

Maria das Graças Patel

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CHUMBO,
CÁDMIO E COBRE EM AMOSTRAS DE *HELIANTHUS
ANNUUS* (GIRASSOL) UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM
FONTE CONTÍNUA, ATOMIZAÇÃO EM FORNO DE GRAFITE
E ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química Analítica.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia
Azzolin Frescura Bascuñan.

Florianópolis
2017

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

Patel, Maria das Graças

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de chumbo, cádmio e cobre em amostras de *helianthus annuus* (girassol) utilizando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, atomização em forno de grafite e análise direta de sólidos / Maria das Graças Patel; orientadora, Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan, 2017. 84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

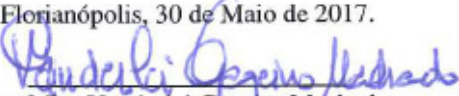
1. Química. 2. Fitorremediação. 3. Girassol. 4. Análise direta de amostra sólida. 5. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. I. Bascuñan, Vera Lúcia Azzolin Frescura. II. Silva, Jessee Severo Azevedo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Maria das Graças Patel

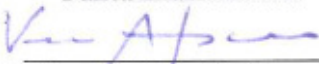
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CHUMBO,
CÁDMIO E COBRE EM AMOSTRAS DE *HELIANTHUS
ANNUUS* (GIRASSOL) UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM
FONTE CONTÍNUA, ATOMIZAÇÃO EM FORNO DE GRAFITE
E ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
"Mestre em Química Analítica" e aprovada em sua forma final pelo
Programa Pós-Graduação em Química.

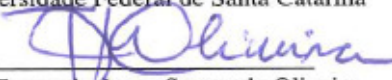
Florianópolis, 30 de Maio de 2017.

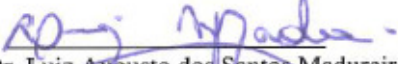

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso


Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina


Dr. Fernando Jorge Santos de Oliveira
Universidade Petrobras- Petrobrás


Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina


Dr. Waldemar Pacheco de Oliveira Filho
Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicomustível

Dedico este trabalho à Deus Pai, Jesus Cristo, ao Espírito Santo, à minha família e ao Gustavo Myrria Neto por estarem sempre presentes na minha vida e me amarem incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor todo poderoso com o qual fiz uma aliança eterna de fidelidade e amor. Ao meu libertador Jesus Cristo, que deu a Sua vida por mim. Ao meu doce amigo Espírito Santo que convence o mundo do pecado, da justiça e do juízo!

Aos meus pais, Nicola Patel e Maria Terezinha Perin Patel, ao meu irmão Nicola Patel Filho e ao meu tio Bruno Patel, que sempre me deram amor, apoio, suporte e consolo. Amo vocês!

Agradeço à professora Dr.^a Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan e à Dr.^a Jessee Severo Azevedo Silva pela oportunidade, ensino e dedicação prestados a mim, sem nunca perder a paciência e o bom humor.

Aos meus irmãos Gustavo Myrria Neto e Bianca Cardoso Gasparini que não mediram esforços para ajudar na concretização deste projeto. Sem a ajuda de vocês não conseguiria finalizar. Muito obrigada sempre!

Aos colegas Juliano Carvalho Ramos e Waldemar Pacheco de Oliveira filho por dividirem comigo, com humildade, seus conhecimentos técnicos e várias histórias, proporcionando um ambiente de trabalho agradável e alegre.

Aos amigos Antonio Fernando Dias Júnior, Edgar Correa Veras, Marcelo Gabriel Nogueira dos Santos e à Luiza Araújo pelos momentos divertidíssimos que passamos como as madrugadas estudando e as vezes que vimos o nascer do sol!!! Com vocês tive momentos extremamente felizes, com muitos risos!!

A todos os membros da Segunda Igreja Batista na Ilha de Florianópolis, pelos momentos descontraídos e por serem meus intercessores: obrigada por todo carinho ao longo dessa trajetória.

À banca examinadora, por ter aceitado avaliar este trabalho, em especial o Dr. Fernando Jorge Santos de Oliveira em quem eu pude ver a amor de Cristo em seu viver.

Por fim, à todas as pessoas que direta ou indiretamente apoiaram este trabalho.

I've tried so hard and got so far, but in the end it
doesn't even matter.

Linking Park, 2000

RESUMO

Várias espécies de vegetais têm a capacidade de remover ou estabilizar metais de solos e águas, acumulando-os nas diferentes partes da planta. Por questões ambientais, econômicas e ocupacionais, o conteúdo de contaminantes, nas plantas utilizadas na fitorremediação, deve ser conhecido antes do gerenciamento e foi a motivação para o desenvolvimento e validação de metodologias para a determinação de Pb, Cd e Cu nas diferentes partes do *Helianthus annuus* (girassol): raiz, caule, folhas, pétalas e coroa. A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua foi a técnica utilizada para a determinação elementar através da introdução direta de sólidos. O programa de temperaturas do forno de grafite foi otimizado e um estudo da estabilidade dos analitos sem e com modificador químico universal Pd/Mg foi realizado para as frações do girassol e para padrões aquosos dos três analitos. O uso do modificador apresentou resultados satisfatórios para a determinação de Pb e Cd, tornando possível o uso da mesma temperatura de pirólise e atomização em todas as partes do girassol e a utilização de curvas analíticas aquosas. Para a determinação do Cu não foi obtido melhorias com o uso do modificador Pd/Mg, então este não foi adotado para as determinações, que foram realizadas usando a curva analítica sólida. Os parâmetros de validação avaliados para os métodos foram: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A exatidão dos métodos foi avaliada por meio de materiais de referência certificados (CRM) e pelo conceito de erro normalizado (E_N). Este foi calculado após estimar-se a incerteza expandida (U). Os valores de Pb, Cd e Cu encontrados nos materiais de referência certificados com seus respectivos valores de U e E_N foram: $12,4 \pm 4,65 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,115$; $2,54 \pm 0,739 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,0$; $12,7 \pm 3,70 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,990$. Os limites de detecção (LOD) obtidos para o Pb e Cd pela análise direta de sólidos, obtidos de dez medidas da solução do modificador químico Pd/Mg, foram $0,491$ e $0,167$ ng, respectivamente. Para o Cu o LOD foi obtido através do branco instrumental com dez medições da plataforma vazia, cujo valor foi de $0,180$ ng. Os valores obtidos das determinações nas frações do girassol variaram entre $0,294$ e $34,2 \mu\text{g g}^{-1}$ (para Pb); $0,07$ e $0,189 \mu\text{g g}^{-1}$ (para Cd) e $5,13$ e $27,16 \mu\text{g g}^{-1}$ (para Cu).

Palavras-chave: Chumbo. Cádmiio. Cobre. Fitorremediação. Girassol. Análise direta de amostra sólida. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.

ABSTRACT

Removal of metal from contaminated soils and water has been accomplished through the ability of some plants in absorbing and stabilizing the elements in different parts. Because of Environmental, economic and occupational concerns the content of contaminants in plants used in phytoremediation must be known before the management and it was the motivation for the development and validation of methods for Pb, Cd and Cu determination in the different parts of *Helianthus annuus* (sunflower): roots, stalk, leaves, petals and head flowers. High resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry was the technique used for elemental determination through the direct introduction of the solid samples. Temperature program of the graphite furnace was optimized as well as the use of Pd/Mg as chemical modifier. For Cd and Pb the addition of the modifier improved the intensities and made it possible the use of the same pyrolysis temperature and aqueous calibration solutions. For Cu no improvements were achieved with the use of Pd/Mg modifier and it was not adopted for determinations, which were carried out using solid calibration curve. Validation parameters applied to the methods were accuracy, precision, sensitivity, selectivity, linearity, work range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Accuracy was evaluated through certified reference materials (CRM) and normalized error concept (E_N), calculated after the estimation of the expanded uncertainty (U). Concentration values found for Pb, Cd and Cu in certified reference materials and the respective U and E_N values were $12.4 \pm 4.65 \mu\text{g g}^{-1}$ and 0.115; $2.54 \pm 0.739 \mu\text{g g}^{-1}$ and 0.0; $12.7 \pm 3.70 \mu\text{g g}^{-1}$ 0.990. For Cd and Pb LOD values were calculate based on ten measurements of the chemical modifier Pd/Mg solution and were 0.491 and 0.167 ng, respectively. For Cu LOD was calculated based on instrumental blank noise, through ten measurements of the empty platform and it was 0.180 ng. Concentration values obtained for the analytes in sunflower parts ranged between 0.294 and $34.2 \mu\text{g g}^{-1}$ (for Pb); 0.07 and $0.189 \mu\text{g g}^{-1}$ (for Cd) and 5.13 and $27.16 \mu\text{g g}^{-1}$ (for Cu).

Keywords: Lead. Cadmium. Copper. Phytoremediation. Sunflower. Direct solid analysis. High resolution atomic absorption spectrometry.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	18
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 ELEMENTOS RELACIONADOS	24
2.1.1 Cádmio	24
2.1.2 Chumbo	25
2.1.3 Cobre	26
2.1.4 Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto ao cádmio, chumbo e cobre	27
2.2 FITORREMEDIAÇÃO	28
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	30
2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA	31
2.5 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS EM ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 EXPERIMENTAL	37

4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1.1	Instrumentação.....	37
4.1.2	Reagentes e amostras	37
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
4.2.1	Preparo das amostras.....	38
4.2.2	Tratamento dos materiais e reagentes utilizados.....	39
4.2.3	Procedimentos analíticos	39
4.2.4	Parâmetros de validação	40
4.2.5	Incerteza de medição.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES TÉRMICAS	44
5.2	PARÂMETROS QUANTITATIVOS	49
5.2.1	Determinação de Pb	49
5.2.2	Determinação de Cd.....	62
5.2.3	Determinação de Cu.....	69
5.2.4	Parâmetros de validação: resultados	78
6	CONCLUSÃO	80
7	REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Cd por análise direta de sólidos nas frações de <i>Helianthus annuus</i> por SS HR CS GF AAS.....	44
Figura 2 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Pb por análise direta de sólidos nas frações de <i>Helianthus annuus</i> por SS HR CS GF AAS.....	45
Figura 3 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Cu por análise direta de sólidos nas frações de <i>Helianthus annuus</i> por SS HR CS GF AAS.....	46
Figura 4 Curvas de pirólise e atomização obtidas por SS HR CS GF AAS para padrões aquosos de Cd, Pb e Cu.....	48
Figura 5 Curva analítica aquosa com calibração externa para a determinação de Pb em amostras de plantas.....	50
Figura 6 Diagrama de causa e efeito para a metodologia de determinação de Pb.	51
Figura 7 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o chumbo na amostra Raiz e na linha analítica 217,0005 nm. $T_{pir} = 1500\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{atom} = 2600\text{ }^{\circ}\text{C}$	62
Figura 8 Curva analítica aquosa para determinação de Cd em amostras de plantas.	63
Figura 9 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o cádmio na amostra Folha e na linha analítica 228,8018 nm. $T_{pir} = 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{atom} = 2000\text{ }^{\circ}\text{C}$	69
Figura 10 Curva analítica sólida com calibração externa para a determinação de Cu em amostras de plantas.....	70
Figura 11 Diagrama de causa e efeito para a metodologia de determinação de Cu.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros de validação e suas respectivas metodologias de determinação e critérios de aceitação.....	42
Tabela 2 Programa de temperatura otimizado para a determinação de Pb, Cd e Cu em amostra de girassóis.....	48
Tabela 3 Parâmetros de validação para a determinação de Pb por SS HR CS GF AAS.....	50
Tabela 4 Incerteza final para a determinação Pb em CRM 1572 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	57
Tabela 5 Incerteza final para a determinação de Pb em girassol na fração raiz por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	60
Tabela 6 Resultados das determinações de Pb por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1572Di125x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1572Di125x e Folha.....	61
Tabela 7 Parâmetros de validação para a determinação de Cd por SS HR CS GF AAS.....	63
Tabela 8 Incerteza final para a determinação de Cd em CRM 1573 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	65
Tabela 9 Incerteza final para a determinação de Cd em girassol na fração pétalas por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	67
Tabela 10 Resultados das determinações de Cd por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1573Di15x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1573Di15x e Pétalas.....	68
Tabela 11 Parâmetros de validação para a determinação de Cu por SS HR CS GF AAS.....	70
Tabela 12 Incerteza final para a determinação de Cu em CRM 1572 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	74

Tabela 13 Incerteza final para a determinação de Cu em girassol na fração pétalas por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.....	76
Tabela 14 Resultados das determinações de Cu por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1572Dil25x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1572Dil25x e Folha.	77
Tabela 15 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o cobre na amostra Raiz e na linha analítica 324,7540 nm. $T_{\text{pir}} = 1500\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{atom}} = 2700\text{ }^{\circ}\text{C}$	78
Tabela 16 Parâmetros de validação e seus respectivos valores e critérios de aceitação.....	79

LISTA DE SIGLAS

AAS – Espectrometria de absorção atômica (do inglês *atomic absorption spectrometry*)

CRM – Materiais de referência certificados (do inglês *certified reference material*)

ICP MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*)

LOD – Limite de detecção (do inglês *limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*)

SS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de sólido (do inglês *solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

SS HR CS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, forno de grafite e análise direta de sólido (do inglês *solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

1 INTRODUÇÃO

A industrialização, o desenvolvimento urbano e atividades agrícolas liberam no meio ambiente substâncias capazes de causar enormes impactos ambientais, em especial a degradação dos solos. Dentre tais substâncias, destacam-se os metais.

A remediação do solo é importante para proteger o meio ambiente de seus efeitos tóxicos e assim conservá-lo para as gerações futuras. Abordagens físico-químicas foram desenvolvidas para tratar solos contaminados; contudo, tecnologias biológicas têm se destacado por sua viabilidade econômica e ambiental. Dentre estas tecnologias destaca-se a fitorremediação, a qual tem sido cada vez mais utilizada (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015).

O potencial de fitorremediação é verificado a partir da capacidade da planta de hiperacumular contaminantes. Há diversas famílias de plantas com capacidade de acumular contaminantes e uma das mais importantes é a *Asteraceae*. Desta família, destaca-se a espécie *Helianthus annuus*, popularmente conhecida como girassol. Este é muito utilizado para a remediação de contaminantes metálicos (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015).

Cádmio, chumbo e cobre são metais comumente encontrados em áreas poluídas (KAPOURCHAL, PAZIRA e HOMAE, 2009), sendo que o primeiro e o segundo não apresentam nenhuma atividade biológica vital, são altamente tóxicos e bioacumulativos; o terceiro elemento, apesar de ser essencial em muitos sistemas biológicos, um desequilíbrio em seu teor causa efeitos nocivos aos seres humanos. Estes metais estando no solo em quantidades significativas podem contaminar alimentos e águas e, por estas vias, causar exposição indevida.

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, forno de grafite e análise direta de sólido (SS HR CS GF AAS) é uma técnica seletiva para a determinação de metais em diversos tipos de amostras, incluindo as biológicas, como tecidos do girassol. A amostragem sólida propicia análises com o mínimo preparo de amostra, consequentemente, há uma redução nos riscos de contaminação e no tempo gasto nesta etapa (KRUG e ROCHA, 2016).

Neste contexto, o presente trabalho visa a determinação de Cd, Pb e Cu em girassol fracionado em raiz, caule, folhas, pétalas e coroa utilizando a espectrometria de absorção atômica com amostragem sólida. O objetivo de se determinar a concentração dos analitos em diferentes partes da planta é saber onde ocorre maior acumulação, para a

disposição ambiental do girassol contaminado após o processo de fitorremediação do solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ELEMENTOS RELACIONADOS

2.1.1 Cádmio

O cádmio é obtido a partir da refinação de complexos de zinco e outros metais, pois não há nenhum mineral específico de Cd que possa ser explorado economicamente. Também se pode obtê-lo por meio da reciclagem de materiais, como baterias de Zn-Cd. No que se refere aos usos deste metal na indústria, podem-se citar os seguintes: revestimento de metais, a fim de torná-los mais resistentes; em plásticos, como estabilizadores; em tintas como pigmento amarelo e em baterias (KABATA-PENDIAS, 2011; BATALHA e PARLATORE, 1977).

A concentração média mundial de Cd no solo é estimada em $0,41 \text{ mg kg}^{-1}$. Em solos não contaminados, seus conteúdos são altamente regidos pela textura do solo e variam de $0,01$ a $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ em solos arenosos e de $0,2$ a $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ em solos argilosos. Cádmio ocorre naturalmente e pode ser adicionado ao solo por meio de atividades naturais; por exemplo, erupção vulcânica e intemperismo de rochas contendo Cd, e por ações antropogênicas, que ocasionam uma deposição mais superficial, como trabalhos com minérios de zinco, incineração de resíduos, queima de combustíveis fósseis e utilização de fertilizantes fosfatados. O Centro Internacional de Desenvolvimento de Fertilizantes determinou o teor de Cd em rochas fosfatadas dos depósitos brasileiros de Araxá e Catalão obtendo-se os valores 2 e $< 2 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Estes níveis são um dos menores (os maiores são 87 e 92 mg kg^{-1} no Senegal e Estados Unidos, respectivamente) entre os maiores produtores deste tipo de fertilizante (KABATA-PENDIAS, 2011; ROBERTS, 2014)

Quando nascem, os seres humanos não apresentam Cd no organismo, porém há um acúmulo durante a vida de 20 a 30 mg do metal. A exposição humana ao cádmio se dá via gastrointestinal, através do consumo de alimentos e água contaminados, sendo os vegetais e os cereais as fontes mais significativas de Cd na dieta. A adsorção ocorre no duodeno e os íons Cd^+ alcançam o fígado complexados com a proteína metalotioneína e são transmitidos pelo sangue até os rins. Outra forma de exposição é por meio da inalação, principalmente em fumantes de cigarro de tabaco e pela exposição ocupacional. Estima-se que 70%

do Cd inalado é adsorvido pelo organismo (COZZOLINO, 2009; PIADÉ, JACCARD, *et al.*, 2015; BATALHA e PARLATORE, 1977).

Sendo cumulativo e de alta toxicidade, o cádmio causa sérios danos ao organismo humano e acumula-se, em particular, nos rins e fígado (COZZOLINO, 2009). Este elemento provoca danos renais ocasionando o surgimento de glicose e proteínas de baixo peso molecular na urina, e, com a contínua exposição ao metal, este quadro clínico pode evoluir e causar distúrbios no metabolismo do Ca. Cádmio tem sido associado ao desenvolvimento de câncer de pulmão, pâncreas, mama, próstata, endométrio e bexiga (PIADÉ, JACCARD, *et al.*, 2015). Experimentos efetuados em animais demonstraram que a placenta constitui uma barreira efetiva à transferência de cádmio ao feto (BATALHA e PARLATORE, 1977).

2.1.2 Chumbo

O chumbo é obtido a partir de seus minérios sulfeto, sendo o principal a *galena*, PbS. Nos Estados Unidos, mais de 90 % da produção de Pb é a partir da reciclagem de baterias de Pb-ácido. A durabilidade – inércia química, alta densidade e a maleabilidade deste metal o tornam vastamente aplicável. Devido a sua inércia, o Pb pode ser utilizado para transportar ácido sulfúrico concentrado à quente e a sua densidade o possibilita ser utilizado como protetor radiológico, uma vez que há um grande número de elétrons para absorver a radiação de alta energia (SHRIVER e ATKINS, 2008; ATKINS e LORETTA, 2006; HOLZBACH, BARROS, *et al.*, 2012). O maior uso mundial deste metal é em baterias, também é usado em soldas, tintas, cabos e ligas. Recentemente, o uso de chumbo como aditivo em combustíveis foi proibido na maioria dos países (KABATA-PENDIAS, 2011).

O valor médio global de chumbo no solo é estimado em 27 mg kg⁻¹, sendo mais concentrado em solos argilosos (granulometria fina) do que arenosos (granulometria grossa). Geralmente, o Pb é acumulado perto da superfície do solo, principalmente devido à sua afinidade com a matéria orgânica (KABATA-PENDIAS, 2011). As plantas não extraem facilmente o Pb do solo e a presença deste elemento, em plantas, ocorre devido à contaminação do solo. Estudos estimam que o Pb, em baixas e altas concentrações, é retirado do solo através das raízes e que este processo é dependente do solo e da planta (COZZOLINO, 2009; KABATA-PENDIAS, 2011).

Países tecnologicamente desenvolvidos apresentam amplo uso de Pb, aumentando os riscos a que está submetida a população. Quando

presente no solo os seres humanos são expostos por meio de duas fontes: a cadeia alimentar e a inalação de poeira do solo. Os alimentos mais importantes considerados como fontes são frutas, vegetais folhosos, cereais, crustáceos, moluscos e vinhos (COZZOLINO, 2009; KABATA-PENDIAS, 2011; COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2006).

Em um homem adulto a quantidade de chumbo no corpo é em torno de 100 a 400 mg, sendo mais concentrado nos ossos, e tende a aumentar com a idade, pois apresenta tempo de meia vida de 20 anos. O chumbo não apresenta nenhuma função vital no organismo humano; entretanto, exibe efeitos adversos, como por exemplo: queimadura na boca, inflamação no trato intestinal, anorexia, paralisia, anemia, distúrbios visuais e convulsões. Uma dieta deficiente em elementos essenciais como Ca, P, Fe, Cu e Zn, tende a aumentar a absorção e retenção de Pb (BATALHA e PARLATORE, 1977; COZZOLINO, 2009).

2.1.3 Cobre

O cobre apresenta forte afinidade com o enxofre então, basicamente, seus minérios são compostos por Cu e S. Um dos minérios principais é a *calcopirita*, CuFeS_2 , sendo a principal fonte de obtenção deste elemento. Por apresentar propriedades versáteis e uma vasta gama de compostos, o cobre tem uma ampla faixa de aplicações. É utilizado para a produção de defensivos agrícolas, fertilizantes, fios elétricos, tubos e, devido as suas propriedades bacteriostáticas, é adicionado à forragem animal (ATKINS e LORETTA, 2006; KABATA-PENDIAS, 2011).

A média de cobre na crosta terrestre é de 55 mg kg^{-1} , com teores maiores em solo argiloso e menores em solo arenoso. A contaminação do solo por Cu ocorre pelo uso de agroquímicos, adubos, resíduos urbanos e industriais e, nos solos agrícolas, pela qualidade da água utilizada na irrigação. Níveis de cobre em áreas contaminadas de origem industrial podem ultrapassar 4000 mg kg^{-1} e de origem agrícola 1500 mg kg^{-1} . Nas plantas, este metal entra pelas células das raízes em formas dissociadas, apesar de neste tecido o cobre ser encontrado em formas complexadas (KABATA-PENDIAS, 2011; SODRÉ, LENZI e COSTA, 2001).

O Cu está amplamente distribuído nos alimentos, e suas melhores fontes são: fígado, ostra, caju, castanha-do-brasil e avelã. Estas fontes fornecem teores de aproximadamente 10 a $1,0 \text{ mg}$ do mineral por 100 g

de alimento. A ingestão de algumas gramas de sais de Cu já é suficiente para causar uma intoxicação aguda. Quantidades perigosas deste metal podem ser ingeridas quando se armazena alimentos ácidos em recipientes de Cu metálico ou ingestão de alguns gramas de sais de Cu (COZZOLINO, 2009).

Nos seres humanos, a ingestão diária de cobre é da ordem de 2 a 5 mg e as necessidades diárias para um adulto são estimadas em 2 mg L^{-1} e para crianças na idade pré-escolar $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (BATALHA e PARLATORE, 1977). Os níveis de Cu nas células são altamente controlados e praticamente não existe Cu sem estar complexado, uma vez que ele, na forma livre, é altamente tóxico (SHRIVER e ATKINS, 2008). Nos organismos humanos, este elemento, previne anemia, doenças ósseas, danos celulares, entre outros (RODRIGUES, SILVA e GUERRA, 2012). Em quantidades excessivas pode produzir vômitos e estragos ao fígado (BATALHA e PARLATORE, 1977). As doenças autossômicas de Menkes e Wilson têm como principal característica o desequilíbrio nos níveis de Cu; deficiência e acúmulo, respectivamente (SHRIVER e ATKINS, 2008).

2.1.4 Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto ao cádmio, chumbo e cobre

O Conselho Nacional do Meio Ambiente, em sua Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009, atribuiu valores de concentrações para certas substâncias químicas, a fim de fornecer orientações sobre a qualidade e alterações do solo. Os valores limite de Cd, Pb e Cu no solo, sem que haja deletério de suas funções principais, como manter um meio básico para a sustentação da vida e um *habitat* para os seres vivos, são de 1,3; 72 e 60 mg kg^{-1} , respectivamente. A Resolução também atribuiu teores máximos desses metais em solos agrícola, residencial e industrial, nos quais valores acima dos limites apresentam riscos potenciais à saúde humana. Em solo agrícola, para Cd, Pb e Cu, os valores são de 3; 180 e 200 mg kg^{-1} , respectivamente; em solo residencial as concentrações são de 8; 300 e 400 mg kg^{-1} , para Cd, Pb e Cu, respectivamente e em solo industrial, 20; 900 e 600 mg kg^{-1} para Cd, Pb e Cu, nesta ordem.

O Ministério de Planejamento Territorial e Meio Ambiente da Holanda publicou em 1994 a Lista Holandesa de Qualidade do Solo 6530. Nesta lista são apresentados valores de concentrações de certos metais, calculados com base num risco desprezível para a saúde humana e para o meio ambiente. Dessa forma, há indicativos dos níveis da

qualidade do solo para que este possa ser utilizado em qualquer finalidade. Em solos com 0 % de argila e matéria orgânica, as concentrações de Cd, Pb e Cu, em mg kg^{-1} em massa seca são de 0,4; 50 e 15, respectivamente, já para solos com 25 % de argila e 10 % de matéria orgânica, os teores de Cd, Pb e Cu são 0,8; 85 e 36 mg kg^{-1} , respectivamente. A abundância natural de metais é maior em solos argilosos do que em solos arenosos e a matéria orgânica no solo diminui a sua densidade, elevando a concentração de metais por volume de solo. Desta forma, a maior parte das substâncias contaminadoras do solo está ligada à fração argila e orgânica do solo.

2.2 FITORREMEDIAÇÃO

A contaminação do solo por metais representa um grande problema para a saúde humana e meio ambiente e, como não são degradáveis, caso não haja intervenção, serão acumulados no solo durante séculos. Neste âmbito, muitos estudos são realizados para se obter métodos eficientes e economicamente viáveis para a descontaminação destes ambientes. Alguns tipos de abordagens para remediar um solo contaminado, com destaque para processos físico-químicos, são: extração, lixiviação e a tratamento térmico. No entanto, essas abordagens são caras, envolvem a destruição da microbiota nativa e podem ser inviáveis economicamente. Outra alternativa para a descontaminação de solos é a remediação biológica - técnica que envolve plantas e microorganismos para remover contaminantes do ambiente. Ela é dividida em microrremediação e fitorremediação. A primeira utiliza microorganismos para a degradação de compostos orgânicos, porém é ineficaz para a descontaminação de metais no solo. A segunda emprega sistemas vegetais e sua microbiota associada como agentes remediadores, e pode ser melhorada aplicando-se técnicas agrônomicas (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015; MA, RAJKUMAR, *et al.*, 2016; RASKIN, SMITH e SALT, 1997; COUTINHO e BARBOSA, 2007).

A fitorremediação é considerada um dos métodos mais viáveis para a remoção de metais do solo, pois é um processo natural, utiliza energia solar, preserva as propriedades do solo, tem baixo custo e alta aceitação pública. Para maximizar o processo de remediação as plantas devem apresentar certas características, tais como: ser tolerante a um ou mais metais, boa capacidade de absorção de concentrações excessivas de metais, ser altamente competitiva com outros vegetais, ter alta taxa de crescimento, raiz profunda, produzir produtos de alta biomassa acima do

solo e de ser fácil colheita (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015; COUTINHO e BARBOSA, 2007).

A fitorremediação envolve vários mecanismos de descontaminação como: fitoextração, fitoestabilização, fitovolatilização, fitotransformação, rizodegradação, fitodegradação, fitofiltração. Os dois primeiros são os mais comumente utilizados para descontaminação de metais. Na fitoextração o contaminante é retirado do solo pela raiz e deslocado para as partes aéreas da planta, e na fitoestabilização a mobilidade dos poluentes fica limitada na raiz da planta (YANG, LIANG, *et al.*, 2014; BHARGAVA, CARMONA, *et al.*, 2012). A fitovolatilização é baseada na capacidade da planta absorver e posteriormente volatilizar o contaminante, usualmente Se e Hg, e liberá-los na atmosfera (TANGAHU, ABDULLAH, *et al.*, 2011). A fitotransformação transforma contaminantes altamente tóxicos em espécies menos tóxicas, por exemplo, Cr (VI) a Cr (III) (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015). Na rizodegradação, os microorganismos da rizosfera ajudam na degradação de xenobióticos orgânico e na fitodegradação esses compostos são degradados dentro da planta por suas enzimas (TANGAHU, ABDULLAH, *et al.*, 2011; KHAN, 2005). A fitofiltração é o sequestro de poluentes por plantas aquáticas (TANGAHU, ABDULLAH, *et al.*, 2011).

O termo hiperacumuladora é utilizado para classificar as plantas capazes de absorver metais em quantidades muito acima dos níveis fisiológicos. O critério para esta designação varia para os diferentes metais, sendo mais de 100 mg kg⁻¹ de peso seco para Cd, ou mais de 1000 mg kg⁻¹ de peso seco para Ni, Cu ou Pb, ou mais de 10000 mg kg⁻¹ de peso seco para Zn ou Mn, em situações onde a planta se desenvolve em solos altamente ricos em metais (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015; BAKER, MCGRATH, *et al.*, 1994). Há diversas famílias de plantas com capacidade de acumular contaminantes, sendo as principais *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* e *Scrophulariaceae*. Da família da *Asteraceae*, destaca-se a espécie *Helianthus annuus*, popularmente conhecida como girassol (ULLAH, HENG, *et al.*, 2015).

Diversos trabalhos são reportados na literatura para a extração de metais, inclusive radioisótopos, utilizando o girassol (GERHARDTA, GERWINGB e GREENBERGA, 2017; ULLAH, HENG, *et al.*, 2015). Benjaphorn Prapagdee (PRAPAGDEE, CHANPRASERT e MONGKOLSUK, 2013) utilizou o girassol para remediar cádmio do solo e potencializou esta remediação com o uso de rizobactérias. Estes microorganismos promoveram um alongamento da raiz e uma maior

absorção de Cd. Victor Wilson-Corral (WILSON-CORRAL, ANDERSON, *et al.*, 2011) estudou a captação de Au e de Cu, que são extraídos ao mesmo tempo, em detritos de minas, utilizando *Helianthus annuus*. Para induzir a captação dos metais, foi aplicado cianeto às plantas. A concentração média de extração de cobre foi aumentada em um fator de quatro vezes nas raízes, mais de duas vezes para as folhas e de oito para o caule. Niu Zhi-xin comparou a capacidade de acumular e tolerar diferentes concentrações de Cd e Pb por quatro plantas: girassol (*Helianthus annuus*), mostarda (*Brassica juncea*), alfafa (*Medicago sativa*) e ricino (*Ricinus communis*) em culturas hidropônicas. Essas quatro plantas extraíram Cd e Pb, porém, em geral, o girassol foi a que apresentou maior capacidade de acumulação (ZHI-XIN, LI-NA, *et al.*, 2007).

Cristiane D. C. Martins (MARTINS, LIDUINO, *et al.*, 2014) estudou a capacidade do girassol em absorver Pb, Cd, Cu e outros compostos de solo contaminado por uma refinaria de petróleo brasileiro. A remoção de Cd, Pb e Cu foi de aproximadamente 100, 55,8 e 73,3 % respectivamente. Após a remediação com o girassol, o solo foi considerado reabilitado para uso em uma área industrial, de acordo com a legislação federal brasileira

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

A escolha do método de análise se baseia em vários critérios e, idealmente, o método selecionado deve ser validado. É necessária compatibilidade entre o método de determinação das espécies químicas e o de preparo de amostra. Primeiramente, escolhe-se a técnica de determinação e definem-se estratégias de modo a obter resultados que solucionem o problema analítico para, então, posteriormente, definir o método de amostragem e de preparo de amostra.

Várias técnicas analíticas podem ser empregadas para a determinação elementar, como técnicas espectrométricas, eletroanalíticas e nucleares. Cada uma delas está associada a uma série de vantagens e desvantagens e na escolha da técnica e do método de análise todos os critérios - como sensibilidade, seletividade, quantidade de analitos, viabilidade econômica - devem ser considerados. Para análises de vários elementos, opta-se por técnicas multielementares, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) ou a análise por ativação com nêutrons instrumental. Já se a quantidade de analitos for pequena, dá-se preferência por métodos de baixa ou média frequência analítica, como por exemplo, espectrometria

de absorção atômica com atomização eletrotérmica e por geração química de vapor, pois estas apresentam custos operacionais menores. Em amostras com matrizes pouco complexas, sugere-se escolher técnicas eletroanalíticas, que em geral apresentam baixo custo de aquisição e operação. Alguns instrumentos como os de absorção atômica, emissão atômica, fluorescência de raios X e espectrometria de massas já fazem parte do repertório da maioria dos laboratórios de análise de rotina de determinação de metais (JÁNOŠOVÁ, SÝKOROVÁ, *et al.*, 2010; DROBYSHEV, SOLOVYEV, *et al.*, 2017; ZAICHICK e ZAICHICK, 2011; SOUZA, PEREIRA, *et al.*, 2015; GRINYER, ATANACKOVIC, *et al.*, 2007; MOREIRA, 2002; GUO, LI, *et al.*, 2017; SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2009).

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é uma técnica de análise monoelementar, ideal para quando se tem até três analitos. Apresenta um custo de aquisição alto e operacional médio, este é devido ao consumo de Ar, plataforma e tubo de grafite. Entretanto, possui elevada sensibilidade, na ordem de ng g^{-1} e em alguns casos, pg g^{-1} . Também é altamente estabelecida e difundida no mercado, e além da determinação de metais também é possível determinar metalóides, como o enxofre, e halogênios, como o cloro e o bromo (ARCÊNIO, 2016; OZBEK e BAYSAL, 2017).

2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA

Os primórdios da técnica analítica de espectrometria de absorção atômica (AAS) ocorreram devido aos questionamentos feitos pelo cientista australiano Alan Wash, em 1952. Este, com sua vasta experiência em medição da absorção de radiação por moléculas, questionava-se por que os espectros moleculares eram geralmente obtidos na absorção e os espectros atômicos na emissão. O resultado desta reflexão foi não haver nenhuma boa razão para negligenciar os espectros de absorção atômica, pelo contrário, eles pareciam oferecer vantagens sobre os espectros de emissão (WELZ, BECKER-ROSS, *et al.*, 2003; WALSH, 1999). A consideração mais simples feita por ele foi que a linha de absorção mais sensível, na maioria das condições, seria independente da temperatura, diferentemente da intensidade de emissão que dependem da temperatura e do potencial de excitação (WALSH, 1999).

O princípio fundamental da AAS envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte

primária de radiação, por átomos livres no estado gasoso, gerados pelo fornecimento de energia térmica. A intensidade luminosa inicial é diminuída pela quantidade de luz absorvida pelo analito. O sistema de AAS é projetado para detectar somente a intensidade da radiação, associado ao comprimento de onda característico do analito, proveniente da fonte de radiação; portanto, radiações procedentes do próprio analito ou do meio externo, não são detectadas. O uso de fontes especiais de luz e a cuidadosa seleção do comprimento de onda permitem a determinação quantitativa específica de elementos individuais na presença de outros átomos (BEATY e KERBER, 1993).

Os componentes básicos de um espectrômetro incluem fonte de radiação, atomizador, um seletor de comprimento de onda (monocromador) e detector. A função da fonte é emitir as linhas características do elemento em estudo. O sistema de atomização produz átomos no estado fundamental, por meio da aplicação de energia térmica. Os principais atomizadores utilizados são forno de grafite e chama. O monocromador dispersa os vários comprimentos de onda de luz emitidos pela fonte e isola a linha de interesse; esta, é direcionada para o detector, que converte os fótons incidentes em fotoelétrons. A corrente elétrica é, então, amplificada e processada pela eletrônica do instrumento (BEATY e KERBER, 1993).

As fontes de radiação podem ser de linhas ou contínuas. A primeira consiste em lâmpadas que emitem apenas radiação específica para cada elemento, o que torna a técnica altamente seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução, porém requer uma lâmpada para cada analito. A segunda tem uma emissão que compreende a faixa contínua do ultravioleta distante até 190 nm, não sendo necessária a troca de lâmpada para os diversos analitos. Ao se utilizar uma fonte de radiação contínua é necessário o uso de um monocromador de alta resolução (BORGES, CURTIUS, *et al.*; SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2009).

Atualmente é utilizado o monocromador duplo de alta resolução. Este é constituído por um prisma Littrow, uma fenda intermediária variável e uma rede echelle. A radiação, após passar pela nuvem de átomos gasosos, é dirigida ao monocromador e incide no prisma que dispersa um pouco da radiação e seleciona a parte do espectro de interesse; após, esta parte de radiação passa pela fenda intermediária, onde novamente uma parte de radiação é selecionada. Por último, esta radiação passa pela rede echelle que, mais uma vez, dispersa a radiação e, conseqüentemente, fornece a alta resolução do intervalo espectral

selecionado (BORGES, CURTIUS, *et al.*; SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2009).

2.5 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS EM ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Dentre todas as operações de uma sequência analítica, a etapa de tratamento das amostras é a mais crítica, pois é nesta etapa que se cometem mais erros e que se gasta mais tempo. A maioria das amostras submetidas para a análise elementar em AAS encontra-se na forma sólida. Usualmente as amostras são convertidas em soluções ou suspensões por meio de decomposição e dissolução, porém estes procedimentos podem causar erros sistemáticos devido às contaminações ou perdas por volatilização. A atomização eletrotérmica permite que amostras sólidas sejam atomizadas diretamente evitando assim a etapa de dissolução (KRUG e ROCHA, 2016; NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008; SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2009).

Na análise direta de sólidos o preparo da amostra é mínimo, portanto a amostragem direta de sólidos apresenta algumas vantagens quando comparada aos procedimentos convencionais. Uma vez que o tratamento é simplificado, há uma redução no tempo gasto nesta etapa, aumentando, assim a frequência analítica e diminuindo os riscos de contaminação e de perdas de analito. O uso de reagentes é mínimo ou nenhum, desta forma, a periculosidade, os custos e a geração e tratamento de resíduos são minimizados tornando o método ambientalmente favorável (NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008). Um dos passos mais crítico na determinação de Hg é a preparação da amostra devido à sua extrema volatilidade. Uma das soluções possíveis deste problema é a análise direta de amostras sólidas. Petko Mandjukov (MANDJUKOV, ORANI, *et al.*, 2015) determinou Hg em sedimentos marinhos e Souza analisou Hg em fertilizantes fosfatados, ambos por SS HR GF AAS obtendo resultados precisos e exatos.

Para a determinação de metais mais voláteis, geralmente, faz-se necessário o uso de um modificador químico, que tem como objetivo criar um ambiente químico favorável à detecção dos analitos pela melhor separação desses da matriz durante a etapa de pirólise. O modificador atua diminuindo a estabilidade térmica dos concomitantes ou convertendo os analitos voláteis em espécies mais estáveis termicamente, permitindo maiores temperatura de pirólise, favorecendo a prévia remoção da matriz à atomização. Uma mistura de nitratos de Pd

e Mg é considerada como um modificador universal, por ser adequada a vários elementos e não apresentar problemas relacionados à formação de sinal de fundo e contaminações (WELZ, BECKER-ROSS, *et al.*, 2005).

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de sólido (SS GF AAS), o programa de aquecimento permite, em alguns casos, particularmente quando se utiliza modificadores químicos, que tanto soluções analíticas quanto amostras sólidas cheguem às mesmas vias de atomização. Desta forma, tem-se a possibilidade de calibrações com soluções de referência. Quando isto não é possível, deve-se fazer uma calibração sólida com materiais de composição idêntica ou semelhante à da amostra de análise (KRUG e ROCHA, 2016; NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008).

Dayara Virgínia Lino Ávila (ÁVILA, BORGES, *et al.*, 2017) desenvolveu um método para de Cr e Co em alimentos para animais por SS HR CS GF AAS. As amostras foram liofilizadas e moídas em um moinho de bolas. A granulometria foi controlada passando a amostra por uma peneira de 150 μm . A faixa de massa inserida no instrumento foi de 0,017 a 0,090 mg. As calibrações foram feitas por meio de soluções. A exatidão dos métodos foi averiguada por meio de análises de materiais de referência certificados, e a precisão expressa como desvio padrão relativo. Os valores destes desvios foram 8,7% para o Cr e 8,3% para o Co.

O método SS GF AAS necessita a utilização de massas diminutas permitindo microanálises, porém massas muito pequenas tendem a comprometer a representatividade, uma vez que os elementos traço podem não estar distribuídos homogeneamente nos materiais. Uma maneira de contornar esse tipo de problema é por meio da moagem. Amostras finamente moídas são mais homogêneas, pois o tamanho das partículas é reduzido e, desta forma, diminui-se a heterogeneidade na distribuição dos analitos na amostra (KRUG e ROCHA, 2016; NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008).

Deve-se tomar cuidado nas quantidades de massa utilizadas nas análises com amostragem sólida. Miguel A. Belarra (BELARRA, CRESPO, *et al.*, 1997) determinou Cu em complexo vitamínico por SS HR CS GF AAS para estudar se a quantidade de massa inserida no instrumento pode ocasionar resultados errôneos, mesmo com amostras de elevada homogeneidade. Foram realizadas 293 medições com massas variando de 0,1 e 1,3 mg. O estudo constatou que massas inferiores a 0,3 mg ou superiores a 1,1 mg dão resultados superestimados e subestimados, respectivamente. Miguel A. Belarra não conclui uma explicação para esse comportamento, apenas sugere que os resultados

subestimados possam ser por causa de resíduo de matriz presente no atomizador, e para os resultados superestimados não sugere uma explicação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de cádmio, chumbo e cobre em amostras de *Helianthus annuus* (girassol) fracionadas em raiz, caule, folhas, pétalas e coroa utilizando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, atomização em forno de grafite e análise direta de sólidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os programas de temperatura do forno de grafite em amostras de girassol comercial fracionadas em raiz, caule, folhas, pétalas e coroa, para os elementos Cd, Pb e Cu, utilizando a análise direta de sólidos.
- Investigar o uso do modificador químico Pd/Mg.
- Estabelecer os seguintes parâmetros de validação: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação.
- Obter os intervalos de confiança como incertezas de medição expandidas, segundo protocolos metrológicos internacionais.
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de cádmio, chumbo e cobre em amostras de girassóis fracionadas em raiz, caule, folhas, pétalas e coroa.
- Verificar em qual parte ocorre maior acumulação.

4 EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Instrumentação

As medidas foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com um atomizador forno de grafite aquecido transversalmente, munido de plataforma e tubo revestidos com grafite pirolítico. O tubo é fechado e integrado com a plataforma. A introdução das amostras sólidas no instrumento se fez de maneira automatizada, com um sistema que integra uma microbalança de resolução 1 μg , cujo modelo é SSA (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Argônio com pureza elevada > 99,98 % (White Martins, Florianópolis, Brasil) foi empregado como gás de proteção e arraste. Os comprimentos de onda utilizados para os estudos de Cd, Pb e Cu foram 228,812; 217,0005 e 324,7540 nm, respectivamente.

Para a secagem e moagem das amostras sólidas, utilizaram-se a estufa elétrica (Biomatic, Porto Alegre, Brasil) e o moinho vibratório MM200 (Retsch, Düsseldorf, Alemanha), nesta ordem. As amostras foram pesadas na balança M 254Ai com resolução de 0,1 mg (Bel Engineering, Monza, Itália). O armazenamento das soluções e amostras ocorreu com o uso de tubos, conhecidos popularmente como Falcon (Consalab, Ipiranga, Brasil) e o seu manuseio por meio de espátulas de inox. E ainda, utilizou-se um forno microondas Ethos Plus (Milestone, Milão, Italia) para a limpeza de algumas peças do moinho vibratório.

Os volumes pipetados para o preparo de soluções e para adicioná-las no instrumento foram obtidos por meio de micropipetas Transferpette S D-100 10-100 μL mono canal com resolução de 0,1 μL (Brand, Wertheim, Alemanha).

4.1.2 Reagentes e amostras

Os reagentes utilizados possuíam no mínimo grau analítico de pureza. No preparo das soluções, a água utilizada foi destilada em sistema de purificação PURELAB Ultra (Elga Veolia, Reino Unido), a uma resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$ e o ácido nítrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi bidestilado abaixo de seu ponto de ebulição em destilador de ácido de quartzo. Utilizou-se padrões monoelementares de Cd, Pb e Cu (SpecSol, Curitiba, Brasil) com concentração de 1,000 g L^{-1}

em 3 % v/v de HNO_3 para o preparo das soluções de calibração. Nas diluições da amostra biológica foi empregado como solvente celulose microcristalina com padrão analítico (Synth, Diadema, Brasil).

Comprou-se um girassol em uma floricultura de Florianópolis, Brasil, e este foi fracionado em raiz, caule, folha, pétalas e coroa. Não se sabe as condições do solo e o tempo de cultivo do girassol.

Para o preparo da solução do modificador químico, empregou-se as soluções Mg e Pd (Merck, Darmstadt, Germany) com concentrações $10,0 \text{ g L}^{-1}$ e 15 % e 17 % v/v HNO_3 , respectivamente. Utilizou-se o tensoativo Extran[®] MA 02 (MERCK S.A., Rio de Janeiro, Brasil) para a limpeza de tubos e espátulas.

Dois materiais de referência certificados (CRM) foram analisados para verificação da exatidão do procedimento: Tomato Leaves 1573 (CRM 1573) e Citrus Leaves 1572 (CRM 1572), produzidos em conjunto pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Gaithersburg, EUA) e *National Bureal of Standards* (NBS, Washington, EUA). O CRM 1572 estipula um mínimo de 500 mg de material seco para que qualquer determinação analítica seja relacionada com os valores do certificado e o CRM 1573 não apresenta nenhuma evidência de não homogeneidade. Estimou-se a incerteza de medição associada à homogeneidade de ambos os materiais, pois as quantidades utilizadas das amostras foram pequenas ou menores que o mínimo.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Preparo das amostras

O girassol foi separado em raiz, caule, folhas, pétalas e coroa (semente e base da semente) e colocado na estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas. A temperatura utilizada não volatiliza nenhum dos analitos. Após, cada fração foi macerada no moinho vibratório com bolas de ágata, que possui dureza maior que a da amostra fibrosa para evitar contaminações, por 60 minutos e 30 Hz para se obter por meio das sucessivas colisões das esferas com a amostra, partículas de entre 0,1 e $100 \text{ }\mu\text{m}$ e assim, diminuir a heterogeneidade do material biológico (KRUG e ROCHA, 2016). Estas amostras foram denominadas de Raiz, Caule, Folhas, Pétalas e Coroa, respectivamente.

Preparou-se, para os analitos Pb, Cd e Cu, uma solução estoque de concentração $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, a partir dos respectivos padrões elementares de concentração de $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. A partir desta, foi preparada uma segunda solução estoque de concentração de $500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções utilizadas na construção das curvas de pirólise e atomização para o Pb, Cd e Cu, foram feitas a partir da segunda solução estoque, e apresentaram a mesma concentração: $25 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções de trabalho utilizadas nas curvas analíticas aquosas de Pb e Cd foram feitas a partir da segunda solução estoque, com concentrações variando de 0,0 a 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Pb e de 0,0 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd. Em todas as soluções acrescentou-se 1 % de HNO_3 v/v e utilizou-se água destilada.

O modificador químico Pd/Mg, com concentrações de 1,5 e 1,0 g L^{-1} de Pd e Mg, respectivamente, foi preparado, misturando-se volumes apropriados das soluções de modificadores químicos comerciais de Pd e Mg, 1 % de HNO_3 v/v e água destilada.

As amostras sólidas de materiais de referências certificados foram diluídas em celulose microcristalina. O CRM Tomato Leaves foi diluído 25 vezes e o CRM Citrus Leaves 5 e 22 vezes. Esta última diluição foi utilizada apenas como padrão de calibração para a determinação de Cu, com massas variando entre 0,063 mg e 1,865 mg. Quantidades apropriadas e medidas na balança, das amostras e da celulose foram misturadas no moinho vibratório por 60 minutos e 30 Hz. Estas amostras foram denominadas de CRM1572Dil25x, CRM1573Dil5x e CRM1573Dil22x, respectivamente.

4.2.2 Tratamento dos materiais e reagentes utilizados

Os tubos empregados para o preparo e armazenamento dos reagentes e amostras, e as ponteiros utilizadas para pipetar as soluções foram lavados com Extran e água, imersos em solução HNO_3 10 % v/v por no mínimo 24 horas e, por último, lavados três vezes com água destilada. Após esta limpeza, eles foram armazenados para serem reutilizados. As peças do moinho vibratório, que entraram em contato com as amostras, foram lavadas com Extran e água, colocados no forno microondas imersos em solução HNO_3 10 % v/v por 1 hora e, então, lavados três vezes com água destilada, para serem reutilizados. O uso do forno microondas se fez para garantir a total remoção de partículas da amostra da superfície porosa das bolas de ágata do moinho vibratório. As soluções que sobraram das análises, contendo basicamente metais e ácido nítrico, foram tratadas com CaCl_2 e encaminhadas para uma empresa de tratamento de resíduos credenciada pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2.3 Procedimentos analíticos

Os comprimentos de onda utilizados para os estudos de Cd, Pb e Cu foram 228,8018; 217,0005 e 324,7540 nm, respectivamente, que são as suas linhas principais de absorção.

Realizaram-se estudos para otimizar as temperaturas de pirólise e atomização nas amostras Folha, Caule, Pétalas, Coroa e Raiz para os analitos Cd, Pb e Cu. Adicionalmente, estudou-se essas temperaturas com o uso do modificador químico Pd/Mg na amostra Pétalas para os analitos Cd e Pb e nas amostras Pétalas e Coroa para o analito Cu. Construiu-se curvas de pirólise e atomização para os padrões aquosos de Cd, Pb e Cu com e sem modificador químico Pd/Mg. O volume do padrão aquoso colocado na plataforma de grafite foi 20 μL e o volume de modificador químico adicionado sobre a amostra foi de 10 μL . Ambos foram inseridos no instrumento por meio da micropipeta.

Foi investigada a possibilidade de construção de curvas analíticas sólidas (com CRMs) e aquosas (com padrões monoelementares) com e sem utilização de modificador químico Pd/Mg. O volume de solução padrão adicionado na plataforma foi de 20 μL .

As quantificações do Cd e Pb nas amostras foram realizadas, após as otimizações, por meio de calibração aquosa externa com uso do modificador químico, e a verificação da exatidão do procedimento por análises do CRM 1573 diluído 5 vezes para o Cd e do CRM 1572 diluído 25 vezes para o Pb. A curva de calibração para a quantificação do Pb foi construída com seis níveis de massa (0,02; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 ng) e duas vezes em cada. Já a de Cd foi feita com cinco níveis (0,01; 0,02; 0,05; 0,075 e 0,1 ng) e em duplicata. As análises dos CRMs foram feitas com três repetições e com média de massa de 0,042 ng para o Pb e 0,025 ng para Cd.

Para a determinação do Cu foi construído uma curva de calibração sólida externa a partir do CRM 1573 diluído 22 vezes, sem uso de modificador químico. Foram feitos 27 níveis de massa, variando de 0,038 à 1,1 ng, e com uma repetição em cada nível. Para a verificação da exatidão, na determinação de Cu, foi utilizado o CRM 1572 diluído 25 vezes. Fez-se três análises deste material e a média das massas foi de 0,63 ng.

4.2.4 Parâmetros de validação

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de validação determinados neste trabalho e as suas respectivas metodologias para a obtenção dos mesmos e critérios de aceitação. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados baseados nos artigos de Cassiana

Seimi Nomura e Eliana G. Barrera (NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008; BARRERA, BAZANELLA, *et al.*, 2017). Considerou-se o desvio padrão de dez medidas do branco (SD_b) e a inclinação da curva analítica (a). Para as curvas analíticas aquosas, os brancos analíticos foram medidas da plataforma de grafite mais 10 μL de modificador químico Pd/Mg. O branco da curva analítica sólida foi obtido por medidas da plataforma de grafite vazia (BARRERA, BAZANELLA, *et al.*, 2017; NOMURA, SILVA e OLIVEIRA, 2008). Os critérios de aceitação destes limites foram estabelecidos abaixo do que a necessidade do trabalho impõe. Foi estipulado um valor acima de 1 μg para ambos os limites. A exatidão foi averiguada com base no conceito de erro normalizado (E_N) que foi obtido utilizando materiais de referência certificados e a estimativa de incerteza de medição do método. A Equação 1 mostra como é calculado o erro normalizado. O método é considerado exato quando o módulo do resultado é igual ou menor que um (INMETRO, 2010). O critério de aceitação da seletividade foi considerado como a ausência de interferências espectrais, pois estas interferem no desempenho da medição. A sensibilidade é a inclinação da curva analítica, então o método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta (INMETRO, 2010). Não se definiu um critério de aceitação para a sensibilidade. A linearidade foi considerada como o intervalo da curva analítica e o seu critério de aceitação foi de acordo com a recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que é um valor acima de 0,99 (RIBANI, JARDIM, *et al.*, 2004). A precisão foi considerada como a incerteza expandida relativa e o seu critério de aceitação foi estipulado como sendo inferior à 50 %. A faixa de trabalho foi considerada como o intervalo da curva analítica e seu critério de aceitação foi satisfazer os limites instrumentais de linearidade e também os das amostras, dentro de fatores de diluição aceitáveis.

Tabela 1 Parâmetros de validação e suas respectivas metodologias de determinação e critérios de aceitação.

Parâmetro	Metodologia adotada	Critério de aceitação
Exatidão	Erro normalizado	≤ 1
Precisão	Incerteza expandida relativa	$< 50\%$
Sensibilidade	Coefficiente angular	-
Seletividade	Verificação de interferências espectrais	Ausência de interferentes
Linearidade	Coefficiente de correlação	$\geq 0,90$
Faixa de trabalho	Intervalo da curva analítica	-
LOD	$LOD = 3 SD_b/a$	1 ng
LOQ	$LOQ = 10 SD_b/a$	1 ng

$$E_N = \frac{X_{lab} - X_c}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

E_N = erro normalizado.

U_{lab} = incerteza expandida do resultado do laboratório.

U_{ref} = incerteza associada ao material de referência certificado.

X_{lab} = valor obtido no laboratório.

X_c = valor do certificado.

4.2.5 Incerteza de medição

Existem diversos guias que podem ser utilizados para se estimar a incerteza de medição. Dependendo do método proposto, alguns guias se aplicam mais do que outros. Neste trabalho, os cálculos de incerteza de medição foram baseados nas seguintes referências:

(1) Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008 (INMETRO, 2008). Este guia é uma versão em português da primeira edição de 2008 do documento *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement*, feito pelo INMETRO. Este documento apresenta fórmulas genéricas para combinações de diferentes fontes de incerteza, montagens de diagramas de causa e efeito, obtenção de coeficientes de sensibilidade e graus de liberdade efetivos.

(2) EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (EURACHEM/CITAC, 2012). Documento

específico para ensaios químicos e de divulgação europeia. Fundamentou-se nele no que se refere à incerteza de regressão linear.

(3) Guia EURACHEM/RELACRE 1 Exemplos De Cálculos De Incertezas (EURACHEM/RELACRE1, 2002). Esta referência serviu como modelo para considerar os padrões de calibração como fontes independentes de incerteza.

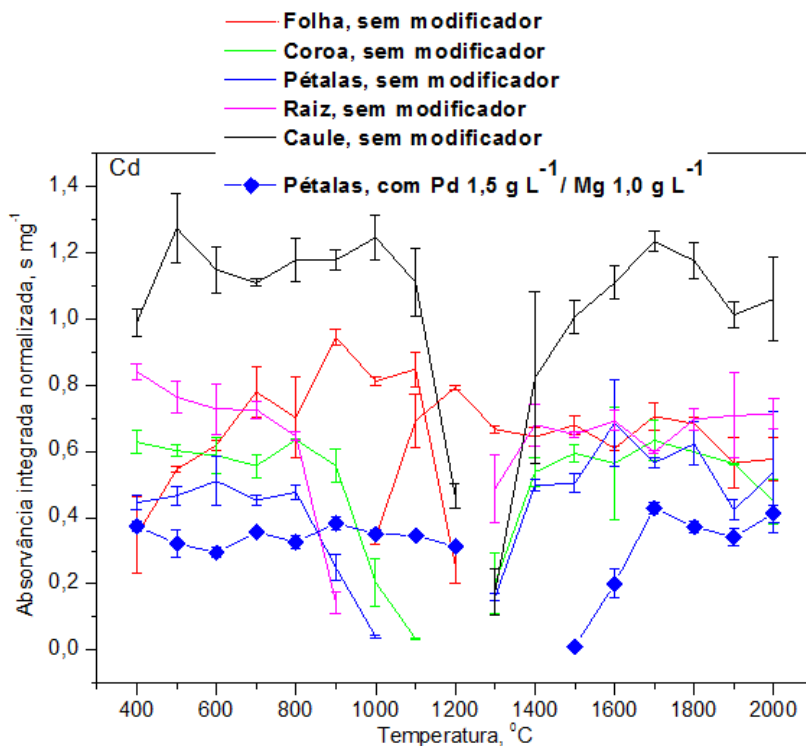
(4) Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos - Documento de caráter orientativo (INMETRO, 2010). Este último material apresenta diversos conceitos relacionados à validação de métodos. Baseou-se nele para verificar a exatidão do método por meio do conceito de erro normalizado, que por sua vez utiliza a incerteza de medição da determinação como uma variável.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES TÉRMICAS

Para estabelecer as temperaturas de compromisso para a amostra e o padrão foram feitas curvas de pirólise e atomização em todas as frações do girassol e em soluções contendo Cd, Pb e Cu. As curvas obtidas estão apresentadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

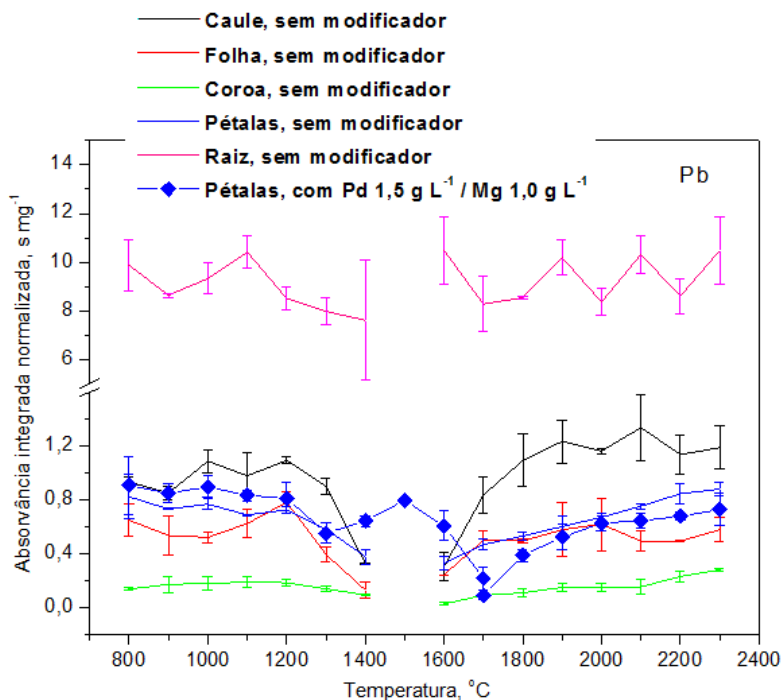
Figura 1 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Cd por análise direta de sólidos nas frações de *Helianthus annuus* por SS HR CS GF AAS.



Na Figura 1 são apresentados as curvas de pirólise e atomização para Cd em diferentes partes do girassol. Nota-se que o perfil da curva de pirólise para as pétalas (sem modificador), raiz e coroa foram semelhantes, apresentando estabilidade térmica até 800 °C. Já para a folha houve um aumento contínuo no sinal até 900 °C. Para as pétalas

com o uso de modificador e a folha sem o uso do modificador, a estabilidade térmica foi mantida até cerca de 1100 °C. Nas etapas de atomização, as pétalas com modificador e o caule sem modificador apresentaram um aumento contínuo no sinal até a temperatura de 1700 °C, em temperaturas superiores, o sinal manteve-se constante. Para as demais frações é observada estabilidade térmica a partir de 1400 °C.

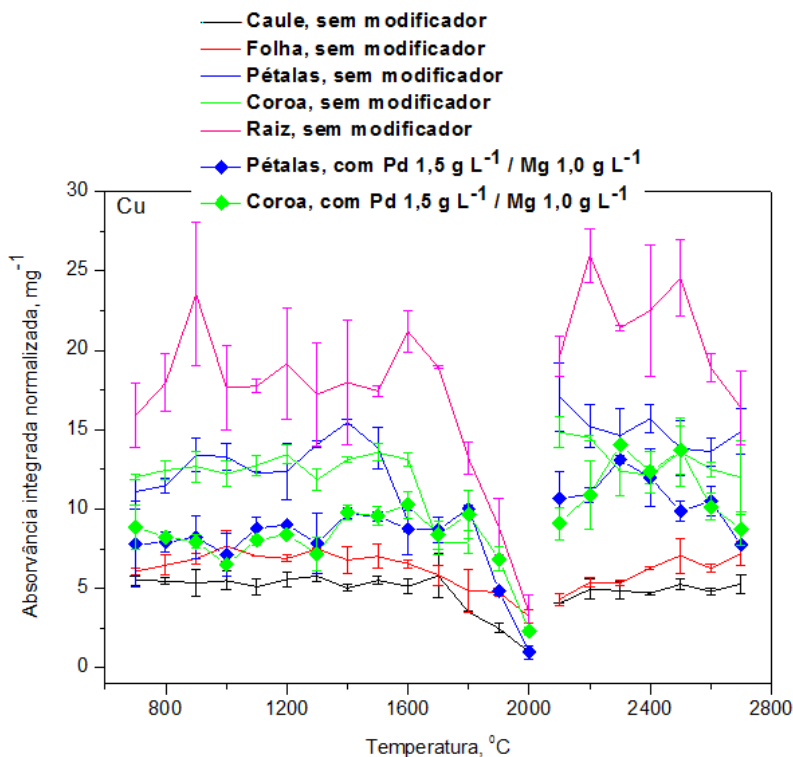
Figura 2 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Pb por análise direta de sólidos nas frações de *Helianthus annuus* por SS HR CS GF AAS.



A Figura 2 apresenta as curvas de pirólise e atomização para as diferentes partes da planta monitorando o Pb. Observa-se que a fração coroa apresentou extensa estabilidade térmica, mantendo o sinal para Pb constante até 1400 °C. Para as demais partes da planta, a estabilidade foi até cerca de 1200 °C. Na etapa de atomização, o caule e as pétalas (com e sem modificador) revelaram aumento de sinal com o aumento da temperatura. Já para as demais partes, pouca diferença é observada nos sinais na faixa térmica de atomização estudada. Observa-se que a

intensidade média do sinal foi significativamente maior na raiz do que para as demais partes da planta, indicando que a técnica de remediação empregada pelo girassol tende a concentrar o Pb na raiz.

Figura 3 Curvas de pirólise e atomização obtidas para a determinação de Cu por análise direta de sólidos nas frações de *Helianthus annuus* por SS HR CS GF AAS.

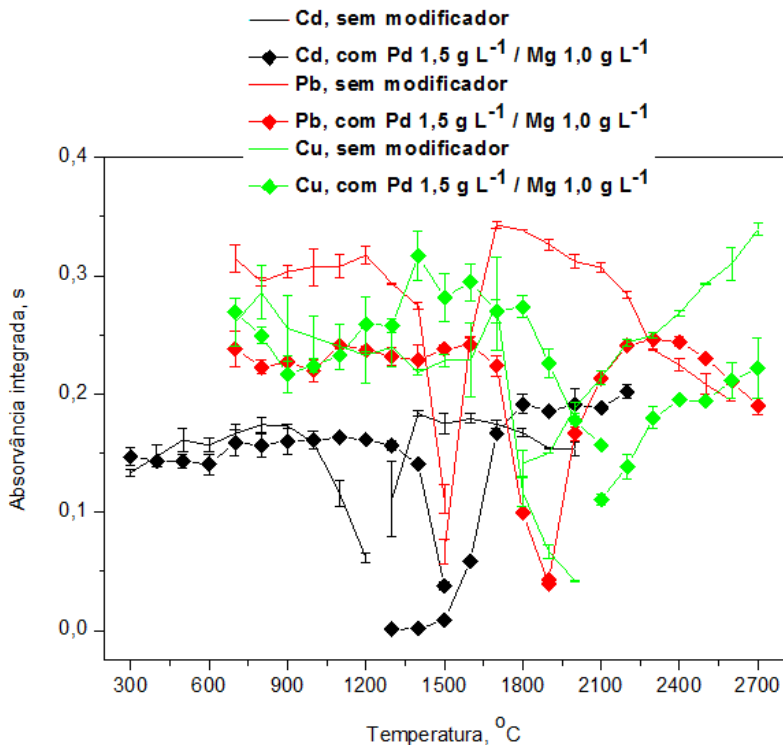


A Figura 3 apresenta as curvas de pirólise e atomização para Cu em diferentes frações do girassol. Visualiza-se que o Cu, dentre os analitos monitorados, é o elemento que possui maior estabilidade térmica, revelando diminuição do sinal apenas em temperaturas acima de 1500 °C, para todas as partes do girassol. Na etapa de atomização, o caule e a folha, foram estáveis na faixa térmica estudada, entretanto, para as demais frações do girassol, temperaturas superiores a 2400 °C ocasionaram diminuição no sinal.

Os sinais de absorvância integrada normalizada para o Cu foram notoriamente mais altos do que para o Cd e Pb nas amostras do girassol, conforme evidenciado nas Figuras 1, 2 e 3. Este comportamento era esperado; pois, diferentemente dos outros metais, o cobre é essencial para a planta do ponto de vista bioquímico. As Figuras 1, 2 e 3, também, mostram que a raiz é a fração do girassol que possui os maiores desvios padrão relativos, possivelmente devido à dificuldade de homogeneização desta parte.

Foram também investigadas as curvas de pirólise e atomização para Cu, Cd e Pb provenientes de padrões aquosos, com e sem a presença de modificador químico Pd/Mg, e estão apresentadas na Figura 4. Este estudo foi proposto com o intuito de aplicar padrões aquosos na realização da curva de calibração, tendo em vista a maior dificuldade no emprego e acesso a padrões sólidos. Nota-se que a presença do modificador químico beneficia a estabilidade térmica de todos os analitos, permitindo empregar temperatura de pirólise de 1400 °C para o Cd, 1700 °C para o Pb e 1800 °C para o Cu. Também possibilita a utilização de temperaturas de atomização mais elevadas para Cd (1700 °C) e para o Pb (2200 °C). Para o cobre, nas curvas de atomização, tanto com quanto sem modificador, observa-se um aumento contínuo no sinal, indicando que até a temperatura estudada, possivelmente, nem todo analito estava atomizado.

Figura 4 Curvas de pirólise e atomização obtidas por SS HR CS GF AAS para padrões aquosos de Cd, Pb e Cu



A Tabela 2 apresenta o programa de temperatura otimizado e que foi utilizado na determinação dos elementos Pb, Cd e Cu nas amostras.

Tabela 2 Programa de temperatura otimizado para a determinação de Pb, Cd e Cu em amostra de girassóis.

Etapa	Temperatura °C	Rampa °C s ⁻¹	Permanência s	Vazão de Ar L min ⁻¹
Secagem I	130	6	25	2
Secagem II	200	4	30	2
Pirólise	1100 ^a /1500 ^{bc}	200	20	2
Atomização	2000 ^b /2300 ^b /2700 ^c	Máxima Potência	8	0
Limpeza	2300 ^a /2600 ^b /2800 ^c	500	4	2

^aCd, ^bPb e ^cCu

Para abranger todas as partes da planta com a mesma temperatura, as análises de Pb e Cd, foram feitas utilizando modificador químico, visto que determinadas partes apresentaram menores temperaturas de pirólise do que outras. As temperaturas ótimas de pirólise foram 1500 e 1100 °C para Pb e Cd, respectivamente. Nas curvas de atomização, o sinal de absorvância ficou mais transiente em temperaturas mais elevadas; desta forma, optou-se por temperaturas de atomização maiores. As temperaturas de atomização selecionadas foram 2300 e 2000 °C, para Pb e Cd, respectivamente. Também, como se utilizou curvas analíticas aquosas na determinação de Pb e Cd, o uso do modificador químico foi essencial para elevar as temperaturas de pirólise e atomização das soluções e assim ficarem próximas das temperaturas das amostras sólidas.

O uso do modificador químico Pd/Mg não agregou nenhuma complexidade na execução do método, e não gerou resíduo, pois o mesmo apresenta elevada durabilidade e pode ser utilizado em outras análises.

Não se utilizou modificador químico para a determinação de Cu; pois, sem a utilização deste, tanto para os padrões aquosos como para as amostras sólidas, as temperaturas de pirólise e atomização, já foram extremamente altas e a temperatura máxima que o instrumento comporta é de 2900 °C. Além disto, as soluções utilizadas para o preparo do modificador químico Pd/Mg apresentavam traços de Cu.

A otimização das condições térmicas se mostrou trabalhosa em consequência da quantidade de amostras e analitos. Porém de fácil execução e sem nenhuma importante periculosidade para o analista, portanto pode ser uma função facilmente delegada. Além da obtenção das temperaturas de compromisso, os experimentos relacionados às otimizações permitiram uma interpretação de quais partes do girassol há maior quantidade dos analitos. As condições assumidas nesta etapa são perfeitamente aplicáveis em qualquer espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.

5.2 PARÂMETROS QUANTITATIVOS

5.2.1 Determinação de Pb

Como descrito no procedimento experimental, a determinação de Pb foi feita por meio de uma curva analítica aquosa com calibração externa utilizando o programa de temperatura previamente otimizado e

modificador químico Pd/Mg depositado sobre a solução padrão. A Figura 5 apresenta a representação gráfica desta curva. A faixa de trabalho, sensibilidade, coeficiente de correlação e os limites de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 3.

Figura 5 Curva analítica aquosa com calibração externa para a determinação de Pb em amostras de plantas.

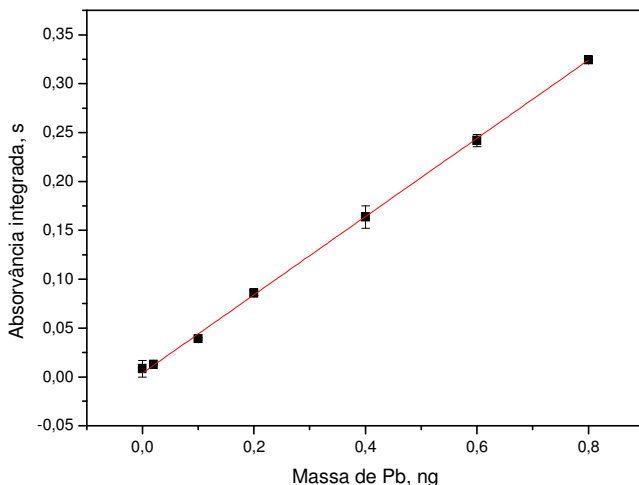


Tabela 3 Parâmetros de validação para a determinação de Pb por SS HR CS GF AAS.

Parâmetros	Valores
Faixa de trabalho	0,02 – 0,8 ng
Sensibilidade	0,398 s ng ⁻¹
Coeficiente de correlação	0,9997
Limite de detecção	5,2 pg
Limite de quantificação	17,2 pg

Conhecendo-se a grandeza mensurável (concentração de Pb em girassol) e a metodologia do trabalho, fez-se um levantamento das grandezas de entrada que podem constituir fontes de erro, e conseqüentemente, afetar o resultado da medição. Com estes termos estabelecidos, foi possível formular a equação do mensurando e

construir um diagrama de causa e efeito para, posteriormente, calcular a incerteza de medição.

A Equação 2 e a Figura 6 apresentam a equação do mensurando e o diagrama de causa e efeito, respectivamente, para a determinação de Pb na amostra de CRM 1572. Este material foi diluído em celulose, pois ele apresenta elevada concentração de Pb. Dependendo do solo em que a planta cresce, é possível que estas apresentem concentrações até maiores que a própria concentração deste CRM ($13,3 \mu\text{g g}^{-1}$).

$$R = \frac{x d}{m C_p} + r + P \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

R = resultado da concentração de Pb na amostra, $\mu\text{g g}^{-1}$.
 x = quantidade de Pb obtida a partir da regressão linear,

ng.

d = fator de diluição.

m = massa inserida no instrumento, mg.

C_p = homogeneidade.

r = repetibilidade do método, $\mu\text{g g}^{-1}$.

P = padrões de calibração, ng.

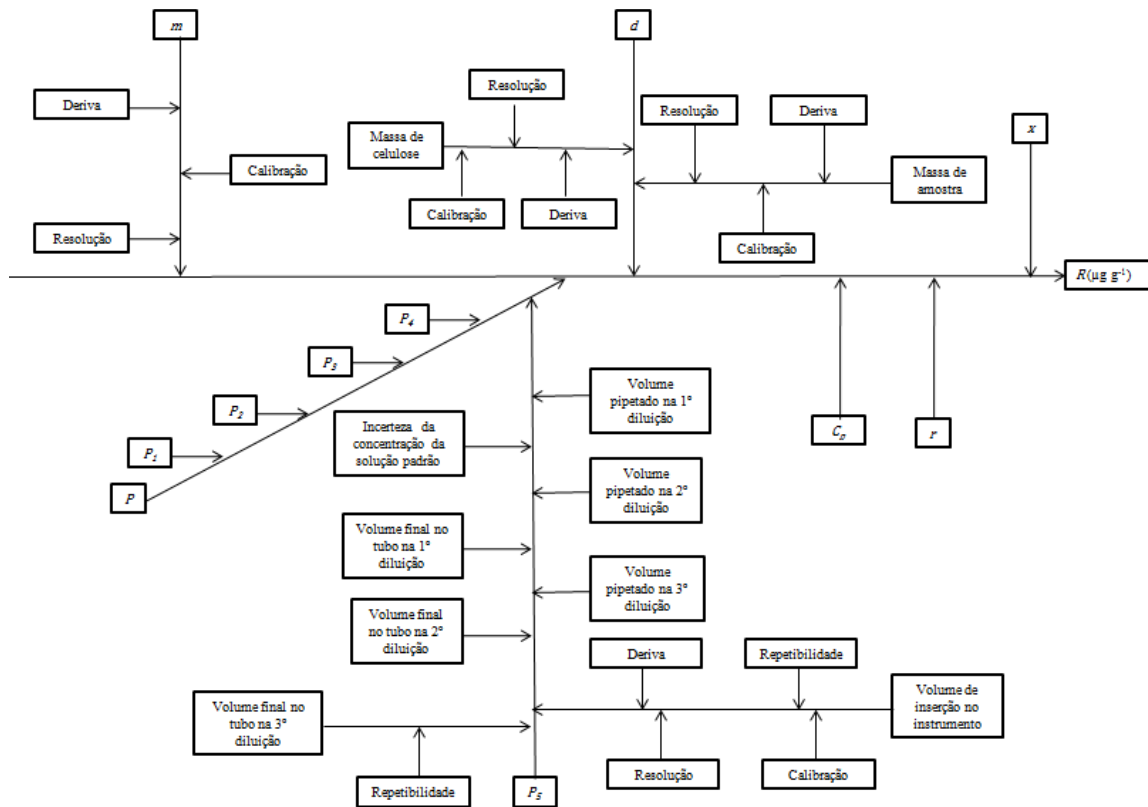
Figura 6 Diagrama de causa e efeito para a metodologia de determinação de Pb.

LEGENDA: R : resultado da quantidade de Pb em material certificado de referência Citrus Leaves 1572 ($\mu\text{g g}^{-1}$); r : incerteza devido à repetibilidade; P : incerteza combinada dos padrões de calibração; P_1 a P_5 : padrões de calibração de 1 a 5; m : incerteza da massa inserida no instrumento; C_p : incerteza devido à homogeneidade; d : incerteza do fator de diluição; x : incerteza da quantidade de Pb na amostra obtida a partir da regressão linear.

NOTA 1: O mesmo exposto na seta do P_3 ocorre para os demais padrões.

NOTA 2: A incerteza que aponta para o volume pipetado para a inserção da solução no instrumento, também ocorre para os outros volumes pipetados.

NOTA 3: As incertezas relacionadas ao volume final no tubo na 3º diluição, de forma semelhante sucedem para as demais diluições.



As fontes de incertezas abordadas podem afetar direta ou indiretamente o resultado. As que afetam diretamente são aquelas que apontam para o eixo principal no diagrama de causa e efeito, e suas grandezas relacionadas estão expostas na equação do mensurando. São elas: as incertezas geradas pela regressão linear (x); a incerteza combinada da concentração dos padrões de calibração (P); a incerteza gerada pela heterogeneidade da amostra (C_p); a incerteza devido à diluição da amostra (d); a incerteza devido à massa de amostra inserida no instrumento (m) e a incerteza gerada pela repetibilidade do método (r).

As fontes de incerteza que afetam indiretamente no resultado não aparecem na equação do mensurando, e não apontam diretamente para o eixo principal do diagrama. Neste trabalho, elas estão relacionadas às medidas de massa (calibração, deriva e resolução), aos volumes pipetados (calibração, deriva, repetibilidade e resolução), aos preenchimentos dos tubos falcon (repetibilidade dos preenchimentos) e à concentração de solução padrão comercial.

A incerteza combinada dos padrões de calibração é discutida se realmente deve ser considerada, pois se tem o entendimento de que ela já esteja incluída na incerteza devido à regressão linear. Neste trabalho, considerou-se a incerteza combinada dos padrões de calibração como uma componente independente, seguindo o modelo apresentado no guia EURACHEM/RELACRE (EURACHEM/RELACRE1, 2002). Já a incerteza oriunda da regressão linear foi estimada de acordo com diretrizes do guia EURACHEM/CITAC (EURACHEM/CITAC, 2012), que utiliza cálculos que refletem a variação aleatória da absorvância (eixo da ordenada) e não a incerteza dos valores das abscisas.

A curva analítica foi feita a partir de cinco padrões de calibração. As incertezas das concentrações de Pb nestas soluções foram estimadas e em seguida, calculou-se a incerteza combinada destes padrões de calibração (somatório das incertezas dos padrões individuais). Para os cálculos da incerteza de cada padrão de calibração, foram consideradas as incertezas da solução padrão comercial, que é fornecida pelo fabricante; dos volumes pipetados e dos volumes finais nos tubos falcon, uma vez que os padrões individuais são preparados por diluições sucessivas a partir do padrão comercial.

Estes tubos não são calibráveis, então foi assumida apenas a incerteza da leitura do volume final do tubo (repetibilidade dos preenchimentos). Para tal, foram efetuados dez ensaios de enchimento com água destilada e, a cada preenchimento, a massa de água era

medida. O volume desta quantidade de massa foi determinado utilizando o valor da densidade da água ($0,9982 \text{ g cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). O desvio padrão destes volumes foi calculado, sendo este valor a incerteza de repetibilidade de enchimento do tubo.

As incertezas dos volumes pipetados envolvem as incertezas de calibração, deriva, resolução e repetibilidade das micropipetas utilizadas. A incerteza de calibração foi obtida a partir do certificado de calibração. A deriva é a incerteza devido à variação do instrumento, gerada pelo uso do mesmo, a partir da data de calibração (CAMERA, 2015). Esta incerteza foi calculada como sendo metade do valor da incerteza de calibração. A incerteza de resolução foi $1,0 \text{ } \mu\text{L}$ (menor divisão da micropipeta) e a de repetibilidade foi calculada de modo semelhante à incerteza de repetibilidade do volume final do tubo falcon. Mediu-se a massa de dez alíquotas de água com mesmo volume na micropipeta e, usando a densidade, foram calculados os seus respectivos volumes e o desvio padrão associado, sendo este a incerteza de repetibilidade dos volumes pipetados.

O coeficiente de sensibilidade de cada fonte de incerteza foi obtido, como sendo a derivada parcial da grandeza geradora da fonte de incerteza em questão em relação ao resultado. Portanto, é importante estabelecer, não somente a equação do mensurando principal (Equação 2), como também, as outras equações relacionadas às grandezas geradoras das fontes de incerteza que afetam o resultado indiretamente, como são os casos das Equações 3 e 4.

Os cálculos, para a obtenção dos valores das quantidades de analito nos padrões de calibração, foram feitos de acordo com a Equação 3.

$$P = \frac{M v v' v'' v'''}{V V' V''} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

P = Padrões de calibração, pg.

M = concentração da solução padrão comercial, mg L^{-1} .

v = volume pipetado na 1ª diluição, μL .

v' = volume pipetado na 2ª diluição, μL .

v'' = volume pipetado na 3ª diluição, μL .

v''' = volume de solução inserida no instrumento, μL .

V = volume final no tubo na 1ª diluição, mL .

V' = volume final no tubo na 2ª diluição, mL .

V'' = volume final no tubo na 3ª diluição, mL .

A homogeneidade foi considerada como uma fonte de incerteza, porque a taxa de heterogeneidade influencia na quantidade de analito presente na amostra. A incerteza da homogeneidade para o material de referência certificado foi estimada como uma variação de 10 % em relação a 1,0 que é o de C_p para o resultado final. Este valor está dividindo o resultado; portanto, a homogeneidade não afeta numericamente o resultado, porém a sua incerteza afeta a incerteza final.

A incerteza do fator de diluição (sólida) é proveniente das incertezas das massas obtidas na balança analítica, uma vez que as massas para esta diluição foram obtidas nesta balança. A massa medida é igual à massa total (amostra mais recipiente) menos a massa de tara (massa do recipiente); então, foram consideradas as incertezas provenientes de ambas as medidas. Para cada medida, considerou-se as incertezas de calibração, deriva e resolução. A excentricidade, que é a imprecisão procedente da diferença em se colocar a massa no centro da área de medida da balança ou nas bordas, foi reputada como zero, pois utilizou-se apenas o centro. A incerteza de calibração foi obtida do certificado de calibração da balança analítica, a incerteza da deriva foi assumida como metade do valor da incerteza de calibração e a de resolução foi 0,1 mg (menor divisão do instrumento).

A Equação 4 mostra como se procedeu a diluição sólida. As derivadas parciais a partir desta equação fornecem os coeficientes de sensibilidade para o respectivo termo variável.

$$d = \frac{m_{amostra} + m_{celulose}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

d = fator de diluição

$m_{amostra}$ = massa de amostra, g.

$m_{celulose}$ = massa de amostra, g.

A quantidade de amostra inserida no instrumento tem sua massa medida em uma microbalança, acoplada ao equipamento. A incerteza desta massa foi obtida considerando as incertezas relacionadas às medidas da massa total e da massa de tara. Para cada medida examinou-se as incertezas de calibração, deriva e resolução. A excentricidade foi considerada zero, como no caso da balança analítica. Na falta de certificado de calibração, assumiu-se como incerteza de calibração 10 %

do erro máximo e a deriva como metade deste valor. A incerteza de resolução foi de 1,0 ng (menor divisão).

A incerteza de repetibilidade é tradicionalmente considerada e advém da aleatoriedade da medição - uma série de medições não resultará em valores idênticos. Esta incerteza é o desvio padrão das medidas da amostra.

As distribuições de probabilidade para todos os casos foram definidas de acordo com o tipo de incerteza.

Após a quantificação das fontes de incertezas, estas foram somadas de acordo com a lei da soma das variâncias, para se obter a incerteza padrão combinada, por meio da Equação 5.

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=0}^n u_n^2 c_n^2} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

u_c = incerteza padrão combinada.

u_n = fonte de incerteza individual.

c_n = coeficiente de sensibilidade relativo à fonte de incerteza u_n .

A incerteza final (incerteza expandida, U) é calculada por meio da Equação 6. O nível de confiança no cálculo da incerteza expandida foi de 95 %.

$$U = u_c k \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

U = incerteza expandida.

u_c = incerteza padrão combinada.

k = fator de abrangência.

A Tabela 4 apresenta os valores das incertezas que afetam diretamente no resultado (incerteza padrão, u) e a porcentagem de contribuição de cada uma para a incerteza final, que corresponde ao intervalo de medição (valor $\pm U$). Os coeficientes de sensibilidade das incertezas, que afetam diretamente o resultado, foram calculados a partir das derivadas parciais das grandezas que constam na equação do mensurando.

Tabela 4 Incerteza final para a determinação Pb em CRM 1572 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.

Ensaio					Valor de referência			Unidade		
Determinação de chumbo em material de referencia Citrus Leaves 1572 diluído 25 vezes em celulose - Incerteza Final					CRM 13.3 +/- 2.4			ug/g		
					Obtido 12,7			ug/g		
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade v_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
U_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,00594	ng	normal	1,000	290,6977	1/mg	1,727047	infinito	60,81
$U_{massa\ amostra}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-152,1197	ng/(mg) ²	-0,175653	infinito	0,63
$U_{padrões}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,1104	ng	normal	2,250	1,0000	1/mg	0,049057	11	0,05
$U_{homogeneidade}$	incerteza devido à homogeneidade	0,1000	-	retangular	1,732	-13,0823	ug/g	-0,755307	infinito	11,63
$U_{fator\ de\ diluição}$	incerteza do fator de diluição	0,2672	-	normal	2,000	0,5233	ug/g	0,069916	infinito	0,10
$U_{repetibilidade}$	incerteza devido à repetibilidade	1,146	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	1,146000	2	26,78
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (v_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)	Unidade					
2,2146	normal	27	2,10	4,6508	ug/g					

Para esta metodologia de determinação de Pb em CRM 1572, a incerteza gerada pela regressão linear é a que mais contribuiu para a incerteza final, seguida da repetibilidade e da homogeneidade. Uma forma eficiente de diminuir a incerteza final é diminuir a incerteza devido à regressão linear. Algumas sugestões para diminuir a incerteza devido à regressão linear são: aumentar o número de pontos da curva analítica, que neste caso foram seis; aumentar o número de medidas em cada ponto, que neste trabalho foram duas e fazer a determinação da amostra o mais próximo possível do centro desta curva de calibração (a média das massas foi 0,042 ng e o meio da curva foi em 0,39 ng). Para minimizar a incerteza de repetibilidade, propõe-se aumentar o número de determinações para cinco, e não três medidas, que foi feito neste trabalho. A incerteza devido à homogeneidade pode ser diminuída deixando a amostra por mais tempo no sistema de moagem, e depois passar toda a amostra por uma malha de diâmetro menor que 63 μm , garantindo assim que o tipo de moagem feito seja extrafino (KRUG e ROCHA, 2016).

A exatidão do método foi avaliada por meio do conceito de erro normalizado com o uso do CRM 1572. O método é considerado exato se o módulo do valor do erro normalizado for igual ou menor que um. Neste caso ele foi de 0,11, portanto o método foi considerado exato.

Dentre as determinações de Pb nas frações do girassol, escolheu-se a parte folha para estimar a incerteza final, pois nesta fração o desvio padrão relativo foi o maior; portanto, provavelmente, apresenta uma incerteza maior. As incertezas foram calculadas de forma semelhante que para o CRM 1572, exceto a incerteza de diluição e de homogeneidade. Como não houve diluição para as diferentes partes do girassol, na equação do mensurando e no diagrama de causa e efeito, não se tem o termo referente ao fator de diluição. A homogeneidade foi considerada como uma variação de 10 % em relação a 1,0 que é o valor de contribuição para o resultado final, multiplicado por um fator. Este fator foi assumido como a razão do desvio padrão relativo da amostra e o desvio padrão relativo do material de referência certificado, para que este fator confira maior variabilidade advinda da homogeneidade para amostras que apresentaram leituras mais dispersas.

A Tabela 5 apresenta, para a metodologia de determinação de Pb na fração folha do girassol, os valores das incertezas e das suas respectivas porcentagens de contribuição. Também exibe a incerteza expandida. O valor desta incerteza foi consideravelmente alto, comparado com o valor do resultado da medição. Concentrações muito baixas tendem a resultar em incertezas significativamente altas. Nesta

análise, a repetibilidade foi a fonte de incerteza que mais contribuiu para o valor da incerteza final. Novamente, sugere-se aumentar o número de determinações da amostra.

Tabela 5 Incerteza final para a determinação de Pb em girassol na fração raiz por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.

Ensaio				Valor de referência				Unidade		
Determinação de chumbo em girassol na fração folha - Incerteza Final				Obtido 1,37				ug/g		
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
U_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,00532	ng	normal	1,000	3,7313	1/mg	0,019856	infinito	0,85
$U_{massa\ amostra}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-5,1417	ng/(mg) ²	-0,005937	infinito	0,08
$U_{padrões}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,1104	ng	normal	2,250	1,0000	1/mg	0,049057	11	5,19
$U_{homogeneidade}$	incerteza devido à homogeneidade	0,1634	-	retangular	1,732	-0,0990	ug/g	-0,009339	infinito	0,19
$U_{repetibilidade}$	incerteza devido à repetibilidade	0,209	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	0,208500	2	93,70
Incerteza padrão combinada (U_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)	Unidade					
0,2154	normal	2	4,53	0,9757	ug/g					

Na Tabela 6, tem-se os valores das concentrações de Pb nas amostras CRM1572Dil25x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Também se tem os valores das incertezas expandidas para o material de referência certificado e para a fração folha. As demais amostras certamente apresentam menor incerteza de medição em valores relativos, visto que a amostra escolhida foi a que possuiu maior desvio padrão relativo.

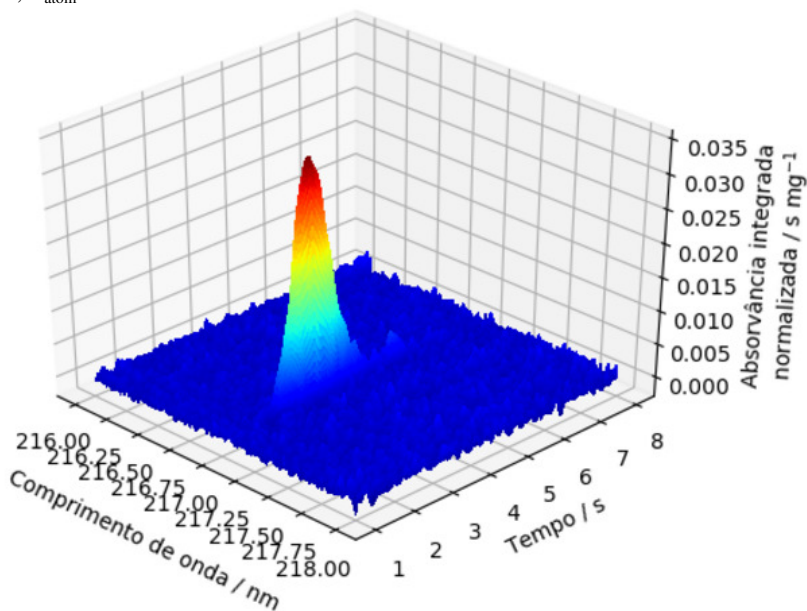
Tabela 6 Resultados das determinações de Pb por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1572Dil25x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1572Dil25x e Folha.

Amostra	Concentração $\mu\text{g g}^{-1}$	Incerteza Expandida $\mu\text{g g}^{-1}$
CRM1572Dil25x	12,4	4,65
Raiz	34,2	-
Caule	2,30	-
Pétalas	2,23	-
Folha	1,37	0,976
Coroa	0,294	-

Nota-se que a fração raiz foi a que apresentou a maior quantidade de chumbo. Resultado semelhante também foi obtido no trabalho desenvolvido por Rui Miguel de Carvalho Júnior (JÚNIOR, 2016). No trabalho deste pesquisador as amostras são girassóis plantados em uma região contaminada por resíduos da indústria petroquímica, com o objetivo de fitorremediação. Elas foram digeridas e utilizou-se a técnica de ICP MS para executar as análises. A maior concentração do Pb nas raízes do que nas demais partes pode ser porque o chumbo não é essencial para a planta, e dependendo da sua concentração, ele pode ser tóxico. Por este motivo, como mecanismo de defesa, a planta concentraria esse metal nas raízes, não o deixando ir para as outras partes da planta (KABATA-PENDIAS, 2011).

A Figura 7 ilustra um espectro de absorvância atômica de Pb na determinação deste metal na fração raiz do girassol, na linha analítica de 217,0005 nm. A alta resolução do instrumento usado na análise permite observar se há sinais de absorvância nas vizinhanças da linha analítica selecionada para a determinação do analito. Neste caso não há sinais de absorvância.

Figura 7 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o chumbo na amostra Raiz e na linha analítica 217,0005 nm. $T_{\text{pir}} = 1500$ °C; $T_{\text{atom}} = 2600$ °C.



5.2.2 Determinação de Cd

A determinação de Cd se deu por meio de uma curva analítica aquosa com calibração externa, utilizando o programa de temperatura previamente otimizado e modificador químico Pd/Mg. A Figura 8 apresenta a representação gráfica desta curva. A faixa de trabalho, sensibilidade, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação são expostos na Tabela 7.

Figura 8 Curva analítica aquosa para determinação de Cd em amostras de plantas.

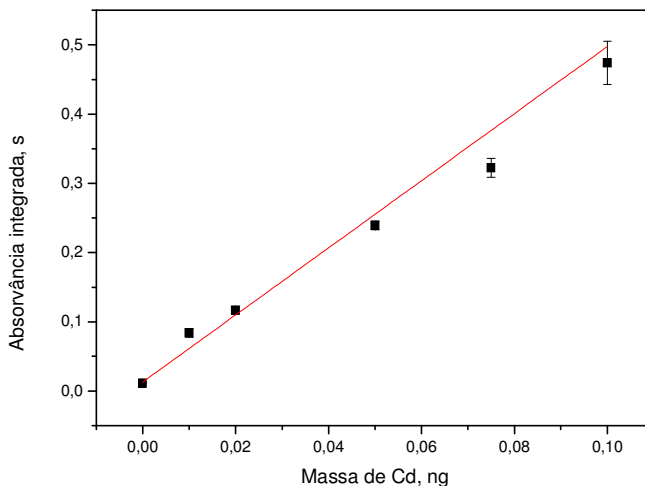


Tabela 7 Parâmetros de validação para a determinação de Cd por SS HR CS GF AAS.

Parâmetros	Valores
Faixa de trabalho	0,01 – 0,1 ng
Sensibilidade	0,0241 s ng ⁻¹
Coefficiente de correlação	0,995
Limite de detecção	0,8 pg
Limite de quantificação	2,8 pg

A grandeza mensurável, neste caso, foi a determinação de Cd em amostras de plantas. O CRM 1573 diluído foi utilizado como referência para verificar a exatidão do método, juntamente com o conceito de erro normalizado. Esta diluição ocorreu porque a concentração de Cd no material era elevada pelos mesmos motivos que no caso do Pb. O procedimento de medição foi devidamente especificado nos procedimentos experimentais. Com estas informações, mensurando e procedimento, foi possível mapear as fontes de erro passíveis de influenciar no resultado da medição. Definidos estes termos, estabeleceu-se a equação do mensurando e o diagrama de causa e efeito,

que são os mesmos que na determinação de Pb em material de referência certificado (Equação 2 e Figura 6).

Os cálculos e os conceitos para estimar as incertezas também foram os mesmos que no caso do Pb. A Tabela 8 apresenta os valores das incertezas que afetam diretamente no resultado e a porcentagem de contribuição de cada uma delas para a incerteza final.

Tabela 8 Incerteza final para a determinação de Cd em CRM 1573 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.

Ensaio						Valor de referência			Unidade	
Determinação de cádmio em Tomato Leaves 1573 diluído 5 vezes em celulose - Incerteza Final						Tomato Leaves 2,5 +/- 0,2			ug/g	
						Obtido 2,54			ug/g	
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
u_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,00317	ng	normal	1,000	104,1667	1/mg	0,329857	infinito	79,74
$u_{massa\ amostra}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-50,3192	ng/mg ²	-0,058104	infinito	2,47
$u_{padrões}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,0185	ng	normal	2,040	1,0000	1/mg	0,009090	58	0,06
$u_{homogeneidade}$	incerteza devido à homogeneidade	0,100	-	retangular	1,732	-2,4153	ug/g	-0,139449	infinito	14,25
$u_{fator\ de\ diluição}$	incerteza do fator de diluição	0,000864	-	normal	2,000	0,4831	ug/g	0,000209	infinito	0,00
$u_{repetibilidade}$	incerteza devido à repetibilidade	0,0688	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	0,068800	2	3,47
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \approx 95%)	Unidade					
0,3694	normal	1661	2,00	0,7388	ug/g					

A maior fonte de contribuição para a incerteza final foi a incerteza da massa obtida na regressão linear. A curva analítica foi feita com cinco padrões de calibração, duas repetições em cada ponto e não se trabalhou no meio da curva nas análises. Observando a Figura 8, percebeu-se uma heterocedasticidade (dispersão dos dados em torno da curva analítica) significativa. Sugere-se, para diminuir a incerteza devido à regressão linear, aumentar o número de repetições em cada ponto e o número de padrões de calibração. Também é de muita relevância trabalhar no meio da curva analítica. A média das absorvâncias nas análises do CRM 1572 foi de $0,133 \text{ s mg}^{-1}$ e o meio da curva foi em $0,39 \text{ s}$.

Apesar de a incerteza final ser 29% do valor obtido, o resultado da medição foi praticamente igual ao da referência. O erro normalizado neste caso foi zero, confirmando que o método proposto é exato.

Da mesma forma que foi feito para o Pb, escolheu-se a parte do girassol que apresentou o maior desvio padrão relativo e estimou-se a sua incerteza. Neste caso, foi a fração pétalas. A Tabela 9 apresenta os valores das incertezas que afetam diretamente no resultado e das suas respectivas porcentagens de contribuição. Também é mostrada a incerteza final. As contribuições para a incerteza final ficaram distribuídas entre a homogeneidade, os padrões de calibração, a repetibilidade e a regressão linear. As mesmas sugestões feitas na análise do chumbo podem ser aplicadas para esta determinação. Para diminuir a incerteza dos padrões calibração, sugere-se que a inserção da solução no instrumento seja feita de maneira automatizada, e não manual, por meio de uma micropipeta, que é como foi feito neste trabalho.

Tabela 9 Incerteza final para a determinação de Cd em girassol na fração pétalas por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.

Ensaio				Valor de referência				Unidade		
Determinação de cádmio em girassol na fração pétalas - Incerteza Final				0,0700				ug/g		
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
U_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,00296	ng	normal	1,000	1,5625	1/mg	0,004620	infinito	7,54
$U_{massa\ amostra}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-0,1072	ng/mg ²	-0,000124	infinito	0,01
$U_{padrões}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,0185	ng	normal	2,040	1,0000	1/mg	0,009090	58	29,18
$U_{homogeneidade}$	incerteza devido à homogeneidade	0,3044	-	retangular	1,732	-0,0686	ug/g	-0,012064	infinito	51,40
$U_{repetibilidade}$	incerteza devido à repetibilidade	0,006	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	0,005800	2	11,88
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)	Unidade					
0,0168	normal	117	2,02	0,0340	ug/g					

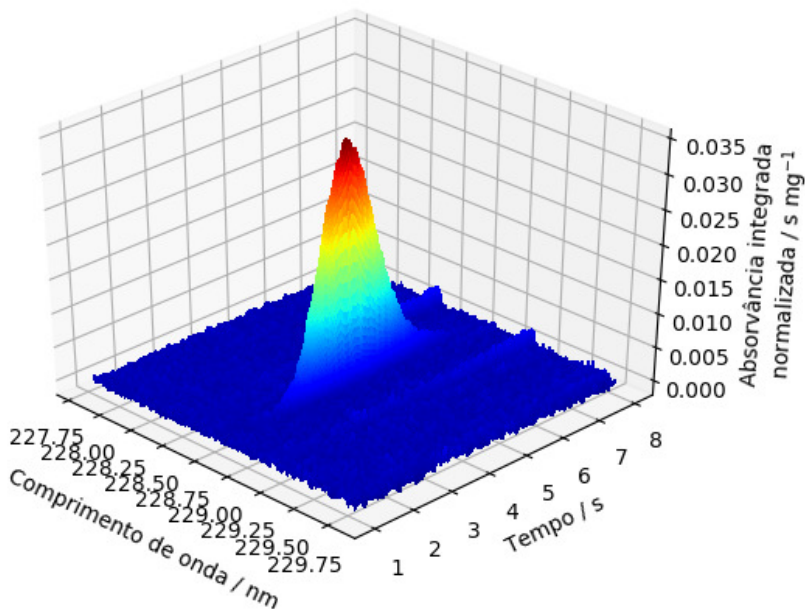
Os valores das concentrações de Cd nas amostras CRM1573Dil5x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa utilizando a metodologia desenvolvida estão expostos na Tabela 10. Estes resultados, para as frações do girassol comercial, ficaram próximos do limite inferior da faixa de concentração de Cd em jardins urbanos na Polônia e nos Estados Unidos, e muito abaixo dos mesmos limites na Grã-Bretanha e na Alemanha (KABATA-PENDIAS, 2011). Apesar de o Cd não ser um elemento essencial para os processos metabólicos, ele foi absorvido e distribuído entre as partes do girassol, principalmente na raiz, no caule e na folha. Este perfil também foi observado no trabalho de Rui Miguel de Carvalho Júnior (JÚNIOR, 2016), citado anteriormente na determinação de Pb, que utiliza amostras de girassóis e a técnica de ICP MS para as determinações.

Tabela 10 Resultados das determinações de Cd por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1573Dil5x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1573Dil5x e Pétalas.

Amostra	Concentração $\mu\text{g g}^{-1}$	Incerteza Expandida $\mu\text{g g}^{-1}$
CRM1573Dil5x	2,54	0,739
Raiz	0,134	-
Caule	0,189	-
Pétalas	0,07	0,0340
Folha	0,137	-
Coroa	0,081	-

A Figura 9 ilustra um espectro de absorvância atômica de Cd na determinação deste metal na fração Folha do girassol, na linha analítica de 228,812 nm. Pode-se observar que não há absorção de radiação nas vizinhanças da linha analítica selecionada.

Figura 9 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o cádmio na amostra Folha e na linha analítica 228,8018 nm. $T_{\text{pir}} = 1100$ °C; $T_{\text{atom}} = 2000$ °C.



5.2.3 Determinação de Cu

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração com padrões aquosos, porém nas primeiras análises com ambos os materiais de referência certificados, verificou-se que as medidas eram precisas, mas não exatas. Apesar de um programa de aquecimento otimizado, as soluções e as amostras sólidas, provavelmente, não apresentaram os mesmos processos de atomização. Deste modo, decidiu-se construir uma curva analítica sólida com massas crescentes do material de referência certificado CRM 1573 diluído 22 vezes, e a exatidão do método foi verificada com o material de referência CRM 1572 diluído 25 vezes e o conceito de erro normalizado. Conforme comentado na seção 5.1 não foi necessário o uso de modificador químico. Foram feitos 27 níveis de massa; pois, como se teve apenas uma repetição em cada ponto, decidiu-se aumentar o número de níveis e desta forma diminuir uma incerteza associada ao padrões de calibração. A Figura 10 apresenta a representação gráfica da curva analítica sólida. A faixa de trabalho,

sensibilidade, coeficiente de correlação, limite de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 11.

Figura 10 Curva analítica sólida com calibração externa para a determinação de Cu em amostras de plantas.

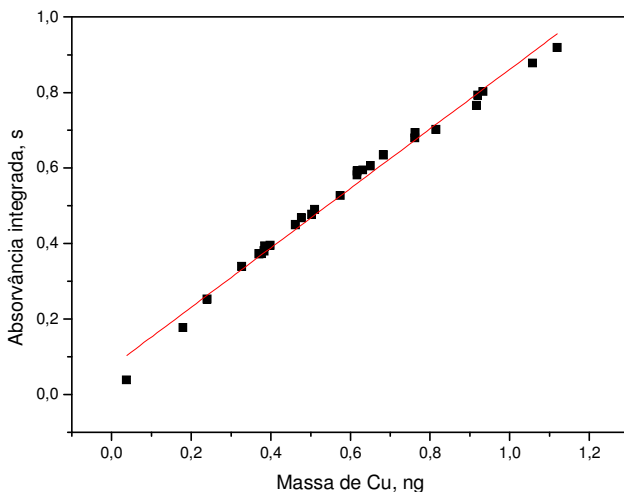


Tabela 11 Parâmetros de validação para a determinação de Cu por SS HR CS GF AAS.

Parâmetros	Valores
Faixa de trabalho	0,0378 – 1,12 ng
Sensibilidade	0,787 s ng ⁻¹
Coeficiente de correlação	0,993
Limite de detecção	15 ng
Limite de quantificação	51 ng

A grandeza mensurável, neste caso, foi a concentração de Cu em amostras de girassol e os métodos de medição foram especificados nos procedimentos experimentais. Com estas informações foi possível estabelecer a equação do mensurando e o diagrama de causa e efeito. Estes são apresentados na Equação 7 e Figura 11.

$$R = \frac{x d}{m C_p} + r + P \quad \text{Equação 7}$$

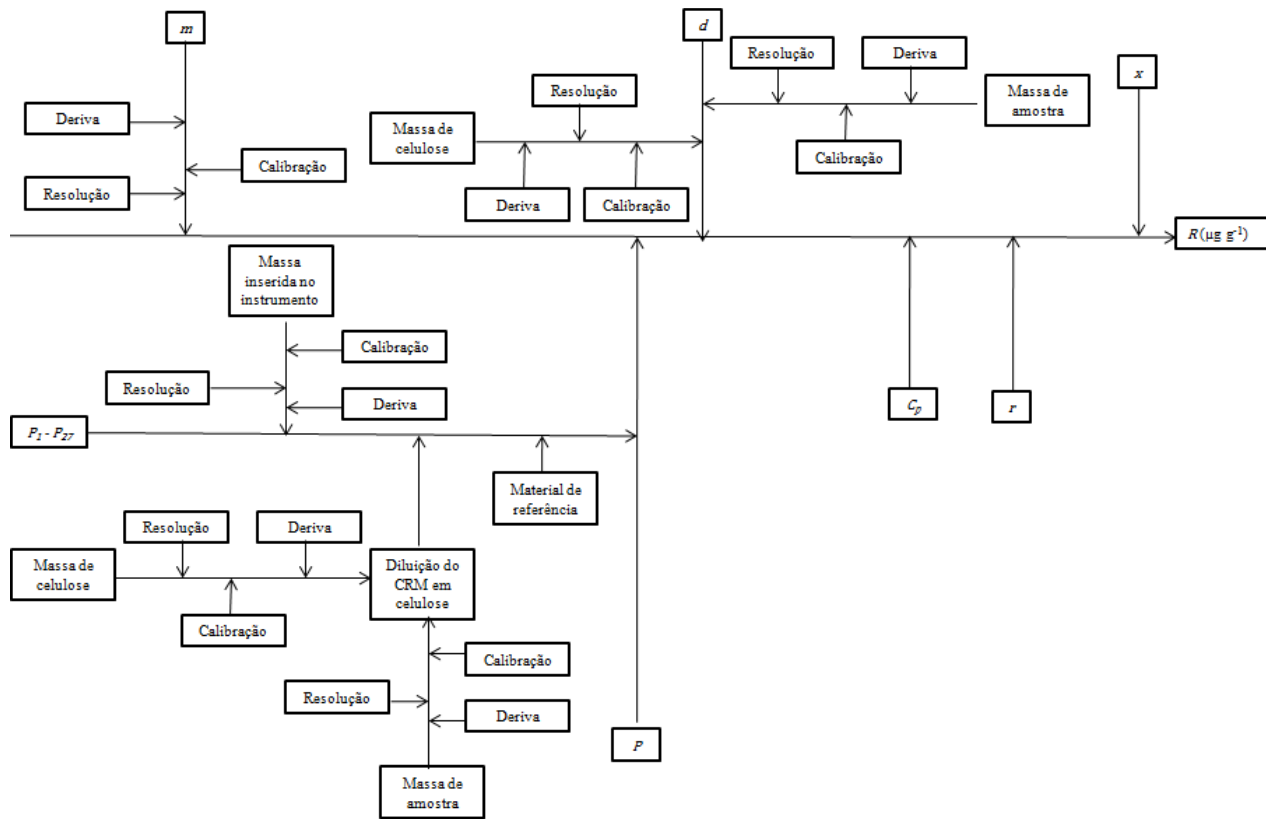
Onde:

R = resultado da concentração de Cu na amostra, $\mu\text{g g}^{-1}$
 x = quantidade de Cu obtida a partir da regressão linear, ng.
 d = fator de diluição.
 m = massa inserida no instrumento, mg.
 C_p = homogeneidade.
 r = repetibilidade do método, $\mu\text{g g}^{-1}$.
 P = padrões de calibração, mg.

Figura 11 Diagrama de causa e efeito para a metodologia de determinação de Cu.

LEGENDA: R : resultado da quantidade de Cu em material certificado de referência Citrus Leaves 1572 ($\mu\text{g g}^{-1}$); r : incerteza devido à repetibilidade; P : incerteza combinada dos padrões de calibração; $P_1 - P_{27}$: padrões de calibração de 1 a 27; m : incerteza da massa inserida no instrumento; C_p : incerteza devido à homogeneidade; d : incerteza do fator de diluição; x : incerteza da quantidade de Cu na amostra obtida a partir da regressão linear.

NOTA: A caixa de texto que contém $P_1 - P_{27}$ indica que todos os parâmetros que apontam para ela ocorrem também para os padrões de calibração de 1 a 27.



Os cálculos e os conceitos para estimar as incertezas foram os mesmos que no caso do Pb, exceto para a incerteza combinada dos padrões de calibração. Para o cálculo das incertezas dos padrões de 1 a 27 foram consideradas as incertezas da massa de CRM 1573, da diluição do CRM 1573 em celulose e da massa inserida no instrumento para a construção da curva de calibração. A Equação 8 mostra como se calculou a quantidade de Cu na massa do CRM 1573 inserida no instrumento para a construção da curva analítica. Os cálculos dos coeficientes de sensibilidade, para os cálculos das incertezas dos padrões de calibração, foram as derivadas parciais da Equação 8.

$$Q = \frac{C_{TM} m}{d} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

Q = quantidade de Cu, ng.

C_{TM} = concentração de Cu no CRM 1573, $\mu\text{g g}^{-1}$.

m = massa de CRM1573Dil22x inserida no instrumento, mg.

d = fator de diluição

A Tabela 12 apresenta os valores das incertezas que afetam diretamente no resultado e a porcentagem de contribuição de cada uma delas para a incerteza final.

Tabela 12 Incerteza final para a determinação de Cu em CRM 1572 por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição

Ensaio						Valor de referência		Unidade		
Determinação de cobre em material de referência Citrus Leaves 1572 diluído 25 vezes (16,5 +/-1 ug/g de Cu) - Incerteza Final						Citrus Leaves 16,5 +/- 1		ug/g		
Curva analítica sólida feita com material de referência Tomato Leaves 1573 diluído 22 vezes (12 +/-2 ug/g de Cu)						Obtido 12,71		ug/g		
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
U_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,01804	ng	normal	1,000	20,0000	1/mg	0,360875	infinito	6,69
$U_{\text{massa amostra}}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-10,0815	ng/mg ²	-0,011641	infinito	0,01
$U_{\text{padrões}}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,5808	ng	normal	2,000	1,0000	ug/ng ²	0,290415	infinito	4,34
$U_{\text{homogeneidade}}$	incerteza devido à homogeneidade	0,1000	-	retangular	1,732	-12,6019	ug/g	-0,727569	infinito	27,21
$U_{\text{fator de diluição}}$	incerteza do fator de diluição	0,2672	-	normal	2,000	0,5041	ug/g	0,067349	infinito	0,23
$U_{\text{repetibilidade}}$	incerteza devido à repetibilidade	1,094	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	1,094000	2	61,52
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})		Fator de abrangência (k)		Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)		Unidade		
1,3948	normal	5		2,65		3,6962		ug/g		

A maior fonte de contribuição para a incerteza final foi a incerteza devido à repetibilidade, seguida da homogeneidade. Para minimizar o efeito destas fontes de incerteza, pode-se utilizar as mesmas sugestões feitas para o caso do Pb. A incerteza ocasionada pela regressão linear contribuiu muito pouco para a incerteza final. Apesar de se ter feito apenas uma medida em cada ponto, a grande quantidade de pontos (27) ao longo da curva analítica manteve a incerteza da regressão linear baixa.

Para o método ser considerado exato, o módulo do resultado do erro normalizado tem que ser menor ou igual a um. Neste caso, foi 0,990. Apesar do valor alto, o método ainda é considerado exato.

Apesar de a literatura afirmar que a curva analítica aquosa é mais trivial (KRUG e ROCHA, 2016), a experiência adquirida neste trabalho mostrou o contrário. Para a construção das curvas analíticas aquosas (análises de Pb e Cd) foi necessário a manipulação com ácidos fortes e soluções de metais com periculosidade. Gerou-se resíduo e despendeu-se tempo. Na construção da curva analítica sólida, não se teve este trabalho. Apenas inseriu-se o material de referência certificado, que já estava diluído, no instrumento. Apesar das 27 medidas, o tempo gasto ainda foi menor do que a construção de uma curva analítica aquosa.

Da mesma forma que foi feito para o Pb e para o Cd, escolheu-se a parte do girassol que apresentou o maior desvio padrão relativo e estimou-se a sua incerteza. Neste caso, foi a fração folha. A Tabela 14 apresenta os valores das incertezas e das suas respectivas porcentagens de contribuição, além da incerteza final. As incertezas devido à repetibilidade e à homogeneidade foram as que mais contribuíram para a incerteza final. As mesmas sugestões feitas para diminuir estas incertezas na análise do chumbo podem ser aplicadas para este método.

Tabela 13 Incerteza final para a determinação de Cu em girassol na fração pétalas por SS HR CS GF AAS. São apresentadas as grandezas com seus respectivos valores de incerteza, distribuição de probabilidade, coeficiente de sensibilidade, incerteza padrão, graus de liberdade, porcentagem de contribuição.

Ensaio					Valor de referência			Unidade		
Determinação de cobre em girassol na fração Folha - Incerteza Final					6,330			ug/g		
Curva sólida feita com material de referência Tomato Leaves 1573 diluído 22 vezes (12±/2 ug/g de Cu)										
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade v_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
U_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,01855	ng	normal	1,000	18,5185	1/mg	0,343569	infinito	5,31
$U_{\text{massa amostra}}$	incerteza da massa inserida no equipamento	0,00231	mg	normal	2,000	-129,0422	ng/mg ²	-0,149005	infinito	1,00
$U_{\text{padrões}}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,5808	ng	normal	2,000	1,0000	ug/ng ²	0,290415	infinito	3,80
$U_{\text{homogeneidade}}$	incerteza devido à homogeneidade	0,2223	-	retangular	1,732	-6,9683	ug/g	-0,894447	infinito	36,01
$U_{\text{repetibilidade}}$	incerteza devido à repetibilidade	1,094	ug/g	normal	1,000	1,0000	-	1,094000	2	53,88
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (v_{ent})		Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)			Unidade		
1,4905	normal	6		2,52	3,7559			ug/g		

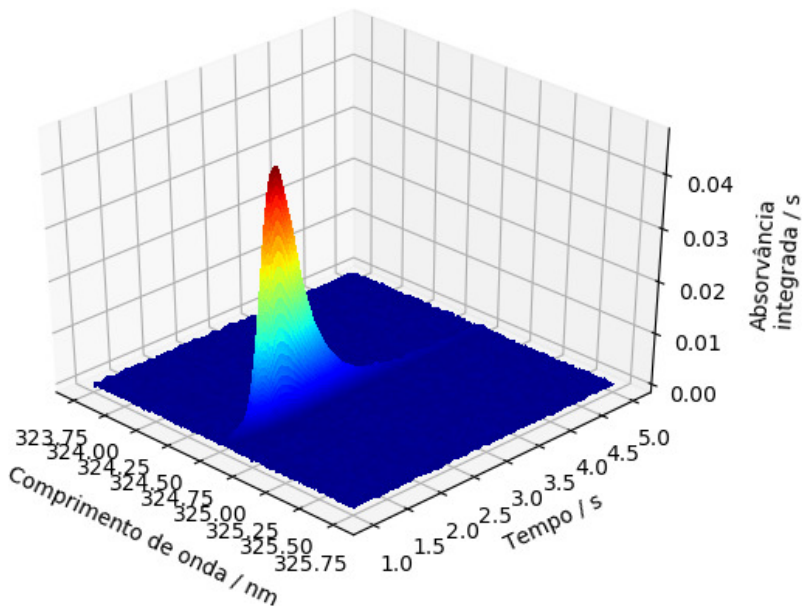
Os valores das concentrações de Cu nas amostras CRM1572Dil25x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa utilizando a metodologia desenvolvida estão exposto na Tabela 15. A fração raiz foi a que apresentou maior concentração de cobre, isto pode ter ocorrido porque os tecidos radiculares das plantas têm uma forte capacidade de reter Cu e evitar o transporte deste metal para as outras partes do vegetal (KABATA-PENDIAS, 2011).

Tabela 14 Resultados das determinações de Cu por SS HR CS GF AAS nas amostras CRM1572Dil25x, Raiz, Caule, Pétalas, Folha e Coroa. Valores da incerteza expandida para a amostra CRM1572Dil25x e Folha.

Amostra	Concentração $\mu\text{g g}^{-1}$	Incerteza Expandida $\mu\text{g g}^{-1}$
CRM1572Dil25x	12,7	3,70
Raiz	27,16	-
Caule	5,13	-
Pétalas	13,9	-
Folha	6,33	3,76
Coroa	12,7	-

A Figura 12 ilustra um espectro de absorvância atômica de Cu na determinação deste metal na fração raiz do girassol, na linha analítica de 324,7540 nm. A única banda observável é a do elemento Cu.

Tabela 15 Espectro de absorvância em função do comprimento de onda e tempo para o cobre na amostra Raiz e na linha analítica 324,7540 nm. $T_{\text{pir}} = 1500\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{atom}} = 2700\text{ }^{\circ}\text{C}$.



5.2.4 Parâmetros de validação: resultados

Os resultados dos parâmetros de validação foram avaliados para saber se estes cumpriram os critérios de aceitação. Em todos os casos cumpriram. A Tabela 15 apresenta os parâmetros de validação, os valores e se estes satisfazem ou não o critério de aceitação.

Tabela 16 Parâmetros de validação e seus respectivos valores e critérios de aceitação.

Parâmetro	Valores Pb	Valores Cd	Valores Cu	Critério de aceitação	Satisfaz o critério de aceitação?
Exatidão	0,11	0,0	0,99	≤ 1	Sim
Precisão	37 %	29 %	29 %	$< 50\%$	Sim
Sensibilidade	$0,398 \text{ s ng}^{-1}$	$0,0241 \text{ s ng}^{-1}$	$0,787 \text{ s ng}^{-1}$	-	-
Seletividade	Sem interferências	Sem interferências	Sem interferências	Ausência de interferentes	Sim
Linearidade	0,9997	0,995	0,993	$\geq 0,99$	Sim
Faixa de trabalho	0,02 – 0,8 ng	0,01 – 0,1 ng	0,0378 – 1,12 ng	Satisfazer os limites instrumentais de linearidade e os das amostras	Sim
LOD	5,2 pg	0,8 pg	15 ng	1 ng	Sim
LOQ	17,2 pg	2,8 pg	51 ng	1 ng	Sim

6 CONCLUSÃO

A técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, atomização em forno de grafite e análise direta de sólidos permitiu que fossem desenvolvidos e validados métodos para a determinação de cádmio, chumbo e cobre em cinco diferentes partes do girassol. Estes métodos apresentam baixa geração de resíduos e custos por utilizar amostragem sólida. A escolha da técnica se mostrou adequada devido à alta seletividade frente à complexa matriz e também por causa da relação entre custos operacionais e quantidade de analitos.

A quantificação de cobre por curva analítica aquosa (como para Cd e Pb) demonstrou ser insatisfatória, muito provavelmente por, no caso deste elemento, os efeitos de matriz exercerem maior influência. Como este elemento é essencial para a planta do ponto de vista biológico, ele apresenta uma grande variedade de interações, como por exemplo, complexado para formar proteínas ou interagindo com uma grande variedade de elementos, resultando em diversos tipos de influência que podem ocorrer no processo de atomização do metal. Contudo, observou-se que quando da aplicação de calibração com curva sólida, a quantificação foi bem-sucedida, ainda que o erro normalizado tenha ficado próximo numericamente de 1,0. Neste caso, foi importante identificar e quantificar as fontes de erro, pois desta forma é possível aplicar estratégias para o melhoramento do método.

Para o Cd e o Pb, a quantificação por meio de curva analítica aquosa foi satisfatória. Os resultados obtidos, tanto na quantificação quanto nas otimizações das condições térmicas, demonstraram que o Cd é distribuído de forma, quase que, uniformemente em todas as frações do girassol. Diferentemente do que ocorre com o Pb, que tende a acumular-se na raiz. A disposição final do girassol que extraiu o Pb pode ser menor do que aquele que extraiu o Cd, pois, possivelmente, só a raiz necessita de tratamento pelo fato de o metal estar mais concentrado nesta parte da planta.

Foi possível a validação dos métodos desenvolvidos para a determinação de Pb, Cd e Cu. Utilizou-se os seguintes parâmetros de validação: exatidão, precisão, sensibilidade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação com critérios de aceitação estipulados de acordo com as necessidades deste trabalho e baseados em guias metrológicos.

O preparo das amostras foi simples e não gerou resíduos. Salienta-se que é necessário um cuidado especial na quantidade de

amostra a ser tomada e na homogeneização das mesmas, sendo este um pré-requisito para a análise de amostras sólidas.

A estimativa da incerteza de medição possibilitou não somente um intervalo de confiança, mas também um mapeamento das fontes de erro de maior influência nas determinações de chumbo, cádmio e cobre. Este mapeamento foi importante porque se pôde averiguar quais as fontes de erro de maior impacto e, conseqüentemente, uma melhor avaliação em como melhorar a precisão do método. A estimativa da incerteza também possibilitou a avaliação da exatidão por meio do erro normalizado.

7 REFERÊNCIAS

- ARCÊNIO, P. P. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de cloro e bromo por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite em amostras de interesse ambiental por suspensão.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.
- ATKINS, P.; LORETTA, J. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.** 3a Edição. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- ÁVILA, D. V. L. et al. Determination of Co and Cr in wet animal feeds using direct solid sample analysis by HR-CS GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 524 - 529, 2017.
- BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 11, p. 41 - 49, 1994.
- BARRERA, E. G. et al. Alternative method for chromium determination in pharmaceutical drugs by HR-CS GF AAS and direct analysis of solid samples. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 365 - 370, 2017.
- BATALHA, B.-H. L.; PARLATORE, A. C. **Controle de qualidade de água para consumo humano; bases conceituais e operacionais.** São Paulo: Cetesbe, 1977.
- BEATY, R. D.; KERBER, J. D. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry.** 2nd Edition. ed. [S.l.]: The Perkin-Elmer Corporation, 1993.
- BELARRA, M. A. et al. Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results? **Spectrochimica Acta Part B**, v. 52, p. 1855 - 1860, 1997.
- BHARGAVA, A. et al. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v. 105, p. 103 - 120, 2012.
- BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58 - 66.
- CAMERA, A. S. **Determinação de mercúrio total por CV AFS e enxofre via molécula de CS por HR-CS MAS em amostras de coque verde de petróleo: uma abordagem metrológica.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2015.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **REGULAMENTO (CE) No 1881/2006 DA COMISSÃO que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos generos alimentícios.** [S.l.]. 2006.

- COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, p. 103 - 117, 2007.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3a Edição. ed. Barueri: Manole, 2009.
- DROBYSHEV, E. J. et al. Trace element biomonitoring in hair of school children from a polluted area by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 14 - 20, 2017.
- EURACHEM/CITAC. **Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2th Edition. ed. [S.l.]: [s.n.], 2012.
- EURACHEM/RELACRE1, G. **Exemplos de cálculos de incertezas**. RELACRE. ed. [S.l.]: [s.n.], 2002.
- GERHARDTA, K. E.; GERWINGB, P. D.; GREENBERGA, B. M. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. **Plant Science**, v. 256, p. 170 - 185, 2017.
- GRINYER, J. et al. Phantom studies of Cd, Hg and Cl by prompt gamma neutron activation analysis using a ^{238}Pu -Be neutron source. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 263, p. 262 - 265, 2007.
- GUO, Z. et al. Simultaneous determination of trace Cd(II), Pb(II) and Cu(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry using a reduced graphene oxide-chitosan/poly-L-lysine nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 11 - 22, 2017.
- HOLZBACH, J. C. et al. Chumbo: Uma introdução à extração e a fitorremediação. **Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 178 - 183, 2012.
- INMETRO. **Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008**. [S.l.], p. 1-126. 2008.
- INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. [S.l.], p. 1-20. 2010.
- JÁNOŠOVÁ, V. et al. Determination of Selected Elements by X-ray Fluorescence Spectrometry in Liquid Drug Samples after the Preconcentration with Thioacetamide. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 65, p. 56 - 63, 2010.
- JÚNIOR, R. M. D. C. **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**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. 4th Edition. ed. New York: Taylor and Francis Group, 2011.

- KAPOURCHAL, A.; PAZIRA, E.; HOMAE, M. Assessing radish (*Raphanus sativus* L.) potential for phytoremediation of lead-polluted soils resulting from air pollution. **Plant, Soil and Environment**, v. 55, p. 202 - 206, 2009.
- KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 355–364, 2005.
- KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo: EditSBQ, 2016.
- MA, Y. et al. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 174, p. 14 - 25, 2016.
- MANDJUKOV, P. et al. Determination of total mercury for marine environmental monitoring studies by solid sampling continuum source high resolution atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 103–104, p. 24 - 33, 2015.
- MARTINS, C. D. C. et al. Phytoremediation of soil multi-contaminated with hydrocarbons and heavy metals using sunflowers. **International Journal of Engineering & Technology**, v. 14, p. 1 - 6, 2014.
- MOREIRA, E. G. **Aplicação da análise por ativação com nêutrons ao estudo da composição química de materiais metálicos**. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002.
- NOMURA, S. C.; SILVA, C. S. D. S. D.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, v. 31, p. 104-113, 2008.
- OZBEK, N.; BAYSAL, A. Determination of sulfur by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry: Review of studies over the last 10 years. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 62 - 76, 2017.
- PIADÉ, J. -J. et al. Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarettesmoke, compared to arsenic or lead. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 12–26, 2015.
- PRAPAGDEE, B.; CHANPRASERT, M.; MONGKOLSUK, S. Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. **Chemosphere**, v. 92, p. 659 - 666, 2013.
- RASKIN, L.; SMITH, R. D.; SALT, D. E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Plant biotechnology**, v. 8, p. 221-226, 1997.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771 - 780, 2004.
- ROBERTS, T. L. Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science. **Procedia Engineering**, v. 83, p. 52 – 59, 2014.

- RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Cobre. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 161-162, 2012.
- SHRIVER, D.; ATKINS, P. **Química Inorgânica**. 4a Edição. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios da Análise Instrumental**. 6a Edição. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2009.
- SODRÉ, F. F.; LENZI, E.; COSTA, A. C. S. D. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**, v. 24, p. 324-330, 2001.
- SOUZA, A. O. D. et al. Determinação de Cd e Pb em amostras de goma xantana por GF AAS, **Química Nova**, v. 38, p. 209 - 213, 2015.
- TANGAHU, B. V. et al. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, p. 1-31, 2011.
- ULLAH, A. et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28–40, 2015.
- WALSH, A. The development of the atomic absorption spectrophotometer. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 1943 - 1952, 1999.
- WELZ, B. et al. High-Resolution Continuum-source Atomic Absorption Spectrometry – What Can We Expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 220 - 229, 2003.
- WELZ, B. et al. **High-Resolution Continuum Source AAS. The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry**. [S.l.]: WILEY-VCH, 2005.
- WILSON-CORRAL, V. et al. Phytoextraction of gold and copper from mine tailings with *Helianthus annuus* L. **Minerals Engineering**, v. 24, p. 1488 - 1494, 2011.
- YANG, S. et al. Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 8, p. 394 - 404, 2014.
- ZAICHICK, S.; ZAICHICK, V. The effect of age on Ag, Co, Cr, Fe, Hg, Rb, Sb, Sc, Se and Zn contents in intact human prostate investigated by neutron activation analysis. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 69, p. 827 - 833, 2011.
- ZHI-XIN, N. et al. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 961 – 967, 2007.