

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

Avaliação de métodos de preparo de amostras para
determinação de metais em goma xantana

Michele Barboza da Rosa

Pelotas, agosto de 2014

Michele Barboza da Rosa

**Avaliação de métodos de preparo de amostras para
determinação de metais em goma xantana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química (ênfase em Química Analítica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes
Co-Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Pelotas, agosto de 2014

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “**Avaliação de métodos de preparo de amostras para determinação de metais em goma xantana**”

Elaborada por:
MICHELE BARBOZA DA ROSA

Banca examinadora:

.....
Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora - UFPel)

.....
Profa. Dra. Daiane Dias (FURG)

.....
Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira (UFPel)

***“Ele livra e salva,
e opera sinais e maravilhas no céu e
na terra;
ele livrou Daniel do poder dos
leões”.***

(Daniel 6:27)

Dedico este trabalho:

- A Deus:

- A meu pai Paulo e minha mãe Angela:

- Ao meu irmão Pablo;

- A meu namorado Eliézer.

Por toda a força e apoio oferecido durante este período.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo, agradeço a Deus pela benção em minha vida de me conceder um MILAGRE, por remover a pedra que encontrei em meu caminho, por transformar a minha vida e ressuscitar meus sonhos, podendo assim concluir essa etapa da vida.

Agradeço ao meu pai Paulo e minha mãe Angela pelo amor, carinho, força e dedicação e também por estar sempre ao meu lado me apoiando e me dando suporte para seguir em frente, como anjos colocados na minha vida para me guiar e não deixar desistir. Ao meu irmão pelo amor, pelo carinho, cuidados e palavras de conforto nos momentos em que mais precisei. A minha cunhada Luiza por participar me apoiando neste momento.

Ao meu amor Eliézer, meu namorado, meu amigo e companheiro, por ser tão amoroso, carinho, compreensivo, dedicado e por sempre está ao meu lado me incentivando com lindas palavras. Obrigada meu amor, pelas vezes que eu caí e tu me levantaste com tuas palavras de força, me incentivando a não desistir, pois faltava pouco. Amo-te muito és muito importante na minha vida!

Ao meu sogro Hermes e sogra Elis, cunhado Samuel e cunhada Tialitta por participarem dessa etapa contribuindo com muito carinho.

A toda minha imensa família pelo incentivo em seguir em frente. Em especial, aos meus afilhados Luiza e Gabriel que com um simples sorriso e a palavra “dinda” me deixa radiante de felicidade e com muita energia para seguir em frente.

Ao Programa Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de execução do trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Adriane N. Medeiros, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho, assim como pela confiança depositada esperando a recuperação da minha saúde para finalização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof^o. Anderson Ribeiro, primeiramente pela oportunidade de trabalhar com ele como apoio técnico, assim como por todas as contribuições e ensinamentos dados durante este trabalho, e também pelo espaço concedido de seu laboratório para realização do experimento.

A Prof^a. Mariana Vieira pela contribuição dada durante a execução deste trabalho, e também pelo espaço concedido de seu laboratório para realização do experimento.

A prof^a Solange Cadore, pelo espaço oferecido para realização de estudos para o meu trabalho no Grupo de Espectrometria Atômica do Instituto de Química da UNICAMP.

Aos meus amigos, Marta, Camila Pereira, Alexander e Rodrigo, por todos os momentos de alegria e descontração vividos, assim como pelo aprendizado vivido, e sem esquecer o chimarrão e o churrasco feitos para descontrairmos da pressão do dia-a-dia.

A todos os colegas do Laboratório de Metrologia Química, por todo aprendizado vivido.

A todos os professores do curso de mestrado, pela contribuição da minha formação.

Meu agradecimento especial a banca avaliadora, por sua disposição em estarem contribuindo com este trabalho.

Agradeço ao CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que de certa forma contribuíram para a recuperação e realização deste trabalho.

Resumo

Título: Avaliação de métodos de preparo de amostras para determinação de metais em goma xantana

Autor: Michele Barboza da Rosa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof^o. Dr. Anderson S. Ribeiro

A goma xantana é um polissacarídeo natural, sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Devido suas propriedades reológicas como elevada viscosidade e estabilidade, essa goma vem apresentando inúmeras aplicabilidades industriais, e sendo assim, consequentemente substitui muitos polissacarídeos que são tradicionalmente utilizados. Para a produção desta, são adicionados ao meio de cultivo das bactérias sais contendo metais, os quais influenciam diretamente nas propriedades reológicas da goma. Neste trabalho, foram avaliados três diferentes métodos de preparo de amostras baseados na decomposição ácida de goma xantana para posterior quantificação de Na, K, Ca e Mg por técnicas espectrométricas. Os métodos avaliados foram a decomposição ácida em sistema aberto (utilizando mistura de HNO₃/HClO₄), com sistema de refluxo (utilizando apenas HNO₃) e fechado por micro-ondas (utilizando mistura de HNO₃/H₂O₂). A decomposição ácida das amostras utilizando um sistema de refluxo apresentou-se como uma estratégia analítica simples e econômica, permitindo uma eficiência no preparo das amostras. Sendo assim, a exatidão do método utilizando o sistema de refluxo foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos entre os métodos de digestão, bem como através de testes de adição e recuperação, os quais variaram entre 90 a 102%. Os Limites de detecção foram de 0,04, 0,02, 0,02 e 0,001mg g⁻¹ para Na, K, Ca e Mg, respectivamente.

Palavras-chave: Goma xantana, preparo de amostras, metais, Espectrometria atômica.

ABSTRACT

Title: Evaluation of methods of sample preparation for determination of metals in xanthan gum.

Author: Michele Barboza da Rosa

Mastermind: Prof^a. Dr^a. Adriane N. Medeiros

Co-mastermind: Prof^o. Dr. Anderson S. Ribeiro

Xanthan gum is a natural polysaccharide, synthesized by bacteria of the genus *Xanthomonas*. Due to its rheological properties such as viscosity and high stability has shown that gum numerous industrial applicability, and thus, consequently replaces many polysaccharides which are traditionally used. For the production of this, are added to the culture medium of bacteria containing metal salts, which directly influence the rheological properties of the gum. In this study, we evaluated three different methods of preparation of samples based on acid decomposition of xanthan gum for later quantification of Na, K, Ca and Mg by spectrometric techniques. The methods evaluated were the acidic decomposition open system (using mixture of HNO₃ / HClO₄), with the reflux system (using only HNO₃) and closed by microwave (using mixture of HNO₃ / H₂O₂). The acid decomposition of the samples using a reflux system was presented as a simple and economical analytical strategy, enabling efficient sample preparation. Thus, the accuracy of the method using the reflux system was evaluated by comparing the results obtained from the methods of digestion, as well as through addition and recovery test, which varied from 90 to 102 %. The detection limits were 0.04, 0.02, 0.02 and 0,001mg g⁻¹ for Na, K, Ca and Mg, respectively.

Keywords: Xanthan gum, sample preparation, metals, atomic spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bactérias do gênero <i>Xanthomonas campestris</i> (A) visualizada pela microscopia de transmissão eletrônica; (B) desenvolvimento da bactéria em meio de cultura.....	07
Figura 2 – Esquema de preparo do inóculo.....	08
Figura 3 – Esquema da produção da goma xantana.....	11
Figura 4 – Estrutura molecular da goma xantana.....	12
Figura 5 – Componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica.....	18
Figura 6 – Sistema de nebulização e atomização em chama.....	19
Figura 7 – Processos que ocorrem durante a atomização por F AAS.....	20
Figura 8 – Processos de emissão e absorção atômica.....	23
Figura 9 – Componentes básicos de um F AES.....	23
Figura 10 – Formas de aquecimento: condutivo e por micro-ondas.....	29
Figura 11 – Esquema de um forno micro-ondas.....	30
Figura 12 – Desenho esquemático de (A) “dedo frio”, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com refluxo.....	32
Figura 13 – (A) esquema do sistema de refluxo e (B) imagem real.....	34
Figura 14 – Sistema de decomposição convencional aberto.....	39
Figura 15 – (A) tubos contendo amostra e ácido com o sistema de refluxo acoplado e (B) decomposição em andamento.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas de goma xantana comercial.....	13
Tabela 2 – Aplicação do sistema de refluxo para o preparo de amostras....	33
Tabela 3 – Condições operacionais do fotômetro de chama.....	36
Tabela 4 – Condições operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama utilizadas para as determinações analíticas de Ca e Mg.....	37
Tabela 5 – Programa de temperatura e tempo do micro-ondas.....	41
Tabela 6 – Teor de carbono total residual para os três diferentes métodos de preparo de amostras (n = 3).....	46
Tabela 7 – Parâmetros de méritos para as curvas analíticas.....	47
Tabela 8 – Parâmetros de mérito para os estudos da faixa linear para o elemento Na em meio aquoso F AES.....	48
Tabela 9 – Resultados analíticos para Na, K, Ca e Mg em amostras comerciais de goma xantana após diferentes procedimentos de preparo e determinados por F AAS e F AES, (n = 3).....	49
Tabela 10 – Teor de sais monovalentes e bivalentes em amostras de goma xantana comerciais.....	51
Tabela 11 – Valores de recuperação para a amostra farmacêutica utilizando sistema de refluxo, (n = 3).....	52
Tabela 13 – Valores quantificados de Na, K, Ca e Mg em amostras de goma xantana pruni após decomposição com sistema de refluxo (n = 3).....	53
Tabela 14 – Teor de sais monovalentes e bivalentes em amostras de goma xantana pruni.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês Atomic Absorption Spectrometry)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
CVG AAS	Geração química de vapor (do inglês Chemical Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry)
EDL	Lâmpadas de descarga sem eletrodo (do inglês Electrodeless Discharge Lamp)
EUA	Estados Unidos da América
F AAS	Espectroscopia de absorção atômica em chama (do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry)
F AES	Espectrometria de emissão atômica em chama (do inglês Flame Atomic Emission Spectrometry)
FDA	Food and Drug Administration
GF AAS	Espectroscopia de absorção atômica em Forno de grafite (do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)
GLP	Gás liquefeito de petróleo
HCL	Lâmpadas de cátodo oco (do inglês Hollow-Cathode Lamp)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
LD	Limites de detecção
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
OMS	Organização Mundial da Saúde
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
R²	Coeficiente de correlação linear
Rpm	Rotação por minuto

RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês Relative Standard Deviation)
S	Sensibilidade
SD	Desvio Padrão (do inglês Standard Deviation)
\bar{x}	Média

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	04
2.1. Objetivos gerais.....	04
2.2. Objetivos específicos.....	04
3. Revisão da literatura.....	05
3.1. Histórico da goma xantana.....	05
3.2. Goma xantana.....	06
3.2.1. Xanthomonas	06
3.2.2. Produção da goma xantana.....	07
3.2.3. Propriedades reológicas.....	13
3.2.3.1. Influência do teor de sais na reologia da goma.....	14
3.3. Técnicas analíticas para determinação de metais.....	15
3.4. Espectrometria Atômica.....	17
3.4.1. Histórico de AAS.....	17
3.4.2. Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS).....	18
3.4.2.1. Interferências em F AAS.....	20
3.4.3. Espectrometria de emissão atômica em chama (F AES).....	22

3.5. Preparo de Amostras.....	24
3.5.1. Métodos para preparo de amostras de goma xantana.....	25
3.5.2. Decomposição via seca (calcinação).....	25
3.5.3. Decomposição ácida em sistema aberto.....	26
3.5.4. Decomposição ácida em sistema fechado (micro-ondas).....	28
3.5.5. Decomposição ácida utilizando sistema de refluxo.....	31
4. Materiais e Métodos.....	36
4.1. Instrumentação.....	36
4.2. Reagentes e Materiais.....	38
4.3. Amostras.....	39
4.4. Métodos de preparo das amostras.....	39
4.4.1. Método 1 – Decomposição ácida em sistema aberto (Convencional).....	39
4.4.2. Método 2 – Decomposição ácida com Sistema de Refluxo.....	40
4.4.3. Método 3 – Decomposição ácida em sistema fechado (micro-ondas).....	41
4.5. Metodologia.....	42
4.5.1. Determinação do teor de acidez e carbono residual....	42
4.5.2. Definição dos parâmetros de mérito.....	43

4.5.3.	Estudo para definição da faixa linear de Na por F AES	44
4.5.4.	Avaliação da exatidão.....	44
5.	Resultados e Discussões.....	45
5.1.	Avaliação da eficiência dos métodos de preparo de amostras.....	45
5.1.1.	Teor de acidez e carbono total residual.....	45
5.2.	Parâmetros de mérito.....	47
5.3.	Estudos da faixa linear para Na em F AES.....	48
5.4.	Resultados analíticos para determinação de Na, K, Ca e Mg para amostras de goma xantana comercial.....	48
5.5.	Aplicação da metodologia analítica.....	53
6.	Considerações Finais.....	55
7.	Referências Bibliográficas.....	56

1. Introdução

A goma xantana é um polissacarídeo natural de cadeia longa e alto peso molecular, a qual é sintetizada por diversas espécies de bactérias *xanthomonas*. É solúvel em água e com isso apresenta a capacidade de tornar uma solução altamente viscosa mesmo em baixas concentrações. Por se tratar de um biopolímero e possuir propriedades como elevada viscosidade, pseudoplasticidade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, este vem apresentando elevado interesse industrial em diversas áreas como: indústria de alimentos, petroquímica, agro-química, química, bem como nas áreas médicas, de fármacos, de cosméticos, entre outras [1, 2].

Por apresentar propriedades reológicas importantes industrialmente e, também não ser tóxica à saúde humana, a xantana vem sendo amplamente empregada na indústria de alimentos no Brasil e em outros países [2]. Em 1965 no Brasil, através do decreto de lei nº 55.871^a, o emprego de aditivos em alimentos foi regulamentado [3], enquanto nos Estados Unidos (EUA) foi em 1969 que a Food and Drug Administration (FDA) liberou a utilização desta em vários setores industriais, como por exemplo, na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos, sem estabelecer limites quantitativos específicos [2].

Para a produção da goma xantana é necessário a adição de nutrientes ao meio de cultivo, que servem como substrato para as bactérias e influenciam diretamente no rendimento da produção. Fontes de macronutrientes, como C e N, são adicionados, sendo o C proveniente da adição de açúcares como glicose e sacarose e o N provém do glutamato ou de sais de amônio (NH_4^+) [4].

Também são adicionados, no meio de produção ou pós-fermentação, micronutrientes como sais de Ca, Mg, K, Na entre outros, os quais são necessários para o desenvolvimento das bactérias [4,5].

As concentrações desses sais influenciam diretamente nas propriedades reológicas da xantana, assim como também em sua produção [6]. Deste modo, uma quantificação desses metais se faz necessária, uma vez que o acréscimo desses cátions na goma pode interferir na sua aplicação industrial [7]. Para isso, é importante desenvolver e/ou melhorar os métodos analíticos já existentes, a fim de se obter simplicidade, segurança e rapidez para o controle de qualidade desse polissacarídeo.

Dentre as técnicas analíticas disponíveis para a determinação de Na e K, a Espectrometria de Emissão Atômica em Chama (F AES, do inglês Flame Atomic Emission Spectrometry), é a mais utilizada por se tratar de uma técnica simples, onde a amostra é inserida em uma chama e a concentração dos analitos são determinadas pela quantidade de energia emitida [8]. Para a determinação de Ca e Mg, a espectroscopia de absorção atômica em chama (F AAS, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) se destaca por ser uma técnica bem consolidada, a qual vem sendo utilizada para determinação de elementos em baixas concentrações e em diferentes tipos de amostras [9].

Independentemente do método analítico a ser adotado para a determinação das espécies químicas, fica subentendido que o método de preparo da amostra deve ser compatível. Dentre os métodos de preparo de amostras, é válido destacar a decomposição da amostra por via úmida, onde a matéria orgânica é decomposta através da utilização de reagentes oxidantes, como ácidos, mistura de ácidos ou mistura de ácido com H_2O_2 e aquecimento por tempo adequado. Através desse procedimento, é possível obter em solução os elementos a serem determinados na forma de íons, o que torna a amostra apropriada para uma análise instrumental [10].

Recentemente, como alternativa ao método de calcinação para o preparo de amostras de goma xantana, o qual é descrito como método oficial, foi proposto um procedimento que baseia-se na decomposição ácida empregando uma mistura de ácidos inorgânicos oxidantes, como HNO_3 e $HClO_4$, em sistema aberto a uma temperatura abaixo do ponto de ebulição dos ácidos empregados [11].

Cabe salientar que, em sistemas abertos de decomposição de amostras, é difícil obter uma oxidação completa da amostra utilizando apenas HNO_3 para amostras com matrizes mais complexas, por isso a utilização da mistura nitroperclórica, se faz necessária para a decomposição destes tipos de amostras, como a goma xantana. No entanto, a utilização deste meio oxidante merece especial atenção devido aos riscos de explosão, provocada pela formação de percloratos instáveis [10].

Sendo assim, o desenvolvimento de metodologias simples e seguras de decomposição ácida de amostras de goma xantana torna-se atrativas, a fim de

se obter resultados satisfatórios para determinações quantitativas de metais utilizando técnicas de espectrometria atômica.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar três diferentes métodos de preparo de amostras utilizando decomposição ácida para posterior determinação de Na, K, Ca e Mg em goma xantana por técnicas espectrométricas.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Decompor as amostras de goma xantana apenas utilizando HNO_3 e bloco digestor com sistema de refluxo;
- ✓ Comparar a decomposição utilizando o sistema de refluxo com as decomposições em sistema aberto e fechado por micro-ondas;
- ✓ Verificar a exatidão do método desenvolvido, através de ensaios de adição e recuperação;
- ✓ Comparar os resultados obtidos dos três métodos de preparo de amostra através de teste estatístico, a fim de verificar a exatidão do método;
- ✓ Aplicar o método de decomposição ácida com sistema de refluxo em amostras de goma xantana produzidas pelo Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

3. Revisão da Literatura

3.1. Histórico da Goma Xantana

A goma xantana é sintetizada pelas bactérias *xanthomonas*, as quais produzem com a função de defesa contra o ataque de amebas, fagócitos e bacteriófagos, além de atuar também como proteção contra dessecação. Para os humanos, essa goma tem a função de tornar as soluções mais viscosas, uma vez que trata-se de um polissacarídeo de origem microbiana, apresentando-se como uma alternativa aos polissacarídeos existentes que são de origem vegetal [5].

Foi descoberta na década de 50, por pesquisadores norte-americanos no *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, os quais estudavam microrganismos que sintetizassem gomas solúveis em água para aplicação comercial [12–14]. Foi o primeiro polissacarídeo a possuir significado comercial, devido as suas inúmeras propriedades que são importantes na aplicação industrial [15].

A partir de 1960, algumas indústrias fizeram estudos em seus laboratórios visando a produção semi-comercial da goma Kelzan pela empresa Kelco (EUA) [14]. Em 1961, houve a caracterização e isolamento da mesma, e a primeira publicação importante foi feita [16]. Estudos continuaram sendo desenvolvidos e alguns anos após, em 1964, foi viabilizada a produção comercial com propósito industrial do biopolímero, sendo então aplicada em produtos não alimentícios [14].

Em 1967, teve início à produção de xantana no comércio norte americano e, logo após, foi produzida comercialmente na Europa, tornando-se assim um modelo para produção de diferentes biopolímeros [16]. Como já citado anteriormente, em 1965 foi quando o Brasil liberou a utilização de aditivos em alimentos, sendo que não há especificação para o uso da xantana [3], enquanto que nos EUA em 1969 a goma foi aprovada para ser utilizada como aditivo alimentar pela FDA [2, 13, 15,16].

Segundo Palanira e Jayaraman [12], estudos sobre a produção, a matéria-prima empregada na fermentação e aplicações industriais ainda estão sendo realizadas, uma vez que essa goma trata-se de um polissacarídeo que

apresenta uma vasta gama de aplicações comerciais. Atualmente, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem em vigor um compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares que informa o limite máximo deste em alimentos, o qual incluiu a quantidade máxima permitida de xantana em alguns alimentos, que varia de 0,05 a 1,0 g/100g de produto [17].

3.2. Goma Xantana

3.2.1. *Xanthomonas*

As bactérias do gênero *xanthomonas* de diferentes espécies são utilizadas para a produção da goma xantana. Dentre essas é possível citar: *Xanthomonas melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* [1], *Xanthomonas arborícola* pv *pruni* [6], *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas juglandis* [18] entre outras. Porém, a que apresenta destaque na produção comercial são as *xanthomonas campestris* [18].

As bactérias do gênero *xanthomonas* e da espécie *campestris* dão origem a goma xantana por processo fermentativo. Essas bactérias são comumente utilizadas em escala industrial para a produção da goma [4, 5,19,20]. São fitopatogênicas, ou seja, causam doenças em plantas, além de tratar-se de um micro-organismo aeróbio e gram-negativo. Como descrição, essas caracterizam-se por apresentarem hastes retas, medindo de $0,4 \pm 0,7$ μm de largura por $0,7 \pm 1,8$ μm de comprimento. As células são móveis possuindo um único flagelo e as colônias são em geral de pigmentação amarela, lisa e viscosa. A Figura 1 demonstra as *xanthomonas campestris* [4, 21].

Xanthomonas campestris é uma bactéria que infecta uma variedade de plantas, podendo afetar a produtividade agrícola causando prejuízo as lavouras, pois quando o micro-organismo entra em contato com o vegetal pode causar lesões, caracterizadas por veias amarelas e negras, nas raízes, folhas, frutos, ramos causando a morte do vegetal [5, 19, 22]. Ao infectar a planta, a bactéria produz um polissacarídeo de alto peso molecular, caracterizado como sendo a goma xantana [5].

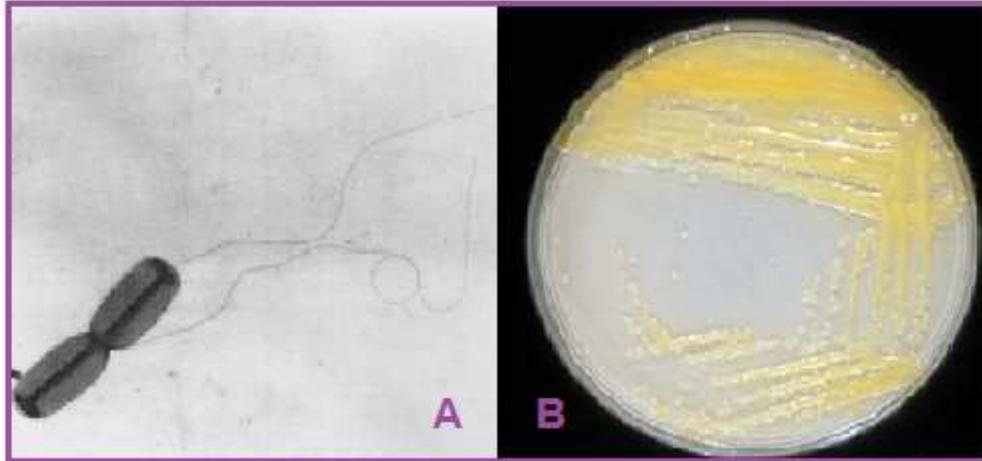


Figura 1 – Bactérias do gênero *Xanthomonas campestris* (A) visualizada pela microscopia de transmissão eletrônica; (B) desenvolvimento da bactéria em meio de cultura. Adaptado de García-ochoa e Vicente [4, 22].

Os meios de cultivo para o crescimento das bactérias *xanthomonas* são complexos ou semi-complexos [4], ou seja, o meio complexo caracteriza-se por conter produtos cujo a composição química não é corretamente definida [23]. O crescimento do micro-organismo em ambos os meios é muito semelhante, assim como o rendimento da biomassa são próximos [4].

3.2.2. Produção da Goma Xantana

Para a produção da goma xantana, primeiramente é necessário propiciar uma reprodução bacteriana, ou seja, criar um inóculo sob condições apropriadas para se obter uma quantidade capaz de ser utilizada em um processo fermentativo. Para essa fermentação e produção, a bactéria necessita de nutrientes, macronutrientes (como C e N) e de micronutrientes (como K, Fe e Ca) [5,12]. A Figura 2 mostra um esquema de formação do inóculo tanto em fase laboratorial como industrial.

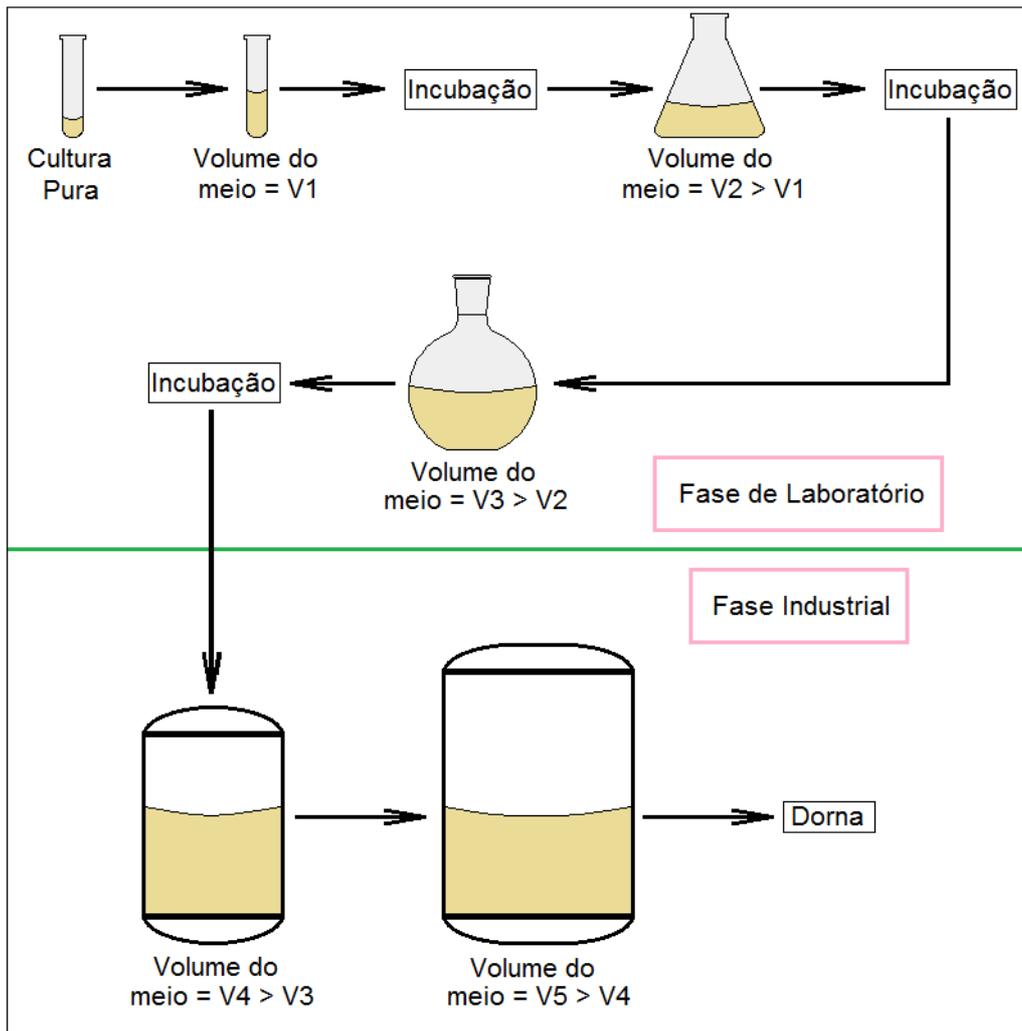


Figura 2 – Esquema de preparo do inóculo. Adaptado de Schmidell e colaboradores [24].

Considerando os macronutrientes, as fontes de C mais frequentemente utilizadas no meio de cultivo são a glicose e a sacarose, servindo também como fonte de energia aos microrganismos. Já para o N, podem ser utilizados o glutamato, nitrato de sódio e nitrato de amônio como as principais fontes. Contudo, o glutamato destaca-se das demais fontes por apresentar resultados experimentais satisfatórios. Essa relação entre a quantidade de C e N é um fator muito importante e que deve ser avaliada durante todo o processo, uma vez que a elevada concentração de N reflete em um rápido crescimento celular, mas, em contrapartida, também pode influenciar inadequadamente nas propriedades reológicas da goma [4, 5, 19].

Além das fontes de macronutrientes citadas, a literatura reporta o uso de inúmeras outras fontes possíveis para esse processo fermentativo. Kumara e colaboradores [2] desenvolveram um estudo para avaliar diferentes fontes de C e N para a produção de goma xantana. Neste estudo foi utilizado glicose, sacarose, maltose e lactose como fontes de C e, para N, os autores fizeram o uso de extrato de carne, peptona, triptona e extrato de leveduras. De acordo com os resultados experimentais, os autores concluíram que sacarose e extrato de leveduras foram as principais fontes de C e N, respectivamente, apresentando um maior percentual de goma no final do processo.

Devido à grande demanda de goma xantana anualmente, a produção utilizando glicose ou sacarose como fontes de carbono, pode tornar-se economicamente inviável [13]. Com isso, a literatura informa diferentes fontes alternativas e de baixo custo, capazes de gerar bons rendimentos e garantir a qualidade da goma, tais como: arroz hidrolisado, cevada, farinha de milho, soro de leite, soro de queijo, melão de cana, polpa de beterraba, polpa de pêsego, amido de mandioca, entre outros [12, 13].

As condições operacionais empregadas no processo de produção também são extremamente importantes, pois essas podem influenciar diretamente no rendimento e na qualidade da goma xantana. A temperatura empregada na produção pode variar dentro da faixa de 25 a 34 °C, mas a comumente utilizada, por apresentar maiores rendimentos, é a de 28 °C [4, 5, 12]. Outro fator que exige atenção é o pH, uma vez que durante a produção da goma xantana tem-se a formação de grupos ácidos, o que decresce o valor de pH para próximo de 5. Para alcançar a condição de neutralidade, a qual é dita como ótima, o pH pode ser ajustado com adições de KOH, NaOH ou NH₄OH [5].

A agitação dos reatores durante o processo também pode influenciar no rendimento da produção, pois está diretamente ligada com a taxa de transferência de oxigênio durante a fermentação. A agitação em média recomendada é de 500 rpm, uma vez que, segundo Garcia-Ochoa e colaboradores [4], valores inferiores podem registrar limitações de oxigênio e valores superiores levam ao baixo crescimento celular, o que caracteriza-se em uma situação de rendimento desfavorável. Todo o processo fermentativo pode

levar um tempo que varia de 48 a 96 horas, o que será definido a partir da disponibilidade de nutrientes no meio [4].

A etapa de recuperação da goma a partir do caldo fermentado, em geral é um processo difícil e de alto custo. Neste processo é obtido aproximadamente 10 a 30 g L⁻¹ de goma xantana, 1 a 10 g L⁻¹ de células e 3 a 10 g L⁻¹ de nutrientes residuais e outros metabólitos [4, 5, 13]. Devido à alta viscosidade, ou seja, elevada concentração de goma no caldo, a retirada da biomassa torna-se difícil, sendo assim, uma diluição em algum dos processos normalmente é feita, facilitando então a remoção da goma [5].

As principais etapas de recuperação da goma envolvem a desativação da atividade celular microbiana para posterior remoção da mesma, precipitação do biopolímero, lavagem, secagem, moagem e empacotamento [4, 5, 12]. O tratamento de purificação da goma dependerá da utilização do polissacarídeo, ou seja, para uma aplicação farmacêutica é necessária uma purificação mais criteriosa do que quando comparada com uma aplicação em indústria petrolífero.

A pasteurização do caldo (tratamento térmico) é utilizada para a desativação das células, pois a alta temperatura leva a degradação do microrganismo, aumenta a remoção de xantana das células e também promove a diminuição da viscosidade do meio. Essa mudança na viscosidade favorece a retirada de partículas insolúveis e células indesejáveis por centrifugação ou filtração [4, 5, 12, 13]. A utilização de tratamento em condições apropriadas (80 – 130 °C, 10 – 20 min, pH 6,3 – 6,9) proporciona a dissolução da goma sem ocorrer degradação térmica, mas, em contrapartida, ocorre o rompimento das células [5].

Após a eliminação das células, o biopolímero é precipitado através de métodos que utilizam adições de sais e/ou solventes orgânicos. Contudo, a técnica normalmente empregada é a precipitação com álcool, podendo ser utilizado neste processo metanol, etanol ou isopropanol. Após essa etapa, a goma xantana é purificada com adições de água, seca em estufa até peso constante (remoção da umidade), triturada e acondicionada. A Figura 3 apresenta um esquema da produção desse biopolímero.

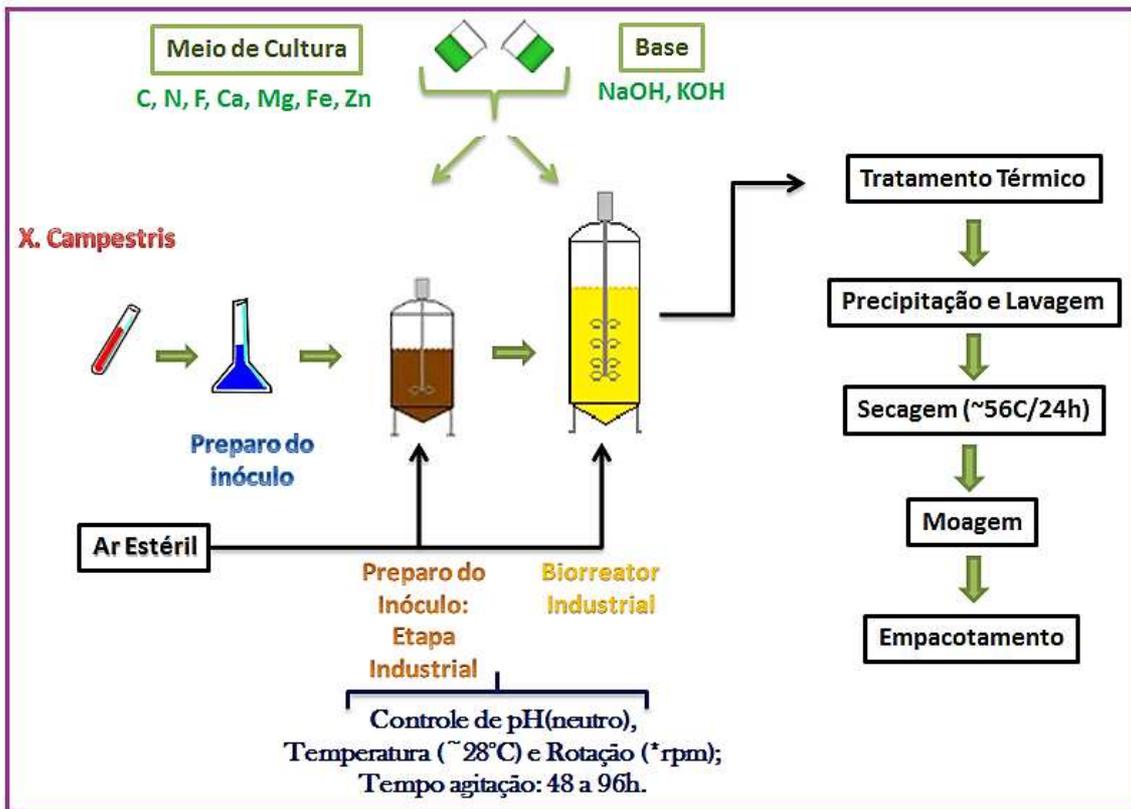


Figura 3 – Esquema da produção da goma xantana. Adaptado de Lima e colaboradores [25].

Em termos de estrutura molecular, a xantana é composta por repetidas unidades pentassacarídicas, contendo D-glicose, D-manose, D-ácido glicurônico, ácido pirúvico e grupos acetato [14, 21]. A Figura 4 mostra a estrutura da goma xantana.

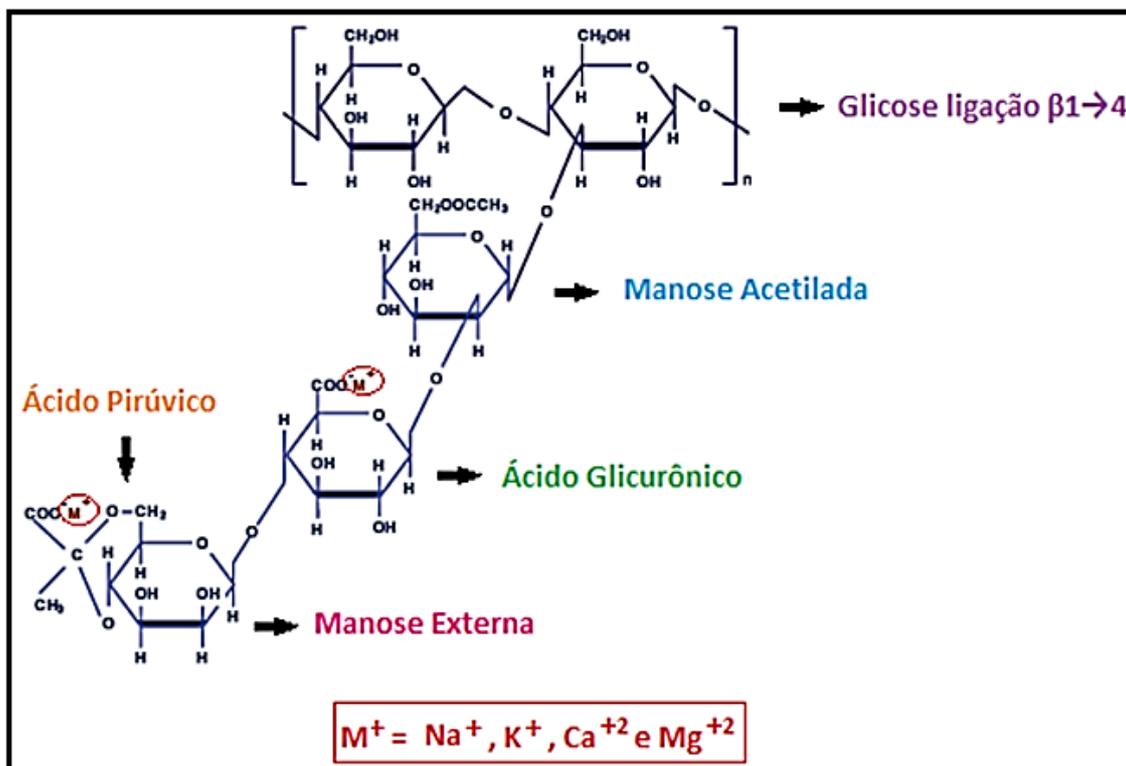


Figura 4 – Estrutura molecular da goma xantana. Adaptado de García-Ochoa e colaboradores [4].

A determinação exata da massa molar da goma xantana é um processo difícil, o que deve-se a complexidade da estrutura molecular, bem como a tendência desse polissacarídeo formar agregados em solução. Além disso, essa grandeza também pode ser influenciada pelo microrganismo produtor e pelas condições operacionais aplicadas durante a fermentação. A literatura reporta uma ampla faixa de valores propostos para a massa molar, a qual varia de 1,1 a $47 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ [14].

A Tabela 1 mostra algumas das propriedades físicas desse polissacarídeo.

Tabela 1 – Propriedades físicas de goma xantana comercial. Adaptada de Garcia-Ochoa e colaboradores [4].

Propriedades	Valor
Estado físico	Seco, em pó com coloração creme
Umidade (%)	8 – 15
Cinza (%)	7 – 12
Nitrogênio (%)	0,3 – 1
Acetato (%)	1,9 – 6
Piruvato (%)	1 – 5,7
Sal monovalente (g L ⁻¹)	3,6 – 14,3
Sal divalente (g L ⁻¹)	0,085 – 0,17
Viscosidade á temperatura ambiente (mPa.s)	13 – 35

Em termos de exposição humana a esse biopolímero, a literatura reporta que trata-se de um material sem riscos toxicológicos para a saúde. Segundo um estudo de caso relatado por Fiume e colaboradores [26], cinco pessoas do sexo masculino consumiram 150 mg Kg⁻¹ diários de goma xantana durante 23 dias, e não apresentaram efeitos adversos significativos sobre a hematologia, química clinica ou sistema urinário. Apesar disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma dose aceitável diária para ingestão humana de até 10 mg Kg⁻¹ de goma [27].

3.2.3 Propriedades Reológicas

A reologia consiste basicamente em uma ciência que estuda a mobilidade dos fluidos, a qual pode ser avaliada correlacionando o comportamento mecânico com a estrutura do material em questão. Para verificar a qualidade de um polímero, um dos parâmetros que deve se levado em consideração é a reologia, para qual se utiliza análises de viscosidade e viscoelasticidade [14].

A goma xantana possui alta solubilidade tanto em água fria como quente, apresentando elevada viscosidade até mesmo em soluções de baixas concentrações. Essa viscosidade tende a aumentar conforme as soluções se

tornem mais concentradas, devido às interações intermoleculares e entrelaçamentos que ocorrem no acréscimo da macromolécula e no peso molecular [4, 14, 28]. A reologia dessas soluções pode variar de acordo com as diferentes cepas, bem como os processos utilizados para obtenção do biopolímero [28]. Em termos de variações no pH, a viscosidade não é fortemente afetada pela mudança de pH entre 1-2 a 11-13 [4, 14].

A composição química influencia diretamente no comportamento reológico desse polissacarídeo, como por exemplo, uma alta concentração de piruvato (> 4 %) apresenta uma viscosidade superior do que aquelas com conteúdo inferior (0,5 a 3 %). Isso se deve, pois o piruvato é capaz de promover a formação de macroestrutura pelo aumento na afinidade polímero-polímero. Além desse, variações na proporção entre glicose, manose e ácido glicurônico, as quais são decorrentes de cepas de diferentes espécies, também influenciam na reologia de soluções de xantana [14, 28]. Segundo Borges e Vendruscolo [14] uma maior quantidade de manose e ácido glicurônico aumentam a viscosidade das soluções. Outro parâmetro que merece atenção é a concentração de sais no meio, os quais também são responsáveis por mudanças nessa propriedade física [28].

3.2.3.1. Influência do teor de sais na reologia da goma

As soluções de goma xantana podem apresentar alterações na sua reologia com adições de sais, tais como NaCl e KCl [28]. Esses sais são frequentemente adicionados na etapa de precipitação da goma, uma vez que são responsáveis por proporcionar uma diminuição da viscosidade da solução [12]. Isso se deve, pois a adição de sais aumenta a força iônica, alterando a conformação da molécula, a qual passa para uma forma mais compactada [29].

Outros reagentes também podem ser adicionados tanto na etapa de produção como na precipitação da goma, os quais contêm íons de Fe^{+3} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} entre outros influenciando diretamente no comportamento reológico [4, 5, 11]. Contudo, as amostras comerciais devem apresentar um teor de sais monovalentes total de 3,6 a 14,3 % (m/m) e de sais bivalentes entre 0,085 e 0,17 % (m/m) [4].

Bergmann e colaboradores [7] desenvolveram um estudo para avaliar o comportamento da goma xantana após a interação com diferentes cátions bivalentes. Neste estudo foi apresentado um gráfico que relaciona a concentração de íons Ca^{+2} e a viscosidade de uma solução de goma xantana, com o qual foi possível concluir uma diminuição na viscosidade à medida que a concentração do íon foi aumentada. Ainda sobre esse mesmo estudo, os autores relatam que esse comportamento descrito para Ca^{+2} é semelhante para os íons bivalentes avaliados (Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd e Pb).

Considerando o uso de goma xantana industrialmente, cerca de 65 % do total produzido é destinado em indústria de alimentos, 15 % em indústria petrolífera e 20 % em áreas diversas [30]. Com isso, as indústrias alimentícias buscam xantanas com alta viscosidade, uma vez que quanto menor o percentual utilizado para atingir a textura, viscosidade ou estabilidade desejada, menor será a interferência na cor do produto final. Da mesma forma, o uso de um polissacarídeo com essa característica também é desejado na área petrolífera, pois a utilização de pequenas quantidades interfere pouco no volume final dos fluidos de perfuração [31, 32].

Com base nisso, é evidente a importância de conhecer as características reológicas desse biopolímero para as suas devidas aplicações. Além dos vários parâmetros citados que influenciam na viscosidade das soluções de goma xantana, a determinação da concentração de metais como Na, K, Ca e Mg se tornam de extrema importância para o seu controle de qualidade, uma vez que isso reflete diretamente nas características do polissacarídeo e conseqüentemente na sua finalidade industrial.

3.3. Técnicas analíticas para determinação de metais

A análise química tem como principal meta a determinação de diferentes tipos de espécies químicas em diversos tipos de amostras. Para isso, deve-se levar em consideração algumas etapas essenciais para a realização da análise desejada. Essas etapas constituem uma sequência analítica, e está organizada como definição do problema, escolha do método, amostragem, preparo das amostras, calibração, medida, avaliação e ação [10].

Para a determinação de analitos, de uma forma geral, é necessária extrema atenção principalmente na etapa de amostragem e preparo das amostras, pois uma vez mal conduzidas essas etapas, pode haver uma grande probabilidade de erro nas análises, por perdas do analito por volatilização e/ou adsorção. Além disso, quando se realiza uma análise de qualquer natureza, é indispensável à prevenção de qualquer tipo de contaminação, seja na amostra ou no material a ser utilizado [33, 34].

Outra etapa fundamental é a escolha da técnica para a determinação de metais, pois dependendo da concentração do elemento presente na amostra, essa técnica deve apresentar sensibilidade adequada para análise. Além disso, é importante também levar em consideração a natureza e a quantidade de amostra disponível para proceder às análises [35, 36].

De acordo com a literatura, diversas técnicas instrumentais analíticas podem ser utilizadas para a determinação de metais, tais como: Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (F AAS) ou em Forno de Grafite (GF AAS), Espectrometria de Emissão Atômica em Chama (F AES), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) e a Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), as quais se destacam por serem as mais empregadas para esse tipo de análise, tanto em pesquisa como em rotina industrial [35, 37].

As técnicas citadas anteriormente, podem ser diferenciadas em termos de sensibilidade e limites de detecção (LD), ou seja, capacidade de detecção da menor quantidade de analito. Das técnicas de plasma indutivamente acoplado, a espectrometria de massas apresenta uma maior sensibilidade, quando comparada a espectrometria de emissão óptica. Como vantagens de ambas as técnicas é a capacidade de detecção multielementar, o que caracteriza uma maior rapidez para a obtenção das informações de interesse. Entretanto, um alto custo está associado a esta técnica, podendo tornar-se inviável para algumas análises químicas [38, 39].

A técnica de AAS é bastante difundida dentro da química analítica, a qual é caracterizada por apresentar um baixo custo de operação quando comparada com as técnicas de plasma citadas anteriormente. Além disso, pode operar em dois principais modos de atomização, com as quais é possível a quantificação de diversos elementos com sensibilidades distintas [38, 40].

Para a determinação de Ca, K, Mg e Na, as técnicas de F AAS e F AES apresentam sensibilidade e seletividade adequada de análise, podendo serem empregadas para análises de diversos tipos de amostras.

3.4. Espectrometria Atômica

3.4.1. Histórico de AAS

O nascimento da AAS surgiu a partir da observação de um espectro solar, no qual foi possível perceber a existência de algumas linhas pretas devido ao processo de absorção na atmosfera solar. Contudo, o princípio da espectrometria atômica começou a ser melhor entendido com um experimento realizado por Kirchhoff e Bunsen em 1860, o qual baseava-se na utilização de um sal de sódio que era aquecido sobre uma chama e o espectro gerado era então avaliado. Este estudo ficou conhecido como “reversão de linhas”, o qual a partir dele foi possível concluir que todos os corpos podem absorver radiação na mesma intensidade emitida [40].

Alguns anos depois, por volta de 1952, Alan Walsh apresentou as condições experimentais necessárias para aplicação da AAS, o que rendeu a ele um grande reconhecimento na comunidade científica, pois passou a ser considerado o “pai” da AAS moderna [40, 41].

Essa técnica geralmente é monoelementar e baseia-se na medida da intensidade de absorção de energia por átomos no estado fundamental e gasoso. Conseqüentemente, após a absorção de energia, tais átomos passaram para um estado excitado de maior energia [40, 42].

Em AAS, o processo de absorção de átomos se dá após esses serem atomizados no estado fundamental, formando uma nuvem atômica no caminho ótico. A quantificação pode ser realizada por F AAS, GF AAS ou em tubos (ex. quartzo) para as técnicas de geração química de vapor (CVG AAS). A Figura 5 mostra os componentes básicos de um espectrômetro com destaque para os tipos de atomizadores que podem ser empregados comercialmente.

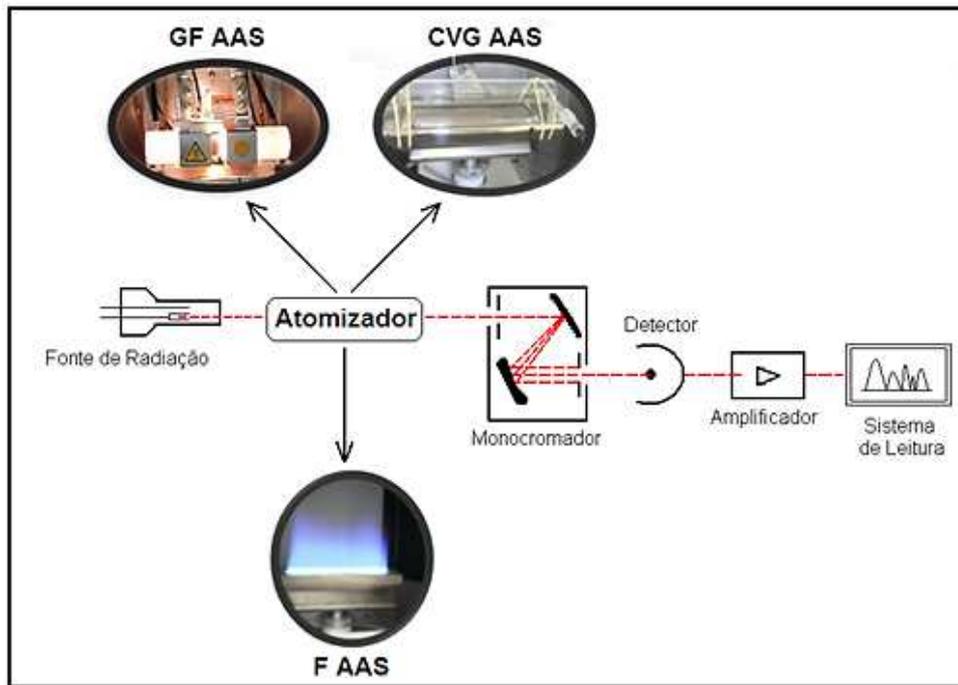


Figura 5 – Componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica.

Com base nos componentes básicos de um espectrômetro, apresentado na Figura 5, as fontes de radiação mais utilizadas são as lâmpadas de cátodo oco (HCL) e ou lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL), as quais emitem radiação específica de mesmo comprimento de onda do elemento a ser determinado [42].

3.4.2. Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)

Em um atomizador por chama, a solução da amostra é aspirada através do uso de um nebulizador pneumático, o qual é operado por meio de fluxo de ar à alta pressão [42]. A Figura 6 apresenta um esquema para atomização em chama.

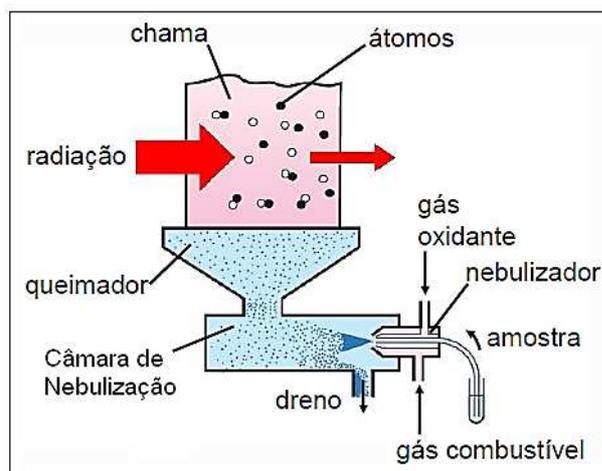


Figura 6 – Sistema de nebulização e atomização em chama. Adaptado de Shimadzu [43].

Conforme visualizado na Figura 6, na câmara de nebulização o líquido aspirado é transformado em um aerossol, o qual é então conduzido até o atomizador. Na chama, o solvente é evaporado produzindo partículas finamente divididas (processo chamado de dessolvatação), seguido da volatilização dessas partículas para a formação de moléculas gasosas, as quais são subsequentemente dissociadas a átomos, que irão absorver a energia proveniente da fonte de radiação [42].

A Figura 7 mostra um esquema dos processos que ocorrem durante a atomização por F AAS, desde a introdução da amostra até a etapa de atomização.

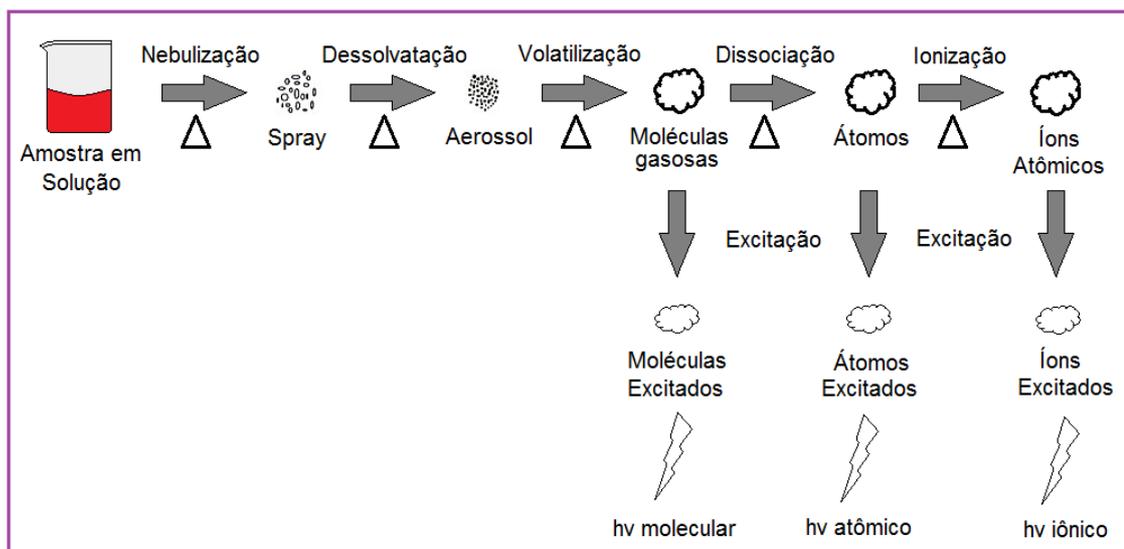


Figura 7 – Processos que ocorrem durante a atomização por F AAS. Adaptado de Skoog e colaboradores [42].

Com esses nebulizadores pneumáticos, a taxa de aspiração da solução da amostra varia de 4 a 7 mL min⁻¹, porém no máximo 10 % da solução da amostra introduzida é transformada em aerossol útil, sendo sua maior parte (acima de 90 %), portanto, descartada [40].

Considerando a chama, um grande número de combinações de gases combustível e oxidante pode ser utilizado para a sua produção. As misturas mais comumente empregadas são: ar e acetileno (atinge temperaturas na faixa de 2100 a 2400 °C) ou óxido nítrico e acetileno (atinge temperaturas na faixa de 2600 a 2800 °C). A temperatura da chama e as razões entre os gases são considerados parâmetros importantes, uma vez que esses estão diretamente ligados à eficiência de atomização [40].

3.4.2.1. Interferências em F AAS

Em absorção atômica, de um modo geral, as interferências podem ser classificadas em dois tipos: as interferências espectrais e não espectrais. As espectrais aparecem quando a absorção ou emissão de uma espécie interferente se sobrepõe ou fica muito próxima ao sinal do analito. Já as não espectrais resultam de vários processos que ocorrem durante a atomização e que alteram as características de absorção do analito [42].

Para contornar os problemas causados devido às interferências espectrais, uma alternativa é o uso de sistemas corretores, os quais são responsáveis por medir a intensidade do fundo separadamente do sinal de absorvância total, que por subtração de ambos os valores, se obtém um sinal analítico livre de interferências. Para tal procedimento, existem quatro sistemas corretores disponíveis: fonte contínua, utilização do efeito Zeeman, utilização de corrente pulsada e medição próxima à linha analítica. Cada um desses corretores apresenta suas características para medir e corrigir o sinal de fundo em AAS, a fim de gerar um sinal analítico mais limpo possível para as análises químicas [40].

A interferência de ionização é um exemplo não espectral, que ocorre quando a temperatura da chama é muito alta para a determinação do analito de interesse, o que acaba levando a formação de uma quantidade significativa de íons. Esse fato reflete diretamente em um menor sinal de absorvância, pois o número de átomos no estado fundamental e gasoso é afetado. Os metais alcalinos e alcalinos terrosos, como o Na, K, Ca e Mg são considerados os elementos mais suscetíveis a interferências desta natureza, devido a seus baixos potenciais de ionização em relação aos demais elementos [40, 42]. Para a minimização dessa interferência, é possível adicionar junto às amostras e soluções de calibração, outro elemento mais facilmente ionizável (lítio, célio ou rubídio) que o analito de interesse. Soluções desses elementos são conhecidas como supressores de ionização, as quais funcionam de forma a aumentar a quantidade de elétrons na chama, deslocando o equilíbrio em favor dos átomos no estado fundamental, ou seja, minimizando a ionização do analito a ser quantificado [40].

Outro tipo de interferência não espectral é a formação de compostos refratários com o analito, os quais são caracterizados por serem de difícil volatilização na chama. Esses compostos podem ser formados a partir da reação dos analitos com os gases da chama, formando, como por exemplo, óxido e carbonatos. Além disso, também podem ocorrer reações com outras espécies químicas, proveniente da matriz da amostra [40, 44].

Para a determinação de cálcio utilizando chama Ar/Acetileno, interferências podem ser registradas com a presença de fosfato, sulfato,

alumínio, silício e entre outros. Já para a determinação de magnésio, as interferências mais comuns ocorrem na presença de alumínio e silício [40].

Esse tipo de interferência pode ser eliminado com o uso de uma chama mais quente, pelo uso de agentes complexantes, os quais impedirão a precipitação de compostos refratários, ou pelo uso de outro elemento capaz de formar com o interferente um composto mais estável. O elemento mais utilizado para esses casos é o lantânio, o qual é conhecido como “agente liberador”, justamente pelo fato de competir pelos compostos interferentes e liberando o analito de interesse para ser atomizado [40, 44].

3.4.3. Espectrometria de emissão atômica em chama (F AES)

A FAES, também conhecida como fotometria de chama, é a mais simples das técnicas analíticas baseadas em espectrometria atômica. Seu funcionamento consiste na introdução da amostra, de forma semelhante ao descrito para F AAS, até chegar na chama. Os analitos, ao receberem energia proveniente da chama, geram espécies excitadas que, ao retornarem para seu estado fundamental, liberam essa energia em forma de radiação, a qual possui como característica um comprimento de onda único para cada elemento. Com isso, a análise é realizada com o registro da quantidade de radiação emitida pelos íons excitados [8].

A Figura 8 mostra um esquema do processo de emissão atômica e seu espectro, bem como uma comparação com a absorção atômica.

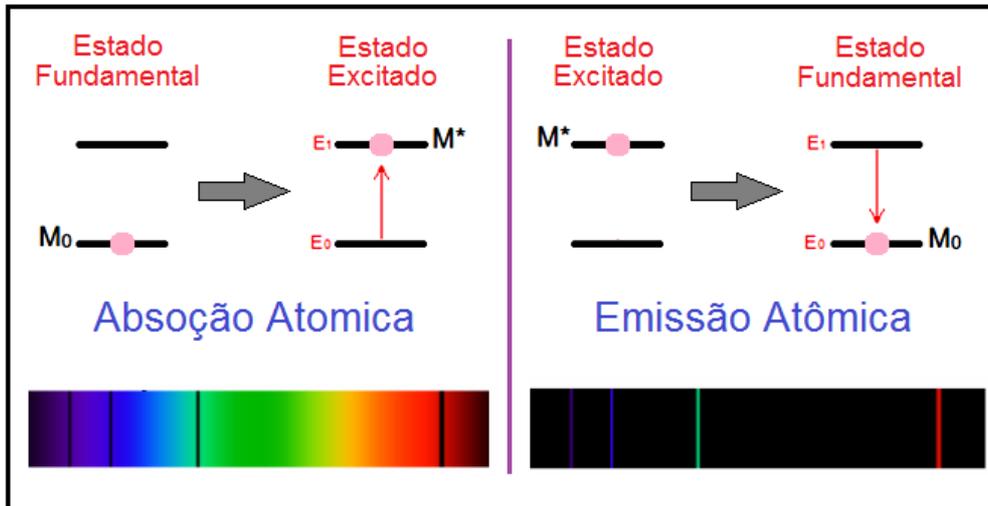


Figura 8 – Processos de emissão e absorção atômica. Adaptado de Sousa, R. A. [45].

A chama pode ser composta de ar (como oxidante) e gás butano - GLP (como combustível), alcançando assim, temperaturas entre 1700 e 1900 °C. Também é possível utilizar a mesma combinação de gases do F AAS (ar/acetileno) para análises de emissão atômica [8]. Subsequentemente, a radiação produzida passa por uma lente e um filtro óptico, que permite a passagem apenas da radiação característica do analito de interesse para o fotodetector, o qual é responsável em converter energia luminosa em sinal elétrico [46]. A Figura 9 mostra um esquema dos componentes básicos relacionados a técnica de fotometria em chama.

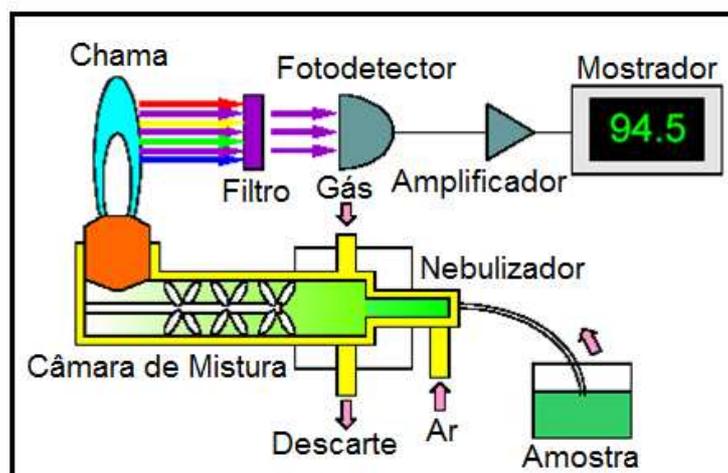


Figura 9 – Componentes básicos de um F AES. Adaptado de Sousa, R. A. [45].

Considerando a chama composta por ar/GLP, a temperatura alcançada é menor do que aquelas atingidas em chamas de F AAS. Apesar disso, já é suficiente para excitar metais alcalinos e alcalinos terrosos, como: Na, K, Ca e Li, gerando, conseqüentemente, a emissão de linhas atômicas características para cada elemento. Sendo assim, o fotômetro de chama caracteriza-se por ser um equipamento de baixo custo, simples, rápido e eficiente, com inúmeras aplicações em diversos ramos, tais como análises clínicas, controle de qualidade de alimentos, entre outras [8].

3.5. Preparo de Amostras

A etapa de preparo de amostras possui uma extrema importância dentro de um protocolo analítico, pois é a partir dela que a amostra é convertida a uma forma adequada para análise, ou seja, é possível garantir que a espécie química de interesse seja determinada [10, 47].

Considerando as etapas de uma sequência analítica, o preparo das amostras é responsável por 61 % do tempo total e 30 % dos erros de uma análise. A esses erros podem ser atribuídas às possíveis perdas de analitos por volatilização ou adsorção, dissolução incompleta do analito e contaminação, a qual pode advir do ar, reagentes ou materiais em geral. Além disso, a falta de treinamento e desqualificação do analista também pode contribuir com erros associados a essa etapa [10].

Como objetivos dessa etapa, busca-se obter sempre os melhores resultados, no mais curto espaço de tempo, com a mínima contaminação, baixo custo, baixo consumo de reagente e geração de pouco resíduo [10]. Para isso, a literatura reporta diferentes métodos que podem ser seguidos para o preparo de diferentes tipos de amostras, os quais vão desde uma simples diluição até uma total decomposição da amostra, seja por via seca ou úmida [10, 47-49]. Para a escolha do melhor método a ser empregado, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como conhecer as características do elemento que se quer determinar, as faixas de concentração desse elemento, a quantidade de amostra disponível, a qualidade do local em que será feito as análises, o custo relacionado, o tempo gasto e a qualificação e/ou experiência do analista que irá manusear as amostras [10].

3.5.1. Métodos para o preparo de amostras de goma xantana

Devido ao seu comportamento reológico, uma simples solubilização da amostra de goma xantana em meio aquoso levaria a uma solução final com elevada viscosidade [4, 14]. Sendo assim, soluções com essa característica apresentam dificuldade em serem nebulizadas, o que acaba prejudicando a sua introdução em um equipamento de análise, uma vez que podem causar entupimento do capilar e baixa reprodutibilidade entre as medidas [50]. Desta forma, as atenções são voltadas para a etapa de preparo de amostras, a qual tem o papel de converter a amostra em uma forma apropriada.

Dentre os métodos disponíveis na literatura, os mais indicados são aqueles responsáveis por destruir parcial ou totalmente a matriz da amostra, resultando em uma solução contendo os analitos de forma apropriada para serem quantificados [11]. O método oficial para o preparo de amostras de xantana é a calcinação, o qual é reportado tanto pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [51] como pela American Society for Testing and Materials (ASTM) [52].

3.5.2. Decomposição via seca (calcinação)

O método de calcinação pode ser considerado um dos mais simples para decomposição de diferentes tipos de amostras, o qual baseia-se na queima da fração orgânica da amostra, obtendo um resíduo inorgânico na forma de cinza, solúvel em água ou ácido diluído. O aquecimento é realizado em forno tipo mufla, empregando temperaturas que podem variar de 300 a 1000 °C dependendo da necessidade de decomposição da matriz. Durante o aquecimento, o oxigênio atmosférico atua como agente oxidante e o resíduo proveniente da queima consistem de óxidos de metais, além de fosfatos, sulfatos, silicatos, entre outros. Para acelerar o processo de oxidação, muitos estudos envolvem a adição de reagentes auxiliares, tais como o nitrato de magnésio [10, 47, 48].

Conforme mencionado anteriormente, para o preparo de amostras de goma xantana é indicado o uso de calcinação, o qual vem sendo recentemente

empregado em muitos trabalhos para a determinação de metais por espectrometria atômica [6, 53-56]. Este método oficial consiste na calcinação de 0,4 g de amostra a 550 °C em forno mufla, durante um período de tempo que pode variar de 5 a 8 horas. Após esse processo, as cinzas resultantes são tratadas com 12 mL de água régia (3HCl:1HNO₃) e, posteriormente, o volume final de 100 mL foi completado com uma solução de HCl 1 % v/v [52]. De um modo geral, a decomposição por via seca apresenta vantagens como o uso de ácidos diluídos, requer pouca atenção do operador e não necessita de capelas especiais. Além disso, trata-se de um método de baixo custo e tem capacidade de decompor grandes quantidades de amostras (> 10 g) [10].

Apesar da aplicabilidade desse método, uma desvantagem pode ser considerada como a mais evidente, a qual trata-se da perda de analitos por volatilização devido as altas temperaturas empregadas durante o processo. Além disso, o recipiente utilizado para decomposição das amostras também pode apresentar alguns inconvenientes, pois se for utilizado cadinhos de porcelana, a matriz da amostra pode reagir e formar compostos que comprometam a disponibilidade do analito para a sua posterior quantificação. Outro exemplo é o uso de cadinhos de platina, sendo possível a formação de ligas metálicas com o elemento de interesse. A alta suscetibilidade de contaminação também caracteriza um ponto negativo desse método, a qual pode advir tanto do ar atmosférico, uma vez que trata-se de um sistema de decomposição aberto, como das paredes internas da mufla, que podem acumular resquícios de elementos metálicos [10, 47].

Com base nisso, é importante buscar outros métodos para o preparo de amostras de goma xantana, uma vez que é recomendado evitar o uso de decomposições em mufla devido aos erros sistemáticos listados [10].

3.5.3. Decomposição ácida em sistema aberto

Os processos de decomposição geralmente envolvem a adição de reagentes e energia, sendo estas suficientes para romper algumas ligações químicas. Dentre esses procedimentos, a decomposição por via úmida é muito empregada para diversos tipos de amostras, a qual pode se dar tanto em sistema aberto como em sistema fechado. Para ambos os casos, o reagente

adicionado às amostras trata-se de um ácido mineral oxidante, uma mistura de diferentes ácidos ou uma mistura entre um ácido e outro reagente (como por exemplo, peróxido de hidrogênio). Com isso, a matéria orgânica presente é então oxidada a CO_2 e H_2O , permanecendo os analitos de interesse em solução ácida, na forma de cátions inorgânicos simples [10, 48].

Na decomposição por via úmida em sistema aberto, o aquecimento pode ser realizado por meio de um bloco digestor, chapa de aquecimento ou bico de Bunsen. Contudo, o grande inconveniente de se utilizar sistemas abertos é o risco de perdas do analito e/ou ácido por volatilização, bem como a contaminação da solução da amostra. Além disso, outros pontos negativos também podem ser listados, tais como o longo tempo necessário para a decomposição e o uso de grandes volumes de ácidos. Isso se dá, principalmente, quando se necessita a reposição desses reagentes devido a sua volatilização em temperaturas elevadas, implicando em altos valores de branco analítico e, desta forma, comprometendo o LD da análise [10, 48].

Um fator importante para o processo de decomposição em sistemas abertos é a temperatura empregada, a qual vai depender do tipo de amostra a ser mineralizada. Entretanto, o fator limitante na escolha da temperatura ideal é a ebulição dos ácidos envolvidos [10].

Para o preparo de amostras biológicas, a escolha do ácido e a temperatura de aquecimento são fatores fundamentais, uma vez que trata-se de uma matriz relativamente de difícil mineralização. Gonzalez e colaboradores [57] informam que para a decomposição rápida e completa de amostras com alto teor de carboidratos, precisa-se de uma temperatura de $140\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto que para altos teores de proteínas e lipídios são necessários 150 e $160\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Já no estudo realizado por Pichler e colaboradores, [58] os autores afirmam que para completa oxidação de materiais orgânicos utilizando ácido nítrico como meio oxidante, é necessária temperaturas superiores a $200\text{ }^\circ\text{C}$.

As condições de decomposição, tais como tempo, temperatura e quantidade de ácido oxidante, são de extrema importância, uma vez que podem levar a obtenção de soluções das amostras com baixo teor de carbono residual, o que é o indicativo de um eficiente processo de eliminação da matriz

da amostra. Além disso, um baixo teor de carbono residual também é desejável para evitar interferências durante o processo de leitura instrumental [59, 60].

Para o preparo de amostras de goma xantana, Klaic e colaboradores [11] desenvolveram um método de decomposição ácida em sistema aberto para posterior determinação de Na, K, Ca e Mg por espectrometria atômica. Para esse procedimento, foram utilizados aproximadamente 100 mg de amostra e 5 mL de HNO_3 , sendo posteriormente submetido ao aquecimento em bloco digestor a 100 °C durante um período de 2 horas. Após o resfriamento das soluções, 2 mL de HClO_4 foram adicionados e encaminhados novamente a aquecimento por mais 1 hora na mesma temperatura. Este procedimento proposto foi comparado com o método oficial de calcinação, e os resultados apresentaram-se concordantes a um nível de 95% de confiança pelo teste-t. Ainda sobre este estudo, os autores relatam que a digestão ácida envolvendo apenas ácido nítrico como meio oxidante, não apresentou resultados satisfatórios, fazendo com que fosse necessária a adição de ácido perclórico para uma eficiente mineralização.

O HClO_4 possui ponto de ebulição de 203 °C e quando aquecido torna-se um forte agente oxidante. Contudo, esse ácido destaca-se negativamente pelo seu poder explosivo quando a quente entra em contato direto com materiais facilmente oxidáveis [10]. Além disso, recentemente este reagente passou a ser controlado pelo exército brasileiro, tornando sua aquisição mais difícil e conseqüentemente com um maior custo [61]. Sendo assim, a busca de métodos alternativos para o preparo de amostra sem a presença de ácido perclórico como meio oxidante, torna-se atraente, a fim de contornar alguns inconvenientes relacionados aos métodos já descritos na literatura para amostras de goma xantana.

3.5.4. Decomposição ácida em sistema fechado (micro-ondas)

Com o uso de sistemas fechados, é possível minimizar erros referentes a perdas de analito e/ou reagente por volatilização, garantindo assim uma maior eficiência na etapa de preparo de amostras. Outro fator importante que também deve ser levado em consideração para o sucesso desse método é a pressão interna do sistema, a qual é aumentada proporcionalmente à medida

que a temperatura eleva-se [10, 48]. Contudo, devido a esse aumento da pressão interna, o risco de explosões do sistema também aumenta, podendo colocar em risco as análises, bem como o analista [62].

Recentemente, o uso de fornos micro-ondas vem ganhando destaque entre os métodos que utilizam sistema fechado para o preparo amostras, uma vez que este apresenta simplicidade, rapidez e aplicabilidade para diversos tipos de matrizes [48, 49]. O uso da radiação micro-ondas para a decomposição de amostras já é bastante conhecido, tendo os primeiros relatos em 1975, sendo esses estudos realizados em frascos aberto e em fornos domésticos. Com os avanços instrumentais, novos sistemas de micro-ondas foram criados a fim de um maior aperfeiçoamento dessa prática, bem como garantir maior segurança ao operador, uma vez que é possível obter informações de pressão e temperatura interna dos tubos durante o processo de decomposição [10].

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas portadoras de energia, onde uma vez absorvidas provocam um aumento considerável na temperatura do material absorvente. Esse aquecimento tem como característica a absorção direta de energia pelo material, ou seja, não ocorre conforme observado no aquecimento convencional (chapas de aquecimento, chamas, etc.) [10, 62]. A Figura 10 mostra a diferença entre os sistemas de aquecimento.

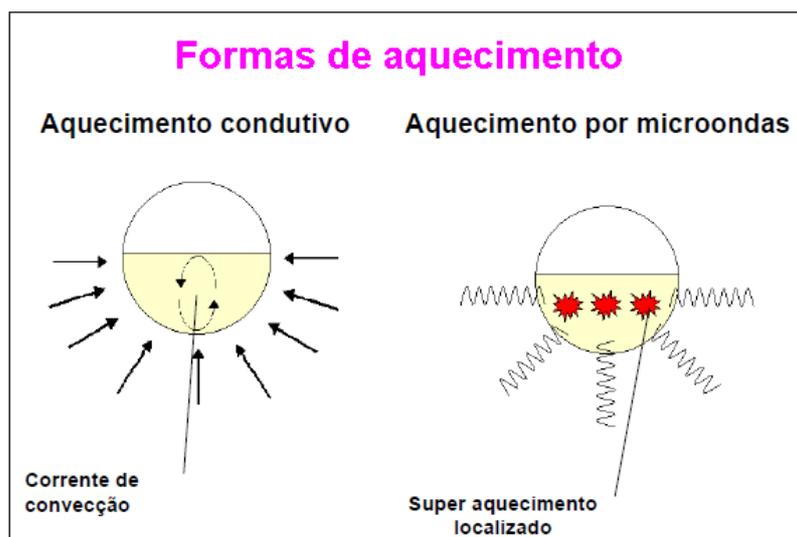


Figura 10 – Formas de aquecimento: condutivo e por micro-ondas. Adaptado de Krug [10].

Considerando a instrumentação de forno micro-ondas, esses contêm um magnetron que produz as radiações, as quais são então conduzidas por meio de um guia de onda e dispersadas para o interior do forno. As amostras que estão contidas nos tubos são expostas à radiação de forma homogênea, uma vez que esses tubos são distribuídos em uma bandeja rotatória [10]. A Figura 11 apresenta um esquema de um forno micro-ondas utilizado para o preparo de amostras.

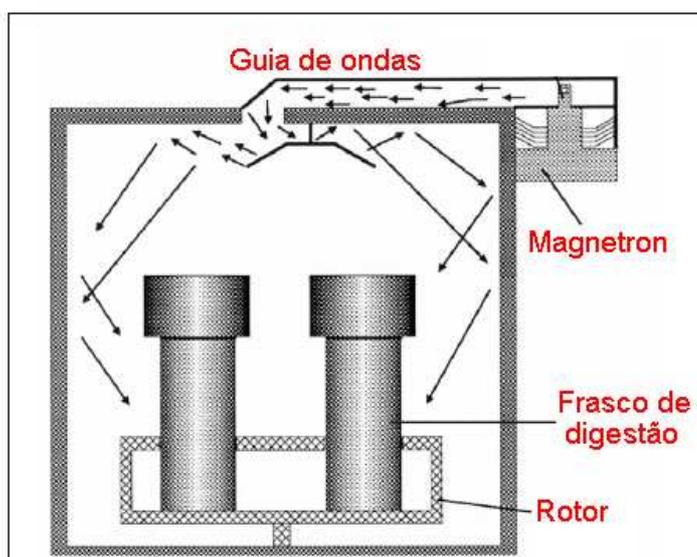


Figura 11 – Esquema de um forno micro-ondas. Adaptado de Krug [10].

Apesar das grandes vantagens citadas em utilizar um sistema fechado no preparo de amostras, uma desvantagem considerável, e que está diretamente relacionada aos fornos micro-ondas é o alto custo instrumental, fazendo com que nem todos os grupos de pesquisa e laboratórios que fazem análises de rotina tenham acesso a esta instrumentação [63].

Para o preparo de amostras de goma xantana, a literatura não reporta estudos empregando o método de decomposição ácida com radiação micro-ondas. Isso impulsiona o desenvolvimento de estudos envolvendo essa aplicabilidade, para a posterior determinação de metais em amostras de polissacarídeo. Além disso, o desenvolvimento de métodos alternativos para o preparo dessas amostras torna-se atrativo, visando resultados tão satisfatórios quanto os alcançados em procedimentos já bem estabelecidos na literatura.

3.5.5. Decomposição ácida utilizando sistema de refluxo

Recentemente, o uso de sistemas de refluxo vem ganhando destaque na literatura, sendo aplicado no preparo de diferentes tipos de amostras para a posterior quantificação de metais. Esse sistema caracteriza-se por conter uma superfície mais fria, a qual é resfriada com água, garantindo assim uma eficiente condensação dos vapores gerados no interior do tubo, que contém a amostra e é aquecido externamente [64]. Contudo, essa aplicação não é tão recente, pois em 1972, Tölg [65] apresentou um estudo de revisão mostrando um sistema de refluxo para o processo de decomposição ácida de amostras. O autor divulga em seu estudo o desenho do sistema para a combustão de amostras, o qual contém um “dedo frio” que apresenta orifícios para entrada e saída de água fria, mantendo uma circulação de água e garantindo um ambiente sempre frio, além de contar com uma abertura central para entrada de oxigênio e outra para o vácuo, facilitando o processo de combustão das amostras depositadas no interior do tubo. Esse sistema foi então muito utilizado para a determinação de elementos a nível traço em diversas matrizes de origem orgânica [65].

Ferreira e colaboradores [64] recentemente publicaram um estudo de revisão sobre o uso de sistemas de refluxo no preparo de amostras. Esses autores divulgaram um desenho esquemático de um sistema que vem sendo utilizado em vários trabalhos, o qual consiste em um tubo de vidro que fica conectado na parte superior dos frascos digestores, caracterizando-se como uma superfície fria devido a este conter água para condensar os vapores internos gerados. A Figura 12 mostra esse sistema.

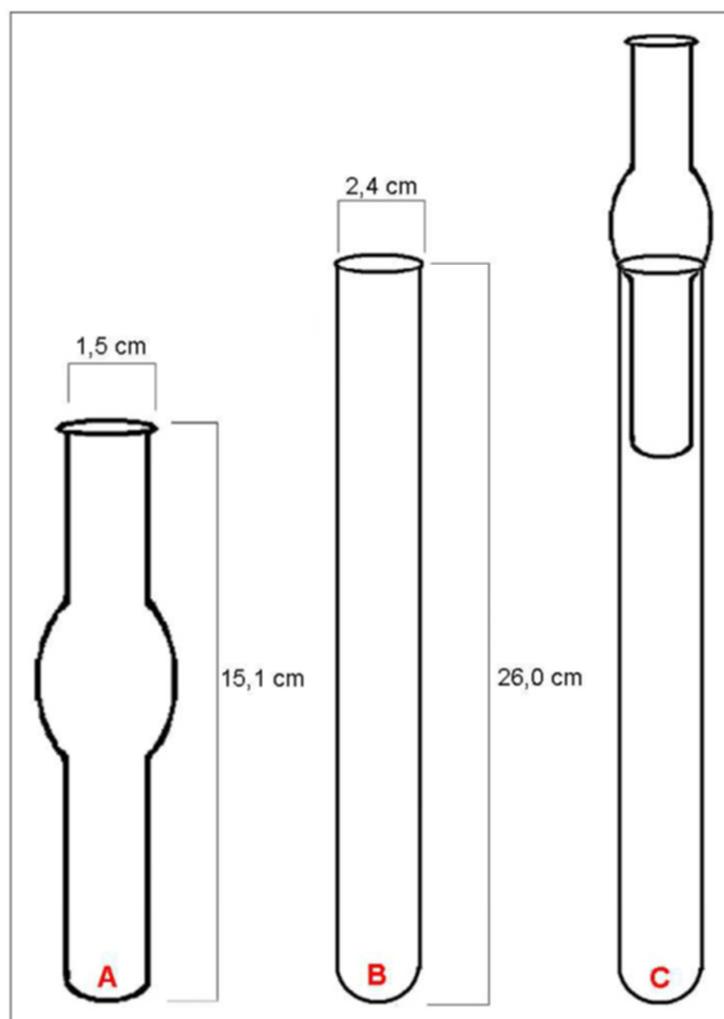


Figura 12 – Desenho esquemático de (A) “dedo frio”, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com refluxo. Adaptado de Ferreira e colaboradores [64].

Em termos de aplicações, o sistema exposto na Figura 12 já foi empregado para a decomposição ácida de diferentes tipos de amostras e subsequente determinação de vários analitos. A Tabela 2 apresenta algumas dessas aplicações.

Tabela 2 – Aplicação do sistema de refluxo, desenvolvido por Ferreira e colaboradores [64], para o preparo de amostras.

Amostras	Analitos	Técnica	Ref.
Tecido de ostra	Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn	ICP OES	66
Fertilizantes e rochas	As	HG AAS	67
Vinhos	Cd	GF AAS	68
Material particulado atmosférico	As	HG AAS	69
Alimentos vegetais	Pb	GF AAS	70
Arroz	Cd	GF AAS	71
Gasolina	As	HG-GF AAS	72
Arroz	Ca, K, Mg, Na, P, Fe, Mn, Sr e Zn	ICP OES	73
Vinagre	Cd	GF AAS	74
Caigua	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, V e Zn	ICP OES	75

Em todos os trabalhos citados na Tabela 2, os autores ressaltam a eficiência do sistema de refluxo para a decomposição de amostras, obtendo resultados concordantes para os analitos avaliados. Contudo, os sistemas usados podem apresentar alguns pontos negativos, tais como: a falta de circulação de água no “dedo frio”, o que ao longo do tempo pode aumentar a temperatura e se tornar um recipiente com água em um estado indesejável; a possibilidade de acúmulo de líquido nos contatos superiores, o que levaria a escorrer parte dessa solução pela lateral externa do tubo; e a dificuldade de alívio de pressão interna do sistema, o que poderia acarretar em projeções do “dedo frio” e, conseqüentemente, uma projeção da água para fora desse recipiente [76].

Para contornar esses inconvenientes, Oreste e colaboradores [77] desenvolveram um novo desenho para um sistema de refluxo para o preparo de amostra. Esse sistema encontra-se representado na Figura 13.

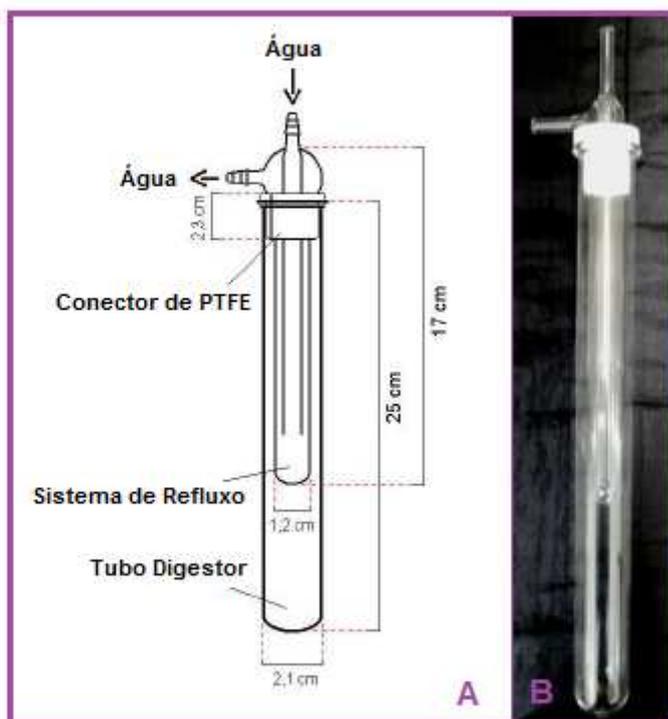


Figura 13 – (A) esquema do sistema de refluxo e (B) imagem real. Adaptado de Oreste e colaboradores [77].

Os dois sistemas de refluxo apresentados na literatura e nas Figuras 12 e 13 assemelham-se por ambos conter um “dedo frio” conectado a tubos digestores, o qual proporciona o refluxo de vapores gerados, aproveitando ao máximo a capacidade de decomposição e minimizando as perdas de analito e/ou ácido utilizado no processo. Contudo, o diferencial do sistema de refluxo desenvolvido [77] é a circulação de água no interior do “dedo”, garantindo sempre uma superfície fria, independente da temperatura de aquecimento do bloco digestor, para condensação dos vapores gerados. Além disso, a conexão entre as peças é feita com um encaixe de PTFE, o qual possui uma profunda ranhura lateral, o que garante trabalhar sempre a pressão atmosférica, evitando possíveis explosões por acréscimo de pressão interna.

O sucesso do sistema de refluxo em reter quantitativamente os analitos e evitar perdas por volatilização se deve ao fato da superfície fria do “dedo frio” permitir a formação de um filme líquido de uma solução absorvedora, rica em vapores de água e ácidos utilizados durante a mineralização das amostras. Dessa forma, por exemplo, quando se utiliza uma quantidade adequada de

HNO₃ no frasco de decomposição e aliada ao emprego de temperatura para o aquecimento do bloco digestor superior a sua temperatura de ebulição, propicia uma formação da solução absorvedora (mistura azeotrópica) na superfície do frasco de refluxo, com elevada força iônica, o qual propicia a retenção dos analitos na forma de nitratos solúveis em água e após condensação e gotejamento, retornam para o meio reacional no tubo digestor.

Através desse sistema, os mesmos autores desenvolveram um estudo que consiste na determinação de Hg total em amostras biológicas pela técnica de CV AAS. Para este trabalho, aproximadamente 0,1 ou 0,25 g de material de referência certificado (CRM) de peixe foram decompostos com 2 mL de HNO₃, utilizando sistema de refluxo por um tempo de 2 horas e aquecido a 120 °C. Para fins comparativos, também foi realizado uma decomposição ácida nas mesmas condições de ácido, tempo e temperatura, mas utilizando sistema aberto. Segundo os autores, os resultados analíticos para a concentração de Hg não foram concordantes com o valor certificado para a decomposição em sistema aberto, devido a perdas desse analito por volatilização durante o aquecimento. No entanto, esse fato não foi observado quando utilizado o sistema de refluxo, o que mostra sua eficiência para a quantificação desse elemento, o que apresenta sua aplicabilidade para a análise de elementos voláteis.

Outras aplicações recentes, também foram realizadas pelo mesmo grupo de pesquisa utilizando este sistema de refluxo: em amostras comerciais de carnes [78] e arroz [79] para a posterior quantificação de metais. Para ambos os estudos, o meio oxidante utilizado foi apenas HNO₃ e o aquecimento do bloco digestor foi de 220 e 210 °C, respectivamente. Apesar da temperatura empregada ser superior ao ponto de ebulição do ácido utilizado (p.e. 120°C), não foram registradas perdas desse reagente por volatilização, bem como de nenhum dos analitos avaliados, mostrando a eficiência de condensação dos vapores pelo “dedo frio”.

Com base nos resultados desses estudos, se torna atrativo a exploração desse sistema de refluxo para aplicações em outros tipos de matrizes, a fim de avaliar sua eficiência frente a métodos convencionais já consolidados pela literatura.

4. Materiais e Métodos

4.1. Instrumentação

Para determinação de Na e K foi utilizado um fotômetro de chama modelo B462 da marca Micronal, (São Paulo/SP). Gás liquefeito de petróleo (GLP) foi utilizado como combustível e ar comprimido como oxidante para a chama. As condições operacionais do fotômetro de chama estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições operacionais do fotômetro de chama.

Condições de Análise	
Taxa de aspiração da amostra (mL min^{-1})	5
Ar comprimido (L min^{-1})	9
Pressão (kgf/cm^2)	1
Tempo de estabilização da leitura (segundos)	8

As medidas de Ca e Mg foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama (F AAS) modelo AA – 6300 da marca Shimadzu (Japão), equipado com lâmpada de arco de deutério como corretor de fundo e lâmpadas de cátodo oco para cada elemento como fontes de linha. Para compor a chama, foram utilizados ar comprimido e gás acetileno como oxidante e combustível, respectivamente. Os parâmetros foram ajustados para cada elemento e mantidos para as próximas leituras instrumentais. Através desse sistema, aproximadamente 2,5 mL de amostra são inseridos no nebulizador e aspirados até a chama. As condições operacionais do espectrômetro de absorção atômica utilizadas seguiram as recomendações do fabricante e estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama utilizadas para as determinações analíticas de Ca e Mg.

Parâmetros	Analito	
	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	422,7	285,2
Fenda espectral (nm)	0,7	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	10	8
Altura do queimador (mm)	7	7
Vazão de gás combustível (L min ⁻¹)	2,0	1,8

As amostras de goma xantana foram pesadas em uma balança analítica Ohaus Adventurer modelo AR 2140 (PineBrook, NJ, EUA) com uma resolução de 0,1 mg e máximo de tara de 210 g.

Para os processos de decomposição ácida das amostras, um bloco digestor modelo MA-4025 da marca Marconi (Piracicaba, SP, Brasil), o qual foi utilizado para o sistema aberto de decomposição e também para o sistema semi-fechado, ou seja, com adaptação de um sistema de refluxo para cada tubo de digestão, a fim de evitar perdas de analito e reagente por volatilização durante o aquecimento. O sistema de refluxo utilizado foi desenvolvido por Oreste e colaboradores [77] e pertence ao grupo LabMeQui, conforme já foi demonstrado na Figura 13.

Para o preparo das amostras também foi utilizado, um micro-ondas modelo ETHOS 1 (Milestone, Sorisole, Italy), equipado com frascos de PTFE. Para avaliar a eficiência das decomposições ácidas, foi utilizado um analisador de carbono orgânico residual TOC-5000 da marca Shimadzu (TK, Japão). Esses instrumentos foram disponibilizados pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) através do projeto casadinho.

4.2. Reagentes e Materiais

Todos os reagentes utilizados no experimento foram de grau analítico. No preparo das soluções e nas diluições das amostras foram utilizadas água deionizada, obtida em um sistema de Direct-Q 3 de purificação da marca Millipore Corporation (Bedford, USA), com resistividade de 18,3 MΩ cm à 25°C. O HNO₃ 65 % (v/v) utilizado no preparo das amostras da marca Vetec (Brasil) foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 da marca Marconi (Piracicaba, SP, Brasil). O HClO₄ 70 % (v/v) da marca Vetec (Brasil) foi utilizado no preparo das amostras a partir da metodologia convencional, citada na literatura. Para as decomposições feitas em micro-ondas foram utilizadas, além do HNO₃, H₂O₂ 35 % (v/v) da marca Fluka (Alemanha).

Para a determinação do teor de carbono total, alíquotas das soluções resultantes da decomposição ácida foram tituladas com uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹, que foi preparada a partir do sólido da marca Synth (São Paulo, Brasil). Além desses reagentes, soluções de CsCl 1% m/v e LaCl₃ 10 % m/v foram utilizadas como tampões de ionização e para minimização de formação de óxidos, respectivamente, na determinação de Ca e Mg. Para a calibração foram utilizadas soluções padrão de Na, K, Ca e Mg fazendo-se a diluição para cada elemento a partir das soluções padrão estoque de 1000 mg L⁻¹ da marca Fluka (Buchs, Alemanha). Essas diluições para a calibração instrumental foram realizadas em meio ácido (HNO₃ e uma mistura de HNO₃/HClO₄) e meio aquoso.

Todos os materiais de laboratório, como frascos de polipropileno (PP), vidrarias e outros utilizados para o preparo das amostras e soluções padrão, foram lavados com água corrente e sabão líquido. Posteriormente, esses materiais foram imersos em uma solução de HNO₃ 10% (v/v) por 48 horas. Após esse período, foram enxaguados com água deionizada e secos, para futura utilização.

4.3. Amostras

Foram utilizadas quatro amostras comerciais (Farmaquímica, Kelgum, Jungbunzlaver e Sigma Aldrich) e três amostras produzidas por *Xanthomonas arborícola pv pruni* (cepa 106 em pH 7,0, cepa 101 em pH 7,0 e pH 9,0) desenvolvidas no Laboratório de Biopolímeros, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) [80].

4.4. Métodos de preparo das amostras

4.4.1. Método 1 – Decomposição ácida em sistema aberto (Convencional)

As amostras foram preparadas conforme foi descrito por Klaic e colaboradores [11]. Para esse procedimento pesaram-se aproximadamente 0,1 g de amostra diretamente em tubos de digestão, logo após adicionaram-se 5 mL de HNO₃ bidestilado. Os tubos foram levados para aquecimento em bloco digestor, com temperatura de 100 °C por um período de 2 horas. Após o resfriamento da solução resultante, adicionaram-se 2 mL de HClO₄ e levou-se novamente ao aquecimento, com temperatura de 100 °C por um período de 1 hora. A Figura 14 mostra o sistema convencional de preparo das amostras utilizadas.



Figura 14 – Sistema de decomposição convencional aberto.

Após o período de 3 horas, tempo total da decomposição das amostras, a solução resultante foi resfriada até temperatura ambiente e transferida para frascos volumétricos de PP, sendo diluídas a 50 mL com água deionizada. Para a etapa de leitura instrumental, essas soluções finais foram diluídas de acordo com a faixa linear de cada elemento e com a concentração encontrada em cada amostra.

4.4.2. Método 2 – Decomposição ácida com Sistema de Refluxo

Para esse procedimento pesaram-se a aproximadamente 0,1 g de amostra diretamente em tubos de digestão, logo após adicionaram-se 5 mL de HNO₃ bidestilado e acoplou-se o sistema de refluxo aos tubos. O sistema foi aquecido em bloco digestor a 220 °C por um período de 3 horas. A Figura 15 mostra o sistema de refluxo acoplado aos tubos de digestão em aquecimento no bloco digestor.

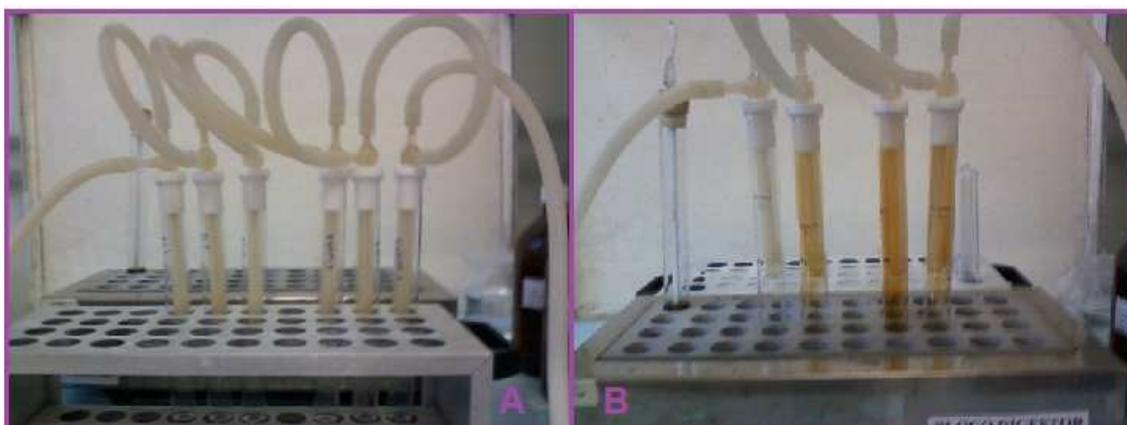


Figura 15 – (A) tubos contendo amostra e ácido com o sistema de refluxo acoplado e (B) decomposição em andamento.

A solução resultante foi resfriada até temperatura ambiente e transferida para frasco de PP, sendo diluídas a 50 mL com água deionizada.

Para a etapa de leitura instrumental, essas soluções finais foram diluídas de acordo com a faixa linear de cada elemento e com a concentração encontrada em cada amostra.

4.4.3. Método 3 – Decomposição ácida em sistema fechado (micro-ondas)

Para esse procedimento pesaram-se aproximadamente 0,1 g de amostra diretamente em frascos de politetrafluoretileno (PTFE), logo após adicionaram-se 3 mL de HNO₃ bidestilado, 1 mL H₂O₂ 35 % v/v e 4 mL de H₂O deionizada, sendo posteriormente os frascos fechados e colocados no interior do forno de micro-ondas. O equipamento foi programado com uma potência de 1000 W, pressão de 45 bar e temperatura de 200 °C em um período total de 46 minutos. A Tabela 5 apresenta o programa de temperatura e tempo do procedimento em micro-ondas.

Tabela 5 – Programa de temperatura e tempo do micro-ondas.

Número	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Potência (W)
1	3	80	45,0	1000
2	2	80	45,0	1000
3	4	120	45,0	1000
4	5	120	45,0	1000
5	7	200	45,0	1000
6	25	200	45,0	1000

A solução resultante foi resfriada até temperatura ambiente e transferida para frasco de PP, sendo diluídas a 50 mL com água deionizada.

Para a etapa de leitura instrumental, essas soluções finais foram diluídas de acordo com a faixa linear de cada elemento e com a concentração encontrada em cada amostra. Cabe salientar que todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5. Metodologia

4.5.1. Determinação do teor de acidez e carbono residual

Considerando os procedimentos para decomposição ácida utilizando o sistema convencional aberto e de refluxo, uma avaliação sobre a acidez residual pôde ser realizada através de uma titulação ácido/base. Através desse estudo é possível verificar o teor de ácido perdido durante o processo de aquecimento em ambos os sistemas. Contudo, apesar das condições operacionais de cada método serem diferentes (quantidade de ácido e temperatura), é possível ter uma ideia da eficiência de cada sistema em minimizar perdas de reagente por volatilização.

Para a decomposição ácida em micro-ondas, a determinação do teor de acidez não foi realizada, pois espera-se que não ocorra perda de ácidos por volatilização, uma vez que trata-se de um sistema fechado.

Esse processo foi conduzido utilizando uma solução padronizada de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como reagente titulante e uma solução de fenolftaleína 1 % (m/v) como indicador. Com isso, soluções ácidas preparadas à temperatura ambiente e submetidas ao aquecimento, conforme as condições dos procedimentos de preparo de amostras em sistema aberto e refluxo, foram tituladas para fins comparativos.

A determinação do teor de carbono total residual é uma forma de se avaliar a eficiência de um procedimento de preparo de amostra envolvendo métodos de decomposição ácida. Sendo assim, foram determinados esse teor nas soluções de três diferentes amostras que foram submetidas aos métodos de mineralização.

Para esse procedimento, as soluções das amostras foram diluídas devido à elevada acidez, a fim de alcançar $\text{pH} \geq 2$, com um volume final de 10 mL. As leituras instrumentais foram realizadas em triplicata e a concentração foi obtida em ppm.

4.5.2. Definição dos parâmetros de méritos

Estudos de curvas analíticas foram realizados para todos os analitos: Na, K, Ca e Mg, a fim de verificar se há interferência dos reagentes na construção das mesmas. Foram construídas curvas em meio aquoso e em meio ácido (HNO₃ e mistura entre HNO₃/HClO₄) nas mesmas concentrações das amostras preparadas a partir das decomposições

Dentre os parâmetros de mérito que devem ser avaliados destaca-se o limite de detecção (LD), o qual trata-se da menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada. A equação para a determinação do LD é dada a partir de um fator multiplicativo ($k = 3$) e a fração entre o desvio padrão (SD) da leitura de dez sinais do branco e a sensibilidade (S) [81–84]. A Equação 1 mostra a relação para calcular o LD.

$$LD = \frac{k \cdot SD}{S} \quad \text{Eq. 1}$$

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade do analito que pode ser quantificada em uma amostra, com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais utilizadas. Para o cálculo do LQ, pode-se utilizar a mesma Equação 1 apresentada, uma vez que a única diferença é o fator multiplicativo, o qual trata-se de $k = 10$ [81–84].

Em relação aos parâmetros citados, ambos são diferenciados entre limite de detecção e quantificação instrumental (LD_I e LQ_I) e limite de detecção e quantificação do método (LD_M e LQ_M). O LD_I e LQ_I são estabelecidos a partir de um sinal instrumental produzido por uma certa concentração de analito. Já para o LD_M e LQ_M a diferença é que se leva em consideração a concentração de analito na amostra, ou seja, todo processo analítico pelo qual passou a amostra [84]. Para os resultados de LD_M e LQ_M foram utilizados nos cálculos a massa de amostra e a diluição final.

4.5.3. Estudo para definição da faixa linear de Na por F AES

Tendo como base as altas concentrações de Na encontradas nas amostras de goma xantana analisadas, o que necessitaria da diluição das amostras para subsequente análise, estudos referente a faixa linear para este elemento por F AES foram feitos com o intuito de aumentar a faixa linear de trabalho e assim, evitar possíveis erros de quantificação. Esse estudo foi realizado variando entre os três modos de sensibilidade ajustáveis do equipamento: sensibilidade mínima, média e máxima.

4.5.4. Avaliação da exatidão

Devido a falta de material de referência certificado (CRM, do inglês Certified Reference Material), a exatidão do método de decomposição ácida com sistema de refluxo foi avaliada através de testes de adição e recuperação de concentrações conhecidas dos analitos. Esse teste foi realizado para apenas uma das amostras estudadas.

5. Resultados e Discussões

5.1. Avaliação da eficiência dos métodos de preparo de amostras

5.1.1. Teor de acidez e carbono total residual

A avaliação do teor de acidez foi realizada tanto para o sistema aberto como para o sistema de refluxo. Isso é importante para fins comparativos entre ambos os sistemas, uma vez mostra a eficiência no processo de decomposição.

Para o sistema convencional aberto, dois ácidos foram utilizados em temperatura de 100 °C, obtendo perda de aproximadamente 25 % da mistura ácida após o processo de aquecimento.

Já para o sistema de refluxo, o qual utiliza apenas HNO₃ como meio oxidante a uma temperatura de 220 °C, o valor de perda do ácido foi de aproximadamente de 18 %. Esse menor valor mostra a eficiência do sistema de refluxo em condensar os vapores gerados, mesmos quando os ácidos são submetidos a temperaturas maiores, minimizando perdas do mesmo por volatilização. Se a decomposição em sistema aberto fosse realizada nas mesmas condições de ácido e temperatura descritas para o sistema de refluxo, certamente haveria uma grande perda do ácido adicionado, o que poderia necessitar de reposições de reagente para uma completa decomposição da matriz da amostra.

De modo a avaliar a eficiência dos três procedimentos de preparo de amostras, foi determinado o teor de carbono total em apenas três amostras de goma xantana, o qual os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Teor de carbono total residual para os três diferentes métodos de preparo de amostras (n=3).

Amostra	Carbono Total Residual, $\bar{x} \pm SD$ em % m/m (RSD, %)		
	<i>Sist. Convencional</i>	<i>Sist. Refluxo</i>	<i>Sist. Micro-ondas</i>
Jungbunzlaver	21,2 \pm 0,5 (2,4)	4,7 \pm 0,3 (6,4)	9,5 \pm 0,3 (3,2)
Kelgum	18,2 \pm 0,3 (1,6)	3,7 \pm 0,1 (2,7)	6,3 \pm 0,1 (1,6)
Farmaquímica	15,2 \pm 0,4 (2,6)	2,9 \pm 0,1 (3,4)	4,6 \pm 0,3 (6,5)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, percebe-se que o menor teor de carbono total residual foi obtido para a decomposição ácida com sistema de refluxo. Observa-se que para o sistema aberto (convencional), foi obtido um alto teor de carbono, o que possivelmente é devido a temperatura empregada para esse procedimento, a qual foi a menor quando comparada com os demais métodos, resultando em uma decomposição menos eficiente. Já no sistema fechado (micro-ondas), os resultados de carbono total foram superiores aos obtidos com o sistema de refluxo, mas inferiores aos obtidos por sistema aberto.

O sistema de refluxo apresentou resultados inferiores quando comparado com o sistema de micro-ondas, o que mostra sua grande eficiência na decomposição ácida de amostras com elevado teor de carbono. As condições adotadas para esse procedimento permitiram uma elevação da temperatura do bloco digestor até 220 °C, ou seja, 100 °C acima do ponto de ebulição do ácido utilizado, o que garantiu uma maior turbulência da solução e aumento na taxa de refluxo durante o aquecimento. Esse comportamento da solução, aliado ao tempo adotado de aquecimento foram os fatores fundamentais para garantir uma ótima decomposição e, conseqüentemente, obter um baixo teor de carbono residual.

Cabe salientar que, o emprego de temperaturas elevadas do bloco digestor, superiores ao ponto de ebulição dos respectivos ácidos, só é possível utilizando o sistema de refluxo, uma vez que esse sistema minimiza perdas do ácido por volatilização. Em contrapartida, se o sistema convencional aberto for adotado com temperaturas elevadas, a tendência é chegar à secura do tubo digestor, ou seja, volatilizar a solução ácida presente.

5.2. Parâmetros de mérito

Para todos os analitos, curvas de calibração foram construídas nos três diferentes meios (aquoso, HNO₃ e HNO₃/HClO₄). Os parâmetros de mérito obtidos para esse estudo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de méritos para as curvas analíticas.

Meio	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Inclinação (L mg ⁻¹)	R ²	LD _M (mg g ⁻¹)	LQ _M (mg g ⁻¹)
Na					
Aquoso		2,055	0,999	0,003	0,010
HNO ₃	0,1 - 0,6	2,195	0,998	0,009	0,033
HNO ₃ /HClO ₄		2,042	0,998	0,004	0,013
K					
Aquoso		0,377	0,993	0,017	0,056
HNO ₃	0,2 - 1,4	0,392	0,998	0,020	0,066
HNO ₃ /HClO ₄		0,325	0,995	0,022	0,074
Ca					
Aquoso		0,044	0,999	0,015	0,050
HNO ₃	0,5 - 2,0	0,034	0,998	0,026	0,087
HNO ₃ /HClO ₄		0,036	0,998	0,010	0,032
Mg					
Aquoso		1,075	0,999	0,001	0,002
HNO ₃	0,1 - 0,4	1,047	0,998	0,002	0,006
HNO ₃ /HClO ₄		1,000	0,995	0,001	0,002

LD_M= limite de detecção do método; LQ_M= limite de quantificação do método.

Conforme pode ser observado na Tabela 7, não houve diferença entre as inclinações das três curvas analíticas para cada analito estudado. Independente do meio e do analito, foram obtidos ótimos coeficientes de correlação linear ($\geq 0,993$). Em relação aos valores de LD e LQ, pode-se verificar que os valores foram próximos entres os meios de calibração. De acordo com esses estudos e observação dos resultados, o meio aquoso foi escolhido para a construção das curvas analíticas.

5.3. Estudos da faixa linear para Na em F AES

Para a determinação de Na em amostras de goma xantana por F AES, um estudo para definir a faixa linear de calibração foi realizado. Os parâmetros de mérito para esse estudo estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros de mérito para os estudos da faixa linear para o elemento Na em meio aquoso por F AES.

Sensibilidade	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Inclinação (L mg ⁻¹)	R ²	LD _M (mg g ⁻¹)	LQ _M (mg g ⁻¹)
Mínima	0,1 – 10,0	0,031	0,999	0,155	0,518
Média	0,1 – 5,0	0,275	0,999	0,039	0,128
Máxima	0,1 – 0,5	2,629	0,992	0,001	0,016

LD_M= limite de detecção do método; LQ_M= limite de quantificação do método.

Os valores relativos aos parâmetros de méritos encontrados para Na, como faixa linear, coeficiente linear, LD e LQ apresentaram diferença entre as sensibilidades instrumentais. Entretanto, independente dessa sensibilidade instrumental, foram obtidos ótimos coeficientes de correlação linear ($\geq 0,992$).

A partir desses resultados a sensibilidade instrumental média foi escolhida como faixa de trabalho para a calibração do equipamento, pois apresentou uma menor oscilação do sinal analítico em relação a sensibilidade máxima. Sendo assim, os parâmetros de mérito para essa sensibilidade foram definidos para a quantificação de Na para as amostras estudadas.

5.4. Resultados analíticos para determinação de Na, K, Ca e Mg para amostras de goma xantana comercial

Conforme citado anteriormente, é de extrema importância o monitoramento de metais em amostras de goma xantana, uma vez que isso influencia diretamente em sua reologia e, conseqüentemente, na aplicação em diversos setores industriais. Além disso, como a goma xantana é muito utilizada em alimentos, o controle de metais também torna-se importante para

uma segurança alimentar para o consumidor. Sendo assim, quatro amostras comerciais foram decompostas por três diferentes métodos, a fim de comparar os resultados. Os resultados de concentração dos analitos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados analíticos para Na, K, Ca e Mg em amostras comerciais de goma xantana após diferentes procedimentos de preparo e determinados por F AAS e F AES, (n = 3).

Amostra	Valor Encontrado, $\bar{x} \pm SD$, mg g ⁻¹ (RSD, %)		
	Sist. Aberto Convencional	Sist. Refluxo	Sist. Fechado Micro-ondas
<i>Na</i>			
Farmaquímica	25,7±0,5(1,9)	26,7±0,2(0,7)	26,6±1,9(7,1)
Kelgum	3,5±0,2(5,7)	3,6±0,1(2,8)	4,1 ±0,7(17,0)
Jungbunzlaver	18,6±0,1(0,5)	18,4±0,6(3,3)	17,4±1,0(5,7)
Sigma	18,5±1,7(9,2)	18,1±0,5(2,8)	16,8±0,7(4,2)
<i>K</i>			
Farmaquímica	1,4 ± 0,1 (7,1)	1,6 ± 0,1 (6,3)	1,4 ± 0,1 (7,1)
Kelgum	14,4 ± 0,9 (6,3)	14,2 ± 0,5 (3,5)	13,6 ± 0,4 (2,9)
Jungbunzlaver	27,8 ± 1,7 (6,1)	27,4 ± 0,9 (3,3)	26,0 ± 1,8 (6,9)
Sigma	44,2 ± 0,5 (1,1)	42,5 ± 1,6 (3,8)	42,7 ± 3,2 (7,5)
<i>Ca</i>			
Farmaquímica	9,5 ± 0,6 (6,3)	8,4 ± 0,3 (3,6)	5,6 ± 0,2 (3,6)
Kelgum	0,46 ± 0,03 (6,5)	0,41 ± 0,01 (2,4)	0,34 ± 0,03 (8,8)
Jungbunzlaver	0,25 ± 0,02 (8,0)	0,21 ± 0,01 (4,8)	0,16 ± 0,01 (6,3)
Sigma	0,22 ± 0,01 (4,5)	0,22 ± 0,02 (9,1)	0,23 ± 0,01 (4,3)
<i>Mg</i>			
Farmaquímica	0,76 ± 0,03 (3,9)	0,79 ± 0,01 (1,3)	0,76 ± 0,01 (1,3)
Kelgum	0,45 ± 0,02 (4,4)	0,45 ± 0,01 (2,2)	0,45 ± 0,01 (2,2)
Jungbunzlaver	0,66 ± 0,01 (1,5)	0,66 ± 0,01 (1,5)	0,67 ± 0,01 (1,5)
Sigma	0,30 ± 0,01 (3,3)	0,30 ± 0,01 (3,3)	0,30 ± 0,01 (3,3)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, percebe-se uma elevada concentração de Na e K para quase todas as amostras de goma xantana analisadas. Já para os demais analitos, apenas a amostra Farmaquímica apresentou uma alta concentração de Ca. Estes resultados provavelmente são decorrentes da adição de sais desses respectivos analitos no meio de produção ou pós-fermentação, os quais são necessários para o desenvolvimento das bactérias [4, 5].

Com relação à comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostras, para todos os valores foi aplicado o teste estatístico t pareado para um limite de confiança de 95 %, pelo qual foi possível verificar que não há diferenças significativas entre os métodos de decomposição ácida utilizados para o preparo das amostras de xantana e posterior quantificação de Na, K e Mg em todas as amostras analisadas.

Para a determinação de Ca os diferentes métodos de preparo de amostra mostraram-se adequados para a análise e os resultados foram concordantes entre si. No entanto, aplicando o mesmo teste estatístico, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os resultados somente para a amostra Sigma. Contudo, quando avalia-se apenas os sistemas convencional aberto e de refluxo, verifica-se uma concordância a um nível de 95% entre os resultados para todas as amostras.

Para a amostra Kelgum, não houve diferenças significativas a um nível de 99 % de confiança, pelo teste estatístico t pareado, entre o método de micro-ondas e os demais métodos na determinação de Ca. Entretanto, nota-se valores muito discrepantes para as amostras Farmaquímica e Jungbunzlaver para o procedimento envolvendo micro-ondas. Nessas duas amostras, observa-se resultados de concentrações inferiores àquelas encontradas para os demais métodos de decomposição ácida. Esse erro pode estar associado a perdas desse analito por adsorção aos frascos de PTFE utilizados durante a decomposição por micro-ondas ou pela instabilidade do analito em solução devido ao transporte, uma vez que o preparo dessas amostras foram realizadas no laboratório do grupo de espectrometria atômica (GEAtom do IQ/UNICAMP) e as leituras instrumentais no laboratório de metrologia química (LabMeQui do CCQFA/UFPel). Para contornar esses inconvenientes, a decomposição por micro-ondas deve ser repetida com estudos de otimização,

a fim de encontrar as melhores condições (como: tempo, temperatura e quantidade de ácido) para esse processo.

Ainda com base na Tabela 10, é possível perceber que o método que utiliza a decomposição ácida com sistema de refluxo mostra-se mais preciso do que os demais métodos, uma vez que este apresenta uma média entre o RSD para os quatros analitos e amostras de 3,4 %, enquanto que os demais métodos apresentaram médias de 4,8 e 5,6 % para sistema convencional aberto e fechado por micro-ondas, respectivamente.

Com relação ao teor desses metais em goma xantana, García-Ochoa e colaboradores [4] estabelecem uma faixa aceitável para sais monovalentes e bivalentes, conforme já foi listada na Tabela 1. Contudo, vários sais podem ser utilizados na produção de goma xantana, mas os sais de Na, K, Ca e Mg são os que mais contribuem para o teor dos monovalentes e bivalentes que devem ser controlados.

Considerando os resultados de concentração de Na, K, Ca e Mg (Tabela 10), foi possível calcular o teor de sais monovalentes (Na + K) e bivalentes (Ca + Mg) para as amostras comerciais tratadas pelo método de refluxo proposto. Esses valores estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Teor de sais monovalentes e bivalentes em amostras de goma xantana comerciais.

Amostra	Teor de sais em % m/m			
	<i>Monovalente</i>	<i>Aceitável Monovalente*</i>	<i>Bivalente</i>	<i>Aceitável Bivalente*</i>
Farmaquímica	2,9		0,88	
Kelgum	1,7	3,6 – 14,3	0,09	0,085 – 0,170
Jungbunzlaver	4,5		0,09	
Sigma	6,1		0,05	

*Valores apresentados por García-Ochoa e colaboradores [4].

Com base na Tabela 10, para o teor de sais monovalentes, as amostras Farmaquímica e Kelgum apresentaram valores inferiores a faixa aceitável. As demais amostras (Jungbunzlaver e Sigma) apresentaram teores dentro do

esperado. Para os sais bivalentes, apenas a amostra Farmaquímica ficou fora da faixa aceitável, apresentando um teor muito superior ao limite máximo esperado. Já para a amostra sigma, valores inferior a faixa aceitável foi encontrada para os sais bivalentes.

A variação dos teores de íons presentes em amostras de goma xantana, tanto os monovalentes como os bivalentes, é dependente das cepas e dos processos fermentativos que ocorrem durante as produções. Contudo, altas concentrações de sais podem afetar negativamente as características estruturais e também as propriedades reológicas desse polissacarídeo [54].

A fim de avaliar a exatidão do método proposto para decomposição ácida em sistema de refluxo, testes de adição e recuperação dos analitos foram realizados em apenas uma amostra de goma xantana (Farmaquímica). A Tabela 11 mostra as concentrações adicionadas e obtidas após a realização desse teste.

Tabela 11 – Valores de recuperação para a amostra Farmaquímica utilizando sistema de refluxo, (n = 3).

Analito	Adição (mg g⁻¹)	*Valor Encontrado, $\bar{x} \pm$ SD, mg g⁻¹ (RSD, %)	Recuperação (%)
Na	15,0	14,8 ± 0,9 (6,1)	98,3
K	2,5	2,6 ± 0,1 (3,8)	102,0
Ca	10,0	9,0 ± 0,28 (3,1)	90,1
Mg	0,8	0,8 ± 0,04 (5,0)	93,7

* Valor calculado a partir da diferença entre a concentração total com adição e da concentração sem adição.

Conforme os resultados obtidos e apresentados na Tabela 12, observa-se uma ótima faixa de recuperação, que foi de 90,1 a 102,4 %. Isso mostra que esse método de preparo de amostra proposto pode ser utilizado com a garantia de uma boa exatidão para o controle desses metais em amostras de goma xantana.

5.5. Aplicação da metodologia analítica

Foi realizada uma aplicação em amostras desenvolvidas pelo Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

De acordo com a Tabela 12, o método proposto foi aplicado para a determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de xantanas pruni produzidas em diferentes condições.

Tabela 12 – Valores quantificados de Na, K, Ca e Mg em amostras de goma xantana pruni após decomposição com sistema de refluxo (n=3).

Analito	Amostra	Valor Encontrado, $\bar{x} \pm SD$, mg g ⁻¹ (RSD, %)
Na	Xp-106-pH7	20,2 ± 0,9 (4,5)
	Xp-101-pH9	44,7 ± 0,5 (1,1)
	Xp-101-pH7	28,0 ± 0,4 (1,4)
K	Xp-106-pH7	20,1 ± 0,6 (3,0)
	Xp-101-pH9	13,4 ± 0,6 (4,5)
	Xp-101-pH7	15,6 ± 0,4 (2,9)
Ca	Xp-106-pH7	0,35 ± 0,01 (2,9)
	Xp-101-pH9	0,36 ± 0,02 (5,5)
	Xp-101-pH7	0,30 ± 0,01 (3,3)
Mg	Xp-106-pH7	1,19 ± 0,02 (1,7)
	Xp-101-pH9	2,19 ± 0,08 (3,7)
	Xp-101-pH7	1,88 ± 0,05 (2,7)

As amostras de xantana pruni foram obtidas em pH controlado, pela adição de NaOH 2 M, portanto, o conteúdo de sais teve origem da solução de produção da goma. A baixa concentração de Mg encontrada, se deve a adição de pequenas concentrações de sais desse elemento no meio fermentativo. No caso do Ca, não foram adicionados nenhum sal contendo esse cátion, mas o que justifica a sua concentração encontrada é uma possível contaminação durante o processo.

Para Na, todas as amostras estudadas apresentaram uma elevada concentração desse elemento. Isso é devido a adição de solução de NaOH para controlar o pH, o que justifica os teores de Na encontrados em XP-106 a pH 7 e Xp-101 pH 7 serem semelhantes, enquanto que teores mais elevados desse analito foram encontrados em XP-101-pH 9. Já para K, a variação de sua concentração está relacionada com os meios de produção do polissacarídeo.

Considerando os resultados de concentração para todos os analitos, a Tabela 13 mostra o teor de sais monovalentes e bivalentes para as amostras de goma xantana pruni decompostas em sistema de refluxo.

Tabela 13- teor de sais monovalentes e bivalentes em amostras de goma xantana pruni.

Amostra	Teor de sais em % m/m			
	<i>Monovalente</i>	<i>Aceitável Monovalente*</i>	<i>Bivalente</i>	<i>Aceitável Bivalente*</i>
Xp-106-pH7	4,0		0,15	
Xp-101-pH9	5,8	3,6 – 14,3	0,26	0,085 – 0,170
Xp-101-pH7	4,4		0,22	

Todas as amostras de xantana pruni apresentaram valores de acordo com a faixa verificada na literatura para sais monovalentes. No entanto, levando em consideração os limites estabelecidos para gomas comerciais, apenas a Xp-106 pH 7 está de acordo com os valores para sais bivalentes. Isso pode estar associado ao fato da xantana comercial ser normalmente produzida em pH 7, o que necessita da adição de menor quantidade de reagente (como exemplo a solução controladora de pH), diminuindo a probabilidade de contaminação por outros elementos.

6. Considerações Finais

Neste trabalho foram avaliados três métodos de preparo de amostras de goma xantana, os quais consistem em decomposição ácida em sistema convencional aberto, em sistema de refluxo e em sistema fechado por micro-ondas. Esses métodos foram aplicados em quatro amostras comerciais para a posterior determinação de Na, K, Ca e Mg por técnicas de espectrometria atômica.

Dentre os três métodos, a decomposição ácida em sistema de refluxo mostrou-se eficiente, simples e seguro, pois foi possível obter ótimos resultados tanto para o teste de adição e recuperação como para a comparação com os demais métodos avaliados.

O preparo de amostra empregado nesse trabalho conta com um sistema de refluxo, com o qual foi possível garantir uma eficiente decomposição ácida, uma vez que a temperatura no bloco digestor foi elevada a 100 °C acima do ponto de ebulição do único ácido empregado, sem risco de haver perdas desse reagente por volatilização, o que foi possível devido à condensação dos vapores gerados internamente. Essa eficiência pode ainda ser concluída em termos do teor de carbono residual total, o qual foi menor para o sistema proposto, quando comparado com os demais métodos de preparo utilizados.

Esse sistema vem mostrando-se como uma ótima alternativa para o preparo de amostras por mineralização ácida, pois através dele é possível obter uma decomposição satisfatória da matéria orgânica sem perder analito e reagente por volatilização, além de caracterizar-se como um sistema de baixo custo, podendo ser empregado em qualquer laboratório de pesquisa e/ou análises de rotina. Com isso, aplicações desse sistema podem ser estudadas para a determinação de metais, não apenas somente para essas amostras de goma xantana, mas também para os demais tipos de goma xantana e diferentes analitos.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Rottava, I.; Batesini, G.; Silva, M. F.; Lerin, L.; Oliveira, D.; Padilha, F. F.; Toniazzi, G.; Mossi, A.; Cansian, R. L.; Di Luccio, M.; Treichel, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, 2009, 65–71.
- [2] Kumara, S. M.; Khan, B. A.; Rohit, K. C.; Purushotham, B. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, v. 4, n. 6, 2012, 2507–2512.
- [3] Brasil. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. D.O.U-Diário Oficial da União de 09 de abril de 1965.
- [4] García-ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties – Research review paper. *Biotechnology Advances*, v. 18, n.7, 2000, 549–579.
- [5] Luvielmo, M. M.; Scamparini, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. *Estudos Tecnológicos*, v. 5, n. 1, 2009, 50–67.
- [6] Borges, C. D.; Vendruscolo, C. T.; Martins, A. L.; Lomba, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arborícola pv pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 2, 2009, 160–165.
- [7] Bergmann, D.; Furth, G.; Mayer, C. Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, 2008, 245–251.

- [8] Okumura, F.; Cavaleiro, É. T. G.; Nóbrega, J. A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 5, 2004, 832–836.
- [9] Amorim, F. A. C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares. *Química Nova*, v. 31, 2008, 1784–1790.
- [10] Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª edição, Piracicaba, 2010, 340 p.
- [11] Klaic, P. M. A.; Nunes, A. M.; Moreira, A. S.; Vendruscolo, C. T.; Ribeiro, A. S. Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: Sample treatment by acid digestion. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, 2011, 1895–1900.
- [12] Palaniraj, A.; Jayaraman, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* – Review. *Journal of Food Engineering*, v.106, 2011, 1–12.
- [13] Rosalam, S.; England R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, 2006, 197–207.
- [14] Borges, C. D.; Vendruscolo C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 29, n. 2, 2008, 171–188.
- [15] Colegrove, G. T. Agricultural applications of microbial polysaccharides. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, v.22, n. 3, 1983, 456–460.

[16] Portela, R. B.; Faria, S.; Resende, M. M.; Cardoso, V. L. Modelagem da produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Horizonte Científico*, v. 2, 2008, 1–19.

[17] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares, de março 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fbc4c6735/Compendio_marco_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em março de 2014.

[18] Rodda, A.B.; Dunstanb, D.E.; Bogera, D.V. Characterization of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, 2000, 159–174.

[19] Menezes, J. D.S.; Druzian, J.I.; Padilha F. F.; Souza, R. R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 8, n. 8, 2012, 1761–1776.

[20] Garcia-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Alcon, A. Chemical structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, 2004, 284–292.

[21] Psomas, S. K.; Liakopoulou-Kyriakides, M.; Kyriakidis D. A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, 2007, 273–280.

[22] Vicente, J.G.; Holub, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, v. 14, n. 1, 2013, 2–18.

[23] Borzani, W.; Schimidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E. *Biotecnologia industrial – fundamentos*. 1ª edição, São Paulo: Edgar Blücher, 2001, 254 p.

- [24] Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial*, v. 2, 1ª edição. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, 541p.
- [25] Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial*, v. 3, 1ª edição. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, 593p.
- [26] Fiume, M. M; Heldreth, B. A. Safety assessment of microbial polysaccharide gums as used in cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*, 2012, 1-51.
- [27] World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series 751, 1987, 60p.
- [28] Diaz, P. S.; Vendruscolo, C. T.; Vendruscolo, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, 2004, 15–28.
- [29] Carrington, S.; Odell, J.; Fisher, L.; Mitchell, J.; Hartley, L. Polyelectrolyte behavior of dilute xanthan solutions: salt effects on extensional rheology. *Polymer*, v.37, 1996, 2871–2875.
- [30] Chanoft, M. O uso de hidrocolóides na indústria alimentícia. 2009. Disponível em: <http://www.docearoma.com.br/pt/faq_det.asp?id_faq=17>. Acessado em maio de 2014.
- [31] Mayer, L.; Vendruscolo, C. T.; Silva, W. P.; Moura, A. B. Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 2, 2008, 87-95.
- [32] Toneli, J. T. C. L.; Murr, F. E. X.; Park, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 7, 2005, 181-204.

- [33] López-Antón, M. A.; Díaz-Somoano, M.; Ochoa-González, R.; Martínez-Tarazona, M. R. Analytical methods for mercury analysis in coal and coal combustion by products. *International Journal of Coal Geology*, v. 94, 2012, 44–53.
- [34] Suzuki, T.; Akagi, H.; Arimura, K.; Ando, T.; Sakamoto, M.; Satoh, H.; Naganuma, A.; Futatsuka, M.; Matsuyama, A. *Mercury analysis manual*. Ministry of the Environment, Japan, 2004, 105p.
- [35] Micaroni, R. C. C. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, v. 23, n. 4, 2000, 487–495.
- [36] Morita, M.; Yoshinaga, J.; Edmonds, J. S. The determination of Mercury species in environmental and biological samples. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, 1998, 1585–1615.
- [37] Leermakers, M.; Baeyens W.; Quevauviller P.; Horvat, M. Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, 2005, 383–393.
- [38] PerkinElmer Instruments. *Guide to atomic spectroscopy techniques and applications*. 2000, 40 p.
- [39] Giné, M. F. *Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)*. CENA/USP: São Paulo, 1998, 148 p.
- [40] Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd edition, Wiley-Vch: Germany, 1999, 955p.
- [41] Walsh, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochimica Acta*, v. 7, 1955, 108–117.

[42] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. Princípios de análise instrumental. 6ª edição, Bookman: Porto Alegre, 2009, 1059p.

[43] Kauer, F. AAS: princípios e instrumentação. Shimadzu Brasil, 2007, 148 p.

[44] Krug, F. J.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, P. V. Espectrometria de absorção atômica: fundamentos e atomização com chama. Apostila didática CENA/USP, 2004, 39p.

[45] Sousa, R. A. Espectrometria de emissão atômica. In.: I Workshop de Química Analítica. Pelotas: PPGQ/UFPel, 2010, 98p.

[46] Junior, V. R.; Ferraz, L. F. M.; Rabello, L. M. Cuidados básicos com fotômetro de chama. Recomendação técnica nº7 – Emb rapa, 1997, 7p.

[47] Moreau, R. L. M.; Siqueira, M. E. P. B. Toxicologia analítica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011, 318 p.

[48] Oliveira, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 14, 2003, 174-182.

[49] Korn, M. G. A.; Boa Morte, E. S.; Santos, D. C. M. B.; Castro, J. T.; Barbosa, J. T. P.; Teixeira, A. P.; Fernandes, A. P.; Welz, B.; Santos, W. P. C.; Santos, E. B. G. N.; Korn, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review. Applied Spectroscopy Reviews, v. 43, 2008, 67-92.

[50] Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. Química Nova, v. 25, 2002, 1132–1144.

[51] Association of official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC international, 14ª ed., Washington, 1987.

[52] ASTM D1428-64. Annual Book of ASTM Standard, v. 10. Philadelphia, 1981.

[53] Borges, C.D.; Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A.; Vendruscolo, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arborícola* pv *pruni* strain 106. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, 2009, 262–268.

[54] Oliveira, P.D.; Vendruscolo, C. T.; Borges, C. D.; Michel, R. C., Lomba, R. F. T. Avaliação comparativa das propriedades de xantanas produzidas pelo patovar *pruni* e *clairana* com xantana comercial para predição de uso. *Polímeros*, v. 23, 2013, 417–424.

[55] Borges, C. D.; Bastos, C. P.; Vendruscolo, C. T. Avaliação das características físicas e químicas de gomas xantanas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, 2007, 107–114.

[56] Pinto, E.P.; Furlan, L.; Vendruscolo, C. T. Chemical de acetylation natural xanthan (Jungbunzlauer®). *Polimeros*, v.21, 2011, 47 – 52.

[57] Gonzalez, M. H.; Souza, G. B.; Oliveira, R. V.; Forato, L. A.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta*, v. 79, 2009, 396–401.

[58] Pichler, U.;Haase, A.; Knapp, G. Microwave-enhanced flow system for high-temperature digestion of resists organic materials. *Analytical Chemistry*, v.71, 1999, 4050–4055.

[59] Wasilewska, M.; Goessler, W.; Zischka, M.; Maichin, B.; Knapp, G. Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 17, 2002, 1121–1125.

[60] Gouveia, S. T.; Silva, F. V.; Costa, L. M.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Analytica Chimica Acta*, v. 445, 2001, 269–275.

[61] Relação de produtos controlados. Dinâmica assessoria em documentos, 2010, 19p.

[62] Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. *Química Nova*, v. 20, 1997, 638-643.

[63] Quaresma, M. C. B.; Cassella, R. J.; La Guardia, M.; Santelli, R. E. Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination. *Talanta*, v. 62, 2004, 807–811.

[64] Ferreira, S. L. C.; Silva, L. O. B.; Santana, F. A.; Junior, M. M. S.; Matos, G. D.; Santos, W. N. L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. *Microchemical Journal*, v. 106, 2013, 307–310.

[65] Tölg, G. Extreme trace analysis of the elements – I, methods and problems of sample treatment, separation and enrichment. *Talanta*, v. 19, 1972, 1489-1521.

[66] Nano, R. M. W.; Bruns, R. E.; Ferreira, S. L. C.; Baccan, N.; Cadore, S. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. *Talanta*, v. 80, 2009, 559–564.

[67] Macedo, S. M.; Jesus, R. M.; Garcia, K. S.; Hatje, V.; Queiroz, A. F. S.; Ferreira, S. L. C. Determination of total arsenic and arsenic (III) in phosphate fertilizers and phosphate rocks by HG-AAS after multivariate optimization based on Box-Behnken design. *Talanta*, v. 80, 2009, 974–979

[68] Ferreira, S. L. C.; Jesus, R. M.; Matos, G. D.; Andrade, J. B.; Bruns, R. E.; Santos, W. N. L.; Cavalcante, D. D.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B. Multivariate Optimization and Validation of an Analytical Method for the Determination of Cadmium in Wines Employing ET AAS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, 2009, 788–794.

[69] Macedo, S. M.; Santos, D. C.; Jesus, R. M.; Rocha, G. O.; Ferreira, S. L. C.; Andrade, J. B. Development of an analytical approach for determination of total arsenic and arsenic (III) in airborne particulate matter by slurry sampling and HG-FAAS. *Microchemical Journal*, v. 96, 2010, 46–49.

[70] Jesus, R. M.; Junior, M. M. S.; Matos, G. D.; Santos, A. M. P.; Ferreira, S. L. C. Validation of a digestion system using a digester block/cold finger system for the determination of lead in vegetable foods employing electro thermal atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, v. 94, 2011, 942–946.

[71] Silva, D. G.; Junior, M. M. S.; Silva, L. O. B.; Portugal, L. A.; Matos, G. D.; Ferreira, S. L. C. Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier. *Analytical Methods*, v. 3, 2011, 2495–2500.

[72] Becker, E. M.; Dessuy, M. B.; Boschetti, W.; Vale, M. G. R.; Ferreira, S. L. C.; Welz, B. Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by hydride generation–graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 71-72, 2012, 102–106.

[73] Silva, D. G.; Scarminio, I. S.; Anunciação, A. S.; Souza, A. S.; Silva, E. G. P.; Ferreira, S. L. C. Determination of the mineral composition of Brazilian rice and evaluation using chemometric techniques. *Analytical Methods*, v. 5, 2013, 998–1003.

[74] Junior, M. M. S.; Silva, L. O. B.; Leão, D. J.; Ferreira, S. L. C. Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ET AAS. *Food Chemistry*, v. 160, 2014, 209–213.

[75] Oliveira, A. C.; Santos, V. S.; Santos, D. C.; Carvalho, R. D. S.; Souza, A. S.; Ferreira, S. L. C. Determination of the mineral composition of Caigua (*Cyclanthera pedata*) and evaluation using multivariate analysis. *Food Chemistry*, v. 152, 2014, 619–623.

[76] Oreste, E. Q. Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras biológicas para a determinação de Hg, Cd, Pb e Sn por Espectrometria de Absorção Atômica. 2013, 188 f. Dissertação (mestrado em química) – Centro de ciências químicas, farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

[77] Oreste, E. Q.; Jesus, A.; Oliveira, R. M.; Silva, M. M.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. R. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. *Microchemical Journal*, v. 109, 2013, 5–9.

[78] Oreste, E. Q.; Oliveira, R. M.; Nunes, A. M.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb e Sn in meat Samples by GF AAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. *Analytical Methods*, v. 5, 2013, 1590–1595.

[79] Pinheiro, A. C. A.; Lisboa, M. T.; Ribeiro, A. S.; Nunes, A. M.; Yamasaki, A. Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS. *Química Nova*, v. 37, 2014, 6–9.

[80] Universidade Federal de Pelotas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Process for preparing a xanthan biopolymer. International Patent WO/2006/047845, 2005.

[81] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2011, 999 p.

[82] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resoluções: RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acessado em maio de 2013.

[83] Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro-Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvadori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 11, 1998, 1–6.

[84] Brito, N. M.; Junior, O. P.A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e meio ambiente, v. 13, 2003, 129–146.