, paciência e oportunidade de realização de um sonho.

Ao Prof. Dr. José do Patrocínio Hora Alves pela co-orientação e apoio.

À Profa. Dra. Luciane Pimenta Romão pelo incentivo.

À família LQA pelo companheirismo: Bruno, Elisangela, Danielle, Kennedy, Fabrício, Fabiano, Marinoé e Pedro.

Aos colegas de mestrado pela convivência saudável: Adalberto, Elisangela, Jeremias, Ricardo e Silvanito.

Aos professores do Núcleo de Pó-Graduação pelos ensinamentos: Carlos Alexandre, Eduardo, Haroldo, Hilda, José do Patrocínio e Marina.

À Anselmo Pinheiro por ser um amigo tão prestativo nas horas mais urgentes.

Aos amigos da Petrobras – Anselmo Lessa, Jadson, Jairo Amâncio e Sérgio - que permitiram a utilização do forno de microondas.

Ao meu chefe imediato, Lafayette Franco Sobral, e à chefia da Embrapa Tabuleiros Costeiros - Edmar Ramos Siqueira, Edson Diogo e Tereza Cristina de Oliveira - pela grande oportunidade que me foi dada.

Aos meus amigos e companheiros da Embrapa pelo apoio sincero: Daniel, Joézio, Roberto e Robinson.

À Profa. Dra. Ana Eleonora Almeida Paixão por ter gentilmente cedido o programa STATISTICA 6.0 que foi uma ferramenta imprescindível na condução desse trabalho.

A minha esposa e companheira, Cleunice, pela presença sempre constante, estimulando-me nos momentos mais difíceis a seguir no objetivo que traçamos.

A minha cunhada, Helenice, pelas contribuições durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Dona Gedalva, que apesar de todas as intempéries, viu na educação dos filhos um caminho de preparo para a vida.

À Anita Barreto Viana pelos dias em que não desligou o computador!

CURRICULUM VITAE

Nome: Robson Dantas Viana

Nascimento: Aracaju, 25 de janeiro de 1971.

EDUCAÇÃO

2º Grau: Curso Técnico em Química 1986 – 1989

Graduação: Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Aracaju. 1996.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Técnico de Nível Superior II do Laboratório de Fertilidade de Solos e Nutrição de Plantas – Embrapa Tabuleiros Costeiros.
Admissão em 1994.

BOLSAS

8/1993 – 7/1994: Bolsista de Iniciação científica do CNPq
9/1993 – 12/1994: Bolsista de Iniciação científica do CNPq

TRABALHOS RESUMIDOS EM EVENTOS

1. "COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE ABERTURA DE AMOSTRAS DE TECIDO VEGETAL PARA DETERMINAÇÃO DE MICRONUTRIENTES POR EAA". Robson Dantas Viana, Carlos Alexandre Borges Garcia, José do Patrocínio Hora Alves, Elisangela de Andrade Passos. 12º Encontro Nacional de Química Analítica. São Luís, Maranhão. 14 a 17 de outubro de 2003.

2. "USO DE PLANEJAMENTO FATORIAL E MATRIZ DOEHLERT PARA OTIMIZAÇÃO DE DIGESTÃO DE TECIDO VEGETAL EM VASOS DE PTFE". Robson Dantas Viana, Carlos Alexandre Borges Garcia, José do Patrocínio Hora Alves. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. v. único, Poços de Caldas, Minas Gerais. 31 de Maio a 03 de Junho de 2005.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i
LISTAS DE TABELAS iii
LISTAS DE ABREVIATURAS v
RESUMO vi
ABSTRACT vii
1. INTRODUÇÃO 1
2. JUSTIFICATIVA 5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
3.1. SISTEMA SOLO-PLANTA 6
3.2. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DAS PLANTAS 10
3.3. ANÁLISE QUÍMICA DE PLANTAS 14
3.4. AMOSTRAGEM 15
3.5. LAVAGEM 16
3.6. SECAGEM 17
3.7. MOAGEM E ARMAZENAGEM 18
3.8. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE PLANTA 19
3.8.1. Digestão por via seca 20
3.8.2. Digestão por via úmida 23
3.8.3. Agentes oxidantes 30
3.9. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE MÉTODOS ANALÍTICOS 35
3.9.1. Planejamento fatorial completo 37
3.9.2. Matriz Doehlert 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 47
4.1. INSTRUMENTOS 47
4.2. REAGENTES, PADRÕES, AMOSTRAS E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS 48
4.3. PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO 49
4.3.1. Digestão em forno de microondas 49
4.3.2. Digestão em bloco digestor com vasos fechados de PTFE 49
4.4. ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO 50
4.5. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM FORNO DE MICROONDAS 51

4.5.1. Robustez da digestão em forno de microondas 55
4.6. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM VASOS DE PTFE 55
4.6.1. Robustez da digestão em bloco digestor 57
4.7. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS OTIMIZADOS 58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
5.1. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM FORNO MICROONDAS 60
5.1.1. Planejamento fatorial completo e planejamento Doehlert 62
5.1.2. Teste de robustez 67
5.2. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM VASOS FECHADOS DE PTFE..... 69
5.2.1. Planejamento fatorial completo e planejamento Doehlert. 69
5.2.2. Teste de robustez 76
5.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS 78
6. CONCLUSÃO 88
REFERÊNCIAS 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas envolvidas na análise foliar. 15
Figura 2. Formas de aquecimento: (a) por microondas e (b) por condução. 25
Figura 3. Esquema do forno de microondas focalizadas com uma cavidade e sistema de refluxo. 27
Figura 4. Esquema de forno microondas com vasos fechados. 28
Figura 5. Diagrama de Pareto para as variáveis concentração do ácido, temperatura final e tempo final, relativo à digestão de amostras de planta. . 40
Figura 6. Distribuição dos pontos experimentais para duas variáveis de acordo com a matriz Doehlert. 42
Figura 7. Planejamento Doehlert para três variáveis: a) Desenho tridimensional do Cuboctaedro centrado sobre uma face triangular. b) Distribuição dos pontos experimentais após projeção plana do cuboctaedro sobre a face triangular.. 42
Figura 8. Regiões (a) de máximo, (b) de mínimo e (c) de sela. 45
Figura 9. Programa de aquecimento: TR 180°C, TP 5 min e C 2 mol L^{-1}. ... 53
Figura 10. Programa de aquecimento: TR 220°C; TP 7,5 min e C 3 mol L^{-1} 53
Figura 11. Programa de aquecimento: TR 220°C, TP 10 min e C 4 mol L^{-1}. 54
Figura 12. Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados. 64
Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento Doehlert para a otimização dos fatores temperatura (TR) e tempo (TP), tendo como resposta analítica a eficiência (E). 66
Figura 14. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores para o estudo da robustez. 68
Figura 15. Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados. 71
Figura 16. Superfície de resposta: concentração de ácido nítrico (C), temperatura final (TR) e eficiência (E), mantendo-se a variável tempo final em 119 min. 73
Figura 17. Superfície de resposta: concentração de ácido nítrico (C), tempo final (TP) e eficiência (E), mantendo-se a variável temperatura final em 210ºC. 74

Figura 18. Superfície de resposta: tempo final (TP), temperatura final (TR) e eficiência (E), mantendo-se a variável concentração de ácido nítrico (C) em 6,65 mol L^{-1}. 74
Figura 19. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores para o estudo da robustez. 77
Figura 20. Curva analítica para o elemento Fósforo. 82
Figura 21. Curva analítica para o elemento Potássio. 82
Figura 22. Curva analítica para o elemento Cálcio. 83
Figura 23. Curva analítica para o elemento Magnésio. 83
Figura 24. Curva analítica para o elemento Manganês. 84
Figura 25. Curva analítica para o elemento Zinco. 84
Figura 26. Curva analítica para o elemento Ferro. 85
Figura 27. Curva analítica para o elemento Cobre. 85

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Principais limitações na produção agrícola em várias regiões do mundo. 7
Tabela 2. Elementos essências às plantas. 11
Tabela 3. Níveis críticos para algumas cultivares. 13
Tabela 4. Faixas adequadas de macronutrientes para algumas cultivares. 13
Tabela 5. Faixas adequadas de micronutrientes para algumas cultivares... 13
Tabela 6. Seleção dos fatores e de seus níveis em um processo de digestão ácida de amostras de planta. 38
Tabela 7. Planejamentos fatoriais completos para duas e três variáveis..... 39
Tabela 8. Planejamento matriz Doehlert para duas variáveis com seus valores codificados. 43
Tabela 9. Planejamento Doehlert para três variáveis com seus valores codificados. 43
Tabela 10. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3. 52
Tabela 11. Programa de aquecimento do forno de microondas usado durante todo o processo de otimização. 52
Tabela 12. Planejamento Doehlert para as duas variáveis estudadas. 54
Tabela 13. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para o teste de robustez. 55
Tabela 14. Programa de aquecimento do bloco digestor usado durante o processo de otimização. 56
Tabela 15. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3. 56
Tabela 16. Planejamento Doehlert para as duas variáveis estudadas. 57
Tabela 17. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez. 58
Tabela 18. Níveis máximo e mínimo dos fatores selecionados 62
Tabela 19. Planejamento experimental e resultados obtidos em E (%). 62
Tabela 20. Análise de variância dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 19. 63
Tabela 21. Domínios experimentais dos fatores significativos para a superfície de resposta. 65

Tabela 22. Matriz Doehlert para as duas variáveis estudadas. 65
Tabela 23. Níveis mínimo e máximo dos fatores selecionados para o teste de robustez. 67
Tabela 24. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez. 68
Tabela 25. Níveis máximo e mínimo dos fatores selecionados 69
Tabela 26. Planejamento experimental e resultados obtidos em E(%). 70
Tabela 27. Análise de variância dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 26 70
Tabela 28. Domínios experimentais dos fatores significativos para a superfície de resposta. 72
Tabela 29. Matriz Doehlert para as três variáveis estudadas. 72
Tabela 30. Níveis mínimo e máximo dos fatores selecionados para o teste de robustez. 76
Tabela 31. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez. 77
Tabela 32. Resultados das análises da amostra certificada NIST 1547 em forno microondas e em vasos de PTFE. 81
Tabela 33. Resultados das análises da amostra certificada GBW 07605 em forno microondas e em vasos de PTFE. 81
Tabela 34. Limites de detecção e de quantificação dos elementos avaliados após digestão em forno microondas. 86
Tabela 35. Limites de detecção e de quantificação dos elementos avaliados após digestão em vasos de PTFE. 87

LISTAS DE ABREVIATURAS

A	Absorvância
ANOVA	Análise de variância
b	Coeficiente angular da curva analítica
C	Concentração de ácido nítrico
CII	Comitê Inter-Instituts d'Etudes des Techniques Analytiques
CTD	Percentual de carbono total no digerido
CTL	Percentual de carbono total na amostra de leunena
E	Eficiência
EAA	Espectroscopia de absorção atômica
FAAS	Espectroscopia de absorção atômica em chama
ICP-OES	Espectroscopia de emissão óptica por plasma Indutivamente acoplado
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
NCHS-O	Nitrogênio, Carbono, Hidrogênio, Enxofre e Oxigênio
NIST	National Institute of Standards & Technology
PTFE	Politetraflouetileno
RSD	Desvio padrão relativo
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
s	Desvio padrão
TOC	Carbono orgânico total
TP	Tempo final
TR	Temperatura final

RESUMO

Os desenvolvimentos crescentes na agricultura e o fato de deterem informações valiosas sobre os ecossistemas têm provocado um progressivo interesse em diversas áreas do conhecimento pela composição química das plantas. No entanto, os métodos clássicos de digestão de tecido vegetal, tais como digestão por via seca e por via úmida, são morosos; passíveis de perdas de analitos por volatilização ou de retenção ao resíduo sólido; necessitam de grandes quantidades de reagentes concentrados e de supervisão constante do analista. Devido à importância da matriz planta e às desvantagens dos métodos clássicos, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais rápidos e cujos resultados sejam confiáveis e obtidos com contaminação mínima, baixo consumo de reativo e geração mínima de resíduo. Neste trabalho, os fatores concentração de ácido nítrico, temperatura e tempo finais de decomposição em forno de microondas e em vasos de PTFE sob aquecimento em bloco digestor, ambos em sistema fechado, foram escolhidos para serem otimizados através das metodologias multivariadas conhecidas como planejamento fatorial completo e planejamento Doehlert, tendo como reposta analítica a eficiência na eliminação de carbono total em uma amostra teste de folha de leucena. Os valores ótimos obtidos para os fatores concentração de ácido nítrico, temperatura e tempo finais de decomposição foram, respectivamente, 2,0 mol L^{-1}, 220ºC e 10 min para digestão em forno de microondas e 6,5 mol L^{-1}, 210ºC e 2 h para digestão em vasos de PTFE. Os tempos totais para a digestão assistida por forno de microondas e sob aquecimento em bloco digestor foram 23 min e 3 h, respectivamente. Após a obtenção dos valores ótimos, a exatidão dos dois métodos propostos foi avaliada pela recuperação dos analitos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn em dois materiais de referência certificados, NIST 1547 (folha de pêssego) e GBW 07605 (folha de chá). Como as recuperações variaram entre 97 e 112%, para o forno de microondas, e de 96 a 112% para a digestão em bloco digestor, e a comparação estatística pelo teste-t não mostrou nenhuma diferença significante entre os valores obtidos e os valores certificados, a um nível de confiança de 95%, estes métodos podem ser empregados para digestão de tecido vegetal como uma alternativa mais rápida e efetiva.

PALAVRAS –CHAVE: Digestão de tecido vegetal; Microondas; Doehlert.

ABSTRACT

The growing developments in the agriculture and the fact of they stop valuable information on the ecosystems have been motivating a progressive interest in several areas of the knowledge for the chemical composition of the plants. However, the classic methods of digestion of vegetable tissue, such as the digestions for dry ash (calcinations) and for wet ash, they are slow; susceptible to analyte losses for volatilization or retention to the solid residue; they need great amounts of concentrated reagents and of the analyst's constant supervision. Due to the importance of the plant matrix and to the disadvantages of the classic methods, it is done necessary the development of faster methods and whose results are reliable and obtained with contamination minimum, low reagent consumption and minimum generation of residue. In this work, the factors concentration of acid nitric, temperature and time final of decomposition in microwave oven and in vases of PTFE under heating in digestor block, both in closed system, were chosen for they be optimized through the methodologies multivariate known as full factorial design and Doehlert design, tends how analytical response the efficiency in the elimination of total carbon in a sample tests of leucena leaf. The optimum values obtained for the factors concentration of acid nitric, temperature and time final of decomposition were, respectively, 2,0 mol L^{-1}, 220ºC and 10 min for digestion in microwave oven and 6,5 mol L-1, 210ºC and 2 h for digestion in vases of PTFE. The total times for the digestion assisted by microwave oven and under heating in digestor block were 23 min and 3 h, respectively. After the obtaining of the optimum values, the accuracy of the two proposed methods was evaluated by the recovery of the analyte Ca, Ass, Faith, K, Mg, Mn, P and Zn in two certified reference materials, NIST 1547 (peach leaf) and GBW 07605 (tea-leaf). As the recoveries they varied between 97 and 112%, for the microwave oven, and from 96 to 112% for the digestion in digestor block, and the statistical comparison for the test-t it didn't show any significant difference between the obtained values and the certified values, the a level of trust of 95%, these methods can be used for digestion of vegetable tissue as a faster alternative and it executes.

KEYWORDS: Digestion of vegetable tissue; Microwaves; Doehlert.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são componentes importantes dos ecossistemas, pois reciclam elementos químicos, estabelecendo um caminho de transporte destes elementos do meio abiótico para o biótico (Chojnacka et al., 2005). Como as suas fontes primárias de nutrientes são o ar, o solo e a água, a determinação de sua composição química fornece informações valiosas sobre estes reservatórios para investigações agrícolas, toxicológicas e ambientais (Ivanova et al., 2001).

Na agronomia, a análise química de tecido vegetal ou análise foliar é essencial na avaliação do estado nutricional das plantas, em estudos de fertilidade do solo e em programas de adubação. Tais estudos diagnosticam deficiências ou excessos de nutrientes, bem como permitem acompanhar o efeito dos fertilizantes e corretivos no estado nutricional dos vegetais cultivados.

A utilização da análise foliar como critério de diagnóstico do estado nutricional das plantas baseia-se na premissa de existir uma relação entre o fornecimento de nutrientes e a concentração destes na planta, e que acréscimos ou decréscimos nestas concentrações se relacionam com produções mais altas ou mais baixas, respectivamente.

Comparando-se os teores dos elementos essenciais na amostra de planta com os valores de um padrão (plantas normais) é possível diagnosticar desequilíbrios nutricionais (Malavolta, 1980; Oliveira et al., 1991; Munson e Nelson, 1990). Por outro lado, o excesso de alguns elementos essenciais como o Cu, Fe, Mn e Zn pode ser prejudicial à planta.

Como as plantas assimilam indiscriminadamente da solução do solo tanto elementos essenciais como não essenciais, é necessária, cada vez mais, a determinação de elementos tóxicos, os quais se acumulam nas plantas em conseqüência da poluição ambiental (Masson, 1999), podendo estes elementos entrar na cadeia trófica do homem e dos animais.

A maioria dos elementos, que nos interessa analisar nas plantas, se encontra como compostos orgânicos ou em uma matriz orgânica e é necessário proceder à eliminação ou à destruição desta matriz antes das análises (Etchevers e Etchevers, 1980). A determinação mais comumente feita em rotina é a dos teores totais, através da destruição da matéria orgânica do material seco pelos métodos clássicos de digestão seca (calcinação) e digestão úmida em sistema aberto (Hoenig, 1995).

Entretanto, estes dois métodos clássicos apresentam várias desvantagens (Clément, 1995; Hoenig e Kersabiec, 1996; Wieteska et al., 1996; Silva, 1999; Anzano et al., 2000; Nascentes et al., 2001; Vassileva et al., 2001; Almeida et al., 2002; Oliveira, 2003): os ácidos concentrados usados em grandes quantidades são fontes de contaminação, como também de perigo; ambos os métodos são processos lentos, necessitando de 8 a 12h horas; há possibilidade de contaminação pelo ambiente e de perdas por volatilização (As, Cd, Hg, Pb e Zn), pois são realizados sob pressão atmosférica e em altas temperaturas; necessitam de acompanhamento constante do analista, sob condições insalubre e/ou perigosa.

Na digestão úmida em sistema aberto, a mistura HNO_3 + $HClO_4$ é a mais utilizada em laboratórios de análise de tecido vegetal, sendo aplicável à quase todos os tipos de amostras: folhas, sementes, raízes, caules, cascas e outros (Silva, 1999).

Entretanto, devido à possibilidade de explosão do ClO_4^- na presença de carbono, ao desprendimento de gases e vapores tóxicos (NO, NO_2, HNO_3 e $HClO_4$), à corrosão do bloco digestor e da capela, à precipitação do $KClO_4$ (Silva, 1999), a venda controlada do HNO_3 e do $HClO_4$ e ao elevado tempo de análise, métodos alternativos têm sido apresentados na literatura, os quais utilizam ácidos concentrados e diluídos (Araújo et al., 2002), combinados ou não com o peróxido de hidrogênio, com aquecimento por

microondas em sistema fechado ou aberto ou com aquecimento condutivo em sistema fechado.

Considerando que os métodos clássicos de decomposição de amostras de tecido vegetal, digestão nítrico-perclórica e a calcinação, apresentam inconvenientes e que o interesse pela composição química de materiais de planta está crescendo como resultado dos desenvolvimentos contínuos na agricultura e de estudos ambientais (Rodushkin et al, 1999), a busca por métodos mais eficientes e rápidos de digestão de amostras de tecido vegetal se faz necessária.

Muitas variáveis contribuem para eficiência de um processo de digestão de amostras de planta. A otimização mais comumente realizada dessas variáveis em laboratório de análise química é por meio de técnicas univariadas, onde cada variável é otimizada individualmente com as demais variáveis fixas. Entretanto, esta técnica não é eficiente, pois demanda muito tempo e reagentes, além de desconsiderar a influência das interações entre as variáveis na resposta analítica. Por isso que metodologias multivariadas como planejamento fatorial completo e metodologias de superfícies de respostas estão sendo preferidas na otimização de experimentos analíticos, uma vez que são mais eficientes, pois demandam menos experimentos e consideram as interações entre os fatores ou variáveis na resposta analítica (Lemos et al., 2005; Korn et al., 2005).

Na estratégia de otimização de variáveis em um processo digestão de amostras de planta, o planejamento fatorial completo é empregado para selecionar as variáveis mais significativas, dentre as variáveis avaliadas, para a obtenção da melhor resposta analítica. Em seguida, os valores ótimos destas variáveis mais significativas, dentro do domínio experimental estudado, podem ser determinados pela aplicação da metodologia de superfície de respostas, tais como o planejamento composto central, planejamento Box-Behnken e planejamento ou matriz Doehlert.

Considerando que a eficiência de um planejamento experimental é definida como o número de coeficientes do modelo estimado dividido pelo número de experiências, o planejamento Doehlert é mais eficiente do que os planejamentos Box-Behnken e composto central (Ferreira et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi otimizar, através do planejamento fatorial completo e o planejamento Doehlert, as variáveis concentração de ácido nítrico, a temperatura final e tempo final de dois métodos de digestão de tecido vegetal, ambos em sistema fechado, um com aquecimento por microondas e outro empregando vasos de PTFE com aquecimento condutivo em bloco digestor.

A resposta analítica empregada durante o processo de otimização foi o percentual de carbono total eliminado de uma amostra teste de folha de leucena, vegetal rico em proteína, após submetê-la a todos os experimentos exigidos pelos dois planejamentos.

Após a determinação dos valores ótimos das variáveis escolhidas, dois materiais de referência certificados de planta, NIST 1547 (folha de pêssego) e GBW 07605 (folha de chá), foram submetidos aos dois programas de aquecimento otimizados, e os valores obtidos para os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn foram comparados com os valores certificados, não revelando diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95%.

2. JUSTIFICATIVA

A análise química de tecido vegetal é essencial em pesquisas agrícolas, biológicas e ambientais, uma vez que as plantas reciclam e transportam elementos químicos de ambientes abióticos para ambientes bióticos. Estes elementos químicos podem desenvolver uma atividade biológica essencial ou agir como agentes tóxicos, tanto para planta quanto para os seres vivos que a tem em sua cadeia trófica.

Para a agricultura, o conhecimento da composição química das plantas pode diagnosticar deficiências ou excessos de nutrientes, bem como permite acompanhar o efeito dos fertilizantes e corretivos no estado nutricional dos vegetais cultivados.

Para todas estas áreas do conhecimento, é essencial que a análise de tecido vegetal seja conduzida no sentido de obter resultados confiáveis, no menor tempo, com mínima contaminação, baixo consumo de reativo e geração mínima de resíduo ou mínimo desperdício.

No entanto, as técnicas clássicas de preparo de amostras de planta são morosas, estão sujeitas a contaminação e a perdas de analitos, expõe o analista a contaminantes cancerígenos e necessitam de grandes quantidades de reagentes concentrados.

Por esta razão, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais rápidas, eficientes e que não exponham o analista e o meio ambiente a poluentes. O desenvolvimento dessas técnicas é mais efetivo quando metodologias multivariadas são aplicadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. SISTEMA SOLO-PLANTA

A produtividade das culturas agrícolas é determinada por diversos fatores de produção que podem ser agrupados em tecnológicos e sócio-econômicos. Entre os fatores tecnológicos, estão relacionados: a deficiência hídrica, a fertilidade do solo, o controle de doenças, pragas, plantas daninhas e uso de cultivares. Os fatores sócio-econômicos incluem, entre outros, a disponibilidade de crédito, de insumos, de tecnologias modernas, a situação econômica e a assistência técnica (Fageria, 1998).

À medida que se consegue controlar com eficiência os fatores tecnológicos e tornar os fatores sócio-econômicos favoráveis, é possível assegurar a lucratividade e a competitividade de um empreendimento no mercado nacional ou internacional.

A fertilidade do solo se refere à capacidade do mesmo em fornecer minerais essenciais, em quantidade e proporção adequadas, para o crescimento normal das plantas (Raij et al., 1987; Fageria, 1989). Dessa forma, a deficiência de um elemento nutritivo no solo, reduz a capacidade produtiva da planta, pois há uma diminuição em seu desenvolvimento, em sua reprodução e em sua produção (Jorge, 1986).

A fertilidade do solo, depois da deficiência hídrica, é o fator de produção que mais influencia no desenvolvimento das plantas. Para Fageria (1998) o estresse nutricional, entendido como a deficiência ou a toxidez nutricional de elementos no solo, representa um dos principais limitantes da produtividade das culturas em solos agrícolas.

Na Tabela 1, estão destacados o estresse nutricional e a deficiência hídrica como as principais limitações na produção agrícola em várias regiões do mundo.

O solo não é um sistema compactado, pois entre as partículas sólidas existem interstícios que são constituídos por macro e microporos que em condições normais são ocupados, respectivamente, por gases (O_2, CO_2 e N_2) e uma solução geralmente diluída, a solução do solo. Dessa forma, o solo é formado por três fases: sólida, líquida e gasosa (Malavolta, 1980; Klar, 1988; Luchese et al., 2001; Tomé Jr., 2002).

Tabela 1. Principais limitações na produção agrícola em várias regiões do mundo.

Regiões	Porcentagem de área total					
	Deficiência hídrica	**Estresse nutricional**	**Baixa Profundidade do solo**	**Excesso de água**	**Geleira**	**Sem maior limitação**
América do Norte	20	22	10	10	16	22
América Central	32	16	17	10	-	25
América do Sul	17	47	11	10	-	15
Europa	8	33	12	8	3	36
África	44	18	13	9	3	16
Ásia Sul	43	5	23	11	-	18
Ásia Norte e Central	17	9	38	13	13	10
Ásia Sudeste	2	59	6	19	-	14
Austrália	55	6	8	16	-	15
Mundo	28	23	22	10	6	11

Fonte: Fageria (1998)

A fase gasosa do solo é fonte de oxigênio necessário à respiração das plantas e dos microorganismos aeróbicos que mineralizam a matéria orgânica (Luchese et al., 2001) e que oxidam, por exemplo, NH_4^+ em NO_3^- e S^{2-} em SO_4^- que são formas iônicas absorvidas pela planta (Fanquin, 1994).

Na fase gasosa também está presente o nitrogênio atmosférico que é biologicamente fixado devido à simbiose entre plantas e as bactérias denominadas rizóbios (Luchese et al., 2001). É por este motivo que práticas

que aumentam a aeração, como aração, gradagem e subsolagem, tendem a aumentar a absorção de elementos do solo (Malavolta, 1980).

A fase sólida do solo, constituída pelas frações minerais e orgânicas, funciona como reservatório de nutrientes para as culturas e como superfície ativa, regulando a concentração dos elementos na solução do solo (Malavolta, 1980).

A fase líquida ou solução do solo é o compartimento no qual se encontram dissolvidos os componentes, tanto da fase sólida quanto da fase gasosa do solo (Malavolta et al., 1997)

É somente da solução do solo que as plantas podem absorver elementos minerais essenciais ao seu desenvolvimento, bem como elementos não essenciais ou até mesmo tóxicos (metais pesados), pois as plantas têm uma capacidade limitada para selecionar somente o que lhe é indispensável (Marschner, 1995).

As reações que controlam a mobilidade e a disponibilidade de elementos químicos (nutrientes ou contaminantes) em solos compreendem adsorção e dessorção, precipitação e dissolução e complexação. Esses processos decorrem de vários atributos do solo que exercem um papel importante no processo de absorção pelas plantas, tais como: pH, potencial redox, textura, porosidade, quantidade e qualidade da matéria orgânica, presença de outros íons, atividade microbiana, temperatura e umidade (Fageria, 1989; Kabata-Pendias, 2004; Bronick e Lal, 2005).

O sistema solo-planta é controlado por muitos fatores associados às condições do solo e do clima, ao genótipo da planta e ao manejo agrícola, caracterizando por ser um sistema aberto, de composição não estável, controlado por infinitos equilíbrios com cinéticas características e algumas de extrema complexidade em que substâncias químicas são constantemente transferidas, geralmente de forma reversível, entre os compartimentos do solo e a planta (Malavolta et al., 1997; Luchese et al., 2001).

Em estudos ambientais e agronômicos, é cada vez mais necessária a determinação de elementos tóxicos (Masson, 1999) em plantas, uma vez que estas reciclam e transportam esses elementos de ambientes abióticos (ar, água e solo) para ambientes bióticos (Hamilton, 1995).

Por exemplo, a contaminação do solo, conseqüência de atividades antropotécnicas, representa sérios riscos aos componentes bióticos dos ecossistemas, pois contaminantes disponíveis no solo podem ser absorvidos pelas plantas e através desta entrar na cadeia alimentar de organismos vivos (Freire, 1998; Fanquin e Fernandes, 2001; Cardoso et al., 2003).

A característica das plantas de assimilar, indiscriminada, tanto os elementos essenciais ao seu desenvolvimento, quanto os agentes tóxicos (Malavolta et al., 1997) é sem dúvida um atributo negativo, pois o ideal seria que fossem somente assimilados aqueles elementos indispensáveis ao seu desenvolvimento. Por outro lado, essa característica permite que as plantas possam ser utilizadas para estudar ou avaliar o impacto da atividade humana nas suas principais fontes de nutrientes: o ar, a água e o solo (Hamilton, 1995), ou seja, nos três reservatórios geoquímicos da natureza: Atmosfera, Hidrofesra e Litosfera.

Algumas espécies de plantas são utilizadas na fitoremedição de áreas degradadas (Khan, 2001; Baird, 2002; Mattina et al., 2003), no monitoramento de poluição atmosférica e do solo (Kovnatsky e Surnin, 1993; Bettinelli et al., 2002; Krachler et al., 2002; Pugh et al., 2002; Perämäki e Pöykio, 2003) e na avaliação de fitotoxidade de metais pesados em solos agrícolas tratados com resíduos industriais ou urbanos que, embora sejam ricos em matéria orgânica e em nutrientes minerais, possuem em sua constituição metais pesados e contaminantes orgânicos (Simonete e Kiehl, 2002; Nascimento et al.,2004).

A determinação dos teores totais de elementos químicos em amostras de tecido vegetal sempre será necessária para avaliar o estado nutricional das plantas, a fitotoxidade de insumos agrícolas, a fitoremediação de áreas impactadas ou em estudos de monitoramento de impacto ambiental do solo ou da atmosfera, quando vegetais são utilizados como bioindicadores. Nesses estudos, as plantas funcionam como verdadeiros extratores de nutrientes ou de contaminantes, ou seja, a planta é usada como meio para se avaliar de forma mais detalhada a fertilidade do solo e a sua possível contaminação por agentes tóxicos.

3.2. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DAS PLANTAS

Na planta são encontrados praticamente todos os elementos da tabela periódica (Malavolta et al., 1997); entretanto, poucos são essenciais a sua nutrição, possuindo também em sua constituição elementos úteis e tóxicos (Malavolta, 1987).

Marschner (1995) relata que o termo elemento essencial foi enunciado pela primeira vez em 1939 por D. I. Arnon e P. R. Stout Para esses autores, um elemento é considerado essencial, desde que três critérios de essencialidade sejam obedecidos:

1. Na ausência do elemento, a planta não consegue completar o seu ciclo de vida;
2. A função do elemento na planta não pode ser substituída por outro elemento;
3. Que o elemento esteja diretamente envolvido no metabolismo da planta; por exemplo, que seja constituinte de uma enzima ou participe de alguma reação enzimática.

Alguns elementos não são considerados essenciais, mas apenas benéficos ou úteis, pois a sua ausência não é um fator limitante, mas apenas colabora com o desenvolvimento dos vegetais em situações particulares e em pequenas concentrações. Marschner (1995) lista nesta categoria o sódio (Na), silício (Si), cobalto (Co), o iodo (I) e vanádio (V).

Os elementos químicos considerados essenciais aos vegetais são denominados de nutrientes. Até o momento, dezessete elementos são conhecidos como essenciais (Tabela 2).

Os elementos essenciais são classificados em macro e micronutrientes (Jones Jr. et al., 1991), dependendo da quantidade que as plantas necessitam para o seu adequado crescimento.

Os macronutrientes são necessários em grandes quantidades, enquanto os micros, em pequenas quantidades. Esta classificação não significa que os macronutrientes são mais essenciais do que os micronutrientes, mas, que são apenas necessários em maior quantidade.

Enquanto os micronutrientes são predominantemente constituintes de moléculas enzimáticas, os macronutrientes fazem parte da composição de compostos orgânicos, tais como as proteínas e os ácidos nucléicos, além de regular por osmose as membranas celulares (Marschner, 1995).

Tabela 2. Elementos essências às plantas.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Carbono	(C)	Boro	(B)
Hidrogênio	(H)	Cloro	(Cl)
Oxigênio	(O)	Cobre	(Cu)
Cálcio	(Ca)	Ferro	(Fe)
Magnésio	(Mg)	Manganês	(Mn)
Nitrogênio	(N)	Molibdênio	(Mo)
Fósforo	(P)	Níquel	(Ni)
Potássio	(K)	Zinco	(Zn)
Enxofre	(S)		

Fonte: Jones Jr. et al. (1991)

Embora os elementos Cu, Mn, Fe, Mo, Ni, Zn e B sejam essenciais para várias funções fisiológicas das plantas, serão tidos como tóxicos para os animais, o homem e para as próprias plantas quando em excesso (Fanquin e Fernandes, 2001; Tüzen, 2003).

Há muito tempo que a avaliação do estado nutricional das plantas é usada na experimentação agrícola (Jorge, 1986), pois, mesmo que a análise de solo indique que os níveis de nutrientes disponíveis sejam adequados, não assegura o suprimento para as plantas, uma vez que muitos fatores contribuem para a sua absorção, e é por isso que a avaliação direta do estado nutricional das plantas é necessária para elucidar se os nutrientes foram absorvidos na proporção e quantidade adequadas (Raij, 1991).

O teor mineral de plantas como critério para diagnosticar o seu estado nutricional, segundo Jorge (1986) parece ter sido utilizado pela primeira vez em 1903, embora as primeiras contribuições importantes tenham surgido depois de 1930 com os trabalhos dos pesquisadores H. Lagatu e L. Maume (Malavolta, 1980).

A utilização da análise de tecido vegetal como critério de diagnóstico baseia-se na premissa de existir uma relação significativa entre o suprimento de nutrientes no solo (ou adubo) e os níveis desses nutrientes na planta, e

que, por sua vez, o aumento ou a diminuição na quantidade dos nutrientes se relaciona com produções maiores ou menores respectivamente (Munson e Nelson, 1990; Raij, 1991; Malavolta et al., 1997).

Miyazawa et al. (1992) destacam algumas aplicações da análise de plantas em estudos agronômicos:

1. Diagnosticar deficiências ou excessos de nutrientes não identificados visualmente;
2. Confirmar sintomas visuais observados no campo;
3. Localizar áreas que apresentam suprimento marginal de nutrientes;
4. Identificar a assimilação de um determinado nutriente pela planta;
5. Identificar interações e antagonismos entre nutrientes;
6. Identificar a mobilidade, a redistribuição, a flutuação estacional e o local de armazenamento de um determinado nutriente;
7. Indicar a necessidade de uma análise complementar do solo para identificar a causa específica de um problema nutricional;
8. Complementar a análise de solo em programa de aplicação de fertilizantes e corretivos.

A avaliação do estado nutricional das plantas é um método relativo, isto é, os resultados analíticos de cada nutriente, são comparados com valores-padrão previamente tabelados, resultantes de muita experimentação (Fageria, 1989; Malavolta et al., 1997).

Os sistemas ou critérios de interpretação conhecidos como níveis críticos (Tabela 3) e faixas de suficiência (Tabelas 4 e 5) fundamentam-se no estabelecimento de valores-padrão, admitindo que nutrientes, cuja concentração seja inferior a esses limites, provavelmente estejam limitando o crescimento, o rendimento ou a qualidade dos frutos (Texeira et al., 2002).

Após a realização da interpretação da análise foliar, através da comparação com os valores críticos ou faixas de suficiência da cultura em estudo, é possível avaliar se cada nutriente está em nível adequado. As etapas seguintes são destinadas a determinar a causa da deficiência, como é possível corrigi-la e o que é necessário para evitá-la nas próximas

colheitas (Jones Jr. et al., 1991).

Tabela 3. Níveis críticos para algumas cultivares.

Cultura	Macronutrientes (g kg^{-1})						Micronutrientes (mg kg^{-1})				
	N	P	K	S	Ca	Mg	B	Zn	Cu	Mn	Fe
Abacaxi	15	1,2	30	-	5	3	-	-	-	-	-
Arroz	30	1,2	20	-	6	3	30	20	-	15	-
Banana	26	2,2	28	2	6	3	-	-	15	20	8
Café	30	1,2	18	2	10	3,5	40	10	6	50	70
Citros	22	1,2	10	2	30	3	50	25	6	25	60
Coco	17	1	5	-	5	3	-	-	-	-	-
Feijão	30	3	20	2	25	5	20	30	10	75	-
Milho	20	2,2	20	2	4,5	2,5	20	20	9	-	-
Tomate	40	4	38	-	20	5	100	50	20	100	150

Fonte: Raij (1991)

Tabela 4. Faixas adequadas de macronutrientes para algumas cultivares.

Cultura	Macronutrientes (g kg^{-1})					
	N	P	K	S	Ca	Mg
Abacaxi	15-17	0,8-1,2	22-30	-	8-12	3-4
Arroz	27-35	1,8-3,0	13-30	1,4-3,0	2,5-10	1,5-5,0
Banana	27-36	1,8-2,7	35-54	2,5-8,0	3-12	3-6
Café	26-32	1,2-2,0	18-25	1,5-2,0	10-15	3,0-5,0
Citros	23-27	1,2-1,6	10-15	2,0-3,0	35-45	2,5-4,0
Feijão	30-50	2,5-4,0	20-24	2,0-3,0	10-25	2,5-5,0
Leucena	20-48	1,5-3,0	13-30	1,5-3,0	5-20	2,0-4,0
Milho	27-35	2,0-4,0	17-35	1,5-3,0	2,5-8,0	1,5-5,0
Tomate	40-60	4-8	30-50	3-10	14-40	4-8

Fonte: Silva (1999)

Tabela 5. Faixas adequadas de micronutrientes para algumas cultivares.

Cultura	Micronutrientes / g kg^{-1}					
	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
Abacaxi	20-40	5-10	100-200	50-200	-	5-15
Arroz	4-25	3-25	70-200	70-400	0,1-0,3	10-50
Banana	10-25	6-30	80-360	200-2000	-	20-50
Café	50-80	10-20	50-200	50-200	0,1-0,2	10-20
Citros	36-100	4-10	50-120	35-300	0,1-1,0	25-100
Feijão	15-26	4-20	40-140	15-100	0,5-1,5	18-50
Leucena	25-50	5-12	40-250	40-150	-	20-50
Milho	10-25	6-20	30-350	20-200	0,1-0,2	15-100
Tomate	30-100	5-15	100-300	50-250	0,4-0,8	30-100

Fonte: Silva (1999)

3.3. ANÁLISE QUÍMICA DE PLANTAS

Na avaliação do estado nutricional dos vegetais, os teores totais dos elementos químicos são determinados em partes específicas das plantas.

A folha é, todavia, o órgão da planta normalmente escolhido, pois é nesta que o metabolismo é mais intenso e há um reflexo imediato entre sua composição e a concentração de nutrientes no solo (MacNaeidhe, 1995).

Como a folha é a parte da planta preferida na avaliação do estado nutricional, a análise química de plantas é geralmente denominada de análise foliar.

Como a maioria dos elementos de interesse presentes nas plantas encontra-se como compostos orgânicos ou em uma matriz orgânica (Etchevers e Etchevers, 1980) e as técnicas analíticas empregadas na análise foliar requerem, freqüentemente, que o analito esteja em solução na forma inorgânica mais simples, a eliminação ou a diminuição da matéria orgânica deve ser realizada antes das medidas analíticas (Gouveia et al., 2001).

As técnicas instrumentais mais empregadas na maioria dos laboratórios de análise foliar são a espectrofotometria de absorção atômica em chama (FAAS) para a determinação dos nutrientes metálicos K, Mg, Ca, Cu, Mn, Zn, Fe, Mo e Ni, a espectrofotometria de absorção molecular para determinação dos nutrientes não metálicos como o S, P e B e, com menos freqüência, a espectrofotometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) para a análise de todos os nutrientes determinados pelas duas técnicas anteriores.

Nos procedimentos analíticos que envolvem a eliminação da matriz orgânica, a preparação da amostra é freqüentemente considerada o “Calcanhar de Aquiles” do processo analítico, principalmente devido ao tempo gasto (Nascentes et al., 2001).

De uma maneira geral, a preparação de amostras requer em média 61 % do tempo total necessário para a análise, além de ser responsável por 30 % dos erros do processo analítico (Oliveira, 2003).

A preparação das amostras de folha inclui muitas etapas, igualmente importantes, que permitem, quando bem conduzidas, ao sucesso da análise foliar e à correta interpretação dos resultados analíticos. O esquema desse processo está representado na Figura 1.

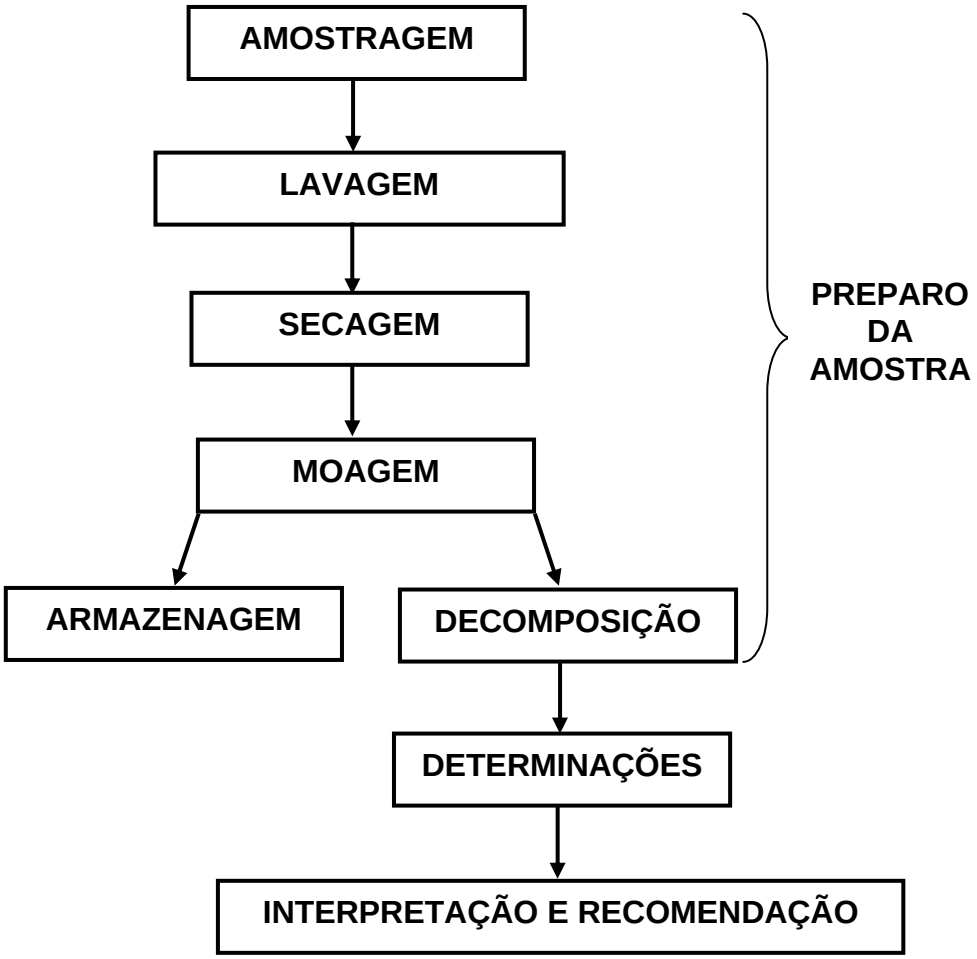


Figura 1. Etapas envolvidas na análise foliar.

3.4. AMOSTRAGEM

O correto diagnóstico do estado nutricional de uma planta depende não só da exata medida dos elementos de interesse, mas também de um rigoroso programa de amostragem (Clément, 1995).

A amostragem é a primeira e uma das mais importantes etapas em um processo analítico, pois tem o objetivo de garantir a representatividade da amostra (Hoenig, 2001).

Obter uma amostra representativa de uma espécie de planta é uma tarefa complexa e exige profissionais bem treinados, com conhecimentos específicos (Jones Jr. e Case, 1990; Silva, 1999).

Como a concentração de nutrientes varia de acordo com a época do ano e a parte da planta a ser amostrada, é necessária a padronização desses parâmetros (Raij, 1991; MacNaeidhe, 1995).

Para fins de levantamento do estado nutricional de uma cultura, a literatura é ampla no que diz respeito a critérios de amostragem. Várias coletâneas especificam, em forma de tabelas, a parte da planta a ser coletada, a sua localização na planta, o seu estágio de crescimento, o número de partes da planta e o número de plantas a serem coletadas. Quando não há informação quanto à forma de amostragem, a regra geral é coletar as folhas maduras superiores (Jones et al, 1991).

Se outros procedimentos de amostragem forem adotados, a interpretação dos resultados de análise foliar será prejudicada, uma vez que os experimentos realizados para estabelecer os valores críticos ou e as faixas de suficiência obedeceram a critérios de amostragem padronizados.

Outros critérios de amostragem podem ser utilizados, desde que não sejam para fins de levantamento do estado nutricional das culturas. Neste caso, o objetivo da pesquisa estabelecerá o critério de amostragem (Silva, 1999).

3.5. LAVAGEM

Após a coleta, a amostra deve ser encaminhada o mais rápido possível ao laboratório para que se realize a sua lavagem, pois a demora pode degradá-la. A lavagem é realizada para remover contaminações da superfície das folhas. Os principais contaminantes são as partículas de solo, defensivos agrícolas (inseticidas e fungicidas) e adubos foliares.

As análises de micronutrientes, especialmente as análises de ferro e alumínio, são as mais afetadas pela contaminação superficial (Etchevers e Etchevers, 1980; Jones et al, 1991).

A lavagem é uma etapa crítica da análise de planta, porque o uso de diferentes tipos de solventes na limpeza de folhas pode dar lugar a resultados analíticos subestimados, uma vez que nutrientes podem ser lixiviados por solventes mais concentrados.

A lavagem com uma solução de detergente neutro 0,1 a 0,3% (v/v) ou com ácidos diluídos e água deionizada tem mostrado ser eficiente. E finalmente a eficiência da lavagem depende da estrutura da planta, ou seja, se a superfície é lisa, rugosa ou possui pêlos (Quevauviller, 1995).

3.6. SECAGEM

Após a lavagem, o tecido da planta deve ser seco o mais rápido possível para preservá-lo da decomposição microbiológica e de alterações químicas (Jones Jr. e Case, 1990; Markert, 1995; Quevauviller, 1995).

Atrasos no processo de secagem podem, por exemplo, ocasionar quebra das proteínas e de ligações simples de nitrogênio, provocando a sua perda pela liberação de amônia (Jones Jr. e Case, 1990).

No processo de secagem, a temperatura deve ser alta o suficiente para destruir as enzimas responsáveis pela decomposição da amostra, e baixa o suficiente para evitar a perda de elementos voláteis de interesse e a decomposição térmica (Quevauviller, 1995).

Na maioria dos casos, os melhores resultados são obtidos secando as amostras em bolsas de papel em uma estufa com circulação de ar forçada e temperatura em torno de 60ºC. O tempo de secagem é finalizado quando se obtém peso constante (Etchevers e Etchevers, 1980).

A secagem a vácuo em temperaturas na faixa de 40 – 50ºC tem provado ser um método eficiente, quando se deseja determinar elementos altamente voláteis (Markert, 1995).

Outros métodos também têm sido utilizados na secagem de amostras de plantas, tais como a liofilização e a secagem rápida em forno de microondas.

Quando não é possível secar a amostra imediatamente, a mesma deve ser mantida sob refrigeração a 4ºC em um refrigerador ou em caixa com gelo.

3.7. MOAGEM E ARMAZENAGEM

A pulverização de amostras é uma das etapas mais importantes quando faz parte de um procedimento analítico, pois geralmente está associada a erros por contaminação ou volatilização de analitos (Markert, 1995).

Para se obter uma amostra homogênea, o material vegetal seco deve ser cominuído em moinho de facas com partes de aço inoxidável, principalmente quando se deseja analisar micronutrientes, pois pode ocorrer contaminação por Cu e Fe.

O tamanho final das partículas depende da massa da alíquota da amostra a ser submetida à mineralização. Quanto menor a massa da alíquota, menor deve ser o tamanho da partícula, pois só dessa maneira é possível garantir a homogeneidade da amostra, a qual é necessária em um processo analítico.

Quando a massa da amostra é maior ou igual a 1 g, partículas menores ou iguais a 1 mm (peneira de 20 mesh) são suficientes, mas para massas inferiores, é recomendado utilizar partículas menores do que 0,5 mm (peneira 40 mesh).

Para evitar contaminação, as peças dos moinhos que entram em contato com a amostra devem ser cuidadosamente limpas com ar comprimido depois de cada pulverização.

A escolha de recipiente para a estocagem do material vegetal seco e moído é particularmente crítica, uma vez que a umidade pode permitir o aparecimento de fungos (Quevauviller, 1995) e, portanto, a degradação da amostra.

Para Markert (1995), amostras estocadas em frascos de plásticos ou de vidro bem vedados e na ausência de luz não apresentam modificação em sua composição química.

3.8. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE PLANTA

A maioria das determinações analíticas em matrizes orgânicas requer a eliminação total da matéria orgânica ou que sua quantidade em solução seja mínima (Oliveira, 2003; Capelo-Martínez et al., 2004).

O método apropriado para a decomposição de uma amostra depende da sua natureza, do elemento de interesse e de sua faixa de concentração, do grau de recuperação aceitável, da técnica de determinação e da precisão e da exatidão desejadas.

Na decomposição, a amostra é convertida para uma forma em que o elemento de interesse (analito) possa ser adequadamente quantificado.

Como é necessário que as plantas sejam analisadas em seus teores totais quando se deseja realizar o diagnóstico de deficiências nutricionais (Masson, 1999) ou para fins ambientais, o tecido vegetal deve ser solubilizado, ou seja, a matéria orgânica é destruída e os nutrientes são determinados em solução.

Nenhuma outra etapa da preparação de amostras de planta provoca mais controvérsia do que a etapa de mineralização, no que diz respeito ao melhor procedimento de destruição da matéria orgânica (Anzano et al., 2000).

As técnicas mais empregadas na decomposição de amostras de planta são as baseados nas digestões por via seca e por via úmida, em sistema aberto ou fechado, e por via úmida assistida por microondas em sistema fechado ou aberto (Bock, 1979; Anzano et al., 2000; Christie et al., 1989; Hoenig e Kersabiec, 1996; Rodushkin et al. 1999; Borkowska-Burnecka, 2000; Tüzen, 2003).

3.8.1. Digestão por via seca

Dentre as técnicas empregadas na mineralização de amostras de tecido vegetal, a digestão por via seca é a mais simples, baseando-se na destruição da matéria orgânica em uma mufla elétrica na presença do oxigênio do ar, obtendo-se um resíduo inorgânico, na forma de cinza, que é solubilizado em ácido apropriado, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos (Hoenig, 2001; Capelo-Martínez et al., 2004).

O oxigênio atmosférico funciona como comburente e o resíduo formado consiste, entre outros, de óxidos de metais, sulfatos não voláteis, fosfatos e silicatos.

Os principais inconvenientes desta técnica são: as perdas possíveis de elementos voláteis, contaminação da amostra por partículas aerotransportadas, sorção irreversível dos analitos na parede dos recipientes e perda dos analitos retidos à sílica.

Na calcinação são empregados recipientes de porcelana, de quartzo, de platina ou béqueres de vidro. No entanto, os cadinhos de porcelana podem liberar alumínio e os béqueres, sódio, potássio e boro (Jones Jr. e Case, 1990).

Segundo Hoenig (1995) a calcinação de amostras de planta opera à pressão atmosférica em temperaturas em torno de 450 ^{o}C, pois essa temperatura é alta o suficiente para destruir a matéria orgânica, enquanto as perdas por volatilização são baixas. No entanto, Almeida et al. (2002), objetivando caracterizar alguns analitos inorgânicos (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) em 10 (dez) plantas medicinais, constataram que a decomposição total das amostras ocorreu entre 580 e 600 ºC, após 10-12 h.

As perdas por volatilização durante a calcinação estão associadas a altas temperaturas. Para temperaturas entre 450 e 550 ºC, são baixas as recuperações dos elementos altamente voláteis como o mercúrio (Hg), selênio (Se) e arsênio (As) (Hoenig et al., 1998; Vassileva et al., 2001).

Hoenig e Kersabiec (1996) afirmam, com relação a estes elementos, que a calcinação é proibida quando estiverem em altos teores na amostra.

Vassileva et al (2001) obtiveram boas recuperações para arsênio (76 a 102 %) e selênio (75 a 102 %) em amostras de plantas terrestres com baixos teores desses elementos (0,09 a 8,9 µg g^{-1}), quando submetidas à calcinação a 450 ºC e eliminação da sílica com o ataque do ácido fluorídrico (HF).

Os mecanismos de perda de elementos voláteis não são somente influenciados pela temperatura máxima de calcinação, mas também pela taxa de aquecimento. Mesmo à temperatura alcançando 520 ^{o}C, desde que seja de forma lenta, não se observa perda dos elementos voláteis Pb, Zn e Cd (Hoenig, 1995).

Outro problema encontrado na calcinação diz respeito às perdas de analitos retidos ao resíduo insolúvel, fenômeno que é fortemente dependente da natureza das espécies químicas presentes na amostra.

A matriz planta, por exemplo, contém alumínio e principalmente silício em concentração que pode chegar a 10 % (Hoenig et al., 1998), e os ácidos clorídrico ou nítrico, geralmente utilizados, não garantem a solubilização dos compostos de sílica e conseqüentemente dos elementos inicialmente associados ou retidos durante a calcinação (Hoenig e Kersabiec, 1996).

A presença de silício e do alumínio na amostra é um fator de risco para a exatidão do método, uma vez que os elementos cádmio, chumbo, cobre, ferro, zinco e manganês podem ser adsorvidos à sílica. Além disso, o alumínio pode ser precipitado na forma de Al_2O_3, diminuindo a sua recuperação (Clément, 1995).

A adsorção à sílica depende do tipo de amostra e do analito, de tal maneira que as incorporações podem alcançar 95% para o Al, 38% para o Fe, 23% para o B, 20% para o Pb, 15% para o Cd, 10% para o Cu, 8% para o Zn, 5% para o Mn e 4% para os elementos Ca e Mg (Hoenig et al., 1998).

Por esta razão, o Comitê Inter-Instituts d'Etudes des Techniques Analytiques (CII) propôs, em 1975, a inclusão do ácido fluorídrico (HF) na oxidação por via seca de materiais biológicos e a volatilização da sílica (Hoenig et al., 1998; Vassileva et al, 2001).

O CII é formado por um grupo de laboratórios responsáveis pela preparação de material de referência de planta, bem como pelo desenvolvimento de metodologias analíticas.

O método proposto pelo CII envolve as seguintes etapas (Hoenig et al., 1998): calcinação do material de planta a 450ºC; a solubilização das cinzas em ácido nítrico ou clorídrico; filtração; secagem do papel de filtro e do resíduo; tratamento com HF seguido pelo aquecimento até secagem e finalmente solubilização do resíduo em ácido nítrico ou clorídrico; mistura das duas soluções obtidas e ajuste do volume para as determinações posteriores. Neste método, somente a etapa de calcinação da amostra vegetal leva 20 h, das quais, 4 h destinam-se ao aumento gradativo de temperatura até 450ºC e as 16 h finais, à manutenção desta temperatura (Hoenig, 2001). No entanto, em alguns trabalhos (Silva, 1999; Almeida et al., 2002; Pugh et al, 2002), o tempo destinado à calcinação de amostras de planta varia entre 8 e 12 horas.

Hoenig (2001) afirma que o método proposto pelo CII não assegura a dissolução dos silicatos e conseqüentemente de todos os elementos associados a eles, pois as amostras de planta possuem um teor variável de sílica, podendo chegar a 10%.

Como os riscos de perdas por volatilização dos elementos mercúrio, selênio e arsênio sempre existiram (Vassileva et al., 2001) e devido aos possíveis erros sistemáticos, não se adota a via seca para a certificação de materiais de planta (Quevauviller, 1995).

Embora a calcinação seja um método laborioso, tedioso, moroso e propício à contaminação externa e a perdas por volatilização (Silva, 1999; Sandroni e Smith, 2002), no Brasil este método é empregado pelos laboratórios de análise do Instituto Agronômico de Campinas (Coscione, 2001), além de ser citado, dentre outros, no manual de análises química de solos, plantas e fertilizantes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa para a análise de Al, B, Ca, Cd, Cl, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si e Zn (Silva, 1999).

A simplicidade de execução, a determinação de vários elementos e a possibilidade de trabalhar com massas superiores a 1g são as principais vantagens do método de calcinação de amostras de tecido vegetal.

3.8.2. Digestão por via úmida

Embora não exista consenso sobre uma metodologia definitiva para a preparação de amostras sólidas, devido à diversidade de materiais, à natureza dos analitos e às diferentes técnicas analíticas de medidas (Garcia, 1992; Chakraborty et al., 1996) há uma tendência para o emprego dos métodos de mineralização por via úmida, sejam estes em sistema aberto ou fechado, sob aquecimento convencional ou sob assistência das microondas (Hoenig, 1996).

No procedimento por via úmida, a mineralização e a dissolução das amostras são garantidas pela ação de ácidos oxidantes ou combinações desses ácidos em várias proporções ou combinações com o peróxido de hidrogênio, sob altas temperaturas (Gouveia et al., 2001; Hoenig, 2001; Vassileva et al., 2001).

Durante o processo de digestão, os ácidos oxidam a matéria orgânica a dióxido de carbono, água e outros compostos voláteis que são eliminados, deixando apenas os sais ou ácidos dos constituintes inorgânicos (Christian, 1994).

A maioria dos processos oxidativos por via úmida em amostras orgânicas, biológicas e botânicas envolve o uso de combinações dos ácidos sulfúrico, nítrico, perclórico e de peróxido de hidrogênio (Etchevers e Etchevers, 1980; Jones et al., 1991; Hoenig, 1995; Krug, 2004).

Segundo Oliveira (2004), quando se deseja realizar uma digestão por via úmida, aspectos do ácido como o seu poder oxidante, o seu ponto de ebulição, a solubilidade dos sais resultantes da mineralização, a segurança na sua manipulação e a sua pureza devem ser considerados.

A digestão por via úmida de amostras de planta pode ser realizada tanto em sistema aberto, quanto em sistema fechado. Os métodos mais comuns de aquecimento empregados nos dois sistemas são: o método clássico, utilizando a energia térmica fornecida por blocos digestores e placas de aquecimento, e o aquecimento através de microondas (energia radiante) geradas por fornos de microondas com cavidade fechada (sistema de digestão por microondas em vaso fechado) e com cavidade aberta (sistema

de digestão por microondas em vaso aberto).

Comparativamente, a digestão por via úmida, tanto em sistema aberto quanto em sistema fechado, sob aquecimento clássico (Wieteska et al., 1996; Gonçalves Jr et al., 2000; Polkowska-Motrenko et al., 2000; Vassileva et al., 2001; Tüzen, 2003) é menos eficiente do que a realizada com aquecimento por microondas, sob pressão atmosférica (Sahuquillo et al., 1999; Nóbrega, 2002) ou sob pressão em vasos fechados (Gouveia et al., 2001; Araújo et al., 2002), pois enquanto a mineralização das amostras por aquecimento térmico leva horas, o aquecimento por microondas necessita de minutos (Kingston e Jassie, 1988; Burguera e Burguera, 1998; Sandroni e Smith, 2002). A diferença de tempo entre as duas formas de aquecimento deve-se ao mecanismo de transferência de energia (Sandroni e Smith, 2002).

No aquecimento promovido pelas microondas (Figura 2a), está energia age como uma radiação não-ionizante que causa, dentro da mistura reacional, rotação de dipolo e movimento iônico, sem modificar a estrutura molecular (Chemat et al.,2004).

No primeiro mecanismo, os dipolos das moléculas, com momento dipolo permanente ou induzido, alinham-se ao campo elétrico que oscilando a alta freqüência, normalmente 2.45 GHz, força as moléculas a moverem-se de forma que a fricção resultante aquece a solução (Kingston e Jassie, 1988; Gfrerer e Lankmayr, 2005).

No mecanismo de condução iônica ocorre uma migração eletroforética dos íons dissolvidos de um lugar para outro em função da polaridade do campo eletromagnético aplicado, e a resistência da solução a este fluxo de íons resulta em fricção e conseqüente aquecimento da solução (Buldini et al, 2002; Gfrerer e Lankmayr, 2005).

Uma característica do aquecimento promovido pelas microondas é que os recipientes de vidro borossilicato, quartzo e PTFE, comumente utilizados e transparentes à radiação microonda, permanecem, durante o processo de decomposição, a uma temperatura sempre inferior à temperatura da mistura reacional. Este fenômeno ocorre porque o aquecimento é de dentro para fora e os recipientes são pobres condutores

de calor.

Todavia, no aquecimento clássico ou condutivo (Figura 2b) as fontes de calor, tais como placa de aquecimento e o bloco digestor, aquecem os recipientes de vidro, quartzo ou PTFE (pobres condutores de calor) que transferem a energia térmica para a camada inferior da amostra, ou seja, a camada da base do recipiente. Devido à diferença de temperatura entre as camadas inferior e superior da amostra, a transferência de calor se dá por convecção, pois a camada inferior, menos densa, se desloca para cima, enquanto a camada superior, mais densa, desloca-se para baixo. Dessa forma, a temperatura da fonte de energia é sempre superior à do recipiente, que é superior a da amostra, ou seja, o fluxo de calor ocorre de fora para dentro por dois mecanismos de transferência de energia: condução e convecção.

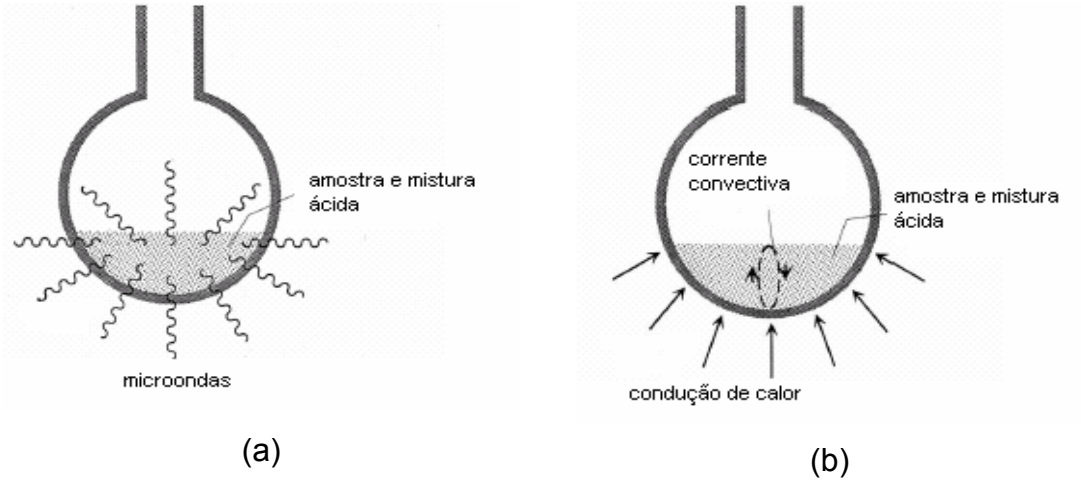


Figura 2. Formas de aquecimento: (a) por microondas e (b) por condução. Fonte: Kingston e Jassie (1988).

Analisando os dois métodos de aquecimento (radiante e condutivo), é possível afirmar que a rotação de dipolos molecular e a condução iônica, fenômenos que ocorrem no aquecimento assistido por microondas, aquecem de forma muito mais rápida e eficiente do que a condução e a convecção que são fenômenos inerentes ao aquecimento convencional.

Além do alto consumo de tempo, de 8 a 12 horas, a digestão de amostra de planta por via úmida em sistema aberto e aquecimento clássico apresenta as seguintes desvantagens (Hoenig, 2001; Oliveira, 2003):

1. Necessidade de grandes quantidades de reagentes;
2. Possibilidade de contaminação externa;
3. Perdas por volatilização;
4. Utilização de reagentes concentrados;
5. Pré-concentração das impurezas dos reagentes;
6. Desprendimento de gases e vapores tóxicos durante toda a etapa de digestão;
7. Necessidade constante de supervisão.

Destacam-se como vantagens deste procedimento:

1. Utilização de massas maiores do que aquelas utilizadas pelos métodos em sistema fechado;
2. Baixo custo de instrumentação;
3. Alta freqüência analítica (40 amostras por digestão).

Os riscos de contaminação externa, de perdas de analitos por volatilização e de liberação de gases e vapores tóxicos são reduzidos quando a digestão é realizada em sistema fechado, mesmo sob aquecimento clássico, além da redução de reagentes de alta pureza e do tempo de digestão, pois é possível neste sistema se trabalhar com temperaturas superiores ao do ponto de ebulição dos reagentes (Krug, 2004).

Com relação à digestão de amostras assistida por microondas, dois modelos são comercializados: o sistema de digestão por microondas em vaso aberto, também conhecido como sistema com microondas focalizadas e o sistema de digestão por microondas em vaso fechado.

No sistema com microondas focalizadas (Figura 3), a amostra, sob pressão atmosférica, é mineralizada em tubos de quartzo, de vidro borossilicato ou de Teflon e a radiação microondas gerada pelo magnetron é focalizada na amostra pelo guia de ondas.

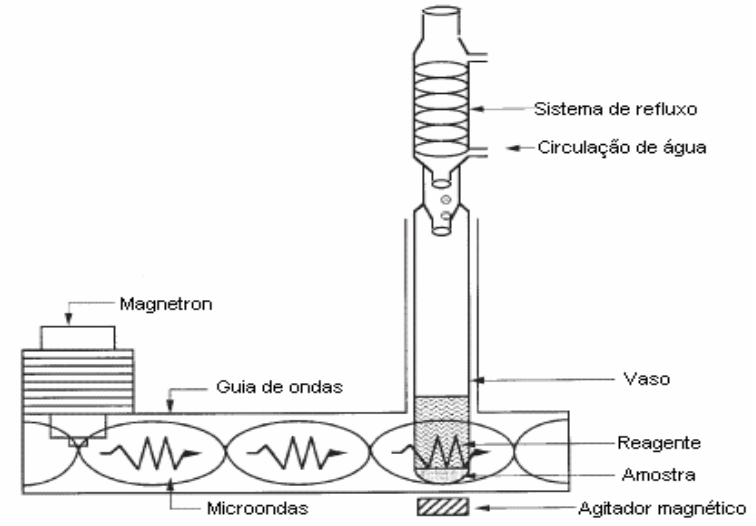


Figura 3. Esquema do forno de microondas focalizadas com uma cavidade e sistema de refluxo. Fonte: Letellier et al. (1999).

Este sistema de digestão apresenta como principais vantagens (Burguera e Burguera, 1998; Hoenig et al., 1998; Nóbrega, 2002; Oliveira, 2003):

1. Maior segurança, pois opera em pressão atmosférica;
2. Permite programar, a qualquer momento, a adição de reagentes durante a digestão, possibilitando o ataque ácido seqüencial;
3. Possibilidade de trabalhar com grandes massas (até 10 g), permitindo concentrar o analito;
4. Cada reator é operado independentemente, devido ao controle autônomo da adição de reagentes e temperatura;
5. Ideal para amostras ricas em matéria orgânica;
6. Mínima contaminação externa e perda por volatilização, pois os vasos são adequadamente fechados à pressão atmosférica;
7. Possibilidade de automatização total.

As principais limitações dos fornos de microondas focalizados são atribuídas à necessidade de grandes quantidades de ácidos e a exigência de ácido sulfúrico (330ºC) para alcançar elevadas temperaturas, uma vez que a operação se dá sob pressão atmosférica (Santos et al., 2005).

Nos de fornos de microondas com vasos fechados (Figura 4), as

microondas geradas pelo magnetron se propagam pelo guia de onda até a cavidade, onde são refletidas e espalhadas homogeneamente por um refletor rotatório, atingindo as amostras que estão em bombas de digestão fixadas em um rotor.

A digestão em vasos fechados assistida por microondas se beneficia tanto do aquecimento rápido, promovido pelas microondas, como do efeito sinergético das altas temperaturas e pressões alcançadas em sistemas fechados (Alvarado et al., 1996; Kubrakova, 1997; Hoenig, 2001).

Luque – Garcia e Luque de Castro (2003) destacam como vantagens da digestão em forno microondas com cavidade fechada: o decréscimo no tempo de digestão, pois altas temperaturas são alcançadas; as perdas de compostos voláteis são evitadas já que não há perda de vapor; menor necessidade de reagentes uma vez que não há saída de vapores; os riscos de contaminação não existem, pois não há necessidade de adições contínuas de reagentes; há pequeno ou nenhum risco de contaminação aerotransportada; os vapores tóxicos produzidos durante a digestão ácida são aprisionados nos vasos, não expondo o analista.

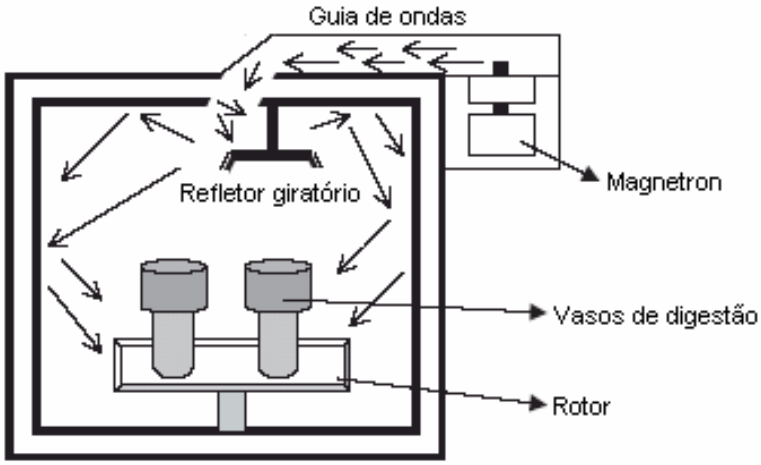


Figura 4. Esquema de forno microondas com vasos fechados. Fonte: Oliveira (2003).

Esta técnica tem sido empregada nos casos em que as altas temperaturas são necessárias para dissolver amostras cujas matrizes são de difícil decomposição, pois neste sistema, a pressão aumenta rapidamente devido à evaporação da mistura ácida e dos gases que evoluem das reações de decomposição e então a temperatura sobe drasticamente acima

do ponto de ebulição atmosférico do ácido (Heltai e Percsich, 1994).

Devido à eficiência e rapidez, laboratórios de todo o mundo têm empregado extensivamente esta técnica para a dissolução de uma variedade de amostras, incluindo amostras geológicas, biológicas, botânicas, alimentícias e ambientais (Kingston e Jassie, 1988; Smith e Arsenault, 1996).

Há um grande número de publicações que lidam com este tópico (Rodushkin et al., 1999; Gouveia et al., 2001; Ivanova et al., 2001; Araújo et al., 2002; Pugh et al., 2002; Chojnacka et al., 2005), e na maioria delas, as condições experimentais adotadas parecem ser essencialmente empíricas

Quando se deseja otimizar a digestão ácida em sistema fechado com assistência das microondas, parâmetros como a massa da amostra, o tipo do ácido, o volume e a concentração dos reagentes, temperatura, pressão, tempo de aquecimento e potência do forno devem ser levados em consideração.

Gouveia et al. (2001) avaliaram o desempenho do ICP-OES na determinação do teor de carbono residual após submeter amostras de fígado bovino, de leite em pó integral, de soja e de materiais de referência certificados de folhas de maçã (NIST- 1515) e de espinafre (1570a) a seis diferentes programas de digestão (potência versus tempo) em forno de microondas com cavidade fechada. Os parâmetros, como massa das amostras, tipos de oxidante (HNO_3 e H_2O_2), concentração e volume dos oxidantes, foram fixados.

Araújo et al. (2002) com o objetivo de determinar a concentração mínima de HNO_3 que garantisse a digestão eficiente de amostras botânicas, fixaram a massa da amostra, o volume dos oxidantes (HNO_3 e H_2O_2 a 30%) e o programa de aquecimento do forno de microondas (potência versus tempo). A medida do teor total de carbono residual foi utilizada como parâmetro de avaliação da eficiência do processo de decomposição, após submeter espécies de forrageira a concentrações crescentes do ácido nítrico (2, 3, 4, 5, 7 e 14 mol L^{-1}).

3.8.3. Agentes oxidantes

Entre os agentes oxidantes, o ácido nítrico concentrado é o mais utilizado na decomposição de amostras orgânicas, biológicas e botânicas, participando da maioria das misturas, pois é um forte agente oxidante, seus sais de nitrato são bastante solúveis, não forma complexo, e é possível obtê-lo com alto grau de pureza (Kingston e Jassie, 1988; Araújo et al., 2002; Krug, 2004).

Para a decomposição de amostras vegetais, o uso apenas do ácido nítrico, sob pressão atmosférica, não é suficiente para a completa decomposição da matéria orgânica, devido ao seu baixo ponto de ebulição em sistema aberto (120°C), pois a decomposição por este ácido dos três constituintes básicos de tecidos biológicos e vegetais (carboidratos, proteínas e lipídeos) requer temperaturas entre 140ºC e 170ºC (Krug, 2004). Por isso que outros agentes oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio e os ácidos perclórico e sulfúrico, são misturados ao ácido nítrico para aumentar o ponto de ebulição da mistura, possibilitando destruir a matriz orgânica.

Uma característica importante do ácido nítrico é que seu potencial de oxidação é diretamente proporcional ao aumento de temperatura, ou seja, a eficiência do processo de decomposição da matéria orgânica depende da temperatura.

Enquanto que em sistemas abertos (sob pressão atmosférica), a temperatura máxima do azeótropo do ácido nítrico com a água é 120ºC, em sistemas fechados é possível alcançar temperaturas em torno de 300ºC. O sistema fechado permite, portanto, trabalhar acima do ponto de ebulição do ácido, aumentando dessa forma a velocidade de decomposição e diminuindo drasticamente o tempo de digestão das amostras.

As temperaturas de 140, de 150 e de 170ºC, necessárias respectivamente para a decomposição de carboidratos, proteínas e lipídios, são facilmente alcançadas em sistema fechado, utilizando somente ácido nítrico.

Observa-se que as altas pressões e temperaturas alcançadas em vasos fechados sob ação das microondas viabilizam, inclusive, a utilização

de ácido nítrico diluído em procedimentos de digestão de amostras de planta, pois as altas temperaturas promovem uma destruição mais completa da matriz da amostra (Zhou et al., 1996; Araújo et al., 2002).

A utilização de ácido diluído em processos de digestão é particularmente atraente, uma vez que minimiza os resíduos, diminui os custos, decrescem os valores dos brancos e melhora a introdução das amostras digeridas durante a determinação analítica, quando sistemas de nebulização são usados.

Dentre os ácidos usados em combinação com o ácido nítrico, o ácido sulfúrico é o que apresenta o maior ponto de ebulição, aproximadamente 330°C, o que lhe permite destruir completamente quase todos os compostos orgânicos.

No entanto, não são recomendadas misturas com ácido sulfúrico para decomposição de amostras de tecido vegetal que apresentem elevados teores de cálcio, pois o sulfato de cálcio formado é relativamente insolúvel, reduzindo o teor de cálcio em solução e de outros elementos por co-precipitação (Kingston e Jassie,1988; Jones et al.,1991; Hoenig, 1995).

Além disso, devido a suas propriedades físicas, a presença do ácido sulfúrico é indesejada em soluções, em cujas técnicas analíticas de determinação (FAAS e ICP-OES) utilizam nebulizadores como mecanismos de introdução de amostras, pois interferências físicas podem ocorrer devido a mudanças na formação e transporte do aerossol, quando há diferenças de densidade, de viscosidade e de tensão superficial entre as amostras e as soluções padrão (Todoli e Mermet, 1999; Hoenig et al., 2001).

Gouveia et al. (2001), avaliando o desempenho das configurações radial e axial do ICP-OES na determinação do teor de carbono residual em amostras biológicas, alimentícias e botânicas após processo de decomposição, verificaram preliminarmente que o ácido sulfúrico, ao contrário do ácido nítrico ou da mistura de ácido nítrico e do peróxido de hidrogênio, causava um decréscimo pronunciado da intensidade de emissão do carbono para as duas configurações avaliadas. Para os autores, a diminuição de intensidade observada se deve provavelmente à alta viscosidade do ácido sulfúrico que interfere na eficiência do transporte do

digerido para a tocha.

Outro agente oxidante bastante utilizado com ácido nítrico é o ácido perclórico, constituindo uma solução denominada nítrico-perclórica. Este ácido que forma com a água uma mistura azeotrópica com temperatura de ebulição aproximadamente 203°C, quando concentrado e a quente é um poderoso oxidante, decompondo completamente a matéria orgânica (Etchevers e Etchevers, 1980; Kingston e Jassie,1988; Jones et al.,1991;). Por outro lado, a sua utilização exige extrema precaução com a segurança, uma vez que é potencialmente perigoso durante a digestão de materiais biológicos (Hseu, 2004), quando concentrado e mantido aquecido (Etchevers e Etchevers, 1980).

Além de agir como agente oxidante, a presença de ácido nítrico em quantidade adequada na mistura nítrico-perclórica é uma maneira de reduzir a probabilidade de explosões (Bock, 1979; Etchevers e Etchevers,1980).

Silva (1999) afirma que a digestão com a mistura HNO_3 + $HClO_4$ (3:1), realizada em bloco digestor com controle de temperatura, é a mais utilizada para a mineralização da matéria orgânica em amostras de tecido vegetal. Isto se deve ao baixo custo instrumental e à alta freqüência analítica, pois os blocos comercializados permitem processar até 40 amostras.

A mistura de ácido nítrico com peróxido de hidrogênio é utilizada principalmente em amostras com alto teor de carbono, situação em que o ácido perclórico deve ser evitado.

O emprego do peróxido de hidrogênio em misturas com ácidos se deve ao seu alto poder oxidante, aos seus produtos de decomposição atóxicos (água e oxigênio) e ao seu elevado grau de pureza, resultando em brancos mais baixos. Além disso, a adição desse reagente contribui para a diminuição de resíduo sólido e do teor de carbono residual das amostras digeridas (Veschetti et al., 2000).

Geralmente, o peróxido de hidrogênio é imprescindível em procedimentos que utilizam volumes pequenos de ácidos concentrados ou soluções diluídas de ácidos, pois funciona como um agente oxidante auxiliar.

Alguns autores empregam o ácido fluorídrico (HF), que é um ácido não oxidante, combinado aos ácidos oxidantes para a decomposição por via

úmida, em sistema aberto, de amostras de planta, como forma de garantir a solubilização de todos os elementos, pois o silício, que está presente nestas amostras entre 0,3% a 10,3%, pode formar compostos estáveis e insolúveis com os elementos Cu, Zn, Fe, Mn e Al (Kingston e Jassie,1988; Hoenig e Kersabiec, 1996; Hoenig et al., 1998; Polkowska-Motrenko et. al, 2000).

Hoenig et al. (1998) com o objetivo de validar dois métodos de digestão por via úmida para amostras de planta, sob pressão atmosférica, e utilizando dois sistemas de aquecimento (sistema clássico e as microondas focalizadas), verificou que a adição do HF à mistura HNO_3/H_2O_2 melhorou as recuperações dos elementos Al, Fe, Ca, Mg e Ni, as quais eram, sem o referido ácido, 65, 87, 90, 90 e 80%, respectivamente. Para estes autores, os elementos afetados e a amplitude das perdas estão associados somente ao tipo de amostra, e que na prática a eficiência dos procedimentos estudados depende da composição da matriz das amostras de planta.

Durante a digestão, o ácido fluorídrico reage com os materiais à base de sílica, convertendo os silicatos em SiF_4 que é volatilizado, liberando dessa forma os analitos associados à sílica.

Há divergências com relação à necessidade ou não de HF na mistura reacional em procedimentos de digestão de amostras de plantas em sistema fechado com assistência das microondas.

Enquanto alguns trabalhos utilizaram HF para melhorar a recuperação de alguns analitos (Kubrakova, 1997; Mierzwa et al., 1998; Polkowska-Motrenko et al., 2000), outros trabalhos apresentaram excelentes recuperações com somente ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) (Rodushkin et al., 1999; Anzano et al., 2000; Gouveia et al., 2001; Ivanova et al., 2001; Araújo et al., 2002; Pugh et al., 2002; Chojnacka et al., 2005).

Rodushkin et al. (1999), submetendo 0,5 g do padrão certificado de folha de pêssego, NIST 1547 (o mesmo empregado nesta dissertação), à digestão por 60 minutos em microondas com cavidade fechada e utilizando somente os agentes oxidantes HNO_3 concentrado (5 mL) e H_2O_2 a 30% (0,5 mL), obtiveram as seguintes recuperações: K (100%), Ca (101), Mg (102%), P (104%), S (91%), Al (89%), Fe (97%), Mn (97%), Zn (102%) e Cu (97%).

Neste mesmo trabalho, um outro método, agora em sistema aberto e utilizando somente HNO_3 concentrado, levou a recuperações menores do que às obtidas em sistema fechado para os analitos Al (54%) e Fe (89%). Segundo os autores, é possível que a causa das recuperações incompletas, para a digestão em sistema aberto, seja a presença de silício no material de referência, pois o reagente utilizado não possibilita a dissolução completa dos silicatos. Além disso, os referidos autores justificam as melhores recuperações em sistema fechado devido ao forte ataque oxidante (HNO_3 e H_2O_2) em altas temperatura e pressão.

Araújo et al. (2002) obtiveram, também sem a presença de ácido fluorídrico, recuperações entre 95 e100% dos elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn em material padrão de referência NIST 1570a (folha de espinafre) e recuperações entre 87 e 116% em material padrão de referência NIST 8433 (farelo de trigo), utilizando como mistura oxidante, 2 mL de HNO_3 2 mol mL^{-1} e 1 mL de H_2O_2 30% (v/v) em forno de microondas fechado para uma massa de 250 mg de amostra.

Zhou et al. (1996), utilizando também ácido nítrico 14% (v/v) e sem a adição de ácido fluorídrico na digestão do material padrão de referência NIST 1515 (folhas de maçã), alcançaram recuperações entre 96 e 103% para os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni e Zn.

Alguns cuidados, no entanto, devem ser tomados quando se usa o ácido fluorídrico. As vidrarias devem ser evitadas, pois a sílica presente nestes materiais pode ser atacada, sendo necessária à utilização de recipientes de politetrafluoretileno (PTFE) ou de outros materiais plásticos (Hoenig, 2001); além disso, a sua manipulação exige cuidados redobrados, uma vez que este ácido provoca queimaduras sérias na pele de difícil cicratização (Oliveira, 2003).

Para Quevauviller (1995), devido aos riscos inerentes à utilização do ácido fluorídrico na digestão de amostras de planta, novos métodos devem ser desenvolvidos e validados como uma alternativa.

3.9. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Como na maioria dos processos analíticos, muitas variáveis estão envolvidas na resposta de uma outra variável de interesse (Araújo e Brereton, 1996a; Lundstedt et al., 1998; Neto et al., 2003), é imprescindível para qualquer área de pesquisa conhecer, de modo a obter conclusões corretas sobre os experimentos, quais variáveis ou fatores são importantes para maximizar a resposta do processo estudado (Miller e Miller, 1993; Calado e Montgomery, 2003). O método que pretende alcançar níveis ótimos dos fatores para uma determinada resposta é conhecido por otimização (Miller e Miller, 1993).

Na maioria dos procedimentos analíticos, os experimentos são otimizados de maneira univariada, alterando uma variável de cada vez, enquanto as demais permanecem constantes. Embora este método clássico e empírico seja considerado de fácil interpretação, caracteriza-se por ser uma estratégia ineficiente, laboriosa e não econômica, pois não fornece qualquer informação sobre os pontos ótimos, requer um número elevado de experimento, consome grandes quantidades de reagentes, além de ignorar as interações entre as variáveis que influenciam a resposta analítica (Ferreira et al., 2002; Kincl et al., 2005).

Todavia, os planejamentos estatísticos de experimentos (técnicas multivariadas) é a forma mais eficiente de otimização de fatores, pois permitem a otimização simultânea de mais de uma variável, de forma mais rápida, econômica e efetiva do que a técnica univariada (Letellier et al., 1999; Castro e Baccan, 2005).

Por exemplo, na digestão ácida de amostras de tecido vegetal por via úmida e em sistema aberto com aquecimento clássico, a massa da amostra, o tipo do ácido, o volume dos reagentes, a concentração dos reagentes, a temperatura de aquecimento e o tempo são variáveis que influenciam na eficiência da decomposição da matéria orgânica. Para as digestões em sistemas fechados, além das variáveis listadas, a variável pressão e potência (em forno microondas) devem ser incluídas. Quando se busca otimizar processos de digestões, as variáveis escolhidas (variáveis independentes),

após o processo de otimização, devem assumir valores tais (ótimos) que permitam como prováveis respostas (variável dependente): altas recuperações dos analitos, baixo teor de carbono orgânico residual e baixa acidez residual dos digeridos.

Segundo Lundstedt et al. (1998), a relação entre a resposta de um experimento e as variáveis experimentais pode ser descrita por meio de uma função y = f(x).

Esta função aproxima-se de uma função polinomial e representa uma boa descrição da relação entre as variáveis experimentais e a resposta.

Três tipos de modelos polinomiais podem ser utilizados e exemplificados para duas variáveis: x_1 e x_2.

O modelo polinomial mais simples contém apenas termos lineares e descreve somente a relação linear entre as variáveis experimentais e a resposta. No modelo linear, a função é expressa para as duas variáveis da seguinte forma:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \text{resíduo}$$

O próximo nível de modelos polinomiais contém termos adicionais que descrevem as interações entre as diferentes variáveis experimentais. Então, o modelo é descrito da seguinte forma:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \text{resíduo}$$

Os dois modelos descritos anteriormente são bastante utilizados na investigação de sistemas experimentais, como por exemplo: em estudos preliminares, testes de robustez e outros similares.

Para a determinação de um ótimo (máximo ou mínimo) através de funções polinomiais, termos quadráticos devem ser introduzidos no modelo:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \text{resíduo}$$

Para os três polinômios descritos anteriormente, b_0 é o termo independente, b_1 e b_2 são coeficientes dos termos lineares, b_{11} e b_{22} são os coeficientes dos termos quadráticos e b_{12} e o coeficiente do termo de interação. Todos estes parâmetros não são conhecidos e devem ser determinados para cada experimento. O resíduo é a diferença entre o valor calculado e a resposta experimental.

3.9.1. Planejamento fatorial completo

O planejamento fatorial é uma estratégia multivariada simultânea bastante empregada quando se deseja determinar a influência de uma ou mais variáveis (variável independente) sobre uma outra variável de interesse (resposta ou variável dependente).

Esta estratégia permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se, assim, uma análise de uma variável sujeita a todas as combinações das demais.

Entretanto, o modelo matemático que representa o planejamento fatorial completo não permite indicar os valores ótimos dos fatores ou variáveis independentes para uma determinada resposta analítica (Bosque-Sendra et al, 2000), pois nestes planejamentos os fatores são estudados preferencialmente em dois níveis, e planejamentos em dois níveis descrevem somente linhas e não curvas. Quando as medidas são realizadas em três ou mais níveis, curvas são obtidas e neste caso, o ponto ótimo pode ser calculado (Massumi et al., 2002).

Calado e Montgomery (2003) afirmam que o planejamento fatorial é a única maneira estatística de prever as significâncias dos efeitos de todas as varáveis experimentais (efeitos principais) e dos efeitos das interações na resposta ou respostas investigadas.

Dessa forma, o planejamento fatorial se constitui em uma poderosa ferramenta utilizada pelos pesquisadores para determinar quais variáveis exercem maior influência no desempenho de um dado processo, conduzindo à redução do tempo e do custo operacional, além da melhoria do rendimento.

O planejamento fatorial vem sendo freqüentemente empregado na

otimização de muitos processos químicos, tais como: otimização de sistemas de pré-concentração de metais em amostra de água do mar e bebidas (Ferreira et al., 2002; Castro e Baccan, 2005; Cerutti et al., 2004a; Cerutti et al., 2004b), otimização de parâmetros instrumentais (Amaro e Ferreira, 2004), otimização do fluxo e das condições químicas em sistemas de injeção em fluxo (Cruz, 1995), otimização da extração assistida por microondas para determinação de pesticidas (Gfrerer e Lankmayer, 2005), otimização de digestão ácida, assistida por microondas em amostras de planta para determinação de nitrogênio (Korn et al., 2005).

O número de experimentos no planejamento fatorial completo é calculado através da expressão n^k, onde n é o número de níveis dos fatores e k é o número de fatores. No entanto, este planejamento é mais aplicado para dois níveis, pois a depender do número de fatores, a quantidade de experimentos necessários aumentaria excessivamente, tornando o planejamento trabalhoso e ineficiente.

Os dois níveis das variáveis são chamados de inferior ou mínimo e superior ou máximo, sendo representados no planejamento, por convenção, pelos códigos (-) ou (-1) e (+) ou (+1), respectivamente. Os códigos -1 e +1 correspondem aos limites do intervalo de variação de cada variável (Letellier et al., 1999). O nível zero (0), ou ponto central, pode também ser incluído e representa os valores médios das variáveis. A inclusão do nível zero em replicata é necessária para verificar se há relações não lineares no intervalo estudado e para estimar o erro experimental sem a necessidade de replicata de todo o planejamento. Na Tabela 6 está representado um exemplo da seleção de três fatores e seus respectivos níveis (mínimo, máximo e central) com valores reais e codificados. Na Tabela 7, os planejamentos fatoriais completos para 2 e 3 variáveis experimentais são mostrados.

Tabela 6. Seleção dos fatores e de seus níveis em um processo de digestão ácida de amostras de planta.

Fatores	Mínimo	Central	Máximo
Temperatura final (ºC)	180 (-1)	200 (0)	220 (+1)
Concentração do ácido (mol L^{-1})	2,0 (-1)	4,0 (0)	6,0 (+1)
Tempo final (min)	5 (-1)	7,5 (0)	10 (+1)

Tabela 7. Planejamentos fatoriais completos para duas e três variáveis.

Duas variáveis				Três variáveis				
Nº Exp.	**Variáveis**		**Resposta**	**Nº Exp.**	**Variáveis**			**Resposta**
	x_1	x_2			x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	y1	**1**	-1	-1	-1	y1
2	+1	-1	y2	**2**	+1	-1	-1	y2
3	-1	+1	y3	**3**	-1	+1	-1	y3
4	+1	+1	y4	**4**	+1	+1	-1	y4
5	0	0	y5	**5**	-1	-1	+1	y5
6	0	0	y6	**6**	+1	-1	+1	y6
				7	-1	+1	+1	Y7
				8	+1	+1	+1	Y8
				9	0	0	0	Y9
				10	0	0	0	Y10

Mesmo trabalhando com dois níveis, o planejamento fatorial completo não é adequado quando um número grande de fatores é investigado, uma vez que aumentaria drasticamente a quantidade de experimentos. Tal situação pode ser contornada utilizando o planejamento fatorial fracionário, no qual as interações de 3ª ordem e superiores são ignoradas, pois seus efeitos não são significativos.

A análise de variância (ANOVA), após a execução dos experimentos do planejamento fatorial, indica se os efeitos das variáveis e das suas interações sobre a resposta são estatisticamente significativos ou relevantes. Esta avaliação estatística pode ser feita através de programas estatísticos, como o por exemplo o Solftware comercial Statistica 6.0 da empresa Statsolft South América, utilizado nesta dissertação.

A interpretação do planejamento fatorial completo também pode ser realizada através do diagrama de Pareto, o qual mostra claramente, através de retângulos horizontais, quais são os efeitos mais relevantes na resposta analítica. Neste diagrama os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (p=0,05) devem ser considerados no modelo matemático, ou seja, são estatisticamente significativos para a resposta analítica em um intervalo de confiança de 95%.

Como estratégia de otimização, somente os fatores estatisticamente significativos são empregados nos modelos de superfícies de repostas que determinam os valores ótimos (mínimos, máximos ou pontos de sela) destes

fatores para a obtenção da melhor resposta.

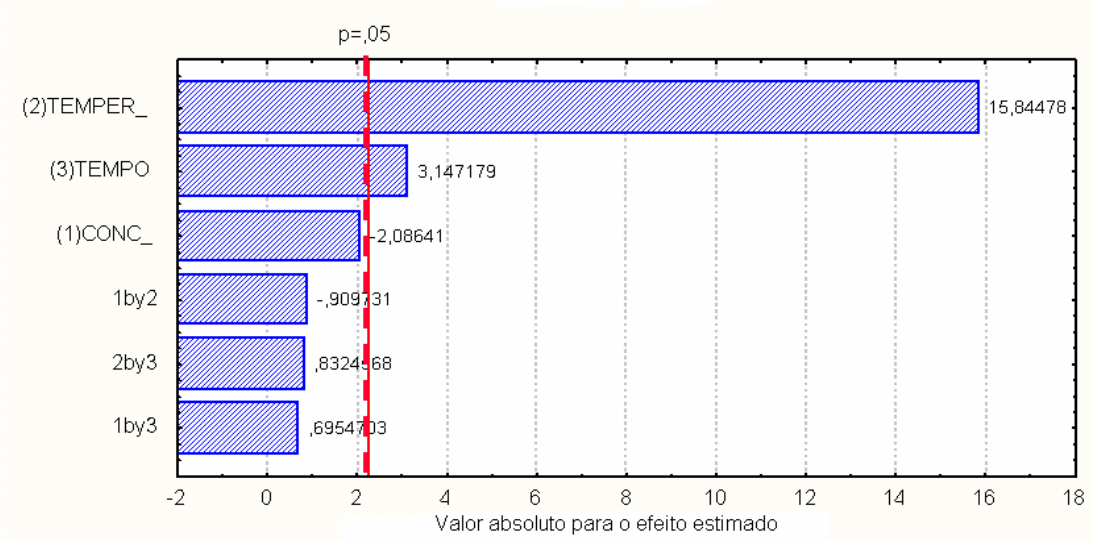


Figura 5. Diagrama de Pareto para as variáveis concentração do ácido, temperatura final e tempo final, relativo à digestão de amostras de planta.

Analisando o diagrama de Pareto (Figura 5), conclui-se que a temperatura e o tempo são variáveis estatisticamente significativas para um limite de confiança de 95% e que a resposta analítica, dentro do domínio experimental estudado, é mais eficiente quando os valores destas duas variáveis aumentam, como revelam os sinais positivos relacionados a estes efeitos, 15,84 para a temperatura e 3,15 para o tempo.

Considerando ainda o diagrama de Pareto, verifica-se que a variável concentração e suas interações não mostraram relevância estatística para o domínio experimental estudado, e dessa forma é possível empregar a menor concentração estudada (ou seu ponto central) para a realização do processo de digestão.

No entanto, as variáveis estatisticamente significativas, temperatura e tempo, precisam ser otimizadas, ou seja, os seus valores ótimos precisam ser encontrados. Como os planejamentos experimentais com dois níveis para os fatores (planejamento fatorial completo ou fracionário) não permitem localizar seus pontos ótimos, é necessário recorrer a planejamentos que gerem modelos de segunda ordem que empregam mais de dois níveis e dessa forma permitem obter polinômios quadráticos.

Estes pontos ótimos são freqüentemente determinados pela

aplicação de metodologia de superfície de resposta (RSM), tais como o planejamento composto central (Massumi et al., 2002), planejamento Box-Behnken (Gfrerer e Lankmayr, 2005; Kincl et al., 2005) e planejamento ou matriz Doehlert (Ferreira et al., 2002).

3.9.2. Matriz Doehlert

Em 1970, David Hallam Doehlert desenvolveu um planejamento estatístico para experimentação conhecido por planejamento Doehlert, mas somente a partir da década de 90 é que vem crescendo o número de publicações, envolvendo este planejamento na otimização de experimentos.

Este planejamento descreve uma distribuição uniforme dos pontos experimentais ao redor de círculos centrados ou esferas. Para duas variáveis, o desenho Doehlert consiste em um ponto central e seis pontos que formam um hexágono regular em um círculo, conforme Figura 6 (Araújo e Brereton, 1996b).

Na otimização de três variáveis, a distribuição dos pontos experimentais para o planejamento depende da escolha da projeção geométrica de um cubooctaedro (Figura 7a) sobre um plano (Campaña, et al., 1997). Três projeções são possíveis, e, portanto três tipos de planejamento podem ser gerados pelas projeções. Na Figura 7b é representada a projeção de um cubooctaedro (poliedro com faces quadradas e triangulares) centrado em uma base triangular, bem como a distribuição dos pontos experimentais nessa projeção. Em relação aos dois outros planejamentos, um é obtido pela projeção do cubooctaedro centrado em uma face quadrada e o outro pela projeção do cubooctaedro sobre seu vértice.

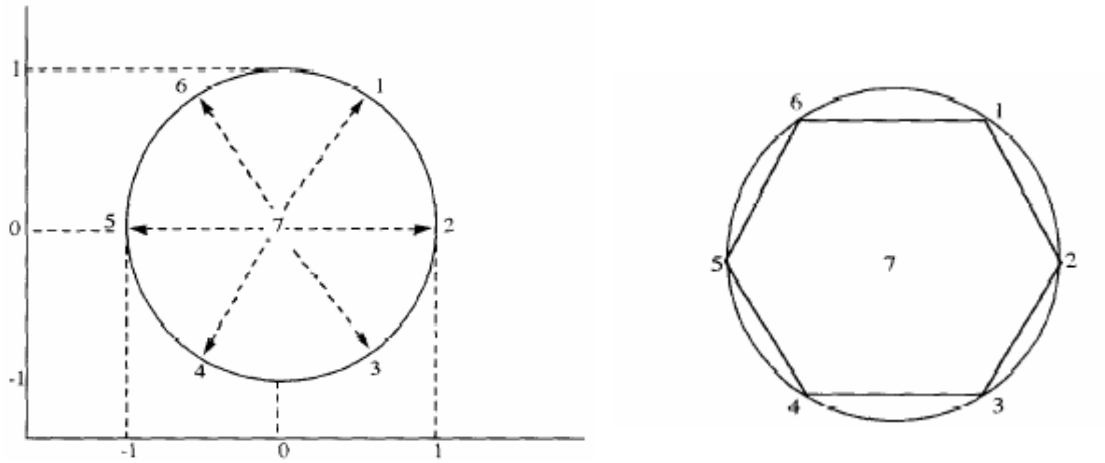


Figura 6. Distribuição dos pontos experimentais para duas variáveis de acordo com a matriz Doehlert. Fonte: Araújo e Brereton, 1996b.

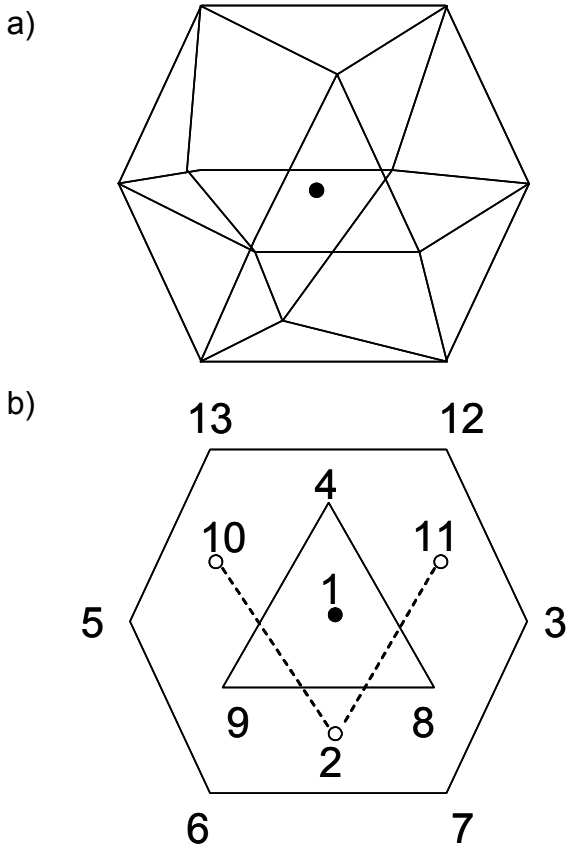


Figura 7. Planejamento Doehlert para três variáveis: a) Desenho tridimensional do Cuboctaedro centrado sobre uma face triangular. b) Distribuição dos pontos experimentais após projeção plana do cuboctaedro sobre a face triangular. Fonte: Campaña, et al., 1997.

Na matriz Doehlert, o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Em um planejamento para duas variáveis (Tabela 8), enquanto uma variável é estudada com cinco níveis, a outra o é somente com três níveis.

Tabela 8. Planejamento matriz Doehlert para duas variáveis com seus valores codificados.

Nº do Experimento	Variáveis experimentais	
	A	B
1	-0.5	0.866
2	0.5	−0.866
3	−0.5	−0.866
4	1	0
5	−1	0
6	0.5	0.866
7	0	0

Para a otimização de três variáveis, três planejamentos experimentais são possíveis: o primeiro, e mais utilizado, é aquele em que as variáveis assumem 3, 5 e 7 níveis (Tabela 9). Para os dois outros, as variáveis assumem somente 3 e 5 níveis.

Tabela 9. Planejamento Doehlert para três variáveis com seus valores codificados.

Nº do Experimento	Variáveis experimentais		
	A	B	C
1	0	0	0
2	0	-0,577	-0,816
3	1	0	0
4	0	0,577	0,816
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	0,5	-0,866	0
8	0,5	0,289	0,816
9	-0,5	0,289	-0,816
10	-0,5	0,289	-0,816
11	0,5	0,289	-0,816
12	0,5	0,866	0
13	-0,5	0,866	0

Como cada planejamento é definido considerando o número de variáveis e os seus valores aparecem de forma codificada na matriz experimental, a relação entre o valor codificado e os valores reais é dada por:

$$C_i = \left(\frac{X_i - X_i^o}{\Delta X_i} \right) \times \alpha$$

onde C_i é o valor codificado para o nível do fator i, X_i é o valor real, X_i^o é o valor real do ponto central do domínio experimental, ΔX_i é o passo de variação (valor central – valor mínimo), α é o valor codificado máximo que a variável assume.

Após a obtenção da equação que relaciona a resposta analítica com as variáveis que afetam estatisticamente o sistema estudado, é aplicado o critério de Lagrange. Este critério, baseado no valor do determinante de Hessian para equações de segunda ordem, objetiva identificar os pontos críticos: máximo (Figura 8a), mínimo (Figura 8b) ou ponto de cela (Figura 8c). O ponto sela corresponde ao ponto onde há o máximo de uma variável e o mínimo de outra

Para uma função de segunda ordem tendo A e B como variáveis (Nechar et al., 1999):

$$R = a + b(\mathbf{A}) + c(\mathbf{B}) + d(\mathbf{A})^2 + e(\mathbf{B})^2 + f(\mathbf{A})(\mathbf{B})$$

Os pontos críticos a_0 e b_0 são obtidos resolvendo-se o sistema de equações:

$\partial R/\partial A = 0$

$\partial R/\partial B = 0$

O valor do determinante de Hessian é dado:

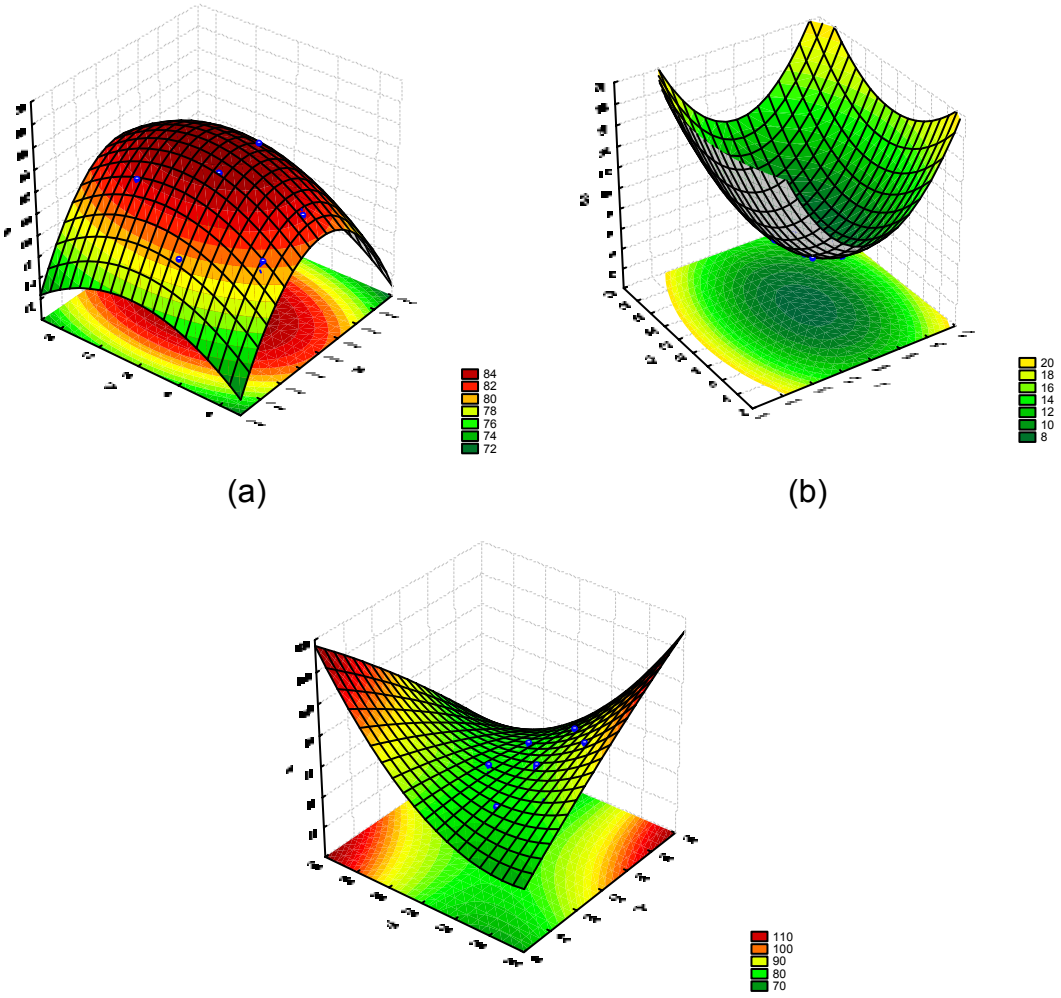
$$H = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} \end{vmatrix}$$

$$H = \left(\frac{\partial^2 R}{\partial A^2} \right) \left(\frac{\partial^2 R}{\partial B^2} \right) - \left(\frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} \right) \left(\frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} \right)$$

Os pontos a_0 e b_0 serão máximos se $H(a_0 \text{ e } b_0) > 0$ e $\partial^2 R/\partial A^2(a_0 \text{ e } b_0) < 0$

Os pontos a_0 e b_0 serão mínimos se $H(a_0 \text{ e } b_0) > 0$ e $\partial^2 R/\partial A^2(a_0 \text{ e } b_0) > 0$

Se $H(a_0 \text{ e } b_0) < 0$ existe um ponto de sela, com máximo e mínimo.



(a) (b)

(c)

Figura 8. Regiões (a) de máximo, (b) de mínimo e (c) de sela.

Para uma função de segunda ordem tendo A, B e C como variáveis:

$$R = a + b(\mathbf{A}) + c(\mathbf{B}) + d(\mathbf{C}) + e(\mathbf{A})^2 + f(\mathbf{B})^2 + g(\mathbf{C})^2 + h(\mathbf{A})(\mathbf{B}) + i(\mathbf{A})(\mathbf{C}) + j(\mathbf{B})(\mathbf{C})$$

Os pontos críticos a_0, b_0 e c_0 são obtidos resolvendo-se o sistema de equações:

$\partial R/\partial A = 0$

$\partial R/\partial B = 0$

$\partial R/\partial C = 0$

Após a aplicação do critério de Lagrange a equação quadrática R, quatro situações são então possíveis:

1. Nenhuma informação é obtida: $\Delta_2 = 0$

2. Existe máximo relativo: $\Delta_1 < 0$; $\Delta_2 > 0$; $\Delta_3 < 0$

3. Existe mínimo relativo: $\Delta_1 > 0$; $\Delta_2 > 0$; $\Delta_3 > 0$

4. ponto de sela: nenhuma situação acima é aplicada

Os valores de Δ_1, Δ_2 e Δ_3 são determinados resolvendo os sistemas:

$$\Delta_1 = \frac{\partial^2 R}{\partial A^2}$$

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} \end{vmatrix}$$

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial B} & \frac{\partial^2 R}{\partial A \partial C} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial B^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial B \partial C} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial C \partial A} & \frac{\partial^2 R}{\partial C \partial B} & \frac{\partial^2 R}{\partial C^2} \end{vmatrix}$$

Os pontos críticos (máximo, mínimo e ponto de cela) e os coeficientes das equações quadráticas são também determinados através de programas estatísticos, como o Solftware comercial Statistica 6.0 da empresa Statsolft South América, utilizado nesta dissertação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. INSTRUMENTOS

1. Balança Analítica digital, marca Mettler, modelo Toledo AB204-5;
2. Analisador Elementar de NCHS-O, marca Flash, modelo EA1112,.
3. Forno de microondas de cavidade fechada com rotor segmentado de média pressão para 10 vasos, dispositivo automático de controle de temperatura em vaso de referência e sensor químico, marca Milestone, modelo ETHUS PLUS T-800,
4. Bloco digestor para até 15 amostras com controle de temperatura, marca Techal, modelo TE007A;
5. Vasos de politetrafluoretileno (PTFE) de volume total de 45 mL com tampas rosqueáveis;
6. Analisador de carbono orgânico total, marca Shimadzu, modelo TOC-5000 A;
7. Espectrofotômetro de Absorção Atômica (E.A.A.), marca Shimadzu, modelo AA-6800, equipado com atomizador por chama e corretor de *backgraund* BGC-D2.
8. Lâmpadas de catodo oco de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn. Os comprimentos de onda (nm) usados nas análises dos metais foram: Ca: 317,9; Cu: 324,8; Fe: 248,3; K: 766,5 ; Mg: 285,2; Mn: 279,5; Zn: 213,9. As determinações do Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn foram feitas em chama ar/acetileno. Todos os ajustes instrumentais foram os recomendados no manual do fabricante.
9. Espetrofotômetro de absorção molecular, marca Femto, modelo 700 plus.

4.2. REAGENTES, PADRÕES, AMOSTRAS E DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Todos os reagentes utilizados foram da marca Merck de grau analítico: HNO_3 65% (v/v); H_2O_2 30% (v/v); $(NH_4)_6MoO_2$; $(NH_4)_2VO_3$.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada (18 MΩ cm, Milipore, USA).

As soluções padrão de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn foram preparadas a partir de soluções estoques de 1mg mL^{-1} (Tritisol ® Merck, Alemanha).

Todas as vidrarias e vasos de PTFE usados pernoitavam em solução de ácido nítrico a 10% (v/v) e em seguida foram enxaguados, no mínimo, três vezes em água ultrapura.

Com relação à limpeza dos vasos de Teflon do forno de microondas, após cada experimento, seguiu-se o procedimento indicado no manual do usuário da Milestone, consistindo em adicionar 5 mL de HNO_3 65% (v/v) em cada vaso, e em seguida executar um programa de aquecimento de 10 min a 650 Watt. Após o resfriamento de 25 min, os vasos foram abertos e enxaguados três vezes com água ultra-pura.

Uma amostra de folha leucena, que é uma leguminosa bastante empregada na alimentação animal, foi utilizada como amostra teste na otimização dos procedimentos de digestão em forno de microondas e em bloco digestor com vasos fechados de PTFE. Esta amostra foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Para a demonstração da exatidão dos dois métodos foram empregados dois materiais de referência certificados, folha de pêssego (NIST 1547, National Institute of Standards & Technology, USA) e folha de chá (GBW 07605, National Research Center for Certified Reference Materials, China).

Os analitos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama ar/acetileno.

O analito P foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular com amarelo-de-vanadato (Silva, 1999).

A determinação do teor total de carbono na amostra de leucena (amostra sólida) foi realiza no analisador elementar.

A determinação do teor total de carbono residual nos digeridos (amostra líquida), durante a etapa de otimização, foi realiza no analisador de carbono orgânico total (TOC).

4.3. PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO

4.3.1. Digestão em forno de microondas

Transferiu-se 500 mg de amostra de folha de leucena para os vasos de teflon do forno de microondas. Em seguida adicionou-se o 2 mL H_2O_2 30% (v/v) e 6 mL de HNO_3 diluído, cuja concentração foi a definida para os planejamentos ou a encontrada após otimização, e deixou-se este sistema em repouso durante 30 minutos para que a amostra fosse completamente umedecida e que houvesse a liberação de gases, evitando um aumento brusco de pressão durante o aquecimento no forno de microondas. Este período de tempo é chamado de digestão fria.

Após a digestão fria, os vasos foram colocados na cavidade do forno de microondas e submetidos aos programas de aquecimento necessários à implementação do planejamento fatorial completo, do planejamento Doehlert e da validação do método otimizado.

Depois da digestão, as soluções das amostras e dos brancos foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e o volume foi completado com água ultra-pura. O teor de carbono orgânico residual nos digeridos foi determinado pelo analisador de carbono orgânico total para posterior cálculo da eficiência (resposta analítica).

4.3.2. Digestão em bloco digestor com vasos fechados de PTFE

Transferiu-se 500 mg de amostra de folha de leucena para os vasos de PTFE. Em seguida adicionou-se o 2 mL H_2O_2 e 6 mL de HNO_3 diluído ,

cuja concentração foi a definida para os planejamentos ou a encontrada após otimização, e deixou-se este sistema em repouso durante 30 minutos para que a amostra fosse completamente umedecida e que houvesse a liberação de gases, evitando um aumento brusco de pressão durante o aquecimento no vasos de PTFE.

Após a digestão fria, os vasos de PTFE foram colocados nas cavidades do bloco digestor e submetidos aos programas de aquecimento necessários à implementação do planejamento fatorial completo, do planejamento Doehlert e da validação do método otimizado.

Depois da digestão, as soluções das amostras e dos brancos foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e o volume foi completado com água ultra-pura. O teor de carbono orgânico residual nos digeridos foi determinado pelo analisador de carbono orgânico total para posterior cálculo da eficiência (resposta analítica).

4.4. ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO

A estratégia utilizada neste trabalho para a otimização dos dois métodos de digestão de amostras de plantas consistiu em realizar um planejamento fatorial completo com o objetivo de verificar quais das variáveis escolhidas foram estatisticamente mais significativas e em seguida submetê-las ao planejamento Doehlert para a otimização final do método. Após a determinação dos valores ótimos das variáveis, a robustez de cada método foi verificada através de um planejamento fatorial completo.

A resposta analítica (variável dependente) empregada no planejamento fatorial e no planejamento Doehlert foi a eficiência de decomposição calculado pela seguinte fórmula:

$E = (\frac{CTL - CTD}{CTL})x100$, onde:

E (%) = Eficiência;

CTL (%) = Percentual de carbono total na amostra de leucena;

CTD (%) = Percentual de carbono total no digerido.

O percentual de carbono total (CTL) encontrado na amostra de folha de leucena e usado em todos os cálculos foi de 44,2 ± 0,6 (n=3).

Considerando todos os experimentos realizados, os percentuais de carbono total no digerido (CTD) variaram, para a digestão em forno de microondas, entre 5,68 e 12,31%, isto é E entre 87,15 e 72,15%, e para a digestão em bloco digestor, o CTD variou entre 4,20 e 13,92%, logo o E variou entre 90,50 e 68,51%.

Todos os dados experimentais foram processados pelo programa STATISTICA 6.0 da StatSoft no módulo “Experimental Design – Central Composite”.

4.5. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM FORNO DE MICROONDAS

As variáveis concentração de ácido nítrico (C), temperatura (TR) e tempo (TP) finais de digestão foram escolhidas para serem otimizadas.

A massa de leucena, o volume ácido nítrico diluído e volume de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) foram fixados em 500 mg, 6mL e 2 mL, respectivamente.

Com o objetivo de verificar quais das variáveis escolhidas (C, TR e TP) influenciam significativamente a resposta analítica, um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado.

As condições experimentais e a matriz gerada pelo planejamento fatorial completo 2^3 estão descritas na Tabela 10.

O programa de aquecimento do forno de microondas, empregado na realização de todos os experimentos do processo de otimização (planejamento fatorial completo, planejamento Doehlert e robustez) está descrito na Tabela 11.

Tabela 10. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3.

EXP.	VARIÁVEIS					
	C		TR		TP	
	Cod.	Molar	Cod.	ºC	Cod.	min
1	(-1)	2	(-1)	180	(-1)	5
2	(+1)	4	(-1)	180	(-1)	5
3	(-1)	2	(+1)	220	(-1)	5
4	(+1)	4	(+1)	220	(-1)	5
5	(-1)	2	(-1)	180	(+1)	10
6	(+1)	4	(-1)	180	(+1)	10
7	(-1)	2	(+1)	220	(+1)	10
8	(+1)	4	(+1)	220	(+1)	10
9	(0)	3	0	200	(0)	7,5
10	(-1)	2	(-1)	180	(-1)	5
11	(+1)	4	(-1)	180	(-1)	5
12	(-1)	2	(+1)	220	(-1)	5
13	(+1)	4	(+1)	220	(-1)	5
14	(-1)	2	(-1)	180	(+1)	10
15	(+1)	4	(-1)	180	(+1)	10
16	(-1)	2	(+1)	220	(+1)	10
17	(+1)	4	(+1)	220	(+1)	10
18	(0)	3	0	200	(0)	7,5

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final.

Tabela 11. Programa de aquecimento do forno de microondas usado durante todo o processo de otimização.

Etapa	Temperatura (ºC)	Tempo (min)
1	TA a 100	4
2	100	4
3	100 a TR	5
4	TR	TP

TA, temperatura ambiente; TR e TP, temperatura e tempo finais, respectivamente.

As etapas do programa de aquecimento do forno de microondas usado durante o processo de otimização estão representadas graficamente nas figuras 9, 10 e 11 para as temperaturas finais 180, 200 e 220ºC e tempos finais de 5; 7,5 e 10 minutos.

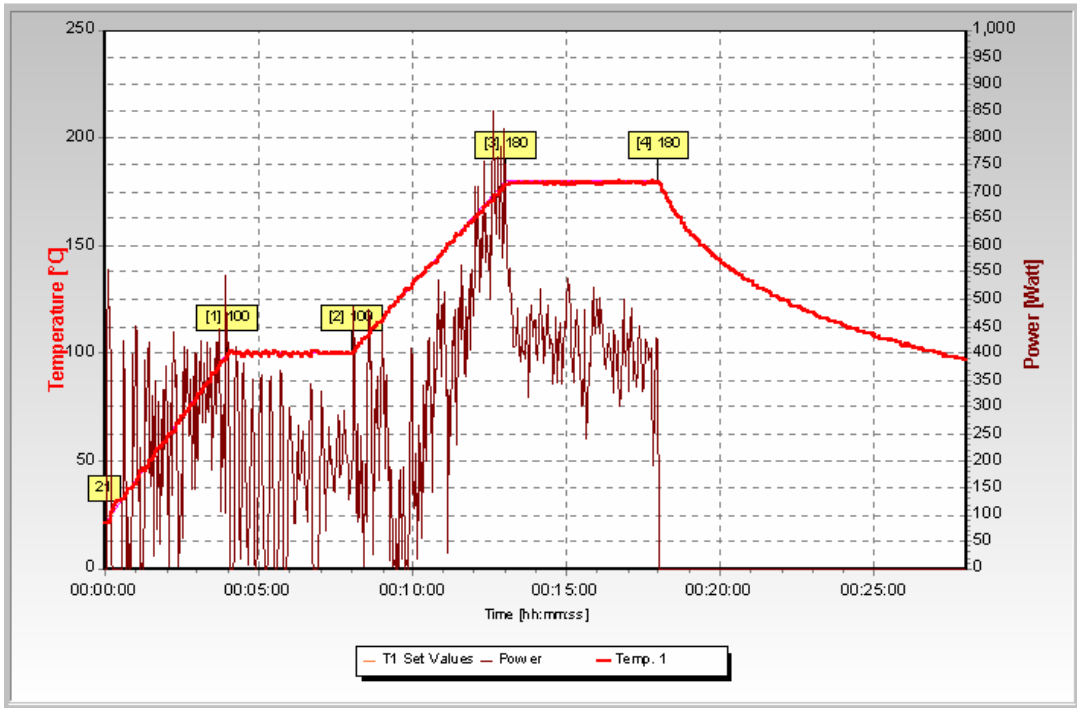


Figura 9. Programa de aquecimento: TR 180°C, TP 5 min e C 2 mol L^{-1}.

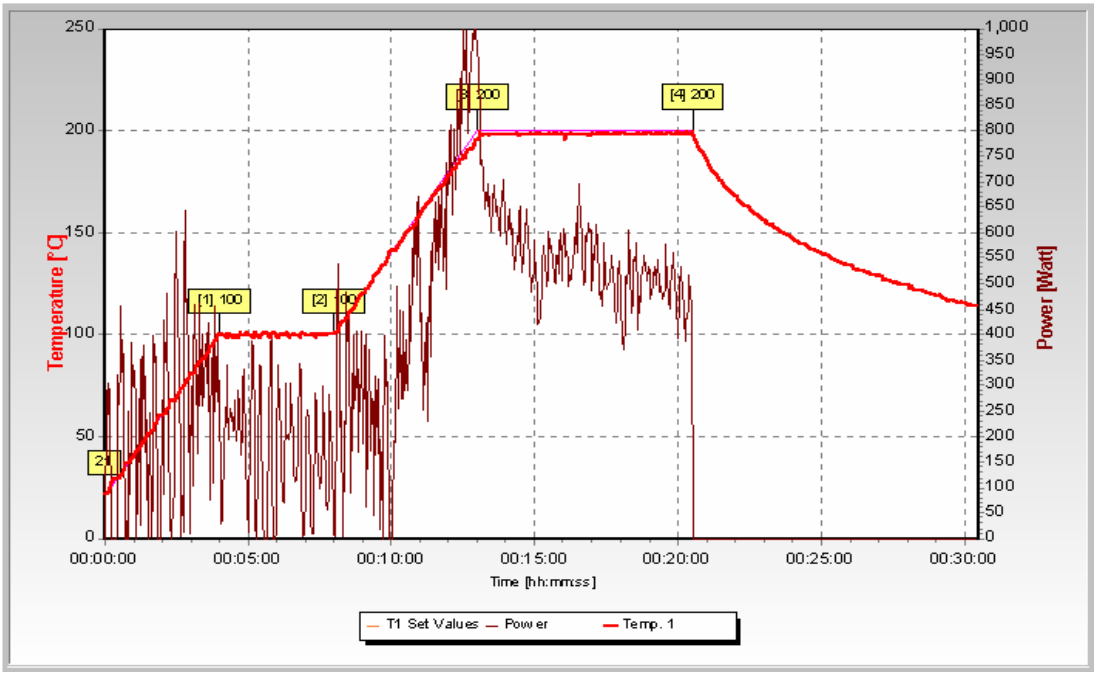


Figura 10. Programa de aquecimento: TR 220°C; TP 7,5 min e C 3 mol L^{-1}.

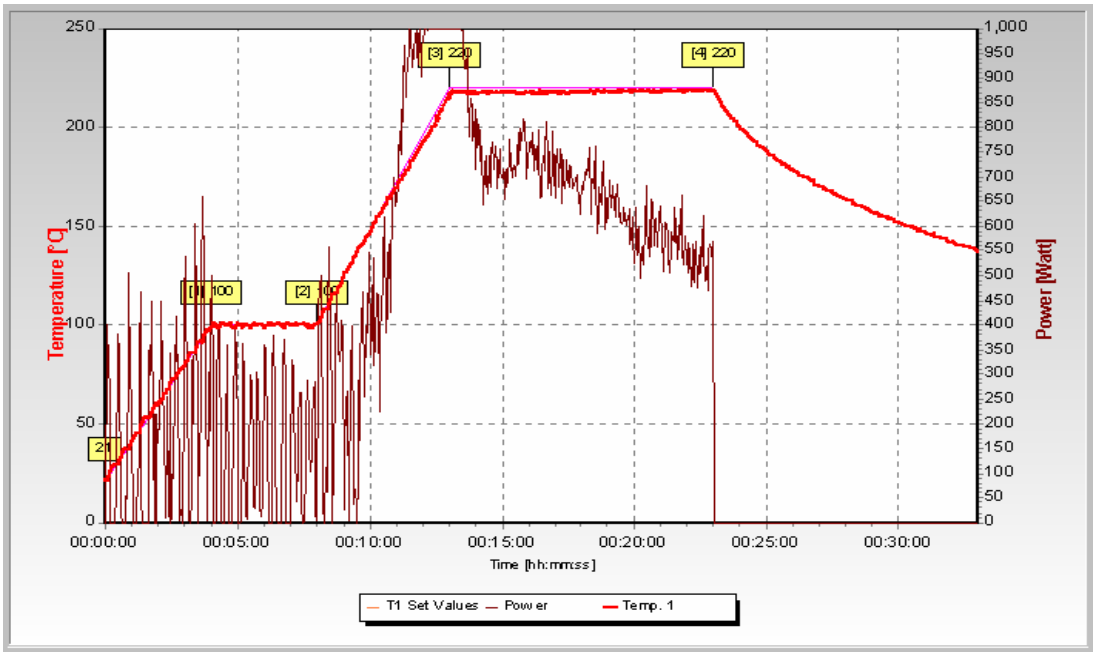


Figura 11. Programa de aquecimento: TR 220°C, TP 10 min e C 4 mol L^{-1}.

Os dados experimentais obtidos foram processados e analisados pelo programa computacional STATISTICA, indicando que as variáveis TR e TP deveriam ser otimizadas. Dessa forma, um planejamento Doehlert, Tabela 12, foi empregado para otimização das referidas variáveis.

Tabela 12. Planejamento Doehlert para as duas variáveis estudadas.

EXP.	VARIÁVEIS			
	TR		TP	
	Cod.	ºC	Cod.	min
1	(0)	215	(0)	9
2	(1)	225	(0)	9
3	(0,5)	220	(0,866)	12
4	(-1)	205	(0)	9
5	(-0,5)	210	(-0,866)	6
6	(0,5)	220	(-0,866)	6
7	(-0,5)	210	(0,866)	12
8 (PC)	(0)	215	(0)	9
9 (PC)	(0)	215	(0)	9

TR, temperatura final de decomposição; TP, tempo final de decomposição.

4.5.1. Robustez da digestão em forno de microondas

Após a obtenção dos valores ótimos, a eficiência do sistema otimizado foi avaliada pelo teste de robustez. Para tanto foi gerado um planejamento fatorial completo 2^3, tendo os valores ótimos como pontos centrais (Tabela 13). Todos os experimentos exigidos pelo planejamento foram conduzidos conforme o procedimento descrito no item 4.3.1.

Tabela 13. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para o teste de robustez.

EXP.	VARIÁVEIS					
	C		TR		TP	
	Cod.	$mol.L^{-1}$	Cod.	ºC	Cod.	min
1	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8
2	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8
3	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8
4	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8
5	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12
6	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12
7	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12
8	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12
9	(0)	2,5	0	220	(0)	10
10	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8
11	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8
12	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8
13	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8
14	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12
15	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12
16	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12
17	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12
18	(0)	2,5	0	220	(0)	10

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final.

4.6. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM VASOS DE PTFE

As variáveis, concentração de ácido nítrico (C), temperatura (TR) e tempo (TP) finais de digestão, foram escolhidas para serem otimizadas.

A massa de leucena, o volume ácido nítrico diluído e volume de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) foram fixados em 500 mg, 6 mL e 2 mL, respectivamente.

O programa de aquecimento do bloco digestor para digestão em vasos fechados de PTFE está descrito na Tabela 14 abaixo para os diferentes níveis de concentração avaliados:

Tabela 14. Programa de aquecimento do bloco digestor usado durante o processo de otimização.

Etapa	Temperatura (ºC)	Tempo (min)
1	TA a 100	15
2	100	30
3	100 a TR	16 a 26*
4	TR	TP

TA, temperatura ambiente; TR e TP, temperatura e tempo finais, respectivamente. * o tempo da etapa 3 é função da temperatura TR, pois há acréscimos de 5ºC a cada minuto, de tal forma que 16 min foram necessários para atingir TR igual 180ºC e 26 min para 230ºC.

Com o objetivo de verificar quais as variáveis escolhidas (C, TR e TP) influenciam significativamente a resposta analítica, um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado. As condições experimentais e a matriz gerada pelo planejamento fatorial completo estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3.

EXP.	VARIÁVEIS					
	C		TR		TP	
	Cod.	$mol.L^{-1}$	Cod.	ºC	Cod.	min
1	(-1)	4	(-1)	180	(-1)	60
2	(+1)	6	(-1)	180	(-1)	60
3	(-1)	4	(+1)	220	(-1)	60
4	(+1)	6	(+1)	220	(-1)	60
5	(-1)	4	(-1)	180	(+1)	120
6	(+1)	6	(-1)	180	(+1)	120
7	(-1)	4	(+1)	220	(+1)	120
8	(+1)	6	(+1)	220	(+1)	120
9	(0)	5	0	200	(0)	90
10	(-1)	4	(-1)	180	(-1)	60
11	(+1)	6	(-1)	180	(-1)	60
12	(-1)	4	(+1)	220	(-1)	60
13	(+1)	6	(+1)	220	(-1)	60
14	(-1)	4	(-1)	180	(+1)	120
15	(+1)	6	(-1)	180	(+1)	120
16	(-1)	4	(+1)	220	(+1)	120
17	(+1)	6	(+1)	220	(+1)	120
18	(0)	5	0	200	(0)	90

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final.

Os dados experimentais obtidos do planejamento acima foram processados e analisados pelo programa computacional STATISTICA, indicando que as três variáveis deveriam ser otimizadas. Dessa forma um planejamento Doehlert, Tabela 16, foi empregado para otimização das referidas variáveis.

Tabela 16. Planejamento Doehlert para as duas variáveis estudadas.

EXP.	VARIÁVEIS					
	C		TR		TP	
	mol.L^{-1}	cod.	ºC	cod.	min	cod.
1	6,0	0	220	0	120	0
2	7,0	1	220	0	120	0
3	6,5	0,5	220	0	150	0,866
4	6,5	0,5	230	0,817	130	0,289
5	5,0	-1	220	0	120	0
6	5,5	-0,5	220	0	90	-0,866
7	5,5	-0,5	210	-0,817	110	-0,289
8	6,5	0,5	220	0	90	-0,866
9	6,5	0,5	210	-0,817	110	-0,289
10	5,5	-0,5	220	0	150	0,866
11	6,0	0	210	-0,817	140	0,577
12	5,5	-0,5	230	0,817	130	0,289
13	6,0	0	230	0,817	100	-0,577
14	6,0	0	220	0	120	0
15	6,0	0	220	0	120	0
16	6,0	0	220	0	120	0

C, concentração molar do ácido nítrico; TR, temperatura final de decomposição; TP, tempo final de decomposição.

4.6.1. Robustez da digestão em bloco digestor

Após a obtenção dos valores ótimos, a eficiência do sistema otimizado foi avaliada pelo teste de robustez. Para tanto foi gerado um planejamento fatorial completo 2^3, com os valores ótimos como pontos centrais (Tabela 17). Todos os experimentos exigidos pelo planejamento foram conduzidos conforme o procedimento descrito no item 4.3.2.

Tabela 17. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez.

EXP.	VARIÁVEIS					
	C		TR		TP	
	Cod.	$mol.L^{-1}$	Cod.	ºC	Cod.	min
1	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8
2	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8
3	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8
4	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8
5	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12
6	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12
7	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12
8	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12
9	(0)	2,5	0	220	(0)	10
10	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8
11	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8
12	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8
13	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8
14	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12
15	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12
16	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12
17	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12
18	(0)	2,5	0	220	(0)	10

C, concentração molar do ácido nítrico; TR, temperatura final de decomposição; TP, tempo final de decomposição.

4.7. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS OTIMIZADOS

Os critérios usados para avaliação de métodos analíticos são conhecidos como “figuras de mérito”. Esses critérios permitem predizer se um determinado método é adequado para o uso pretendido.

Com a finalidade de assegurar a confiabilidade ou validade dos métodos otimizados, foram avaliadas algumas figuras de mérito: exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. Para tanto, os procedimentos de digestão descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2. foram executados com os valores ótimos para a determinação dos teores dos analitos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn.

A exatidão dos dois métodos otimizados foi demonstrada através da comparação entre os resultados das medidas obtidas de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn de dois materiais de referência certificados (folha de pêssego e folha de chá) com os valores certificados dos referidos materiais.

A precisão dos métodos propostos foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo das medidas em quadruplicata de cada analito estudado dos materiais de referência certificados.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados pelas seguintes expressões: LOD = 3 s/b e LOQ = 10 s/b, onde b é inclinação da curva de calibração e s é o desvio padrão de 10 medidas consecutivas dos brancos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa da amostra, o tipo de ácido, o volume de reativos, a concentração de oxidantes, a pressão, a temperatura e o tempo de aquecimento são os fatores ou parâmetros que interferem na eficiência de um processo de digestão de amostras de tecido vegetal em sistema fechado. Dessa forma, quando se deseja otimizar um método de decomposição de amostras vegetais em sistema fechado, alguns parâmetros podem ser fixados, enquanto os domínios experimentais dos outros parâmetros são definidos em função do quanto se conhece sobre sistema a ser otimizado.

Quando não se tem informação suficiente sobre o sistema que se pretende otimizar, experimentações preliminares e revisão de literatura são imprescindíveis.

As condições experimentais fixadas neste trabalho, tanto para a digestão em forno microondas como para em vasos de PTFE, foram: a massa 500 mg de folha de leucena; 6 mL de ácido nítrico diluído e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v).

5.1. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM FORNO MICROONDAS

A massa da amostra vegetal foi fixada em 500 mg para garantir uma concentração maior dos analitos no digerido, facilitando, portanto, às determinações por espectrometria de absorção atômica por chama e absorção molecular. Esta massa é a máxima recomendada para a digestão em sistema fechado, pois altas temperaturas e pressões podem ocorrer e o processo de digestão ser abortado pelo sistema de segurança do aparelho.

Como há perda do poder oxidante quando se trabalha com ácido HNO_3 diluído, foi necessário utilizar o H_2O_2 30% (v/v) como oxidante auxiliar.

O volume da mistura oxidante, HNO_3 diluído e H_2O_2 30% (v/v), foi fixado em 8 mL, pois este é o volume mínimo recomendado pelo manual do forno microondas para que se possa garantir o monitoramento da temperatura durante todo o processo de digestão.

Quanto aos volumes individuais dos agentes oxidantes para a digestão de 500 mg de amostra de tecido vegetal, encontramos na literatura o volume de HNO_3 65% (v/v) variando entre 4 e 15 mL e de 0 a 2 mL para o H_2O_2 30% (v/v): Rodushkin et al. (1999) utilizaram 5 mL de HNO_3 65% (v/v) e 0,5 mL de H_2O_2 30% (v/v), Anzano et al. (2000) empregaram somente 6 mL de HNO_3 65% (v/v), Buchmann et al. (2000) usaram 15 mL de HNO_3 65% (v/v), Ivanova et al. (2001) usuram 4 mL de HNO_3 65% (v/v) e 2 mL de H_2O_2 30% (v/v) e Chojnacka et al. (2005) empregaram 5 mL de HNO_3 65% (v/v).

Considerando a massa máxima de amostra utilizada, 500 mg, e o fato de trabalharmos com ácido nítrico diluído, resolvemos fixar os volumes de ácido nítrico e de peróxido de hidrogênio em 6 e 2 mL, respectivamente.

Os fatores concentração de ácido nítrico, temperatura final e tempo final de decomposição foram os escolhidos para serem otimizados. Os domínios experimentais escolhidos para cada fator estão mostrados na Tabela 18.

Embora Araújo et al. (2002) tenham trabalhado com a metade da massa de amostra vegetal daquela empregada nesta dissertação, escolhemos a faixa de concentração de 2 a 4 mol L^{-1} de ácido nítrico, pois os autores citados obtiveram excelentes resultados com ácido nítrico 2 mol L^{-1}.

Como as temperaturas desejáveis para a digestão de amostras biológicas (planta, por exemplo), usando ácido nítrico, são de 140 ºC para os carboidratos, de 150 ºC para as proteínas e de 170 ºC para os lipídios (Krug, 2004), escolhemos a faixa de temperatura indicada na Tabela 10.

O tempo da etapa final de digestão depende do número de etapas anteriores e do tempo destinado a cada uma delas. Como nesse trabalho o tempo destinado às etapas anteriores foi de 13 min e o tempo total de

digestão de amostras de planta citado na literatura encontra-se entre 17 e 60 minutos (Rodushkin et al., 1999; Anzano et al., 2000; Ivanova et al., 2001; Gouveia et al., 2001; Araújo et al., 2002), resolvemos estudar o tempo final na faixa de 5 a 10 minutos.

Tabela 18. Níveis máximo e mínimo dos fatores selecionados

Fatores	Min (-)	Ponto central	Max(+)
Concentração do ácido nítrico (mol.L^{-1})	2	3	4
Temperatura final de digestão (ºC)	180	200	220
Tempo final de digestão (min)	5	7,5	10

5.1.1. Planejamento fatorial completo e planejamento Doehlert

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado para determinar a influência dos fatores e de suas interações na resposta analítica.

O planejamento experimental e a eficiência (resposta analítica) para cada experimento estão demonstrados na Tabela 19.

Tabela 19. Planejamento experimental e resultados obtidos em E (%).

EXP.	VARIÁVEIS						
	C		TR		TP		E
	Cod.	Molar	Cod.	ºC	Cod.	min	%
1	(-1)	2	(-1)	180	(-1)	5	**73,33**
2	(+1)	4	(-1)	180	(-1)	5	**72,14**
3	(-1)	2	(+1)	220	(-1)	5	**83,49**
4	(+1)	4	(+1)	220	(-1)	5	**82,70**
5	(-1)	2	(-1)	180	(+1)	10	**74,23**
6	(+1)	4	(-1)	180	(+1)	10	**75,13**
7	(-1)	2	(+1)	220	(+1)	10	**85,18**
8	(+1)	4	(+1)	220	(+1)	10	**85,29**
9	(0)	3	0	200	(0)	7,5	**77,60**
10	(-1)	2	(-1)	180	(-1)	5	**74,00**
11	(+1)	4	(-1)	180	(-1)	5	**72,50**
12	(-1)	2	(+1)	220	(-1)	5	**84,49**
13	(+1)	4	(+1)	220	(-1)	5	**83,43**
14	(-1)	2	(-1)	180	(+1)	10	**74,40**
15	(+1)	4	(-1)	180	(+1)	10	**75,18**
16	(-1)	2	(+1)	220	(+1)	10	**87,15**
17	(+1)	4	(+1)	220	(+1)	10	**85,12**
18	(0)	3	0	200	(0)	7,5	**76,20**

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

Com a eficiência calculada, o programa STATISTICA foi aplicado para obter a análise de variância (ANOVA), Tabela 20, e o diagrama de Pareto, Figura 12.

A significância dos efeitos dos fatores estudados foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) e dos valores de P.

O diagrama de Pareto, Figura 12, também mostra a significância dos fatores. Como na interpretação desse diagrama deve-se considerar que o comprimento das barras horizontais é proporcional aos valores absolutos dos efeitos calculados (Lemos et al., 2005), os fatores tempo e temperatura demonstraram efeitos estatisticamente significativos sobre a resposta analítica, para o intervalo estudado.

Por outro lado, a variação da concentração de 2 a 3 mol L^{-1} não promoveu efeito significativo sobre a resposta analítica. Dessa forma, os experimentos do planejamento Doehlert podem ser realizados com ácido nítrico 2 mol L^{-1}. No entanto, decidimos realizá-los com ácido nítrico 2,5 mol L^{-1} para não trabalharmos com valores inferiores a 2 mol L^{-1}, quando a robustez do método fosse avaliada, pois o ácido nítrico a concentrações inferiores a 2 mol L^{-1} perde consideravelmente o seu poder oxidante (Krug, 2004).

Tabela 20. Análise de variância dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 19.

	SQ	**gl**	**MQ**	**F**	**Valor p**
C	1,4280	1	1,4280	3,208	0,106887
TR	461,6052	1	461,6052	1036,979	0,000000
TP	15,2100	1	15,2100	34,169	0,000245
C – TR	0,4761	1	0,4761	1,070	0,328037
C – TP	1,1556	1	1,1556	2,596	0,141589
TR - TP	0,1722	1	0,1722	0,387	0,549366
Erro Puro	4,0063	9	0,4451		
SQ Total	494,9784	17	29,2911		

SQ, soma quadrática; gl, grau de liberdade; MQ, média quadrática; valor p, nível de probabilidade.

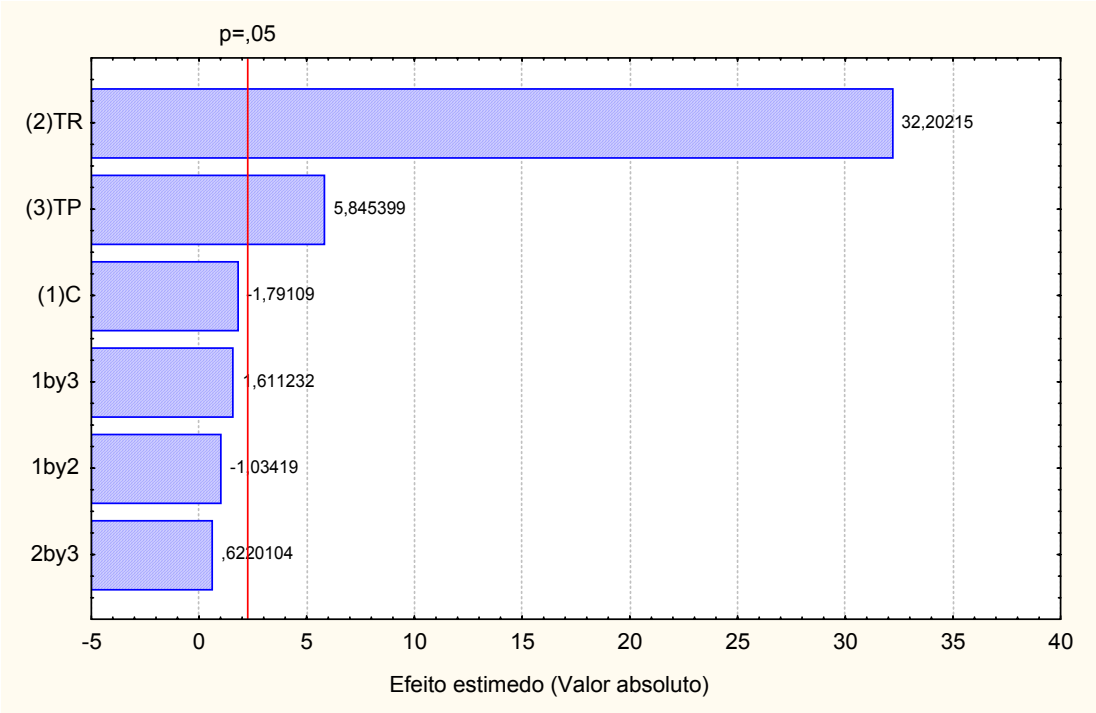


Figura 12. Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados.

O fator temperatura aparece no diagrama de Pareto como a variável mais significativa. Este fato deve-se provavelmente à ampla faixa de temperatura escolhida para o domínio experimental quando comparada às outras variáveis, além do fato de que é uma característica da digestão em forno de microondas o aumento brusco da temperatura em um intervalo pequeno de tempo. Dessa forma, espera-se que a temperatura e o tempo, considerando a pequena faixa de concentração estudada, sejam os fatores mais significativos.

Os resultados do planejamento fatorial demonstraram que os fatores temperatura e tempo precisavam ser otimizados. Então, um planejamento Doehlert para estes dois fatores foi realizado.

Como a temperatura foi o fator mais significativo, resolvemos trabalhar com este fator em maior número de níveis, ou seja, 5 e o tempo com 3 níveis.

Uma vez que o diagrama de Pareto mostrou que a eficiência do processo de decomposição aumenta com o acréscimo de temperatura e de tempo (valores positivos dos efeitos), aumentamos os níveis mínimo e máximo (Tabela 21) dos domínios experimentais para o planejamento

Doehlert (Tabela 22).

Tabela 21. Domínios experimentais dos fatores significativos para a superfície de resposta.

FATORES	Min(-)	PONTO CENTRAL	Max(+)
TR (ºC)	205	215	225
TP (min)	6	9	12

TR, temperatura final de decomposição; TP, tempo final de decomposição.

Tabela 22. Matriz Doehlert para as duas variáveis estudadas.

EXP.	FATORES				
	TR		TP		E
	Cod.	ºC	Cod.	min	%
1	(0)	215	(0)	9	84,69
2	(1)	225	(0)	9	85,06
3	(0,5)	220	(0,866)	12	84,94
4	(-1)	205	(0)	9	79,58
5	(-0,5)	210	(-0,866)	6	80,54
6	(0,5)	220	(-0,866)	6	82,16
7	(-0,5)	210	(0,866)	12	83,16
8 (PC)	(0)	215	(0)	9	84,82
9 (PC)	(0)	215	(0)	9	84,74

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

O programa STATISTICA 6.0 foi aplicado aos dados do planejamento Doehlert, obtendo-se uma superfície de resposta de região de máximo, mostrada na Figura 13. Esta região apresenta como pontos de máximo 220,00ºC e 10,45 min para temperatura e tempo finais, respectivamente.

A região de máximo obtida através do programa STATISTICA pode ser também demonstrada pela aplicação do critério de Lagrange à equação que relaciona a resposta analítica, E, aos fatores TR e TP.

O programa STATISTICA nos forneceu a seguinte equação para o planejamento Doehlert:

$$\%E = -1101{,}847 + 10{,}664.TR - 0{,}0243.TR^2 + 2{,}762.TP - 0{,}160\ TP^2 + 0{,}0027\ TR.TP$$

Aplicando o critério de Lagrange nesta equação, temos:

$H(TR\ e\ TP) = 0{,}0154$
$\partial^2E/\partial TR^2 = -0{,}0483$
$\partial^2E/\partial TP^2 = -0{,}3198$

Como os pontos TR e TP serão máximos se H(TR e TP) > 0 e $\partial^2E/\partial TR^2 < 0$ e $\partial^2E/\partial TP^2 < 0$, então o critério de Lagrange demonstrou que a superfície de resposta, realmente, possui um máximo.

As coordenadas do ponto máximo ou os níveis críticos podem ser calculadas pelas seguintes equações:

$\partial E/\partial TR = 10{,}664 - 0{,}0486.TR + 0{,}0027.TP = 0$

$\partial E/\partial TP = 2{,}762 - 0{,}320.TP + 0{,}0027.TR = 0$

Resolvendo o sistema de equações acima, encontramos os pontos de máximo, ou seja, os valores de temperatura e tempo que levarão à eficiência máxima do processo de composição:

TR = 220,17ºC

TP = 10,42 min

Portanto, os valores calculados (220,17ºC e 10,42 min) não diferem dos valores definidos após aplicação do programa STATISTICA (220,00ºC e 10,45 min).

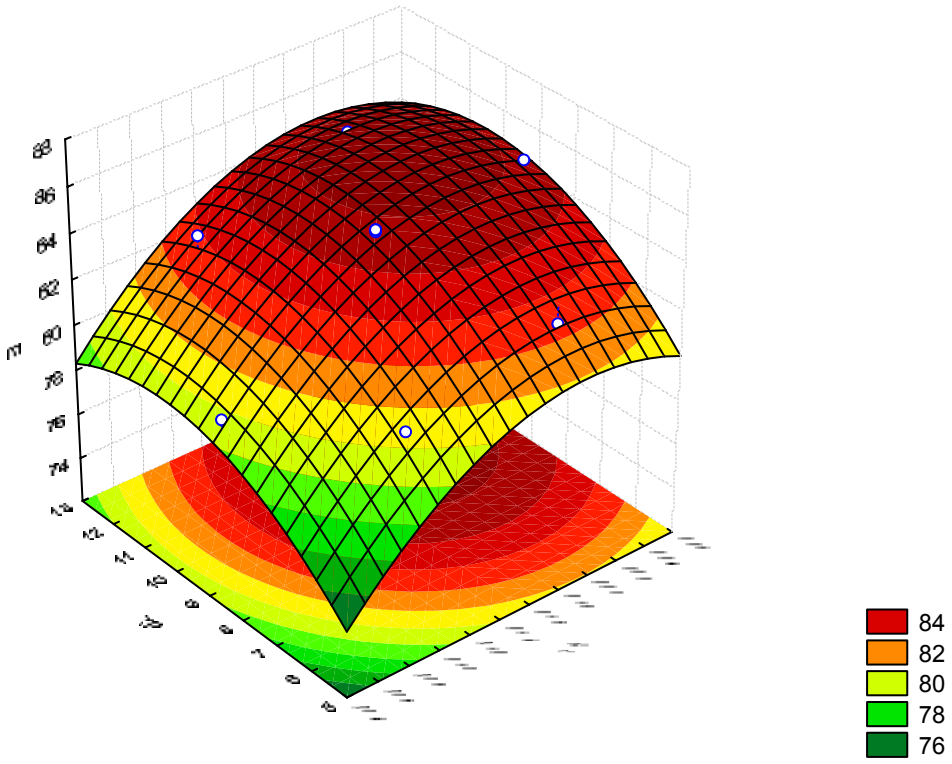


Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento Doehlert para a otimização dos fatores temperatura (TR) e tempo (TP), tendo como resposta analítica a eficiência (E).

Após os resultados do planejamento fatorial completo e do planejamento Doehlert, podemos concluir que os valores ótimos para os três fatores avaliados são:

C = 2,5 mol L^{-1}

TR = 220ºC

TP = 10 min

Os valores acima foram empregados na validação do método de digestão.

5.1.2. Teste de robustez

A consistência de um método analítico é definida por sua capacidade de produzir resultados constantes quando são aplicadas condições operacionais diferentes daquelas originalmente definidas.

Quando as condições operacionais intrínsecas de um método são modificadas é possível determinar a sua robustez, que é a capacidade de um procedimento analítico de produzir resultados constantes na presença de pequenas mudanças nas condições experimentais. Essas pequenas mudanças são representadas por qualquer variação nos valores nominais dos parâmetros do método analítico original. A robustez é um termo relativamente recente e se constitui em fator de performance do método analítico (Bosque-Sendra et al., 1999).

Uma vez que a robustez pode ser testada através de metodologias multivariadas (Korn et al., 2005), empregamos, nesta dissertação, os valores ótimos como pontos centrais e fez-se uma pequena variação nesses valores centrais, conforme Tabela 23.

Tabela 23. Níveis mínimo e máximo dos fatores selecionados para o teste de robustez.

Fatores	Min (-)	Ponto central	Max(+)
Concentração do ácido nítrico (mol.L^{-1})	2	2,5	3
Temperatura final de digestão (ºC)	215	220	225
Tempo final de digestão (min)	8	10	12

Um planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 24), envolvendo as variáveis concentração, temperatura e tempo foi realizado e a robustez foi demonstrada pelo diagrama de Pareto (Figura14).

Tabela 24. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez.

EXP.	VARIÁVEIS						
	C		TR		TP		E.
	Cod.	$mol.L^{-1}$	Cod.	ºC	Cod.	min	%
1	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8	84,09
2	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8	84,40
3	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8	84,29
4	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8	85,48
5	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12	84,66
6	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12	84,75
7	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12	85,99
8	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12	85,86
9	(0)	2,5	0	220	(0)	10	85,28
10	(-1)	2	(-1)	215	(-1)	8	84,39
11	(+1)	3	(-1)	215	(-1)	8	84,11
12	(-1)	2	(+1)	225	(-1)	8	83,96
13	(+1)	3	(+1)	225	(-1)	8	84,74
14	(-1)	2	(-1)	215	(+1)	12	84,15
15	(+1)	3	(-1)	215	(+1)	12	84,95
16	(-1)	2	(+1)	225	(+1)	12	85,12
17	(+1)	3	(+1)	225	(+1)	12	85,06
18	(0)	2,5	0	220	(0)	10	85,16

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

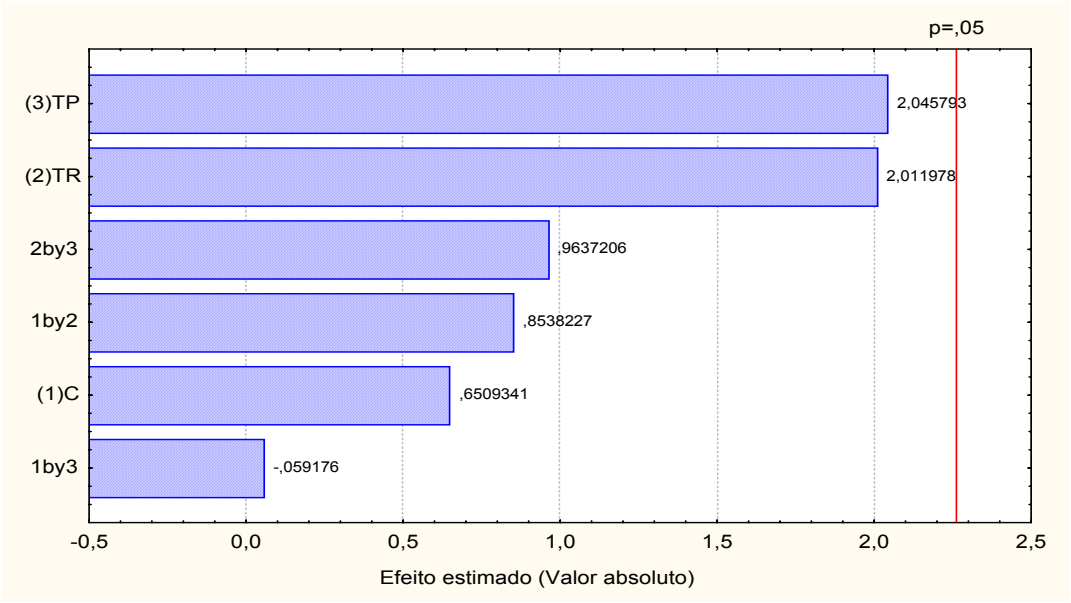


Figura 14. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores para o estudo da robustez.

Analisando o diagrama de Pareto, conclui-se que as variações de 0,5 mol L^{-1}, de 5ºC e de 2 minutos para a concentração, temperatura e tempo, respectivamente, não promoveram diferenças estatísticamente significativas na resposta analítica. Dessa forma, o método proposto para digestão de amostra de tecido em forno de microondas é robusto para o domínio experimental estudado.

5.2. OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO EM VASOS FECHADOS DE PTFE

Neste processo de otimização, assim como na digestão em forno de microondas, as variáveis massa da amostra teste, volume de ácido nítrico e volume de peróxido foram fixados nos valores de 500 mg, 6 mL e 2 mL, respectivamente.

Os fatores concentração de ácido nítrico, temperatura final e tempo final de decomposição foram os escolhidos para serem otimizados.

Como o processo de digestão em forno de microondas é mais eficiente do que o realizado em vasos fechados de PTFE sob aquecimento condutivo, os domínios experimentais (Tabela 25) para os fatores concentração do ácido nítrico e tempo final de digestão, nesta otimização, foram superiores àqueles empregados para a otimização em forno de microondas. No entanto, mantivemos o mesmo domínio para o fator temperatura final de digestão, pois se esperava que o seu valor ótimo estivesse dentro do domínio experimental escolhido.

Tabela 25. Níveis máximo e mínimo dos fatores selecionados

Fatores	Min (-)	Ponto central	Max(+)
Concentração do ácido nítrico (mol L^{-1})	4	5	6
Temperatura final de digestão (ºC)	180	200	220
Tempo final de digestão (min)	60	90	120

5.2.1. Planejamento fatorial completo e planejamento Doehlert.

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado para determinar a influência dos fatores e de suas interações na resposta analítica. O

planejamento experimental e a eficiência para cada experimento estão demonstrados na Tabela 26.

Tabela 26. Planejamento experimental e resultados obtidos em E(%).

EXP.	VARIÁVEIS						
	C		TR		TP		E.
	Cod.	mol L^{-1}	Cod.	ºC	Cod.	min	%
1	(-1)	4	(-1)	180	(-1)	60	68,51
2	(+1)	6	(-1)	180	(-1)	60	68,82
3	(-1)	4	(+1)	220	(-1)	60	73,26
4	(+1)	6	(+1)	220	(-1)	60	73,56
5	(-1)	4	(-1)	180	(+1)	120	75,75
6	(+1)	6	(-1)	180	(+1)	120	77,10
7	(-1)	4	(+1)	220	(+1)	120	79,00
8	(+1)	6	(+1)	220	(+1)	120	81,10
9	(0)	5	0	200	(0)	90	79,32
10	(-1)	4	(-1)	180	(-1)	60	70,18
11	(+1)	6	(-1)	180	(-1)	60	71,20
12	(-1)	4	(+1)	220	(-1)	60	71,18
13	(+1)	6	(+1)	220	(-1)	60	71,49
14	(-1)	4	(-1)	180	(+1)	120	73,62
15	(+1)	6	(-1)	180	(+1)	120	77,48
16	(-1)	4	(+1)	220	(+1)	120	78,96
17	(+1)	6	(+1)	220	(+1)	120	82,65
18	(0)	5	0	200	(0)	90	78,47

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

O programa STATISTICA foi aplicado aos dados do planejamento fatorial da Tabela 26, obtendo-se a análise de variância (ANOVA), Tabela 27, e o diagrama de Pareto, Figura 15.

Tabela 27. Análise de variância dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 26

	SQ	gl	MQ	F	Valor p
C	10,46522	1	10,46522	7,573587	0,022403
TR	50,90822	1	50,90822	36,84182	0,000186
TP	206,3532	1	206,3532	149,3359	6,59E-07
C – TR	0,001225	1	0,001225	0,000887	0,976897
C – TP	5,130225	1	5,130225	3,712697	0,086108
TR - TP	3,045025	1	3,045025	2,203657	0,171841
Erro Puro	12,43625	9	1,381806		
SQ Total	320,9921	17			

SQ, soma quadrática; gl, grau de liberdade; MQ, média quadrática; valor p, nível de probabilidade.

A significância dos efeitos dos fatores estudados foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) e dos valores de “p” no diagrama de Pareto. Neste diagrama, os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (p=0,05) são estatisticamente significativos para a resposta analítica em um intervalo de confiança de 95% (p=0,05).

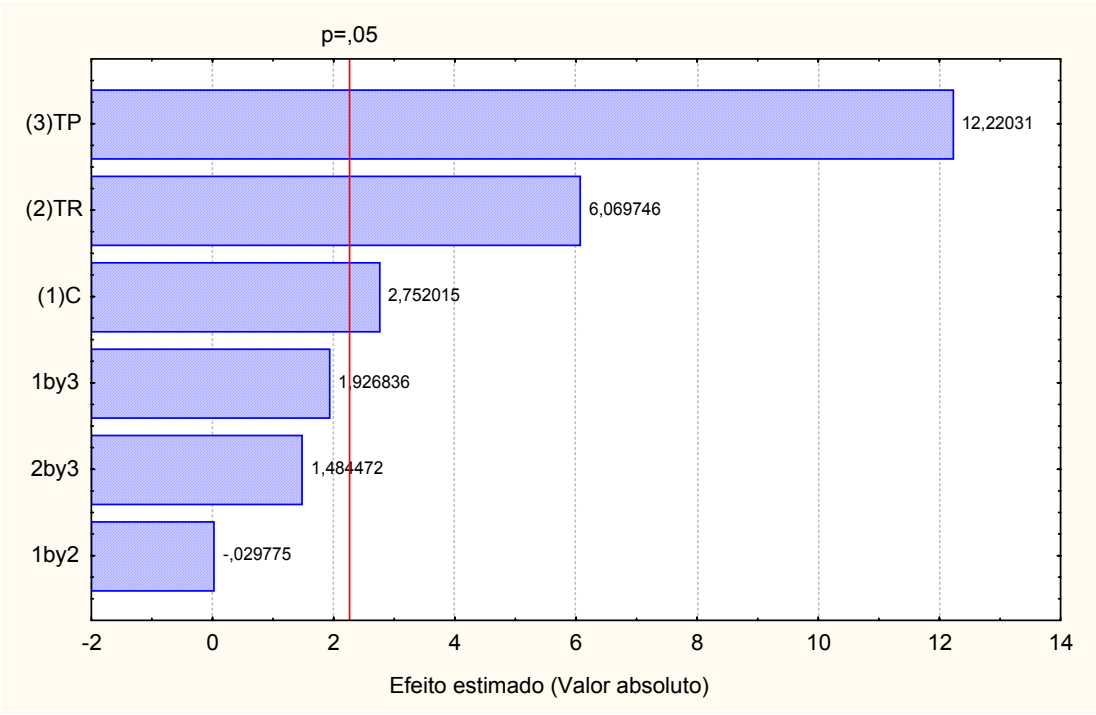


Figura 15. Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados.

Interpretando o diagrama de Pareto (Figura 15), os três fatores estudados demonstraram ter, para os domínios experimentais especificados, efeitos estatisticamente significativos sobre a resposta analítica. O fator tempo final de digestão aparece como a variável mais significativa, seguido pelos fatores temperatura e concentração, todos com valores positivos. Em um processo de digestão ácida de amostras biológicas, espera-se que acréscimos nestes fatores contribuam para a decomposição. No entanto, a variável e o efeito mais significativos dependerá dos domínios experimentais escolhidos para cada variável.

Após o planejamento fatorial completo, concluímos que os três fatores precisavam ser otimizados. Para tanto, realizamos o planejamento Doehlert para três variáveis.

Como o tempo final foi o fator mais significativo, resolvemos trabalhar com este fator no maior número de níveis, ou seja, 7 e a concentração e a temperatura com 5 e 3 níveis, respectivamente.

Uma vez que o diagrama de Pareto mostrou que a eficiência do processo de decomposição aumenta com o acréscimo das três variáveis (valores positivos dos efeitos), aumentamos os níveis mínimo e máximo (Tabela 28) dos domínios experimentais para o planejamento Doehlert. Os trezes experimentos e três pontos centrais necessários para a matriz Doehlert estão descritos na Tabela 29.

Tabela 28. Domínios experimentais dos fatores significativos para a superfície de resposta.

FATORES	Min(-)	PONTO CENTRAL	Max(+)
TP (min)	90	120	150
TR (ºC)	210	220	230
C (mol L^{-1})	5,0	6,0	7,0

C, concentração molar; TR, temperatura final e TP, tempo final.

Tabela 29. Matriz Doehlert para as três variáveis estudadas.

EXP.	VARIÁVEIS						
	C		TR		TP		E.
	mol L^{-1}	cod.	ºC	cod.	min	cod.	%
1	6,0	0	220	0	120	0	81,27
2	7,0	1	220	0	120	0	79,57
3	6,5	0,5	220	0	150	0,866	84,56
4	6,5	0,5	230	0,817	130	0,289	90,50
5	5,0	-1	220	0	120	0	79,03
6	5,5	-0,5	220	0	90	-0,866	77,57
7	5,5	-0,5	210	-0,817	110	-0,289	76,56
8	6,5	0,5	220	0	90	-0,866	77,65
9	6,5	0,5	210	-0,817	110	-0,289	80,31
10	5,5	-0,5	220	0	150	0,866	80,53
11	6,0	0	210	-0,817	140	0,577	78,36
12	5,5	-0,5	230	0,817	130	0,289	86,94
13	6,0	0	230	0,817	100	-0,577	80,81
14	6,0	0	220	0	120	0	79,92
15	6,0	0	220	0	120	0	82,16
16	6,0	0	220	0	120	0	80,67

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

O programa STATISTICA aplicado ao planejamento Doehlert, Tabela 29, indicou como valores críticos, em uma região de ponto de sela, C = 6,65 mol L^{-1}, TR = 210,22ºC, TP = 119,00 minutos e um máximo relativo para as variáveis C e TP. As figuras 16, 17 e 18 representam as superfícies de respostas geradas a partir do planejamento Doehlert.

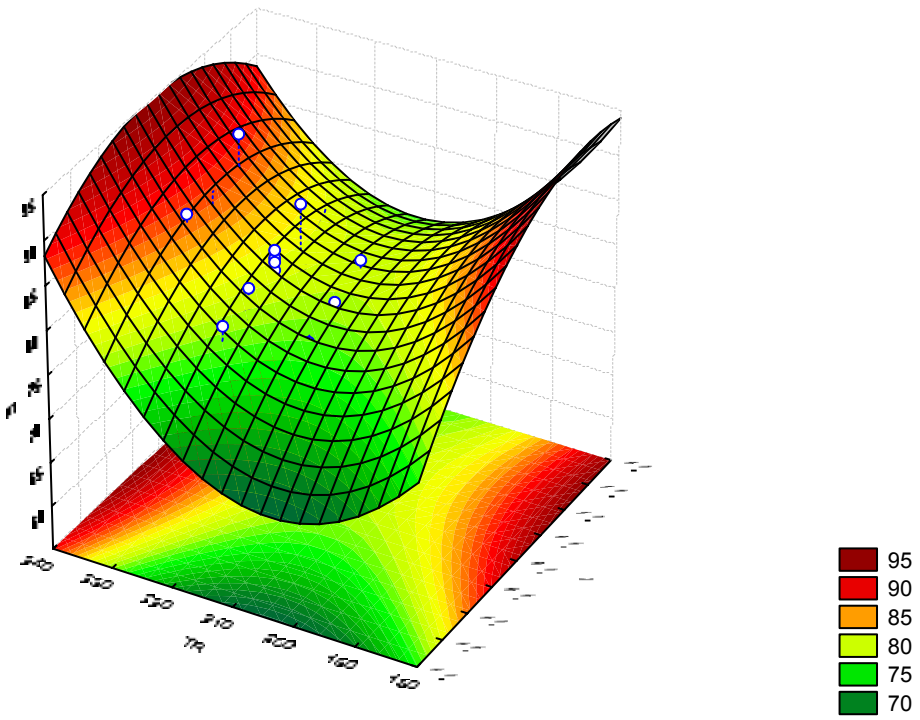


Figura 16. Superfície de resposta: concentração de ácido nítrico (C), temperatura final (TR) e eficiência (E), mantendo-se a variável tempo final em 119 min.

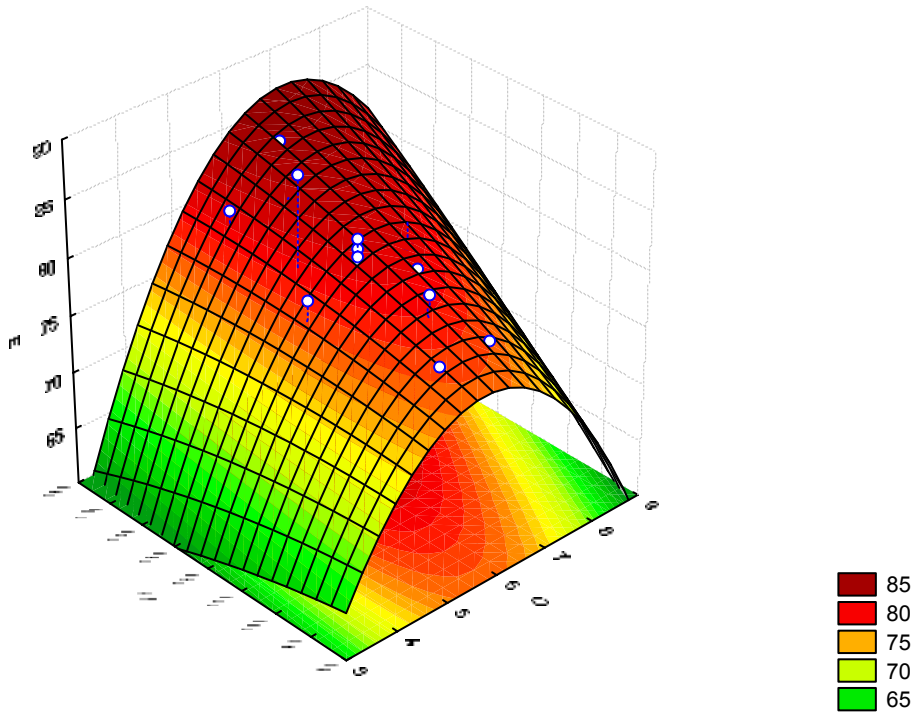


Figura 17. Superfície de resposta: concentração de ácido nítrico (C), tempo final (TP) e eficiência (E), mantendo-se a variável temperatura final em 210ºC.

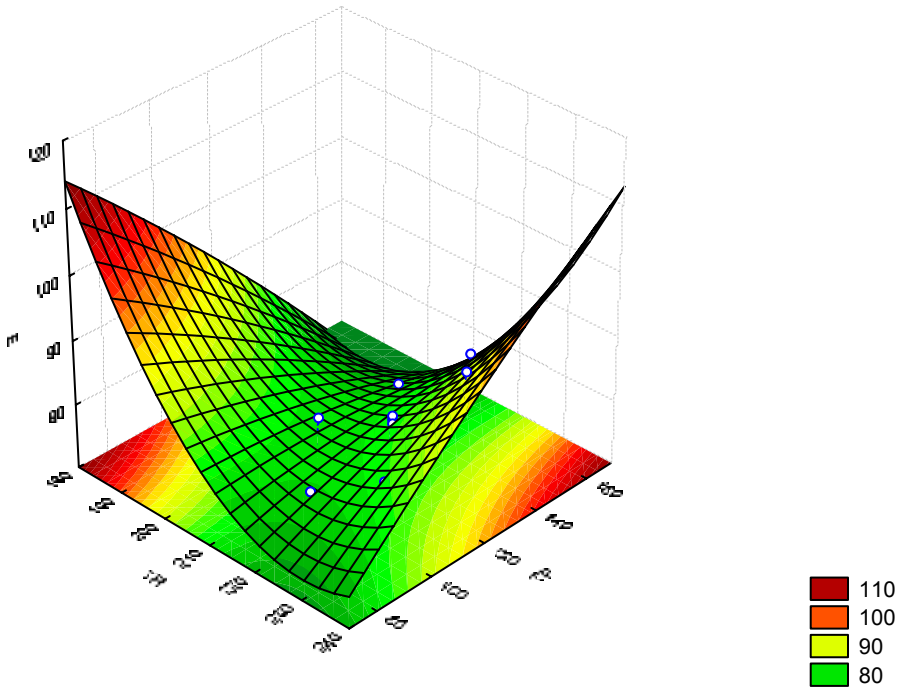


Figura 18. Superfície de resposta: tempo final (TP), temperatura final (TR) e eficiência (E), mantendo-se a variável concentração de ácido nítrico (C) em 6,65 mol L^{-1}.

A equação abaixo, obtida através do programa STATISTICA, ilustra a relação entre os fatores estudados e a resposta analítica.

E. = 1021,026 + 30,6958.C – 1,7050.C^2 – 8,0688.TR + 0,0164.TR^2 – 3,2849.TP – 0,0006.TP^2 – 0,0753.C.TR + 0,0658.C.TP + 0,142.TP.TR

Aplicando o critério de Lagrange à equação quadrática acima temos:

$\partial E/\partial C$ = 30,6958 – 2,4100.C– 0,0753.TR + 0,0658.TP

$\partial E/\partial TR$ = -8,0688 + 0,0328.TR – 0,0753.C + 0,142.TP

$\partial E/\partial TP$ = -3,2849 – 0,0012.TP + 0,0658.C + 0,142.TR

$$\Delta_1 = \frac{\partial^2 E}{\partial C^2} = -2{,}4100 < 0$$

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 E}{\partial C^2} & \frac{\partial^2 E}{\partial C \partial TR} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial TR \partial C} & \frac{\partial^2 E}{\partial TR^2} \end{vmatrix} = -0{,}0847 < 0$$

E. = 1021,03 + 30,696.C – 1,705.C^2 – 8,069.TR + 0,016.TR^2 – 3,285.TP – 0,0006.TP^2 – 0,075.C.TR + 0,066.C.TP + 0,142.TP.TR

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 E}{\partial C^2} & \frac{\partial^2 E}{\partial C \partial TR} & \frac{\partial^2 E}{\partial C \partial TP} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial TR \partial C} & \frac{\partial^2 E}{\partial TR^2} & \frac{\partial^2 E}{\partial TR \partial TP} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial TP \partial C} & \frac{\partial^2 E}{\partial TP \partial TR} & \frac{\partial^2 E}{\partial TP^2} \end{vmatrix} = 0{,}0033 > 0$$

Os valores de $\Delta_1 < 0$, $\Delta_2 < 0$ e $\Delta_3 > 0$ revelam que realmente há um ponto de sela.

Como os pontos críticos indicados pelo programa STATISTICA estavam todos dentro do domínio experimental avaliado, resolvemos

estabelecer como condições experimentais para a posterior validação do método: 6,5 mol L^{-1}, 210ºC e 120 minutos para os fatores concentração, temperatura e tempo, respectivamente.

5.2.2. Teste de robustez

Para o teste de robustez empregamos os valores ótimos como pontos centrais e em seguida fez-se uma pequena variação nesses valores, conforme Tabela 30.

A robustez foi avaliada pelo desenvolvimento de um planejamento fatorial completo 2^3, envolvendo as variáveis: concentração, temperatura e tempo (Tabela 31).

Tabela 30. Níveis mínimo e máximo dos fatores selecionados para o teste de robustez.

Fatores	Min (-)	Ponto central	Max(+)
Concentração do ácido nítrico (mol L^{-1})	6	6,5	7
Temperatura final de digestão (ºC)	200	210	220
Tempo final de digestão (min)	110	120	130

Analisando o diagrama de Pareto (Figura16), conclui-se que esse procedimento é robusto para uma variação de 0,5 mol L^{-1}, de 10ºC e de 10 minutos para a concentração, temperatura e tempo, respectivamente, uma vez que estes fatores não influenciaram significativamente a resposta analítica no domínio experimental estudado.

Tabela 31. Planejamento Fatorial completo para o teste de robustez.

EXP.	VARIÁVEIS						
	C		TR		TP		E.
	Cod.	mol L^{-1}	Cod.	ºC	Cod.	min	%
1	(-1)	6	(-1)	200	(-1)	110	**80,67**
2	(+1)	7	(-1)	200	(-1)	110	**80,14**
3	(-1)	6	(+1)	220	(-1)	110	**81,96**
4	(+1)	7	(+1)	220	(-1)	110	**81,17**
5	(-1)	6	(-1)	200	(+1)	130	**80,76**
6	(+1)	7	(-1)	200	(+1)	130	**83,16**
7	(-1)	6	(+1)	220	(+1)	130	**79,89**
8	(+1)	7	(+1)	220	(+1)	130	**80,86**
9	(0)	6,5	0	210	(0)	120	**80,82**
10	(-1)	6	(-1)	200	(-1)	110	**77,46**
11	(+1)	7	(-1)	200	(-1)	110	**80,42**
12	(-1)	6	(+1)	220	(-1)	110	**79,80**
13	(+1)	7	(+1)	220	(-1)	110	**84,64**
14	(-1)	6	(-1)	200	(+1)	130	**80,50**
15	(+1)	7	(-1)	200	(+1)	130	**79,82**
16	(-1)	6	(+1)	220	(+1)	130	**82,02**
17	(+1)	7	(+1)	220	(+1)	130	**83,02**
18	(0)	6,5	0	210	(0)	120	**80,99**

C, concentração molar; TR, temperatura final; TP, tempo final. E, eficiência.

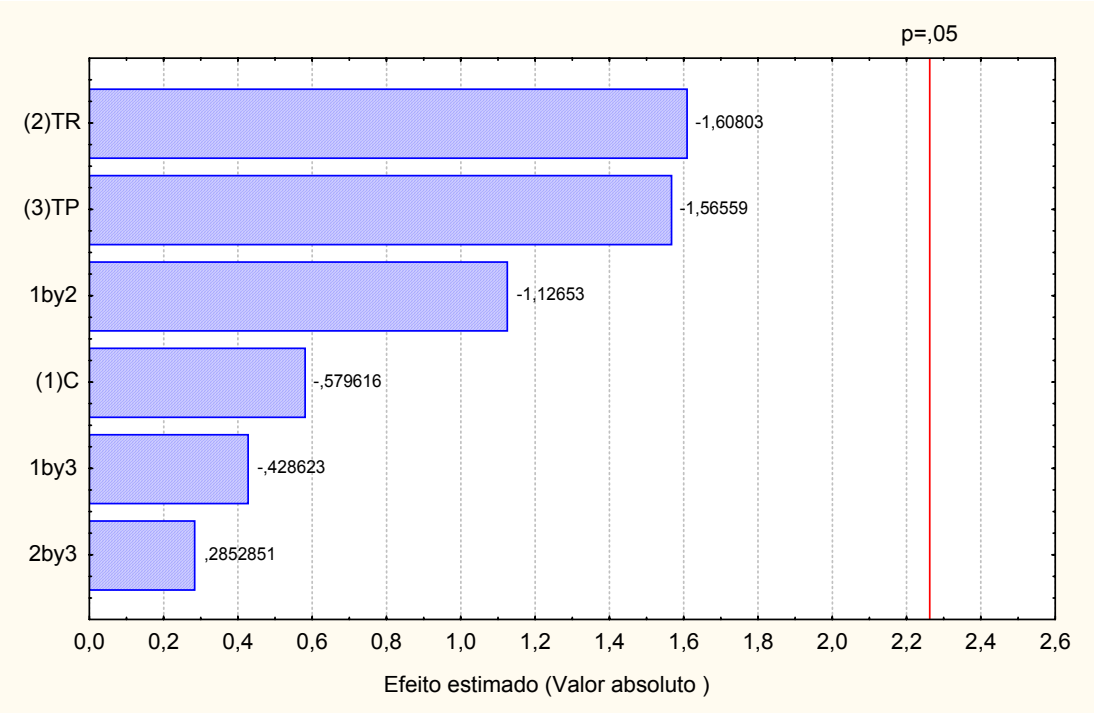


Figura 19. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores para o estudo da robustez.

5.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS

Uma das tendências em química analítica moderna é o desenvolvimento de técnicas analíticas novas e de métodos que possam quantificar os componentes em amostras complicadas (amostras ambientais e alimentos) de forma confiável (Trullols et al., 2004).

Com o desenvolvimento rápido de metodologias analíticas, é de grande importância, nos dias de hoje, garantir a qualidade dos valores obtidos. Por sua vez, a qualidade dos dados de medidas analíticas deve satisfazer dois critérios essenciais: utilidade e confiabilidade ou validade (Taverniers et al., 2004a).

Validar um método é investigar se o propósito do método analítico é alcançado com os resultados analíticos obtidos em um nível de incerteza aceitável (Taverniers et al., 2004b). A validação é, portanto, um aspecto vital para a garantia da qualidade analítica.

A validação de um método analítico desenvolvido em laboratório deve ser sempre efetuada após a sua seleção, desenvolvimento e otimização.

As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho dos dois métodos propostos nesta dissertação foram: exatidão; precisão; limite de detecção e limite de quantificação.

A exatidão pode ser verificada comparando os resultados obtidos com os valores certificados de materiais de referência ou com outro método validado. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida de um programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz da amostra.

A precisão do método analítico é o grau de concordância entre os resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. Matematicamente a precisão pode ser representada pelo desvio padrão relativo expresso em percentagem. O desvio padrão relativo

(RSD) é calculado pela divisão do desvio padrão de várias medidas pela média dessas medidas.

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais.

O limite de quantificação (LQ) do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais.

Uma forma de cálculo dos limites de detecção e de quantificação é a baseada no emprego do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva de calibração (b). As equações são: LD = 3 s/b e LQ = 10 s/b. O desvio padrão da resposta pode ser baseado no desvio padrão do branco.

A exatidão e a precisão dos dois métodos analíticos propostos foram determinadas pela análise, em quadruplicatas, de dois materiais de referência certificados de folha de pêssego (NIST 1547) e de folha de chá (GBW 07605). Os resultados estão mostrados nas tabelas 32 e 33.

O desvio padrão relativo variou entre 0,31 e 10,53% para a digestão em forno microondas e de 0,44 a 8,14% para digestão em vasos de PTFE.

A comparação estatística, pelo teste-t, não mostrou nenhuma diferença significante entre os valores obtidos pelos métodos propostos e os valores certificados, a um nível de confiança de 95%. Para a digestão em forno de microondas, as recuperações variaram entre 99 e 104% para a amostra NIST 1547 e entre 97 e 112% para a amostra GBW 07605. Quanto à digestão em vasos de PTFE, as recuperações variaram entre 96 e 106% para a amostra NIST 1547 e entre 98 e 112% para a amostra GBW 07605.

Os valores dos limites de detecção e quantificação de cada elemento para a digestão em forno de microondas e em vasos de PTFE são mostrados nas tabelas 34 e 35, respectivamente. O limite de detecção foi calculado como três vezes os desvios padrão de 10 medidas do branco dividido pelo coeficiente angular do gráfico de calibração para cada elemento isto é, 3 s/b onde s é o desvio padrão do branco e b é o coeficiente angular do gráfico de calibração. O limite de quantificação foi calculado, multiplicando por 10 o desvio padrão das 10 medidas do branco, dividindo

em seguida este produto pelo coeficiente angular da curva analítica. As curvas analíticas e suas equações da reta estão representadas nas Figuras 19 a 26.

Tabela 32. Resultados das análises da amostra certificada NIST 1547 em forno microondas e em vasos de PTFE.

Elemento	Valor de referência	Forno de microondas			Vasos de PTFE		
		média ± s	RSD (%)	Rec(%)	média ± s	RSD (%)	Rec(%)
P (%)	0,137 ± 0,007	0,142 ± 0,004	2,82	104	0,145 ± 0,006	4,14	106
K (%)	2,43 ± 0,03	2,40 ± 0,02	0,83	99	2,30 ± 0,01	0,44	96
Ca (%)	1,56 ± 0,02	1,59 ± 0,04	2,52	102	1,63 ± 0,01	0,61	104
Mg (%)	0,432 ± 0,008	0,432 ± 0,003	0,69	100	0,435± 0,006	1,38	101
Cu (μg g^{-1})	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,2	5,41	100	3,6 ± 0,2	5,56	97
Fe (μg g^{-1})	218 ± 14	217,0 ± 5,0	2,30	99	220,1 ± 7,0	3,18	97
Mn (μg g^{-1})	98 ± 3	98,2 ± 0,3	0,31	100	100,7 ± 4,2	4,17	102
Zn (μg g^{-1})	17,9 ± 0,4	18,3 ± 1,0	5,46	102	17,2 ± 1,4	8,14	96

Tabela 33. Resultados das análises da amostra certificada GBW 07605 em forno microondas e em vasos de PTFE.

Elemento	Valor de referência	Forno de microondas			Vasos de PTFE		
		média ± s	RSD (%)	Rec(%)	média ± s	RSD (%)	Rec(%)
P (%)	0,284 ± 0,012	0,301 ± 0,011	3,65	106	0,310 ± 0,005	1,61	109
K (%)	1,66 ± 0,02	1,81 ± 0,03	1,66	109	1,65 ± 0,02	1,21	99
Ca (%)	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,01	2,27	102	0,42 ± 0,02	4,76	98
Mg (%)	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02	10,53	112	0,19 ± 0,01	5,26	112
Cu (μg g^{-1})	17,3 ± 1,0	17,7 ± 0,4	2,26	102	16,9 ± 0,5	2,96	98
Fe (μg g^{-1})	264 ± 10	266 ± 6	2,26	101	267 ± 8	3,00	101
Mn (μg g^{-1})	1240 ± 40	1250 ± 58	4,64	101	1243 ± 6	0,48	100
Zn (μg g^{-1})	26,3 ± 0,9	25,6 ± 0,9	3,52	97	27,0 ± 0,4	1,48	103

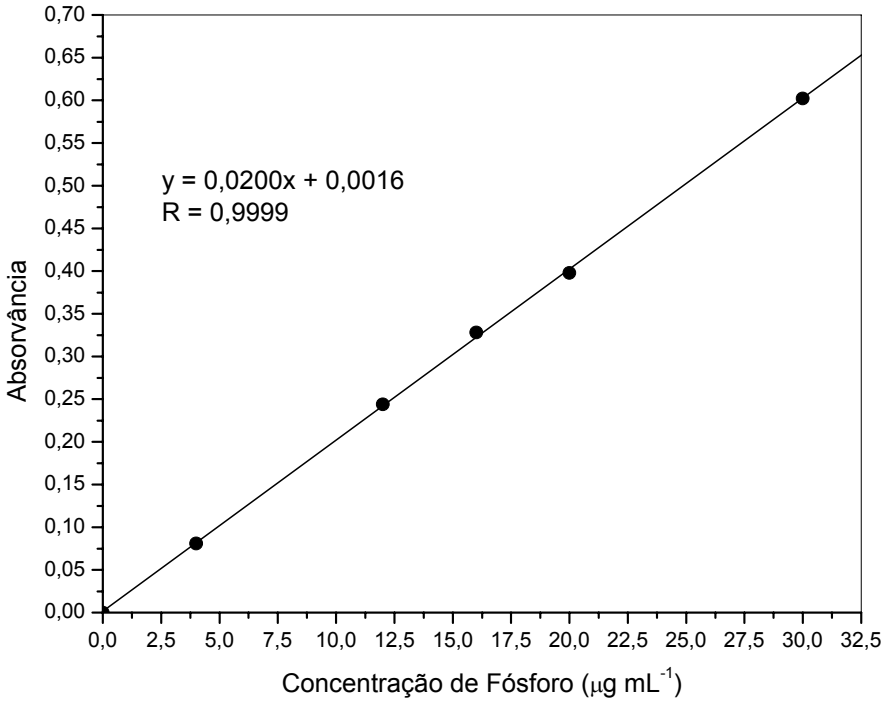


Figura 20. Curva analítica para o elemento Fósforo.

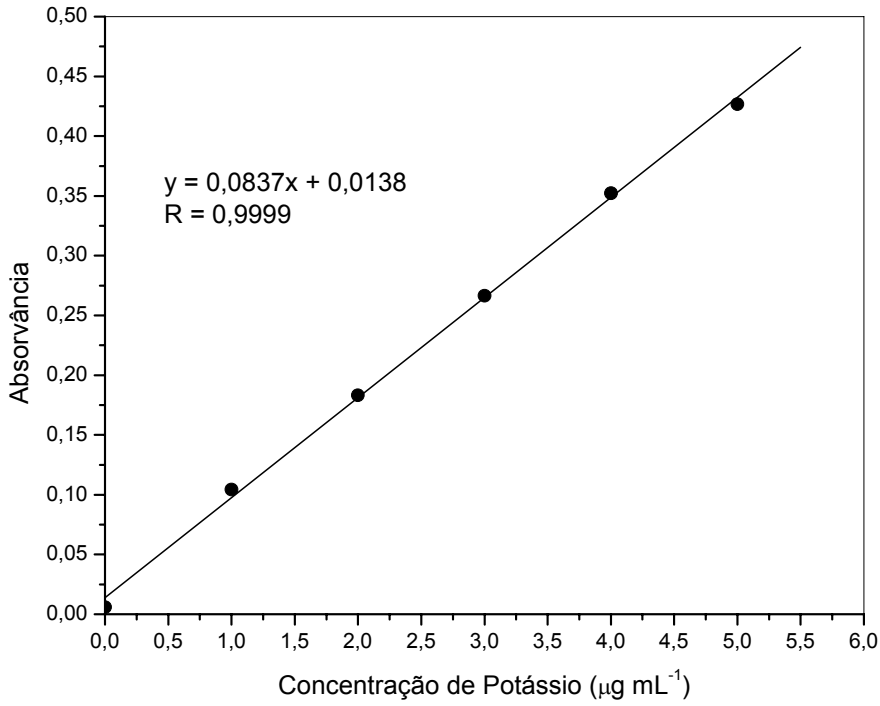


Figura 21. Curva analítica para o elemento Potássio.

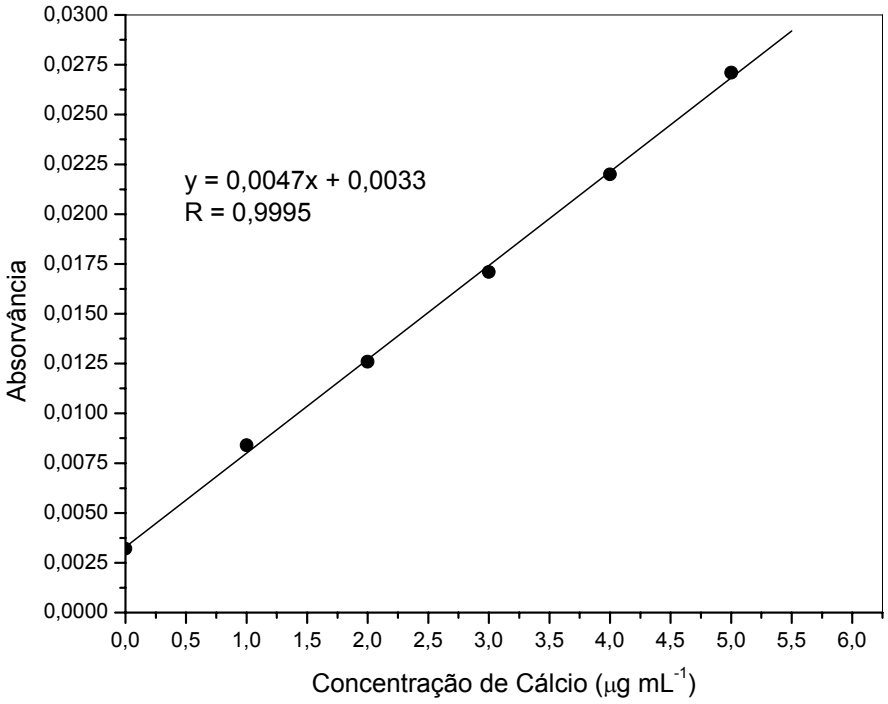


Figura 22. Curva analítica para o elemento Cálcio.

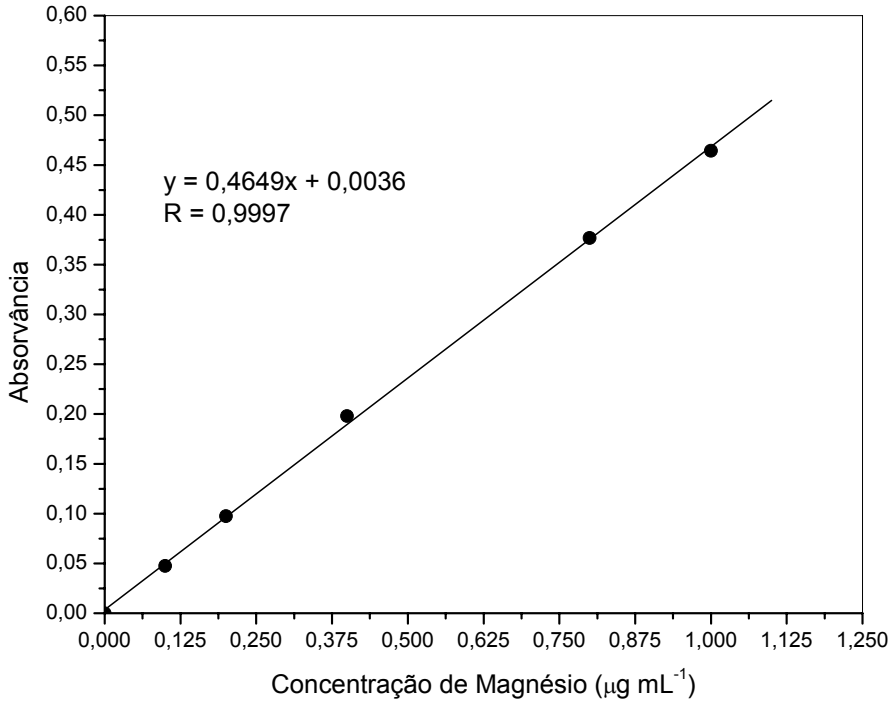


Figura 23. Curva analítica para o elemento Magnésio.

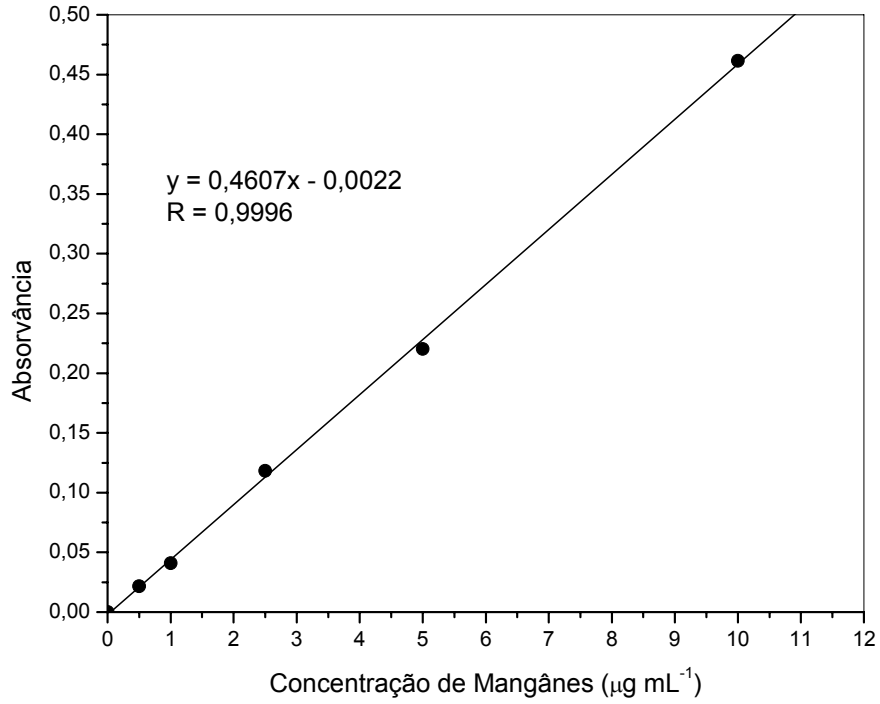


Figura 24. Curva analítica para o elemento Manganês.

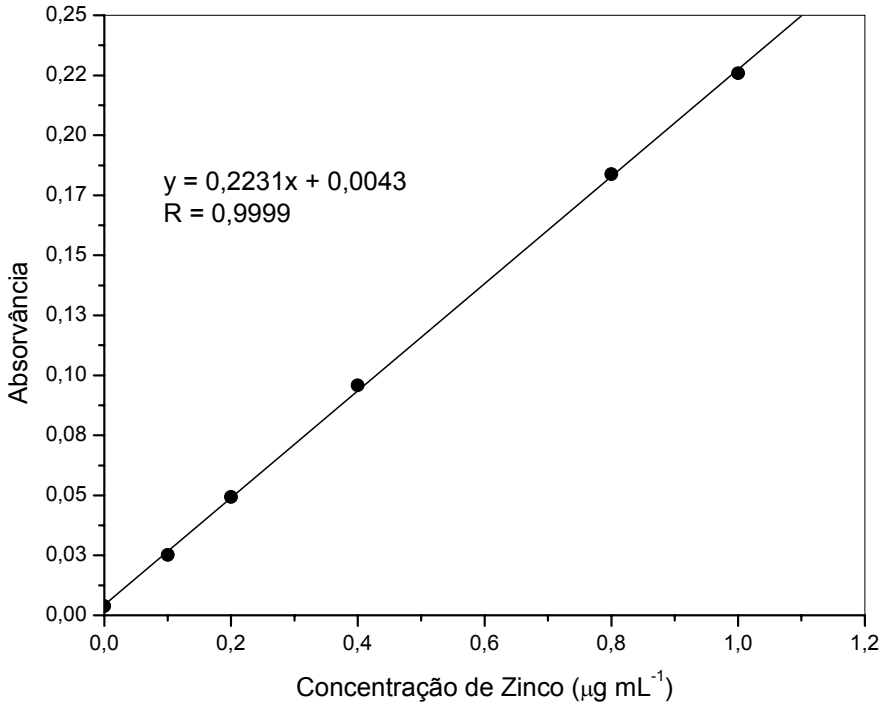


Figura 25. Curva analítica para o elemento Zinco.

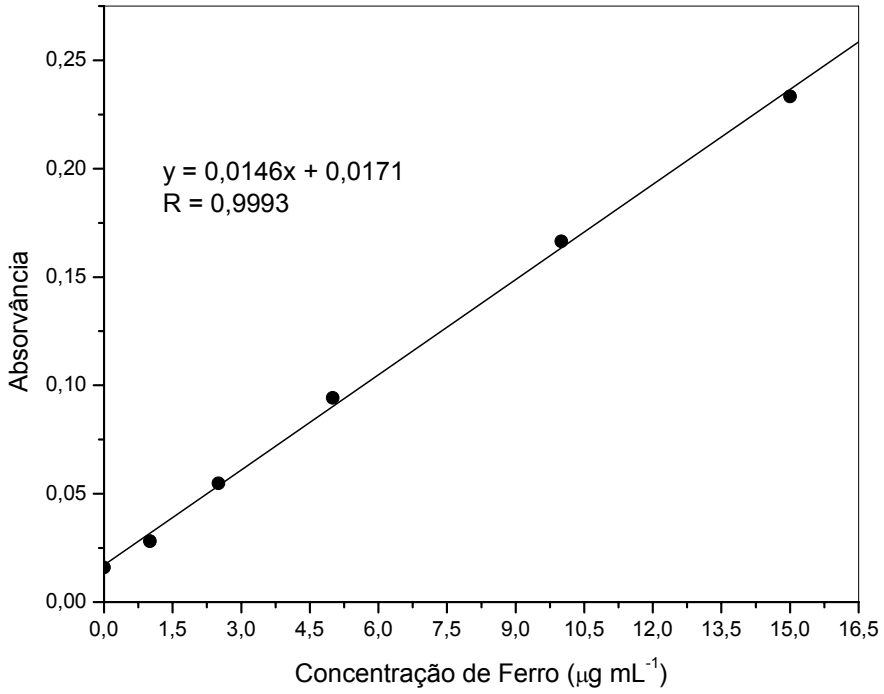


Figura 26. Curva analítica para o elemento Ferro.

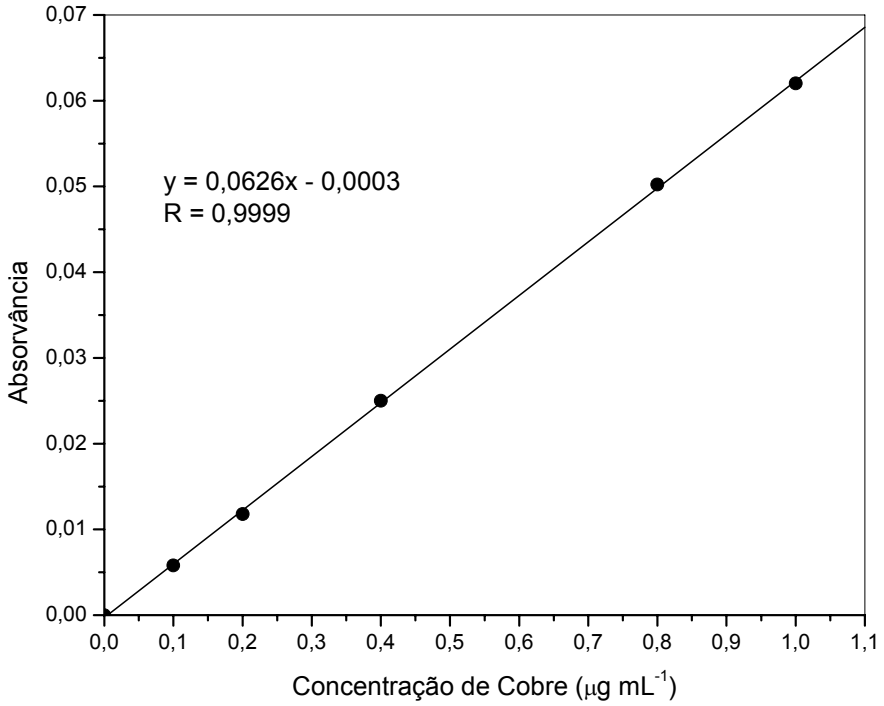


Figura 27. Curva analítica para o elemento Cobre.

Tabela 34. Limites de detecção e de quantificação dos elementos avaliados após digestão em forno microondas.

Branco	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	Absorvância							
1	0,0170	0,0064	0,0051	0,0062	0,0042	0,0003	0,0005	0,0245
2	0,0180	0,0059	0,0047	0,0065	0,0042	0,0005	0,0003	0,0234
3	0,0200	0,0061	0,0055	0,0067	0,0043	0,0006	0,0004	0,0254
4	0,0190	0,0059	0,0051	0,0063	0,0047	0,0004	0,0005	0,0280
5	0,0170	0,0058	0,0055	0,0059	0,0039	0,0004	0,0005	0,0278
6	0,0210	0,0070	0,0048	0,0062	0,0042	0,0005	0,0004	0,0241
7	0,0220	0,0062	0,0042	0,0067	0,0039	0,0007	0,0006	0,0211
8	0,0160	0,0063	0,0055	0,0062	0,0041	0,0004	0,0003	0,0192
9	0,0180	0,0072	0,0056	0,0057	0,0042	0,0003	0,0004	0,0215
10	0,0150	0,0072	0,0046	0,0061	0,0044	0,0006	0,0003	0,0221
S_{branco}	0,00224	0,00049	0,00047	0,00034	0,00023	0,00012	0,00011	0,0029
b (A, L μg^{-1})	0,02	0,0837	0,0047	0,464	0,0626	0,0146	0,0452	0,2231
LD ($\mu g\ mL^{-1}$)	0,3320	0,0176	0,3018	0,0022	0,0110	0,0261	0,0070	0,0384
LQ ($\mu g\ mL^{-1}$)	1,1068	0,0587	1,0061	0,0073	0,0368	0,0869	0,0233	0,1280

Tabela 35. Limites de detecção e de quantificação dos elementos avaliados após digestão em vasos de PTFE.

Branco	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	Absorvância							
1	0,0260	0,0026	0,0052	0,0080	0,0040	0,0008	0,0005	0,0328
2	0,0250	0,0030	0,0048	0,0080	0,0043	0,0010	0,0006	0,0313
3	0,0240	0,0024	0,0051	0,0082	0,0049	0,0009	0,0004	0,0418
4	0,0220	0,0027	0,0042	0,0076	0,0052	0,0011	0,0005	0,0318
5	0,0220	0,0030	0,0046	0,0079	0,0044	0,0009	0,0005	0,0412
6	0,0210	0,0032	0,0052	0,0075	0,0045	0,0008	0,0004	0,0362
7	0,0240	0,0036	0,0054	0,0082	0,0045	0,0007	0,0006	0,0324
8	0,0240	0,0025	0,0054	0,0084	0,0045	0,0008	0,0007	0,0416
9	0,0200	0,0027	0,0047	0,0076	0,0043	0,0009	0,0005	0,0328
10	0,0190	0,0031	0,0045	0,0075	0,0045	0,0010	0,0004	0,0320
S_{branco}	0,00226	0,0004	0,00041	0,00031	0,00033	0,00012	0,00011	0,00444
b (A L μg^{-1})	0,02	0,0837	0,0047	0,4649	0,0626	0,0146	0,0452	0,2231
LD ($\mu g\ mL^{-1}$)	0,3395	0,0137	0,25951	0,0020	0,0158	0,0252	0,0070	0,0598
LQ ($\mu g\ mL^{-1}$)	1,1316	0,0455	0,8650	0,0067	0,0528	0,0839	0,0233	0,1992

6. CONCLUSÃO

As metodologias multivariadas, planejamento fatorial completo e matriz Doehlert, permitiram a otimização de forma eficiente e rápida dos três parâmetros escolhidos para a digestão em forno de microondas e bloco digestor com vasos fechados de PTFE.

Os métodos otimizados revelaram-se exatos, pois a comparação entre os valores obtidos dos elementos avaliados em dois materiais de referência certificados, folha de pêssego (NIST 1547) e folha de chá (GBW 07605), e os seus valores de referência, após os procedimentos digestão, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, para um limite de confiança de 95%.

Constatou-se neste trabalho que o ácido nítrico diluído pode ser utilizado na digestão de amostras de planta em forno de microondas e em bloco digestor, ambos em sistema fechado. Dessa forma, possibilita-se obter valores de brancos menores, reduzir o custo com reagentes e gerar menos resíduos para o meio ambiente.

Comparando os tempos totais de digestão dos métodos propostos com os dos métodos tidos como clássicos, concluímos que houve uma grande redução no tempo de preparo das amostras, uma vez que a digestão em forno de microondas efetivou-se em 23 minutos e a digestão em bloco digestor, em torno de 3 horas. Além disso, a possibilidade de contaminação e de perdas por volatilização é bastante reduzida por serem técnicas desenvolvidas em sistemas fechados.

Os dois métodos propostos podem ser considerados como metodologias alternativas aos métodos clássicos na determinação de elementos químicos em amostras de plantas, sendo que a escolha de um ou de outro dependerá da rapidez de que se deseja obter os resultados analíticos e da disponibilidade de recursos econômicos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. M. B. et al. Determination of minerals in medicinal plants. **Ciênc. Tecnol. Aliment.,** v.22, p.94-97, 2002.

ALVARADO, J.S. Microwave dissolution of plant tissue and the subsequent determination of trace lanthanide and actinide elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, p. 11-20, 1996.

AMARO, J. A. A.; FERREIRA, S. L. C. Application of factorial design and Doehlert matrix in the optimisation of instrumental parameters for direct determination of silicon in naphtha using graphite furnace atomic absorptionspectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, p. 1-5, 2004.

ANZANO, J. M. et. al. Zinc and Manganese Analysis in Maize by Microwave Oven Digestion and Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, p. 837-841, 2000.

ARAÚJO, P.W.; BRERETON, G.- Experimental I. Screening, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 26-31, 1996a.

ARAÚJO, P.W.; BRERETON, G.- Experimental design II. Optimization, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 63-70, 1996b.

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALES, M. H., FERREIRA, A. G. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica acta Part B**, v. 57, p. 2121-2132, 2002.

BAIRD, C. Environmental chemistry. Second edition. University of Western Ontario. 2002. 557p.

BETTINELLI et al. The role of analytical methods for the determination of trace elements in environmental biomonitors. **Microchemical Journal,** v. 73, p. 131–152, 2002.

BOCK, R.; A Handbook of decomposition methods in analytical chemistry. International Text Book Company: London. 1979. 444p.

BORKOWSKA-BURNECKA, J. Microwave assisted extraction for trace element analysis for trace element analysis of plant materials by ICP-AES. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 368, p. 633-637. 2000.

BOSQUE-SENDRA, J. M; NECHAR, M.; RODRÍGUEZ, C. L. Decision protocol for checking robustness with previous outlier detection in the validation of analytical methods. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 365 : p. 480–488, 1999.

BOSQUE-SENDRA, J. M; NECHAR, M.; MOLINA,M. F. Experimental Designs Applied to Solid-Phase Derivative. **Spectrophotometry Mikrochim. Acta**, v. 134, p. 43-50, 2000.

BRONICK, C.J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, v. 124, p. 3 –22, 2005.

BUCHMANN, J. H. et al. Determination of metals in plant samples by using a sector field inductively coupled plasma mass spectrometer. **The Science of the Total Environment,** v. 263, p. 221-229, 2000.

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

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

CALADO V.; MONTGOMERY, D.; Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260p.

CAMPAÑA, G. A. M. et al. Sequential Response Surface Methodology for Multioptimization in Analytical Chemistry with Three-variable Doehlert Designs. **Analytica Chimica Acta**, v. 348, p. 237-246, 1997.

CAPELO-MARTÍNEZ, J. L. et al. Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p.331-339, 2004.

CARDOSO, E. J. B. N.; NAVARRO, R. B.; NOGUEIRA, M. A. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente**. R. Bras. Ci. Solo**, v. 27: p 415-423, 2003.

CASTRO, M. T. P. O.; BACCAN, N. Application of factorial design in optimization of preconcentration procedure or copper determination in soft drink by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta.** v. 65, p. 1264-1269, 2005.

CERUTTI, S. et al. Optimization of the preconcentration system of cadmium with 1(2-thiazolylazo)-*p*-cresol using a knotted reactor and flame atomic absorption spectrometric detection. **Journal of Hazardous Materials B.** v. 112, p.279–283, 2004a.

CERUTTI, S et al. Factorial design for multivariate optimization of an on-line preconcentration ystem for platinum determination by ultrasonic nebulization coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta.** v. 63, p.1077–1082, 2004b.

CLÉMENT, A. Determination of the elements in foliar tissues of forest trees for nutrition diagnostics. **The Science of the total Environment**. v. 176, p. 117-120, 1995.

CHAKRABORTY, R. et al. Literature study of microwave-assisted digestion using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 355: p. 99-111, 1996.

CHEMAT, S. et al. Ultrasound assisted microwave digestion. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.11, p. 5–8, 2004.

CHOJNACKA, K. et al. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. **Science of the Total Enviromenment,** v. 337, p. 175-182, 2005.

CHRISTIAN, G. D. Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. 5 ª edição. Nova York (EUA). p.812. 1994.

CHRISTIE, P.; DICKSON, E. L.; KILPATRICK, D. J. Comparison between wet and dry oxidation methods of samples preparation for copper and zinc analysis of grassland herbage**. J. Sci. Food Agric.**, v. 48, p.155-164, 1989.

COSCIONE, A. R. Uso da calibração multivariada para a determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos. São Paulo: Universidade Federal de Campinas, tese de doutorado, 123p, 2001.

CRUZ, A. M. A. Factorial design for the response exploration of a flow injection system. **Talanta**. v. 42, p.701-709. 1995.

ETCHEVERS, J. E.; ETCHEVERS, G. G.; Analisis químico de suelo y planta. Paraíba: Centro de ciências Agrárias / UFBA. 1980. 150p.

FAGERIA, N. K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. Brasília: Embrapa-DPU, 1989. 425p.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.2, 6-16, 1998.

FANQUIN, V. Nutrição Mineral de plantas. Lavras: ESAL/FAEPE, 1994. 227p.

FANQUIN, V.; FERNANDES, L. A.; Fertilizantes e impacto ambiental. In: SILVA, M. L. N. (coord.). Solo no contexto ambiental. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 26-57.

FERREIRA, S. L. C. et al. Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of experimental variables associated with preconcentration and determination of molybdenum in sea-water by inductively coupled

plasma optical emission spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom**., v.17, p.115-120, 2002.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta,** v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FREIRE, M. F. I et al. Vernonia scorpioides (Lam.) pers. Asteraceae – Determinação de fatores nutricionais relacionados à produção de princípio ativo. **Floresta e Ambiente**. v. 5, p.135-138, 1998.

GARCIA, C. A. B. Métodos alternativos para a decomposição de amostras na dosagem de cobre em alimentos. Bahia: Universidade Federal da Bahia, dissertação de mestrado, 83p, 1992**.**

GFRERER, M. E.; LANKMAYR, E. Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 203-211, 2005.

GONÇALVES JR., A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química nova**, v. 23 (2): p.173-177, 2000.

GOUVEIA, S. T. et al. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p.269–275, 2001.

HAMILTON, E. I. State of the art of trace element determinations in plant matrices: determination of the chemical elements in plant matrices, an overview. **Science of the Total Enviromenment,** v. 176, p.3-14, 1995.

HELTAI, G. E PERCSICH, K. Moderated pressure microwave digestion System for preparation of biological samples. **Talanta**, vol. 41, p. 1067-1072, 1994.

HOENIG, M. Critical discussion of the element analysis of plant matrices. **Science of the Total Enviromenment,** v. 176, p.85-91, 1995

HOENIG, M; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Part B: Spectrochimica Acta,** v. 51, p. 1297-1307, 1996.

HOENIG, M et al. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for analysis of the plant material by atomic spectrometric. **Analytica Chimica Acta**, v. 358, p. 85-94, 1998.

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

HSEU, Z. Y. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods**. Bioresource Technology** , v. 95, p. 53–59, 2004.

IVANOVA, J. et al. Determination of lanthanoids and some heavy and toxic elements in plant certified reference materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p.3-12, 2001.

JONES Jr., J. B.; CASE, V. W.; Sampling, Handling, and Analyzing Plant Tissue Samples. In: WESTERMAN, R.L.; BAIRD, J. V.; CHRISTENSEN, N. W.; FIXEN, P. E.; WHITNEY, D. A. (eds.). **Soil testing and plant analysis.** Madison: SSSA, 1990. p. 389-428.

JONES Jr., J. B.; WOLF, B.; MILLS, H.A. **Plant anallysis handbook; a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide**. Athens: MICRO - MACRO Publ. Inc., 1991. 213p.

JORGE, J A. Solo: manejo e adubação. 2ª Edição. São Paulo: Nobel, 1986. 309 p.

KABATA-PENDIAS, A. Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. **Geoderma,** v. 122, p. 143-149, 2004.

KHAN, A. G. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. **Environment International**, v.26, p. 417-423, 2001.

KINCL, M.; TURK, S.; VRECÊR, F. Application of experimental design methodology in development and optimization of drug release method. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 291, p. 39-49, 2005.

KINGSTON, H.M.; JASSIE, L.B. Introduction to microwave sample preparation. Washington (EUA). 1988. p. 91-154.

KLAR, A. E. A água no sistema solo – planta - atmosfera. 2ª Edição. São Paulo: Nobel, 1988. 408p.

KORN, M. G. et al., Optimisation of focused-microwave assisted digestion procedure for Kjeldahl nitrogen determination in bean samples by factorial design and Doehlert design. **Talanta**, v. 65, p. 710-715, 2005.

KOVNATSKY, E. F.; SURNIN, V. A.Utilization of vegetation sample bank as an indicator of environmental state in the areas of industrial pollution. **The Science of the Total Environment**, 139/140, p.271-277, 1993.

KRACHLER, M. et al. Analytical procedures for the determination of selected trace elements in peat and plant samples by inductively coupled plasma

mass spectrometry. **Part B : Spectrochimica Acta**, v. 57, p. 1277-1289, 2002.

KRUG, F. J. A seqüência analítica, V Workshop sobre preparo de amostras. FAPESP, São Paulo, 2004.

KUBRAKOVA, I. Microwave-assisted sample preparation and preconcentration for ETAAS. **Spectrochimica Acta Part B,** v. 52, p.1469-1481, 1997.

LEMOS, V. A., et al. A new functionalized resin and its application in reconcentration system with multivariate optimization for nickel determination in food samples. **Talanta.** v. 66, p. 174-180, 2005.

LETELLIER, M. et al. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 364, p. 228–237, 1999.

LUCHESE, B. E.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. Fundamentos da química do solo. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2001. 155p.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D.. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 90-98, 2003.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and intelligent laboratory systems.** v. 42, p. 3-40, 1998.

MACNAEIDHE, F. Procedures and precautions used in sampling techniques and analysis of trace elements in plant matrices. The Science of the Total Environment, v. 176, p.25-31, 1995.

MALAVOLTA, E.; Elementos de nutrição mineral de plantas. 1ª Edição. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E**.; Manual de calagem e adubação das principais culturas**. 1ª Edição. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1987. 496p

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2ª Edição. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

MARKERT, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. **The Science of the Total Environment,** v. 176. 45-61, 1995.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2ª Edição. London: Academic Press, 1995. 902p. 1995.

MASSON, P. Matrix effects during trace element analysis in plant samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with axial view configuration and pneumatic nebulizer. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54. p. 603-612, January, 1999.

MASSUMI, A.; NAJAFI, N. M.; BARZEGARI, H. Speciation of Cr(VI)yCr(III) in environmental waters by fluorimetric method sing central composite, full and fractional factorial design. **Microchemical Journal,** v. 72, p. 93–101, 2002.

MATTINA, I. M. et al. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. **Environmental Pollution**, v. 124, p. 375-378, 2003.

MIERZWA, J. et al., Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 47, p. 1263-1270, 1998.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Estatística para química analítica. 2ª Edição. U.S.A: Addison-Wesley Iberoamerican, 1993. 211p.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F. M. Análise química de tecido vegetal. Londrina: IAPAR, 1992. 17p. (Circular Técnica, 74).

MUNSON, R.D.; NELSON, W. L. Principles and practices in plant analysis. In: WESTERMAN, R.L.; BAIRD, J. V.; CHRISTENSEN, N. W.; FIXEN, P. E.; WHITNEY, D. A. (eds.). **Soil testing and plant analysis.** Madison: SSSA, 1990. 359-388.

NACENTES, C. C. KORN, M.; ARRUDA, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extration of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. Microchemical Journal. v. 69, p. 37-43, 2001.

NASCIMENTO, C. W. et. al. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 28, p.385-392, 2004.

NECHAR et al. Application of Doehlert optimization and factorial designs in developing and validating a solid-phase spectrophotometric determination of trace levels of cadmium. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p. 117-130, 1999.

NETO B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; Como fazer experimentos. 2ª Edição. Campinas, SP: Editora de Campinas, 2003. 401p.

NOBREGA, J. A. Review: Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. Spectrochimica Acta Part B, v. 57, p.1855 – 1876, 2002.

OLIVEIRA, A. J. et al. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília: Embrapa – SEA, 1991.

OLIVEIRA, E. Sample for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **J. Braz. Chem. nº 2,** p.174-182, 2003.

OLIVEIRA, E. Revisão sobre o preparo de amostras e tendências, V Workshop sobre preparo de amostras. FAPESP, São Paulo, 2004.

POLKOWSKA-MOTRENKO, H. et al. Effect of acid digestion method on cobalt determination in plant materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 408, p. 89–95, 2000.

PERÄMAKI, P.; PÖYKIO, R. Acid dissolution methods for heavy metals determination in pine nepples. **Environ. Chem. Lett**. v. 1, 191-195, 2003.

PUGH, R. E.; DICK, D. G.; FREDEEN, A. L. Heavy Metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) Contents of Plant Foliage near the Anvil Range Lead/Zinc Mine, Faro, Yukon Territory. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 52, p.273 – 279, 2002.

QUEVAUVILLER, PH. Conclusions of the workshop – improvements of trace element determinations in plant matrices. **The Science of the Total Environment.** V.176, p. 141-148, 1995.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M. E.; LOPES, A. S.; Análise química do solo para fins de fertilidade**.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. 170p.

RAIJ, B. van; Fertilidade do solo e adubação. São Paulo: Agronômica Ceres/Potafós, 1991. 343p.

RODUSHKIN, I.; RUTH, T.; HUHTASAARI, A. Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. **Analytical Chimica Acta**, v. 378, p. 191-200, 1999.

SAHUQUILLO, A., RUBIO, R., RAURET, G., Classical wet ashing versus microwave-assisted attacks for the determination of chromium in plants. **Analyst**, v.124, p. 1-4, 1999.

SANDRONI, V.; SMITH, C. M.M. Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, p.335-344, 2002.

SANTOS, D. M. et. al. A new procedure for bovine milk digestion in a focused microwave oven: gradual sample addition to pre-heated acid. **Talanta**, v. 65, p. 505-510, 2005.

SILVA, F. C. da (Org.) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de

Tecnologia; Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1999. 370 p.

SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, v.59, p. 555-563, 2002.

SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Review: microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p. 1207 – 1238, 1996.

Statistica for Windows, StatSoft, Inc (2001).2300 East 14th Street, Tulsa, OK 741014, USA.

TAVERNIERS, I.; BOCKSTAELE, E. V.; LOOSE, M. D. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 480-490, 2004a.

TAVERNIERS, I.; BOCKSTAELE, E. V.; LOOSE, M. D. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 535-552, 2004b.

TEIXEIRA, L. A. J.; SANTOS, W. R.; BATAGLIA, O. C. Diagnose nutricional para nitrogênio e potássio em bananeira por meio do sistema integrado de diagnose e recomendação (dris) e de níveis críticos. **Rev. Bras. Frutic**, v. 24, p. 530-535, 2002.

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

TOMÉ JÚNIOR, J. B.; **Manual para interpretação de análise de solo.** Guaíba: Livraria e Editora agropecuária, 2001, 247p.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X.; Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 480-490, p.137-145, 2004.

TÜZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal.** v. 74, p. 289-297, 2003.

VASSILEVA, E. et al. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determinations in environmental samples. **Talanta**, v. 54, p. 187-196, 2001.

VESCHETTI, E. et al. Optimization of H_2O_2 action in sewage-sludge microwave digestion using Δ pressure vs. temperature and pressure vs. time graphs. **Microchemical Journal**, v.67, p. 171-179, 2000.

WIETESKA, E.; ZIÓEK, A.; DRZEWIHSKA, A. Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 330, p. 251-257, 1996.

ZHOU, C.Y. et al. Microwave-assisted diluted acid extraction of trace of metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination, **J. Anal. At. Spectrom.** v. 11, p. 585–590, 1996.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo