

MOAGEM CRIOGÊNICA PARA O PREPARO DE AMOSTRAS EM TÉCNICAS ANALÍTICAS

► Resumo

Este trabalho apresenta uma breve revisão sobre o uso da moagem criogênica para o preparo de amostras em aplicações analíticas e alguns resultados obtidos. A moagem criogênica é uma técnica que geralmente utiliza nitrogênio líquido para congelar as amostras antes da moagem, tornando-as quebradiças e, dessa forma, reduzindo a energia requerida para moagem em moinhos mecânicos ou o esforço requerido pelo analista para moagem em almofariz. Assim, pode-se obter um maior número de amostras processadas e distribuições de tamanho de partículas mais homogêneas. Nesta contribuição foram avaliadas as potencialidades da moagem criogênica em amostras de difícil homogeneização, tais como dentes e tecidos biológicos com alto teor de fibras. Os resultados esperados para moagem criogênica, como a rápida homogeneização das amostras e reduzidos tamanhos de partículas, geralmente menores que 100µm, são aqui apresentados.

Palavras-chave: Moagem criogênica, preparo de amostras, cominuição, materiais biológicos

► Summary

This work presents a brief review about the use of cryogenic grinding for sample preparation in analytical applications and some results obtained. Cryogenic grinding is a technique that generally uses liquid nitrogen to freeze the materials to be ground, making sample more brittle and so reducing the amount of energy required by the mechanical mills or the effort required by operator for grinding in mortar and pestle. It increases sample throughput and improves the homogeneity of particle size distribution. In the present contribution the potentialities of the cryogenic grinding were evaluated for different materials of difficult homogenization such as human teeth and biological tissues with high fiber contents. The main results expected by employing cryogenic grinding, such as rapid sample homogenization and particle size distribution generally lower than 100µm, is herewith demonstrated.

Keywords: Cryogenic grinding, sample preparation, comminution, biological materials

■ Introdução

Após a amostragem, a primeira etapa de uma análise química consiste em submeter uma alíquota representativa da amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subsequentes. Esses procedimentos dependem da natureza da amostra, dos analitos a serem determinados e sua concentração, do método de análise e da precisão e exatidão desejadas. O tratamento da amostra pode envolver uma transformação substancial da espécie de interesse para uma forma apropriada visando à aplicação do método de determinação escolhido. É oportuno observar que, dentre todas as operações analíticas, a etapa de pré-tratamento das amostras é a mais crítica. Em geral, é nessa etapa que se cometem mais erros e que

se consome mais tempo. É também a etapa de maior custo. Por isso, os passos de um procedimento de pré-tratamento de amostra deverão ser sempre considerados cuidadosamente.

Na determinação de metais em baixas concentrações, por exemplo, a maioria das técnicas analíticas utilizadas requer que a amostra esteja na forma de uma solução [1]. Entre as vantagens da dissolução da amostra para essas técnicas, estão a facilidade do uso de soluções aquosas para calibração, facilidade para diluições e possibilidade de separações de constituintes com ou sem pré-concentração. Alternativamente, algumas técnicas como a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) ou com chama

*Dário Santos Júnior,
Andréa Cristina Tomazelli,
Francisco José Krug **
USP
Centro de Energia Nuclear na
Agricultura – CENA

Joaquim A. Nóbrega
UFSCar
Departamento de Química

* Autor para correspondência:
Centro de Energia Nuclear na
Agricultura – CENA
C. P. 96
Cep: 13400-970. Piracicaba. SP
Fone: (19) 3429-4600
E-mail: jkrug@cena.usp.br

Nota: A citação de fabricantes não implica na obtenção de nenhum fomento para divulgação deste trabalho, e não constitui recomendação por parte dos autores.

(FAAS), a espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma induzido (ICP-MS) permitem a determinação de metais por meio da análise direta de sólidos e/ou da amostragem de suspensões. Os benefícios da análise de sólidos incluem: diminuição do tempo de preparo das amostras, menor possibilidade de contaminação, menor possibilidade de perda do analito devido à retenção por resíduos insolúveis ou volatilização prematura, menor uso de reagentes, menor produção de resíduos e diminuição dos custos analíticos.

Neste contexto, exceto nos casos de equipamentos com amostradores de ablação por laser, a introdução da amostra na forma sólida ainda requer um mínimo tratamento. Na amostragem direta de sólidos em atomizadores ou vaporizadores eletrotérmicos, assim como na amostragem de suspensões, esse tratamento pode consistir apenas em uma etapa de moagem. Contudo, devido à pequena massa de amostra utilizada nesses métodos, geralmente entre 10 e 500µg, é fundamental que o material moído apresente distribuição homogênea de tamanho de partículas. Essa condição pode ser crítica, principalmente na análise de suspensões em ICP-OES, na qual o tamanho de partículas requerido é, freqüentemente, menor que 10µm [2]. Por outro lado, a análise de suspensões usando-se atomizadores ou vaporizadores eletrotérmicos é mais tolerante ao tamanho de partículas. Nesse caso, usualmente recomendam-se partículas menores que 100µm [3-7], mas o uso de partículas de até 500µm, em algumas situações, pode ser aceitável [8-9].

Infelizmente, a maioria dos moinhos convencionais não produz, em poucos minutos, distribuições homogêneas de partículas menores que 100µm, principalmente para amostras de alta dureza ou com altos teores de fibras e gorduras [10].

Visando diminuir os problemas associados à homogeneização e ao tamanho das partículas, Iyengar e Kasperek [11] desenvolveram a técnica de moagem criogênica para homogeneização de amostras biológicas. O princípio da técnica consiste em promover o congelamento da amostra para aumentar a dureza dos materiais provocando falhas na estrutura. Dessa forma, o material se torna quebradiço, sendo necessária uma menor energia para sua cominuição. No procedimento investigado, a amostra foi colocada em um moinho de bolas, no qual o recipiente da amostra era constituído de PTFE e as bolas constituídas de metal e revestidas com PTFE. O recipiente da amostra foi resfriado em nitrogênio líquido (N₂) por alguns minutos e agitado por 1 min a 3000 ciclos por minuto. O procedimento foi aplicado para moagem de fígado bovino visando à determinação de Ag, Cl, Co, Fe, K, Mn, Na, P, Rb e Zn empregando-se análise por ativação neutrônica instrumental.

Após o trabalho de Iyengar e Kasperek, vários autores demonstraram a eficiência da moagem criogênica para homogeneização de diversos materiais. Embora sua aplicação tenha sido bastante difundida em diversos ramos da indústria, principalmente de termoplásticos e borrachas, e até mesmo para moagem de pneus visando a sua reciclagem, as potencialidades da moagem

criogênica ainda não são intensamente exploradas para o preparo de amostras em aplicações analíticas.

Neste trabalho, pretende-se discutir em uma breve revisão algumas potencialidades da moagem criogênica para rápida homogeneização de amostras em diferentes aplicações analíticas, assim como alguns resultados obtidos utilizando-se essa técnica.

Preparo de amostras visando a determinação de elementos inorgânicos

De Boer e Maessen [12] aplicaram a moagem criogênica para homogeneização de placenta humana. Os autores compararam a eficiência na redução do tamanho das partículas utilizando-se nitrogênio líquido (-196°C) ou gelo seco em acetona (-78°C) para congelamento das amostras. Demonstrou-se que a maior percentagem de partículas menores que 100µm foi obtida quando o conjunto de moagem foi refrigerado sob menor temperatura com nitrogênio líquido. Através de experimentos com traçadores radiativos, os autores observaram melhores homogeneizações usando-se nitrogênio líquido e, além disso, concluíram que alíquotas de 10mg poderiam ser utilizadas representativamente a partir de 10g da amostra.

Zeisler *et al.* [13] investigaram essa técnica utilizando nitrogênio líquido para homogeneizar amostras de fígado bovino, gordura de porco e tecido muscular fibroso. No procedimento investigado foram avaliados um moinho criogênico de bolas e um moinho criogênico de disco. Observou-se que o moinho de disco foi mais eficiente para produzir partículas menores. Após 4 min de moagem, as amostras congeladas foram peneiradas em meio de nitrogênio líquido para prevenir a aglomeração das partículas. As amostras de gordura de porco apresentaram maior dificuldade de homogeneização, sendo que de 10% a 15% do material moído apresentou partículas maiores que 460µm. Para as amostras de tecido muscular fibroso, após 8 min de homogeneização, observou-se que a maioria das partículas foram inferiores a 460µm. Os autores atestaram a homogeneidade para 26 elementos em alíquotas de 250mg utilizando-se a técnica de análise por ativação neutrônica instrumental para os dois tipos de moinhos utilizados.

May e Kaiser [14] avaliaram o procedimento de moagem criogênica para homogeneização de amostras de peixes, utilizando um moinho criogênico modelo 6700 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, EUA). Nesse moinho as amostras são moídas por impacto em um conjunto de moagem, constituído de um tubo de policarbonato e de peças magnéticas de aço inoxidável (440C), o qual é imerso em nitrogênio líquido. Uma vez que as amostras entram em contato com as peças de aço inoxidável, investigou-se a possibilidade de contaminação de 30 elementos em amostras de alta dureza (quartzo) e amostras de tecido de peixe. Após 3 min de moagem os autores observaram contaminações de 1,5µg g⁻¹ Cr, 15µg g⁻¹ Fe, 0,1µg g⁻¹ Mo e 1,0µg g⁻¹ Ni. Os autores concluíram que, comparativamente aos procedimentos freqüentemente utiliza-

dos para homogeneização de materiais biológicos, a moagem criogênica produziu menores tamanhos de partículas (<100µm) com melhor homogeneidade.

Mierzwa *et al.* [5] aplicaram a moagem criogênica no preparo de amostras visando à determinação de Ba, Cu, Fe, Pb e Zn em folhas de chá por GFAAS e ICP-OES. As amostras foram moídas durante 20 min em um moinho com um acessório para resfriamento com nitrogênio líquido. Os autores verificaram que a refrigeração melhorou a eficiência da moagem e que o tamanho médio das partículas, examinado por microscopia eletrônica de varredura (SEM), foi inferior a 60µm.

Engelsen e Wibetoe [7] determinaram Al, Cu, Li e Mn em sementes de pinheiro e materiais de referência certificados (CRMs) de plantas por GFAAS com amostragem de suspensões. A moagem criogênica foi utilizada para evitar problemas de aglomeração das partículas que ocorria durante a moagem das sementes em temperatura ambiente. Os autores observaram que, para moagem em temperatura ambiente, a distribuição do tamanho das partículas foi dispersa até 170µm, tendo sua maior fração situada até 100µm. Para moagem criogênica a distribuição do tamanho das partículas foi mais uniforme, com a maioria das partículas menor que 50µm.

Gouveia *et al.* [15] utilizaram a moagem criogênica para homogeneização de cereais matinais visando à determinação de Fe, Mn e Zn por FAAS após digestão assistida por microondas. A moagem consistiu apenas de uma etapa de pré-congelamento da amostra por 2 min e uma etapa de moagem por 2 min. As medidas dos tamanhos das partículas foram feitas por SEM e apresentaram valores médios de aproximadamente 30µm. Os autores também observaram menores coeficientes de variação na determinação dos analitos em amostras moídas criogenicamente em comparação com amostras moídas em moinhos de facas.

Kamogawa *et al.* [16] determinaram Cd, Cu e Pb em amostras de cabelo por GFAAS empregando análises de suspensões. As amostras foram moídas criogenicamente durante 13 min, obtendo-se distribuições homogêneas, sendo 90% das partículas menores que 95µm.

Santos Jr *et al.* [10] avaliaram a aplicação da moagem criogênica para amostras de alimentos com diferentes teores de fibras e gordura visando ao preparo de suspensões para a determinação de Cd e Pb por GFAAS. As medidas dos tamanhos das partículas foram feitas por difração de laser e apresentaram distribuições homogêneas com partículas geralmente menores que 60µm após 5 min de pré-congelamento e 2 min de moagem. No equipamento utilizado (Spex, Metuchen, NJ, EUA, modelo 6800) é possível a moagem de até quatro amostras simultaneamente. Os autores demonstraram que a homogeneidade das amostras após a moagem criogênica possibilitou a determinação de Cd e Pb em massas de 5mg a 20mg, preparando-se as suspensões diretamente nos copos de 1,5mL do amostrador automático. Um aspecto relevante observado foi a possibilidade de moagem de amostras com alto teor de óleos. Para amostras de castanha do Pará, aplicando-se um período

de pré-congelamento de 15 min e três ciclos de moagem de 2 min, observou-se a dispersão de partículas no óleo e a separação entre as partículas e o óleo após um período de decantação. Nesse ponto, é importante ressaltar que essa característica da moagem criogênica poderia ser implementada como uma alternativa para os procedimentos convencionais de trituração e/ou maceração empregados na extração de pequenas massas de óleos vegetais para análise química, uma vez que, com a moagem, ocorre a liberação direta do óleo (i.e. castanha do Pará e azeitona) ou facilitam-se os procedimentos de extração por solvente, sem que ocorra a degradação de compostos termolábeis.

Outras aplicações da moagem criogênica têm sido relatadas na literatura visando à homogeneização de amostras biológicas [17-22], à diminuição de perdas de componentes com alta volatilidade ou de fácil oxidação quando moídas em temperaturas ambiente (i.e. condimentos, fármacos, óleo e gorduras) [23-29], à produção de CRMs [30-34] e ao preparo de amostras para extração de DNA em ossos [35] e dentes humanos [36,37]. Particularmente para a produção de CRMs, a moagem criogênica é atrativa pois possibilita a obtenção de materiais mais finos e, conseqüentemente, que viabilizarão uma representatividade adequada mesmo para massas reduzidas do material.

Para a maioria dos constituintes de interesse, a moagem à temperatura do nitrogênio líquido é pouco afetada por contaminação, principalmente se as peças do equipamento forem

Tabela 1. Amostras moídas por moagem criogênica.

Material	Massa (g)	Tempo* (min)	Tamanho (µm)	Ref.
Termoplásticos (pellets)	3	3	74 – 149	39
Escama de peixe	1,5	4	< 74	39
Pelo animal	0,5	2	< 74	39
Dente humano (inteiro)	2	2	< 74	39
Vértebra humana (7 mm)	2	4	< 74	39
Pele de rato (natural)	2	3	< 74	39
Nylon (3 mm)	2	4	74 – 149	39
Polietileno	1	2	< 74	39
Polipropileno	1,5	6	< 74 – 149	39
Borracha	0,5	4	149 – 297	39
Madeira	1,3	4	< 149	39
Placenta humana	10	40	< 250	12
Fígado bovino e tecido muscular fibroso	150	4	< 460	13
Tecido de peixe	1 - 2	3	< 100	14
Sementes de pinheiro	-	10	< 50	7
Cereais matinais	1	2	30	15
Cabelo	1 - 2	8	< 95	16
Vegetais e tecido animal	2	2	< 60	10

* Os valores apresentados referem-se apenas a etapa de moagem criogênica.

feitas de PTFE ou titânio. Além de a moagem criogênica ser rápida, uma das vantagens dessa técnica, dependendo do material processado, está na geração de partículas com tamanhos inferiores a 150µm (Tabela 1).

Entretanto, um problema associado à mecanização da moagem criogênica visando aplicações analíticas, é o estresse mecânico sofrido pelas peças móveis do moinho sob baixas temperaturas, podendo levar ao desgaste e, até mesmo, ao cisalhamento do material.

Uma alternativa atraente para esse problema foi implementada nos moinhos Freezer Mill modelos 6750 e 6800 produzidos pela Spex (Metuchen, NJ, EUA) que utilizam a moagem por impacto com barras magnéticas. A Figura 1 mostra o tipo de mecanismo empregado para moagem criogênica nesses moinhos. O conjunto de moagem é constituído de um tubo de policarbonato, uma barra magnética e duas tampas de aço inoxidável. A amostra, entre 1g e 2g (Modelo 6750) ou entre 1g e 100g (Modelo 6800, usando conjuntos de moagem de diferentes capacidades), é introduzida junto com a barra magnética no tubo de policarbonato, o qual é vedado nas extremidades com as tampas de aço. O conjunto de moagem é imerso em nitrogênio líquido durante todo o programa de moagem, o que diminui a possibilidade de perda de componentes voláteis e/ou oxidáveis da amostra. Após o período de pré-congelamento selecionado, um campo magnético alternado é aplicado fazendo com que a barra magnética atinja as tampas do tubo em alta velocidade com uma frequência média de 20 impactos por segundo. A cominuição é promovida pelo impacto da barra magnética com as amostras e com as tampas do conjunto de moagem. Assim, apenas as barras magnéticas estão em movimento no moinho, sem o auxílio de braços ou pistões mecânicos, evitando-se o desgaste ou cisalhamento do material empregado, principalmente em juntas ou conexões. Para amostras de maior dureza, o tubo de policarbonato pode ser substituído por um tubo de aço inoxidável.

Entre as vantagens desses equipamentos está a possibilidade de moer rapidamente amostras de maior dureza (i.e. ossos, quartzo, dentes, polímeros etc.), assim como de materiais de difícil homogeneização (fibras, borrachas, tecidos animais com

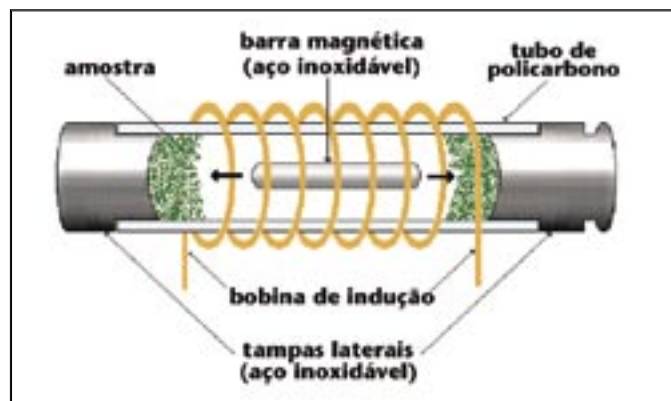


Figura 1. Conjunto de moagem utilizado nos moinhos Spex modelos Freezer Mill 6750 e 6800.

alto teor de umidade e gordura etc.), e a diminuição dos riscos de contaminação entre as amostras, uma vez que cada amostra é moída em um conjunto individual de moagem. A empresa B. Braun (Melsungen, Alemanha) também produz um equipamento para moagem criogênica denominado Mikro-Dismembrator II. Nesse caso, a amostra é pré-congelada sob nitrogênio líquido e em seguida, é transferida para o sistema de moagem. Os fabricantes recomendam a utilização de frascos de moagem e bolas constituídos com PTFE ou aço inoxidável, mas bolas de cromo e carbeto de tungstênio também podem ser usadas. A principal desvantagem dessa estratégia é o gradual aquecimento da amostra durante a etapa de moagem, uma vez que a mesma não é mantida sob nitrogênio líquido.

As Figuras 2, 3 e 4 mostram a distribuição do tamanho de partículas para amostras de siri, mexilhão e dentes humanos, respectivamente, congeladas por 5 min. e moídas por apenas 2 min nos moinhos criogênicos modelo Freezer Mill 6750 e 6800. As medidas do tamanho das partículas foram feitas em medidores de tamanho de partículas por difração de laser Coulter modelo LS230 (Miami, FL, EUA) e Malvern modelo Mastersizer E (Malvern, Inglaterra). Observa-se que 90% das partículas possuem diâmetro inferior a 64µm para siri, 76µm para mexilhão e 137µm para dentes. A moagem destes materiais por períodos mais extensos não reduziu significativamente o tamanho das partículas.

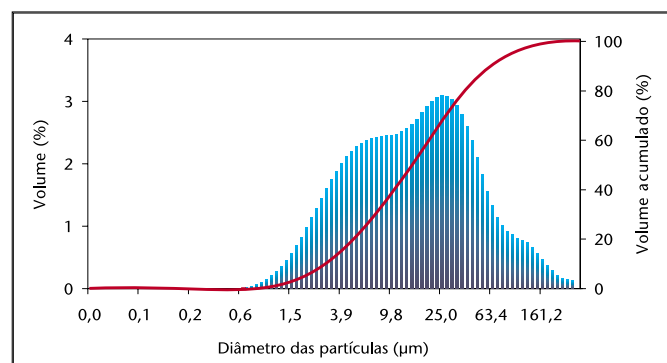


Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas de carne de siri liofilizada, pré-congelada por 5 min e moída em moinho criogênico (Spex, modelo 6750) por 2 min.

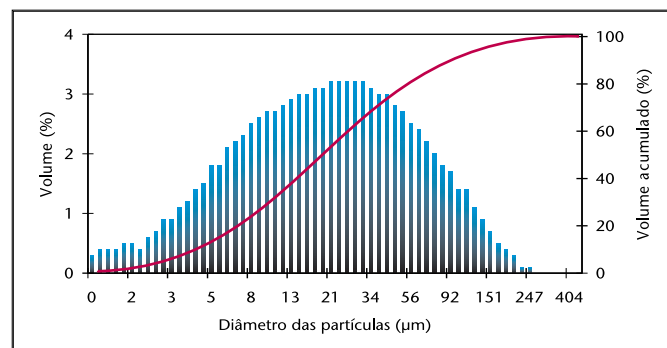


Figura 3. Distribuição do tamanho das partículas de mexilhão liofilizado, pré-congelado por 5 min e moído em moinho criogênico (Spex, modelo 6800) por 2 min.

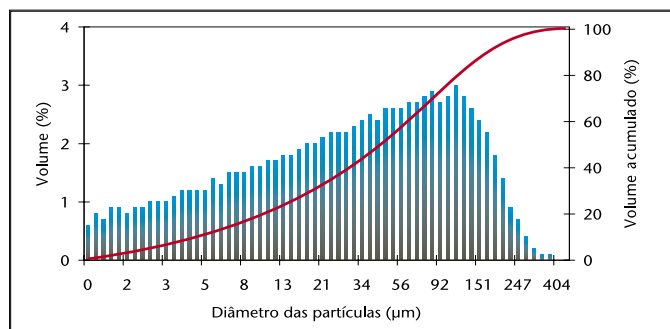


Figura 4. Distribuição do tamanho das partículas de dente humano pré-congelado por 5 min e moído em moinho criogênico (Spex, modelo 6800) por 2 min.

Deve-se ressaltar que, assim como observado por May e Kaiser [14], como a amostra fica em contato com as peças metálicas do conjunto de moagem, há o risco de contaminação por Cr, Fe, Mo e Ni. Assim, no preparo de amostras visando à determinação desses metais, esses equipamentos somente devem ser usados se a concentração endógena dos elementos for substancialmente maior que a contribuição da contaminação. Em trabalhos recentes, Araújo *et al.* [22], Gouveia *et al.* [15] e Carrilho *et al.* [38] demonstraram a possibilidade de utilizar o moinho Spex Freezer Mill 6750 para moagem de diferentes amostras sem contaminação perceptível de ferro.

Conclusões

De acordo com a complexidade das amostras já investigadas e com os resultados já obtidos, a moagem criogênica pode ser recomendada para diminuir o tempo gasto no preparo de amostras em procedimentos analíticos. Além disso, o tamanho reduzido de partículas aumenta a área de ataque dos reagentes, facilitando fortemente os procedimentos de digestão de amostras ou os procedimentos de extração. A homogeneidade do material moído permite o uso de técnicas micro-analíticas como a análise por ativação neutrônica ou a espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos em forno de grafite. Além disso, com partículas diminutas a análise direta de suspensões por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) pode ser implementada em alguns casos.

Até o presente momento, na maioria dos procedimentos de moagem criogênica descritos na literatura, não se alcançaram distribuições homogêneas com tamanhos de partículas menores que 10 μ m. Esse pré-requisito, como já mencionado, é fundamental para introdução e o transporte de suspensões, assim como para atomização do analito em ICP-OES. Dessa forma, apesar das vantagens aqui descritas, a investigação de novos equipamentos com diferentes mecanismos de moagem criogênica ainda é necessária para uma melhor cominuição.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos obtidos em projetos de pesquisa e bolsas de estudo.

Referências

- Nóbrega JA, Costa LM, Santos DM. *Revista Analytica*, 2002, 1, 32.
- Ebdon L, Foulkes M, Sutton K. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 213.
- Cabrera C, Lorenzo ML, Lopez MC. *J. AOAC Int.* 1995, 78,1061.
- Januzzi SBG, Krug FJ, Arruda MAZ. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 375.
- Mierzwa J, Sun YC, Chung YT, Yang MH. *Talanta*, 1998, 47,1263.
- Lima EC, Krug FJ, Ferreira AT, Barbosa Jr F. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999, 14, 269.
- Engelsen C, Wibetoe G. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 494.
- Miller-Ihli NJ. *J Anal At Spectrom.* 1988, 3, 73.
- Miller-Ihli NJ. *Fresenius J Anal Chem.* 1990, 337, 271.
- Santos Jr D, Barbosa Jr F, Tomazelli AC, Krug FJ, Nóbrega JA, Arruda MAZ. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 373, 183.
- Iyengar GV, Kasperek K. *J. Radioanal. Chem.* 1977, 39, 301.
- De Boer JLM, Maessen FJM. *J. Anal. Chim. Acta.* 1980, 117, 371.
- Zeisler R, Langland JK, Harrison SH. *Anal. Chem.* 1983, 55, 2431.
- May TW, Kaiser ML. *J. AOAC Int.* 1984, 67, 589.
- Gouveia ST, Lopes GS, Fatibello F^o O, Nogueira ARA, Nóbrega JA. *J. Food Engineering.* 2002, 51, 59.
- Kamogawa MY, Nogueira ARA, Costa LM, Garcia EE, Nóbrega JA. *Spectrochim. Acta*, 2001, 56, 1973.
- Koglin D, Backhaus F, Schlodot JD. *Chemosphere*, 1997, 34, 2041.
- Kramer GN, Pauwels J. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1990, 338, 390.
- Lugowski ST, Smith DC, McHugh AD, Van Loon JC. *J. Biom. Mat. Res.* 1991, 25, 1443.
- Lugowski ST, Smith D, Bzdega CJ. *Chemia Analityczna.* 1998, 43, 1011.
- Rogero SO, Saiki M, Saldiva PHN, Daliberto ML. *Biol. Trace. Elem. Res.* 1998, 43, 489.
- Araújo GCL, Nogueira ARA, Nóbrega JA. *Analyst*, 2000, 125, 1861.
- Shimo L, Shuangyan G, Zhongping H, Qun W, Haoping Z, Huaiyu P. *Cryogenics.* 1991, 31, 136.
- Singh KK, Goswami TK. *J. Food Proc Preserv.* 2000, 24, 57.
- Singh KK, Goswami TK. *J. Food Proc Engin.* 1999, 22, 175.
- Singh KK, Goswami TK. *J. Food. Engin.* 1999, 39, 359.
- Pesek CA, Wilson LA, Hammond EG. *J. Food. Sci.* 1985, 50, 599.
- Pesek CA, Wilson LA. *J. Food. Sci.* 1986, 51, 1386.
- Murthy CT, Krishnamurthy N, Ramesh T, Rao PNS. *J. Food. Sci. Tech.* 1996, 33, 299.
- Stone SF, Backhaus FW, Byrne AR, Gangadharan S, Horvat M, Kratzer K, Parr RM, Schlodot JD, Zeisler R. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1995, 352, 184.
- Yoshinaga J, Morita M, Okamoto K. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, 357, 279.
- Okamoto K, Yoshinaga J, Morita M. *Mikrochim Acta*, 1996, 123, 15.
- Kramer GN, Muntau H, Maier E, Pauwels J. *Fresenius J. Anal Chem.* 1998, 360, 299.
- Backhaus F, Bagschik U, Burow M, Byrne AR, Froning M, Mohl C, Ostapczuk P, Roszbach M, Schlodot JD, Stoeppler M, Waidmann E, Zeisler R. *Sci. Total Environ.* 1993, 139/140, 447.
- Hoof-Olsen P, Mevåg B, Staalstrøm E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B. *Forensic Sci. International.* 1999, 105, 171.
- Sweet D, Hildebrand D, Phillips D. *J. Forensic Sci.* 1999, 44, 630.
- Sweet D, Hildebrand D. *J. Forensic Sci.* 1998, 43,1199.
- Carrilho ENVM, Gonzalez MH, Nogueira ARA, Cruz GM. *Agricultural and Food Chemistry.* 2002, 50, 4164.
- Metuchen NJ. *Spex CertiPrep, Handbook of sample preparation & handling.* EUA, 1997.