



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LAIANA OLIVEIRA BASTOS SILVA**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA MINIMIZAÇÃO DA ETAPA  
DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MERCÚRIO EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E AMBIENTAIS**

Salvador  
2012

**LAIANA OLIVEIRA BASTOS SILVA**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA MINIMIZAÇÃO DA ETAPA  
DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MERCÚRIO EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS E AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em ciências. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador  
2012

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Silva, Laiana Oliveira Bastos.

Estratégias analíticas para minimização da etapa de preparo de amostra para determinação de mercúrio em amostras alimentícias e ambientais / Laiana Oliveira Bastos Silva. - 2012.  
109 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.

1. Mercúrio. 2. Alimentos - Contaminação. 3. Saúde ambiental. 4. Determinação - Mercúrio.  
5. Análise espectral. I. Ferreira, Sérgio Luis Costa. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 363.73

CDU - 543.42:543.62

A todos que se fizeram presentes e essenciais no desenvolvimento deste trabalho, em especial DEUS, minha amada mãe e meu orientador Prof. Dr. Sergio Ferreira.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante presença em minha vida. Agradeço por mais uma etapa de muito aprendizado e crescimento.

Ao meu orientador Professor Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira pela oportunidade, preciosa orientação e amizade. Um grande exemplo de vida a ser seguido.

Ao Pós-Doutorando Geraldo Matos por toda amizade, paciência e disposição a ajudar. Suas colaborações foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A minha família pelo amor, carinho, torcida e compreensão.

A Irênio Junior por todo amor, companheirismo, apoio, momentos de felicidade e paciência.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ): Fernanda, Danilo, Mário, Robson, Lindomar, Daniel, Geovani, Rogete, Daniela, Jeane, Lidiane, Neyla, Ana Pinto, Dannuza, Walter, Débora, Ivanice, Uenderson, Giovani, Adriana, Raineldes, Dalita... por toda ajuda, momentos de descontração e amizade.

Ao grande amigo que fiz no GRPQQ, Douglas Gonçalves pelas palavras de incentivo, carinho e grande ajuda diária.

A todos os professores que nesta jornada contribuíram com seus valiosos ensinamentos para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos conquistados durante a execução deste trabalho no GRPQQ: Raildo, Anderson, Erick, Fábio Alan, Cléber, Juracir, Pedro, Márcio e especialmente Samuel que com muita paciência me ajudou nos passos iniciais deste trabalho.

A João Victor Santos pela amizade e ensinamentos durante minha iniciação científica.

Aos amigos vizinhos do GPQA: Daniele Muniz, Tiago, Elane e Milena, por toda colaboração e disposição a ajudar.

Aos amigos que conquistei na UFBA durante minha formação em Química Industrial: Hênia, Roberto, Lilian, Paulo Roberto e Cintia.

Aos meus amigos: Ligia, Isaura, Débora, Bruce, Helden e Murilo, que sempre torceram por mim.

A CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho de mestrado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim.

“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de  
muita fadiga e persistência”

Henry Ford

## RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos sensíveis, simples e confiáveis utilizando amostragem em suspensão como estratégia alternativa para a minimização da etapa de preparo de amostras e técnicas de otimização multivariada para a determinação de mercúrio em amostras alimentícias e ambientais empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e geração de vapor frio (CV HR-CS AAS). As condições experimentais para geração de vapor frio de mercúrio e determinação empregando CV HR-CS AAS foram otimizadas utilizando planejamento fatorial completo de dois níveis e planejamento Box-Behnken, considerando os fatores: concentração de ácido clorídrico, concentração de tetrahidroborato de sódio e volume de tetrahidroborato de sódio, os quais apresentaram condições ótimas equivalentes a  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $1 \text{ \% (m/v)}$  e  $4 \text{ mL}$ , respectivamente. Para a determinação de mercúrio em arroz, as suspensões foram preparadas por meio da sonicação da amostra pré-cozida em água, e utilizando  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$  e tiouréia. Para a quantificação, álcool isoamílico foi adicionado no sentido de evitar a formação de espuma. Nestas condições, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de  $0,95$  e  $3,2 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. A exatidão foi confirmada mediante análise de material de referência certificado de farinha de arroz (NIST SRM 1568a) e o método proposto foi aplicado na determinação de mercúrio em amostras de arroz adquiridas em supermercados de Salvador, Bahia, Brasil. Em algumas amostras a concentração de mercúrio ficou abaixo do limite de quantificação, mas na maioria o teor de mercúrio variou de  $4,1$  a  $14 \text{ ng g}^{-1}$ . Algumas amostras também foram analisadas após digestão em microondas e não foram observadas diferenças significativas entre estes resultados e os resultados obtidos com as amostras em suspensão. Para a determinação de mercúrio em carvão, as suspensões foram preparadas utilizando  $4 \text{ mL}$  de  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$  e sonicação em banho ultrassônico por  $30 \text{ min}$ . Nestas condições foram obtidos limites de detecção e quantificação equivalentes a  $0,0060$  e  $0,018 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, e precisões em termos de desvio padrão relativo (RSD %) equivalentes a  $2,5$  e  $6,4\%$  para amostras de carvão contendo concentrações de mercúrio  $0,19$  e  $0,082 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. A exatidão do método foi confirmada mediante análise dos CRMs de carvão BCR 40 e BCR 182. O método proposto foi aplicado na determinação de mercúrio em quatro amostras de carvão provenientes do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil, as quais apresentaram teores de mercúrio entre  $0,082$  a  $0,19 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ . Já para a determinação de mercúrio em sedimento marinho, as suspensões também foram preparadas utilizando  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ , tiouréia  $1\%$  e sonicação. Octanol foi utilizado durante a quantificação a fim de evitar a formação de espuma. Os limites de quantificação e detecção para esse método foram  $0,040$  e  $0,14 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, e a análise do CRM de sedimento PACS-2 conferiu exatidão ao método. A técnica de calibração externa com padrões aquosos foi utilizada na determinação de mercúrio em todas as amostras, uma vez que não foi verificado efeito de matriz durante o desenvolvimento dos métodos.



## ABSTRACT

In this paper, sensitive, simple and reliable analytical methods were developed using slurry sampling as an alternative strategy to the minimization of sample preparation step and multivariate optimization techniques for the determination of mercury in food and environmental samples using atomic absorption spectrometry of the high resolution with continuum source and cold vapor generation (CV HR-CS AAS). The experimental conditions for mercury cold vapor generation and determination using CV HR-CS AAS were optimized using full two-levels factorial design and Box-Behnken design, considering the factors, hydrochloric acid concentration, sodium tetrahydroborate concentration and volume of tetrahydroborate sodium, which showed optimum conditions equivalent to 1.5 mol L<sup>-1</sup>, 1% (w/v) and 4 mL, respectively. For the determination of mercury in rice, slurries were prepared by sonication of the sample pre-cooked in water and 6 mol L<sup>-1</sup> HCl and thiourea. For the quantification, isoamyl alcohol was added to prevent foaming. In these conditions, the limits of detection and quantification obtained were 0.95 and 3.2 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The accuracy was confirmed by analysis of certified reference material of rice flour (NIST SRM 1568a) and the proposed method was applied to the determination of mercury in rice samples purchased at supermarkets in Salvador city, Bahia, Brazil. In some samples the mercury concentration was below limit of quantification, but in most the mercury content varied from 4.1 to 14 ng g<sup>-1</sup>. Some samples were also analyzed after a complete microwave-assisted digestion and there weren't significant differences between these results and the results obtained with the samples in suspension. For the determination of mercury in coal, slurries were prepared using 4mL of 6 mol L<sup>-1</sup> HCl and sonication in an ultrasonic bath for 30 min. In these conditions, were obtained limits of detection and quantification equivalent to 0.0060 and 0.018 µg g<sup>-1</sup>, respectively and precision, expressed as relative standard deviations (RSD%), equivalent to 2.5 and 6.4% for coal samples containing concentrations of mercury 0.19 and 0.082 µg g<sup>-1</sup>, respectively. The accuracy was confirmed by analysis of coal CRMs BCR 40 and BCR 182. The proposed method was applied to the determination of mercury in four coal samples from Rio Grande do Sul and Santa Catarina Cities, Brazil, which had mercury levels between 0.082 to 0.19 µg g<sup>-1</sup>. Already for the determination of mercury in marine sediment, slurries were also prepared using 6 mol L<sup>-1</sup> HCl, 1% thiourea and sonication. Octanol was used for quantification to avoid foaming. The limits of quantification and detection for this method were 0.04 and 0.14 µg g<sup>-1</sup>, respectively, and analysis of sediment CRM PACS-2 gave accuracy the this method. The external calibration technique with aqueous standards was used to determine mercury in all samples, since was not observed effect of the matrix during the development of the method.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Ciclo biogeoquímico do mercúrio.....	21
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática de um HR-CS AAS. (1) espelhos elipsoidais focalizadores; (2) fenda de entrada; (3) espelhos parabolóides; (4) prisma; (5) rede echelle.....	44
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática de um sistema no qual certo número de fatores (variáveis independentes de entrada) atuam para produzir respostas de interesse (variáveis dependentes de saída).....	51
<b>Figura 4</b>	Sistema de geração de hidreto (modulo HS50) acoplado ao espectrômetro CONTRAA 700 do Analytik Jena.....	61
<b>Figura 5</b>	Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado e acoplado ao HR-CS AAS.....	62
<b>Figura 6</b>	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ).....	68
<b>Figura 7</b>	Superfícies de resposta (a) = $(Abs \times C_{NaBH_4} \times C_{HCl})$ ; (b) = $(Abs \times Vol_{NaBH_4} \times C_{HCl})$ e (c) = $(Abs \times Vol_{NaBH_4} \times C_{NaBH_4})$ .....	70
<b>Figura 8</b>	Gráfico de Pareto do planejamento Box-Behnken.....	72
<b>Figura 9</b>	Superfície de respostas $(Abs \times C_{NaBH_4} \times C_{HCl})$ .....	72
<b>Figura 10</b>	Superfície de respostas $(Abs \times Vol_{NaBH_4} \times C_{HCl})$ .....	73
<b>Figura 11</b>	Superfície de respostas $(Abs \times Vol_{NaBH_4} \times C_{NaBH_4})$ .....	73
<b>Figura 12</b>	Gráfico de Pareto do ensaio de robustez.....	77
<b>Figura 13</b>	Gráfico de Pareto.....	79
<b>Figura 14</b>	Amostra de arroz. (A) in natura; (B) parcialmente macerado a grãos menores.....	80
<b>Figura 15</b>	Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva na amostra.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Métodos propostos para a determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão.....	41
<b>Tabela 2</b>	Comparação das vantagens e desvantagens associadas ao uso dos agentes redutores SnCl <sub>2</sub> e NaBH <sub>4</sub> na determinação de mercúrio por vapor frio.....	46
<b>Tabela 3</b>	Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ).....	52
<b>Tabela 4</b>	Exemplo de planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ), considerando as variáveis A, B e C e as interações entre elas.....	54
<b>Tabela 5</b>	Comparação entre as eficiências dos planejamentos de superfícies de resposta.....	55
<b>Tabela 6</b>	Exemplo de matriz de planejamento Box-Behnken para 3 fatores.....	56
<b>Tabela 7</b>	Programa de aquecimento para a digestão de amostra de arroz em forno microondas.....	66
<b>Tabela 8</b>	Matriz do planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.....	68
<b>Tabela 9</b>	Matriz do planejamento Box-Behnken com as respostas analíticas em absorvância para a otimização do método de geração de vapor frio de mercúrio e determinação por HR-CS AAS.....	71
<b>Tabela 10</b>	ANOVA gerada pelo programa STATISTICA 8.0 com os valores experimentais obtidos.....	75
<b>Tabela 11</b>	Domínio experimental para realização do ensaio de robustez aplicando planejamento fatorial (2 <sup>2</sup> ).....	76
<b>Tabela 12</b>	Matriz de planejamento experimental para ensaio de robustez com as respostas analíticas em absorvância.....	76
<b>Tabela 13</b>	Matriz do planejamento para otimização das condições experimentais para a determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão.....	78

<b>Tabela 14</b>	Avaliação da perda de mercúrio durante a execução do método analítico proposto.....	81
<b>Tabela 15</b>	Teste de adição e recuperação.....	89
<b>Tabela 16</b>	Determinação de mercúrio em arroz usando amostragem em suspensão e digestão ácida.....	89
<b>Tabela 17</b>	Determinação dos parâmetros necessários para aplicação do teste-t pareado.....	90
<b>Tabela 18</b>	Resumo das figuras analíticas de mérito do método desenvolvido.....	91
<b>Tabela 19</b>	Determinação de mercúrio em amostras de arroz.....	92
<b>Tabela 20</b>	Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS AAS e geração de vapor frio.....	93
<b>Tabela 21</b>	Determinação de mercúrio em carvão usando amostragem em suspensão.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABS</b>	Absorvânica
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BCR</b>	Community Bureau of Reference
<b>CCD</b>	Dispositivo de Carga Acoplada ( <i>Charge Coupled Device</i> )
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>CRM</b>	Material de referência certificado ( <i>Certified Reference Material</i> )
<b>CV</b>	Vapor frio ( <i>Cold Vapor</i> )
<b>CV AFS</b>	Espectrometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio ( <i>Cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i> )
<b>CV HR-CS AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica de Fonte Contínua e Alta Resolução com Vapor Frio ( <i>Cold Vapor High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
<b>ETAAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica ( <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> )
<b>FAO</b>	Organização de Alimentos e Agricultura ( <i>Food and Agriculture Organization</i> )
<b>HR-CS AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica de Fonte Contínua e Alta Resolução ( <i>High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
<b>ICP MS</b>	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia ( <i>National Institute of Standards e Technology</i> )
<b>NRCC</b>	National Research Council Canada
<b>RSD</b>	Desvio Padrão Relativo ( <i>Relative Standard Deviation</i> )
<b>WHO</b>	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3	<b>O ELEMENTO MERCÚRIO</b> .....	20
3.1	ASPECTOS GERAIS .....	20
3.2	TOXICIDADE E EFEITOS NOCIVOS.....	21
3.3	A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM ARROZ.....	22
3.4	A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM CARVÃO.....	24
3.5	A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SEDIMENTO MARINHO.....	25
4	<b>AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO</b> .....	27
4.1	ASPECTOS GERAIS.....	27
4.2	FATORES IMPORTANTES NO PREPARO DAS SUSPENSÕES .....	29
4.2.1	Tamanho da partícula.....	29
4.2.2	Diluyente.....	30
4.2.3	Relação massa sólida e volume do diluyente.....	31
4.2.4	Partição do analito.....	32
4.2.5	Homogeneização e estabilização da suspensão.....	34
4.2.5.1	Sistema de homogeneização.....	34
4.2.5.2	Agentes estabilizantes.....	36
4.3	TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO.....	37
4.4	APLICAÇÃO DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM MATRIZES COMPLEXAS.....	38
5	<b>ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA</b> .....	42
5.1	ASPECTOS GERAIS.....	42
5.2	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E GERAÇÃO DE VAPOR FRIO.....	43
6	<b>OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA</b> .....	50

6.1	ASPECTOS GERAIS.....	50
6.2	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE DOIS NÍVEIS...	51
6.3	PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN.....	55
7	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	58
7.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	58
7.2	REAGENTES .....	58
7.3	PREPARO DE SOLUÇÕES.....	59
7.3.1	Soluções de mercúrio ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).....	59
7.3.2	Solução de hidróxido de sódio 0,05% (m/v).....	59
7.3.3	Solução de tetrahidroborato de sódio 1% (m/v).....	60
7.3.4	Solução de ácido clorídrico 6 mol L <sup>-1</sup> .....	60
7.3.5	Solução de tiouréia 1% (m/v).....	60
7.4	INSTRUMENTAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EMPREGANDO CV HR-CS AAS.....	60
7.5	PREPARO DAS SUSPENSÕES E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EMPREGANDO CV HR-CS AAS.....	62
7.5.1	Preparo das suspensões de arroz.....	62
7.5.2	Preparo das suspensões de carvão.....	63
7.5.3	Preparo das suspensões de sedimento marinho .....	65
7.6	PREPARO DE AMOSTRA DE ARROZ EMPREGANDO DECOMPOSIÇÃO EM FORNO MICROONDAS.....	65
8	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	67
8.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR CV HR-CS AAS.....	67
8.1.1	Planejamento Fatorial Completo (2 <sup>3</sup> ).....	67
8.1.2	Planejamento Box-Behken.....	70
8.1.3	Ensaio de robustez.....	75
8.2	UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE ARROZ EM SUSPENSÃO.....	77

8.2.1	Otimização das condições experimentais para determinação de mercúrio em arroz empregando amostragem em suspensão e CV HR-CS AAS.....	77
8.2.2	Avaliação do processo de cozimento do arroz no procedimento proposto.....	80
8.2.3	Avaliação da perda de mercúrio durante o procedimento proposto.....	81
8.2.4	Avaliação da extração de mercúrio no processo de amostragem em suspensão.....	81
8.2.5	Validação do método.....	82
8.2.5.1	Avaliação do efeito de matriz e escolha da técnica de calibração.....	82
8.2.5.2	Linearidade .....	83
8.2.5.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	84
8.2.5.4	Sensibilidade .....	85
8.2.5.5	Faixa Linear .....	85
8.2.5.6	Faixa linear de trabalho .....	86
8.2.5.7	Precisão .....	86
8.2.5.8	Exatidão .....	87
8.2.5.9	Eficiência de extração .....	90
8.2.5.10	Resumo das principais figuras analíticas de mérito do método proposto.....	91
8.2.6	Aplicação do método proposto.....	92
8.3	UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE CARVÃO EM SUSPENSÃO.....	93
8.4	UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO.....	95
9	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	97
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	99



## 1 INTRODUÇÃO

O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos e nocivos à saúde humana e aos ecossistemas, apresentando uma tendência à bioacumulação em organismos vivos e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (SELIN, 2009). Sua presença no ambiente deve-se tanto a processos naturais como erupções vulcânicas e desgaseificação da crosta terrestre quanto, em grande parcela, a processos industriais, atividades mineiras de garimpagem e queima de combustíveis fósseis (LEOPOLD et al., 2010; WHO, 1991).

As principais fontes de contaminação por mercúrio são a ingestão de alimentos contaminados, inalação e exposição ocupacional em atividades que o envolvam. Em virtude disso, a determinação de mercúrio em amostras de alimentos e ambientais é de grande importância para avaliar o grau de exposição humana a este elemento e os níveis de contaminação ambiental. Porém, em muitas situações a sua determinação não é uma tarefa tão fácil devido às baixas concentrações nas amostras quando não contaminadas, a volatilidade deste analito e a etapa de decomposição que compreende o preparo de amostras mais frequentemente utilizado em matrizes ambientais e de alimentos (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003).

A decomposição como técnica de preparo de amostra apresenta a vantagem de melhorar a homogeneidade da distribuição do analito na fase aquosa, porém é um dos processos mais complexos de preparo de amostra e pode levar a perdas por volatilização quando realizadas em altas temperaturas e sistemas abertos, risco de contaminação, uso de grandes volumes de reagentes e maior tempo de análise (SEGADE e BENDICHO, 1999). Diante do exposto novas abordagens analíticas que visam à determinação direta de analitos em amostras no estado natural, ou seja, sem sofrer decomposição, vem sendo utilizadas. Dentre estas novas abordagens, a amostragem em suspensão apresenta-se como uma alternativa bastante atraente visto que diminui o risco de perdas por volatilização e contaminação da amostra, reduz o consumo de reagentes perigosos e corrosivos, reduz o tempo de análise, pode ser aplicada em matrizes orgânicas e inorgânicas e possibilita análise de especiação (FLORES et al., 2001; FERREIRA et al., 2010).

A técnica de amostragem em suspensão para a determinação de mercúrio pode ser empregada com diversas técnicas espectroanalíticas, tais como: espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS), espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV AFS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor frio ou vaporização eletrotérmica (CV / ETV ICP MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor frio (CV ICP OES). Dentre todas estas técnicas analíticas a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio apresenta-se como uma boa alternativa, uma vez que reúne uma série de características favoráveis à análise de mercúrio total em suspensões de amostras ambientais e de alimento, tais como: simplicidade, limite de quantificação adequado, baixo custo relativo, rapidez, e no caso em questão disponibilidade (SEGADE e BENDICHO, 1999).

Os métodos analíticos podem ser desenvolvidos empregando otimização clássica que utiliza o método univariado e a contemporânea, que utiliza métodos multivariados. No método univariado, que otimiza uma única variável por vez enquanto que as demais são mantidas constantes, não são levadas em consideração as interações entre as variáveis; já no multivariado todas as variáveis são otimizadas simultaneamente, as interações entre as variáveis são levadas em consideração e avaliações dos efeitos e da significância dos fatores e das interações podem ser realizadas (MARANHÃO et al., 2007; FERREIRA SLC, BRUNS R. et al., 2007).

Diante do exposto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos, utilizando amostragem em suspensão e otimização multivariada, para a determinação de mercúrio em amostras alimentícia e ambiental, empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e geração de vapor frio (CV HR-CS AAS).

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Desenvolver métodos analíticos simples, rápidos e confiáveis baseados na aplicação de estratégias alternativas de preparo de amostras para a determinação de mercúrio em amostras de arroz, carvão e sedimento marinho empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e geração de vapor frio (CV HR-CS AAS).

### **Objetivos específicos**

- Desenvolver procedimento para geração de vapor frio de mercúrio empregando CV HR-CS AAS;
- Utilizar estratégias de otimização multivariada, como planejamento fatorial completo de dois níveis e planejamento Box-Behnken, para otimizar as condições de geração de vapor frio de mercúrio para determinação no HR-CS AAS;
- Aplicar a técnica de amostragem em suspensão como estratégia alternativa de preparo de amostras de arroz, carvão e sedimento marinho para a determinação de mercúrio por CV HR-CS AAS;
- Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras de interesse alimentício e ambiental.

### 3 O ELEMENTO MERCÚRIO

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS

O mercúrio é um elemento químico de símbolo Hg, de número atômico 80 e massa igual a 200,59 u. Encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente, apresenta pontos de fusão e ebulição equivalentes a  $-38,87\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $356,72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente e está situado no grupo 12 da classificação periódica dos elementos. O mercúrio pode ser classificado de acordo com sua forma apresentada no ambiente em: mercúrio metálico ou elementar, mercúrio inorgânico e orgânico, sendo o mercúrio elementar a forma mais volátil dentre todas (GUILHEN, 2009).

O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre associado a outros elementos, sendo o minério cinábrio ( $\text{HgS}$ ) sua forma mais abundante. Além das minas de mercúrio, têm-se também como fontes naturais de mercúrio as erupções vulcânicas, processo de desgaseificação da crosta terrestre e evaporações naturais (WHO, 1991; MICARONI et al., 2000; ZAHIR et al., 2005). O mercúrio é também um elemento presente nos combustíveis fósseis, incluindo o gás natural, óleo cru, carvão, xistos e betumes, consistindo assim as suas queimas em principais fontes de descarga antropogênica deste elemento na atmosfera (LEOPOLD et al., 2010). O aporte antrópico de mercúrio no ambiente ocorre também através de indústrias de produção de cloro-soda, de tintas, de papel e celulose, de equipamentos elétricos, de instrumentos de medição e controle, de produção de acetaldeído, agrotóxicos, atividades odontológicas e garimpeiras, entre outros (WHO, 1991).

As emissões de mercúrio tanto naturais quanto antropogênicas em sua maioria são sob a forma de mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), podendo também ser emitidos, em quantidades menores, sob outras formas químicas. A presença de mercúrio no ambiente sob outras formas também se deve a transformações biogeoquímicas do mercúrio elementar a mercúrio em estados de oxidação +1 e +2. A forma mais abundante do mercúrio na atmosfera é a elementar sendo que as demais formas são mais encontradas em sistemas aquáticos, solo e

sedimento, devido a sua maior solubilidade em água (SELIN, 2009; LEOPOLD et al., 2010). A Figura 1 mostra a mobilidade das espécies de mercúrio no ambiente através do ciclo biogeoquímico, onde MMeHg é monometilmercúrio e DMeHg é dimetilmercúrio. O ciclo natural biogeoquímico do mercúrio envolve transporte atmosférico, deposição na terra e oceano e revolatilização.

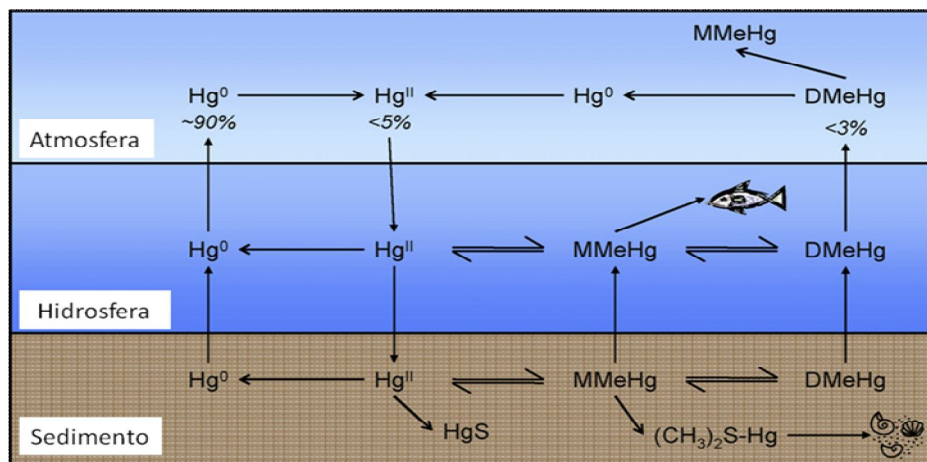


Figura 1 - Ciclo biogeoquímico do mercúrio.

Fonte: Adaptada de LEOPOLD et al., 2010

### 3.2 TOXICIDADE E EFEITOS NOCIVOS

O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos que impactam a saúde humana e ecossistemas, apresentando efeitos nocivos aos organismos vivos mesmo em concentrações muito pequenas. Sua toxicidade varia nos seus diferentes compostos, sendo as suas formas orgânicas geralmente mais tóxicas que as inorgânicas, devido ao radical orgânico permitir a rápida penetração na corrente sanguínea (MICARONI et al. 2000; LEOPOLD et al., 2010).

Dentre todas as formas o metilmercúrio é a mais tóxica, sendo que o mercúrio  $Hg^{2+}$  também é bastante tóxico devido a sua grande afinidade com grupos sulfídricos das proteínas, enzimas, hemoglobina e albumina. Já a espécie elementar ( $Hg^0$ ) apresenta baixa toxicidade em relação às demais espécies de mercúrio, porém quando absorvido pelo organismo através dos

pulmões se oxida na corrente sanguínea a uma espécie mais tóxica ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e se distribui rapidamente pelo corpo através do sangue (MICARONI et al. 2000; GUILHEN, 2009).

As manifestações clínicas associadas à intoxicação por mercúrio incluem náuseas, vômitos, cãibra, distúrbios visuais, inflamações gastrointestinais e danos ao sistema nervoso central, tais como; depressão, distúrbios de memória, dificuldade em articular palavras, tremor, fadiga, cefaléia e irritabilidade (WHO, 1991; YALLOUZ et al., 2001; MICARONI et al. 2000). Além do exposto, o metil-mercúrio tem efeito feto-tóxico, com alterações irreversíveis para o feto, mesmo sem o aparecimento de sintomas na mãe (YALLOUZ et al., 2001).

### 3.3 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM ARROZ

O arroz é uma planta da família das gramíneas, cujo nome científico é *Oryza sativa* L. Conhecido como cereal do tipo grão, caracteriza-se como o principal alimento na dieta de mais da metade da população mundial, sendo então um dos cereais de maior cultivo do mundo. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, sua importância é destacada desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. O arroz é uma excelente fonte de energia por apresentar alta concentração de amido e, além disso, fornece proteínas, vitaminas e minerais. A concentração de minerais difere nas frações do grão e é grandemente influenciada pelas condições de cultivo como fertilização e condições do solo e pelo processamento (DENARDIN et al., 2004; WALTER et al., 2008; EMBRAPA, 2005).

O mercúrio é um elemento altamente perigoso e potencialmente tóxico devido a seu comportamento acumulativo e persistente, sendo os alimentos uma das principais fontes de contaminação de mercúrio para o ser humano. Em virtude disso a Organização de Alimentos e Agricultura juntamente com a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) (1978), estabelecem a ingestão tolerável semanal de mercúrio total de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso corporal ou  $43 \mu\text{g}$  por dia para um indivíduo de 60 Kg. Quanto à legislação brasileira, a mesma por

meio do Decreto nº 55871, de março de 1965, estabelece o valor de  $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$  como limite máximo de tolerância de mercúrio em qualquer outro alimento que não seja peixe, crustáceo e molusco.

Diante do exposto é que nos últimos anos vem crescendo o interesse em desenvolver métodos sensíveis para determinar mercúrio em níveis muito baixos em amostras de alimento, especialmente no arroz que é um dos grãos cereais mais consumidos mundialmente.

Da Silva et al. (2010), recentemente propuseram um método para o determinação de mercúrio em arroz utilizando Espectrometria de Fluorescência Atômica com geração de vapor Frio (CV AFS). O método proposto se baseia na digestão da amostra em forno microondas utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, seguido de diluição contendo KBr/KBrO<sub>3</sub> e hidroxilamina. Utilizaram como agente redutor o SnCl<sub>2</sub> em meio ácido (HCl) e obtiveram como limite de detecção o valor de  $0,9 \text{ ng g}^{-1}$ . A faixa de concentração de mercúrio encontrada em 24 amostras analisadas foi de  $1,3$  a  $7,8 \text{ ng g}^{-1}$ .

Li et al. (2010), desenvolveram um método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) para especiar metilmercúrio em arroz cultivado em áreas próximas a mineração de mercúrio. O método foi baseado em hidrólise enzimática e concluíram que em arroz cru o MeHg apresenta-se quase exclusivamente como CH<sub>3</sub>Hg-L-cisteína (CH<sub>3</sub>HgCys) e que o cozimento converte a maioria do CH<sub>3</sub>HgCys a outras formas de MeHg, sendo que o teor de mercúrio total em amostras de arroz com ou sem cozimento não eram significativamente diferentes.

QIU et al. (2008), avaliaram o teor de metilmercúrio em arroz cultivado em áreas abandonadas de mineração de mercúrio na China. Para determinação do teor de mercúrio total empregaram digestão a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  em banho de água utilizando a mistura ácida HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Já para análise de MeHg, as amostras foram digeridas usando KOH-metanol com posterior emprego da técnica de extração com solvente para a análise de MeHg. O mercúrio total foi determinado utilizando CV AFS e o metilmercúrio utilizando Cromatografia Gasosa acoplada ao CV AFS. As amostras analisadas apresentaram um teor de mercúrio total e metilmercúrio equivalentes a  $17,5 - 608$  e  $7,31 - 62,3 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente.

### 3.4 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM CARVÃO

O carvão tanto mineral quanto vegetal é bastante utilizado como combustível para geração de energia. No Brasil, o carvão vegetal obtido por combustão incompleta de madeiras é destinado ao atendimento da demanda de diversos segmentos da indústria, como indústria de cimento e principalmente a indústria de siderurgia (UHLIG et al., 2008). Já o carvão mineral gerado por fossilização de matéria orgânica depositada em camadas profundas da terra e extraído por processos de mineração, tem grande aplicação mundial em geração de energia elétrica por meio de usinas termoelétricas e em indústrias para geração de calor. Segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), no Brasil as maiores jazidas situam-se nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e as menores no Paraná e em São Paulo, sendo que este minério para o Brasil representa pouco mais de 1,5 % da matriz da energia elétrica.

Dependendo da origem, o carvão pode conter de 25 a 97 % de carbono; 2 a 6 % de hidrogênio; 2 a 20 % de oxigênio; traços de nitrogênio e enxofre, além de diferentes minerais e elementos tóxicos (de CARVALHO, 2008). Como a combustão de carvão é uma das principais fontes antropogênicas de mercúrio no ambiente e o depósito do seu rejeito ao ar livre pode levar à contaminação de águas superficiais, subterrâneas, solo e sedimentos por lixiviação, a concentração de mercúrio nesta matriz vem sendo investigada, a fim de avaliar a qualidade deste combustível que é bastante utilizado e estimar o quanto de mercúrio pode ser liberado durante a sua combustão (FLORES et al., 2001; Xu et al., 2003).

FLORES et al. (2001), determinaram mercúrio em carvão mineral usando geração de vapor frio diretamente de suspensões e Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS). Para tanto, suspensões de carvão foram preparadas utilizando de 20 a 100 mg de CRM de carvão e 10 mL de ácido nítrico 1 mol L<sup>-1</sup>. As mesmas eram então mantidas a temperatura ambiente por 12-96 h e ocasionalmente agitadas manualmente. Utilizaram tetraidroborato de sódio como agente redutor, sendo que todo vapor de mercúrio gerado era transportado e recolhido no tubo de grafite pré-



aquecido com um modificador químico permanente por 60 seg, seguindo então para a etapa de atomização. O método proposto apresentou um limite de detecção equivalente a  $9 \text{ ng g}^{-1}$ .

LIU et al. (2004), desenvolveram um método para a determinação de traços de mercúrio em carvão empregando digestão em microondas e CV AFS. Realizaram a digestão utilizando a mistura ácido nítrico, clorídrico e fluorídrico, sendo que todas as condições experimentais foram avaliadas e otimizadas. Validaram o método mediante análise de CRM de carvão e obtiveram limite de detecção e precisão equivalentes a  $0,03 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $>5 \%$ , respectivamente.

### 3.5 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SEDIMENTO MARINHO

Os sedimentos são amplamente empregados como indicadores ambientais, pois os mesmos possuem uma grande capacidade de incorporar e acumular elementos contaminantes, mesmo quando estes estão presentes na água em concentrações muito baixas. Os sedimentos normalmente são levados de um curso de água para outro e em virtude disso, as análises dos sedimentos em vários pontos de uma região de interesse servem para rastrear fontes de contaminação, monitorar esses contaminantes ou levantar informações relevantes sobre a qualidade do ambiente aquático (PEREIRA et al., 1998).

O mercúrio é um metal nocivo que atinge sua forma mais tóxica (metilmercúrio) em sistemas aquáticos, tanto na porção água quanto na porção sedimento, devido à atividade de microorganismos capazes de converter o mercúrio  $\text{Hg}^{2+}$  em metilmercúrio. O mercúrio pode bioconcentrar em organismos vivos aquáticos e biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, provocando efeitos adversos tanto a população marinha quanto ao homem (SELIN, 2009). Em virtude disso e do exposto anteriormente, o desenvolvimento de métodos para a determinação de mercúrio em sedimentos marinhos é de grande importância, visto que podem ser aplicados na avaliação dos níveis de contaminação de um ecossistema aquático.

De acordo com a Resolução do CONAMA nº 344 de 25 de março de 2004, que se baseia em legislações canadense e norte-americana, dois níveis devem ser adotados como critérios de qualidade para sedimentos. O nível 1 que representa uma concentração abaixo da qual a probabilidade de efeitos adversos à biota é baixa e o nível 2 que representa uma concentração acima da qual espera-se um efeito adverso à biota. Para Hg esses níveis 1 e 2 em sedimentos de água doce são 0,17 e 0,486  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, e em sedimentos de águas salobras e salinas são 0,15 e 0,71  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

REZENDE et al. (2011), determinaram mercúrio e arsênio em amostras de sedimento da bacia do Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil, empregando HG AAS. Para tanto, utilizaram procedimentos de digestão pseudo-total com HCl:HNO<sub>3</sub> (3:1 v/v) e extração parcial com HCl 1 mol L<sup>-1</sup> e ultra-som. Observaram que 14 % das amostras excederam o limite de nível 1 estabelecido pela Resolução 344/2004 do CONAMA. Submeteram também as amostras com alto teor de mercúrio a termodessorção acoplada à espectrometria de absorção atômica (TDAAS) para especiação e observaram somente a presença da espécie Hg<sup>2+</sup> nas amostras.

RIBEIRO et al. (2004), empregaram amostragem em suspensão para a determinação de mercúrio em sedimentos por CV AAS e para tanto prepararam a suspensão com água régia e ácido fluorídrico e sonicação e obtiveram valores de mercúrio concordantes com CRMs de sedimento. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de sedimento marinho provenientes da costa da ilha de Santa Catarina, os quais apresentaram concentrações de mercúrio que variaram entre 0,103 a 0,148  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

## 4 AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO

### 4.1 ASPECTOS GERAIS

A etapa de preparo de amostras constitui o conjunto de procedimentos realizados com o intuito de converter a amostra, física e quimicamente, em uma forma adequada para análise, de forma que a espécie química de interesse seja quantificada com precisão e exatidão utilizando uma determinada técnica analítica de medida. Esta etapa é responsável por consumir em torno de 61% do tempo gasto em uma análise química e está associada à manipulação das amostras onde há risco de contaminação e/ou perda do analito de interesse (KRUG, 2008).

Os procedimentos empregados no preparo da amostra dependem da natureza da amostra, dos analitos de estudo e suas concentrações, da técnica que será utilizada para a determinação destes analitos e da precisão e exatidão desejadas. Dentre estes procedimentos se destacam com maior frequência as operações de solubilização/decomposição, extração, pré-concentração e derivatização. Para a determinação de metais em amostras complexas, como as ambientais e de alimento, frequentemente é empregado antes da análise instrumental o processo de solubilização/decomposição das amostras (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003).

A decomposição de matrizes complexas é uma etapa crítica que se baseia convencionalmente em técnicas de digestão ácida que faz uso de combinações de ácidos fortes oxidantes e temperaturas e/ou pressões elevadas. As principais preocupações e desvantagens em relação a esta técnica de decomposição estão relacionadas a perdas por volatilização quando as mesmas são realizadas em altas temperaturas e em sistemas abertos, ao risco de contaminação, a necessidade de utilizar grandes volumes de reagentes e a um maior tempo gasto neste processo de preparo que não é muito simples (SEGADE e BENDICHO, 1999).

Diante de tudo que foi apresentado e apesar dos processos de decomposição total de amostras complexas permitirem uma melhora na

homogeneidade da distribuição do analito na fase aquosa, atualmente a química analítica tem mostrado entre suas prioridades o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostra mais simples, rápidos e que evitem ou minimizem os processos relacionados à decomposição total da amostra e a sua manipulação (FERREIRA et al., 2010). Dentre as novas abordagens analíticas com esse intuito, a amostragem em suspensão apresenta-se como uma forte alternativa às metodologias convencionais de preparo de amostras, ganhando grande enfoque por parte da comunidade científica (KORN et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

A técnica de amostragem em suspensão que foi primeiramente empregada por Brady et al. (1974) na determinação de zinco e chumbo em folhas e sedimentos marinhos vem sendo aplicada em diversos trabalhos científicos empregando as mais variadas técnicas analíticas de quantificação, tais como; espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (ALVES et al., 2001; BRANDÃO et al., 2011), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) (BARALKIEWICZ et al., 2005; DA SILVA et al., 2011), espectrometria de absorção atômica com chama e geração de hidretos (HG FAAS) (MACEDO et al., 2009) , espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) (SEGADE e BENDICHO, 1999; RIBEIRO et al., 2004;), espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV AFS) (CAVA-MONTESINOS et al., 2004) e espectrometria de massa e de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP MS, ICP OES) (DOS SANTOS EJ et al., 2005; WANG et al., 2006; SANTOS e NOBREGA, 2006).

A amostragem em suspensão consiste na determinação direta de analitos em amostras sólidas dispersas em uma fase líquida, as quais são transportadas como soluções (FERREIRA et al., 2010). Este procedimento de preparo de amostra que minimiza o processamento de amostras sólidas e complexas apresenta uma série de vantagens quando comparado aos procedimentos clássicos. Entre estas vantagens, destacam-se: diminuição do risco de contaminação da amostra, redução do uso de reagentes corrosivos e perigosos, o que resulta em benefícios econômicos e ambientais, eliminação ou redução de perdas de analito por volatilização, redução do tempo de análise, aplicável em análise de amostras orgânicas e inorgânicas e na

determinação de elementos voláteis, maior sensibilidade devido à menor diluição das amostras, possibilidade de análise de especiação quando associados a reações de derivatização e procedimentos de separação, possibilidade do uso de padrões aquosos para a calibração e por fim, pode ser facilmente automatizado ou mecanizado para análise de injeção em fluxo (MAGALHAES e ARRUDA, 1998; RIBEIRO et al., 2004; FERREIRA et al., 2010).

Para desfrutar das vantagens associadas à técnica de amostragem em suspensão, faz-se necessário primeiramente obter suspensões homogêneas e estáveis, uma vez que estas características influenciam diretamente na exatidão e precisão do método (FERREIRA et al., 2010). Desta forma, parâmetros que influenciam diretamente na estabilidade e homogeneidade das suspensões devem ser estudados e avaliados, tais como: tamanho da partícula, tipo e concentração do diluente, relação massa sólida e volume do diluente, agentes estabilizantes, partição do analito e homogeneização (BENDICHO e DE LOOS-VOLLERBREGT, 1991; FERREIRA et al., 2010).

## 4.2 FATORES IMPORTANTES NO PREPARO DAS SUSPENSÕES

### 4.2.1 Tamanho da partícula

Em amostragem em suspensão, o tamanho da partícula além de influenciar na estabilidade e homogeneidade da suspensão, influencia na eficiência de transporte da amostra e na atomização do analito. Em virtude disso, esse fator tem um efeito mais acentuado em técnicas como FAAS, ICP OES e ICP MS, que usam sistemas de nebulização para introdução da amostra onde há risco de entupimento e bloqueio. Esse fator já não é tão crítico quando suspensões preparadas são analisadas empregando atomização eletrotérmica (ET AAS), vaporização eletrotérmica acoplada a técnicas baseadas em ICP e geração de vapor químico acoplado as técnicas espectroanalíticas, como a de geração de vapor frio e de hidretos, quando não trabalhadas associadas a

injeção em fluxo. O tamanho de partícula mais adequado a ser usado depende da composição da amostra, da homogeneidade da amostra em relação ao analito, da densidade da amostra e da técnica analítica empregada para a determinação (BENDICHO e DE LOOS-VOLLERBREGT, 1991; MAGALHAES e ARRUDA, 1998; SEGADE e BENDICHO, 1999; FERREIRA et al., 2010).

Quando o tamanho das partículas da amostra original influencia na homogeneidade e estabilidade da suspensão, é realizada a moagem da amostra com posterior peneiração em malhas. Entre as técnicas de moagem, as mais utilizadas são moinho de bolas, moagem em almofariz e moagem criogênica. As principais desvantagens vinculadas a esse processo são os riscos de contaminação e problemas de eletricidade estática quando partículas muito pequenas, obtidas por moagem, são pesadas (MAGALHAES e ARRUDA, 1998; FERREIRA et al., 2010).

SEGADE e BENDICHO (1999), determinaram mercúrio total em amostras ambientais e biológicas sólidas empregando amostragem em suspensão combinada com espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo. Neste trabalho, avaliaram a influência do tamanho da partícula na determinação de mercúrio e observaram que o seu tamanho não exercia influência na recuperação, apesar de partículas superiores a 100  $\mu\text{m}$  gerarem desvios padrões relativos maiores. Observaram também, muitas vezes, o entupimento da válvula de injeção quando trabalhavam com tamanho de partículas superiores a 150  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 Diluente

O diluente consiste em um componente crucial no preparo de suspensões, pois além de atuar como meio para isto, pode atuar como extrator do analito, melhorando assim a precisão e a exatidão, uma vez que há transferência dos analitos para a fase líquida. A escolha do diluente e sua concentração são feitas considerando a característica da matriz e do analito a ser determinado. Soluções ácidas diluídas ou concentradas e até mesmo combinadas com outros ácidos (TORRES et al., 2007) e com peróxido de

hidrogênio (ARAUJO et al., 2008) constituem os diluentes mais utilizados no preparo das suspensões, sendo o ácido nítrico o mais explorado dentre todos (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010). O uso de ácido nítrico diluído como diluente é bastante reportado na literatura, tanto para o preparo de suspensões de matrizes orgânicas (ARAUJO et al., 2007; VIEIRA et al., 2011) como inorgânicas (KRIVAN et al., 1998; GENTSCHEVA et al., 2004).

Na determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão vários trabalhos vêm reportando o uso de ácidos como diluentes. RIBEIRO et al. (2004), empregaram amostragem em suspensão para determinação de mercúrio em sedimento, lodo de esgoto e carvão por CV AAS, sendo que no preparo de suspensão dois procedimentos foram avaliados. Um dos procedimentos utilizou como diluente a mistura de água régia com ácido fluorídrico, recomendado para a determinação de mercúrio nas 3 matrizes trabalhadas; e o outro utilizou apenas o ácido nítrico como diluente, procedimento este adequado somente para a determinação de Hg em carvão. Já TYSON e SEGADE (2003), utilizaram ácido clorídrico como diluente no preparo de suspensão de tecido de peixe para especiação de mercúrio empregando dois simples sistemas de injeção em fluxo e CV AAS.

Em contraposição, às soluções ácidas, a água pura e as soluções alcalinas não são usualmente utilizadas como diluentes, apresentando assim poucos trabalhos empregando o seu uso. Entre estes se destacam recentemente o de CAMPILLO et al. (2010) que prepararam suspensões de tecidos biológicos com hidróxido de tetrametilamônio para a determinação de cobre, manganês e cobalto empregando ETAAS e o de TORRES et al. (2009) que determinaram mercúrio inorgânico e total em amostras biológicas a partir de suspensões preparadas em água e empregando CV AAS.

#### 4.2.3 Relação massa sólida e volume do diluente

Um importante fator na técnica de amostragem em suspensão é a relação/razão entre a massa sólida e o volume do diluente utilizados. A escolha da massa da amostra e do volume do diluente deve ser feita de acordo com a

homogeneidade e com o teor do analito na amostra. Considerando uma amostra homogênea e com altas concentrações do analito de interesse é adequado o uso de uma razão menor entre a massa da amostra e volume do diluente para obtenção de melhores propriedades analíticas para o procedimento, tais como precisão e exatidão. Já para amostras com baixos teores do analito um aumento da razão entre massa de amostra e volume de diluente se faz necessária para a determinação do elemento (FERREIRA et al., 2010). Esta relação (massa amostra/volume diluente) é a terminologia mais adequada para a concentração da suspensão em vez de porcentagem, pois resultados analíticos diferentes podem ser obtidos a partir de suspensões de mesma concentração (CAL-PRIETO et al., 2002). MILLERHILL (1994) estudou a influência do preparo das suspensões na exatidão do método proposto utilizando ultrassom e ETAAS, observou que diferentes resultados podem ser obtidos para a mesma concentração ( $2 \text{ mg } 1 \text{ mL}^{-1}$  e  $200 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ ) da suspensão.

Suspensões diluídas preparadas quando a amostra apresenta altas concentrações do analito podem ser utilizadas até um determinado limite, visto que perdas na precisão podem ocorrer devido ao menor número de partículas presentes na suspensão quando as mesmas estão muito diluídas (BENDICHO e LOOS-VOLLEBREGT, 1991; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998). Já suspensões concentradas, que são preparadas com intuito de se obter menores limites de detecção e quantificação quando a amostra apresenta baixo teor do analito, podem gerar problemas como efeitos de matriz, dificuldade na estabilidade da suspensão principalmente para matrizes de alta densidade e redução da precisão, devido às dificuldades encontradas na pipetagem (CAL-PRIETO et al., 2002).

#### 4.2.4 Partição do analito

A partição do analito que corresponde à extração do analito para a fase líquida da suspensão durante o seu preparo é um fator bastante avaliado devido sua grande influência na precisão e exatidão do método. Os erros



associados a não homogeneidade na distribuição do tamanho da partícula na amostra sólida são insignificantes quando ocorre extração do analito para o meio líquido. A eficiência de extração para um determinado analito para a fase líquida pode ser influenciada por um conjunto de fatores como: natureza do analito, característica da matriz, tamanho da partícula, tipo e concentração do diluente, força de ligação entre elemento e matriz, eficiência de homogeneização e tempo de exposição ao diluente e à homogeneização (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010). Como já informado anteriormente, diluentes ácidos utilizados no preparo da suspensão aumentam a eficiência de extração do analito para o meio líquido da suspensão, sendo que esta eficiência pode ser ainda mais aumentada ao se utilizar concentrações mais elevadas do ácido.

Este fator é de fundamental importância na avaliação das técnicas de calibração quando se trabalha com amostragem em suspensão e espectrometria atômica (FERREIRA et al., 2010). Quando a extração do analito para a fase líquida da suspensão é eficiente, de acordo com trabalhos reportados na literatura, a técnica de calibração externa usando padrões aquosos conduz a bons resultados, indicando que a mesma pode ser empregada, visto que nestas condições o analito apresenta comportamentos similares tanto na amostra quando no padrão (CAL-PRIETO et al., 2002).

DOS SANTOS WNL et al. (2005), utilizaram curvas de calibração preparadas com padrões aquosos para a determinação de cobre em chocolate em pó empregando amostragem em suspensão e FAAS, sendo que a extração de cobre para a fase líquida da suspensão foi em torno de 90%. MOREDA-PIÑEIRO et al. (2002), determinaram mercúrio em suspensões aquosas de amostras ambientais e biológicas por ETAAS com geração de vapor frio utilizando a técnica de calibração com adição de padrão pois, foi verificado um acentuado efeito de matriz, muito possivelmente por terem usado a água como diluente, a qual não atua de maneira eficaz na extração do analito para o meio líquido da suspensão.

#### 4.2.5 Homogeneização e estabilização da suspensão

A homogeneização e/ou a estabilização da suspensão, que visa à distribuição homogênea das partículas no meio líquido para garantir a representatividade da amostra, compreendem fatores dos mais críticos na técnica de amostragem em suspensão, visto que afetam diretamente a precisão e exatidão do método. A homogeneização/estabilização de uma suspensão pode ser alcançada por meio de agitação e/ou adição de agente estabilizante também conhecido como dispersante, surfactante, espessante ou agente tixotrópico (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; CAL-PRIETO et al., 2002).

##### 4.2.5.1 Sistema de homogeneização

Os diversos sistemas de homogeneização das suspensões são baseados em processos de agitação, entre os quais se destacam: a agitação manual, a agitação magnética, misturador por efeito vortex, agitação baseada em borbulhamento de gás e agitação ultrassônica. A eficiência destes sistemas depende, fundamentalmente, da taxa de sedimentação do material suspenso (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; CAL-PRIETO et al., 2002).

A agitação manual, que consiste em agitar o recipiente da suspensão antes da análise, é o processo mais simples e econômico dentre todos, mas pode ser ineficiente quando utilizado para materiais de alta densidade, sendo então necessário o uso de agentes estabilizantes. Em virtude disso, este processo é mais efetivo para materiais de baixa densidade (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010). Já a agitação mecânica, empregando a agitação magnética ou misturador vortex baseia-se no uso de um instrumento que promove a agitação da suspensão até se alcançar uma distribuição homogênea do material sólido. É um processo de fácil operação, ampla disponibilidade e de baixo custo quando comparado a outros processos instrumentais, sendo que é bem adequado para o preparo de grandes volumes

de suspensão. Estes processos não são de fácil automação e no caso da agitação magnética, seu uso é inadequado para matrizes ferrosas (BENDICHO e LOOS-VOLLEBREGT, 1991; FERREIRA et al., 2010).

A agitação baseada em borbulhamento de gás é uma alternativa simples e econômica para análise de suspensões empregando ETAAS. Este processo é baseado na passagem de um fluxo de argônio através da suspensão presente no *vial* do amostrador automático, o qual é interrompido imediatamente antes da pipetagem da suspensão. A desvantagem deste processo é a formação de espumas em amostras com alto teor orgânico (CALPRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010).

O uso da agitação ultrassônica para homogeneização/estabilização de suspensões vem ganhando grande destaque nos últimos anos em virtude da sua eficiência na diminuição do tamanho das partículas, na quebra de aglomerados e na extração das espécies de interesse para a fase líquida da suspensão quando diluentes ácidos são utilizados (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; FERREIRA et al., 2010). Essas características inerentes à agitação ultrassônica é resultado do fenômeno chamado de cavitação acústica que envolve a formação, crescimento e colapso de diminutas bolhas de gás, ao passar ondas ultrassônicas com pressões oscilantes através de um meio líquido (LUQUE-GARCÍA e LUQUE DE CASTRO, 2003).

Outra vantagem associada à agitação ultrassônica é o uso da energia do ultra-som para acelerar ou melhorar processos de reações de derivatização (LUQUE DE CASTRO et al., 2011). Essa abordagem vem ganhando espaço na conversão de organomercuriais em mercúrio inorgânico para determinação de mercúrio total em matrizes diversas empregando CV AAS. CAPELO et al. (2000), propuseram um novo método de oxidação utilizando radiação ultra-som à temperatura ambiente para converter organomercuriais em mercúrio inorgânico e determinar mercúrio total em amostras de água empregando CV AAS. Para tanto, utilizaram como meio líquido ácido clorídrico  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , o qual foi suficiente para a oxidação rápida e completa de organomercuriais, em contraste com outros oxidantes como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio que renderam uma oxidação incompleta.

Dois alternativas freqüentemente usadas, que trabalham com o ultra-som como fonte de energia externa, são os banhos ultrassônicos e as sondas

ultrassônicas. Os banhos ultrassônicos são fontes de irradiação ultrassônica de menor custo e maior disponibilidade, porém seu poder de sonicação em relação às sondas ultrassônicas é menor. As sondas ultrassônicas são utilizadas diretamente no recipiente que contem a suspensão e apresentam uma maior capacidade para dissipar a energia ultrassônica, apresentando assim uma melhor extração do analito para a fase líquida em relação ao banho (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010).

#### 4.2.5.2 Agentes estabilizantes

Os agentes estabilizantes atuam na suspensão com a finalidade de dispersar aglomerados e/ou impedir a sedimentação de partículas. Uma vez que a taxa de sedimentação depende da densidade do diluente e do material sólido, da viscosidade do meio diluente e do tamanho das partículas da amostra, líquidos altamente viscosos ou surfactantes são usualmente empregados na estabilização de suspensões (LOOS-VOLLEBREGT, 1991; FERREIRA et al., 2010).

Os compostos ou mistura de compostos mais reportados na literatura como agentes estabilizantes são viscalex, glicerol, surfactantes não iônico como triton X-100 , etanol, isopropanol, glicerol-metanol e glicerol-água, sendo que a capacidade de estabilização destes agentes depende da característica da amostra, do tamanho das partículas e da concentração do agente estabilizante (LOOS-VOLLEBREGT, 1991; MAGALHÃES e ARRUDA, 1998). A quantidade do agente estabilizante a ser utilizado deve ser determinada de forma criteriosa, visto que o seu uso de forma inadequada aumenta a possibilidade de contaminação da amostra, de interferências químicas e de problemas na pipetagem que podem comprometer a precisão (CAL-PRIETO et al., 2002).

MOREDA-PIÑEIRO et al. (2002), utilizaram glicerol como agente estabilizante para determinar mercúrio em suspensões aquosas de amostras biológicas e ambientais empregando CV ETAAS. Já RIBEIRO et al. (2004), não fizeram uso de agente estabilizante no preparo da suspensão de sedimento,

lodo de esgoto e carvão para a determinação de mercúrio empregando CV AAS, pois a suspensão preparada utilizou a mistura, água régia e ácido fluorídrico, como diluente e a sonicação como sistema de homogeneização/estabilização.

#### 4.3 TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO

Em amostragem em suspensão a avaliação da técnica de calibração é de grande importância para a validação do método analítico, visto que o comportamento do analito na amostra e no padrão aquoso pode ser diferente indicando efeito de matriz. Desta forma, a técnica de calibração utilizando padrões aquosos não pode ser diretamente utilizada para suspensões sem avaliações prévias (FERREIRA et al., 2010).

Diversas técnicas de calibração têm sido empregadas para a determinação da concentração do analito em amostragem em suspensão. Dentre elas se destacam a calibração usando padrões aquosos, a técnica de adição de analito e a técnica de calibração usando materiais de referência certificados ou matriz sintética (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010).

A técnica de calibração externa utilizando padrões aquosos para a quantificação do analito quando se trabalha com amostragem em suspensão só pode ser aplicada quando não há diferença significativa entre a inclinação da curva de calibração usando padrões aquosos e a inclinação da curva obtida com adição de analito nas amostras em suspensão (FERREIRA et al., 2010). A simplicidade, o baixo custo e o menor tempo de análise são características inerentes a esta técnica de calibração, uma vez que uma única curva analítica pode ser utilizada na análise de diversas amostras de uma mesma matriz.

Quando diferenças significativas são encontradas entre as inclinações da curva de calibração externa e da curva de adição de analito há um pronunciado efeito de matriz que não permite o uso de padrões aquosos na calibração. Nestes casos, o mais adequado a se fazer é usar a técnica de adição de analito desde que o efeito de matriz seja semelhante para um determinado

número de amostras. Desta forma, uma inclinação média é estimada a partir das inclinações de curvas obtidas utilizando amostras da mesma matriz. Caso os efeitos de matriz sejam diferentes entre as amostras de uma mesma matriz, o uso de uma inclinação média não pode ser aplicado, logo a técnica de adição tem que ser feita para todas as amostras individuais da matriz, o que a torna uma técnica demorada e cansativa (FERREIRA et al., 2010).

Alguns trabalhos reportados na literatura relatam o emprego de materiais de referência certificados para a construção da curva de calibração na análise de amostras suspensas. Essa técnica pode ser abordada de duas formas: uma, que é o uso de diferentes massas de um único CRM para a construção da curva de calibração e outra que consiste no uso de diferentes CRM's de naturezas semelhantes, porém com concentrações diferentes do analito. Essa técnica de calibração é dispendiosa e a disponibilidade desses materiais normalmente é limitada, pois nem para todo tipo de amostra há um CRM (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998; CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010). Desta forma, quando não há disponível um CRM de natureza semelhante à amostra de trabalho, uma alternativa viável é a construção de uma curva de calibração baseada no preparo de suspensões padrões em uma matriz sintética de composição físico-química semelhante à amostra real (CAL-PRIETO et al., 2002; FERREIRA et al., 2010).

#### 4.4 APLICAÇÃO DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM MATRIZES COMPLEXAS

Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na amostragem em suspensão para a determinação de mercúrio em amostras complexas vêm sendo alvo de interesse por parte dos pesquisadores em virtude das vantagens associadas a essa técnica.

VIÑAS et al. (2001), desenvolveram um método para a determinação de mercúrio em comidas para bebê e em frutos do mar empregando amostragem em suspensão e ETAAS. As suspensões foram preparadas usando uma massa de amostra que variou entre 0,2 a 2 g e 5 mL de uma solução contendo 0,1 %

(m/v) de Triton X-100, 3 % (v/v) ácido nítrico e 0,1 % (m/v) de anti-espumante. O triton X-100 foi utilizado como agente estabilizante para obter uma boa dispersão das partículas e evitar formação de aglomerados e anti-espumante para evitar a formação de espuma. A homogeneização das suspensões foi realizada primeiramente por movimentos repetidos de um êmbolo, depois por sonicação e por último por agitação magnética. Curvas de calibração preparadas com padrões aquosos puderam ser utilizadas desde que preparadas com nitrato de prata e permanganato de potássio, que atuam como modificadores de matriz. Os resultados analíticos foram comparados e confirmados com resultados obtidos por outros métodos baseados na digestão da amostra em forno microondas e a validação foi feita mediante análise de CRM.

CAVA-MONTESINOS et al. (2004), desenvolveram um método altamente sensível para a determinação de Hg em amostras de leite empregando amostragem em suspensão e CV AFS. A suspensão foi preparada sonicando em banho ultrassônico a mistura de 1g de leite em pó com 2 mL de água régia. Posterior a essa agitação foram adicionados 0,5 mL de antiespumante e 2,5 mL de cloridrato de hidroxilamina juntamente com 6,25 mL de ácido clorídrico concentrado para formar um meio adequado para a determinação de Hg empregando cloreto estanhoso como agente redutor. Em seguida, as amostras foram tratadas com 2mL de KBr  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e de  $\text{KBrO}_3$   $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  e diluídas até 25 mL. O limite de detecção encontrado foi de  $0,011 \text{ ng g}^{-1}$  de Hg na amostra original, sendo que o método apresentou uma precisão que variou entre 2,8 a 3,4 %. Este método foi validado mediante análise de CRM de leite em pó desnatado (NIST-1459). Os resultados obtidos pelo procedimento desenvolvido foram comparados com os obtidos por digestão assistida por microondas e medidas em CV AFS evidenciaram uma boa concordância entre as duas estratégias.

LIAW et al. (1997), utilizaram amostragem em suspensão com ultra-som para determinar mercúrio em amostras de peixe empregando ICP-MS e vaporização eletrotérmica. As suspensões foram preparadas pesando 0,5 g de amostra em balão de 25 mL e adicionando quantidades adequadas de ácido clorídrico e triton X-100 para formar uma solução final contendo 6 % (v/v) de HCl e 1 % (v/v) de Triton X-100. As suspensões foram sonicadas por 30 min

em banho ultrassônico e posteriormente a isso, alíquotas de 1 mL eram retiradas para análise enquanto a suspensão era agitada com o uso do misturador vortex. Como o analito apresentou comportamento diferenciado na suspensão de peixe e nos padrões aquosos, a técnica de adição de padrão para fins de calibração foi empregada. O método foi validado mediante análise de dois CRMs de músculo de peixe (DORM-1, DORM-2) e um de fígado de peixe (DOLT-1).

SU et al. (2008), determinaram traços de mercúrio em amostras geológicas empregando CV AAS e amostragem em suspensão. Dois procedimentos de preparo de suspensão foram utilizados. Um deles utilizou como diluente apenas ácido fórmico e o outro, ácido fórmico com ácido clorídrico, sendo que em ambos a agitação foi promovida por sonicação. O método proposto (foto-CVG) promove a geração de vapor frio de mercúrio usando ácido fórmico e radiação ultravioleta (UV), eliminando assim a necessidade do uso de agentes redutores tradicionais como cloreto estanhoso e tetrahidroborato de sódio. Esse método proposto apresentou limite de quantificação e precisão equivalentes a  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$  e 2.6 %, respectivamente.

Além desses trabalhos apresentados, a Tabela 1 mostra alguns métodos estabelecidos e suas respectivas características analíticas para a determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão.



Tabela 1 - Métodos propostos para a determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão.

<b>Amostra</b>	<b>Técnica</b>	<b>LD</b>	<b>Precisão (RSD %)</b>	<b>Referência</b>
<b>Lodo de esgoto</b>	ETAAS	0,1 µg g <sup>-1</sup>	-	Lopez-Garcia et al., 2002
<b>Carvão mineral</b>	CV ETAAS	9 ng g <sup>-1</sup>	-	Flores et al., 2001
<b>Ambiental</b>	ETV ICP-MS	0,18 µg g <sup>-1</sup>	0,8 - 11	Da Silva et al., 2003
<b>Tecido de peixe</b>	CV AAS	67 ng g <sup>-1</sup>	-	Segade e Tyson, 2003
<b>Sedimento</b>	CV ETV ICP-MS	0,8 ng g <sup>-1</sup>	-	Vieira et al., 2004
<b>Sedimento, lodo de esgoto e carvão</b>	CV AAS	30 ng g <sup>-1</sup>	-	Ribeiro et al., 2004
<b>Lodo de esgoto</b>	ETAAS	17 ng g <sup>-1</sup>	8,3	Baralkiewicz et al., 2005
<b>Biológica e ambiental</b>	CV ICP OES	0,08 µg g <sup>-1</sup>	< 12	dos Santos EJ et al., 2005
<b>Soro sanguíneo</b>	CV AFS	25 ng L <sup>-1</sup>	3,9	Aranda et al., 2009
<b>Cereais</b>	CV ICP-MS	0,07 ng g <sup>-1</sup>	-	Chen e Jiang, 2009
<b>Solo e sedimento</b>	CV AAS	0,03 µg g <sup>-1</sup>	< 5	Collasiol et al., 2004
<b>Peixe</b>	CV AFS	7 µg g <sup>-1</sup>	6,8	Cava-Montesinos et al., 2004
<b>Biológicas</b>	CV AAS	16 µg g <sup>-1</sup>	< 7	Torres et al., 2009

## 5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

### 5.1 ASPECTOS GERAIS

Dentre as técnicas analíticas, as técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS) são as mais amplamente difundidas e empregadas na determinação de elementos traços em uma diversidade de matrizes complexas, sejam elas biológicas, ambientais, alimentícias e geológicas (BORGES et al., 2005). SNEDDON et al. (1993), destacaram que o uso e o interesse em AAS vem sendo representado pelo número de laboratórios que usam essa técnica e não pelo número de publicações que indicam maior interesse acadêmico.

A espectrometria de absorção investiga os espectros de linhas que são observados na interação da radiação eletromagnética com átomos livres no estado gasoso. A técnica se baseia no princípio de que esses átomos livres gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação eletromagnética de energia específica (comprimento de onda) emitida por uma fonte espectral. A redução da intensidade da radiação de uma linha selecionada emitida pela fonte espectral está correlacionada através da absorvância (ABS) com o número de átomos livres no caminho óptico e conseqüentemente com a concentração do elemento na amostra, obedecendo os princípios da lei de Beer (WELZ e SPERLING, 1999; BORGES et al., 2005).

A etapa de atomização que converte o analito em átomos livres no estado gasoso é considerada a mais importante na análise por AAS (WELZ e SPERLING, 1999). Diferentes atomizadores são empregados com esse propósito, dentre eles se destacam a chama, na espectrometria de absorção atômica com chama, o tubo de grafite, na espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e a célula de quartzo aquecida com chama ou eletrotérmicamente, na espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (SKOOG, 2002). A técnica de geração de vapor frio, utilizada na determinação de elementos como mercúrio, não faz uso de chamas ou aquecimentos eletrotérmicos como atomizadores. Nesta técnica, o elemento é quimicamente reduzido ao seu estado atômico livre por meio da reação da

amostra com um forte agente redutor em um sistema fechado. Os átomos livres no estado gasoso são então conduzidos ao caminho óptico do espectrômetro com auxílio de um gás carreador (BEATY e KERBER, 2002).

Em instrumentos convencionais de AAS são utilizados normalmente uma fonte de radiação específica para cada elemento (fonte de linha), o que implica que a fonte emite apenas as linhas do próprio elemento de estudo tornando assim a técnica altamente seletiva e dispensando o uso de monocromadores de alta resolução. Porém, a mesma tem como desvantagem além da restrição considerável de informações sobre o ambiente espectral, a limitação em ser considerada e usada como técnica monoelementar, levando à necessidade de se ter uma variedade de lâmpadas, em geral, uma para cada elemento (BORGES et al., 2005).

Os espectrômetros de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) possuem uma fonte de emissão contínua de radiação de alta intensidade em substituição as fontes de emissão de linhas dos equipamentos convencionais e, além disso, apresentam um monocromador duplo de alta resolução e um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) como detector. Essa nova configuração permite a determinação de metais e não metais com limites de detecção cinco vezes melhor quando comparados aos espectrômetros de fonte de linha (LS AAS), além de informarem sobre o ambiente espectral da linha analítica e permitirem medições seqüenciais rápidas (WELZ, 2005).

## 5.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E GERAÇÃO DE VAPOR FRIO

Em comparação a AAS convencional, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) apresenta uma série de vantagens que a constitui na nova geração da espectrometria atômica. A configuração atual e básica de um equipamento de HR-CS AAS é representada na figura 2. A radiação de uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade de emissão (190 – 850 nm), que opera em modo *hot spot*

após passagem pela célula de absorção, é dirigida a um monocromador duplo de alta resolução (DEMON - Double-Echelle Monochromator) constituído por um prisma e por uma rede de difração echelle. A radiação, altamente resolvida, atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de CCD com 512 *pixels*, 200 dos quais são utilizados com propósitos analíticos. Todos os 200 *pixels* são iluminados e lidos simultaneamente e a intensidade de radiação é convertida em absorvância para cada *pixel* individualmente (WELZ, 2005; WELZ et al., 2005).

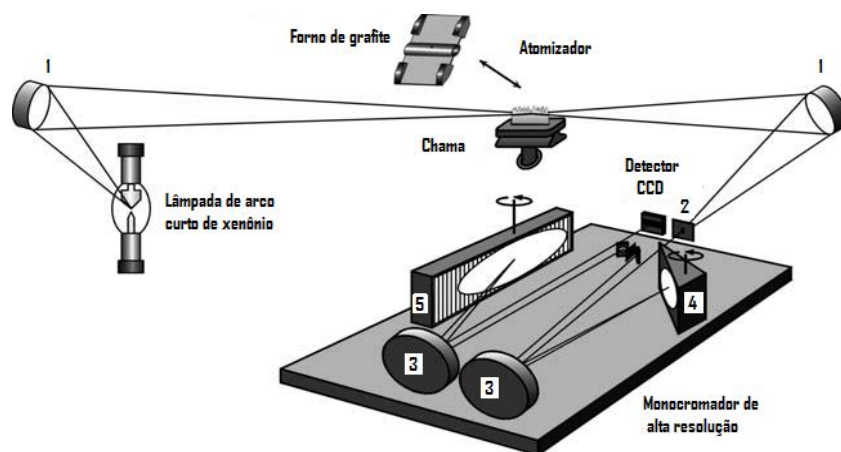


Figura 2 - Representação esquemática de um HR-CS AAS: (1) espelhos elipsoidais focalizadores; (2) fenda de entrada; (3) espelhos parabolóides; (4) prisma; (5) rede echelle.

Fonte: Adaptada de WELZ, 2005.

Em HR-CS AAS, como a intensidade da fonte de radiação é uma a três ordens de grandeza maior que a intensidade de uma lâmpada de cátodo oco de um AAS convencional, uma melhora na razão sinal/ruído e no limite de detecção (LD) por fatores de três a dez devem ser esperados, visto que o ruído é inversamente proporcional à raiz quadrada da intensidade de radiação (WELZ, 2005; WELZ et al., 2005).

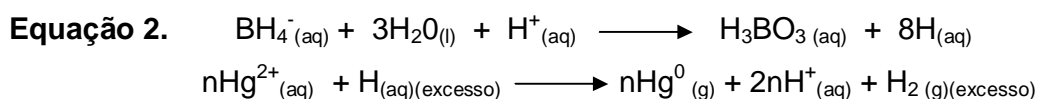
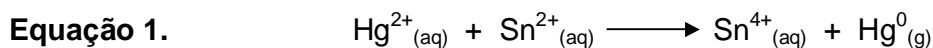
A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e geração de vapor frio (CV HR-CS AAS) é uma técnica particularmente adequada para determinação de mercúrio, visto que este elemento pode ser reduzido facilmente ao seu estado atômico livre sem a

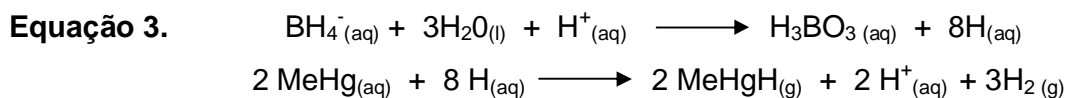
necessidade de qualquer unidade de atomização, podendo então ser medido por absorção atômica sem a necessidade de aquecimento.

A técnica de vapor frio para determinação de elementos como o mercúrio se baseia na redução deste elemento presente na amostra a átomos livres no estado gasoso por meio de reação com fortes agentes redutores em sistemas fechados. O mercúrio livre volátil formado no frasco reacional é carregado para o tubo T de quartzo (célula de absorção), posicionado no caminho óptico do espectrômetro, por meio de tubos interligados e com auxílio de um gás carreador inerte, chamado de gás de arraste (argônio ou nitrogênio). Na medida em que os átomos livres de mercúrio chegam à célula de absorção, a medida de absorvância aumenta indicando o aumento da concentração de átomos de mercúrio no caminho óptico. Se no sistema, o vapor frio de mercúrio passar da célula de absorção para o descarte haverá um pico de absorvância que então cairá quando o mercúrio tiver esgotado. Neste caso, a medida do sinal analítico será tomada quando a maior absorvância for observada, ou seja, será tomada em relação à altura de pico (BEATY e KERBER, 2002).

Dois agentes redutores são mais amplamente utilizados na determinação de mercúrio utilizando a técnica de geração de vapor frio, são eles: o cloreto estanhoso ( $\text{SnCl}_2$ ), que é capaz de reduzir em meio ácido o íon  $\text{Hg}^{2+}$  e alguns organomercuriais, exceto o metilmercúrio e; o tetraidroborato de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), que é um redutor mais energético capaz de reduzir completamente o mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e os organomercuriais (WELZ e SPERLING, 1999).

Abaixo, seguem as equações de reação de redução de mercúrio inorgânico usando o cloreto estanhoso (1) e de mercúrio inorgânico e metilmercúrio usando o tetraidroborato de sódio (2 e 3):





Na equação 2, o mercúrio inorgânico é diretamente reduzido a mercúrio elementar utilizando uma ampla faixa de concentração de tetrahidroborato de sódio. Já a equação 3, indica que ao se usar baixas faixas de concentração de tetrahidroborato de sódio, a redução de metilmercúrio pode gerar um intermediário (MeHgH), resultando em baixas medidas de absorvância, necessitando assim de um aquecimento na célula de absorção (Tubo T de quartzo) para haver sua decomposição em  $\text{Hg}^0$  e posterior medida. Não realizando esse aquecimento, uma melhora na geração de mercúrio elementar pode ser observada ao aumentar a concentração do redutor, o que é comprovado com o aumento do sinal de absorvância (SEGADE e TYSON, 2003; CAPELO et al., 2000).

O agente redutor tetrahidroborato de sódio é instável e deve ser preparado normalmente em soluções diluídas de hidróxido de sódio para evitar a sua hidrólise, garantindo assim a sua estabilidade (SCHILESINGER et al., 1953).

Uma relação comparativa de vantagens e desvantagens associadas ao uso de cada um destes agentes redutores na determinação de mercúrio é abordado na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação das vantagens e desvantagens associadas ao uso dos agentes redutores  $\text{SnCl}_2$  e  $\text{NaBH}_4$  na determinação de mercúrio por vapor frio.

<b>Parâmetro</b>	<b><math>\text{SnCl}_2</math></b>	<b><math>\text{NaBH}_4</math></b>
<b>Sensibilidade</b>	maior	menor
<b>Capacidade de redução de espécies organomercuriais</b>	menor	maior
<b>Formação de espuma</b>	menor	maior
<b>Interferência causada por íons de metais pesados</b>	menor	maior
<b>Interferência causada por formação de hidretos de íons</b>	menor	maior
<b>Custo</b>	menor	maior

Fonte: adaptada de Analytik Jena AG

A escolha do agente redutor e a determinação das condições para determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio são feitas de acordo com os critérios de estudo do pesquisador e com os recursos disponíveis. Independente da escolha, otimizações da concentração e do volume do redutor e da condição ácida do meio devem ser feitas para aumentar a eficiência de geração do vapor e promover estudos mais completos sobre a influência destes na determinação de mercúrio utilizando o método de estudo.

CAPELO et al. (2006), determinaram mercúrio por FI-CV AAS, utilizando o cloreto estanhoso como agente redutor depois da degradação de organomercuriais com auxílio de ultra-som. Segundo os autores, a oxidação de organomercuriais é alcançada através da sonicação de soluções contendo ácido clorídrico, considerando que o ácido clorídrico concentrado contém água e cloro que podem reagir dando uma mistura de ácido clorídrico e ácido hipocloroso, cujo íon auxilia na degradação de organomercuriais.

SEGADE e TYSON (2003), determinaram Hg(II) e Hg total em amostras biológicas e de sedimento empregando FI-CV AAS. Para tanto, utilizaram concentrações diferentes do agente redutor tetrahidroborato de sódio para diferenciar Hg(II) e MeHg. Segundo os autores, foi possível determinar o Hg(II) usando baixa concentração do redutor, enquanto que com altas concentrações ambas as espécies são reduzidas, sendo que as inclinações das curvas analíticas de calibração (sensibilidade) para determinação de mercúrio total obtidos com padrões de metilmercúrio e mercúrio não foram significativamente diferentes.

CAPELO et al. (2000), avaliaram o uso dos agentes redutores, cloreto estanhoso e tetrahidroborato de sódio, na determinação de mercúrio total em amostras líquidas após processo de oxidação avançada com base no uso de ultra-som para degradação de organomercuriais, usando condições brandas como ácido clorídrico à temperatura ambiente e empregando CV AAS. Ambos agentes redutores nas condições estabelecidas foram eficazes na determinação de mercúrio total, sendo que com o uso do cloreto estanhoso foi possível, além da determinação de mercúrio total, a determinação de mercúrio inorgânico na presença de organomercuriais.

A vantagem da técnica de geração de vapor é a sua sensibilidade elevada combinada à separação eficiente do analito da matriz, que é um método de introdução de amostra que minimiza interferências. Portanto, devido ao pequeno número de constituintes na fase gasosa presente na célula de absorção, interferências espectrais não são observadas (D'ULIVO e DEDINA, 1996). Quando o tetrahidroborato de sódio é utilizado como agente redutor para determinação de mercúrio por CV AAS, as interferências são semelhantes às presentes na técnica de geração de hidretos, sendo que a maioria destas interferências desaparece quando o agente redutor, cloreto estanhoso, é utilizado.

As interferências encontradas na técnica de geração de vapor quando se utiliza o tetrahidroborato de sódio como agente redutor são normalmente relacionadas às interferências na fase condensada. Essas interferências são as que ocorrem no frasco de reação, dentro da solução, que podem envolver desde a formação do vapor frio e/ou sua liberação da solução à retenção do mercúrio pela presença de concomitantes, impossibilitando assim sua disponibilização (IRACEMA et al., 2002). Neste último caso, alguns metais presentes concomitantemente na solução como cobre, chumbo, níquel, ouro, platina e paládio podem ser reduzidos ao estado metálico, formando pequenas partículas, que podem reter mercúrio resultando assim na supressão da intensidade do sinal de absorvância deste elemento (BARANOWSKA e SZMYD, 1994).

As interferências relacionadas à liberação do vapor químico formado da solução para a fase gasosa são verificadas quando se trabalha com maiores volumes de solução no frasco reacional, pois são observados sinais relativamente mais largos e de menor altura, e quando há formação de espuma que afeta a cinética e liberação do vapor químico quando se trabalha com algumas amostras. Para contornar esse problema, faz-se necessário o uso de antiespumantes, como por exemplo, alcoóis de cadeia carbônica longa (IRACEMA et al., 2002).

KRATA et al. (2003), avaliaram a interferência de 3 grupos de elementos na determinação de mercúrio em água natural e concluíram que concentrações de até 50 mg L<sup>-1</sup> de Na, K, Mg e Ca, que estão normalmente presentes em grande quantidade na matriz, não interferem na determinação. Ni, Zn e Cd



(elementos que nas condições de trabalho reduzem e formam amálgamas) em concentrações de até  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , não afetam o sinal analítico. Já a presença de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu e Fe, diminui o sinal em quase 50 %. Os elementos Se(VI), Sb(V), Sb(III), As(III) e Pb(II), que podem simultaneamente serem reduzidos a espécies voláteis, podendo assim afetar a redução do mercúrio, não apresentam influência sobre o sinal de mercúrio quando estão presentes em concentrações de até  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Para eliminar a interferência causada pelas concentrações de cobre e ferro foi utilizado extração em fase sólida com a finalidade de promover a separação destes componentes interferentes.

ROKKJAER et al. (1993), inferiram que em procedimentos que utilizam ácido nítrico para o preparo de amostras e tetrahidroborato de sódio como agente redutor para geração de vapor de Hg, há supressão do sinal de mercúrio devido à presença de óxidos nitrosos voláteis formados durante a decomposição da amostra, que inibem a redução do mercúrio pelo fato da velocidade da reação desses óxidos ser tão rápida com o redutor consumindo-o antes da redução completa do mercúrio.

## 6 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

### 6.1 ASPECTOS GERAIS

A quimiometria é um ramo da ciência que emprega conhecimentos estatísticos e matemáticos na resolução de problemas químicos e no desenvolvimento e otimização de métodos analíticos (BROWN, 1990). As ferramentas quimiométricas vêm sendo aplicadas em larga escala nas otimizações de métodos analíticos, visto que as mesmas proporcionam uma redução no número de experimentos, no consumo de reagentes e nos trabalhos laboratoriais (FERREIRA SLC, BRUNS R et al., 2007).

A aplicação de planejamento multivariado na otimização de métodos analíticos tem como principal objetivo obter as melhores respostas para a questão em estudo ao se determinar as condições ótimas das variáveis que afetam o sistema. Além disso, esse método que otimiza simultaneamente todas as variáveis, possibilita o estabelecimento de modelos matemáticos que permitem a avaliação do efeito e da significância dos fatores, assim como das interações entre eles, o que não é possível utilizando otimização univariada, que otimiza uma variável por vez, enquanto as demais são mantidas constantes. Este tipo de otimização não permite a interpretação e avaliação das interações entre as variáveis, além de demandar mais tempo e poder gerar otimizações ineficientes quando os efeitos de interações são significativos (MARANHÃO et al., 2007; FERREIRA SLC, BRUNS R. et al., 2007).

Na otimização multivariada duas variáveis são abordadas: as respostas de interesse que são as variáveis dependentes e os fatores que são as independentes. A resposta é o valor medido dos resultados experimentais e os fatores são as variáveis a serem estudadas que podem ou não afetar o sistema (Figura 3). Os valores possíveis que o fator pode assumir são chamados de níveis do fator sendo que cada um dos fatores é estudado dentro de uma região experimental de variação chamada de domínio experimental. (LUNDSTEDT et al., 1998; FERREIRA SLC, KORN MGA et al. 2007).

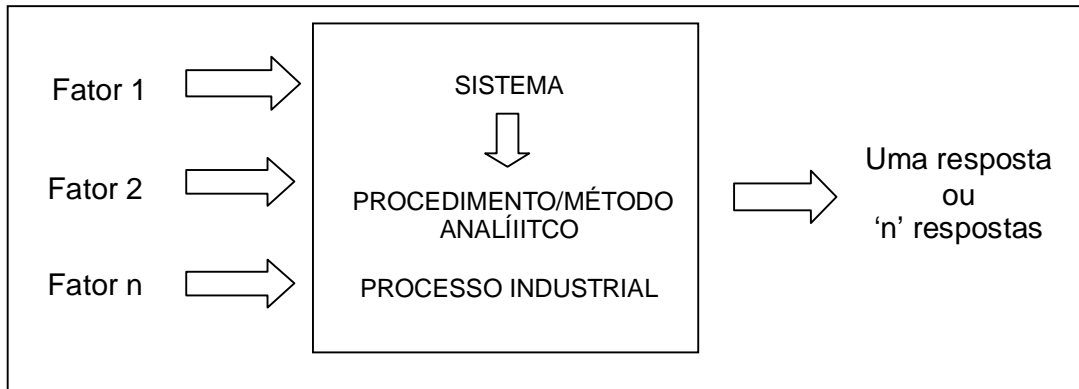


Figura 3 - Representação esquemática de um sistema no qual certo número de fatores (variáveis independentes de entrada) atuam para produzir respostas de interesse (variáveis dependentes de saída).

Fonte: Adaptada de NETO et al., 2010.

O primeiro passo da otimização multivariada é avaliar os fatores selecionados para o estudo utilizando planejamento fatorial completo ou fracionário, a fim de obter o efeito e a significância destes fatores no procedimento analítico. Depois de determinar os fatores que influenciam significativamente o sistema em estudo, condições ótimas são determinadas utilizando metodologia de superfícies de respostas (planejamento experimentais mais complexos), tais como Box-Behken, Doehlert e Composto Central (FERREIRA SLC, BRUNS R et al., 2007; TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

## 6.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE DOIS NÍVEIS

O planejamento fatorial completo é um planejamento simultâneo que pode ser utilizado para estimar a significância dos fatores, os efeitos principais e os efeitos das interações das variáveis em estudo sobre uma resposta analítica desejada. Se o fator é estudado experimentalmente em dois níveis, compõe o chamado planejamento fatorial completo de dois níveis, onde o número de experimentos é dado pela expressão,  $n^k$ , sendo que n corresponde ao número de níveis a serem estudados para cada fator e k ao número de fatores. Esses

níveis são normalmente representados pelos sinais (+) e (-), que indicam nível superior e nível inferior do fator estudado, respectivamente, os quais delimitam o domínio experimental. Pontos centrais representados por (0), nos quais todas as variáveis assumem valores médios, devem ser incluídos no planejamento a fim de avaliar a curvatura e estimar o erro experimental do planejamento, substituindo assim a necessidade de replicar todos os ensaios (LUNDSTEDT et al. 1998; UNTERLEIDER, 2006).

Na tabela 3, é apresentada uma matriz do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), a qual apresenta 3 fatores (A, B e C) cada um variando em dois níveis. Para este planejamento são normalmente realizados 11 experimentos, onde 8 são obrigatórios e equivalem a todas combinações possíveis entre os níveis dos fatores, e 3 equivalem aos pontos centrais (PC).

Tabela 3 - Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo ( $2^3$ )

<b>Experimentos</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	+	+	+
<b>2</b>	+	+	-
<b>3</b>	+	-	+
<b>4</b>	+	-	-
<b>5</b>	-	+	+
<b>6</b>	-	+	-
<b>7</b>	-	-	+
<b>8</b>	-	-	-
<b>9 (PC)</b>	0	0	0
<b>10 (PC)</b>	0	0	0
<b>11 (PC)</b>	0	0	0

Os experimentos devem ser executados em ordem aleatória visando evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas (NETO et al., 2010). Como dito anteriormente, a utilização do ponto central no

planejamento permite a estimativa da curvatura do conjunto de dados obtidos, a qual compreende a torção que o conjunto de dados sofre e que o modelo linear (plano) não descreve adequadamente.

De posse dos resultados experimentais, a avaliação da significância dos efeitos principais e das interações entre as variáveis pode ser feita através de análise de variância (ANOVA) e da interpretação de gráficos de pareto. A avaliação utilizando a ANOVA faz uso de valor de  $p$  (probabilidade estatística), para estimar a significância dos efeitos principais e das interações. Para valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) o efeito é estatisticamente significativo, sendo 0,05 o nível de significância que corresponde a uma decisão tomada a um nível de confiança de 95% (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Já na avaliação feita por interpretação do gráfico de pareto o efeito de um determinado fator é considerado significativo se a barra horizontal do gráfico que o representa ultrapassar a linha vertical correspondente a um nível de confiança de 95% ( $p = 0,05$ ) (ARAMBARRI et al., 2000).

O efeito principal de um fator e das interações entre os fatores é a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior. O efeito pode assumir valor positivo ou negativo indicando respectivamente aumento e diminuição da resposta analítica quando há deslocamento do nível inferior para o superior do domínio experimental. Para fins de exemplificação será considerado um planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), constituído pelos fatores A, B e C, pelas interações entre estes fatores e pelas  $Y$ 's respostas (Tabela 4). Os sinais das interações para cada experimento são obtidos por meio do produto dos sinais dos fatores que originam a interação, por exemplo, o sinal (+) da interação AB do experimento 1 é obtido pelo produto entre os sinais (+) de A e B (LUNDSTEDT et al., 1998).

Tabela 4 - Exemplo de planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), considerando as variáveis A,B e C e as interações entre elas.

Experimento	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Respostas
1	+	+	+	+	+	+	+	$Y_1$
2	+	+	-	+	-	-	-	$Y_2$
3	+	-	+	-	+	-	-	$Y_3$
4	+	-	-	-	-	+	+	$Y_4$
5	-	+	+	-	-	+	-	$Y_5$
6	-	+	-	-	+	-	+	$Y_6$
7	-	-	+	+	-	-	+	$Y_7$
8	-	-	-	+	+	+	-	$Y_8$

O cálculo dos efeitos para cada fator do planejamento e para cada uma das interações é dado pela equação 4 abaixo:

**Equação 4.** 
$$Efeito = \frac{\sum yi(+)-\sum yi(-)}{n/2}$$

Onde:  $n$  equivale ao número de experimentos.

Então, para fins de cálculo o efeito de A e da interação entre as variáveis A e B é dado pelas equações 5 e 6, respectivamente:

**Equação 5.** 
$$Efeito(A) = \frac{[(y1 + y2 + y3 + y4) - (y5 + y6 + y7 + y8)]}{4}$$

**Equação 6.** 
$$Efeito(AB) = \frac{[(y1 + y2 + y7 + y8) - (y3 + y4 + y5 + y6)]}{4}$$

O modelo linear matemático do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) utilizado para descrever o sistema em estudo por meio de uma relação funcional entre as respostas e os fatores estudados, esta representado abaixo pela equação 7.

**Equação 7.** 
$$Y = a + b A + c B + dC + e AB + f AC + g BC + h ABC$$

Onde, **Y** é a resposta experimental, **a** é o termo independente, **A**, **B** e **C** as variáveis de estudo, **b**, **c** e **d** os coeficientes dos termos lineares relativos aos fatores e **e**, **f**, **g** e **h** os coeficientes relativos a interações entre as variáveis.

### 6.3 PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

Comparando as metodologias de superfícies de respostas o planejamento Box-Behnken necessita do mesmo número de experimentos que o planejamento Doehlert para o seu desenvolvimento, utilizando uma quantidade fixa de fatores, porém apresentam um número menor quando comparados ao planejamento composto central (SOUZA et al., 2005). Os planejamentos Box-Behnken e Doehlert são mais eficientes que o composto central, sendo que a eficiência de um planejamento experimental é definido pela razão entre os números de coeficientes estimados pelo modelo e o número de experimentos (FERREIRA SLC, BRUNS R. et al., 2007). A tabela 5 compara as eficiências entre as metodologias de superfície de respostas Box-Behnken (BB), Composto Central (CC) e Doehlert (D).

Tabela 5 - Comparação entre as eficiências dos planejamentos de superfícies de resposta.

Fatores	Nº de coeficientes	Número de experimentos			Eficiência		
		CC	D	BB	CC	D	BB
2	6	9	7	-	0,67	0,86	-
3	10	15	13	13	0,67	0,77	0,77

Fonte: adaptada de FERREIRA SLC, BRUNS R. et al., 2007

O planejamento Box-Behnken que surgiu a partir das desvantagens associadas ao planejamento fatorial completo de 3 níveis quando trabalhado com muitos fatores ( $n > 2$ ), é utilizado para a otimização de três ou mais variáveis, sendo que cada um delas é estudada a três níveis (-1, 0, +1). O número de experimentos necessários para o desenvolvimento deste planejamento é dado por  $N = k^2 + k + c$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $C$  o número de pontos centrais. Este tipo de planejamento não contém ensaios

onde todos os fatores estejam em condições extremas, ou seja, simultaneamente em níveis mais baixos (-) ou em níveis mais altos (+), logo o mesmo não é indicado para situações que se deseja avaliar os fatores nas condições extremas, sendo úteis então para evitar experimentos realizados sob estas condições para o qual resultados não satisfatórios são esperados (FERREIRA SLC, BRUNS R. et al., 2007).

Considerando um sistema com três variáveis, o número de experimentos necessário para o desenvolvimento do planejamento Box-Behnken, levando em consideração 3 pontos centrais equivale a:

**Equação 8.** 
$$N = (3)^2 + 3 + 3 = 15$$

A matriz deste planejamento, considerando os fatores A, B e C com níveis representados por valores codificados, está representada na tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Exemplo de matriz de planejamento Box-Behnken para 3 fatores

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	-1	-1	0
<b>2</b>	1	-1	0
<b>3</b>	-1	1	0
<b>4</b>	1	1	0
<b>5</b>	-1	0	-1
<b>6</b>	1	0	-1
<b>7</b>	-1	0	1
<b>8</b>	1	0	1
<b>9</b>	0	-1	-1
<b>10</b>	0	1	-1
<b>11</b>	0	-1	1
<b>12</b>	0	1	1
<b>13 (PC)</b>	0	0	0
<b>14 (PC)</b>	0	0	0
<b>15 (PC)</b>	0	0	0



O modelo matemático empírico do planejamento Box-Behnken é uma relação funcional polinomial com termos quadráticos. Este modelo matemático é representado pela equação 9, considerando somente os termos até interações de segunda ordem.

**Equação 9.**  $Y = a + b A + c B + dC + e A^2 + f B^2 + g C^2 + h AB + i AC + j BC$

Onde, **Y** é a resposta experimental, **a** é o termo independente, **A, B e C** as variáveis de estudo, **b, c e d** os coeficientes dos termos lineares e **e, f e g** os coeficientes dos termos quadráticos e **h, i e j** os coeficientes do termos de interações entre as variáveis.

Para estimar o ponto crítico (condição ótima), deve-se resolver os sistemas de equações (Equação 10,11 e 12) obtidos quando o modelo (equação geral) é derivado em relação a cada fator.

**Equação 10.**  $\frac{\delta(Y)}{\delta(A)} = b + 2 e A + h B + i C = 0$

**Equação 11.**  $\frac{\delta(Y)}{\delta(B)} = c + 2 f B + h A + j C = 0$

**Equação 12.**  $\frac{\delta(Y)}{\delta(C)} = d + 2 g C + i A + j B = 0$

Vale salientar que todos os dados experimentais podem ser tratados no programa STATISTICA, a fim de se obter gráficos de pareto, superfícies de respostas, cálculos de efeitos, tabela ANOVA e pontos críticos.

## 7 PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- I. Espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo CONTRAA 700 Analytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha).
- II. Modulo de Geração de Hidreto HS50 Analytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha).
- III. Banho Ultrassônico Modelo USC -1850 UNIQUE (Indaiatuba, São Paulo, Brasil).
- IV. Sistema para purificação de água Milli-Q Plus (Bedford, MA, USA).
- V. Sistema de destilação de ácidos SubPUR Sub-boiling (Milestone, Sorisole, Itália).
- VI. Sistema de digestão em microondas modelo Start D (Milestone, Sorisole, Itália), equipado com 10 tubos de TFM de 100mL e camisas de cerâmica.
- VII. Centrífuga de mesa modelo T32C JANETZKI (Alemanha)

Todos esses equipamentos fazem parte do instrumental analítico do laboratório de Pesquisa em Química e Quimiometria do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

### 7.2 REAGENTES

- I. Ácido Nítrico bi-destilado (MERCK, Alemanha)
- II. Ácido Clorídrico (MERCK, Alemanha)
- III. Hidróxido de Sódio (MERCK, Alemanha)
- IV. Tetrahidroborato de Sódio (MERCK, Alemanha)
- V. Tiouréia (MERCK, Alemanha)
- VI. Álcool Isoamílico (MERCK, Alemanha)

VII. Água Ultrapura

VIII. Peróxido de Hidrogênio (MERCK, Alemanha)

### 7.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

Água ultrapura de sistema de purificação modelo Milli-Q Plus (Bedford, MA, USA) foi utilizada no preparo de todas as soluções. As vidrarias e recipientes utilizados foram lavados com solução diluída de Extran (MERCK), enxaguados com água desionizada, mantidos em solução de ácido nítrico (10 % v/v) por 48 h e então lavados três vezes com água ultrapura antes de serem utilizados. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 7.3.1 Solução de mercúrio ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

Soluções de mercúrio inorgânico de concentrações que variaram de 0,1 a  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram preparadas diariamente a partir de uma série de diluições da solução estoque de mercúrio da MERCK ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) em solução de ácido nítrico 0,05 % (v/v).

#### 7.3.2 Solução de hidróxido de sódio 0,05 % (m/v)

A solução estoque de Hidróxido de sódio 0,05% (m/v) utilizada para estabilização da solução de tetrahidroborato de sódio foi preparada a partir da dissolução de 0,5000 g de hidróxido de sódio em grânulos em água ultrapura em balão volumétrico de 1 litro.

### 7.3.3 Solução de tetrahidroborato de sódio 1 % (m/v)

Soluções de tetrahidroborato de sódio (1 % m/v) em hidróxido de sódio (0,05 % m/v) foram preparadas diariamente de acordo com o volume necessário para a análise do dia.

### 7.3.4 Solução de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>

A solução estoque de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>, utilizada no preparo da suspensão e na leitura empregando CV HR-CS AAS, foi preparada a partir da diluição de 50 mL de ácido clorídrico 37 % (MERCK) em água ultrapura utilizando balão volumétrico de 100 mL.

### 7.3.5 Solução de tiouréia 1% (m/v)

A solução estoque de Tiouréia 1 % (m/v) utilizada no procedimento de preparo da suspensão foi preparada a partir da dissolução de 0,2500 g de tiouréia (MERCK) em água ultrapura utilizando balão volumétrico de 25 mL.

## 7.4 INSTRUMENTAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EMPREGANDO CV HR-CS AAS

Concentrações de mercúrio foram medidas usando o espectrômetro CONTRAA 700 Analytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha), que possui uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade de radiação operando no modo hot-spot, um monocromador duplo de alta resolução e um dispositivo de cargas acopladas (CCD) como detector. O instrumento foi operado utilizando o

comprimento de onda de 253.6519 nm (linha principal do mercúrio) e uma corrente de 13A, sendo que a concentração do mercúrio foi determinada por análise da altura de pico.

Um sistema de geração de hidreto (modulo HS50) do Anlytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha) foi acoplado ao espectrômetro CONTRAA 700 (Figura 4), e a geração de vapor foi operada manualmente. Para a geração de vapor frio de mercúrio utilizou-se como redutor uma solução de tetrahidroborato de sódio 1 % (m/v) estabilizada em solução de hidróxido de sódio 0,05 % (m/v). Quatro mililitros desta solução foram injetados dentro do frasco reacional durante o período de 6 segundos. O volume das amostras em suspensão no frasco reacional foi equivalente a 10 mL com concentração de HCl em torno de 1,5 mol L<sup>-1</sup> e foi utilizado o argônio com grau de pureza 99,996 % (White Martins, São Paulo, Brasil) como gás carreador dos vapores de mercúrio. O desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado e acoplado ao HR-CS AAS é apresentado na figura 5.



Figura 4 - Sistema de geração de hidreto (modulo HS50) acoplado ao espectrômetro CONTRAA 700 do Anlytik Jena.

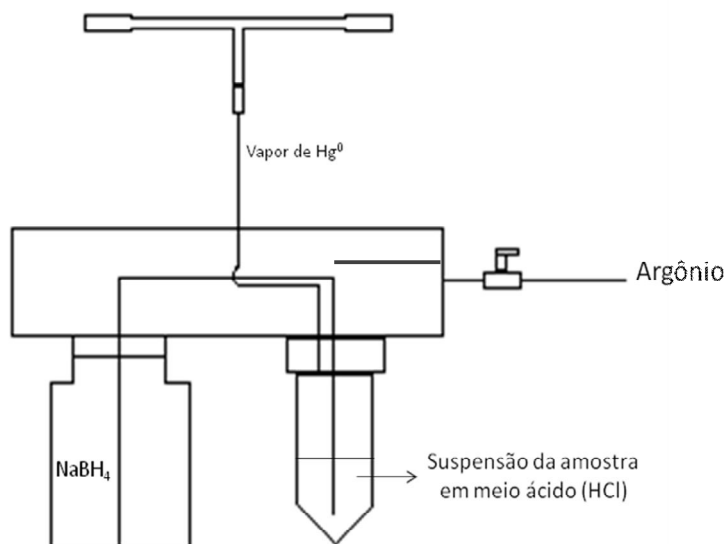


Figura 5 - Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado e acoplado ao HR-CS AAS.

## 7.5 PREPARO DAS SUSPENSÕES E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EMPREGANDO CV HR-CS AAS

As suspensões das amostras foram preparadas em meio ácido utilizando sonicação em banho ultrassônico modelo USC -1850 UNIQUE (Indaiatuba, São Paul, Brasil), com controle de temperatura a uma frequência de 25 kHz e potência de 154 W.

### 7.5.1 Preparo das suspensões de arroz

#### **Material de Referência Certificado NIST SRM 1568a (Farinha de arroz)**

Para preparar a suspensão, 0,2 g de CRM foi pesado e misturado com 2 mL de água ultrapura em balão volumétrico de 10 mL. Esta mistura foi

aquecida a 60 °C por 20 minutos em banho termostaticado. Após o resfriamento, 4 mL de solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e 500 µL de solução de tiourea 1% (m/v) foram adicionados e o balão volumétrico foi colocado em banho ultrassônico por 30 min a 60 °C. Após novo resfriamento, água ultrapura foi adicionada para atingir o volume de 10 mL do balão volumétrico e assim obter a suspensão da amostra. Uma alíquota de 4 mL dessa suspensão foi transferida para o frasco reacional de geração de vapor frio (tubo de centrífuga de 50 mL) e 900 µL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e 200 µL de álcool isoamílico foram adicionados a esse frasco reacional. Posteriormente a essa etapa, água ultrapura foi adicionada até que atingisse o volume de 10 mL. Para determinação de mercúrio, o frasco reacional foi inserido no módulo de geração de hidreto HS50 que estava acoplado ao espectrômetro e então foram adicionados 4 mL de solução de tetrahidroborato de sódio por um período de 6 segundos. O vapor gerado foi carregado, através do uso do gás argônio, para dentro da célula de quartzo que estava situada no caminho óptico do espectrômetro.

### **Amostra de arroz**

Para preparar a suspensão de arroz, primeiramente foi pesado 0,2 g de amostra já parcialmente macerada em grãos pequenos. Os demais passos para o preparo da suspensão são equivalentes aos do preparo da suspensão do material de referência certificado (NIST 1568a)

#### **7.5.2 Preparo das suspensões de carvão**

### **Material de Referência Certificado BCR 40**

Para preparar a suspensão de carvão, 0,1 g de amostra foi pesada em balão volumétrico de 25 mL e 4 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados. Posteriormente à adição, o balão volumétrico com a amostra e o ácido foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos. Após a sonicação foi então adicionado água ultrapura até que atingisse o volume de 25 mL do balão volumétrico. Uma alíquota de 4 mL dessa suspensão foi transferida para o

frasco reacional de geração de vapor frio (tubo de centrífuga de 50 mL) e 1900  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  foram adicionados a esse frasco reacional. Após essa etapa, água ultrapura foi adicionada até que atingisse o volume de 10 mL. Para determinação de mercúrio, o frasco reacional foi inserido no módulo de geração de hidreto HS50 que estava acoplado ao HR-CS AAS e as demais etapas foram executadas.

### **Material de Referência Certificado BCR 182**

BCR-182 (carvão vapor) é um carvão médio volátil de elevado teor de cinzas. Foi selecionado para cobrir a gama de propriedades de interesse para utilizações industriais.

Para preparar a suspensão de carvão, 0,2 g de amostra foi pesada em balão volumétrico de 10 mL e 4 mL de  $\text{HCl}$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  foram adicionados. Posteriormente à adição, o balão volumétrico com a amostra e o ácido foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos. Após a sonicação foi então adicionado água ultrapura até que atingisse o volume de 10 mL do balão volumétrico. Uma alíquota de 4 mL dessa suspensão foi transferida para o frasco reacional de geração de vapor frio (tubo de centrífuga de 50 mL) e 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  foram adicionados a esse frasco reacional. Após essa etapa, água ultrapura foi adicionada até que atingisse o volume de 10 mL. Para determinação de mercúrio, o frasco reacional foi inserido no módulo de geração de hidreto HS50 que estava acoplado ao HR-CS AAS e as demais etapas foram executadas.

### **Amostra de carvão**

Para preparar a suspensão das amostras de carvão, o procedimento utilizado foi equivalente ao utilizado no preparo da suspensão do material de referência certificado BCR 182.



### 7.5.3 Preparo das suspensões de sedimento marinho

#### **Material de Referência Certificado NRCC PACS-2 (sedimento marinho)**

Para preparar a suspensão de sedimento marinho, 0,1 g de amostra foi pesada em balão volumétrico de 25 mL e 4 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados juntamente com 1 mL de tiouréia 1 %. Posterior as adições, o balão volumétrico foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos. Após a sonicação foi então adicionada água ultrapura até que atingisse o volume de 25 mL do balão volumétrico. Uma alíquota de 2 mL da suspensão preparada foi transferida para o frasco reacional de geração de vapor frio (tubo de centrífuga de 50 mL) e 2 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> juntamente com 500 µL de octanol foram adicionados a esse frasco reacional. Posterior a essa etapa água ultrapura foi adicionada até que atingisse o volume de 10 mL. Para determinação de mercúrio, o frasco reacional foi inserido no modulo de geração de hidreto HS50 que estava acoplado ao HR-CS AAS e as demais etapas foram executadas.

### 7.6 PREPARO DE AMOSTRA DE ARROZ EMPREGANDO DECOMPOSIÇÃO EM FORNO MICROONDAS

A digestão foi realizada utilizando 0,2 g de arroz já parcialmente macerado em grãos menores e empregando uma mistura oxidante de 2,0 mL de ácido nítrico concentrado, 1,0 mL de peróxido de hidrogênio e 5,0 mL de água ultra-pura, sendo que antes da adição da água o sistema foi mantido em descanso por 30 min na chamada etapa de pré-digestão. O forno de microondas foi programado para aquecer a amostra em sete etapas a uma pressão de 45 bar, como é mostrado na Tabela 7. Na etapa 7, o sistema foi arrefecido durante 40 min, utilizando ventilação forçada. Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos para tubos de centrífuga de 15 mL e foi adicionado água ultrapura para atingir o volume total de 10 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra que foi analisada.

Tabela 7 - Programa de aquecimento para a digestão de amostra de arroz em forno microondas

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>1</b>	5	800	80
<b>2</b>	2	800	80
<b>3</b>	4	900	120
<b>4</b>	2	900	120
<b>5</b>	10	1000	180
<b>6</b>	10	1000	180
<b>Ventilação</b>	40	-	-

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 8.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR CV HR-CS AAS

Na etapa de otimização são realizados estudos na tentativa de se obter as melhores condições para o método proposto. Neste trabalho foram estudados os seguintes fatores para a otimização da geração de vapor frio de Hg: concentração ( $C_{\text{NaBH}_4}$ ) e volume de tetraidroborato de sódio ( $V_{\text{NaBH}_4}$ ) e concentração de ácido clorídrico ( $C_{\text{HCl}}$ ). Para tanto, primeiramente foi realizado um planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), a fim de avaliar a significância e o efeito dos fatores, bem como a interação entre eles, e posteriormente um planejamento Box-Behnken com objetivo de obter as condições críticas de cada fator para a geração de vapor frio de mercúrio e determinação por HR-CS AAS.

#### 8.1.1 Planejamento fatorial completo ( $2^3$ )

Com objeto de avaliar os fatores escolhidos para estudo quanto ao seu efeito, significância e interação foi realizado um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^3$ ). Para tanto os experimentos foram realizados empregando o módulo HS50 acoplado ao HR-CS AAS e utilizando 10 mL de solução de  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio inorgânico. As respostas quimiométricas avaliadas foram em termos de absorvância (ABS) obtidas através da altura de pico. A matriz de planejamento juntamente com os valores reais e codificados estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.

Experimento	C <sub>HCl</sub>	C <sub>NaBH<sub>4</sub></sub>	Vol <sub>NaBH<sub>4</sub></sub>	ABS
1	1 (4 mol L <sup>-1</sup> )	1 (3%)	1 (3,5mL)	0,10387
2	1 (4 mol L <sup>-1</sup> )	1 (3%)	-1 (0,5mL)	0,05381
3	1 (4 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (1%)	1 (3,5mL)	0,13233
4	1 (4 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (1%)	-1 (0,5mL)	0,10979
5	-1 (2 mol L <sup>-1</sup> )	1 (3%)	1 (3,5mL)	0,20004
6	-1 (2 mol L <sup>-1</sup> )	1 (3%)	-1 (0,5mL)	0,18284
7	-1 (2 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (1%)	1 (3,5mL)	0,14558
8	-1 (2 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (1%)	-1 (0,5mL)	0,13850
9 (PC)*	0 (3 mol L <sup>-1</sup> )	0 (2%)	0 (2,0mL)	0,15814
10 (PC)*	0 (3 mol L <sup>-1</sup> )	0 (2%)	0 (2,0mL)	0,16368
11 (PC)*	0 (3 mol L <sup>-1</sup> )	0 (2%)	0 (2,0mL)	0,15131

\*PC: Ponto Central

Com as respostas analíticas, em absorvância, foram gerados: gráfico de Pareto (Figura 6) e superfícies de respostas (Figura 7).

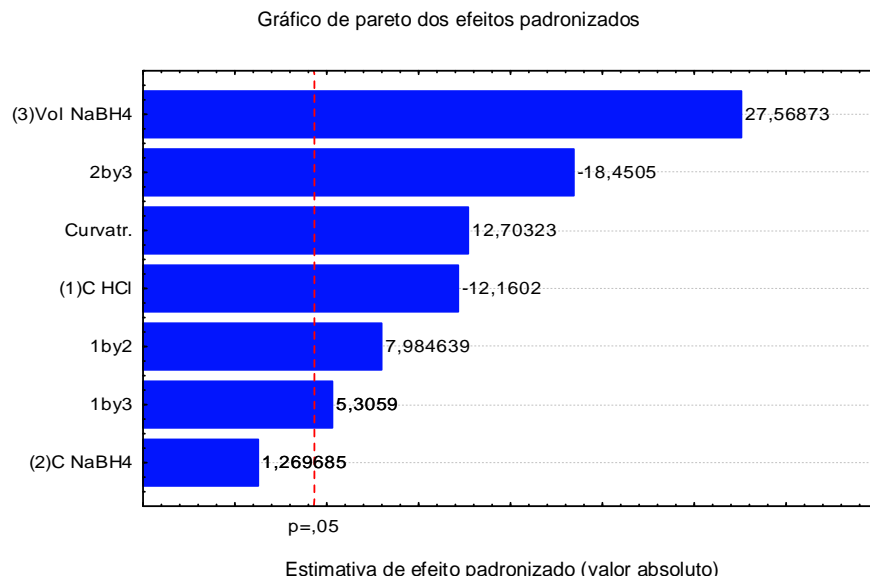
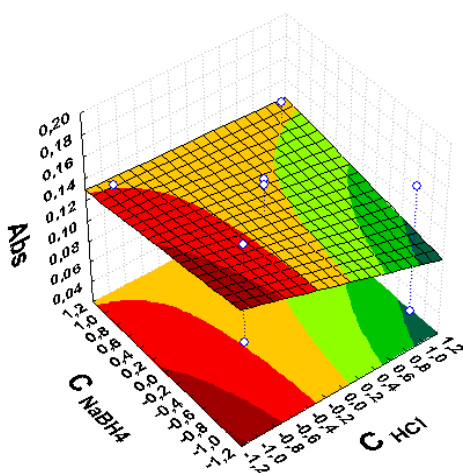


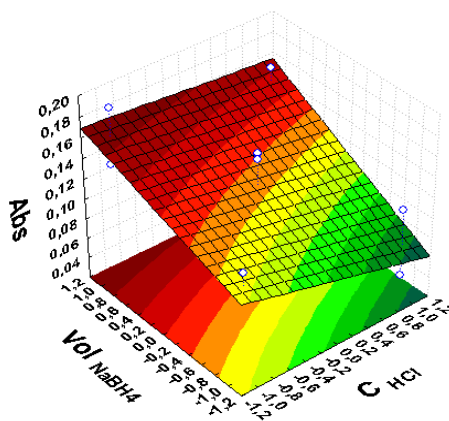
Figura 6 - Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo ( $2^3$ )

De acordo com o gráfico de Pareto obtido o fator mais significativo, ou seja, aquele que mais influencia a geração de vapor frio e determinação de mercúrio é o volume do tetrahidroborato de sódio. Este fator apresenta um efeito positivo (0,0628) no processo, ou seja, na medida em que o volume de tetrahidroborato de sódio aumenta, a resposta analítica em termos de absorvância também aumenta. Outro fator significativo é a concentração de ácido clorídrico, que apresenta um efeito negativo (-0,0277), o que significa que à medida que a concentração deste ácido diminui a resposta analítica em termos de absorvância aumenta, o que está de acordo com a química do sistema, pois a medida que a concentração do ácido diminui, menos gás hidrogênio é formado e liberado, diminuindo assim a quantidade do mesmo no caminho óptico, aumentando assim a concentração de mercúrio.

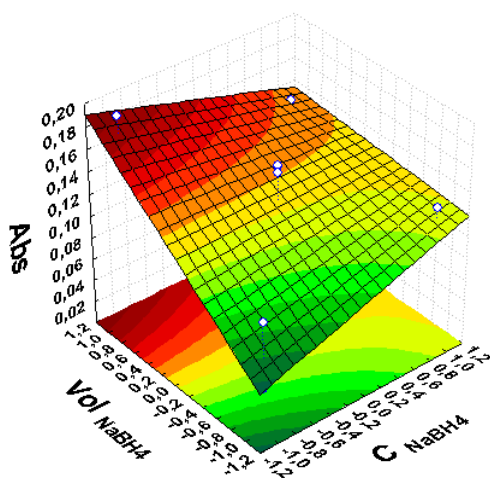
Já o fator concentração de tetrahidroborato de sódio, dentro do domínio experimental de trabalho não é significativo para a geração e determinação de mercúrio. Porém as interações volume de tetrahidroborato de sódio x concentração de tetrahidroborato de sódio e concentração de ácido x concentração de tetrahidroborato de sódio são significativas, o que torna este último fator importante para o sistema, sendo desta forma necessário determinar seu valor ótimo.



(a)



(b)



(c)

Figura 7 - Superfícies de resposta (a) = (Abs x C<sub>NaBH4</sub> x C<sub>HCl</sub>) ;  
 (b) = (Abs x Vol<sub>NaBH4</sub> x C<sub>HCl</sub>) e (c) = (Abs x Vol<sub>NaBH4</sub> x C<sub>NaBH4</sub>)

De acordo com as superfícies de respostas (Figura 7), é possível concluir que maiores respostas analíticas (absorvância) são obtidas quando se utiliza menores concentrações de tetraidroborato de sódio e de ácido clorídrico e maiores volumes de tetraidroborato de sódio.

A partir da interpretação do gráfico de Pareto e das superfícies de respostas é que foi escolhido o novo domínio experimental para a determinação das condições ótimas de cada fator utilizando o planejamento Box-Behnken.

### 8.1.2 Planejamento Box-Behnken

A determinação das condições experimentais ótimas para geração de vapor frio de mercúrio e determinação utilizando o modulo HS50 acoplado ao HR-CS AAS foi feita utilizando o planejamento Box-Behnken para três variáveis, cuja matriz é estabelecida com 15 experimentos. As variáveis selecionadas a partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial completo foram: concentração de ácido clorídrico (C<sub>HCl</sub>), concentração de borohidreto

de sódio( $C_{NaBH_4}$ ) e volume de borohidreto de sódio( $Vol_{NaBH_4}$ ). Os experimentos foram realizados utilizando soluções de 10 mL contendo  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio. A matriz do planejamento está apresentada na Tabela 9, onde os níveis das variáveis estão em valores reais e codificados.

Tabela 9 - Matriz do planejamento Box-Behnken com as respostas analíticas em absorvância para a otimização do método de geração de vapor frio de mercúrio e determinação por HR-CS AAS

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>HCl</sub></b>	<b>C<sub>NaBH<sub>4</sub></sub></b>	<b>Vol<sub>NaBH<sub>4</sub></sub></b>	<b>ABS</b>
1	-1 (1 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (0,5 %)	0 (3,0 mL)	0,14781
2	1 (3 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (0,5 %)	0 (3,0 mL)	0,14203
3	-1 (1 mol L <sup>-1</sup> )	1 (1,5 %)	0 (3,0 mL)	0,19854
4	1 (3 mol L <sup>-1</sup> )	1 (1,5 %)	0 (3,0 mL)	0,17151
5	-1 (1 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	-1 (1,5 mL)	0,16904
6	1 (3 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	-1 (1,5 mL)	0,14487
7	-1 (1 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	1 (4,5 mL)	0,20475
8	1 (3 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	1 (4,5 mL)	0,20080
9	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (0,5 %)	-1 (1,5 mL)	0,10422
10	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	1 (1,5 %)	-1 (1,5 mL)	0,15831
11	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	-1 (0,5 %)	1 (4,5 mL)	0,17878
12	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	1 (1,5 %)	1 (4,5 mL)	0,18212
13	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	0 (3,0 mL)	0,19700
14	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	0 (3,0 mL)	0,20785
15	0 (2 mol L <sup>-1</sup> )	0 (1 %)	0 (3,0 mL)	0,19565

Com as respostas analíticas, em absorvância, foram gerados: gráfico de Pareto (Figura 8), superfícies de respostas (Figuras 9, 10 e 11) e um modelo matemático que relaciona os fatores de otimização com a absorvância (Equação 13).

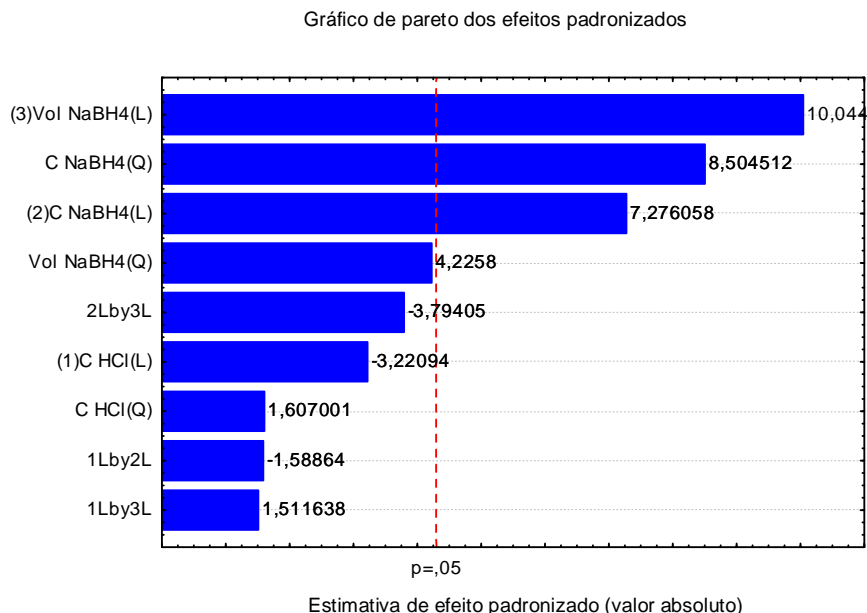


Figura 8 - Gráfico de Pareto do planejamento Box-Behnken

De acordo com o gráfico de Pareto é possível inferir que os fatores que tem influência significativa no sistema são o volume e a concentração de tetrahydroborato de sódio, sendo que dentro do domínio experimental a concentração de ácido clorídrico e as interações entre os fatores estudados não se apresentaram significativas.

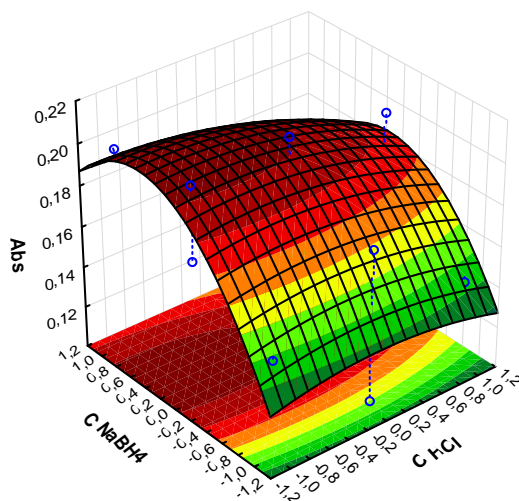


Figura 9 - Superfície de respostas (Abs x C<sub>NaBH4</sub> x C<sub>HCl</sub>)



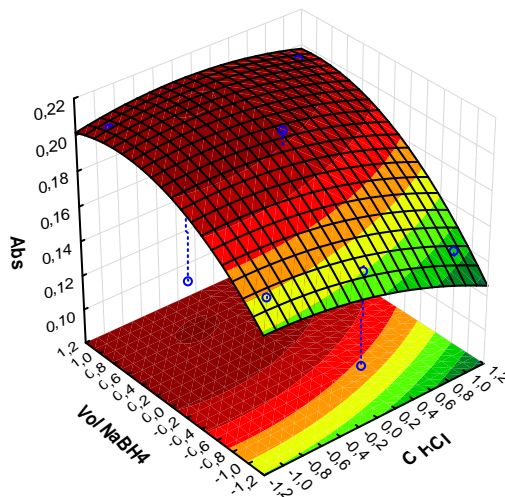


Figura 10 - Superfície de respostas (Abs x Vol<sub>NaBH4</sub> x C<sub>HCl</sub>)

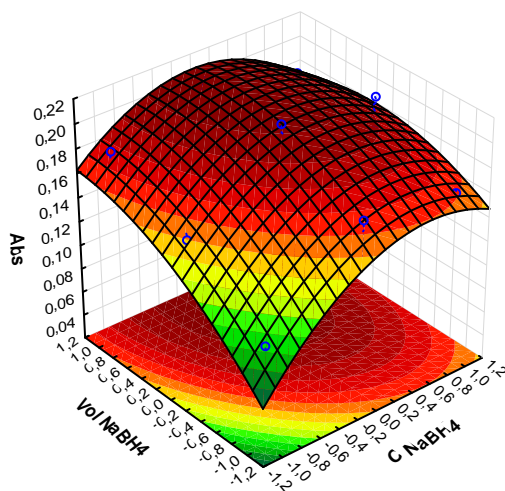


Figura 11 - Superfície de respostas (Abs x Vol<sub>NaBH4</sub> x C<sub>NaBH4</sub>)

O modelo matemático que relaciona os fatores envolvidos na otimização (concentração de ácido, volume e concentração de tetraidroborato de sódio) com a absorvância, está representado abaixo pela equação 13, no qual os termos significativos estão destacados de vermelho.

**Equação 13.**

$$\text{Abs} = 0.1669 - 0.007616(\text{C}_{\text{HCl}}) - 0.005595(\text{C}_{\text{HCl}})^2 + 0.01720(\text{C}_{\text{NaBH}_4}) - 0.02960(\text{C}_{\text{NaBH}_4})^2 + 0.02375(\text{V}_{\text{NaBH}_4}) - 0.01471(\text{V}_{\text{NaBH}_4})^2 - 0.00531(\text{C}_{\text{HCl}})(\text{C}_{\text{NaBH}_4}) + 0.00506(\text{C}_{\text{HCl}})(\text{V}_{\text{NaBH}_4}) - 0.01269(\text{C}_{\text{NaBH}_4})(\text{V}_{\text{NaBH}_4})$$

A derivação desse modelo para cada fator resulta no sistema de equações:

**Equação 14.**

$$\frac{\delta(Abs)}{\delta(C\ HCl)} = -0,007616 - 0,01119(C_{HCl}) - 0,00531(C_{NaBH_4}) + 0,00506(V_{NaBH_4}) = 0$$

**Equação 15.**

$$\frac{\delta(Abs)}{\delta(C\ NaBH_4)} = 0,01720 - 0,0592(C_{NaBH_4}) - 0,00531(C_{HCl}) - 0,01269(V_{NaBH_4}) = 0$$

**Equação 16.**

$$\frac{\delta(Abs)}{\delta(Vol\ NaBH_4)} = 0,02375 - 0,02942(V_{NaBH_4}) + 0,00506(C_{HCl}) - 0,01269(C_{NaBH_4}) = 0$$

A resolução destes sistemas de equação resulta em uma condição de máximo de absorvância, em valores codificados, para cada fator, que foi de (-0,4857) para concentração de ácido clorídrico, (+0,1973) para concentração de tetraidroborato de sódio e (+0,6389) para volume de tetraidroborato de sódio. Esse modelo não obteve falta de ajuste (Lack of fit) (Tabela 10) e os resultados como valores reais indicam 1,51 mol L<sup>-1</sup> de concentração de ácido clorídrico, 1,10 % para concentração de tetraidroborato de sódio e 3,96 mL para volume de tetraidroborato de sódio. Considerando todos esses resultados, as condições experimentais escolhidas para quantificação de mercúrio por CV HR-CS AAS foram:

$$[HCl] = 1,50\ mol\ L^{-1}, [NaBH_4] = 1,0\ \% \text{ and } V_{NaBH_4} = 4,0\ mL$$

Mesmo o fator, concentração de ácido clorídrico, não ter se apresentando significativo dentro do domínio experimental de estudo, indicando que é possível utilizar qualquer concentração de ácido que esteja dentro deste domínio sem que haja muita influência na resposta analítica, foi feito a determinação do valor ótimo do mesmo, com intuito de assegurar um valor de estudo para a realização dos procedimentos. O valor estabelecido como ótimo

(1,50 mol L<sup>-1</sup>) foi adequado para uso nos demais procedimentos, visto que se distancia de forma adequada dos níveis do domínio experimental, assegurando a robustez para essa variável, além de, exigir por si só um consumo menor de reagente.

Tabela 10 - ANOVA gerada pelo programa STATISTICA 8.0 com os valores experimentais obtidos.

Fator	ANOVA (3 fatores, Planejamento Box-Behnken, 1 bloco, 15 experimentos)				
	SS	df	MS	F	p
(1)C <sub>HCl</sub> L+Q	0,000580	2	0,000290	6,47845	0,133717
(2)C <sub>NaBH<sub>4</sub></sub> L+Q	0,005603	2	0,002802	62,63387	0,015715
(3)Vol. NaBH <sub>4</sub> L+Q	0,005312	2	0,002656	0,59,37460	0,016563
1*2	0,000113	1	0,000113	2,52378	0,253079
1*3	0,000102	1	0,000102	2,28505	0,269753
2*3	0,000644	1	0,000644	14,39478	0,062978
Falta de ajuste	0,000073	3	0,000024	0,54606	0,697854
Erro puro	0,000089	2	0,000045		
Total SS	0,012198	14			

### 8.1.3 Ensaio de robustez

O sistema de geração de vapor químico de mercúrio e sua determinação por HR-CS AAS apresenta melhores respostas quando são utilizadas as seguintes condições: concentração de ácido clorídrico: 1,5 mol L<sup>-1</sup>, concentração de tetrahydroborato de sódio: 1% m/v e volume de tetrahydroborato: 4,0 mL. Para avaliar o comportamento do sistema quando essas condições sofrem uma pequena variação em torno das condições ótimas, foi realizado o ensaio de robustez. O mesmo foi feito aplicando planejamento fatorial completo (2<sup>2</sup>), onde o domínio experimental foi obtido através da variação de 20 % para mais e para menos em torno dos valores críticos. O fator concentração de ácido clorídrico não foi incluído no ensaio de robustez, pois como já comentado, o mesmo dentro do domínio experimental (1 a 3 mol L<sup>-1</sup>) não se apresentou significativo.

Desta forma é apresentado na Tabela 11 o domínio experimental para o planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), considerando os fatores; concentração e volume de tetraidroborato de sódio.

Tabela 11 - Domínio experimental para realização do ensaio de robustez aplicando planejamento fatorial ( $2^2$ )

<b>Domínio Experimental</b>			
<b>Fator</b>	<b>( - )</b>	<b>( 0 )</b>	<b>( + )</b>
<b>C<sub>NaBH4</sub></b>	0,8 %	1 %	1,2 %
<b>Volume<sub>NaBH4</sub></b>	3,2 mL	4,0 mL	4,8 mL

As variáveis e os seus respectivos níveis em valores reais e codificados estão apresentados na matriz de planejamento na Tabela 12.

Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental para ensaio de robustez com as respostas analíticas em absorvância

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>NaBH4</sub></b>	<b>Vol<sub>NaBH4</sub></b>	<b>ABS</b>
<b>1</b>	1 (1,2 %)	1 (4,8 mL)	0,20963
<b>2</b>	1 (1,2 %)	-1 (3,2 mL)	0,20365
<b>3</b>	-1 (0,8 %)	1 (4,8 mL)	0,20789
<b>4</b>	-1 (0,8 %)	-1 (3,2 mL)	0,20843
<b>5 (PC)</b>	0 (1 %)	0 (4,0 mL)	0,20309
<b>6 (PC)</b>	0 (1 %)	0 (4,0 mL)	0,19714
<b>7 (PC)</b>	0 (1 %)	0 (4,0 mL)	0,20639

A resposta obtida, como sinal analítico (absorvância), foi analisada utilizando o software STATISTICA 8.0, que mostrou através do gráfico de Pareto (Figura 12), que as variações não foram significativas a um nível de confiança de 95 %, possibilitando assim inferir que o método é robusto.

Gráfico de pareto de efeitos padronizados

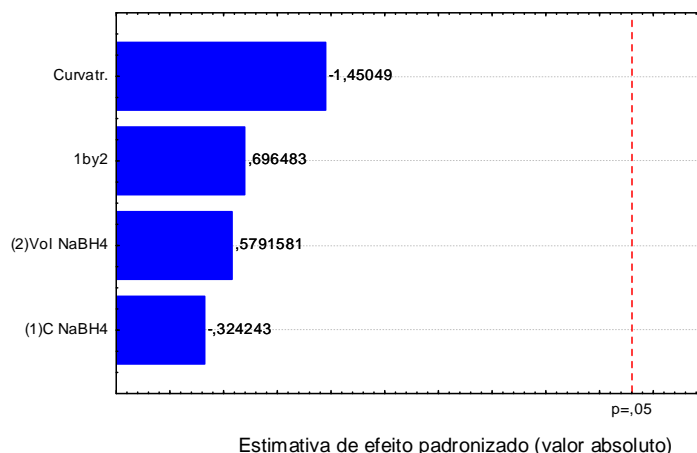


Figura 12 - Gráfico de Pareto do ensaio de robustez

## 8.2 UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE ARROZ EM SUSPENSÃO

### 8.2.1 Otimização das condições experimentais para determinação de mercúrio em arroz empregando amostragem em suspensão e CV HR-CS AAS.

A determinação de mercúrio em arroz empregando amostragem por suspensão requer o uso de tiouréia como agente complexante para melhorar a extração de mercúrio para fase líquida e álcool isoamílico como antiespumante, devido à formação intensa de espuma durante o processo de geração de vapor nesta matriz.

Desta forma, um planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) foi realizado para avaliar as melhores condições experimentais de quantificação de mercúrio empregando amostragem por suspensão. Os fatores envolvidos no planejamento foram: volume de ácido clorídrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , concentração de tiouréia (% m/v) e volume de álcool isoamílico. Os experimentos foram realizados utilizando 0,2 g de arroz em balão de 10 mL contendo  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de

mercúrio. A Tabela 13 mostra os valores codificados e reais e os sinais analíticos (absorvância) obtidos em altura do pico.

Tabela 13 - Matriz do planejamento para otimização das condições experimentais para a determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão

<b>Experimento</b>	<b>Vol<sub>HCl</sub></b>	<b>C<sub>tiouréia</sub></b>	<b>Vol<sub>álcool</sub></b>	<b>ABS</b>
<b>1</b>	1 (5 mL)	1 (0,04 %)	1 (300 µL)	0,24100
<b>2</b>	1 (5 mL)	1 (0,04 %)	-1 (100 µL)	0,16600
<b>3</b>	1 (5 mL)	-1 (0,00 %)	1 (300 µL)	0,19240
<b>4</b>	1 (5 mL)	-1 (0,00 %)	-1 (100 µL)	0,13930
<b>5</b>	-1 (3 mL)	1 (0,04 %)	1 (300 µL)	0,22690
<b>6</b>	-1 (3 mL)	1 (0,04 %)	-1 (100 µL)	0,16900
<b>7</b>	-1 (3 mL)	-1 (0,00 %)	1 (300 µL)	0,17400
<b>8</b>	-1 (3 mL)	-1 (0,00 %)	-1 (100 µL)	0,12180
<b>9 (PC)</b>	0 (4 mL)	0 (0,02 %)	0 (200 µL)	0,30830
<b>10 (PC)</b>	0 (4 mL)	0 (0,02 %)	0 (200 µL)	0,30610
<b>11 (PC)</b>	0 (4 mL)	0 (0,02 %)	0 (200 µL)	0,29060

Os resultados do planejamento fatorial foram avaliados e os efeitos das variáveis sobre a determinação de mercúrio empregando amostragem por suspensão foram calculados. Os valores dos efeitos foram (0,01175), (0,04385) e (0,05955) para volume de ácido clorídrico, concentração de tiouréia e volume de álcool isoamílico, respectivamente. Estes dados demonstram que todos os três fatores tem efeito positivo e que a concentração de tiouréia e o volume de álcool isoamílico são os fatores que mais afetam o processo. Também é possível concluir que os fatores significativos dentro do domínio experimental estabelecido são a concentração de tiouréia e o volume de álcool, o que pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 13).

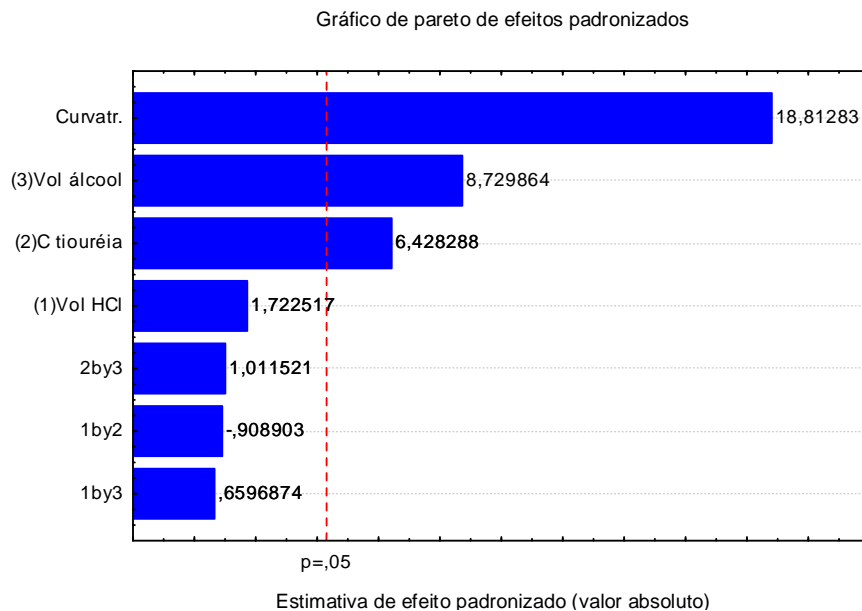


Figura 13 - Gráfico de Pareto

O teste de curvatura que avalia o comportamento do sistema na região do ponto central (se há ou não condição de máximo nesta região) foi aplicado nos resultados obtidos, e para o seu cálculo foi utilizado a seguinte equação:

**Equação 17.** 
$$\text{Curvatura} = R_{ED} - R_{CP},$$

Onde,  $R_{ED}$  é a média das respostas obtidas a partir dos experimentos específicos obtidos pelo planejamento fatorial, e  $R_{CP}$  é a média das respostas obtidas para o ponto central.

Uma análise dos resultados,  $R_{ED} = (0,17880)$ ,  $R_{CP} = (0,30167)$  sugeriu uma curvatura negativa (-0,12287) que juntamente com a significância da curvatura representada no gráfico de Pareto (Figura 13), revela que existe uma região máxima de sinal analítico perto das condições experimentais do ponto central, que corresponde em valores reais a: 4 mL de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>, a 0,02 % de concentração final tiouréia e 200 µL para o volume de álcool isoamílico.

Desta forma as melhores condições para determinar mercúrio empregando amostragem em suspensão e considerando o domínio

experimental em estudo são: 4 mL de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>, 0,02 % de concentração final tiouréia e 200 µL para o volume de álcool isoamílico.

### 8.2.2 Avaliação do processo de cozimento do arroz no procedimento proposto

Antes do preparo da suspensão, a amostra parcialmente macerada em grãos pequenos (Figura 14) passa por um processo de cozimento em banho a 60 °C. A eficiência e a necessidade da etapa de cozimento no procedimento proposto foram avaliadas. Para tanto, uma amostra de arroz em triplicata foi analisada utilizando o procedimento geral de preparo, sem e com a etapa prévia de cozimento. A concentração de mercúrio (expressa com intervalo de confiança a um nível de 95 %) encontrada utilizando o procedimento com a etapa de cozimento foi  $4,10 \pm 0,41$  ng g<sup>-1</sup>. Já sem a etapa de cozimento a concentração encontrada foi abaixo do limite de quantificação. Os resultados demonstram que a etapa de cozimento auxilia no processo de diminuição das partículas ao utilizar banho ultrassônico e melhora o processo de extração de mercúrio para a fase líquida da suspensão e, além disso, pôde ser observado que a ausência de cozimento gerava suspensões não homogêneas, chegando algumas vezes a não haver formação completa da mesma.



Figura 14 - Amostra de arroz. (A) in natura; (B) parcialmente macerado a grãos menores.



### 8.2.3 Avaliação da perda de mercúrio durante o procedimento proposto

Considerando o caráter volátil do mercúrio, experimentos foram realizados para avaliar o comportamento deste elemento durante as etapas de cozimento e de sonicação. Uma amostra com baixo teor de mercúrio foi utilizada e uma quantidade fixa de íons de mercúrio foi adicionada em diferentes ordens como representado na Tabela 14. Todas as condições experimentais foram mantidas e somente a ordem de adição de mercúrio foi variada. Os resultados, como pode ser visto na Tabela 14, demonstram que no processo de cozimento e sonicação não há perda significativa de mercúrio, com recuperação variando de 91 a 96 %.

Tabela 14 - Avaliação da perda de mercúrio durante a execução do método analítico proposto

<b>Teste</b>	<b>Ordem de execução do experimento</b>	<b>Recuperação</b>
1	Amostra+ adição de Hg + cozimento+ sonicação+ medida	96 %
2	Amostra + cozimento + adição de Hg + sonicação+ medida	93 %
3	Amostra + cozimento + sonicação + adição de mercúrio + medida	91 %

### 8.2.4 Avaliação da extração de mercúrio no processo de amostragem em suspensão

O processo de extração de mercúrio durante o procedimento de amostragem em suspensão e a quantificação do mesmo foi investigado em detalhes. Para tanto, uma amostra de arroz em triplicata foi submetida a procedimento geral proposto. Após o preparo da suspensão foi tomada uma alíquota de 4 mL de cada uma das triplicatas e as mesmas foram utilizadas para determinação de mercúrio. A concentração média encontrada foi  $13,72 \pm 2,71 \text{ ng g}^{-1}$ . O restante da suspensão (6 mL) foi centrifugada e então foi tomada

uma alíquota de 4 mL do sobrenadante, na qual o mercúrio foi determinado utilizando o procedimento geral. A concentração média de mercúrio encontrada foi de  $14,82 \pm 4,41 \text{ ng g}^{-1}$ . Este experimento evidencia que durante o preparo da suspensão o mercúrio presente nas amostras de arroz é quantitativamente extraído para a fase líquida da suspensão e que não há necessidade de centrifugação das amostras antes da leitura, visto que as concentrações sem e com centrifugação não apresentam valores com diferença significativa.

#### 8.2.5 Validação do método

##### 8.2.5.1 Avaliação do efeito de matriz e escolha da técnica de calibração

Para avaliar o efeito de matriz e escolher a técnica de calibração para o procedimento, um experimento empregando o procedimento geral envolvendo a técnica de adição de analito foi realizado utilizando uma amostra de arroz com baixo teor de mercúrio. Quantidades de mercúrio foram adicionadas nas amostras de arroz antes do preparo da suspensão de forma que fossem obtidas amostras de suspensão de arroz para medida com concentração equivalente aos seguintes pontos da curva analítica 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . A inclinação da curva analítica obtida (expressa como intervalo de confiança ao nível de 95 %) foi  $(0,07598 \pm 0,00221)$ . A curva de calibração realizada nas mesmas concentrações utilizando padrões aquosos foi feita e a inclinação da mesma foi  $(0,07629 \pm 0,00255)$ . Esses resultados demonstram que a determinação de mercúrio utilizando o método proposto neste trabalho pode ser realizada usando a técnica de calibração externa utilizando padrões aquosos, já que não há diferença significativa entre as inclinações das curvas analíticas obtidas como pode ser visto na figura 15.

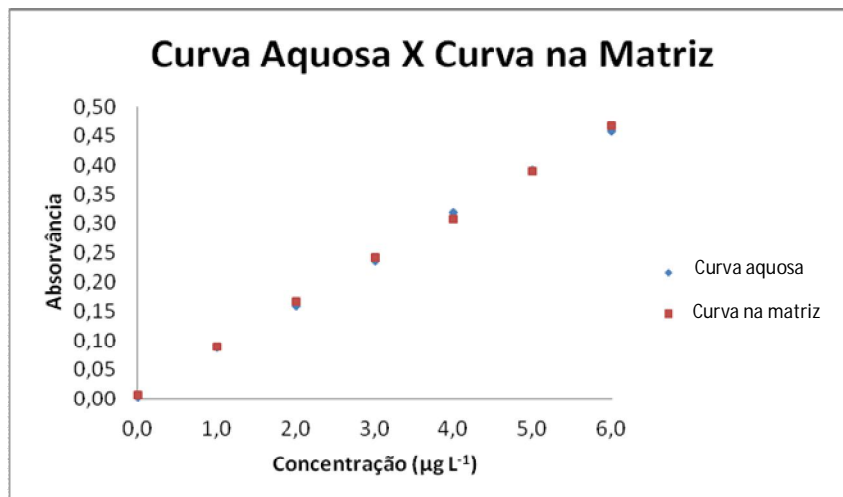


Figura 15 - Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva na amostra.

#### 8.2.5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados (y) correlacionados linearmente com as concentrações do analito (x) em uma determinada faixa de aplicação (GUILHEN, 2009). A linearidade é normalmente expressa através dos coeficientes de correlação linear (R) da curva de calibração, que apresenta uma faixa de magnitude entre -1 e 1. Quanto mais próximo de 1 ou de -1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais, ou seja, menor o erro em y (MILLER e MILLER, 1993). Em resumo, quanto mais próximo de 1 o valor de R, maior a garantia linear da relação entre sinal medido (y) e concentração do analito (x) para o intervalo de concentrações em questão.

Neste trabalho, a curva analítica que foi obtida usando padrões aquosos foi linear até 25 µg L<sup>-1</sup>, apresentando como coeficiente de correlação ( R ) o valor de 0,9995.

### 8.2.5.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação são fatores críticos na seleção de um método para análise de traços. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada por um determinado método analítico, mas não necessariamente quantificada, ou seja, é a menor concentração que proporciona um sinal no instrumento significativamente diferente do sinal de um branco (MILLER e MILLER, 1993). Segundo a IUPAC, para cálculo do limite de detecção deve-se levar em consideração parâmetros da curva analítica e medidas do branco, o que pode ser expresso na equação 18:

**Equação 18.** 
$$LD = 3 \times \frac{s}{b}$$

Onde,  $s$  é o desvio padrão da leitura de brancos e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica de calibração.

Neste trabalho, o limite de detecção foi de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que para a determinação empregando amostragem em suspensão e usando  $0,2 \text{ g}$  de amostra de arroz este limite é equivalente a  $0,95 \text{ ng g}^{-1}$ . Para fins de cálculo foi feita a leitura de 10 brancos, sendo que o desvio padrão e o coeficiente angular considerados foram  $0,000205$  de  $0,0808$ , respectivamente.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida, com uma determinada certeza estatística. Para cálculo do limite de quantificação também são levados em consideração parâmetros da curva analítica e medidas do branco, o que pode ser expresso na equação 19.

**Equação 19.** 
$$LQ = 10 \times \frac{s}{b}$$

O Limite de quantificação deste trabalho foi equivalente a  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que para a determinação empregando amostragem em suspensão e usando

0,2 g de amostra de arroz, este limite é equivalente a  $3,18 \text{ ng g}^{-1}$ , considerando os mesmos valores de b e s usados para calcular o LD.

#### 8.2.5.4 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a capacidade de um método em discriminar pequenas variações na concentração do analito, e pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, isto é, pelo coeficiente angular desta curva (INMETRO, 2003).

Um método pode ser dito sensível quando uma pequena variação na concentração do analito é capaz de gerar uma variação considerável no sinal analítico. Isso é observado quando a inclinação da curva analítica de calibração é mais acentuada, ou seja, quando apresenta um coeficiente angular relativamente alto. Neste trabalho, a sensibilidade do método desenvolvido foi de  $(0,0765 \pm 0,0017)$ , o que lhe confere capacidade de distinguir concentrações muito próximas de mercúrio.

#### 8.2.5.5 Faixa linear

A faixa linear consiste na extensão da aplicabilidade do método, que vai desde o limite de quantificação (LQ) até a concentração onde é observado o desvio da linearidade. O método proposto neste trabalho apresentou uma faixa linear que se estendeu de 0,03 a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , a qual corresponde, em termos de  $\text{ng g}^{-1}$ , a faixa de 3,18 a 3125 para as suspensões de arroz preparadas.

#### 8.2.5.6 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho consiste na faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado, buscando uma faixa de forma que as concentrações mais esperadas das amostras se situem, sempre que possível, mais próximas ao centro. A faixa linear de trabalho do método proposto foi de 0,03 a 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , que corresponde a uma faixa de 3,18 a 62,5  $\text{ng g}^{-1}$ .

#### 8.2.5.7 Precisão

A precisão é um parâmetro que avalia o grau de dispersão de resultados de ensaios independentes obtidos pela repetição de uma mesma amostra ou de padrões aquosos, em condições bem definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetitividade, que avalia a concordância entre resultados independentes obtidos pelo mesmo métodos e sob as mesmas condições de medição e da reprodutibilidade, que avalia a concordância entre resultados independentes obtidos sob diferentes condições de medição.

A precisão, usualmente, é expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD %) também conhecido como coeficiente de variação (CV %). A mesma é calculada através da razão entre o desvio padrão das medidas de uma mesma concentração ( $s$ ) e a média das medidas dessa concentração ( $X_m$ ), sendo expresso normalmente em porcentagem (Equação 20).

**Equação 20.**

$$RSD\% = \left( \frac{s}{X_m} \right) \cdot 100$$

A precisão é um parâmetro geralmente dependente da concentração do analito e em virtude disso se faz necessária a sua determinação para diferentes concentrações do analito (THOMPSON et al, 2002).

Deste modo, a precisão expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD %), calculado a partir de 7 medidas consecutivas de suspensões, foi de 1,98 e 12,10% para suspensões preparadas a partir de duas amostras de arroz com as concentrações de mercúrio de 10,32 e 4,90 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 8.2.5.8 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que expressa o grau de concordância entre o resultado experimental obtido e o valor aceito como o mais provável, ou seja, o valor de referência convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2003). A avaliação da exatidão de um método normalmente é feita mediante análise de material de referência certificado (CRM), teste de adição/recuperação e/ou ensaios interlaboratoriais.

Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado de farinha de arroz NBS SRM 1568, o qual possui valor certificado de (0,0058 ± 0,0005) mg Kg<sup>-1</sup> de mercúrio. Aplicando o método proposto foi encontrada uma concentração de mercúrio de (0,0060 ± 0,0007) mg Kg<sup>-1</sup>, a qual está em concordância com o valor certificado, conferindo assim exatidão ao método. O CRM foi preparado do mesmo modo como as suspensões de arroz utilizando um valor de massa de 0,2 g.

Para avaliar se houve diferença significativa, a um nível de confiança de 95 %, entre o valor certificado e o valor encontrado foi aplicado o teste t, utilizando a seguinte equação:

**Equação 21.** 
$$|t| = |(x - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s}|$$

Onde: x = média dos valores experimentais

μ = valor de referência

n = número de determinações

s = desvio padrão das medidas

Se o valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado (valor crítico) não há diferença significativa entre o valor obtido experimentalmente e o valor de referência, evidenciando, portanto que não foi possível constatar a existência de erros sistemáticos (MILLER e MILLER, 1993).

Substituindo os resultados experimentais na equação do teste t , obtém-se:

**Equação 22.** 
$$|t| = |(0,0060 - 0,0058) \frac{\sqrt{3}}{0,0002}|$$
$$t = 1,73$$

Sendo o t tabelado para n-1 graus de liberdade equivalente a 4,303 é possível verificar que o t calculado (1,73) é menor que o t tabelado (4,303), o que permite inferir que não há diferença significativa entre os valores obtidos pelo método proposto e o valor certificado, ou seja, o método é exato.

Ao conferir exatidão ao método mediante a análise do CRM de farinha de arroz foi possível inferir que os seguintes elementos não interferem na determinação de mercúrio empregando CV HR-CS AAS quando estão em concentrações próximas a: Ca (0,0118 % m/m), Mg (0,056% m/m), K (0,1280 % m/m), Na( 6,6 mg Kg<sup>-1</sup>), Zn (19,4 mg Kg<sup>-1</sup>), Cd (0,022 mg Kg<sup>-1</sup>), Cu (2,4 mg Kg<sup>-1</sup>), Fe (7,4 mg Kg<sup>-1</sup>), Se (0,38 mg Kg<sup>-1</sup>) e As (0,29 mg Kg<sup>-1</sup>).

A exatidão também foi avaliada mediante teste de adição/recuperação (spike) que consiste na recuperação do analito após análise de amostras nas quais foram adicionadas quantidades conhecidas do mesmo (Tabela 15). A recuperação pode ser calculada através seguinte equação 23:

**Equação 23.** 
$$R (\%) = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde: C<sub>1</sub> = concentração determinada na amostra adicionada,

C<sub>2</sub> = concentração determinada na amostra não adicionada,

C<sub>3</sub> = concentração adicionada



Tabela 15 - Teste de adição e recuperação

Amostras ([Hg] ng g <sup>-1</sup> )	Adição de Hg (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
1 (< LQ)	0,3	93%
	3	96%
2 (6,27)	0,3	91%
	3	95%

Além da análise do material de referência certificado e do ensaio de adição/recuperação, algumas amostras foram analisadas após digestão completa em forno microondas usando ácido nítrico concentrado, peróxido de hidrogênio 30% (v/v) e água ultrapura. Esses resultados, expressos com intervalo de confiança (ao nível de 95 %), são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Determinação de mercúrio em arroz usando amostragem em suspensão e digestão ácida

Amostra, nº	Concentração (ng g <sup>-1</sup> )	
	Suspensão	Digestão
1	4,90 ± 1,47	4,37 ± 0,49
2	8,78 ± 0,81	8,64 ± 1,34
3	6,27 ± 0,88	6,24 ± 0,95
4	10,40 ± 1,48	11,32 ± 0,79
5	13,72 ± 2,71	13,78 ± 3,20
6	10,32 ± 0,51	10,69 ± 0,36

O teste-t pareado é utilizado para comparar métodos de análise por meio do estudo de amostras que contêm diferentes quantidades de analito (MILLER e MILLER, 1993).

Aplicando teste-t pareado a esses resultados, ao nível de confiança de 95%, não houve diferença estatística entre os valores obtidos pelo método de suspensão e aqueles obtidos após digestão ácida, o que pode ser observado

pela resolução da equação 24 abaixo utilizando os parâmetros representados na tabela 17.

**Equação 24.** 
$$t = X_s \frac{\sqrt{n}}{S_s}$$

Onde:  $X_s$  : média das diferenças

$n$  : número de amostras

$S_s$ : desvio padrão das diferenças

Tabela 17 - Determinação dos parâmetros necessários para aplicação do teste-t pareado

<b>Amostras, nº</b>	<b>Diferença entre os métodos</b>
1	0,53
2	1,02
3	0,03
4	-0,92
5	-0,06
6	-0,37
<b>Média</b>	0,04
<b>Desvio padrão</b>	0,68

Aplicando os valores calculados na equação 24, é obtido o valor de  $t$  equivalente a 0,14. O valor tabelado de  $t$  para  $n-1$  graus de liberdade é de 2,57, desta forma o valor calculado para  $t$  é inferior ao valor tabelado, logo é possível inferir que os métodos não dão valores significativamente diferentes para as concentrações médias de mercúrio.

#### 8.2.5.9 Eficiência de extração

A eficiência de extração do método proposto foi avaliada utilizando as condições experimentais otimizadas em uma determinada amostra de arroz em triplicata. A eficiência ( $E_f$ ) foi calculada mediante a razão entre os sinais de

absorvância obtidos quando as suspensões foram analisadas ( $A_s$ ) e os sinais de absorvância obtidos quando o sobrenadante das suspensões após centrifugação ( $A_c$ ) foram analisados, sendo expressa em porcentagem (Equação 25).

**Equação 25.** 
$$Ef = \left( \frac{A_s}{A_{aq}} \right) \cdot 100$$

Para a amostra analisada o  $A_s$  de 0,01384 e o  $A_{aq}$  de 0,01449 conferiu um eficiência de extração de 95%, demonstrando que o processo de extração de mercúrio é completo nas condições experimentais estabelecidas para o procedimento proposto.

#### 8.2.5.10 Resumo das principais figuras analíticas de mérito do método proposto

Tabela 18 - Resumo das figuras analíticas de mérito do método desenvolvido

<b>Figuras de mérito</b>	
<b>Limite de detecção</b>	0,01 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	0,95 ( $\text{ng g}^{-1}$ )
<b>Limite de quantificação</b>	0,03 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	3,18 ( $\text{ng g}^{-1}$ )
<b>Sensibilidade</b>	(0,0765 $\pm$ 0,0017)
<b>Faixa linear</b>	0,03 a 25 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Precisão (RSD%)</b>	1,98 (10,32 $\text{ng g}^{-1}$ )
	12,10 (4,90 $\text{ng g}^{-1}$ )

## 8.2.6 Aplicação do método proposto

O método proposto para determinar o teor de mercúrio em arroz foi utilizado em 10 amostras de arroz compradas em supermercados na cidade de Salvador, Brasil, entre os meses de julho e agosto de 2011. Dessas 10 amostras 3 apresentaram um teor de mercúrio inferior ao limite de quantificação ( $3,18 \text{ ng g}^{-1}$ ). As demais amostras apresentaram teores de mercúrio que variaram entre  $4,10$  e  $13,72 \text{ ng g}^{-1}$ , apresentando uma média de  $8,36 \text{ ng g}^{-1}$ . Esses resultados, expressos com intervalo de confiança (ao nível de 95%), são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Determinação de mercúrio em amostras de arroz

<b>Amostra, nº</b>	<b>Concentração (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>
1	$4,90 \pm 1,47$
2	$8,78 \pm 0,81$
3	$6,27 \pm 0,88$
4	$10,40 \pm 1,48$
5	$13,72 \pm 2,71$
6	$10,32 \pm 0,51$
7	$4,10 \pm 0,41$
8	< LQ
9	< LQ
10	< LQ

LQ =  $3,18 \text{ ng g}^{-1}$

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com dados reportados na literatura (DA SILVA et al., 2010), que apresentaram teor de mercúrio em arroz que variaram entre  $1,3$  a  $7,8 \text{ ng g}^{-1}$ . Além disso, os teores de mercúrio nestas amostras estão em sua maioria inferiores ao limite máximo de tolerância de mercúrio permitido em alimentos ( $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) pelo Decreto nº 55871 de 1965 da legislação Brasileira, com exceção da amostra 5 que apresentou concentração média ( $13,72 \text{ ng g}^{-1}$ ) superior a este limite e das

amostras 4 e 6 que apresentaram concentrações em torno deste limite (10,40 e 10,32 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente). Não é adequado inferir que estas amostras de arroz representam risco à saúde humana por apresentarem teor de mercúrio superior ao limite máximo estabelecido, uma vez que necessitaria da coleta de mais amostras para verificar se o resultado é pontual ou representativo da amostra como um todo indicando que a mesma é caracterizada por elevados teores de mercúrio.

### 8.3 UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE CARVÃO EM SUSPENSÃO

O procedimento geral de preparo de suspensão de carvão proposto neste trabalho foi compreendido na sonicação de uma massa adequada de carvão em uma quantidade estabelecida de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>. Este procedimento possibilitou a formação da suspensão de carvão e determinação de mercúrio por CV HR-CS AAS, comprovado por análise de material de referência certificado de carvão BCR 40 e BCR 182. As condições de geração de vapor frio de mercúrio e determinação empregando CV HR-CS AAS estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS AAS e geração de vapor frio

<b>Parâmetro</b>	<b>Condições ótimas</b>
<b>Concentração HCl (mol L<sup>-1</sup>)</b>	1,5
<b>Concentração de NaBH<sub>4</sub> (% m/v)</b>	1
<b>Volume de NaBH<sub>4</sub> (mL)</b>	4

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o mercúrio utilizando o método proposto foram de 0,04 e 0,15 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os limites foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC e a partir da leitura de dez brancos. Como a

determinação de mercúrio por esse método emprega amostragem em suspensão o limite de detecção e quantificação são melhores representados por 0,03 e 0,09  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, para procedimento empregado no CRM BCR 40, que fez uso de 0,1 g de amostra e 25 mL de suspensão. Já para procedimento empregado no CRM BCR 182, que fez uso de 0,2 g de amostra e 10 mL de suspensão, o LD e o LQ foram 0,006 e 0,019  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

A sensibilidade do método desenvolvido, expressa pela inclinação da curva de regressão linear, foi de  $(0,0664 \pm 0,0087)$ , o que confere ao método capacidade de distinguir concentrações muito próximas de mercúrio. O método proposto neste trabalho apresentou uma faixa linear que se estendeu de 0,04 a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio. Esta faixa em termos de amostragem em suspensão e usando procedimento empregado no CRM BCR 40 equivale a 0,03 - 18,75  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Já empregando procedimento de amostragem em suspensão no CRM BCR 182 esta faixa se estende de 0,006 a 3,75  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

A precisão expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD %) foi de 2,50 e 6,41% para suspensões preparadas a partir de duas amostras de carvão com as concentrações de mercúrio de 0,188  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 0,082  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Ao preparar suspensão do CRM BCR 40 e determinar mercúrio por CV HR-CS AAS obteve-se como resultado a concentração de mercúrio equivalente a  $(0,35 \pm 0,11)$   $\text{mg Kg}^{-1}$ , o que confere exatidão ao método, visto que este valor está concordante com o valor certificado do CRM  $(0,35 \pm 0,06)$   $\text{mg Kg}^{-1}$ .

Ao aplicar o procedimento de preparo de suspensão no CRM BCR 182 que apresenta um valor certificado de  $(0,040 \pm 0,007)$   $\text{mg Kg}^{-1}$  para mercúrio, obteve-se um teor equivalente a  $(0,037 \pm 0,013)$   $\text{mg Kg}^{-1}$ . Foi aplicado Teste-t para fins de comparação entre valor experimental e valor certificado e o mesmo indicou que não há diferença significativa entre esses valores, confirmando assim exatidão ao método.

Ao conferir exatidão ao método mediante a análise dos CRMs de carvão foi possível inferir que os seguintes elementos não interferem na determinação de mercúrio empregando CV HR-CS AAS quando estão em concentrações próximas a: Cd  $(0,057 \text{ mg Kg}^{-1})$ , Se  $(0,68 \text{ mg Kg}^{-1})$  e Zn  $(33,3 \text{ mg Kg}^{-1})$ .

O método proposto utilizado na determinação de mercúrio do material de referência certificado BCR 182 foi aplicado em quatro amostras de carvão

provenientes do Estado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Todos os resultados expressos com intervalo de confiança (ao nível de 95%) estão apresentados na tabela 21.

Tabela 21 - Determinação de mercúrio em carvão usando amostragem em suspensão

<b>Amostra, Nº</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
1	Santa Catarina	0,108 $\pm$ 0,011
2	Santa Catarina	0,082 $\pm$ 0,008
3	Santa Catarina	0,188 $\pm$ 0,007
4	Rio Grande do Sul	0,134 $\pm$ 0,005

O teor de mercúrio encontrado nas amostras variou de 0,082 a 0,188  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os relatados por XU et al (2003), que afirmam que o teor de mercúrio para a maior parte de amostras de carvão varia entre 0,02 a 1  $\mu\text{g g}^{-1}$ , sendo que as concentrações médias encontradas em amostras de carvão provenientes dos EUA, Inglaterra e Austrália variaram entre 0,1 a 0,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

#### 8.4 UTILIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO

O preparo da suspensão de sedimento marinho proposto neste trabalho é compreendido na sonicação de uma massa adequada de sedimento em uma determinada quantidade de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup> e de tiouréia 1% (m/v), além do uso de octanol como anti-espumante. Este procedimento de preparo possibilitou a formação da suspensão de sedimento marinho e determinação de mercúrio por CV HR-CS AAS, comprovado por análise de material de referência certificado de sedimento marinho PACS-2 fornecida por NRCC.

As condições de geração de vapor frio e determinação de mercúrio empregando HR-CS AAS foram as mesmas que foram aplicadas nas suspensões de arroz e carvão. Os limites de detecção (LD) e quantificação

(LQ) calculados para o mercúrio utilizando o método proposto foram de 0,04 e 0,14  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

A sensibilidade do método desenvolvido, expressa pela inclinação da curva de regressão linear, foi de  $(0,0710 \pm 0,0013)$ , o que confere ao método capacidade de distinguir pequenas diferenças de concentrações de mercúrio. O método proposto neste trabalho apresentou uma faixa linear que se estendeu de 0,14 a 43,75  $\mu\text{g g}^{-1}$  de mercúrio e ao aplicá-lo no material de referência certificado PACS-2 obteve-se como resultado a concentração de mercúrio equivalente a  $(2,88 \pm 0,20)$   $\text{mg Kg}^{-1}$ . Para avaliar se o valor experimental obtido estava concordante com valor certificado  $(3,04 \pm 0,20)$   $\text{mg Kg}^{-1}$  foi aplicado Teste-t, sendo que o mesmo indicou que não há diferença significativa entre esses valores, conferindo assim exatidão ao método.

Ao conferir exatidão ao método mediante a análise do CRM de sedimento marinho, foi possível inferir que os seguintes elementos não interferem na determinação de mercúrio empregando CV HR-CS AAS quando estão em concentrações próximas a: Ca (1,96 g/100g), Mg (1,47 g/100g), K (1,24 g/100g), Na (3,45 g/100g), Fe (4,09 g/100g), Zn (364  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), Cd (2,11  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), Cu (310  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), Se (0,92  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), Pb (183  $\text{mg Kg}^{-1}$ ), Sb (11,3  $\text{mg Kg}^{-1}$ ) e As (26,2  $\text{mg Kg}^{-1}$ ).



## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos analíticos desenvolvidos mostraram-se eficientes na determinação de mercúrio total em amostras de arroz, carvão e sedimento marinho, com excelente precisão e exatidão e limites de quantificação adequados para as baixas concentrações freqüentemente encontradas nestes tipos de amostras quando não contaminadas e também inferiores aos limites de mercúrio permitidos em arroz e sedimento marinho de acordo com as legislações vigentes.

As técnicas de otimização multivariada, planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) e planejamento Box-Behnken, se revelaram eficientes na otimização das variáveis que influenciam a geração de vapor frio de mercúrio e determinação empregando CV HR-CS AAS e das que influenciam a determinação de mercúrio em arroz empregando amostragem em suspensão.

A aplicação da amostragem em suspensão como procedimento alternativo para o preparo das amostras, levou ao desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, sensíveis e confiáveis para a determinação de mercúrio em amostras de arroz, carvão e sedimentos marinhos. O emprego do banho ultrassônico permitiu a homogeneização/estabilização das suspensões e no caso das suspensões de arroz foi verificado que a agitação ultrassônica juntamente com aquecimento para o cozimento do arroz foi de grande importância na diminuição do tamanho das partículas, na quebra de aglomerados e na extração das espécies de interesse para a fase líquida da suspensão. O banho ultrassônico permitiu também que as suspensões fossem preparadas em balões volumétricos (sistema fechado), o que minimizou riscos de contaminação e perdas de analito. Por fim, a amostragem em suspensão proporcionou uma simplificação e redução bastante significativa das operações envolvidas na etapa de preparo das amostras de arroz, carvão e sedimento.

A combinação do uso de ultra-som com soluções de ácido clorídrico diluído no preparo das suspensões e com o uso do agente redutor tetrahidroborato de sódio permitiu o desenvolvimento de métodos capazes de determinar mercúrio total nas amostras sem a necessidade de digestão completa das mesmas.

A possibilidade do uso da técnica de calibração externa com padrões aquosos na determinação de mercúrio nas amostras em questão, proporcionou uma maior simplicidade aos procedimentos estabelecidos, tornando-os apropriados para análises de rotina.

Os teores de mercúrio encontrados nas amostras de arroz comercializadas em Salvador em sua maioria, além de estarem concordantes com teores já encontrados por outros trabalhos reportados na literatura, estavam abaixo do limite máximo permitido ( $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) pelo Decreto nº 55871 de 1965 da legislação Brasileira. Porém algumas amostras apresentaram teores um pouco acima do limite máximo tolerável em alimentos, indicando a necessidade de coleta e análise de mais amostras para certificar se as concentrações relativamente altas de mercúrio são características inerente as mesmas.

As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras de carvão provenientes das minas do Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina estão de acordo com as obtidas por outros autores e em outros países.

Por fim, parâmetros analíticos adequados foram obtidos para os métodos desenvolvidos durante o processo de validação, assegurando a confiabilidade dos resultados analíticos, o que por sua vez é imprescindível na análise de amostras alimentícias e ambientais, quanto aos teores de mercúrio que é um metal de elevada toxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANNEE). **Atlas de Energia Elétrica do Brasil. Cap.9 – Carvão Mineral**. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br>>. Acesso em: 10 de Jan. 2012.

ALVES, F. L.; CADORE, S.; JARDIM, W. F.; ARRUDA, M. A. Z. River sediment analysis by slurry sampling FAAS: determination of copper, zinc and lead. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 799 – 802, 2001.

ANALYTIK JENA AG. **Fundamentals, instrumentation and techniques of atomic absorption spectrometry**. Alemanha.

ARAMBARRI, I.; GARCIA, R.; MILLAN, E. Optimisation of tin determination in aqua regia-HF extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using experimental design. **Analyst**, v. 125, p. 2084-2088, 2000.

ARANDA, P. R.; GIL, R. A.; MOYANO, S.; DE VITO, I.; MARTINEZ, L. D. Slurry sampling in serum blood for mercury determination by CV-AFS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1399 -1403, 2009.

ARAUJO, R. G. O.; DIAS, F.de S.; MACEDO, S. M.; DOS SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 101, p. 397 – 400, 2007.

ARAUJO, R. G. O.; OLESZCZUK, N.; RAMPAZZO, R. T.; COSTA, P. A.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R.; WELZ, B.; FERREIRA, S. L. C. Comparison of direct solid sampling and slurry sampling for the determination of cadmium in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 77, p. 400-406, 2008.

BARALKIEWICZ, D.; GRAMOWSKA, H.; KÓZKA, M.; KANECKA, An determination of mercury in sewage sludge by direct slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, p. 409-413, 2005.

BARANOWSKA, I.; SZMYD, E. Elimination of interferences from Cu, Pb, Ag, Au, Pt, Pd and Se en the determination of mercury by CV AAS using sodium

tetrahydroborate (III) reduction in copper concentrates. **Fresenius´ Journal of analytical chemistry**, v. 350, n. 3, p. 178-180, 1994.

BEATY, R. D.; KERBER, J. D. **Concepts, instrumentation and techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry**. 2<sup>o</sup> Ed. Perkin-Elmer corporation, U.S.A., 2002.

BENDICHO, C.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers. **Journal of analytical atomic spectrometry – A review**, v. 6, p. 353 -374, 1991.

BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; UWE, H. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Analytica**, n.18, p. 58-67, 2005.

BRADY, D. V.; MONTALVO, J. G.; JUNG, J.; CURRAN, R. A. Direct determination of lead in plant leaves via graphite furnace atomic absorption. **At. Absorpt. Newslett**, v. 13, n. 5, p. 118-119, 1974.

BRANDÃO, G. C.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 231-233, 2011.

BRASIL. **Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 de Jan. de 2012.

BRASIL. **Resolução nº 344, de 25 de março de 2004**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 10 de Jan. de 2012.

BROWN, S. D. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 84R-101R, 1990.

CAL-PRIETO, M. J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J. M.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, v. 56, p. 1-51, 2002.

CAMPILLO, N.; MUÑOZ-DELGADO, E.; LOPEZ-GARCÍA, I.; BAEZA-ALBARRACÍN, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. **Suspensions of biological tissues in alkaline médium for the determination of copper, manganese and cobalt by electrothermal absorption spectrometry.** *Microchimica acta*, v. 171, p. 71-79, 2010.

CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Room Temperature Sonolysis-Based Advanced Oxidation Process for Degradation of Organomercurials: Application to Determination of Inorganic and Total Mercury in Waters by Flow Injection-Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4979 – 4984, 2000.

CAPELO, J. L.; RIVAS, G. M.; OLIVEIRA, L. G.; VILHENA, C.; SANTOS, A. C.; VALADA, T.; GALESIO, M.; OLIVEIRA, P.; DA SILVA, M. D. R. G.; GASPAR, E. M.; ALVES, S.; FERNANDEZ, C.; VAZ, C. Mercury determination by FI-CV-AAS after the degradation of organomercurials with the aid of an ultrasonic field: the important role of the hypochlorite ion. **Talanta**, v. 68, p. 813-818, 2006.

CAVA-MONTESINOS, P.; DOMINGUEZ-VIDA, M. L.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIA, M. On-line speciation of Mercury in fish by cold vapour atomic fluorescence through ultrasound-assisted extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 1386-1390, 2004.

CAVA-MONTESINOS, P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Cold vapor atomic fluorescence determination of mercury in milk by slurry sampling using multicommutation. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, p. 145 – 153, 2004.

CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G.R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.

CHEN, F. Y.; JIANG, S. J. Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of As, Cd and Hg in cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6564-6569, 2009.

COLLASIOL, A.; POZEBON, D.; MAISA, S. M. Ultrasound assisted mercury extraction from soil and sediment. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 157-164, 2004.

D'ULIVO, A.; DEDINA, J. Interferences in hydride atomization studied by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 481 – 498, 1996.

DA SILVA, A. F.; DIAS, L. F.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of Hg and Tl in environmental reference materials using slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry with permanganate as modifier and calibration against aqueous Standards. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v.18, p. 344-349, 2003.

DA SILVA, D. G.; MATOS, G. D.; DOS SANTOS, A. M. P.; FIUZA, R. P.; DE JESUS, R. M. A procedure using slurry sampling for the determination of manganese in corn flour by ET AAS. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2625 – 2629, 2011.

DA SILVA, M. J.; PAIM, A. P. S.; PIMENTEL M. F.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Determination of Mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Analytica Chimica Acta**,v. 667, p. 43-48, 2010.

De CARVALHO, J. F. Combustíveis fósseis e insustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 3, p. 30-33, 2008.

DENARDIN, C. C.; da SILVA, L. P.; STORCK, C. R.; NORBERG, J. L. Composição mineral de cultivares de arroz integral, parboilizado e branco. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 2, p. 125-130, 2004.

DOS SANTO, E. J.; HERRMANN, A. B.; VIEIRA, M. A.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Evaluation of slurry preparation procedures for the determination of mercury by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line cold vapor generation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 659 – 665, 2005.

DOS SANTOS, W. N. L.; DA SILVA, E. G. P.; FERNANDES, M. S.; ARAUJO, R. G. O.; COSTA, A. C. S.; VALE, M. G. R.; FERREIRA, S. L. C. Determination of copper in powdered chocolate samples by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1099 - 1102, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA).  
Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 10 de Jan. 2012.

FAO/WHO. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. Twenty second report of the Joint Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva, WHO Technical Report Series no. 63, 1978.

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

FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, H. S.; DA SILVA, E. G. P.; ARAÚJO, R. G. O.; AMORIM, F. A. C.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. C.; DE JESUS, R. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 475-491, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; MACEDO, S. M. M.; DOS SANTOS, D. C.; DE JESUS, R. M.; DOS SANTOS, W. N.L; QUEIRZO, A. F. de S.; DE ANDRADE, J. B. Speciation analysis of inorganic antimony in airborne particulate matter employing slurry sampling and HG QT AAS. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 26, p. 1887 – 1891, 2011.

FERREIRA, S. L. C.; MIRÓ, M.; DA SILVA, E. G. P.; MATOS, G. D.; DOS REIS, P. S.; BRANDÃO, G. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; DUARTE, A. T.; VALE, M. G. R.; ARAUJO, R. G. O. Slurry sampling – An analytical strategy for the determination of metals and metalloids by sprectroanalytical techniques. **Applied Spectroscopy reviews**, v. 45, p. 44-62, 2010.

FLORES, E. M. M.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Determination of Mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite tube, and electrothermal atomization. **Spectrochimica acta part B – Atomic Spectroscopy**, v. 56, p. 1605-1614, 2001.

GENTSCHEVA, G.; DETCHEVA, A.; HAVEZOV, I.; IVANOVA, E. Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of sodium and iron impurities in optical crystals of rubidium titanyl phosphate. **Microchimica acta**, v. 144, p. 115 -118, 2004.

GUILHEN, S. N. **Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008**, Março 2003.

IRACEMA, T.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; DE CAMPOS R. C. Revisão: A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1132-1144, 2002.

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

KRATA, A.; PYRZYNSKA, K.; BULSKA, E. Use of solid-phase extraction to eliminate interferences in the determination of mercury by flow-injection CV AAS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 735 – 739, 2003.

KRIVAN, V.; HEGER, A.; HAUPTKORN, S. Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for trace element analysis of high-purity tungsten trioxide. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.360, p. 167 – 174, 1998.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1ªed. Piracicaba, 2008.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters – A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, p. 127-138, 2010.

LI, L.; WANG, F.; MENG, B.; LEMES, M.; FENG, X.; JIANG, G. Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3103-3107, 2010.



LIAW, M. J.; JIANG, S. J.; LI, Y. C. Determination of mercury in fish samples by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 52, p. 779-785, 1997.

LIU, J.; ZHENG, C. G.; XU, J. Y. Determination of trace Mercury in coal by microwave digestion and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 24, p. 1133-1135, 2004.

LOPEZ-GARCIA, I.; SANCHEZ-MERLOS, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Determination of Mercury in sewage sludges by slurry samplign electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC international**, v. 85, p. 25-30, 2002.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3-40, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations - A review. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1189 – 1195, 2011.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in analytical chemistry**. v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MACEDO, S. M.; DOS SANTOS, D. C.; DE JESUS, R. M.; DA ROCHA, G. O.; FERREIRA, S. L. C.; DE ANDRADE, J. B. Development of na analytical approach for determination of total arsenic and arsenic (III) in airborne particulate matter by slurry sampling and HG-FAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 46-49, 2009.

MAGALHÃES, C. E. de C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensão: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 459 – 466, 1998.

MARANHÃO, T. de A.; MARTENDAL, E.; BORGES, D. L. G; CARASEK, E.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Couldo point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace absorption spectrometry with multivariate optimization using Box-Behnken design. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 1019-1027, 2007.

MICARONI, R. C. da C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. de F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

MILLER, J. C.; MILLER, J.N. **Estadística para química analítica**. 2ª Edição. Delaware, E.U.A., Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., 1993.

MILLERHILLI, N. J. Influence of slurry preparation on the accuracy of ultrasonic slurry electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v.9, p. 1129-1134, 1994.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Direct Mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 460, p. 111-122, 2002.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman: 2010.

PEREIRA, M.E.; DUARTE, A. C; MILIWARD, G. E.; ABREU, S. N.; AND VALE, C. An estimation of industrial mercury stored in sediments of a confined area of the Lagoon of Aveiro (Portugal). **Wat Sci. Tech.**, v. 37, p. 125-130, 1998.

QUI, G.; FENG, X.; LI, P.; WANG, S.; LI, H.; SHANG, L.; FU, X. Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa L.*) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2465-2468, 2008.

REZENDE, P. S.; MOURA, P. A. S.; JUNIOR, W. A. D.; NASCENTES, C.C.; WINDMOLLER, C. C.; COSTA, L. M. Arsenic and Mercury mobility in Brasillian Sediments from the São Francisco River Basin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.5, p. 910-918, 2011.

RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. Slurry sampling for Hg determination in sediments, sewage sludge and coal samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 825 – 831, 2004.

ROKKJAER, I.; HOYER B.; JENSEN, N. Interference by volatile nitrogen oxides in determination of mercury by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 40, n. 5, p. 729-735, 1993.

SANTOS, M. C.; NOBREGA, J. A. Slurry nebulization in plasmas for analysis of inorganic materials. **Applied spectroscopy reviews**, v. 41, p. 427 – 448, 2006.

SCHLESINGER, H. I.; BROWN, H. C.; FINHOLT, A. E.; GILBREATH, J. R.; HOEKSTRA, H. R.; HTDE, E. K. Sodium Borohydride, its hydrolysis and its use as a reducing agent and in the generation of hydrogen. **Journal of the Amercian Chemical Society**, v. 75, p. 215-219, 1953.

SEGADE, S. R.; TYSON, J. F. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow-injection-cold vapor atomic absorption spectrometry, using sodium borohydride as the sole reducing agent. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 797-807, 2003.

SEGADE, S. R.; BENDICHO, C. Slurry sampling combined with ultrasonic pretreatment for total mercury determination in samples containig inorganic and methylmercury by flow inhection-cold vapor atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1907-1912, 1999.

SELIN, N. E. Global Biogeochemical cycling of mercury: A Review. **Annu. Rev. Environ. Resour**, v. 34, p. 43-63, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SNEDDON, J.; FARAH, B. D.; FARAH, K. S. Multielement atomic absorption Spectrometry: A historical perspective. **Microchemical Journal**. v. 48, p. 318-325, 1993.

SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N L.; FERREIRA, S. L. C. Application of Box-Behnken design in the optimisation of an on-line pré-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 737-742, 2005.

SU, Y.; XU, K.; GAO, Y.; HOU, X. Determination of trace mercury in geological samples by direct slurry sampling cold vapor generation atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 191-195, 2008.

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

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure Appl. Chem**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TORRES, D. P.; BORGES, D. L. G.; FRESCURA, V. L.; CURTIUS, A. J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total Mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. **Journal of analytical atomic spectrometry**. v. 24, p. 1118-1122, 2009.

TORRES, D. P.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J. Slurry sampling for Arsenic determination in sediments by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n.4, p. 728 – 732, 2007.

TYSON, J. F.; SEGADE, S. R. Evaluation of two flow injection systems for mercury speciation analysis in fish tissue samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 18, p. 268-273, 2003.

UHLIG, A.; GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. O uso de carvão vegetal na indústria siderúrgica brasileira e o impacto sobre as mudanças climáticas. **Revista Brasileira de Energia**, v. 14, n. 2, p. 67-85, 2008.

UNTERLEIDER, C. E. A. **Otimização multivariada de um processo químico através do uso de projetos de experimentos**. Dissertação de mestrado, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

VIEIRA, D. R.; CASTRO, J. T.; LEMOS, V. A. Determination of lead and manganese in biological samples and sediment using slurry sampling and flame atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC international**, v. 94, p. 645 -649, 2011.

VIEIRA, M. A.; SAINT´PIERRE, T. D.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Determination of As, Hg, Se and Sn in sediment slurries by CVG ETV ICP-MS with trapping in an Ir treated graphite tube and calibration against aqueous standards. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 19, p. 297 – 300, 2004.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; de AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, Z. Z.; QIU, D. R.; TAO, G. Y.; YANG, P. Y. Research advance in slurry sample introduction for plasma emission spectrometry/mass spectrometry. **Spectroscopy and spectral analysis**, v. 26, p. 542 – 547, 2006.

WELZ, B. High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 381, p. 69-71, 2005.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-resolution continuum Source AAS**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3<sup>a</sup> ed. Weinheim, Germany: VCH, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental health criteria 118: Inorganic Mercury**, 1991.

XU, M.; YAN, R.; ZHENG, C.; QIAO, Y.; HAN, J.; SHENG, C. Status of trace emission in a coal combustion process: a review. **Fuel Processing Technology**, v.85, p. 215-237, 2003.

YALLOUZ, A.; CAMPOS, R. C.; LOUZADA, A. Níveis de mercúrio em atum sólido enlatado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2001.

ZAHIR, F.; RIZWI, S. J.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Low dose mercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 351-360, 2005.