

Rui Miguel de Carvalho Júnior

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de elementos traço em amostras de solo e plantas de girassol utilizando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química Analítica.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera L. A. Frescura Bascuñan

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carvalho Júnior, Rui Miguel

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de elementos traço em amostras de solo e plantas de girassol utilizando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado / Rui Miguel Carvalho Júnior ; orientadora, Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan - Florianópolis, SC, 2016.

97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

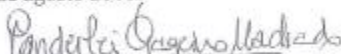
1. Química. 2. validação de método. 3. solos agrícolas. 4. elementos potencialmente tóxicos. I. Bascuñan, Vera Lúcia Azzolin Frescura. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Rui Miguel de Carvalho Júnior

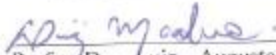
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE
SOLO E PLANTAS DE GIRASSOL UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE
MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO.


Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em
Química Analítica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Química.


Florianópolis, 01 de agosto 2016.

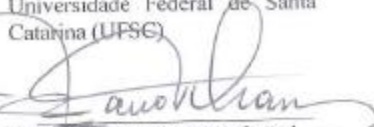

Prof., Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso


Banca Examinadora:


Prof., Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira
Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC)


Prof., Dr. Luis Otávio de Brito
Benetoli
Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC)


Prof., Dr. Maria Bertilia Oss
Giacomelli
Instituto Federal de Santa Catarina
(IFSC)


Prof., Dr. Marco Tadeu Grassi
Universidade Federal do Paraná
(UFPR)


Dr. Fernando Jorge Santos de
Oliveira
Petróleo Brasileiro S.A.
(PETROBRAS)


Prof., Dr.^a Vera Lúcia A. F. Bascunã
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dedico a execução deste trabalho especialmente ao meu filho, Caio Letty de Carvalho. A minha mãe Teresinha Koch, pai Rui Miguel de Carvalho e minha irmã Daniella Koch de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

A professora Vera L. A. Frescura Bascuñan pela orientação, paciência, amizade, confiança e exemplo de competência, seriedade, ética e humanidade.

Aos professores membros da comissão examinadora deste trabalho, pelas valiosas sugestões.

A amiga e professora Maria Bertília O. Giacomelli, por fazer parte do início da minha vida acadêmica transmitindo paciência, profissionalismo, ética e paixão pela ciência compartilhando comigo seus ensinamentos, e acima de tudo, emergindo em mim o profundo desejo para realização deste doutorado, a esta professora eu expresso meus elevados votos de gratidão, estima e consideração.

Ao saudoso professor Adilson J. Curtius (*in memoriam*), que além de uma inspiração foi uma pessoa fundamental para a escolha da realização deste doutorado e, que deixou muitas saudades e conhecimento.

Ao professor Eduardo S. Chaves, pelo exemplo de caráter, simplicidade e humildade em compartilhar seus ensinamentos e sua valiosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Tatiana Saint Pierre por sua amizade, colaboração e oportunidade em disponibilizar seu laboratório para realizar alguns estudos.

Ao Fernando Oliveira, pelos seus sábios conselhos, sua amizade, paciência, determinação e confiança transferidas a mim durante este período.

Aos amigos e professores que integram o laboratório de espectrometria atômica e de massas da UFSC, Juliano Carvalho, Graziela Salvador, Jessee Severo, Daiane Paula, Adriana Camera, Jefferson Santos, Jairo Fontana e os professores Daniel Borges e Tatiane Maranhão, deixo o meu simples, porém de coração, muito obrigado.

A todos os meus amigos do departamento de química da UFSC, em especial, ao Josias, Edinho, Vanessa Simão, Adriana Neves, vocês me propuseram alguns dos melhores momentos de descontração, sem vocês este período teria sido muito mais difícil.

Um agradecimento especial, a uma grande e, iluminada amiga que também fez parte desta caminhada, desde a época de mestrado na UFPR, minha

saudosa e querida Daisy Gomes (*in memoriam*), que também me proporcionou inúmeras risadas e momentos agradáveis, este trabalho contém sua alegria.

Agradeço especialmente a Mauana Schneider pela sua colaboração durante este trabalho, mas principalmente pela amizade, companheirismo e lealdade.

Ao Departamento de Química da UFSC, especialmente aos amigos Grace e Jadir da secretaria de Pós-Graduação, pelo pronto atendimento e ajuda durante esse período.

A CAPES pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço ao meu Poder Superior que eu chamo de Deus, pela minha existência e por todas as oportunidades a mim destinadas.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Resumo

Neste trabalho, foram desenvolvidas e validadas metodologias analíticas para a análise inorgânica de amostras de solos e girassol (*Helianthus annuus*), utilizando a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A metodologia proposta para a determinação de Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Sr, V e Zn em amostras de solos, utilizou a digestão ácida assistida por microondas na presença de 4 mL de HNO₃, 1 mL HCl, 1mL H₂O₂ e 0,5 mL HF. Após o preparo das amostras a linearidade do método, foi demonstrada para a faixa de trabalho entre 1 µg L⁻¹ a 500 µg L⁻¹ utilizando Rh como padrão interno. A linearidade foi comprovado por meio do coeficiente de correlação linear apresentando para todos os analitos valores maiores que 0,996; o teste *F* ainda evidenciou o ajuste linear do modelo matemático da curva de calibração e, o gráfico de resíduos, demonstrou a homocedasticidade dos valores obtidos nesta faixa de trabalho. A seletividade deste método foi comprovada pela comparação estatística utilizando o teste *t-pareado* dos valores obtidos entre o método proposto com o método U.S. EPA 3050b. Os valores do limite de quantificação (LQ) obtido estão entre 0,03 µg g⁻¹ para Cd e 24 µg g⁻¹ para Fe. A exatidão deste método foi avaliada por meio da quantificação de dois materiais de referência certificado (Soil-7 e BCR 142), sendo comprovada a igualdade estatística dos valores certificados e determinados pelo método proposto obtidos por meio do teste *t-student*. E a precisão deste método, sendo comprovada com a verificação dos valores do desvio padrão relativo sendo menor que 8% para n=3. A metodologia desenvolvida para determinação de As, Ba, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, V e Zn em girassol utilizou preparo das amostras com digestão ácida contendo 6 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂ com aquecimento assistido por microondas. A linearidade do método foi comprovada com os valores do coeficiente de correlação linear, sendo que, para todos os analitos os valores foram superiores a 0,996; o ajuste linear do modelo estatístico foi comprovado com os valores do teste *F* e a homocedasticidade dos valores obtidos foram confirmadas na faixa de trabalho pelo gráfico de resíduos. O limite de quantificação do método estabeleceu valores entre 0,15 µg g⁻¹ a 0,03 µg g⁻¹ para o Zn e Co, respectivamente. A exatidão foi comprovada pela quantificação do material de referência certificado CTA-OTL-1 de folha de tabaco o que

não demonstrou diferenças significativas quando aplicado o teste *t-student* comparando o valor certificado com o determinado, além deste teste a aplicação do teste de recuperação também demonstrou boa exatidão, sendo que as concentrações recuperadas ficaram entre 80 e 120 % para todos os analitos. A metodologia foi aplicada para determinação dos elementos potencialmente tóxicos em diferentes partes do girassol (raízes, sementes, caule e folhas), que demonstrou uma tendência no acúmulo de elementos inorgânicos específicos nas raízes e nas folhas do girassol quando a amostra de girassol foi cultivado em solos contaminados. Já, para as amostras de solos, foi possível identificar em latossolos maiores concentrações dos analitos Cd, Cu, Mn, Pb, Sr e Zn nos solos sob plantio direto quando comparado com amostras de vegetação nativa, além disso, maiores concentrações de Fe também foram encontradas quando comparadas com amostras de cambissolo. De uma maneira geral, as metodologias mostraram serem eficazes para o monitoramento da concentração dos elementos nas amostras de solo e em todas as partes das plantas.

Palavras-chave: validação de método, solos agrícolas, elementos potencialmente tóxicos.

Abstract

In this work an analytical methods for inorganic analysis of soil samples and sunflower samples (*Helianthus annuus*) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was developed. In the proposed methodology for determination of Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Sr, V and Zn in soil samples the procedure for sample treatment was carried out by microwave digestion in a medium using 4.0 mL of HNO₃, 1.0 mL HCl, 1.0 mL H₂O₂ and 0.5 mL of HF. The calibration curve concentrations ranged from 1 µg L⁻¹ up to 500 µg L⁻¹ and good linearity was achieved as confirmed by the correlation coefficient (r) with values better than 0.996 for all analytes. The determinations were carried out using Rh as internal standard. F test also confirmed the linear adjustment of the mathematical model of the calibration curve and the residue graph showed the homoscedasticity of the obtained values in the working range. In order to evaluate the selectivity of this method a comparison with an official method, U.S. EPA 3050B, was done through paired *t-test* of the obtained values in both procedures and the results presented good agreement. Limits of quantification (LOQ) for the method ranged between 0.03 µg g⁻¹ for Cd and 24 µg g⁻¹ for Fe. Accuracy evaluated through the application of the method to two certified reference materials (Soil-7 and BCR 142) provided values statistically equal to the certified values according to *t-student* test. Precision expressed as relative standard deviation of a set of measurements provided values lower than 8% for n=3. For the determination of As, Ba, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, V and Zn in sunflower the methodology included a microwave digestion procedure for the sample preparation using acid medium containing 6.0 mL of HNO₃ and 2.0 mL of H₂O₂. Good linearity was achieved as shown by the correlation coefficient (r) obtained for all analytes with values better than 0.996. Linear adjustment of the statistical model was assessed through *F-test* and the homoscedasticity of the obtained values was acceptable for the working range as confirmed by the residual analysis graphic. Limits of quantification (LOQ) of the method presented values ranging between 0.15 µg g⁻¹ 0.03 µgg⁻¹ for Zn and Co, respectively. Accuracy was confirmed through the quantification of the analytes in certified reference material CTA-OTL-1 (tabaco leaves) whose obtained values presented no significant differences with the certified values, according

to *t-student* test. Recovery tests were also carried out and good recoveries were obtained, between 80 and 120% for all analytes.

The methodology was applied to the determination of potentially toxic elements in different parts of sunflower plants (roots, seeds, stems and leaves) and the results show that there is a tendency of accumulation of specific inorganic elements in sunflower roots and leaves which were grown in contaminated soils. Higher concentration of Cd, Cu, Mn, Pb, Sr and Zn were found in no tillage soil samples when compared with native vegetation soil samples. Additionally, higher concentrations of Fe were found oxisols than in inceptisol samples. The methods developed in this work can be effectively used in monitoring the concentration of components in all parts of plant samples, such as sunflower, and in different types of soil.

Palavras-chave: method validation, agricultural soils, potentially toxic elements.

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Potenciais interferentes espectrais para alguns isótopos.^{46, 48} _____ 34
- Tabela 2.** Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA _____ 44
- Tabela 3.** Parâmetros instrumentais utilizados para as determinações por ICP-MS. _____ 44
- Tabela 4.** Programa de temperatura e volume dos reagentes utilizados para a digestão das amostras de solo e dos materiais de referência certificado. _____ 49
- Tabela 5.** Programa de Temperatura para a digestão das amostras de girassol. _____ 49
- Tabela 6.** Volumes dos reagentes utilizados na otimização, com as respectivas concentrações dos analitos. _____ 52
- Tabela 7.** Comparação entre LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) método proposto com a literatura. _____ 52
- Tabela 8.** Resultados da comparação dos métodos, desenvolvido neste estudo com o método U.S. EPA 3050 b. Os resultados estão acompanhados dos seus respectivos limite de confiabilidade para $n= 3$ e 95% de confiança. _____ 59
- Tabela 9.** Verificação da exatidão do método proposto com seus respectivos valores determinados e certificados. Os resultados estão acompanhados dos seus respectivos limite de confiabilidade para $n= 3$ e 95% de confiança _____ 60
- Tabela 10.** Parâmetros da curva analítica para faixa de trabalho entre $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $500 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando Rh como padrão interno. _____ 62

Tabela 11. Valores das concentrações dos analitos (mg kg⁻¹), para determinação de elementos nas amostras, com seus respectivos limites de confiança para $\mu = 95\%$ e $n = 3$ _____ 66

Tabela 12. Limite de detecção e limite de quantificação para o método proposto, com Rh como padrão interno _____ 62

Tabela 13. Valores da concentração para as amostras certificadas (Oriental Tobacco Leaves, CTA-OTL-1) com adição de Rh como padrão interno _____ 75

Tabela 14. Valores das concentrações dos analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$), para o estudo da adição/recuperação dos metais na amostra em diferentes pontos da curva de calibração _____ 76

Tabela 15. Resultados para o estudo da linearidade e da homocedasticidade da curva analítica utilizando Rh como padrão interno na faixa de trabalho de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para quantificação de metais nas amostras de girassol _____ 78

Lista de Figuras

- Figura 1.** Diagrama esquemático de um ICP-MS quadrupolar com alguns sistemas de introdução da amostra no plasma.(adaptado pelo autor) _____ 31
- Figura 2.** Diagrama esquemático da tocha (fonte HOUK, R. S. adaptado pelo autor)⁴³ _____ 32
- Figura 3.** Imagem dos cones; a) Cone amostrador, b) Skimmer. (fonte NELMS, S.M)³⁷ _____ 33
- Figura 4.** Otimização da vazão do gás nebulizador utilizando uma solução aquosa enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1100 W (fonte próprio autor) _____ 46
- Figura 5.** Otimização da razão de CeO/Ce em função da vazão do gás de nebulização, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1100 W. _____ 46
- Figura 6.** Otimização da razão de Ba⁺⁺/Ba em função da vazão do gás de nebulização, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1150 W. _____ 47
- Figura 7.** Otimização da potência da radiofrequência utilizando uma solução aquosa contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, mantendo-se a vazão do gás de nebulização em 1 Lmin^{-1} . (Fonte: próprio autor). _____ 48
- Figura 8.** Resultado dos ensaios para determinar a necessidade de macerar e peneirar os solos, com seus respectivos RSD's (%). (Fonte: próprio autor). _____ 54
- Figura 9.** Verificação da exatidão do método: resultados da análise da amostra IAEA Soil-7, com seus respectivos limite de confiabilidade para $n= 3$ e 95% de confiança. Al, Fe e Mg em mg g^{-1} .(Fonte: próprio autor) _____ 55
- Figura 10.** Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica empregando a análise de resíduos. (Fonte: próprio autor). _____ 63

Figura 11. Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica empregando a análise de resíduos. (Fonte: próprio autor). _____ 64

Figura 12. Resultados para amostras de solo Latossolo, média \pm desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em peso seco. Barras ■ NV e ■ NT, com diferentes letras mostram diferença significativa). * Concentração de Al, Mg, Fe e em mg g^{-1} . (Fonte: próprio autor). _____ 69

Figura 13. Resultados para amostras de solo Inceptisol, média \pm desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em peso seco. Barras ■ NV e ■ NT com diferentes letras mostram diferença significativa. * Concentração de Al, Mg, Fe e em mg g^{-1} . (Fonte: próprio autor). _____ 70

Figura 14. Amostra de girassol subdividida em: a) folha; b) raiz; c) caule, f) semente. (Fonte: próprio autor) _____ 72

Figura 15. Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica para quantificação de girassol empregando a análise de resíduos. (Fonte: próprio autor). (Fonte: próprio autor). _____ 78

Figura 16. Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica para quantificação de girassol empregando a análise de resíduos. (Continuação) (Fonte: próprio autor). _____ 79

Figura 17. Valores das concentrações dos analitos (mg kg^{-1}), para determinação de elementos nas amostras de girassol comercial, com seus respectivos limites de confiabilidade para $\mu = 95\%$ e $n = 3$. ____ 81

LISTA DE ABREVIATURAS

XRF: Espectrometria de fluorescência de raios-X (*X-ray fluorescence spectrometry*)

NAA: Análise por ativação de nêutrons (*neutron activation analysis*)

AAS: Espectrometria de absorção atômica (*Atomic Absorption Spectrometry*)

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)

ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ET AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (*Electrothermal atomic absorption spectrometry*)

ETV: Vaporização Eletrotérmica (*electrothermal Vaporization*)

LA: Ablação a laser (*Laser Ablation*)

U.S. EPA: United State Environmental Protection Agency

ICP: Plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma*)

ISO: International Organization of Standardization

IEC: International Electrotechnical Commission

Eurachem: European analytical chemistry

CQI: Controle de qualidade interno

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

WELAC: Western European Laboratory Accreditation Cooperation

ICH: International Conference on Harmonisation

LOD: limite de detecção (*Limit of Detection*)

LOQ: limite de quantificação (*Limit of Quantification*)

USP: United states pharmacopeia

RSD: Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

CRM: Certified Reference Materials

CONAMA: Conselho nacional do meio ambiente

NT: Plantio direto (*no tillage*)

NV: mata nativa (*native vegetation*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. ELEMENTOS TRAÇO EM SOLOS E PLANTAS	25
2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM SOLOS E PLANTAS	28
2.2.1 <i>ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)</i>	30
2.3. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	35
2.3.1. <i>SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE</i>	38
2.3.2 <i>FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE</i>	40
2.3.3 <i>LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO</i>	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. INSTRUMENTAÇÃO	44
4.1 ESPECTRÔMETRO DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)	44
4.2 OTIMIZAÇÕES INSTRUMENTAIS	44
4.3 SISTEMA DE AQUECIMENTO ASSISTIDO POR MICROONDAS	48
5. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM SOLOS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÕES	50
5.1 METODOLOGIA	50
5.1.2 <i>MATERIAIS E REAGENTES</i>	50
5.2 RESULTADOS	51
5.2.1 <i>PREPARO DAS AMOSTRAS</i>	51
5.2.2 <i>VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE METAIS EM SOLO USANDO ICP-MS</i>	56
5.2.3 <i>PARÂMETROS DE MÉRITO</i>	56
5.2.4 <i>SELETIVIDADE</i>	57

5.2.5 <i>EXATIDÃO</i>	59
5.2.6 <i>FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE</i>	61
5.2.7 <i>APLICAÇÕES ANALÍTICAS</i>	65
5.2.8. <i>APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA EM AMOSTRAS DE SOLO AGRÍCOLA</i>	67
6. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM PLANTAS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÕES.	71
6.1 <i>METODOLOGIA</i>	71
6.1.2 <i>MATERIAIS E REAGENTES</i>	71
6.1.3 <i>PREPARO DAS AMOSTRAS</i>	71
6.2 <i>RESULTADOS</i>	73
6.2.2 <i>VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE METAIS EM GIRASSOL (HELIANTHUS ANNUUS) USANDO ICP-MS</i>	73
6.2.3 <i>LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO</i>	73
6.2.4 <i>EXATIDÃO</i>	74
6.2.5 <i>FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE</i>	77
6.3 <i>APLICAÇÕES ANALÍTICAS</i>	80
7. CONCLUSÕES	83
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

A química analítica apresenta-se com grande importância para os diferentes setores na ciência, tecnologia, sociedade e do meio ambiente. Todas as áreas necessitam do auxílio desta ciência para o desenvolvimento dos seus estudos. É indubitável a importância e a natureza interdisciplinar da química analítica, a importância da química é tanta que a própria família real ao chegar ao Brasil solicitou aulas de química em 1811 na Academia Real Militar de Artilharia, Fortificação e Desenho.¹

Pode-se afirmar que a química começou no Brasil, neste mesmo período, com a criação do Laboratório Químico Prático do Rio de Janeiro (1812 - 1819), cujo propósito era o desenvolvimento de pesquisas químicas com finalidade comercial. Desde esta época torna-se evidente a importância da química analítica, já que o interesse do laboratório criado era analisar o pau brasil (*Caesalpinia echinata*) que os portugueses desejavam comercializar com a China.² Estes interesses comerciais perfazem até os dias atuais exigindo dos cientistas desta área uma busca incansável pelo desenvolvimento de novos métodos analíticos a cada dia.

Atualmente, os resultados gerados nos laboratórios de química analítica são adotados como base para decisões nos diferentes setores da indústria, da saúde, meio ambiente, entre outros. Com base nestes resultados, aceitam-se ou rejeitam-se matérias primas, diferencia-se desempenho de fornecedores, processos produtivos são modificados e, atua-se sobre a saúde das pessoas, dos animais e do meio ambiente.³

A princípio, a química analítica deve envolver um problema, que poderá ser solucionado analisando-se uma ou mais amostras por um método apropriado, ou melhor, por um método devidamente validado em função dos objetivos desejados.⁴ Um desafio desta atualidade é a quantificação de metais e metalóides em solos, isto porque estes elementos são constituintes naturais da morfologia dos solos ou, ainda, são inseridos por atividades antropogênicas ao meio ambiente podendo acarretar em danos ao habitat animal a saúde vegetal e humana.

Algumas das atividades antropogênicas incluem a mineração e fundição de metais, a queima de combustíveis fósseis, o uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura, a produção de baterias, depósitos irregulares de rejeitos industriais e a eliminação de resíduos urbanos, levando a introdução de elementos potencialmente tóxicos ao solo.⁵ Os solos contaminados por metais afetam os processos fisiológicos e

bioquímicos do desenvolvimento das plantas. ⁶ Portanto, o verdadeiro conhecimento da concentração desses metais nos solos e nas plantas não pode ser negligenciado.

Os compostos inorgânicos, que estão disponíveis para a absorção pelas plantas são aqueles constituintes solúveis presentes na solução do solo ou aqueles que são facilmente solubilizados pelos exsudatos. ⁷ Embora as plantas requerem certos nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento, quantidades excessivas destes elementos podem tornar-se tóxico para as plantas.

Alguns dos efeitos negativos para as plantas causados pela alta concentração de elementos potencialmente tóxicos em solos incluem a inibição de enzimas citoplasmáticas e danos às estruturas celulares devidas ao stress oxidativo. ⁸ Um exemplo do efeito tóxico indireto, é a substituição dos nutrientes essenciais pela troca catiônica das plantas. ⁹ Além disso, alguns metais têm influência negativa sobre o crescimento das atividades dos microrganismos do solo que também afetam negativamente o crescimento das plantas. ¹⁰ Por isso, devemos ter a confiança dos métodos de análise química em solos e plantas para conduzir as medidas corretivas e tomadas de decisões adequadas. Isto, porque, dados analíticos não confiáveis podem conduzir decisões desastrosas e prejuízos irreparáveis.

Neste sentido, a validação de um método de análise química é uma característica importante, pois está intimamente relacionado com a qualidade dos resultados. Estes valores de desempenho e os limites para confiabilidade devem estar em conformidade com os requisitos definidos pelo método de análise à que se dispõe.

Conforme o pressuposto, esta Tese situa-se como uma base de estudos iniciais para o grupo de pesquisa onde ela foi desenvolvida. A tese foi dividida no desenvolvimento e na validação para determinação de metais traço em solos e em plantas de girassol, avaliando estatisticamente os parâmetros necessários para a validação química e aplicações analíticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Elementos traço em solos e plantas

A presença de metais e metalóides em solos podem ter origem natural ou antropogênica, porém a permanência destes elementos no solo podem ter um tempo indefinido e, dessa forma, causar perigo à saúde humana ou animal, já que poderão entrar na cadeia alimentar. Entre estes, deve-se ressaltar que alguns são essenciais às plantas (Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn), às bactérias fixadoras de nitrogênio (Co) e aos animais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn), no entanto, o Pb, Cd, Hg não são essenciais e são potencialmente tóxicos. Embora a solubilidade dos metais dependa da forma em que se encontram no solo, o pH é uma das características do solo que mais afeta a solubilidade destes. Um exemplo disso, é quando o pH aumenta e a solubilidade do Cd, Cu, Hg, Ni e Zn diminui, isto porque altera a carga do ligante complexante afetando a concentração do metal livre.¹⁰

A distribuição e a adsorção dos metais no solo dependem de sua solubilidade e da formação de complexos solúveis com a matéria orgânica. De maneira geral, o Co segue o modelo de distribuição da matéria orgânica e dos minerais da argila. O Cu permanece por longo período de tempo no solo, uma vez que são fortemente fixados pela matéria orgânica, óxidos de Fe, Al e Mn e pelos minerais de argila, sendo um dos menos móveis entre os metais. O Cd também é relativamente imóvel no perfil do solo, assim como o Pb que tende a se acumular nas camadas superficiais.¹⁰

O conteúdo total de metais e metalóides no solo é, em regra, um indicador não eficiente da contaminação dos mesmos e da sua toxicidade para as plantas, já que raras vezes esses dados são correlacionados com a sua concentração nos tecidos das plantas.¹¹ Mas torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de métodos para a determinação quantitativa destes elementos em amostras de solos, uma vez que é de extrema importância o conhecimento do conteúdo total dos elementos químicos neste tipo de matriz.

A concentração dos elementos químicos nas plantas depende da disponibilidade destes no solo e da capacidade que as plantas têm para absorver e transferir os mesmos para as suas diferentes partes.¹²

Embora a composição química das plantas seja regulada pela seleção biológica dos elementos, os mecanismos de absorção podem ser

limitados para cada elemento, evitando principalmente aqueles que não parecem desempenhar uma função específica no interior das plantas. De fato, a absorção destes elementos pelas plantas não está diretamente relacionada com a sua concentração total no solo, mas depende da fração disponível dos mesmos e, entre outros fatores, do teor de nutrientes, da disponibilidade de água no solo, da área explorada pela rizosfera e da atividade microbiana do solo.¹²

O conhecimento da composição elementar das plantas é importante para uma variedade de domínios científicos, ou seja, fisiologia vegetal, agricultura, monitoramento ambiental e, a genética das espécies. Nesse aspecto, recentemente uma nova área científica vem sendo discutida, a *ionômica*, que estuda a composição mineral de oligoelementos nos organismos, em combinação com as respectivas modificações no genoma.¹³

O cobre é conhecido como um elemento essencial para o crescimento das plantas, exercendo funções vitais, como na síntese de proteínas, no metabolismo de carboidratos e na fixação de N₂.¹¹ No entanto, concentrações desse elemento entre 20 e 100 mg kg⁻¹ na matéria seca da parte aérea são consideradas tóxicas para um grande número de espécies.¹²

A toxidez de Cu nas raízes de espécies arbóreas manifesta-se pela ausência de formação de raízes secundárias e do escurecimento das mesmas, que se tornam mais finas e quebradiças, atribuindo-se essa resposta típica a danos nas extremidades das raízes que podem reduzir a capacidade da planta de se fixar no substrato e de absorver nutrientes.¹⁴

O bário é amplamente utilizado nos dias atuais, podemos encontrá-lo na fabricação de ligas com alumínio, vidro, cimento e cerâmica. Além disso, o bário é utilizado na eletrônica, exames médicos (radiografia), produtos farmacêuticos, química fina, aditivo em óleo lubrificante, refinamento de açúcar, revestimento de papel e, ainda, como pigmento em tintas.¹⁵

Como evidenciado, o Ba é encontrado em muitos insumos da vida moderna, e por isto, podemos verificar a presença dele no meio ambiente. O aumento da concentração de bário foi detectado em plantas cultivadas em locais de eliminação de resíduos e em áreas urbanas. Tendo em vista que o Ba está presente na gasolina, foi encontrado uma relação altamente significativa entre o chumbo e o bário em folhas de espécies de *Quercus ilex* (também conhecida por azinheira ou azina) e, assim, o Ba foi sugerido como um marcador valioso para as emissões de veículos.¹⁶

A toxicidade do Ba também foi estudada em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e, assim, descobriram que a presença do bário mesmo em concentrações suportáveis pela espécie não afetavam o crescimento das plantas, porém, indicando um efeito negativo sobre as concentrações de potássio no tecido foliar.¹⁷ Além disto, o Ba interagiu com o sulfato de cálcio na nutrição da planta.

Apesar de concentrações relativamente elevadas em solos, somente uma quantidade limitada de bário é assimilada pelas plantas. Assim, na maioria dos alimentos a concentração de bário é relativamente baixa ($< 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) e um pouco mais elevada nos produtos à base de cereais, com concentrações cerca de 1 mg kg^{-1} .¹⁷

O molibdênio é um nutriente essencial para plantas e animais.¹⁸ No que se refere às plantas, microrganismos reduzem as espécies de nitrato de molibdênio para nitrito e assim auxiliam na fixação biológica de nitrogênio.¹⁹

Já no que tange os seres humanos, a deficiência de Mo pode levar a distúrbios genéticos²⁰ e, ainda, pode substituir a ação do tungstênio em várias enzimas humanas.²¹ A toxicidade do Mo está intrinsecamente ligada às interações com cobre e enxofre. No mesmo sentido, as manifestações ocasionadas pelo envenenamento por Mo estão associados com a deficiência de cobre, mas nem todos os sintomas clínicos são suavizados com a suplementação de cobre.²²

Além da contaminação antropogênica, muitos elementos entram no ecossistema através da própria ação da natureza. O arsênio, muito além do Mo, está entre os elementos mais nocivos à saúde humana, como o mercúrio, o chumbo e o cádmio. Em concentrações elevadas, podem provocar vários tipos de cânceres, como o de pele, pâncreas e pulmão, além de abalos ao sistema nervoso, malformação neurológica e abortos.²³

A presença de compostos de arsênio no solo também pode ser devido a práticas agrícolas. Por cerca de cem anos, compostos arsenicais inorgânicos (trióxido de arsênio, ácido arsênico, arsenatos de cobre) têm sido amplamente utilizados em pigmentos, pesticidas, insecticidas, herbicidas e fungicidas. Neste sentido, devido a sua periculosidade, atualmente não é mais utilizado nas práticas agrícolas dos países ocidentais, mas a persistência dos resíduos de arsênio em solos é uma questão ambiental e em alguns casos fazem parte como ocorrência natural de alguns tipos de solos em baixa concentração.²⁴

A preocupação com os níveis de elementos no solo justifica-se por ser a principal fonte de oligoelementos para as plantas, tanto micronutrientes como poluentes.²⁵

Por sua vez, o As inorgânico é tóxico para as plantas, levando à inibição da absorção de fosfato. Isto pode ser explicado pela semelhança química entre os íons arsenato e fosfato, o que permite uma absorção de arsenato pelas plantas, que, em seguida, inibe a absorção de fosfato.²⁶ Seguindo assim, podemos dizer que uma elevada concentração de As nos solos poderá reduzir o rendimento do plantio, uma vez que inibe o crescimento das plantas, podendo ser letal sob condições severas.²⁴

2.2. Métodos analíticos para determinação de elementos traço em solos e plantas

Vários métodos têm sido propostos para a determinação elementar em amostras ambientais, utilizando diferentes técnicas analíticas, entre elas a fluorescência atômica (AFS), espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF), análise por ativação de nêutrons (NAA), espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS).²⁵ No entanto, a técnica de ICP-MS é uma das mais amplamente utilizadas, isto porque alia à capacidade multi-elementar com a alta sensibilidade, além de apresentar uma ampla faixa dinâmica de análise, capacidade de informações isotópicas e, ainda, a possibilidade do uso com outros dispositivos para a introdução da amostra, por exemplo, vaporização eletrotérmica (ETV) e ablação a laser (LA).²⁶

Considerando a análise elementar de amostras de solo e sedimento por AAS, ICPOES e ICP-MS, normalmente, é necessária uma digestão completa da amostra para análise.^{27,28,29} O processo de digestão do solo e sedimento é realizada principalmente por fusão alcalina,³⁰ por digestão ácida utilizando ácidos minerais e aquecimento com bloco digestor,³¹ ou assistida por microondas.³² Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) publicou os métodos EPA 3050, 3051, 3051^a e 3052 para a digestão ácida de solos, sedimentos e amostras de lodo para análise de metais utilizando as técnicas AAS, ICP OES e ICP-MS.³³

A maioria dos métodos da U.S. EPA não são capazes de promover a decomposição completa da amostra, apenas o método U.S. EPA 3052 com aquecimento assistido por microondas na presença de ácido fluorídrico (HF) permite uma digestão total da amostra. No entanto, uma elevada quantidade de reagentes químicos é necessário, de

acordo com este método, uma mistura de 4mL de ácido clorídrico (HCl), 9mL de ácido nítrico (HNO₃) e 3mL de HF são necessários para a decomposição total da amostra.

Já o método 3050, é um método muito oneroso, pode levar a perda do analito ou mesmo a contaminação da amostra, este método utiliza sistema de digestão com bloco digestor, tempo de 5 h e aproximadamente 25 mL de reagente. O método 3051 por sua vez, utiliza a digestão assistida por microondas, no entanto, o elevado consumo de reagente deste método prejudica o limite de detecção, além de ser contraditório aos conceitos da química verde.¹¹

No entanto, conforme descrito por Roje, que testou métodos de digestão usando duas etapas, uma etapa prévia usando 10 mL de HNO₃ a temperatura ambiente antes da utilização dos ácidos para digestão assistida por microondas e quantificação por SF-ICP-MS. A mistura de reagentes usados na segunda etapa foram HNO₃/HCl (9:1; v/v); HCl/HNO₃ (3:1; v/v); HNO₃/HCl/HF (8:1:1; v/v). Entre os reagentes selecionados para a digestão das amostras de sedimento, a água régia (HNO₃/HCl, 1: 3 v/v) foi encontrada como a forma de digestão mais favorável para quantificação do teor de metal e metalóides nessa matriz, no entanto o elevado consumo de reagentes usados por Roje e colaboradores não permite a obtenção de baixos valores para o limite de quantificação dos analitos testados.³⁴

Deve-se enfatizar a necessidade de HF para dissolução de amostras contendo silicatos, como solos e sedimentos, para a digestão completa da matriz. Porém, HF favorece a precipitação de alguns fluoretos, como fluoretos de Al⁺³, Ca⁺², Fe⁺³ e Mg⁺². Nogueira e colaboradores testaram 3 procedimentos de preparo de amostra para quantificação inorgânica de solos (dois deles sendo os métodos U.S. EPA 3051 e 3052), e também desenvolveram um método contendo HF que utiliza por fim H₃BO₃ para a complexação dos fluoretos remanescentes e posterior quantificação por ICP OES. Embora o método descrito pelos colaboradores utilizou apenas um ciclo de digestão assistida por microondas, foi necessário uma etapa para centrifugação, o que elevou o tempo de preparo de amostra.³⁵

Outra metodologia amplamente utilizada para o preparo das amostras de solos é descrito por Tedesco onde a intenção maior é avaliar as frações biodisponíveis para as plantas e não solúveis dos elementos majoritários nos solos.³⁶ Sendo as plantas o destino final destes elementos potencialmente tóxicos, ou ainda, atuando estes elementos como nutrientes em alguns casos.

Neste sentido, os métodos oficiais descritos na literatura para análise de metais e metalóides em plantas são apresentados pela AOAC, dando ênfase para os métodos AOAC 953.3; 951.01; 941.03 e o 985.01. Os métodos mencionados são onerosos e quase todos utilizam técnicas colorimétricas para quantificação e, assim, não conseguindo atingir baixo limite de quantificação, importante parâmetro analítico quando deseja-se uma determinada investigação ambiental. A exceção é o método 985.01 que utiliza a técnica de ICP OES para determinação.

Goodman e colaboradores, propuseram um método em seu estudo de caso para investigação da contaminação de metais em plantas que usou uma composição perigosa de reagentes, por ser explosiva, sendo 20 mL da mistura de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ (5:1:1 v/v/v). Como mencionado, além de perigosa e agressiva ao meio ambiente esta composição usou elevado volume de reagentes.³⁷

Assim, o desenvolvimento de novas metodologias que além de promover resultados precisos e exatos, que busquem a redução do volume de reagentes utilizados na etapa de digestão da amostra possam colaborar para que se obtenham baixos limites de quantificação dos métodos, além disso, preparo de amostra mais simples e rápidos também são objetivados. Sendo assim, promover a diminuição dos riscos potenciais de contaminação ao meio ambiente com a redução de reagentes tóxicos vem a contribuir para a química verde, além de outros benefícios econômicos.

2.2.1 *Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)*

A espectrometria de massa (Mass Spectrometry - MS) é uma técnica analítica instrumental que permite separar espécies iônicas pela razão entre a massa e a carga (m/z) de cada isótopo. A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) teve seu início em meados de 1970. No entanto, o marco introdutório para o desenvolvimento e o entendimento da utilização do plasma como uma fonte de íons para a MS foi datado na década de 80.²⁶

A técnica analítica de ICP-MS é usada para análise isotópica que combina a notável característica de um plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma - ICP*) para atomizar e ionizar as amostras, com a sensibilidade e seletividade da espectrometria de massa.

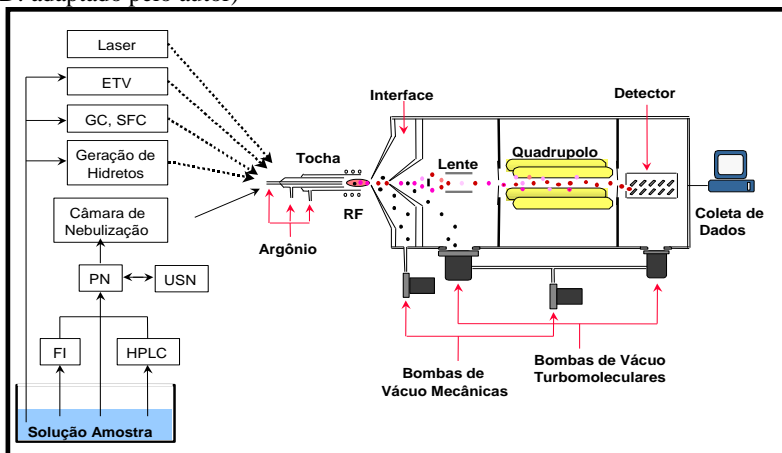
Esta técnica tem sido muito empregada para análises de plantas, solos, amostras biológicas, geológicas e de alimentos.^{38,39,40}

Além destas características e aliadas à capacidade de análise sequencial rápida do ICP-MS com sistema de separação de massas quadrupolar, torna-se vantajosa a sua utilização para análise de elementos traço. Ainda como bônus, apresenta a solução para muitos problemas encontrados na análise de elementos metálicos, isto é, as dificuldades para determinar elementos formadores de óxidos e carbetos em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS).⁴¹

A grande maioria dos equipamentos de ICP-MS são constituídos por cinco partes principais, como pode ser observado na Figura 1, um sistema de introdução de amostra, uma fonte de íons, a interface, o analisador de massas (opcionalmente podendo conter dois analisadores de massa) e o detector. Acrescido, ainda, um sistema de alto vácuo e um sistema de registro e processamento dos dados.

As amostras são geralmente aspiradas sob a forma de solução líquida e introduzidas no plasma como um fino aerossol previamente formado na câmara de nebulização. Este aerossol por intermédio do injetor é introduzido na tocha onde é formado o plasma, carregado pelo fluxo de gás (normalmente argônio).

Figura 1. Diagrama esquemático de um ICP-MS quadrupolar com alguns sistemas de introdução da amostra no plasma. (Fonte: SAINT'PIERRE, Tatiana D. adaptado pelo autor)⁴²

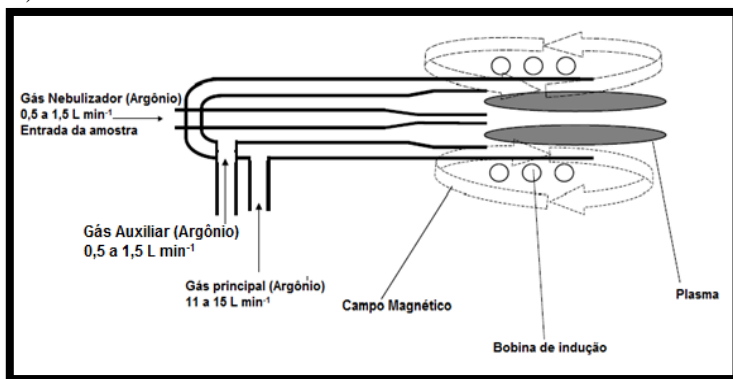


O plasma consiste de uma descarga sem eletrodos, em um gás à pressão atmosférica, o qual é mantido pela energia fornecida por uma fonte de radiofrequência de aproximadamente 27 ou 40 MHz, que induz um campo magnético oscilante em uma bobina de cobre. O ICP é uma fonte energética destrutiva e, possui a função de ionizar a amostra, isto é, é a fonte de íons.

O ICP forma-se numa tocha de quartzo, conforme Figura 2, cujo extremo é centralizado no interior de uma bobina de indução eletromagnética. A tocha é constituída por três tubos concêntricos com entradas independentes de gás em cada seção anelar.

O gás nebulizador é usado para transportar a amostra na forma de aerossol, este cria um canal axial de menor temperatura no centro do plasma, no entanto, ele não compõe o plasma. Já o gás principal é responsável pela geração do plasma e, na seção intermediária encontra-se o gás auxiliar, este conduz o plasma para fora da tocha e, ainda, funciona como uma proteção para as paredes do tubo injetor.⁴³

Figura 2. Diagrama esquemático da tocha (fonte HOUK, R. S. adaptado pelo autor)⁴³



Após a introdução da amostra líquida, a formação do aerossol e a geração das espécies iônicas no plasma, os íons produzidos são amostrados e direcionados para o espectrômetro de massa através de uma interface, que se encontra sobre uma região de vácuo na ordem de 10^{-3} atm, a amostragem e o transporte dos íons é feito pela diferença de pressão, uma vez que a região do plasma encontra-se à pressão atmosférica.⁴⁴

O feixe iônico é extraído na interface através do orifício do cone amostrador (Figura 3 a), nessa região, grande parte das partículas

neutras e carregadas negativamente, e também parte dos íons positivos são eliminados do sistema pelas bombas de vácuo mecânica e turbo moleculares. Os íons positivos são extraídos para a região de alto vácuo do quadrupolo através do orifício central do cone skimmer (Figura 3 b) onde na seqüência o feixe iônico é colimado por uma lente iônica e direcionado para o analisador de massa neste caso um quadrupolo.

Quando uma determinada corrente direta (DC) e um campo oscilante em radiofrequência (RF) são aplicados sobre o quadrupolo o par positivo e negativo de hastes do sistema conduz o íon de interesse de uma extremidade até a outra do quadrupolo. Os critérios de desempenho do quadrupolo são resolução e sensibilidade de abundância. Os íons de diferentes m/z passam entre as hastes ou se chocam com elas e são ejetados para fora do quadrupolo e finalmente os íons são direcionados para o detector.⁴⁴

Os detectores recebem os íons provenientes do analisador de massas e os converte em pulsos elétricos. Um detector adequado deve apresentar elevada sensibilidade; larga faixa linear; pequeno tempo de resposta e sinal de fundo baixo. Atualmente existem alguns sistemas de detecção, os convencionais são, os multiplicadores de elétrons secundários, multiplicadores de elétrons em canal, copos de Faraday e outros.⁴³

Figura 3. Imagem dos cones; a) Cone amostrador, b) Skimmer. (fonte NELMS, S.M)²⁶



Como qualquer técnica analítica sensível, o ICP-MS apresenta algumas limitações, como interferências espectrais e não espectrais. Estas interferências podem ser devido à sobreposição de isótopos dos elementos, da presença de concomitantes na solução da amostra ou, ainda, na formação de íons poliatômicos. Por exemplo, o uso do argônio como gás formador do plasma gera interferência isobárica na massa 40, por óxidos ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$) e por íons poliatômicos ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$). Com isto, há sobreposição com os isótopos principais dos elementos ^{40}Ca , ^{56}Fe , ^{52}Cr , ^{75}As , e ^{80}Se , entre outros, que o

separador de massas do tipo quadrupolo do ICP-MS não consegue resolver.⁴⁵ A escolha de um isótopo com menor interferência, bem como a utilização das equações de correção para os elementos podem, as vezes, reduzir ou eliminar as interferências.

Neste mesmo sentido, com a introdução da tecnologia da célula de reação/colisão (*Dynamic reaction cell – DRC*), novas possibilidades para a determinação dos elementos por ICP-MS têm sido demonstrados, uma vez que o DRC permite reduzir determinados interferentes.⁴⁵ Desta forma pode-se dizer que o melhor modo de evitar as interferências é a remoção dos possíveis interferentes, o que nem sempre é possível. Porém, o sinal da espécie interferente pode ser facilmente separado do sinal analítico, através de equipamentos de alta resolução.

Estudos de interferentes em ICP-MS resultaram em inúmeras estratégias para reduzir o seu impacto, estas estratégias incluem o resfriamento do plasma,⁴⁵ uso de células de colisão e reação,⁴⁶ correções por equações matemáticas,⁴⁷ e analisadores de massa de alta resolução.⁴⁸

A Tabela 1 apresenta os isótopos de alguns elementos e algumas de suas potenciais interferências espectrais em ICP-MS.

Tabela 1. Potenciais interferentes espectrais para alguns isótopos.^{46, 48}

Isótopo	Potenciais interferentes
²⁷ Al	¹¹ B ¹⁶ O, ⁹ Be ¹⁸ O, ⁵⁴ Fe ⁺² , ¹² C ¹⁵ N, ¹³ C ¹⁴ N
¹⁰⁷ Ag	⁹¹ Zr ¹⁶ O, ⁸⁹ Y ¹⁸ O
⁷⁵ As	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl, Sm ⁺²
¹³⁸ Ba	¹²² Sn ¹⁶ O, ¹²² Te ¹⁶ O, ¹³⁸ Ce, ¹³⁸ La
¹¹⁴ Cd	⁹⁸ Mo ¹⁶ O, ¹¹⁴ Sn
⁵⁹ Co	⁴² Ca ¹⁶ OH, ⁴³ Ca ¹⁶ O, ¹¹⁸ Sn ⁺²
⁶³ Cu	³¹ P ¹⁶ O ₂
⁵² Cr	⁴⁰ Cr ¹² C, ³⁶ Ar ¹⁶ O, ³⁸ Ar ¹⁴ N, ³⁵ Cl ¹⁷ O, ³⁷ Cl ¹⁵ N, ³⁵ Cl ¹⁶ OH,
⁹⁸ Mo	⁸¹ Br ¹⁷ O, ⁸¹ Br ¹⁶ OH
⁶⁰ Ni	⁴⁴ Ca ¹⁶ O, ²³ Na ³⁷ Cl, ³⁶ Ar ²⁴ Mg, ¹²⁰ Sn ²⁺
⁵¹ V	³⁵ Cl ¹⁶ O
⁶⁶ Zn	Ba ⁺² , ³² S ¹⁷ O ₂
⁹⁰ Zr	⁷⁴ Ge ¹⁶ O

2.3. Validação de metodologias analíticas

Existem muitas controvérsias em relação à terminologia empregada nos sistemas de gestão da qualidade para laboratórios, um exemplo disto é, em relação aos termos validação e qualificação, quando se refere a um método ou técnica analítica.

Tem sido observado na comunidade científica que diferentes pesquisadores adotam termos diferentes para as mesmas coisas, e os mesmos termos para coisas diferentes. Neste sentido, a palavra qualificação refere-se ao instrumento, que pode ser por um módulo individual, ou por um sistema, por exemplo, em ICP-MS, a câmara de nebulização, a lente iônica ou a ação do quadrupolo, ou ainda, o sistema de introdução da amostra (líquida ou sólida). Checando estes compartimentos com resultados previamente especificados (geralmente por meio de uma recomendação do fabricante) deve ser um exemplo de qualificação.

Já o termo validação, refere-se à aplicação, o processo e o método. Por exemplo, para validação do método é especificado o limite de detecção ou quantificação do analito na amostra, exatidão, linearidade, seletividade dentre outros parâmetros. Tais especificações podem somente ser verificadas com um sistema qualificado.⁴⁹

Segundo a Norma NBR ISO/IEC 17025, validação é a confirmação, por meio de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos.^{50,51} A validação de um método analítico deve ser adaptada caso a caso, sendo progressivamente mais exigente para as seguintes situações:

- Extensões e/ou modificações de métodos normalizados;
- Métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização prevista;
- Métodos Não Normalizados;
- Métodos criados e desenvolvidos pelo próprio laboratório.

O termo validar também apresenta algumas variações conceituais, segundo Eurachem, validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método em investigação tem desempenho consistente com o que a aplicação requer.⁵² Já para o Horwitz, validar é o processo na qual se verifica ou demonstra-se a certeza ou correção de um método analítico.⁵³ Já o Inmetro de acordo com o vocabulário ISO/IEC 17025 (*International Standards Organization*) estabelece que é fundamental a confirmação por testes e

apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional e, ainda que, por meio da validação, os métodos de ensaio executem e conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.^{54,55}

Este propósito analítico reflete a obtenção de resultados com um aceitável padrão de precisão e exatidão. Para a acreditação de um método analítico, o resultado deve sempre ser acompanhado de uma declaração de incerteza, o que determina a interpretação do resultado, em outras palavras, a interpretação e a utilização de qualquer medição dependem totalmente da incerteza (em um nível de confiança) associado a ele.⁵⁰

A IUPAC (União Internacional da química pura e aplicada) declara a necessidade de que os métodos analíticos sejam confiáveis e, que, além disso, estejam em conformidade com as regulamentações nacionais e internacionais.⁵⁶ Os métodos analíticos, portanto, devem ser reconhecidos internacionalmente e o laboratório tem que tomar medidas adequadas para garantir a capacidade em fornecer os dados com a qualidade exigida. Tais medidas incluem:

- utilização de métodos de análise validados;
- utilização de procedimentos de controle de qualidade internos;
- participação em programas de ensaios de proficiência;
- tornar-se credenciado a um padrão internacional, normalmente

ISO / IEC 17025.

O credenciamento, recentemente chamado de acreditação a ISO/IEC 17025 trata especificamente da criação da rastreabilidade para as medições, bem como, a exigência de uma série de outros requisitos técnicos e de gestão da qualidade, incluindo os itens supracitados.⁵⁰

A validação do método é, portanto, um componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar para permitir que a apresentação de dados analíticos sejam confiáveis. A validação "completa" de um método analítico é geralmente adotada como característica de uma análise, este procedimento é conhecido como desempenho interlaboratorial do método (também conhecido como um estudo colaborativo ou ensaio colaborativo).⁵² Internacionalmente foram estabelecidos protocolos para a validação "completa" de um método de análise para um ensaio colaborativo.

O guia 43 Parte-1 da ABNT ISO/IEC faz distinção entre o uso de comparações interlaboratoriais para ensaios de proficiência para a determinação do desempenho do laboratório, e para outros propósitos tais como: estabelecer a eficácia e a comparabilidade de novos métodos de ensaio ou de medição, acompanhar métodos estabelecidos e

determinar as características de desempenho de um método, geralmente conhecidos como estudos colaborativos.

A validação de um método pode ser dividida em duas partes e/ou etapas. A primeira, chamado de *validação no laboratório* (“*in house validation*”), consiste em validar um método desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação *in house* é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade, que estabelece a comparação interlaboratorial. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à *validação completa* (“*full validation*”).⁵⁶

O segundo tipo, *validação completa*, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que estabelece a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim, a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.^{56,57,58}

No Brasil, há duas principais agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE n^o 899, de 29/05/2003,⁵⁹ e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho/2011.⁵⁵ Na Tabela 2 podem ser observados alguns desses parâmetros. Um desafio nos laboratórios atuais é utilização destes guias como ferramenta da qualidade associada à confiabilidade dos resultados gerados.

Tabela 2. Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalo da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de Calibração
Limite de Detecção (LOD)	Limite de Detecção (LOD)
Limite de Quantificação (LOQ)	Limite de Quantificação (LOQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	
Exatidão e tendência (bias)	Exatidão
Precisão	Precisão
<ul style="list-style-type: none"> • Repetitividade • Precisão Intermediária • Reprodutibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Repetitividade (precisão intra-corrida) • Precisão Intermediária (precisão inter-corrida) • Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	

2.3.1. Seletividade e Especificidade

A seletividade e a especificidade convergem para a idéia de confiabilidade do método analítico. Alguns autores trazem diferentes definições para ambos os termos, enquanto, para outros autores, estes termos são idênticos. O termo “específico” é usado para o método na qual a resposta se refere a um único analito, enquanto que “seletivo” é utilizado para um método que produz respostas para diferentes entidades químicas que podem ser distinguidas umas das outras. Neste caso, o método é perfeitamente capaz de medir com precisão o analito na presença de interferências.⁵⁶

Assim como, para o termo “validar”, a seletividade e especificidade apresentam diferentes definições. Segundo a WELAC (*Western European Laboratory Accreditation Cooperation*), a seletividade de um método refere-se à extensão em que ele pode determinar um analito(s) em uma mistura complexa, sem interferência de outros componentes da mistura. Já, um método que é perfeitamente seletivo para um analito ou grupo de analitos é dito como específico.⁶⁰

Já para o ICH (*International Conference on Harmonisation*), estabelece que o termo especificidade seja a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem ser preditos estarem presentes na amostra. Por sua vez, a falta de especificidade de um procedimento analítico individual pode ser compensada por outro procedimento analítico de apoio.⁶¹

De acordo com EURACHEM, especificidade e seletividade essencialmente refletem a mesma característica e estão relacionados muito intimamente, de tal maneira que um método só pode ser específico, se for 100% seletivo. Outro termo relacionado é a confirmação da identidade, que é a prova de que o sinal de medição, que tem sido atribuído ao analito, é apenas devido ao analito e não à presença de alguma espécie química ou semelhança física que surge por coincidência.⁵²

Já para a IUPAC, a seletividade se refere a uma parte do método que pode ser aplicada para determinar uma espécie em particular, na mistura, ou matrizes, sem sofrer interferências de outras espécies de comportamento similar a do analito. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.⁵⁶

Conforme o pressuposto, a seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta do analito e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve agir no sinal analítico.⁶¹ O método de adição de padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade.^{62,63} Outro procedimento para avaliar a seletividade do método, é através da realização da análise por uma técnica diferente, ou seja, que utilize outro princípio para quantificação química, por exemplo, testar o método para ICP-MS e avaliar a seletividade por ET AAS.⁶⁴

Millour, S. e colaboradores realizaram a validação de um método capaz de quantificar 21 analitos em amostras de alimentos usando a ICP-MS. Avaliaram a especificidade realizando testes de recuperação em diferentes níveis de concentrações da curva analítica. A regressão linear foi testada considerando o coeficiente angular (*slope*) = 1 e $\neq 1$ e o coeficiente linear (*intercepto*) = 0 e $\neq 0$, como parâmetro de aceitabilidade na resposta foi adotado o teste *t-student* considerando que o valor de $T_{\text{observado}} < T_{\text{critico}}$. Os autores concluíram que, o método de digestão por microondas com procedimento de preparo de amostra conforme NF EN 13805 foi seletivo para os analitos estudados.⁶⁵ Outros

autores também buscaram a mesma forma de validar a especificidade do método.⁶⁶

Não há expressão única para a especificidade. A forma como é realizada depende do objetivo e do tipo de análise. Para os testes de identificação, o objetivo é assegurar a identidade do analito. Neste sentido a seletividade também pode ser avaliada por amostras “*spiking*”.^{67, 68}

2.3.2. Faixa de Trabalho e Linearidade

A linearidade é a capacidade do método para induzir os resultados do teste que estão diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um determinado intervalo. A faixa de trabalho é o intervalo entre os níveis superiores e inferiores do analito (inclusive), que têm sido demonstrados serem determinados com precisão, rigor e linearidade utilizando o método como descrito. As diretrizes do ICH (*International Conference on Harmonisation*) especificam um mínimo de cinco níveis de concentração para a determinação da faixa linear, juntamente com faixas mínimas especificadas.⁶⁹

Na prática, o estudo de linearidade deve ser idealizado para atender as especificações do método proposto.⁷⁰ Aceitabilidade dos dados da linearidade é frequentemente julgado por examinar o coeficiente de correlação linear e o intercepto da linha de regressão linear para a resposta versus a concentração. Um coeficiente de correlação de 0,99 é geralmente considerado como ajuste aceitável dos dados para a linha de regressão.⁵⁵

A determinação da linearidade de um método analítico compreende muito além do que apenas cálculos de regressão linear. Adicionalmente, os valores residuais devem ser calculados. Esta última representa as diferenças entre o valor real de y e o valor de y previsto a partir da análise de regressão, para cada valor de x . Se os valores residuais, calculado pela regressão linear simples, são distribuídos aleatoriamente sobre a linha de regressão, a linearidade é confirmada, enquanto tendências sistemáticas indicam não linearidade. Se tal tendência ou padrão for observado, isto sugere que os dados sejam melhor tratados por regressão ponderada.^{69,70,71}

Uma abordagem alternativa para o estabelecimento de linearidade é dividir a resposta das respectivas concentrações e traçar essas respostas relativas como uma função da concentração, numa escala

logarítmica. A linha obtida deve estar na horizontal ao longo do intervalo linear completo, com um desvio positivo em baixas concentrações e um desvio negativo em altas concentrações. Ao desenhar linhas paralelas horizontais, que correspondem a, por exemplo, 95% e 105% da linha horizontal resposta relativa, a intersecção os pontos podem ser derivados em que o método se torna não linear.⁶⁷

2.3.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Existe uma grande variação analítica para terminologia e formulações para o LOD e LOQ (limite de detecção e limite de quantificação, respectivamente). O LOD é a terminologia mais utilizada, tal como, aceite pela Eurachem, que é o mínimo valor detectável, e que de acordo com a ISO, concentração.⁷² No entanto, todas as organizações oficiais referem-se à mesma definição, ou seja, a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato.

Em geral, o LOD é expresso como uma concentração ou uma quantidade, derivado de um sinal instrumental, que pode ser detectado com razoável certeza para um determinado procedimento analítico.⁵⁰ O menor sinal, é o sinal que se situa acima de k vezes do desvio padrão do branco, em que k é um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança requerido.^{67,63}

Quanto maior o valor de k , maior é o nível de confiança. A Eurachem e a IUPAC recomendam um valor de 3 para k , o que significa que a probabilidade de um sinal é de 3 vezes acima do valor do branco da amostra. Na concentração ou quantidade de três vezes o desvio padrão do branco, o desvio padrão relativo ou o coeficiente de variação no sinal medido é de 33%.⁷³ De acordo com a USP / ICH, o LOD corresponde a esse sinal, onde a proporção sinal : ruído é 2:1 ou 3:1.⁷³ O LOD ainda pode ser definido como 3 vezes o desvio padrão de dez medidas do branco da amostra dividido pela inclinação da curva de calibração, quando a técnica utilizada for instrumental necessitando de uma curva analítica.⁵⁶

Para o LOQ (limite de quantificação), definições e fórmulas são muito semelhantes as do LOD, exceto que para o LOQ, k é considerado como sendo 5, 6 ou mesmo 10.⁶⁹ Um valor de 10 para k significa que o desvio padrão relativo (% RSD) do LOQ é de 10%. Assim, o LOQ corresponde à concentração ou a quantidade do analito, quantificável

com um coeficiente de variação não superior a 10%.⁷⁴ Na prática, o limite de quantificação pode ser calculado de forma análoga ao LOD, e ainda pode ser definido como 3,3 vezes o valor do LOD.⁶⁹

Conforme o pressuposto, muitas são as opções para demonstrar os parâmetros da validação de um método analítico em laboratório químico. Neste sentido, tornam-se necessário apresentar de forma pontual algumas dificuldades encontradas no desenvolvimento de métodos especificamente em análise de solos e plantas, temas centrais desta tese. Algumas dificuldades descritas na literatura enfatizam o tempo do preparo de amostra e a utilização de volumes excessivos de ácidos inorgânicos como ícones a serem superados no desenvolvimento de método. Neste sentido, esta tese apresenta um avanço no desenvolvimento de métodos analíticos multielementares e na demonstração de algumas possibilidades estatísticas utilizadas para validar métodos de análise química.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Desenvolver e validar métodos analíticos multielementares para determinação de elementos traço em amostras de solo e girassol utilizando a técnica de ICP-MS.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a homogeneidade das amostras de solos;
- Otimizar os reagentes utilizados na digestão das amostras de solos e plantas associados com sistema de aquecimento assistido por microondas;
- Otimizar os parâmetros instrumentais do ICP-MS para a análise de solo e plantas;
- Validar e determinar os parâmetros de mérito para cada método;
- Determinar a concentração dos elementos potencialmente tóxicos em solos agrícolas utilizando a metodologia validada;
- Aplicar a metodologia validada para análise de elementos traço em girassol.

4. INSTRUMENTAÇÃO

4.1. Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo ELAN 6000 (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Toronto, Canadá) com um sistema de geração do aerossol por nebulização pneumática de fluxo cruzado e argônio, com pureza de 99,997 % (White Martins, SP, Brasil). Os parâmetros instrumentais otimizados para as determinações por ICP-MS estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais utilizados para as determinações por ICP-MS.

Potência da Radiofrequência	1100 W
Cones amostrador e skimmer	Pt
Varreduras/Leituras	50
Leituras/Replicatas	1
Replicatas	3
<i>Dwell time</i>	200 ms
Gás do plasma	15 L min ⁻¹
Gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Gás nebulizador	1 L min ⁻¹
Nebulizador	Pneumático de fluxo cruzado

4.2. Otimizações Instrumentais

Antes da realização das análises, foi realizado à checagem das condições do equipamento através da leitura da *Daily Performance*, e o resultado comparado com os dados informados no manual do equipamento. Desta forma, para todos os estudos foram estabelecidos como critério de qualificação a $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ valores menores que 3%, bem como para $^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$. Também se mostraram adequadas as contagens para ^{24}Mg , ^{103}Rh e ^{208}Pb . Dessa forma, o aparelho mostrou-se qualificado para os métodos propostos, além de apresentar boa precisão

demonstrada neste caso pelo baixo RSD, isto é, sempre < 5% dessas medidas.

Após o equipamento demonstrar adequada qualificação para análise, alguns parâmetros foram otimizados para o desenvolvimento do método e quantificação das amostras. Foi efetuada a otimização da vazão do gás nebulizador, a vazão variou de 0,7 a 1,5 L min⁻¹ com uma taxa de 0,1 L min⁻¹, como pode ser observado na Figura 4. A otimização Foi realizada com uma solução aquosa contendo 10 µg L⁻¹ dos analitos. Durante o experimento foi mantido fixo o valor da potência de radiofrequência em 1100 W. Como pode ser observado o valor compromisso da vazão do gás nebulizador é de 1 L min⁻¹.

A vazão do gás nebulizador influencia diretamente no tempo de residência da amostra no plasma, isto é, uma alta vazão do gás de nebulização faz com que o aerossol passe muito rápido pelo plasma, e conseqüentemente elevando a população de espécies moleculares (MO⁺). Isto porque o tempo é insuficiente para promover a dissociação dos óxidos. Por outro lado, se o tempo de residência for muito lento a população de íons dupla carga (M⁺⁺) é favorecida e, conseqüentemente em ambos os casos, comprometerá o resultado analítico.

Por sua vez, a temperatura do canal central do plasma também é afetada pelo gás nebulizador, sendo assim, quanto menor a temperatura, menor é a energia do plasma, podendo não atingir a energia para ionizar alguns analitos.

Nesta otimização, também foi monitorado a razão de óxidos (¹⁵⁶CeO/¹⁴⁰Ce), conforme Figura 5 além da razão de íons de dupla carga (Ba⁺⁺/Ba), mostrada na Figura 6. Também foi otimizada a potência da radiofrequência, conforme mostrado na Figura 7, mantendo-se fixa a vazão do gás de nebulizador previamente otimizada, ou seja, 1 L min⁻¹.

Sendo assim, com o intuito de otimizar a vazão do gás nebulizador, tendo como fator resposta as contagens do analito no plasma e, conseqüentemente, a baixa população de espécies moleculares, isto é, MO⁺, foi utilizada a razão ¹⁴⁰Ce¹⁶O⁺/¹⁴⁰Ce⁺, conforme mostrado na Figura 5, isto porque a energia de ligação do CeO é muito alta, sendo assim, a razão ¹⁴⁰Ce¹⁶O⁺/¹⁴⁰Ce⁺ estando < 3%, pressupõe-se que todos os outros elementos terão formação de óxidos abaixo desse valor. Desta forma, como pode ser observado nas Figuras 4, 5, 6 o valor de compromisso para a vazão do gás de nebulizador foi de 1 L min⁻¹ e para a potência de radiofrequência foi de 1100 W.

Figura 4. Otimização da vazão do gás nebulizador utilizando uma solução aquosa enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1100 W.

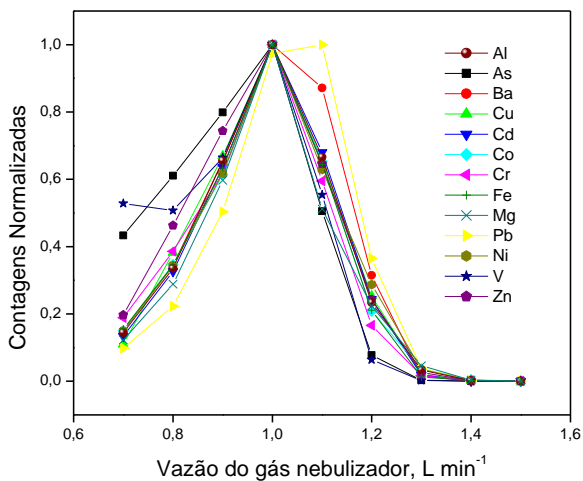


Figura 5. Otimização da razão de CeO/Ce em função da vazão do gás de nebulização, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1100 W.

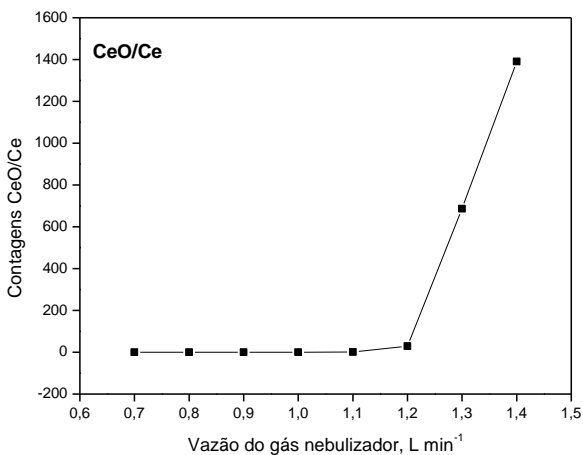
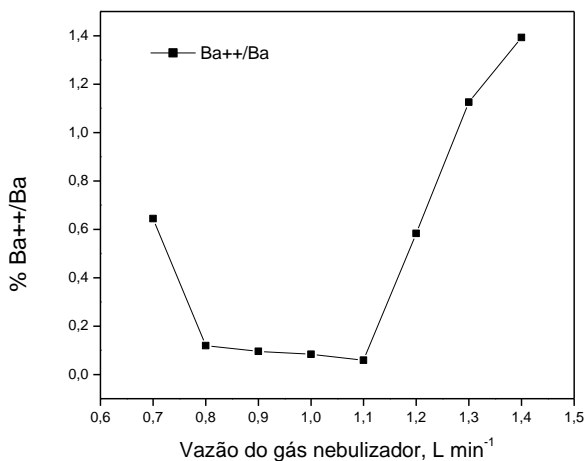


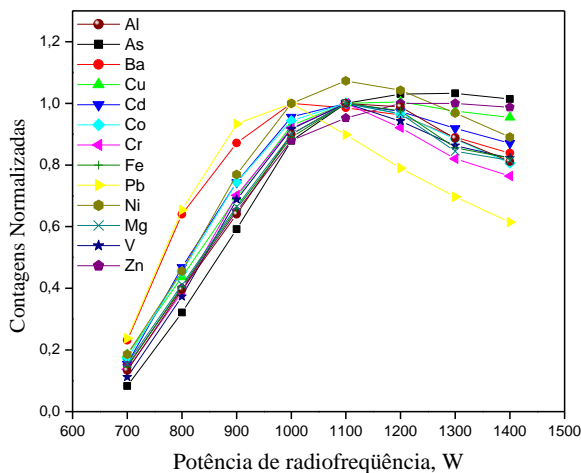
Figura 6 Otimização da razão de Ba^{++}/Ba em função da vazão do gás de nebulização, mantendo-se a potência da radiofrequência em 1150 W.



A potência da radiofrequência (RF), por sua vez conduz a uma maior população de íons M^{++} , pois com o aumento desta, tem-se um aumento da energia cinética entre os íons, aumentando o número de colisões, proporcionando a formação de M^{++} . Por outro lado, a diminuição na intensidade iônica para os óxidos (MO^+) deve-se a uma maior dissociação deste, devido ao aumento do número de choques (efeito indireto) entre as moléculas, provocado pelo aumento da potência de RF.

Os íons carregados (M^+) possuem um valor de potência RF ótimo, com o qual se pode observar um máximo de intensidade iônica para o analito sem a formação elevada, tanto da população de MO^+ quanto de M^{++} .

Figura 7. Otimização da potência da radiofrequência utilizando uma solução aquosa contendo $10\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, mantendo-se a vazão do gás de nebulização em 1 L min^{-1} . (Fonte: próprio autor)



4.3. Sistema de aquecimento assistido por microondas

Para a digestão das amostras de solo e do material de referência certificado Soil-7 e BCR 142 foi utilizado um sistema com aquecimento assistido por radiação microondas da marca Milleston e modelo ETHOS PLUS (Soriso, Bergamo, Itália). O programa de temperatura e o volume dos reagentes (após a otimização) utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Para a digestão das amostras de plantas e do material de referência certificado foi utilizado um sistema com aquecimento assistido por radiação microondas da marca Milleston e modelo MLS 1200 Mega (Soriso, Bergamo, Itália). O programa de temperatura utilizado para a digestão estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Programa de temperatura e volume dos reagentes utilizados para a digestão das amostras de solo e dos materiais de referência certificado.

Reagentes da digestão			Programa de micro-ondas		
Reagentes	Volume (mL)	Etapa	Temperatura 1 (°C)	Temperatura 2 (°C)	Tempo (min)
HNO ₃	4	1	20	85	2:30
HCl	1	2	85	150	4:00
H ₂ O ₂	1	3	150	210	5:00
HF	0,5	4	210	210	20:00
		5	Resfriamento		
H ₃ BO ₃ *	4				

*Foi adicionado após o resfriamento à temperatura ambiente para a eliminação do ácido fluorídrico.

Tabela 5. Programa de Temperatura para a digestão das amostras de girassol.

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
2	85	700
5	145	800
3	210	1000
10	210	1000

5. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM SOLOS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÕES

5.1 Metodologia

5.1.2 Materiais e Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: HNO_3 65% (Synth®, Diadema, São Paulo, Brasil), HCl 30% (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), HF 50% (Química Moderna Indústria e Comércio LTDA, Barueri, São Paulo, Brasil), solução aquosa 5% m/v de H_3BO_3 (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Para garantir o alto índice de pureza dos ácidos, foi utilizado um sistema de quartzo para destilar os ácidos (KurnerAnalysestechnik, Rosenheim, Alemanha), bi-destilando (HCl , HNO_3) e tri-destilando (HF) em um destilador de poli(tetra-fluoretileno) também da KurnerAnalysestechnik.

A água utilizada contém alto índice de pureza, esta foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), resultando em uma água com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Soluções de padrão monoelementar (SpecSol®) contendo 1000 mg L^{-1} dos seguintes elementos: Ce, Rh, Mg, Pb, In, Ba foram utilizadas para preparar a solução de monitoramento da *daily performance* usado no ICP-MS.

Solução monoelementar da marca Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça) foi utilizado como padrão interno, 1000 g L^{-1} de Rh na forma de RhCl_3 , 1000 g L^{-1} .

A curva analítica foi preparada com solução de padrão rastreável de acordo com ISO GUIDE 34 da marca Inorganic™ Ventures, contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos.

Os seguintes materiais de referência certificados foram utilizadas: BCR 142 da *Community Bureau of Reference* (Bruxelas, Bélgica) e Soil-7 da *International Atomic Energy Agency – IAEA* (Viena, Áustria).

As amostras de solos agrícolas foram coletadas no estado do Paraná de acordo com os dados da localização sul $25^\circ 0' 28.26''$ e oeste $50^\circ 15' 09.31''$ (Ponta Grossa - PR), onde nesta região ocorre uma predominância do solo do tipo latossolo vermelho e, na localização descritas pela coordenada sul $25^\circ 24' 37.8''$ e oeste $49^\circ 58' 2.8''$ (Palmeira-PR), onde a predominância é de cambissolo. Estas amostras

foram coletadas em áreas de mata nativa (NV) e plantio direto (PD) onde num período antecedente havia atividade agrícola de soja, trigo e milho, estas amostras foram devidamente separadas por perfil de profundidade da seguinte forma: 0–10, 10–20, 20–40 e 40–60 cm.

Além das amostras de solos agrícolas, outras amostras de solos também foram quantificadas, sendo estas provenientes de vasos de plantas de girassol compradas no comércio local.

5.2 Resultados

5.2.1 Preparo das amostras

O preparo da amostra é considerado uma etapa crítica dentro de um protocolo analítico e pode envolver desde a simples diluição da amostra ou mesmo a decomposição parcial e total da mesma.⁷⁵ As amostras e os CRM's foram preparados a partir das seguintes quantidades: aproximadamente 100 mg da amostra ou do CRM foram adicionados diretamente nos frascos de teflon juntamente com os seguintes reagentes HCl (1 mL), HNO₃ (4 mL), HF (0,5 mL), H₂O₂ (1 mL), sendo então, submetidos ao aquecimento assistido por microondas (conforme Tabela 4), após a conclusão da etapa de digestão, uma nova etapa com a adição da solução de H₃BO₃ (4mL) foi necessário para a eliminação do HF residual, prejudicial ao sistema de ICP-MS. Sendo assim, estas quantidades foram adotadas como *método base*.

A partir do método base, descrito anteriormente foram feitos alguns ensaios para verificar a eficiência deste método para a digestão, conforme pode ser observado na Tabela 6, para este processo foi utilizado o material de referencia certificado Soil-7 (IAEA), onde foi possível variar o volume de cada reagente individualmente, ou seja, no primeiro experimento foi mantido todos os volumes descritos no método base, porém substituindo o volume de HNO₃ que era de 4 mL para 2 mL, em outro procedimento, foi mantido novamente os volumes dos outros reagentes fixos e substituindo de 4 mL para 8 mL o volume de HNO₃, e assim, sucessivamente conforme apresentado na Tabela 6.

O experimento conduzido pode evidenciar que os volumes inicialmente sugeridos estavam adequados para o método proposto. Já, as amostras utilizadas para quantificação foram amostras adquiridas no comércio local, onde foi comprado vasos com plantas de girassol (3 vasos), sendo o solo quantificado pela metodologia desenvolvida.

Tabela 6. Volumes dos reagentes utilizados na otimização, com as respectivas concentrações dos analitos.

Analito	HNO₃ 2mL mg kg⁻¹	HNO₃ 8mL mg kg⁻¹	H₂O₂ 0,5 mL mg kg⁻¹	H₂O₂ 2mL mg kg⁻¹	Amostra 50 mg de mg kg⁻¹	Amostra 200 mg de mg kg⁻¹	HF 1,5 mL (mg kg⁻¹)
Al*	57,1	57,6	55,2	54,2	55,3	55,1	57,5
As	15,9	14,7	15,2	15,2	14,9	15,8	20,4
Ba	124,1	143,12	138,82	139,28	135,47	137,84	136,30
Cd	1,44	1,57	1,38	1,30	1,12	1,39	1,47
Cu	11,18	11,02	12,02	21,36	8,85	10,65	10,73
Fe*	24,1	27,2	24,3	25,8	11,7	26,1	28,5
Mg*	10,75	10,44	10,07	10,10	10,12	10,11	12,43
Ni	25,7	27,6	22,3	26,8	22,3	28,6	27,7
Pb	65,81	66,5	64,4	68,6	64,6	68,5	68,7
V	76,6	75,5	73,3	74,1	76,1	74,9	79,6
Zn	149,9	141,8	137,8	135,9	135,2	136,6	139,9

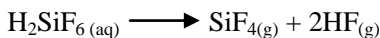
* Concentração do Al, Fe e Mg = mg g⁻¹

Como pode ser observado pela Tabela 6, em todas as variações o Ba, Zn e V foram os analitos que apresentaram alteração da concentração, em alguns casos apresentando valores maiores e as vezes menores quando os volumes dos reagentes eram substituídos conforme consta na tabela em relação ao método proposto. Já a concentração de Fe, foi prejudicada quando a massa da amostra foi reduzida para 50 mg, ao invés de 100 mg conforme o método proposto. Neste sentido foi escolhido como condição compromisso o volume dos reagentes proposto no método base anteriormente descrito.

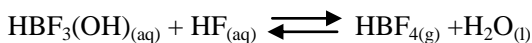
A escolha por esses reagentes baseou-se nas amostras a serem digeridas, isto é, amostras de solo contendo silicatos, matéria orgânica e variados minerais. O HCl é usado para dissolver a maioria dos metais mais eletropositivos que o hidrogênio, além dos seus óxidos e hidróxidos. Para decomposição de muitos metais e óxidos, o ácido clorídrico é mais eficiente que outros ácidos minerais oxidantes utilizados como solvente.⁴ Já o HNO₃ é um ácido forte e um agente oxidante bastante poderoso, capaz de oxidar praticamente todos os metais. O HF é responsável pela inserção do íon fluoreto (F⁻), o F⁻ é um eficaz complexante.³⁵ Neste sentido é necessário a utilização do ácido fluorídrico para a dissolução de materiais que contêm silicatos conforme a equação abaixo:



O ácido fluorossilícico pode ser removido na formade SiF₄ gasoso, promovendo sua dissolução a quente em sistema aberto com ácido sulfúrico, nítrico ou perclórico:



Em sistemas fechados como no caso da digestão usando forno de microondas, o HF pode ser volatilizado reagindo com uma solução saturada de ácido bórico, conforme reação abaixo:

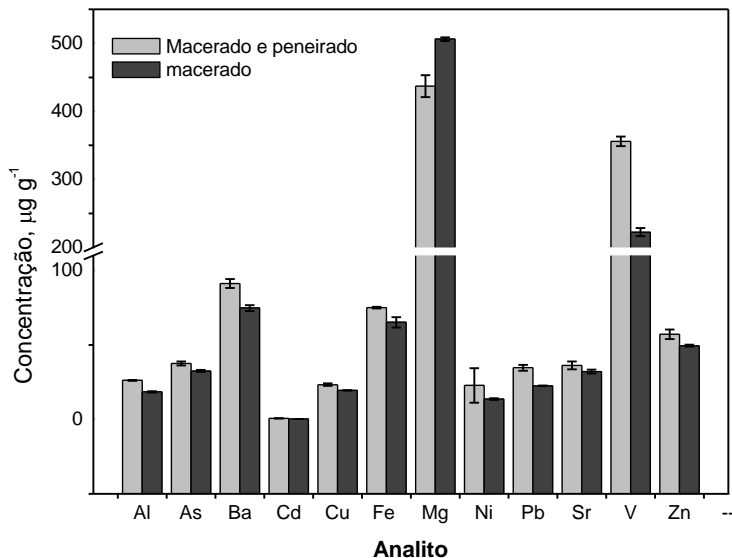


Além desses reagentes, também foi utilizado o H₂O₂ como agente auxiliar de oxidação, aumentando assim, o poder oxidante dos ácidos utilizados.

As amostras de solo, em geral, são caracterizadas por serem heterogêneas, no que diz respeito a compostos inorgânicos.⁷⁶ Neste sentido, foi realizado um procedimento de digestão para que fosse possível quantificar a maior concentração dos analitos, além de obter resultados com boa precisão, considerando os reagentes previamente otimizados.

Para este ensaio, foram utilizados 100 mg de amostra de solo comercial preparados conforme o método proposto neste trabalho. Desta forma, pode ser observado na Figura 8, onde é evidenciada para a maioria dos analitos um maior valor obtido da concentração após a digestão, quando as amostras foram maceradas e peneiradas, com exceção do Mg, no entanto, o valor da concentração do Mg mostrou-se exato pela análise do material de referencia certificado, neste sentido, assumiu-se o compromisso com a necessidade de macerar em almofariz com pistilo e peneirar em malha de 100 μm as amostras de solo antes da digestão para quantificação dos metais totais.

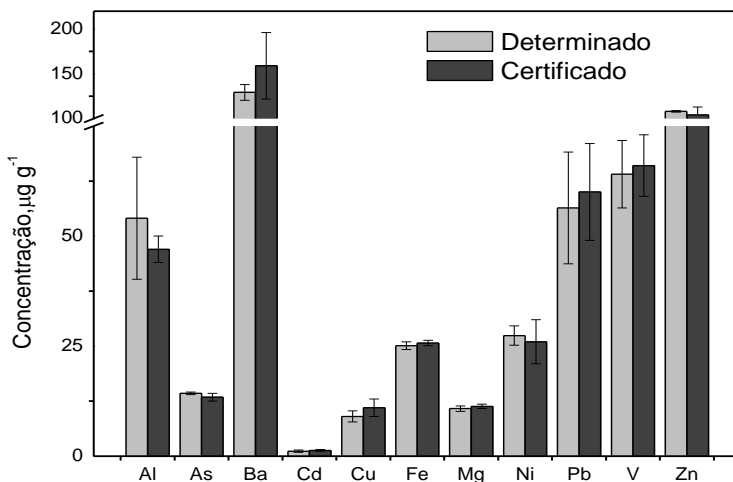
Figura 8. Resultado dos ensaios para determinar a necessidade de macerar e peneirar os solos, com seus respectivos RSD's (%). (Fonte: próprio autor)



Sendo assim, então as amostras de solo foram maceradas e, posteriormente peneiradas com malha de 100 μm para garantir uma

suficiente homogeneidade na granulometria. Em seguida, uma massa de aproximadamente 100 mg das amostras foram pesadas diretamente em frascos de Teflon®, no qual foi acrescentado 4 mL de HNO₃, 1 mL de HCl, 1 mL de H₂O₂, aguardando por um período de uma hora, em temperatura ambiente e com os frascos previamente fechados, após isto foi adicionado 0,5 mL de HF antes de serem submetidas ao programa de digestão usando forno de microondas conforme apresentado na Tabela 4. Após esta etapa, ocorreu um resfriamento a temperatura ambiente para em seguida adicionar a solução de H₃BO₃ e novamente passar pela etapa de digestão usando o mesmo programa de temperatura. Após a digestão, as amostras foram diluídas para o volume final de 50 mL com água ultra pura (Milli-Q). Em seguida, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 v/v para a realização das determinações por ICP-MS. A exatidão do método foi verificada pela análise do material de referência certificada Soil-7 (IAEA) e os resultados estão apresentados na Figura 9. Os resultados obtidos comprovaram a exatidão do método, não apresentando diferença significativa de acordo com o teste *t-student*, demonstrando concordância estatística com os valores certificados.

Figura 9. Verificação da exatidão do método: resultados da análise da amostra IAEA Soil-7, com seus respectivos limite de confiabilidade para n= 3 e 95% de confiança. Al, Fe e Mg em mg g⁻¹.(Fonte: próprio autor)



5.2.2 Validação da metodologia para análise de metais em solo usando ICP-MS

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método resulte em informações confiáveis sobre a amostra ele deve sofrer uma avaliação designada de *validação*. Foram avaliados os seguintes parâmetros deste método: Linearidade, Especificidade e seletividade, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

5.2.3 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para análise de solo por ICP-MS usando a calibração externa com padrão aquoso e Rh como padrão interno foram adequados, o Rh permitiu a correção das interferências espectrais. O coeficiente de correlação linear foi adequado para todos os analitos ($R > 0,996$). A precisão do método foi comprovada por meio do desvio padrão relativo que foi menor do que 8 % ($n=3$) indicando boa precisão para análise multielementar. O limite de detecção (LOD) foi considerado a partir da amostra sem umidade, considerando uma alíquota de 100 mg da amostra de solo digerida e avolumada a 50 mL e uma diluição de 10 vezes para posterior análise usando ICP-MS. O LOD foi definido como 3 vezes o desvio padrão de dez medidas do branco da amostra dividido pela inclinação da curva de calibração, os valores do LOD estão apresentados na Tabela 7. O LOD obtido foi inferior a $7,3 \mu\text{g g}^{-1}$ para todos os analitos, estes valores foram semelhantes e até melhores do que alguns encontrados na literatura, que usaram amostras e/ou pré-tratamento similares para análise por ICP-MS. O limite de quantificação (LOQ) foi definido como 3,3 vezes o valor do LOD. Os valores do LOQ obtido para o método proposto estão entre $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e $24 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe, sendo adequado para análise de elementos traço em amostras de solo.

Tabela 7. Comparação entre LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) método proposto com a literatura.

Isótopo	LOD Método Proposto	Roje, V. (2011) ³⁴	Melaku <i>et al.</i> (2005) ⁷⁶
²⁷ Al	2,4	16,3	-
⁷⁵ As	0,7	0,17	-
¹³⁸ Ba	0,4	1,17	-
¹¹¹ Cd	0,01	0,04	0,01
⁶³ Cu	0,06	0,89	0,03
⁵² Cr	0,04	0,4	0,04
⁵⁷ Fe	7,3	1,89	-
²⁴ Mg	1,7	-	-
⁶⁰ Ni	0,2	0,28	0,04
²⁰⁸ Pb	0,01	0,40	0,01
⁸⁸ Sr	0,05	3,39	-
⁵¹ V	0,1	0,15	-
⁶⁶ Zn	0,4	2,31	2,3

5.2.4 Seletividade

É necessário que o método apresente primeiro uma elevada especificidade e seletividade antes que a quantificação válida possa ser realizada.⁷² A seletividade em química tem como objetivo garantir a identidade do analito, portanto, deve ser o primeiro passo da validação de um método instrumental e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente o uso do método.⁷³

Não há expressão única para a especificidade. A forma que isso é feito depende do objetivo e do tipo de análise à qual o método esta sendo testado. Para os testes de identificação, o objetivo é assegurar a identidade de um analito. Para a realização dos ensaios de impureza, é necessário a demonstração de que o método tem a capacidade para determinar ou para discriminar o analito na presença de outros interferentes.

A capacidade seletiva do método desenvolvido para os analitos Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Mg, Pb, Sr, V, Zn foi demonstrada

segundo o recomendado pelo guia do Inmetro, ou seja, pela comparação de resultados obtidos com um método oficial para o mesmo propósito, neste caso o método U.S EPA 3050b foi utilizado. Os resultados apresentados na Tabela 8 não mostram diferenças significativas entre os valores encontrados na comparação dos métodos, conforme teste *t-student*, confirmando-se assim a boa capacidade seletiva e específica para os analitos em questão.

As interferências por íons poliatômicos que poderiam afetar os resultados de alguns isótopos como, por exemplo, ^{75}As , ^{51}V , ^{204}Pb , foram corrigidas com a utilização de uma equação de correção, conforme a equação abaixo, demonstrada para o ^{75}As , onde íons poliatômicos provocados pela combinação de ^{40}Ar e ^{35}Cl , podem causar interferência na determinação, além deste, o isótopo ^{77}Se interfere na combinação de $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$, que também foi corrigido na mesma equação.

$$As^{75} = [total]^{75} - \left[Se^{77} - Se^{82} \times \text{abundância} \frac{Se^{77}}{Se^{82}} \right] \times \text{abundância} \left[\frac{Cl^{35}}{Cl^{37}} \right]$$

Além desta correção de interferência, a utilização de um isótopo alternativo também foi necessário para garantir a seletividade do método na totalidade dos analitos, como foi a utilização do isótopo ^{57}Fe ao invés do ^{56}Fe que seria o mais abundante, porém passivo de interferente por íons poliatômicos provocado pela combinação do $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$.

Como pode ser observado na Tabela 8 a seletividade deste método foi comprovada pela comparação entre os valores obtidos com o método proposto e o método oficial da U.S. EPA 3050b. Aplicando-se o teste *t-pareado* foi possível comprovar a igualdade estatística dos valores. O valor do $t_{experimental}$ foi menor do que o valor do $t_{tabelado}$ para um nível de confiança de 95% e $n=3$, evidenciando assim a seletividade deste método.

Tabela 8. Resultados da comparação dos métodos, desenvolvido neste estudo com o método U.S. EPA 3050 b. Os resultados estão acompanhados dos seus respectivos limite de confiabilidade para n= 3 e 95% de confiança.

	CRM Soil-7 (IAEA) Método proposto (µg/g)		CRM Soil – 7 (IAEA) Método U.S. EPA 3050b; (µg/g)	
	Valor Certificado	Valor Determinado	Valor Determinado	Valor T _{experimental}
Al (mg/g)	47 ± 4	57,4 ± 15,2	49,4 ± 1,9	2,75
As	13,4 ± 0,9	14,3 ± 0,3	12,9 ± 0,2	2,77
Ba	159 ± 28	125,9 ± 8,4	137,1 ± 4,6	2,76
Cd	1,3 ± 0,2	1,10 ± 0,31	1,3 ± 0,4	2,03
Cr	60 ± 14	55,9 ± 8,4	73,1 ± 6,6	2,77
Cu	11 ± 2	9,01 ± 1,32	9,6 ± 1,7	1,51
Fe (mg/g)	25,7 ± 0,5	25,7 ± 0,2	25,99 ± 0,48	0,65
Ni	26 ± 5	27,1 ± 2,3	29,9 ± 3,7	2,58
Mg (mg/g)	11,3 ± 0,5	10,96 ± 0,47	12,11 ± 0,72	2,77
Pb	60 ± 5	66,71 ± 3,42	64,66 ± 9,51	1,73
Sr	108 ± 6	107,89 ±1,23	106,36 ± 5,21	0,98
V	66 ± 7	64,0 ± 7,7	65,2 ± 4,0	0,64
Zn	104 ± 9	112,7 ± 1,2	104,6 ± 17,2	2,71

*T_{tabelado} : 2,78 (95% confiabilidade, n=3)

5.2.5 Exatidão

A fim de verificar a exatidão do método proposto, foram quantificados dois materiais de referência certificado Soil-7 e o BCR 142 que foram submetidos ao mesmo procedimento de digestão e de quantificação das amostras reais. Os resultados determinados e os valores certificados encontram-se expresso na Tabela 9. Os resultados obtidos demonstram a concordância estatística com os valores certificados para as determinações por ICP-MS para todos os elementos analisados, de acordo com o teste *t-student*, considerando um nível de confiança de 95%. Além desta concordância dos valores, o método

demonstrou habilidade em quantificar solos oriundos de diferentes origens, por isso a escolha de dois materiais de referência como pode ser observado abaixo, isto é, o Soil – 7 que trata-se de um solo coletado da camada superficial, acima de 10 cm. E, o BCR 142, trata-se de um solo levemente arenoso.

Tabela 9. Verificação da exatidão do método proposto com seus respectivos valores determinados e certificados. Os resultados estão acompanhados dos seus respectivos limite de confiabilidade para n= 3 e 95% de confiança.

	Soil-7 ($\mu\text{g g}^{-1}$)		BCR 142 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Valor Certificado	Determinado	Valor Certificado	Determinado
Al (mg g^{-1})	47 ± 4	$57,4 \pm 15,2$	5,0*	$3,9 \pm 0,3$
As	$13,4 \pm 0,9$	$14,3 \pm 0,3$		
Ba	159 ± 28	$125,9 \pm 8,4$	450*	$363,5 \pm 27,5$
Cd	$1,3 \pm 0,2$	$1,10 \pm 0,31$	$0,25 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,01$
Cu	11 ± 2	$9,01 \pm 1,32$	$27,5 \pm 0,6$	$27,50 \pm 3,52$
Cr	60 ± 14	$55,9 \pm 8,4$		
Fe (mg g^{-1})	$25,7 \pm 0,5$	$25,7 \pm 0,2$	1,96*	$1,2 \pm 0,2$
Mg (mg g^{-1})	$11,3 \pm 0,5$	$10,9 \pm 0,5$	6570*	5563 ± 794
Ni	26 ± 5	$27,1 \pm 2,3$	$29,2 \pm 2,5$	$29,7 \pm 3,4$
Pb	60 ± 5	$66,7 \pm 3,4$	$37,8 \pm 1,9$	$38,72 \pm 3,52$
Sr	108 ± 6	$107,89 \pm 1,23$	164*	$145,43 \pm 9,00$
V	66 ± 7	$64,0 \pm 7,7$		
Zn	104 ± 9	$112,7 \pm 1,2$	$92,4 \pm 4,4$	$85,9 \pm 6,1$

* valores informados

5.2.6 Faixa de Trabalho e Linearidade

O método foi desenvolvido para uma faixa de trabalho que fosse possível quantificar elementos em baixas concentrações, bem como, quando as concentrações forem acima dos limites previstos na legislação nacional, neste caso, o CONAMA 420/09. Neste sentido, a faixa de trabalho estabelecida para o método foi determinada na curva analítica entre as concentrações de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com a Tabela 10, todos os analitos apresentaram coeficientes de correlação linear, "r", maior ou igual a 0,996, demonstrando haver relação linear entre a contagens dos analitos e a concentração estabelecida, representando um bom indicativo de linearidade, de acordo com as recomendações da Anvisa, este coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,99 e para o Inmetro um valor superior a 0,90 é aceitável. No entanto, o valor de "r" ou "R²" são insuficientes para demonstrar a linearidade de uma curva de calibração.⁷⁸ Por isso foi necessário avaliar o ajuste do modelo, utilizando uma abordagem alternativa, nomeadamente, por meio da avaliação da homoscedasticidade de dados.⁷⁸

O estudo da homoscedasticidade dos dados foi realizado utilizando o teste-F. No teste F, os dados são assumidos para ser distribuído uniformemente quando o valor de F tabelado (F_{tab}) for maior do que o valor F experimental (F_{exp}) ($F_{\text{tab}} > F_{\text{exp}}$). Sendo assim, como o $F_{\text{tab}} > F_{\text{exp}}$ podemos dizer que a falta de ajuste não é evidenciada, ou seja, não ocorre dispersão dos pontos na curva analítica. O F_{tab} é obtido a partir de uma tabela de valores críticos de distribuição F, com níveis de confiança de 95% para os graus de liberdade, e o F_{exp} é obtida usando a Eq. 1.⁷⁸ Os valores para o F_{exp} são apresentados na Tabela 10.

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{Eq. 1}$$

Tabela 10. Parâmetros da curva analítica para faixa de trabalho entre $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $500 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando Rh como padrão interno.

Analito	r	R ²	F _{exp}
Al	0,9977	0,995	2.748
As	0.9989	0.997	2.746
Ba	0.9997	0.999	2.749
Cd	0.9990	0.998	2.746
Cr	0.9991	0.998	2.663
Cu	0.9992	0.998	2.747
Fe	0,9993	0,999	2,749
Ni	0.9994	0.998	2.748
Mg	0,9967	0,993	2,743
Pb	0.9998	0.999	2.749
Sr	0.9992	0.998	2.747
V	0.9986	0.997	2.745
Zn	0.9978	0.995	2.741

* F_{tab}(2,45,95%) = 3,2

Além disso, os gráficos de resíduos mostrados na Figura 10 comprovam que os dados foram dispersos aleatoriamente ao longo da curva analítica, demonstrando que não existe tendência dos dados, evidenciando a homocedasticidade dos resultados na faixa de trabalho. Para todos os analitos a variação foi menor que ± 1 de desvio padrão entre a concentração predita com a determinada, com exceção do As que chegou a ± 2 e do V apresentando valor de $\pm 1,5$. As maiores variações encontradas para o resíduo dos dados encontram-se nas faixas menores de concentração, como pode ser observado para As e Pb, isto ocorre justamente porque nas menores faixas os erros cometidos são mais pronunciados, no entanto, não comprometeram a linearidade do método. Neste sentido podemos dizer que o método proposto apresentou-se comportamento linear durante a faixa de trabalho.

Figura 10. Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica empregando a análise de resíduos. (Fonte: próprio autor).

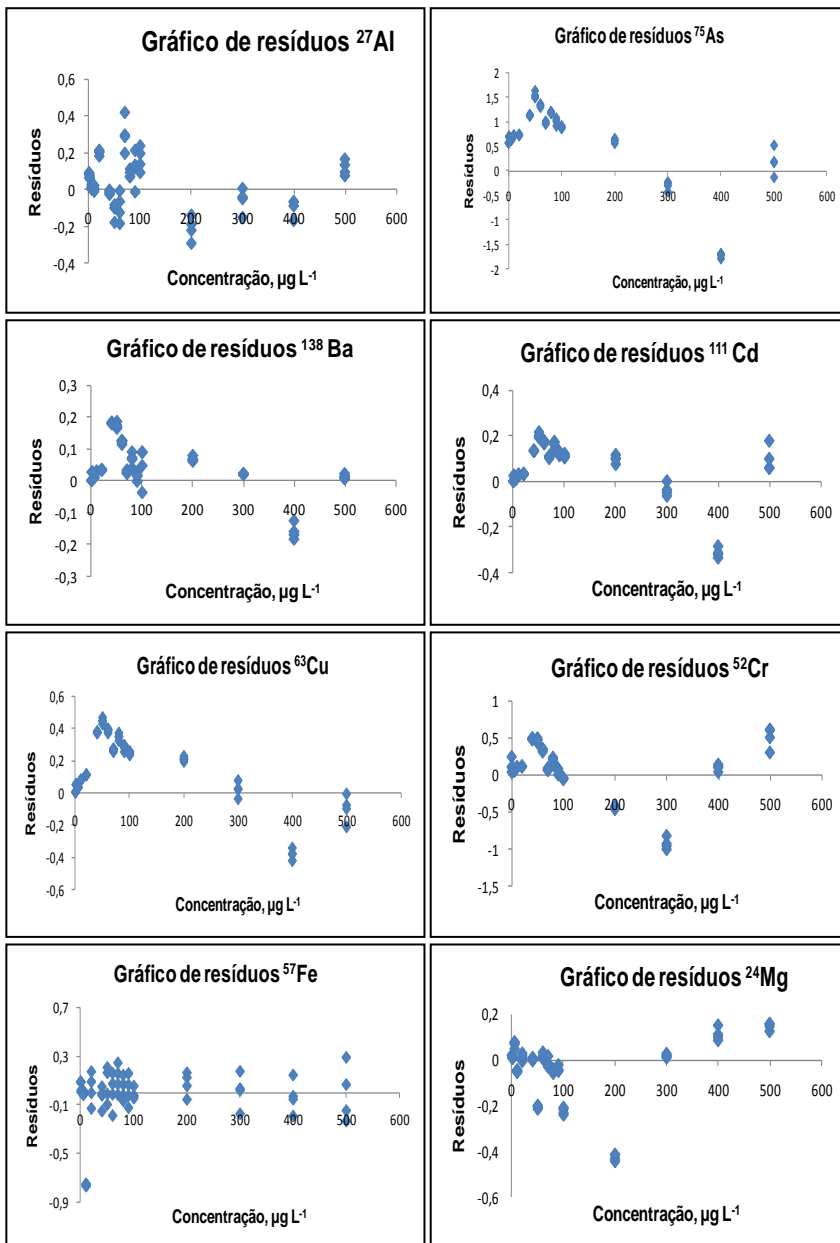
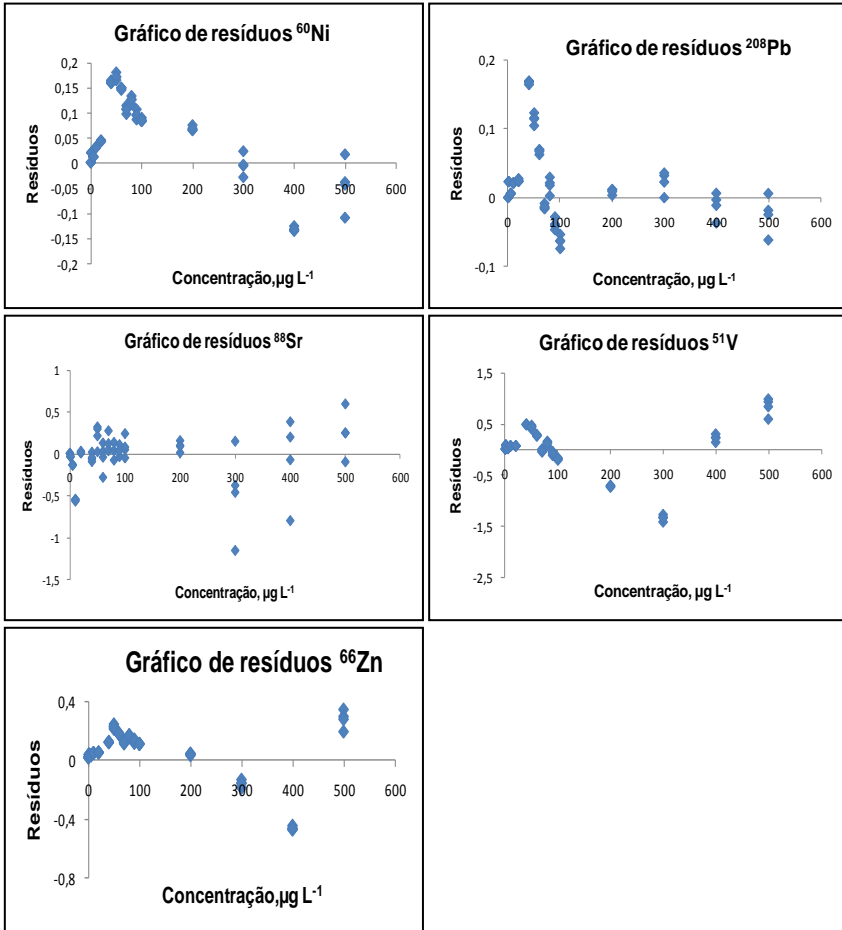


Figura 11. Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica empregando a análise de resíduos. (Fonte: próprio autor).



5.2.7 Aplicações analíticas

A permanência dos metais no solo pode ser indefinida, e dessa forma causar perigo à saúde humana ou animal ao entrarem na cadeia alimentar. Entre os metais, deve-se ressaltar que alguns são essenciais às plantas (Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn), no entanto, outros podem ser tóxicos como Hg, Pb e As, prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Com o objetivo de aplicar a metodologia proposta neste trabalho, foram adquiridos 3 vasos de girassol, contendo a planta e o solo. Os resultados das análises dos solos encontram-se na Tabela 11. As amostras de solos foram preparadas e quantificadas conforme descrito no procedimento de preparo de amostra.

Como podemos observar, as amostras não podem ser classificadas como contaminadas quando comparadas com o CONAMA 420/09. Além disso, por se tratar de um solo para o plantio comercial, não é de se esperar contaminações de natureza inorgânica. No entanto, foi observado maiores valores nas concentrações dos elementos Al, Ba, V, Zn. Como este solo não foi caracterizado, não podemos evidenciar que isto seria fonte de contaminação, podendo estes elementos fazerem parte da composição natural da formação mineral de origem do solo.

A concentração de Zn foi a segunda maior concentração encontrada, isto pode ser devido à adição de fungicidas, como aqueles com princípio ativo constituído pelo dimetil ditiocarbamato de zinco, vendido comercialmente. Uma vez que, como relatado, estas amostras eram vendidas no comércio local sendo passível a aplicação destes compostos para aumentar sua durabilidade até a sua comercialização.

O bário por ser um metal alcalino terroso possui ocorrência natural nos solos. É constituinte de carbonatos, sulfatos e silicatos e ocorre em minerais, como substituto isomórfico de elementos como Ca e K.⁷⁹ Os teores elevados de Ba nestes solos podem ser explicados pela presença do elemento como substituto do K na estrutura do feldspato.⁸⁰ Este mineral é presente na composição das rochas constituintes de grande parte dos solos. O teor médio de bário em solos ao redor do mundo pode estar entre 20 a 3000 mg kg⁻¹.¹⁵

O alto valor de alumínio da amostra de solo analisada pode ter origem na etapa de correção do solo, quando se aplica um corretivo de acidez, por exemplo, calcário, que por sua vez podem ser os carbonatos (de Ca ou de Mg), estes reagem com o hidrogênio do solo liberando água e gás carbônico e, assim, alumínio é insolubilizado na forma de hidróxido, o que pode ter acumulado na amostra quantificada.⁸¹

Tabela 11. Valores das concentrações dos analitos (mg kg^{-1}), para determinação de elementos nas amostras, com seus respectivos limites de confiança para $\mu = 95\%$ e $n = 3$.

Analito	Amostra de Solo vaso 1	Amostra de Solo vaso 2	Amostra de Solo vaso 3	Conama 420/09
Al	140,2 \pm 0,4	133,4 \pm 0,5	151,1 \pm 0,7	-
As	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	35
Ba	233,8 \pm 0,2	242,8 \pm 0,1	288,0 \pm 0,1	300
Cd	0,42 \pm 0,01	1,13 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01	3
Cr	28,01 \pm 0,02	28,30 \pm 0,01	31,41 \pm 0,02	150
Cu	23,39 \pm 0,01	32,58 \pm 0,01	28,95 \pm 0,01	200
Fe	25,1 \pm 0,1	21,1 \pm 0,1	27,3 \pm 0,1	-
Ni	11,1 \pm 0,1	15,8 \pm 0,1	11,5 \pm 0,1	70
Mg	11,2 \pm 0,2	16,5 \pm 0,1	19,9 \pm 0,4	-
Pb	34,64 \pm 0,01	32,57 \pm 0,01	33,92 \pm 0,01	180
Sr	3,931 \pm 0,005	3,751 \pm 0,001	4,261 \pm 0,004	-
V	64,9 \pm 0,1	74,0 \pm 0,1	77,9 \pm 0,1	-
Zn	123,9 \pm 0,1	111,8 \pm 0,2	98,7 \pm 0,1	450

5.2.8. Aplicação da metodologia proposta em amostras de solo agrícola

O método desenvolvido neste trabalho para amostras de solo, foi aplicado para a determinação de metais em dois tipos diferentes de solo (Latossolo e Cambissolo) do estado do Paraná, coletadas no perfil a partir da superfície (0-10; 10-20; 20-40; 40-60 cm).

Na Figura 12, os resultados para Latossolos são apresentados e, como pode ser observado para as concentrações Cd, Cu, Mn, Pb, Sr, Zn, foram significativamente mais elevados nos solos de plantio direto (NT) do que aqueles em solos sob mata nativa (NV), o Ni também mostrou comportamento semelhante; mas na concentração obtida a partir da camada de 10-20 cm de altura, não se observou qualquer diferença significativa.

Em média, os resultados obtidos para a medida foram maiores em solos sob NT, mostrando significância nas camadas 10-20 cm e 20-40 cm. Os solos brasileiros altamente intemperizados (por exemplo, Latossolos) têm baixas concentrações de P e elevada acidez. Portanto para estes solos grandes quantidades de calcário e fertilizante a base de fosfato têm sido usados para maximizar o rendimento agrícola.

No entanto, a matéria-prima mineral para fertilizantes fosfatados pode conter, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn.^{82,83} O estrôncio é um dos contaminantes do calcário agrícola.^{84,85} Assim, os níveis de As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn e Sr em solos NT são provavelmente devido ao uso de calcário e de fertilizantes fosfatados. A concentração de Mg se mostrou significativamente maior em solos NV apenas na primeira camada (0-10 cm). Nas camadas superiores do solo, a atividade biológica e os ciclos biogeoquímicos dos elementos são normalmente mais elevados, desempenhando um papel importante na manutenção da NV, isto justifica maior concentração de Mg na camada 0-10 cm.⁸⁶

A concentração de ferro em ambos os Latossolos (NT e NV) foi muito semelhante, mas a camada 20-40 cm mostrou valores significativamente mais elevados para os solos NT. Para Al, as concentrações foram encontradas no nível de mg g⁻¹ para ambos os solos analisados.

No entanto, para as amostras de latossolo as concentrações de Al encontrados em solos sob NV mostrou resultados mais elevados quando comparados com solos sob NT. Em solo agrícola sob NT ocorre uma maior remoção de elementos, devido à colheita causando uma redução dos estoques de elementos no sistema, tais como Fe e Al que

são reintroduzidos através fertilizantes e componentes corretivos. Além disso, a concentração de ferro em Cambissolos foram menores em comparação com as de amostras de Latossolos, este comportamento era esperado pois os Latossolos são caracterizados pela alta concentração de ferro.

Os resultados obtidos para as amostras cambissolo, estão apresentados na Figura 13, mostram que o conteúdo dos elementos As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn, foram mais baixos do que as concentrações encontradas nas amostras de Latossolos. Em solos intrazonais com pouco desgaste (como Cambissolo), a aplicação de fertilizantes de fosfato e compostos de correção de elementos potencialmente tóxicos é inferior.^{83,84,85} Isso justifica o fato de que nos cambissolos as concentrações dos elementos não foram alteradas e principalmente apresentaram concentrações mais baixas de elementos potencialmente tóxicos do que em amostras de NT. Além disso, as maiores concentrações para quase todos os elementos analisados foram encontrados em solos sob NV, exceto para Zn mostrando uma concentração significativa maior do que solo NT na camada de 40-60, este aumento na concentração de Zn pode ser devida à adição de fungicidas.

Culturas de trigo e soja têm mostrado a ocorrência de doenças fúngicas, normalmente controlado com fungicidas à base de Zn.⁷⁹ De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 420/09), os valores de investigação em meio agrícola de As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn e são 35, 3, 200, 70, 180, 450 mg kg⁻¹, respectivamente. O cultivo agrícola do solo sob NT resultou em mudanças na concentração destes elementos, mas não atingiu os valores de referência para Cambissolo. No entanto, em Latossolo, as concentrações de As, Cu, Mn e Pb foram maiores do que os valores de referência, mas não o suficiente para ser considerada como concentrações característica de solo contaminado.

Figura 12 Resultados para amostras de solo Latossolo, média \pm desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em peso seco. Barras \square NV e \blacksquare NT, com diferentes letras mostram diferença significativa). * Concentração de Al, Mg, Fe e em mg g^{-1} . (Fonte: próprio autor)

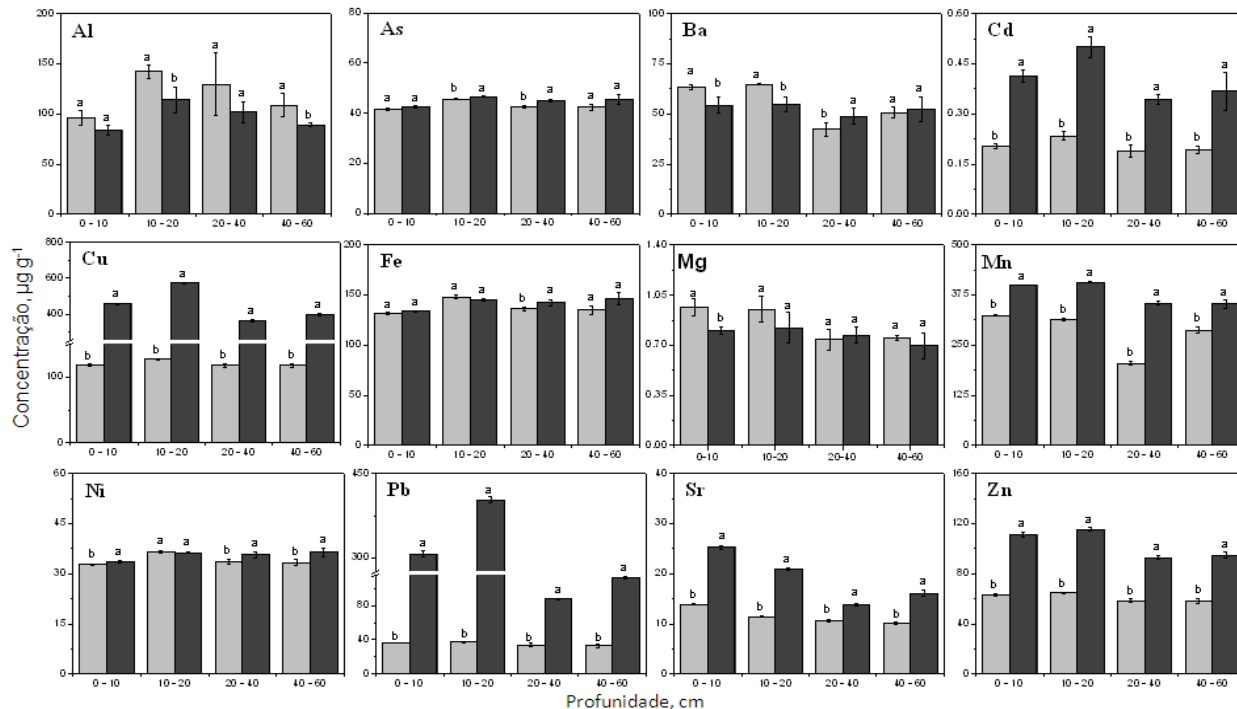
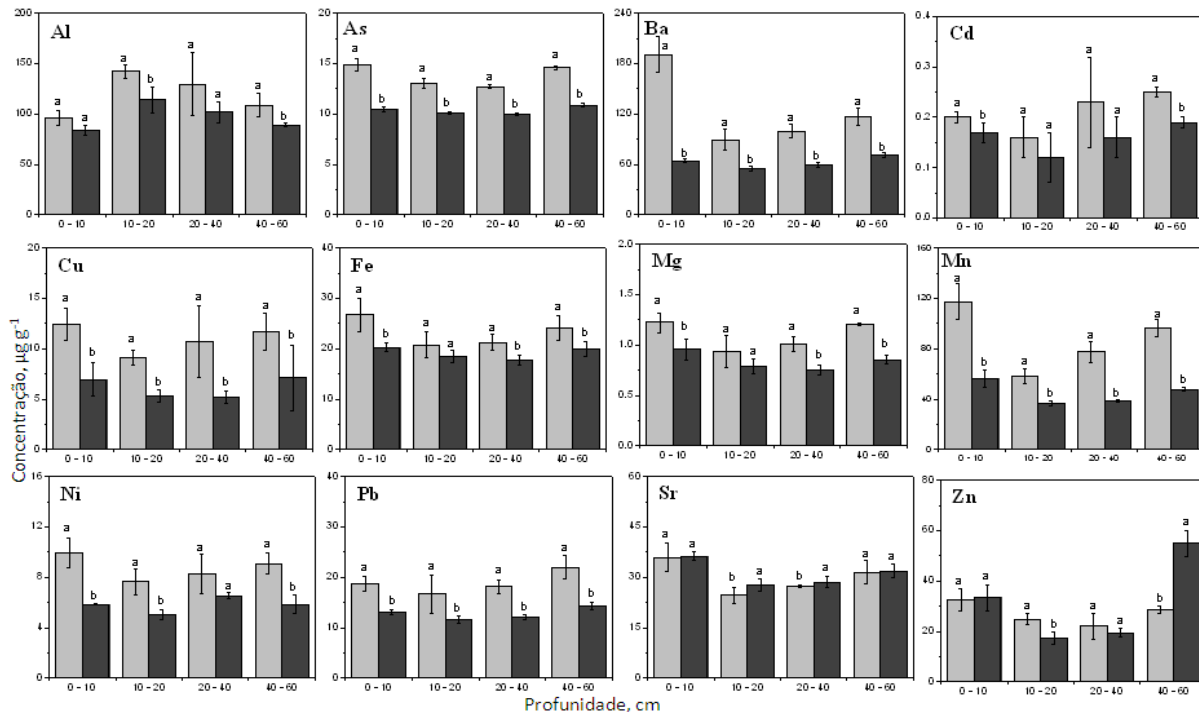


Figura 13. Resultados para amostras de solo Inceptisol, média \pm desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em peso seco. Barras \blacksquare NV e \blacksquare NT com diferentes letras mostram diferença significativa. * Concentração de Al, Mg, Fe e em mg g^{-1} . (Fonte: próprio autor)



6. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM PLANTAS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÕES.

6.1 Metodologia

6.1.2 Materiais e Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: HNO₃ 65% (Synth®, Diadema, São Paulo, Brasil) e H₂O₂(Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Para garantir o alto índice de pureza do HNO₃, foi utilizado um sistema de quartzo para bi-distilar o ácido (Kurner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha).

A água utilizada também contém alto índice de pureza, esta foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), resultando em uma água com resistividade de 18 MΩ cm.

Soluções de padrão monoelementar (SpecSol®) contendo 1000 mg L⁻¹ dos seguintes elementos: Ce, Rh, Mg, Pb, In, Ba foram utilizadas para preparar a solução de monitoramento da *daily performance* usado no ICP-MS.

Soluções monoelementar da marca Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça) foram utilizadas como padrão interno, 1000 g L⁻¹ de Rh na forma de RhCl₃, 1000 g L⁻¹.

A solução utilizada no preparo da curva analítica foi feita com padrão rastreável de acordo com ISO GUIDE 34 da marca Inorganic™ Ventures, contendo 100 µg mL⁻¹ dos analitos.

O material de referência certificada (*Oriental Tobacco Leaves*, CTA-OTL-1) foi utilizado para avaliar a exatidão do método.

6.1.3 Preparo das amostras

As amostras de girassóis utilizadas foram plantadas em uma região contaminada por resíduos da indústria petroquímica com intuito de fitorremediar o solo impactado, neste sentido, garantíamos que essas amostras continham uma concentração mínima dos analitos. Essas

amostras foram colhidas e secas em estufa a baixa temperatura. Posteriormente, as amostras foram preparadas para análise.

As amostras foram subdivididas em raiz, caule, folha, semente conforme mostrado na Figura 14. Após isso, as amostras foram moídas e peneiradas em malha de 100 μm para garantir a homogeneidade. Então, uma massa de aproximadamente 200 mg foi diretamente pesado nos frascos de Teflon® e, adicionou-se 6 mL de HNO_3 bi-destilado e 2 mL de H_2O_2 , seguindo para a etapa de digestão com aquecimento por micro-ondas, conforme programa de temperatura apresentado na Tabela 5 descrito no item 4.3.

Figura 14 Amostras de girassol subdivididas em: a) folha; b) raiz; c) caule, f) semente. (Fonte: próprio autor)



6.2 Resultados

6.2.1 Validação da metodologia para análise de metais em girassol (*Helianthus annuus*) usando ICP-MS

A necessidade de mostrar a integralidade dos resultados gerados por um laboratório faz parte da qualidade e da confiabilidade analítica. A confirmação e demonstração dos estudos sistemáticos é o que dá a coerência científica para as condições a que o método desenvolvido se propõe. Esta confirmação é realizada por evidências objetivas que demonstram a aceitação da aplicabilidade do método para um determinado fim. Neste sentido, a validação deste método foi desenvolvida para fornecer as informações dos parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, faixa de trabalho e linearidade afim de quantificar amostras de girassóis.

6.2.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A quantificação de metais traço nas amostras foi realizada utilizando as condições otimizadas. Para o método proposto, foi utilizado a calibração externa com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Rh como padrão interno.

O limite de detecção foi calculado expressando em unidades de concentração. Este é derivado da menor medida observada que pode ser detectada com razoável certeza em relação a um determinado procedimento analítico. A determinação do LOD permitiu estimar a concentração em que a detecção do analito foi distinguida do ruído de fundo de forma confiável. O valor de LOD foi calculado segundo a Equação 2.

$$LOD = \frac{3xSD}{A} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, “SD” é o valor do desvio padrão obtido experimentalmente através da realização de 10 medidas do branco da amostra, “A” é o valor da inclinação da reta (*slope*) proveniente da curva de calibração obtidos a partir das soluções padrões de concentrações conhecidas (1 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Os limites de detecção estão apresentados na Tabela 12 e mostram que o método proposto tem uma capacidade de detecção

apropriada para a análise de elementos traço, o maior valor foi de 0,044 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Zn e o menor valor foi de 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Co. O limite de quantificação (LOQ) do método foi estabelecido como 3,3 vezes o LOD, neste sentido o método estabeleceu LOQ entre 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cr e Co respectivamente.

O desvio padrão relativo (RSD), $n = 3$, da concentração dos analitos na solução da amostra de referência certificada de folha de tabaco (CTAOTL-1) foi usado para estimar a precisão do método, sendo observado um valor menor do que 8 % para todos os analitos, incluído aqueles que geralmente sofrem interferências por íons poliatômicos, por exemplo, Zn ($\text{Ar}^{36}\text{Si}^{30}$), ^{51}V ($^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}$).

Tabela 12. Limite de detecção e limite de quantificação para o método proposto, com Rh como padrão interno.

Isótopo	LOD($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
^{75}As	0,07	0,23
^{138}Ba	0,002	0,07
^{111}Cd	0,01	0,03
^{59}Co	0,001	0,003
^{63}Cu	0,03	0,09
^{208}Pb	0,002	0,007
^{60}Ni	0,01	0,03
^{51}V	0,003	0,009
^{66}Zn	0,044	0,15

6.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi verificada com a análise do material de referência certificado CTA-OTL-1, (Tabela 13), por comparação dos resultados obtidos com os valores certificados, usando o teste t simples a um limite de confiança de 95%. A calibração com padrões aquosos pode ser utilizada para a determinação de diversos analitos, ou seja, as concentrações determinadas foram concordantes com os valores de referência.

Tabela 13. Valores da concentração para as amostras certificadas (Oriental Tobacco Leaves, CTA-OTL-1) com adição de Rh como padrão interno.

Analitos	Valor Certificado, mg kg⁻¹	Valor Determinado, mg kg⁻¹
As	0,539 ± 0,060	0,56 ± 0,01
Ba	84,2 ± 11,5	78,55 ± 3,56
Co	0,879 ± 0,039	0,882 ± 0,016
Cd	1,12 ± 0,12	1,05 ± 0,02
Cu	14,1 ± 0,5	13,93 ± 0,47
Pb	4,91 ± 0,80	3,777 ± 0,452
Ni	6,32 ± 0,65	6,01 ± 0,22
V	3,08 ± 0,42	2,436 ± 0,565
Zn	49,9 ± 2,4	46,69 ± 0,84

Além da verificação da concordância dos valores determinados com os valores certificados, também foram realizados testes de adição/recuperação. Nesta ocasião, foram preparadas amostras com concentrações conhecidas dos analitos relacionados a diferentes pontos da curva de calibração, sendo estas adições realizadas antes da etapa de preparo das amostras.

Neste sentido, os valores das concentrações e recuperações obtidos para os analitos estão apresentados na Tabela 14.

Os valores de recuperação para adição de padrões inorgânicos ficaram entre 80 e 120%, demonstrando um baixo índice de interferências não espectrais do método proposto e, ainda, encontrando-se assim dentro da faixa recomendada para verificação da exatidão de um método para elementos traço. Entretanto, para o isótopo ⁶⁶Zn o valor recuperado para o padrão inorgânico com concentrações de 1 µg L⁻¹ ficaram abaixo do LOD o que pode ser atribuído a um erro instrumental durante a medida deste isótopo ou, muito provavelmente, devido a sua baixa abundância relativa, isto porque a interferência mais provável neste caso seria proveniente do ¹³²Ba⁺⁺ (0,097%), no entanto, pela baixo valor da abundância deste isótopo mínima formação de íons M⁺⁺ monitorada pela *Daily Performance*, seria pouco provável este evento.

Tabela 14. Valores das concentrações dos analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$), para o estudo da adição/recuperação dos metais na amostra em diferentes pontos da curva de calibração.

Analito	Adição 1 $\mu\text{g L}^{-1}$		Adição 25 $\mu\text{g L}^{-1}$		Adição 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado, %	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado, %	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recupera do, %
As	1,08 ± 0,16	108 ± 9	25,68 ± 1,12	102 ± 4	52,03 ± 1,57	104 ± 3
Ba	1,12 ± 0,52	111 ± 6	23,50 ± 0,56	93 ± 2	46,53±1,04	93 ± 2
Co	1,04 ± 0,12	104 ± 15	25,26 ± 0,27	101 ± 2	50,57±1,00	101 ± 2
Cd	0,98 ± 0,11	98 ± 3	24,04 ± 0,71	96 ± 2	48,16±1,02	96 ± 2
Cu	1,45 ± 1,10	145 ± 18	25,32 ± 0,64	101 ± 2	50,64±1,19	101 ± 2
Pb	1,22 ± 0,31	121 ± 7	24,28 ± 0,67	97 ± 2	47,55±1,79	95 ± 3
Ni	1,12 ± 0,41	111 ± 5	23,44 ± 0,90	93 ± 3	47,38±0,91	94 ± 1
V	1,06 ± 0,25	106 ± 9	24,62 ± 0,28	98 ± 2	49,57±1,32	99 ± 2
Zn	< LOD	< LOD	25,73 ± 0,22	102 ± 1	55,59±6,09	111 ± 12
Analito	Adição 100 $\mu\text{g L}^{-1}$		Adição 200 $\mu\text{g L}^{-1}$		Adição 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado, %	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado, %	Determinado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recupera do, %
As	104,90 ± 1,77	104 ± 2	208,72 ± 5,14	104 ± 2	518,16 ± 1,87	103 ± 3
Ba	94,76 ± 0,68	94 ± 1	192,60 ± 6,49	96 ± 3	503,96 ± 2,17	100 ± 2
Co	101,17 ± 1,05	101 ± 1	201,50 ± 5,08	100 ± 2	515,92 ± 1,07	103 ± 2
Cd	96,52 ± 0,85	96 ± 1	192,94 ± 4,09	96 ± 2	491,41 ± 8,44	98 ± 1
Cu	101,07 ± 1,13	101 ± 1	200,77 ± 5,99	100 ± 2	515,07 ± 1,38	103 ± 2
Pb	98 ± 0,72	98 ± 1	197,36 ± 4,29	98 ± 2	517,26 ± 6,16	103 ± 1
Ni	94,87 ± 1,14	94 ± 1	191,25 ± 3,77	95 ± 2	489,64 ± 6,99	97 ± 1
V	98,79 ± 0,89	98 ± 1	200,64 ± 5,54	100 ± 3	516,13 ± 9,56	103 ± 2
Zn	107,18 ± 7,67	107 ± 7	205,78 ± 1,73	102 ± 1	488,88 ± 3,79	98 ± 6

6.2.4 Faixa de Trabalho e Linearidade

O método foi desenvolvido para quantificar metais em baixa concentração. A faixa de trabalho estabelecida para o método foi determinada na curva analítica entre as concentrações de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com a Tabela 15, todos os analitos apresentaram os coeficientes de correlação e determinação adequados, conforme as normativas do Inmetro e da Anvisa. No entanto, faz-se necessário a demonstração por evidências estatísticas da linearidade da curva analítica, neste sentido, avaliou-se o ajuste do modelo de regressão linear utilizando o teste F .

Neste sentido, os resultados apresentados na Tabela 15 realizados com base no teste F , dos dados brutos da curva analítica, ou seja, contagens versus concentração prevista foram tratados. Foram 8 pontos na curva analítica, com 4 repetições independente da curva. O estudo mostrou a homocedasticidade dos resultados, onde os valores do F_{tab} foi maior que o F_{exp} , dentro disto um modelo linear é evidenciado, ou seja, não ocorre dispersão dos pontos na curva analítica.

Além disso, podem ser observados na Figura 15 e 16 a dispersão aleatória dos dados ao longo da curva analítica mostradas por meio do gráfico de resíduos, o que evidencia a ausência de tendências e erros sistemáticos. Neste sentido podemos dizer que o método proposto apresentou-se linear durante a faixa de trabalho.

Tabela 15. Resultados para o estudo da linearidade e da homocedasticidade da curva analítica utilizando Rh como padrão interno na faixa de trabalho de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para quantificação de metais nas amostras de girassol.

Analito	R	R ²	F _{exp}
As	0,999	0,998	2,78
Ba	0,997	0,994	2,80
Cd	0,997	0,995	2,80
Co	0,996	0,992	2,82
Cr	0,998	0,996	2,79
Cu	0,999	0,998	2,78
Fe	0,999	0,998	2,78
Ni	0,999	0,998	2,78
Mg	0,999	0,998	2,78
Pb	0,998	0,996	2,79
Sr	0,997	0,995	2,80
V	0,999	0,998	2,78
Zn	0,998	0,996	2,79

*F_{tab}(3:31,95 %) = 2,95

Figura 15 – Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica para quantificação de girassol empregando a análise de resíduos.(Fonte: próprio autor)

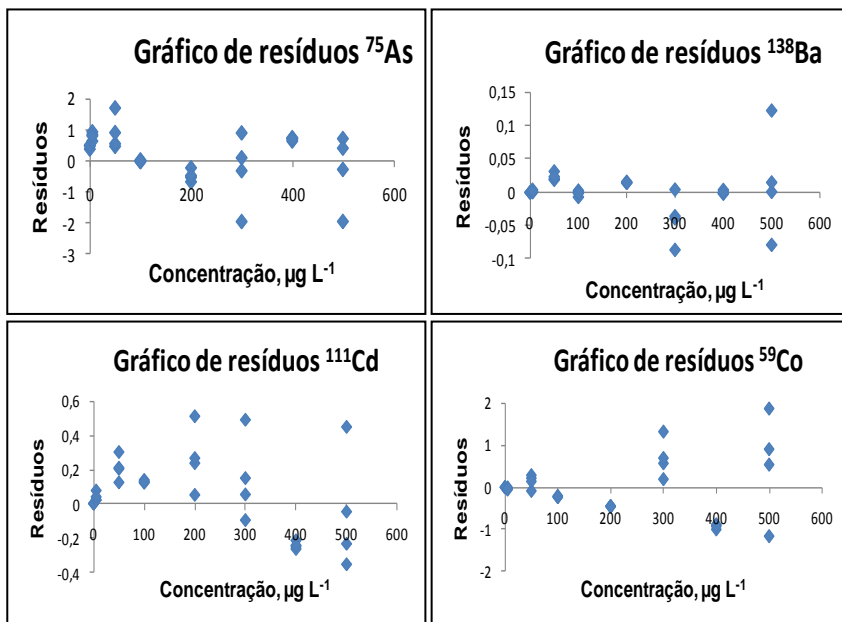
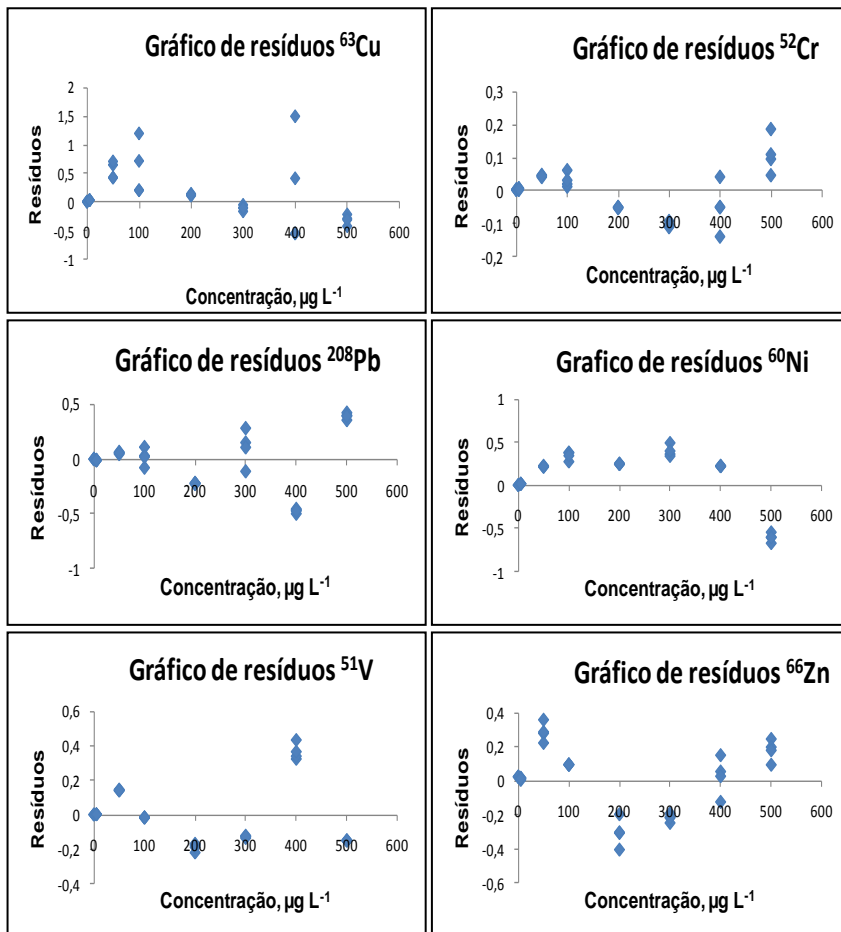


Figura 16 – Avaliação da linearidade dos dados da curva analítica para quantificação de girassol empregando a análise de resíduos. (Continuação)(Fonte: próprio autor)



6.3 Aplicações Analíticas

Após estabelecer os parâmetros LOD's, LOQ's, a linearidade, precisão e exatidão do método proposto para os seguintes analitos: As, Ba, Cd, Co, Cu, Pb, Ni, V, Zn as amostras foram analisadas. Estas amostras foram quantificadas sendo sub-divididas em raiz, caule, folha, semente, conforme já mencionado.

As concentrações das amostras reais estão apresentadas na Figura 17 e foram obtidas pela análise das amostras digeridas, usando-se o sistema convencional de introdução de amostra no plasma; os resultados são expressos pela média ($n = 3$) \pm limite de confiança de 95%, conforme pode ser observado abaixo. Neste sentido, o método pode ser utilizado para a determinação de diversos analitos, inclusive aqueles com baixo potencial de ionização, por exemplo, V e Ba.

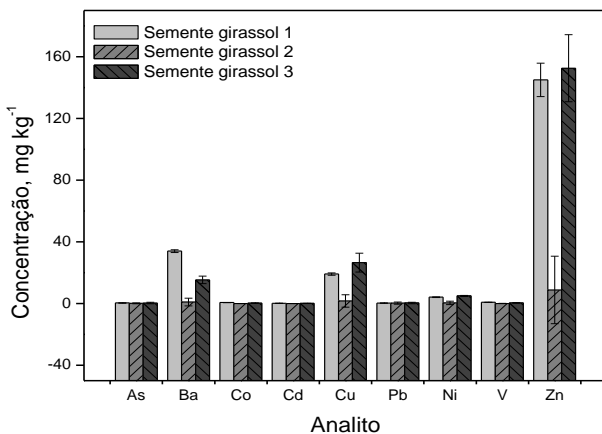
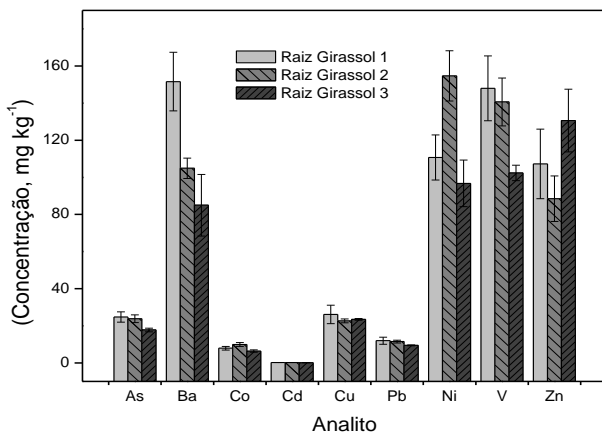
O acúmulo dos metais nas plantas depende de uma série de fatores como: biodisponibilidade da fração solúvel do solo, espécie química do metal, teor de matéria orgânica e capacidade do solo em reter cátions. Além disso, o acúmulo de metais traço no tecido vegetal varia de uma espécie para outra, e em geral, é conhecido uma seqüência decrescente na tendência do acúmulo de elementos potencialmente tóxicos: Ni > Zn > Pb > Cu.¹⁹

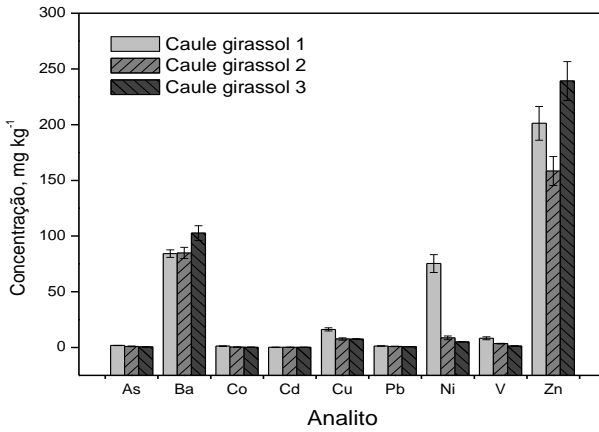
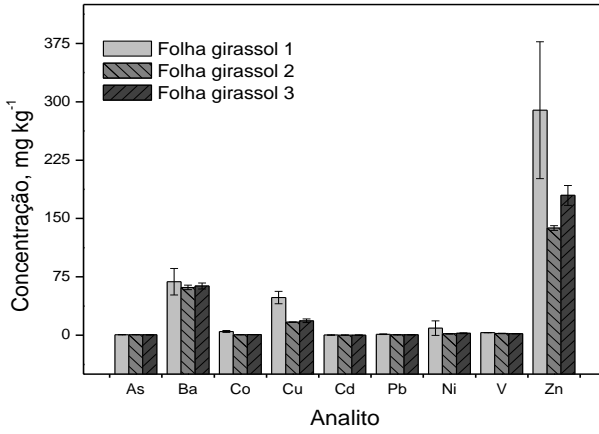
As diferentes partes das plantas comportam-se de modo distintos, de acordo com o elemento, como pode ser observado na figura 17. Neste trabalho podemos observar maiores concentrações dos elementos Ba, Cu, Ni e V nas raízes, Zn e Ba nas sementes, Ba, Cu, Zn nos tecidos foliares e Ba, Ni e Zn no caule. Como se pode observar, a maior parte dos analitos foram encontrados nas raízes, isto justifica-se pelo fato que são quantidades de elementos que a planta não necessita no seu processo vital, retendo-se nessa região. Além disso, uma quantidade dos analitos, apresentaram tendência em acumular-se nas folhas, isto pode ser explicado pelo fato de que na região foliar encontram-se os vacúolos, sendo que nesta região os elementos ficam a disposição das plantas caso elas necessitem para funções vitais.⁸²

O transporte dos metais a partir das raízes para as partes foliares é um potencial problema para saúde, uma vez que em grande maioria utiliza-se as folhas para consumo humano na forma de infusão. Também pode afetar numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, por exemplo, redução do teor de clorofila das plantas, redução da fotossíntese e, conseqüentemente redução da biomassa. No entanto, este estudo foi realizado com plantas de girassol, onde o produto de interesse humano é

o óleo extraído da semente, o que não obteve concentração elevada, podendo neste sentido servir para fitorremediar áreas impactadas além de produzir óleos para produção de biocombustível e outros de interesse humano.

Figura 17 Valores das concentrações dos analitos (mg kg^{-1}), para determinação de elementos nas amostras de girassol comercial, com seus respectivos limites de confiabilidade para $\mu = 95\%$ e $n = 3$.





7. CONCLUSÕES

As metodologias propostas aqui neste trabalho foram todas validadas adequadamente utilizando a técnica de ICP-MS. Estas metodologias mostraram serem simples e eficazes, apresentando limites de detecção adequados, boa precisão e exatidão, seletividade e linearidade para a determinação de alguns elementos específicos em amostras de solo e girassol.

A otimização univariada dos reagentes demonstrou que foi necessário para a digestão das amostras de solo assistida por microondas, o volume de 4 mL de HNO_3 , 1 mL HCl , 1 mL H_2O_2 e 0,5 mL HF seguido pela segunda etapa onde foi consumido 4 mL de uma solução saturada de H_3BO_3 . E, para análise do girassol foram consumidos apenas 4 mL de HNO_3 e 2 mL de H_2O_2 .

Para uma adequada qualificação do ICP-MS, foi necessário a otimização dos parâmetros instrumentais, o que demonstrou-se adequado com a vazão do gás de nebulizador de 1 L min^{-1} e potência de radiofrequência de 1100 W.

A utilização da técnica ICP-MS para a determinação de elementos em solo possibilitou a determinação de 13 elementos. O preparo da amostra costuma ser uma etapa crítica da análise química, entretanto a utilização da maceração e posterior peneiramento proporcionaram a homogeneização necessária para a obtenção de uma boa precisão dos resultados. As determinações foram realizadas usando calibração com padrão aquoso, com a utilização de padrão interno para a quantificação.

Com o método proposto foi possível quantificar Al, As, Ba, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn nas amostras agrícolas de solos do estado do Paraná. Os resultados mostraram com clareza a diferença entre latossolo e cambissolo, além disso, foi possível diferenciar o comportamento desses elementos potencialmente tóxicos nessas amostras quando o solo de origem foi coletado em mata nativa e quando foi coletado em regiões de plantio direto. No Cambissolo, as concentrações de metais foram menores, provavelmente, devido a um menor consumo de fertilizantes químicos e aditivos.

No entanto, os níveis de concentrações dos elementos investigados nas amostras não podem ser considerados como contaminações, porque os seus valores estão inferiores ao CONAMA 420/09.

O método proposto para análise de girassol por ICP-MS utiliza um procedimento simples de preparo das amostras consumindo apenas

HNO_3 e H_2O_2 e aquecimento por microondas, o baixo consumo desses reagentes leva a obter um valor menor para o LOQ. Desta forma, foi possível determinar 9 elementos nas diferentes partes da planta de girassol (caule, semente, raiz e folha) utilizando o mesmo método e, encontrando uma tendência da disposição dos elementos na planta, ou seja, na raiz e na folha.

Além disso, todas as metodologias aqui propostas podem ser aplicadas para análises de rotina, visando o controle da toxicidade dos solos para as plantas, bem como, a identificação de possíveis patologias nas plantas oriundas de um solo contaminado, ou até mesmo para controle de processos de fitorremediação, tendo em vista que os LOQ's aqui apresentados são adequados também para este tipo de investigação.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho e as metodologias analíticas porpostas para área ambiental são encorajadores, ao se considerar o elevado potencial de contaminação antropogênica ao ecossistema. Eles apoiam estudos futuros para corroborarem com os valores de referência para solos paranaenses, contribuindo com o entendimento do manejo agrícola.

Estas metodologias podem ser aplicadas como ferramentas analíticas para a fitorremediação de áreas impactadas por resíduos químicos, no que diz respeito a análise dos elementos aqui apresentados. Neste sentido, um detalhamento da área onde será aplicado este processo, bem como, um estudo da biodisponibilidade química se fará necessário.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferraz, M. H. M. Trabalhos e estudos luso-brasileiros em química (1772-1822). In: Centenário de Heinrich Rheinboldt 1891-1991. IQ-Universidade de São Carlos, 73-83, 1993.
2. Dos Santos, N. P. Laboratório Químico - Prático do Rio de Janeiro – A primeira tentativa de difusão da química no Brasil (1812-1819). *Química Nova*, 27, 342 - 348. 2004.
3. Queenie, S.H.; Chui, Ricardo, R.; Zucchini, J. L.. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Química Nova*, 24, 374-380, 2001.
4. Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba, 2008.
5. Guang, Y., et al. Contamination, bioaccessibility and human health risk of heavy metals in exposed-lawn soils from 28 urban parks in southern China's largest city, Guangzho. *Applied Geochemistry*, 67 52-58, 2016.
6. Salvatore, M. D.; Carafa, A. M.; Carratù, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73, 1461–1464, 2008.
7. Blaylock, M.J.; Huang, J.W. Phytoextraction of metals, in *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. Wiley, New York, USA, 53–70, 2000.
8. Jadia, C. D.; Fulekar, M. H. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 6, 921–928, 2009.
9. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA, 2002.

10. Kim, K. R.; Owens, G.; Naidu, R.; Kwon, S. Influence of plant roots on rhizosphere soil solution composition of long-term contaminated soils
11. BERTON, R.S. Riscos de contaminação do agrossistema com metais pesados. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, A.O. (Ed.). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 312p, 2000.
12. PITCHEL, J.; SALT, C.A.. Vegetative growth and trace metal accumulation on metalliferous wastes. *Journal of Environmental Quality*, v. 27, 618-624, 1998.
13. David, E.S. Update on Plant Ionomics. *Plant Physiology*, September 2004, v.136,2451–2456, 2004
14. MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Switzerland, Worblanfen- Bern: International Potash Institute, ed. 2, 593 p., 1979.
15. OSKARSSON, A.; REEVERS, L. A. Handbook on the Toxicology of Metals: Barium. Academic Press, New York, chapter 20, 2007.
16. MONACI, F.; BARGAGLI, R.. Barium and other trace metals as indicators of vehicle emissions). *Water Air, & Soil Pollution*, v. 100, 89–98, 1997.
17. LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J.. Assessment of barium toxicity in bush beans. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, v. 39, 440–444, 2000
18. National Research Council (NRC). Molybdenum. In *Mineral Tolerance of Animals*, 2nd edn. National Academies Press, Washington, DC, ed. 2, 262–75, 2006.
19. WILLIAMS, R.J.P.; SILVA, J.J.R.F.. The involvement of molybdenum in life. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 292, 293–299, 2002.

20. REISS, J. Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Human Genetics*, v106, 157–63, 2000.
21. NELL, J.A.; ANNISON, E.F.; BALNAVE, D.. The influence of tungsten on the molybdenum status of poultry. *British Poultry Science* . v. 21, 193–202, 1980.
22. HALL, O. J. Veterinary Toxicology. In *Molybdenum*. Elsevier Inc, chapter 33, 449-452, 2007.
23. DIXON, H. B. F. The biochemical action of arsenic acids especially as phosphate analogues. *Advances in Inorganic Chemistry*. Academic Press, San Diego, CA, 191–228, 1997.
24. JIANG, Q. Q.; SINGH, B. R. Effect of different forms and sources of arsenic on crop yield and arsenic concentration. *Water Air, & Soil Pollution*, v. 74, 321–343, 1994.
25. SOODAN, R.K., *et al.* Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: A tabulated review, *Talanta*, 125, 405-410, 2014.
26. NELMS, S.M. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., 2005.
27. KRISHNA, M. V. B., *et al.* A cost-effective and rapid microwave-assisted acid extraction method for the multi-elemental analysis of sediments by ICP-AES and ICP-MS, *Analytical Methods* 4, 3290, 2012.
28. PICOLOTO, R. S., *et al.* Determination of inorganic pollutants in soil after volatilization using microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B* 86, 123-130, 2013.
29. OLIVEIRA, S., *et al.* Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 96, 1-7, 2014.
30. UCHIDA, S.; Tagami, K.; Tabei K. Comparison of alkaline fusion and acid digestion methods for the determination of rhenium

in rock and soil samples by ICP-MS, *Analytical Chimica Acta* 535, 317-323, 2005.

31. KELEPERTZIS, E.. Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: Insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece, *Geoderma*, 221-222, 82–90, 2014.

32. MARIN, B., *et al.* Comparison of microwave-assisted digestion procedures for total trace element content determination in calcareous soils. *Talanta*, 77, 282–288, 2008.

33. SILVA, Y. J. A. B. C., NASCIMENTO, W. A., BIONDI, C. M.. Comparison of USEPA digestion methods to heavy metals in soil samples, *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 47-53, 2014.

34. ROJE, V.. Fast method of multi-elemental analysis of stream sediment samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) with prior single-step microwave-assisted digestion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 532–539, 2011.

35. NÓBREGA, J. A, *et al.* Decomposição de amostras de solos assistida por radiação microondas: estratégia para evitar a formação de fluoretos insolúveis, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29, 547-553, 2005.

36. TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5)

37. GOODMAN, R.C.; *et al.* Heavy metals in soil and plants after long-term sewage irrigation at Tianjin China: A case study assessment. *Agricultural Water Management*, 171, 153–161, 2016.

38. EVANS, E. H.; *et al.* Inductively Coupled and microwave induced plasma sources for mass spectrometry. *The Royal Society of Chemistry*, Ed. 1., 1995.

39. BERTIN, R. L.; *et al.* Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 45–51, 2016.
40. SCHUDEL, G.; *et al.* Trace element characterization of USGS reference materials by HR-ICP-MS and Q-ICP-MS. *Chemical Geology*, 410, 223–236, 2015.
41. WELZ, B.; SPERLING, M.. *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley; Weinheim, Ed. 3, 1999.
42. SAINT'PIERRE, Tatiana D. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais traço em álcool combustível e gasolina por espectrometrias de absorção atômica e de massa com plasma indutivamente acoplado, Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
43. HOUK, R. S; JARVIS, K. E; GRAY, A. L. *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Chapman and Hall, Blackie & Son Ltd. USA, 1992.
44. TORMEN, L. II Curso Teórico e Prático sobre Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) – Aspectos instrumentais em ICP-MS. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 10 a 12 de novembro de 2008.
45. TANNER, S. D.. Characterization of ionization and matrix suppression in inductively coupled 'cold' plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 10, 905-921, 1995.
46. ROWAN, J.T.; HOUK, R.S. Attenuation of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry by gas-phase collisions. *Applied Spectroscopy*, v 43, 976-980, 1989.
47. LABORDA, F., *et al.* Mathematical correction for polyatomic interferences in the speciation of chromium by liquid chromatography-inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, 433-437 2006.
48. REED, N.M., *et al.* Characterization of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry using

a high resolution mass spectrometer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 9, 881-884, 1994.

49. D'ILIO, S.; et al. Simultaneous quantification of 17 trace elements in blood by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system. *Analytica Chimica Acta*, v. 579, 202-208, 2006.

50. TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 8, 535-532, 2004.

51. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2 ed. Rio de Janeiro: Abnt, 2005. 31 p

52. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998.

53. HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.

54. ISO 5725-1 (International Standards Organization).. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions. Geneva: ISO, 1994.

55. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2011.

56. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Harmonized guidelines for single: laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74, 5, 835-855, 2002.

57. GUNTIÑAS, M.B. de La Calle et al. Proficiency test for heavy metals in feed and food in Europe. *Trends In Analytical Chemistry*, p. 454-465, 2009.
58. HUND, E. ; MASSART, D.luc; SMEYERS-VERBEKE, J.. Interlaboratory studies in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 145-165, 2000.
59. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
60. WELAC Guidance document No. WG D2 1st edn., EURACHEM/WELAC Chemistry, Teddington, 1993.
61. International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
62. SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57, 2003.
63. United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods , Rockville, 1999.
64. LEITE, Flávio. **Validação em Análise Química**. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008. 357 p
65. MILLOUR, S., *et al.* Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 111–120, 2011.
66. CHEVALLIER, E., et al. Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile. *Journal of Food Composition and Analysis* 41, 35–4, 2015.

67. HUBER, L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Interpharm Press, East Englewood, CO, USA, 1998.
68. RIBANI, M.; *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 5, 771-780, 2004.
69. ICH-Q2B, *Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1996 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).
70. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. *Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
71. CX/MAS 01/4, Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, *Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes*, Agenda Item 4a of the 23rd Session, Budapest, Hungary, 26 February–2 March, 2001.
72. CX/MAS 02/4, Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (FAO/WHO), *Proposed draft guidelines for evaluating acceptable methods of analysis*, Agenda Item 4a of the 24th Session, Budapest, Hungary, 18–22 November 2002+CX/MAS 02/4-Add.2.
73. Eurachem Guide: *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*, LGC, Teddington.
74. KUSELMAN, I.; SHERMAN, F. *Assessment of limits of detection and quantitation using calculation of uncertainty in a new method for water determination*. *Accreditation and Quality Assurance*, 4, 124-128, 1999.
75. AGAZZI, A.; PIROLA, C. *Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation*. *Microchemical Journal*, 67, 337-341, 2000.

76. MELAKU, S., DAMS, R., MOENS, L.. Determination of trace elements in agricultural soil samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry: Microwave acid digestion versus aqua regia extraction. *Analytica Chimica Acta*, 543, 117–123, 2005.
77. KRUG, F. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 2008.
78. MULLER, J. N.; MULLER, J. C.. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 6. ed. England: Pearson Education Limited, 2010, 297 p.
79. Malavolta, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.
80. TAYLOR L. R.; PAPP, R. B.; POLLARD B. D. Instrumental Methods For Determining Elements, Selection and Application, VCH publishers, Nova York , USA, 1994.
81. LOPES, Alfredo Scheid; SILVA, Marcelo de Carvalho; GUILHERME, Luiz Roberto Guimarães. **ACIDEZ DO SOLO E CALAGEM**. São Paulo: Associação Nacional Para Difusão de Adubos, 1991.
82. D.K. Gupta , S. Chatterjee , S. Datta , V. Veer , C. Walther. Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals *Chemosphere* 108 (2014) 134–144
83. Malavolta, E. (2006). Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres.
84. LIU, W. J., *et al.* Elemental and strontium isotopic geochemistry of the soil profiles developed on limestone and sandstone in karstic terrain on Yunnan-Guizhou Plateau, China: implications for chemical weathering and parent materials. *Journal of Asian Earth Sciences*, 67–68, 138–152, 2013.
85. BRINZA, L., *et al.* Incorporation of strontium in earthworm-secreted calcium carbonate granules produced in strontium-amended

and strontium-bearing soil. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 113, 21–37, 2013.

86. MCLAUGHLIN, J. W.. Biogeochemical cycling and chemical fluxes in a managed northern forested wetland, Michigan USA. *Forest Ecology Management*, 261, 649–661, 2011.

ANEXO

Trabalhos publicados durante o doutorado (2011-2016)

De Carvalho Junior, R. M. Dos santos, Jéssica A. ;Silva, Jessee A. S. ; Do Prado, Thiago G. ; Da Fonseca, Adriel Ferreira ; Chaves, Eduardo S. ; Frescura, Vera L. A. . Determination of metals in brazilian soils by inductively coupled plasma mass spectrometry. Environmental Monitoring and Assessment (dordrecht. online) v. 187, p. 535, 2015.

Freitas, Paula Cristiana de ;**Carvalho, Rui Miguel de** ; Silva, Jessee Severo Azevedo ; Prado, Thiago ; Duarte, Elis Regina ; Frescura, Vera L. A. ; Chaves, Eduardo S. Ultrasound-assisted extraction for colorimetric determination of iron in soil: a comparison with inductively coupled plasma mass spectrometry. Química Nova (impresso), v. 38, p. 570-574, 2015.

Silva, A. H. ; Locatelli, C. ; Filho, U. P. ; Gomes, B. F. ; **De Carvalho Junior, R. M.**; De Gois, J. S. ; Borges, D. L. ; Creczynski-pasa, T. B.Visceral fat increase and signals of inflammation in adipose tissue after administration of titanium dioxide nanoparticles in mice. Toxicology and Industrial Health, v. 1, p. 1-12, 2015.

De Carvalho Junior, R. M.; May Junior, J. A. ; Camera, A. S. ; Bascuna, V. L. A. F. ; Quigley, H. ; Hoogesteijn, R. ; Crashaw, P. ; Tortato, F. R. ; Morato, R. G; Sartorello, I. ; Rampim, I. ; Habersfeld, M. ; Paula, R. C. Mercury analysis in hair of free-ranging jaguars (*panthera onca*) in Pantanal, Brazil. In: latin american congress of clinical and laboratorial toxicology, 2014, porto alegre. technological development for the advances of toxicology and promotion of health, 2014.

De Carvalho Junior, R. M.; Silva, Jessee S.A ; Bascuñan, V. L. A. F. ; Oliveira, F. J. S. Determinação multielementar de elementos-traço em solo proveniente de áreas impactadas. In: XXXIV congresso brasileiro de ciência do solo, 2013, florianópolis. anais do XXXIV congresso brasileiro de ciência do solo, 2013.

De Carvalho Junior, R. M.; Salvador, G. ; Gois, J. S. ; Bascuñan, V. L. A. F. ; borges, d. l. g. ; oliveira, f. j. s. . determinação de elementos traço em frações de *helianthus annuus* (girassol) usando icp-ms. in: encontro

nacional de química analítica, 2013, belo horizonte. encontro nacional de química analítica : química analítica e qualidade de vida, 2013.

De Carvalho Junior, R. M; May Junior, J. A. ; Bascuna, V. L. A. F. ; Moraes, E. A. ; Quigley, H. A técnica de icp-ms aliada a medicina de conservação de onças-pintadas (*panthera onca*) no brasil. in: encontro nacional de química analítica, 2013, belo horizonte. encontro nacional de química analítica: Química analítica e qualidade de vida, 2013.

Chaves, E. S. ; **Carvalho Júnior, R. M.** ; Andrade, R. M. ; Bascuna, V. L. A. F.; Curtius, A. J. Determinação de mercúrio em glicerina por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio. in: 16º encontro nacional de química analítica, 2011, campos do Jordão. 16º encontro nacional de química analítica, 2011.