

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Ingrid de Souza Pellegrini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS E
METALOIDES EM AMOSTRAS DE SANGUE ANIMAL POR DMA E TXRF**

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEx/DQ. 1.486

D. 807

Ingrid de Souza Pellegrini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS E
METALOIDES EM AMOSTRAS DE SANGUE ANIMAL POR DMA E TXRF**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clésia Cristina Nascentes
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Leal

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

P381d Pellegrini, Ingrid de Souza.
2022 D Desenvolvimento de métodos para determinação de metais e metaloides em amostras de sangue animal por DMA e TXRF [manuscrito] /Ingrid de Souza Pellegrini. 2022.

[viii], 62 f.: il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Carlos Augusto Gomes Leal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Validação de método - Teses 3. Metais - Teses 4. Fluorescência de raios x - Teses 5. Mercúrio - Teses 6. Arsênio - Teses 7. Níquel - Teses 8. Crômio - Teses 9. Espectrometria de massas - Teses I. Nascentes, Clésia Cristina - Orientadora II. Leal, Carlos Augusto Gomes III. Título

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Desenvolvimento de Métodos Para Determinação de Metais e Metaloides Em Amostras de Sangue Animal Por DMA e TXRF"

Ingrid de Souza Pellegrini

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG

Prof. Guilherme Dias Rodrigues
UFMG

Profa. Maria José Nunes de Paiva
UFMG

Belo Horizonte, 07 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Clésia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior, em 07/03/2022, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Guilherme Dias Rodrigues, Professor do Magistério Superior, em 08/03/2022, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Jose Nunes de Paiva, Membro, em 10/03/2022, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1289738 e o código CRC F1C5DA2F.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pela Sua infinita bondade e pelo Seu amor por mim.

Também gostaria de agradecer às famílias Souza, Pellegrini, Ferraz e Penido pelo apoio incondicional.

Aos amigos de longa data e aos que fiz durante o curso de Mestrado, o meu muito obrigada.

À professora Clésia Cristina Nascentes pela oportunidade única e por ser sempre paciente e cuidadosa comigo.

À Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais por ter cedido as amostras de sangue utilizadas nesse trabalho.

E à Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensinamentos e pela acolhida.

RESUMO

Nesse trabalho, utilizando amostras de sangue animal, foram feitas otimizações e validações de dois métodos analíticos em duas técnicas instrumentais, o Analisador Direto de Mercúrio (DMA) e a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF). Os metais e os metaloides determinados por TXRF foram arsênio, crômio, níquel e selênio.

Os parâmetros avaliados na validação por DMA foram linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os parâmetros foram os mesmos para a validação por TXRF, exceto a linearidade.

O LQ para mercúrio no DMA foi de 0,054 ng. Já para o arsênio, o LQ foi 0,51 µg/L, para crômio 1,03 µg/L, níquel 0,68 µg/L e selênio 0,32 µg/L. Para todos os metais citados, as recuperações médias para repetibilidade e para precisão intermediária satisfizeram o intervalo de aceitação de 80% a 120%. A exatidão dos métodos foi avaliada a partir dos resultados de porcentagem de recuperação obtidos nas etapas de repetibilidade e de precisão intermediária.

Em relação à robustez, o único parâmetro que sofreu alteração significativa para mercúrio foi o tempo de atomização. Para arsênio, foram significativas as alterações feitas nos tempos entre preparo e leitura da amostra, e de secagem. Para crômio, não houve alteração significativa. Para níquel e selênio, apenas o tempo entre o preparo e a leitura da amostra foi significativo.

Palavras-chave: validação, metais, sangue, DMA, TXRF.

ABSTRACT

In this work, the selection of animal blood were performed optimizations and validations of two analytical methods in two instrumental techniques, the Direct Mercury Analyzer (DMA) and the Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry (TXRF). The metals determined by TXRF were metals, chromium, metals and selenium.

The parameters of linear quantification, estimation in the validation by DMA were obtained by DMA, repeatability, precision, precision, and robustness. The parameters were the same for validation by TXRF, except for linearity.

The LQ for mercury was 0.054 ng. As for arsenic, the LQ was 0.51 µg/L, for chromium 1.03 µg/L, elaborated 0.68 µg/L and selenium 0.32 µg/L. For all metals cited, such as medium recoveries and for precision that satisfy the 80% to 120% durability range. The precision of the methods was obtained from the results of repeatability and precision obtained.

Regarding the only robust change change, change for atomization time change. For arsenic, the changes made in the times between preparation and drying reading were significant. For chromium, there was no significant change. o Time and selenium, only the time between sample preparation and reading was significant.

Keywords: validation, metals, blood, DMA, TXRF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura simplificada de uma barragem construída utilizando o método a montante	5
Figura 2: Ilustração do filme fino de amostra sobre o disco.....	19
Figura 3: Esquema ilustrativo da incidência e da reflexão do raios-X sobre a amostra, e da posição do detector	20
Figura 4: Ilustração dos fenômenos de refração e reflexão a depender da relação entre os ângulos de incidência e crítico.....	20
Figura 5: Gráfico obtido para a curva de calibração na validação de método analítico por DMA.....	35
Figura 6: Gráfico referente à normalidade dos resíduos na validação de método por DMA.....	37
Figura 7: Gráfico ilustrativo da independência dos resíduos na validação de método por DMA	38
Figura 8: Filmes formados a partir do preparo da amostra com diluente alcalino (1) e com Triton X-100 0,5% (2).....	46
Figura 9: Craquelamento do filme e desprendimento de suas bordas após o preparo com diluente alcalino.....	47
Figura 10: Craquelamento do filme e desprendimento de suas bordas após o preparo com Triton X-100 0,5%.....	47
Figura 11: Filme formado sobre o disco não siliconizado após utilizar água ultrapura como diluente	49
Figura 12: Espectro obtido após análise da amostra de sangue fortificado com metais a 100 µg/L	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das três versões disponíveis para o DMA-80 Evo, Milestone	17
Tabela 2: Condições avaliadas para otimizar o método analítico para DMA	26
Tabela 3: Condições instrumentais do equipamento TXRF	30
Tabela 4: Estudos iniciais para otimização do método analítico no TXRF	31
Tabela 5: Condições avaliadas para otimização do método desenvolvido no DMA e as respectivas inclinações das curvas	32
Tabela 6: Programa de aquecimento para quantificação de mercúrio em amostra de sangue animal	33
Tabela 7: Condições de análise do método utilizado para análise por DMA	34
Tabela 8: Valores referentes ao teste de HORRAT para repetibilidade no DMA.	40
Tabela 9: Valores referentes ao teste de HORRAT para precisão intermediária no DMA	41
Tabela 10: Valores do nível baixo e do nível alto referentes a cada fator alterado na validação no DMA	43
Tabela 11: Planejamento experimental para os experimentos referentes a robustez para validação no DMA	43
Tabela 12: Resumo dos dados e das informações obtidas após validação de método no DMA.....	45
Tabela 13: Porcentagens de recuperação para cada metal na fase de otimização do método para TXRF	46
Tabela 14: Recuperação média para cada metal após o filme ter sido preparado com água e sem ser siliconizado.....	48
Tabela 15: Valores de LD, LQ e recuperação para cada metal.....	50
Tabela 16: Valores referentes ao teste de HORRAT para repetibilidade no TXRF (n=6).....	51
Tabela 17: Valores referentes ao teste de HORRAT para precisão intermediária no TXRF (n=12).....	52
Tabela 18: Valores do nível baixo e do nível alto referentes a cada fator alterado na validação no TXRF	52
Tabela 19: Planejamento experimental para os experimentos referentes a robustez para validação no TXRF	53
Tabela 20: Valor médio das concentrações para cada metal nos experimentos realizados para analisar a robustez do método	53
Tabela 21: Resumo dos resultados da influência da variação de cada fator na robustez do método.....	54
Tabela 22: Resumo dos dados e das informações obtidas após validação de método no TXRF	55

LISTA DE ABREVIÇÃO

μL – Microlitros

As – Arsênio

Cd – Cádmio

Cr – Crômio

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DMA - Analisador Direto de Mercúrio

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

Hg – Mercúrio

ICP-MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

mL – Mililitros

ng – Nanogramas

ONU - Organização das Nações Unidas

Pb – Chumbo

pH – Potencial Hidrogeniônico

PNSB - Política Nacional de Segurança de Barragem

TMAH - Hidróxido de Tetrametilamônio

TXRF - Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Marcos na proteção ambiental	14
2.2	Desastres ambientais no Brasil	15
2.3	Metais tóxicos e a contaminação animal	20
2.3.1	Arsênio	20
2.3.2	Cádmio	21
2.3.3	Chumbo	21
2.3.4	Crômio	22
2.3.5	Mercúrio.....	22
2.3.6	Níquel	23
2.4	Matrizes utilizadas para avaliar intoxicação animal	23
2.5	Técnicas analíticas para determinação de metais e metaloides em amostras biológicas	25
2.6	Analisador Direto de Mercúrio (DMA)	26
2.7	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF)	29
3.	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4.	METODOLOGIA.....	34
4.1	Instrumentação e materiais	34
4.2	Reagentes e Soluções	35
4.3	Procedimentos experimentais	35
4.3.1	Preparo de soluções utilizadas para a determinação de mercúrio.....	35
4.3.2	Preparo da amostra para análise por DMA	36
4.3.3	Otimização do método analítico	36
4.3.4	Parâmetros de validação	37
4.3.5	Preparo de soluções para análise por TXRF	39
4.3.6	Preparo de amostra e brancos para análise por TXRF	40
4.3.7	Otimização do método analítico para TXRF	41
4.3.8	Parâmetros de validação para TXRF	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.1	Desenvolvimento e Validação de Método Analítico no DMA	43
5.1.1	Otimização do método analítico	43
5.1.2	Etapas da validação do método analítico para Hg	45
5.1.2.1	Linearidade	45
5.1.2.2	Limites de detecção e quantificação	50
5.1.2.3	Repetibilidade	51
5.1.2.4	Precisão Intermediária	52
5.1.2.5	Tendência ou recuperação	52
5.1.2.6	Robustez	52
5.2	Desenvolvimento e Validação de Método Analítico no TXRF	46
5.2.1	Otimização do método analítico	46
5.2.2	Etapas da validação do método analítico	50
5.2.2.1	Limites de detecção e quantificação	50
5.2.2.2	Repetibilidade e exatidão	51
5.2.2.3	Precisão intermediária	51
5.2.2.4	Robustez	52
6.	CONCLUSÃO	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos contribui para a inovação da ciência. Isso porque um método novo muitas vezes busca otimizar o tempo de análise, reduzir gastos financeiros e considerar as questões ambientais. Além disso, busca ampliar as possibilidades disponíveis para análise de amostras que requerem condições mais específicas, como, por exemplo, grande complexidade da matriz e/ou pequena quantidade disponível para análise. Por isso, a busca por inovação deve ser incentivada tanto no ambiente acadêmico quanto nas indústrias e nos laboratórios de empresas.

Análises químicas são realizadas em diferentes contextos e em algumas situações, onde a quantidade de amostra é muito pequena, métodos de microanálise são requeridos. Neste contexto destaca-se a análise de materiais biológicos (sangue, soro, leite, pelos, penas e outros) de animais de pequeno porte. Isso porque o limite máximo permitido para coleta é proporcional à massa corporal do animal. Essas análises são importantes em casos de avaliação de impacto ambiental.

No Brasil, a atividade de mineração se mostra ativa e crescente com o passar dos anos. No ano de 2021, por exemplo, essa atividade representou aproximadamente 5% do valor do PIB nacional (MENDONÇA, 2021). Essa prática causa diversos impactos ambientais, principalmente quando há falha em sua administração. Como exemplo, podem ser citados os rompimentos de duas barragens de rejeitos, ambas em Minas Gerais (a primeira na cidade de Mariana, em 2015 e a segunda na de Brumadinho, em 2019). Além dos impactos ambientais, esses dois acontecimentos trouxeram inúmeras consequências para a sociedade e, principalmente, para os moradores das regiões atingidas.

De acordo com Salabert (2014), as principais vias de intoxicação de animais silvestres são a oral, nasal e por via dérmica. Ao ingerir água e alimentos contaminados, principalmente com metais tóxicos que podem ser acumulados nos tecidos, os animais podem ficar doentes. Desta forma, a determinação de metais e metaloides em amostras obtidas a partir de animais exposto é fundamental para avaliar o impacto e buscar medidas corretivas.

A literatura discute acerca de diversas técnicas analíticas instrumentais utilizadas para determinação de metais e metaloides em matrizes biológicas, como as Espectrometrias de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), de Absorção Atômica com forno de grafite (GFAAS) e de Absorção Atômica com Geração de Vapor a Frio. Entretanto, há outras técnicas que podem ser utilizadas como a espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) e o analisador direto de mercúrio (DMA) que requerem quantidades mínimas de amostra e são menos susceptíveis a efeitos de matriz, possibilitando a análise após procedimentos simples de diluição da amostra.

Para que um método possa ser implementado no laboratório, torna-se necessária a sua validação. A validação de métodos analíticos é um procedimento que visa demonstrar e comprovar que determinado método é adequado e eficiente para o que se propõe em uma rotina de laboratório. Para isso, é preciso que o método seja exato, preciso, estável, reprodutível e robusto diante de pequenas variações nos parâmetros de análise. Dessa forma, o resultado produzido pelo método deve ser compatível com o estabelecido pelos materiais de referência, se for o caso (MELO, 2020).

Para que um método seja validado, diversos experimentos são realizados em laboratório considerando parâmetros como seletividade/efeito de matriz, linearidade, recuperação/veracidade, repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Ao considerar todos esses parâmetros, a validação pode ser vista como um procedimento complexo. Não obstante, ao se tratar de amostras em pequenas quantidades, validar um método torna-se uma tarefa desafiadora.

Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação de metais em pequenas quantidades de amostra (sangue) empregando as técnicas DMA para Hg e TXRF para arsênio, cromo, níquel e selênio. Ambas são consideradas técnicas verdes. Amostras de sangue animal foram escolhidas visando auxiliar análises que têm como principal objetivo avaliar a intoxicação por metais tóxicos sofrida pela fauna após a ocorrência de desastres ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Marcos na proteção ambiental

A partir da Revolução Industrial, o mundo passou a ter necessidades diferentes e a exploração de recursos naturais foi intensificada. A situação se tornou crítica uma vez que a qualidade do meio ambiente não era vista como prioridade pelos envolvidos nos processos exploratórios (POTT; ESTRELA, 2017).

A disposição de rejeitos industriais feita de maneira incorreta e o vazamento acidental de determinadas substâncias químicas geraram contaminações no ar, no solo e nas águas. Além disso, a periculosidade das substâncias químicas utilizadas muitas vezes não era de conhecimento científico, tampouco da população em geral. Um exemplo de substância que era utilizada até a década de 70 em muitos países, inclusive no Brasil e que hoje é de uso proibido é o diclorodifeniltricloroetano, mais conhecido como DDT. Essa substância era utilizada como inseticida, mas posteriormente foi reconhecida como carcinogênico (DAMATO *et al.*, 2002).

Acontecimentos como os supramencionados despertaram a atenção dos governantes, da comunidade científica e da sociedade, e fez com que surgissem discussões acerca da contaminação ambiental. Percebeu-se, então, a necessidade de proteger o meio ambiente de maneira que o desenvolvimento tecnológico pudesse acontecer de forma harmoniosa com a natureza.

A nível global, existem diversos documentos que tratam sobre o equilíbrio entre avanço tecnológico e meio ambiente. A Declaração da Conferência da Organização das Nações Unidas (ONU) sobre o Meio Ambiente foi promulgada em Estocolmo, no ano de 1972. Esse documento foi a primeira grande conferência marco na área ambiental. Ainda em 1972, a ONU criou o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (ONU, 2020).

O ano de 1992 foi marcado pela realização da Conferência nas Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento, no Rio de Janeiro. Nesse evento, que ficou conhecido como Rio 92, discutiu-se sobre a Agenda 21, documento que trata da proteção do planeta Terra e de seu desenvolvimento sustentável (ONU, 2020).

Em 2002, ocorreu a Rio+10 em Joanesburgo, na África do Sul. Dez anos depois, a Rio+20 acontecia no Rio de Janeiro, novamente. Por fim, em 2015, a Cúpula de Desenvolvimento Sustentável marcava a cidade de Nova York. Nesse último encontro, os países firmaram um acordo denominado Agenda 2030. Esse documento prevê 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, dentre eles os “cidades e comunidades sustentáveis” e “consumo e produção responsáveis”, que devem ser cumpridos até o ano de 2030 (ONU, 2020).

Já a nível nacional, no dia 31 de agosto de 1981 foi promulgada a lei federal nº 6.938, que instituiu a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA). Essa lei estabelece, em seu artigo 1º, que o objetivo da PNMA é preservar, melhorar e recuperar a qualidade ambiental propícia à vida, e visa assegurar condições de desenvolvimento socioeconômico de maneira sustentável ambientalmente.

A Constituição Federal de 1988 aborda sobre o meio ambiente em seu texto. O seu artigo 225 diz que: “Todos têm o direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”. Pode-se concluir que a responsabilidade ambiental não cabe apenas ao Estado, mas também à sociedade em geral.

Outra lei que merece destaque a nível nacional é a de nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, mais conhecida como Lei de Crimes Ambientais. Ela dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências (BRASIL, 1998).

Nota-se que o nosso ordenamento jurídico possui instrumentos que normatizam e controlam as atividades que impactam o meio ambiente no território brasileiro. Entretanto, a fiscalização dessas atividades é defasada, sendo um dos fatores que pode explicar a ocorrência de desastres ambientais no Brasil.

2.2 Desastres ambientais no Brasil

Nos últimos anos, ocorreram vários desastres ambientais no Brasil. Os maiores e mais impactantes foram envolvendo barragens de rejeitos do processo de beneficiamento

do minério de ferro. Esses desastres foram frutos do descaso e da irresponsabilidade com a disposição adequada, eficaz e segura de rejeitos da indústria de mineração.

Uma das maneiras de armazenar os rejeitos oriundos do beneficiamento do minério é utilizando barragens. As barragens podem ser construídas utilizando os métodos a jusante, de linha de centro ou a montante. O método a montante é o menos seguro entre os mencionados, todavia é o mais utilizado por ter menor custo financeiro. Isso porque os degraus da barragem são formados pelos próprios rejeitos a partir de um dique de partida, dispensando a construção de estruturas da engenharia civil (SANTOS *et al.*, 2021). As barragens que armazenavam rejeitos de mineração e se romperam nas cidades de Mariana e Brumadinho foram construídas pelo método à montante. A Figura 1 a seguir ilustra de forma simplificada como é a barragem a montante e traz as denominações de suas partes.

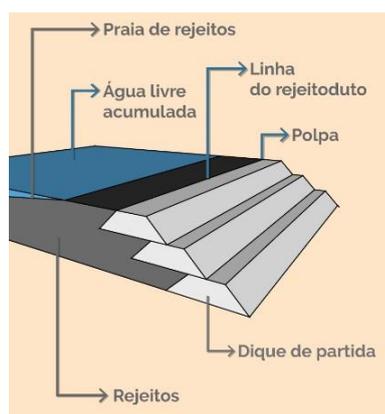


Figura 1: Estrutura simplificada de uma barragem construída utilizando o método a montante.

Fonte: ESTEVES; ANDRADE, 2022.

No dia 5 de novembro de 2015, em Mariana, Minas Gerais, ocorreu o maior deles em relação aos impactos ambientais. O rompimento de uma barragem sob responsabilidade das empresas Samarco, Vale do Rio Doce e BHP Billiton atingiu o Rio Doce e espalhou cerca de 50 milhões de metros cúbicos de lama pelo curso desse rio. Não obstante, atingiu outros dois rios, o Gualaxo do Norte e o Carmo, totalizando aproximadamente 15 km² de impacto direto nos três rios citados. Após 17 dias de escoamento da lama, o Oceano Atlântico também foi atingido (DIAS *et al.*, 2015). Além disso, 19 pessoas tiveram suas vidas ceifadas e 329 ficaram desabrigadas em

razão do desastre de Mariana. A vila denominada Bento Rodrigues ficou soterrada em praticamente sua totalidade.

Mais recentemente, em Brumadinho, Minas Gerais, no dia 25 de janeiro de 2019, a história se repetiu: houve o rompimento da barragem B1, também de responsabilidade da empresa Vale do Rio Doce. Dessa vez, o desastre ambiental foi considerado o maior do Brasil em relação à quantidade de vidas humanas perdidas. Ao todo, foram 270 óbitos, estando 6 pessoas ainda desaparecidas até a data de hoje (23/02/2022) de acordo com as atualizações publicadas no site da Polícia Civil de Minas Gerais e pelo Corpo de Bombeiros Militar de Minas Gerais. Do total, 130 pessoas eram funcionárias da mineradora Vale do Rio Doce (SILVA *et al.*, 2018). A barragem rompida era capaz de armazenar 12 milhões de metros cúbicos de rejeitos (FELICIANO; PASQUALETO, 2019).

Em 2010, cinco anos antes do rompimento ocorrido em Mariana e nove do de Brumadinho, foi instituída no Brasil a Política Nacional de Segurança de Barragem (PNSB). Esse documento estabelece, por exemplo, instrumentos para a gestão do risco de rompimento de barragem, as competências dos órgãos fiscalizadores, as infrações e as responsabilidades dos envolvidos. Além do mais, ele dispõe sobre barragens que objetivem acumular água para quaisquer usos, resíduos industriais, e servir como disposição final ou temporária de rejeitos (BRASIL, 2010).

Hoje, após a ocorrência de dois grandes desastres ambientais envolvendo barragens de rejeitos, a PNSB permanece ineficiente. Tal fato elucida que não é suficiente a existência de diversos documentos que regularizem o uso de barragens e que, até mesmo, criminalizam determinados atos contra o meio ambiente, se não houver fiscalização efetiva antes do ato e, quando preciso, a devida reparação dos danos causados por ele e a punição severa.

Os dois acontecimentos citados acima atingiram diretamente a fauna e a flora dos locais por onde a lama passou, causando a morte de diversos animais e a destruição da vegetação nativa, além de contaminar o solo, as águas e o ar. Esses desastres modificaram os ecossistemas das regiões, além de impactarem a fonte de renda das populações ribeirinhas e alterarem a paisagem da região.

A lama de rejeitos quando seca torna o solo impermeável e destrói os componentes orgânicos da terra, além de diminuir a quantidade de nutrientes disponível e reduzir o pH, o que torna o solo ácido e inapropriado para o cultivo agrícola, por exemplo. Para que um solo ácido seja utilizado para plantações, é necessário que ele passe pelo processo denominado calagem. Esse processo objetiva eliminar a acidez do solo (SANTIAGO *et al.*, 2022). Mas, no caso de o solo ter sido contaminado por metais tóxicos, ele se torna inapropriado para atividades agrícolas devido a uma possível intoxicação alimentar daqueles que consumirem os alimentos ali cultivados.

Após os rompimentos das barragens, o ar atmosférico das regiões atingidas pela lama sofreu alterações. Estudos apontam que as partículas em suspensão, formadas a partir da lama seca, são de tamanho inferior a 10 nm. Partículas desse tamanho são capazes de penetrar nos alvéolos pulmonares e na corrente sanguínea. As consequências desse fato são a diminuição da atividade mucociliar e dos macrófagos, a irritação nas vias respiratórias, o estresse oxidativo e a inflamação pulmonar e sistêmica. A exposição crônica pode ser, até mesmo, cancerígena (ARBEX *et al.*, 2012).

Ao atingir as águas dos rios, a lama, composta principalmente por ferro e alumínio, ocasionou a morte de inúmeras espécies aquáticas. Isso porque a presença da lama no rio causa diminuição do oxigênio disponível na água para os animais aquáticos. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), cerca de onze toneladas de peixes morreram em decorrência do acontecimento em Mariana, além de atingir os berçários de caranguejos e de peixes situados no estado do Espírito Santo (REDAÇÃO, 2015).

O artigo 53 da lei de nº 9.605/1998 diz que haverá aumento de pena de $\frac{1}{6}$ a $\frac{1}{3}$ se o fato resultar diminuição de águas naturais, a erosão do solo ou a modificação do regime climático. Além disso, o seu artigo 54 diz que é crime causar poluição de qualquer natureza que resulte ou possa resultar danos à saúde humana ou que provoquem a destruição significativa da flora ou a mortandade de animais (BRASIL, 1998).

A flora também foi atingida pela lama de rejeitos. Como exemplo, podem ser citadas as sementes que estariam em fase de queda para que pudessem ser germinadas e, assim, houvesse reprodução de determinada espécie de planta. Além do mais,

diversas árvores foram arrancadas da terra e arrastadas por quilômetros de distância, levando consigo suas flores e seus frutos. Isso impacta na reprodução dessas árvores e contribui para a redução da biodiversidade. Vale ressaltar que o artigo 53 da lei de nº 9.605/1998 estabelece o aumento da pena se o crime ambiental é cometido no período de queda de sementes ou no de formação de vegetação (BRASIL, 1998).

Além da fauna aquática, a silvestre também foi bastante impactada. Os animais silvestres bebem as águas dos rios e se alimentam de plantas e de outros animais que também dependem dessas águas para sobreviverem. Dessa forma, a ingestão de água contaminada acarretará a intoxicação de todas as espécies que dela fazem uso.

Um fenômeno observado após a ocorrência de desastres ambientais dessa natureza é a migração de espécies animais. As aves que perderam seus ninhos, por exemplo, irão migrar para outra região a fim de reconstruí-lo. Os animais que sobreviveram após o escoamento da lama também irão migrar para um local em busca pela sobrevivência. Essas migrações podem causar desequilíbrio ecológico no local de destino. Isso porque, nesses locais, haverá espécies que ali vivem em harmonia e será iniciada uma disputa por alimentos e por espaço após a chegada dos novos habitantes, o que causa desarmonia do ecossistema.

Vale ressaltar o artigo 29 da lei de nº 9.605/1998 formaliza como crime aquela atividade que modifica, danifica ou destrói ninho, abrigo ou criadouro natural, e o 53 dispõe que há aumento na pena se o crime for cometido contra espécies raras ou ameaçadas de extinção, ainda que a ameaça ocorra apenas no local da infração (BRASIL, 1998).

Após serem atingidos pela lama, os animais precisarão de tratamento adequado. Mas, existem metais tóxicos nela presentes que não são expelidos pelo organismo do animal (e nem pelo do humano) ou que são eliminados com bastante dificuldade. As consequências desse fato dependem da natureza do metal que foi absorvido, da quantidade ingerida e do tempo de exposição a ele.

Tendo em vista as legislações vigentes no ordenamento jurídico brasileiro acerca de crimes ambientais e seus impactos sobre a fauna, torna-se necessária a análise

toxicológica por metais pesados dos animais que tiveram contato com a lama, tendo sobrevivido ou não. Essa análise irá auxiliar na materialização do ato criminoso.

2.3 Metais tóxicos e a contaminação animal

Os animais podem sofrer contaminação por metais tóxicos de diversas maneiras. Como exemplo, podem ser citadas a ingestão de água, gramíneas, vegetais e outros alimentos contaminados, além do contato com rejeitos de atividades relacionadas à mineração.

De maneira geral, a intoxicação por metais tóxicos em animais pode causar piora repentina em seu estado de saúde, vômitos, fraqueza muscular, alteração nas fezes quanto à coloração e à consistência, falta de apetite e, até mesmo, convulsões (SALABERT, 2014).

Além disso, os metais tóxicos prejudicam a reprodução dos animais. Isso porque eles interferem na atividade das glândulas endócrinas e, conseqüentemente, na produção de hormônios fundamentais para tal processo, como o hormônio folículo estimulante, o luteinizante, o do crescimento e o tireotrófico (COSTA *et al.*, 2020).

Para esse trabalho, os metais selecionados para serem abordados na revisão bibliográfica foram arsênio, cádmio, chumbo, crômio, mercúrio e níquel devido a relevância tóxica de cada um e a viabilidade de alguns deles serem determinados pelas técnicas analíticas instrumentais escolhidas.

2.3.1 Arsênio

O arsênio (As) é um metaloide que pode ser encontrado nas formas orgânica e inorgânica, como cátions As^{3+} ou As^{5+} , sendo o trivalente a forma com maior potencial de intoxicação para humanos e animais.

Quimicamente, o arsênio é semelhante ao fósforo em alguns aspectos. Ambos possuem, por exemplo, 5 elétrons na camada de valência e, por isso, pertencem à família 15 da tabela periódica. Vale ressaltar que os elementos químicos que pertencem à mesma família possuem, além da mesma configuração de elétrons na camada de valência, propriedades químicas e físicas semelhantes. Devido a essas

similaridades, estudos mostram a possibilidade de o arsênio substituir o átomo de fósforo no grupo fosfato de uma molécula de DNA (PATRA *et al.*, 2004).

Um dos sintomas de intoxicação por arsênio em animais é a intensa diarreia, que causa desidratação. Além disso, o animal intoxicado apresenta úlcera, avermelhamento da mucosa intestinal e hemorragia em membranas (GONÇALVES, 2015).

As principais fontes de contaminação do solo por arsênio são os resíduos da indústria cimenteira e da queima de combustíveis fósseis. Além disso, os fertilizantes fosfatados também são fontes de contaminação (CAMPOS, 2022).

2.3.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é um elemento químico localizado na família 12 da tabela periódica, pertencendo ao grupo dos metais de transição. Ele possui vida biológica longa e é excretado lentamente pelo organismo humano.

A contaminação dos solos por Cd se dá, principalmente, pela mineração, poluição atmosférica, queima de combustíveis fósseis e pelas indústrias metalúrgicas. Consequentemente, o animal que se alimenta de frutas e vegetais presentes no solo contaminado será intoxicado. O principal sintoma originado pela intoxicação por esse metal são distúrbios gastrointestinais (MATTHEWS, 1984).

2.3.3 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal que se encontra no grupo 14 da tabela periódica e é encontrado no estado sólido à temperatura ambiente.

Ele apresenta alta periculosidade para o sistema nervoso, para os rins e para a medula óssea. Além disso, ele altera a estabilidade da cromatina e interfere nos processos genéticos do cromossomo, o que pode potencializar a reprodução desordenada de células no organismo e gerar um câncer (CAMPOS, 2022).

De maneira geral, a exposição ao chumbo pode causar disfunções no sistema nervoso central e no periférico, elevação da pressão sanguínea, anemia, insuficiência renal, gota, infertilidade masculina e distúrbios neurológicos na prole. A intoxicação por

chumbo em crianças afeta o sistema nervoso central, e em adultos desencadeia neuropatia periférica e hipertensão (COLASSO, 2020).

2.3.4 Crômio

O crômio é um metal de transição pertencente à família 6 da tabela periódica e pode se apresentar nas formas Cr^{+2} , Cr^{+3} , ou Cr^{+6} . Ele pode ser encontrado naturalmente em rochas, poeiras, carnes, cereais e no solo, além de ser amplamente utilizado pela indústria, principalmente como tratamento anticorrosivo (CHEIS, 2013).

Em sua valência +3, o crômio é essencial ao organismo humano. Já na valência +6, a sua forma mais solúvel, esse metal se torna tóxico, carcinogênico e mutagênico. A inalação do Cr^{+6} pode causar irritação nas vias respiratórias. Vale destacar que essa forma é resultante de processos industriais pelos quais passam o Cr^{+3} (CHEIS, 2013).

2.3.5 Mercúrio

O mercúrio (Hg), metal que pode ser encontrado em sua forma elementar (Hg^0) ou como cátions (Hg_2^{2+}), está presente no meio ambiente como consequência de processos naturais ou pela ação antrópica.

O mercúrio é tóxico para o organismo tanto em sua forma inorgânica quanto na forma orgânica. Quando o mercúrio entra em contato com o meio aquático, por exemplo, ele sofre oxidação e, a partir disso, é originada uma substância química denominada metilmercúrio. Essa substância é biotóxica, bioacumulável, carcinogênica, mutagênica, teratogênica e bastante suscetível a acumular-se ao longo da cadeia alimentar, até atingir o homem (VIEIRA; ALHO, 2000).

A intoxicação aguda por mercúrio elementar pode causar fraqueza, náuseas, vômito, diarreia e tosse, podendo evoluir para uma disfunção respiratória grave. A intoxicação por sua forma elementar causa bronquite, hiper excitabilidade e lesões nos rins. As formas Hg^+ e Hg^{2+} podem acarretar falência renal, inflamação da mucosa gastrointestinal e visão obscurecida. Já o metilmercúrio produz efeitos como constrição do campo visual, surdez, tremores, coma e morte (COLASSO, 2020).

Além disso, estudos mostram que o mercúrio causa danos aos cromossomos e ao DNA, além de atingir o sistema nervoso. Dessa forma, o mercúrio é um metal bastante prejudicial à saúde.

2.3.6 Níquel

O níquel (Ni) está localizado na família 10 da tabela periódica e pode se apresentar nos estados de oxidação Ni^{-1} , Ni^{+1} , Ni^{+2} , Ni^{+3} e Ni^{+4} , sendo que a +2 prevalece sob condições ambientais. Ele está presente no solo, na água e no ar em concentrações traço.

A literatura relata diversas consequências da intoxicação por níquel, como dermatite alérgica e aumento da incidência de câncer pulmonar naqueles indivíduos que ficaram expostos ao níquel por tempo prolongado (PAVESI, 2020).

2.4 Matrizes utilizadas para avaliar intoxicação animal

Um animal com suspeita de intoxicação após ingerir algum material contaminado, como por exemplo pilha, tinta, ração ou até mesmo rejeitos da indústria mineradora após a ocorrência de um desastre ambiental, deve ser submetido a exames toxicológicos. Em caso de comprovada a intoxicação, esse resultado poderá materializar um crime e até auxiliar na mensuração da extensão da gravidade do ato. Para isso, em caso de animais mortos, amostras de vísceras como fígado, rins e intestino podem ser utilizadas na análise. Isso se deve ao fato de a maior parte das substâncias tóxicas se acumularem nesses órgãos. Quando se trata de análise de animais vivos, amostras de pelos, penas, fezes, urina, leite e sangue são utilizadas nas análises toxicológicas.

O pelo, assim como o cabelo, é uma matriz composta majoritariamente pela proteína queratina, havendo também uma parcela de água, lipídios e sais minerais (BORDIN *et al.*, 2015). É utilizado em análises forenses que busquem investigar intoxicação ocorrida há pelo menos algumas semanas. Isso porque é necessário que o pelo cresça para que a substância tóxica seja externalizada do organismo. Vale ressaltar que essas substâncias são incorporadas nos pelos de maneira progressiva. Por isso, o tempo de intoxicação está relacionado ao segmento no qual a substância estiver concentrada, sendo o mais recente na região basal e o mais antigo nas pontas.

As penas são compostas pelas seguintes estruturas: cãlamo (parte do tubo transparente central mergulhado na pele), raque (continuação do cãlamo para fora da pele), barbas (ramificações que saem da raque) e barbelas (ramificações das barbas). Elas servem para cobrir o corpo da ave, facilitar o voo, conservar calor no corpo da ave e até mesmo para camuflar o animal de seus predadores. Em relação ao uso com objetivos forenses, as penas possuem finalidades semelhantes às dos pelos e dos cabelos, como analisar a exposição crônica do animal à determinada substância tóxica (BIOCIÊNCIAS, 2022). Dessa forma, pelos e penas são amostras indicadas para avaliação de contaminação crônica.

Outra matriz indicada para análises toxicológicas são as fezes por serem o resultado do processo de digestão de alimentos e bebidas, sendo indicadas para avaliação de contaminação aguda. Cerca de 90% da quantidade ingerida de chumbo, por exemplo, que não foi absorvida pela via gastrointestinal é excretada pelas fezes. Dentre as vias de excreção existentes, o mercúrio orgânico possui maior afinidade pelas fezes (ZUCOLOTO *et al.*, 2017).

A urina é bastante utilizada como amostra para fins forenses uma vez que a sua coleta não é invasiva e por serem encontradas altas concentrações dos metabólitos em sua composição. No caso da análise do uso de substâncias, um fator limitante é que a maioria dessas substâncias são detectadas após 2 a 5 dias do uso, o que torna a análise restrita aos primeiros dias. Para análise de metais tóxicos, a urina também tem um fator limitante. Vale ressaltar que as matrizes citadas até então são matrizes possíveis de serem coletadas de maneira pouco agressiva aos animais e isso é uma vantagem frente ao sangue, por exemplo.

O sangue é um fluido biológico composto por água, proteínas, gorduras, sais minerais e células. Apesar de ser uma amostra coletada de maneira invasiva (por punção em alguma veia), o sangue é uma matriz bastante utilizada em análises toxicológicas por diversos fatores. Ele permite estimar o tempo que se passou entre o uso (ou a exposição) e a detecção da substância no organismo e é uma matriz indicada para avaliação de intoxicação aguda (BORDIN *et al.*, 2015).

Além disso, para análise de intoxicação animal crônica por metais tóxicos, o sangue também é visto como uma matriz bastante promissora. Isso porque os metais

acumulados no organismo circulam pela corrente sanguínea. A matriz sangue pode ser armazenada no *freezer* após a adição de substâncias anticoagulantes e conservantes.

2.5 Técnicas analíticas para determinação de metais e metaloides em amostras biológicas

A fim de determinar metais em amostras biológicas, diversas técnicas são utilizadas em laboratórios. As mais utilizadas, devido à alta sensibilidade, são as Espectrometrias de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) e de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS). Assim como toda técnica analítica instrumental, elas possuem vantagens e desvantagens.

A ICP-MS apresenta como principal vantagem a alta sensibilidade, sendo adequada para determinar baixas concentrações, como normalmente ocorre nas matrizes biológicas. Além disso, é uma técnica multielementar e, por isso, é capaz de determinar diversos elementos químicos simultaneamente (KRUG *et al.*, 2001).

Para analisar amostras biológicas, Brandão (2015) utilizou a ICP-MS para determinar estanho em tecidos de ratas. Já Rodrigues (2010) avaliou técnicas acopladas à ICP-MS visando estudar o fracionamento e a especiação química do mercúrio em sangue e plasma de carneiro.

Ao contrário da ICP-MS, a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) é uma técnica monoelementar, exceto quando há o uso de uma lâmpada adequada para realizar a leitura de vários metais. Tal fato é considerado como desvantagem quando o objetivo é determinar diversos elementos químicos simultaneamente, como é o caso deste trabalho (TECHNOLOGIES, 2022).

Para determinar o metal mercúrio em amostras diversas, as técnicas convencionalmente utilizadas são Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, ICP-MS e GFAAS. De maneira geral, elas possuem como desvantagens a necessidade da etapa de preparo da amostra, que demanda um tempo considerável, aumenta a chance de contaminação da amostra e diminui a detectabilidade, além de requerer o uso de reagentes. Além disso, é necessário o posterior armazenamento e descarte de resíduos gerados. Outro fato limitante, no caso da técnica ICP-MS é o alto consumo de gases durante a análise, como o argônio,

que tem alto custo financeiro. Ademais, sofrem efeito de memória para o mercúrio e interferências de outras substâncias presentes na amostra.

Considerando o exposto e buscando utilizar técnicas alternativas para determinar metais e metaloides em amostras de sangue, cujas quantidades disponíveis são normalmente pequenas, foram selecionadas duas técnicas para a execução desse trabalho: o Analisador Direto de Mercúrio (DMA) e a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF). Isso porque elas foram consideradas técnicas promissoras para alcançar os objetivos do trabalho, além de serem consideradas técnicas verdes.

Técnicas verdes são aquelas que atendem pelo menos à parte dos princípios da Química Verde. A Química Verde é um ramo da Química que foi definido por John Warner Paul Anastas em 1991. Ela possui doze princípios que tratam sobre, por exemplo, prevenir a formação de resíduos tóxicos em análises químicas, reduzir o uso de solventes e o consumo de energia, e buscar por metodologias que sejam executadas à pressão e temperatura ambientes (eficiência de energia). Além disso, esse ramo da Química busca reduzir o consumo de matérias primas, como trabalhar com volumes menores de amostras e utilizar técnicas que independem do uso de gases (DIAS, 2022).

Diante do exposto, as técnicas DMA e a TXRF possuem características que atendem aos princípios citados e serão mais bem explicadas a seguir.

2.6 Analisador Direto de Mercúrio (DMA)

Essa técnica permite que a determinação de Hg seja realizada sem prévia digestão da amostra uma vez que realiza as etapas de decomposição, pré-concentração por amalgamação e determinação por absorção atômica. O fato de a etapa de preparo de amostra ser dispensada otimiza o tempo total da análise (BAËTA, 2004) e minimiza problemas de perdas e contaminações. Além disso, dispensa o uso de reagentes para digestão da amostra, por exemplo, e o posterior acondicionamento, tratamento e descarte dos resíduos gerados. Ademais, a técnica não utiliza gases de alto custo durante a análise, como o argônio que é bastante utilizado na técnica ICP-MS. O arraste do vapor de mercúrio e de outros elementos presentes na amostra pode ser feito utilizando um compressor de ar. Além disso, o custo para aquisição do

equipamento é menor quando comparado aos clássicos, como o ICP-MS. Vale ressaltar, entretanto, que o DMA é um equipamento exclusivo para Hg ao passo que o ICP-MS determina cerca de 70 elementos.

O DMA possui como vantagem a estabilidade da curva analítica elaborada. Nesse trabalho, por exemplo, utilizou-se a mesma curva de calibração durante toda a validação do método analítico. Vale ressaltar que foram feitas leituras de amostras a fim de realizar a checagem da curva quinzenalmente.

Essas características da técnica de DMA, além do uso de pequena quantidade de amostra, contribuem para que ela seja considerada como uma técnica verde.

A primeira etapa que compõe a técnica citada é a decomposição térmica. Nela, a amostra é introduzida no forno para ser seca e decomposta. A segunda etapa consiste na conversão catalítica dos íons Hg^+ e Hg^{2+} em Hg^0 . Já a terceira, é a amalgamação do mercúrio, etapa em que ele é capturado pela amalgama de ouro e os demais compostos presentes na amostra são eliminados. Feito isso, o mercúrio é liberado após o aquecimento do amalgamador e detectado por absorção atômica na quarta etapa do processo (ANALÍTICA, 2021).

A técnica de análise direta de mercúrio pode ser empregada para determinação desse metal em amostras ambientais, alimentícias, cimenteira, agrícola, cosmética, dentre outras.

Soares *et al.* (2015) utilizou o DMA para detectar mercúrio em solos da região sudeste do Brasil sem influência antropogênica, além de estabelecer correlação entre as características químicas e físicas do solo e o teor de mercúrio naturalmente nele encontrado.

Melendez-Perez e Fostier (2013) usaram o DMA para avaliar um método que quantificasse mercúrio total em amostras de solo e de folhas. Rocha (2021) utilizou a técnica para otimizar e validar métodos para determinação de mercúrio lábil e total em sólidos em suspensão e metilmercúrio em ambientes de águas pretas amazônicas.

O DMA também é utilizado para analisar amostras biológicas. Mendes (2017), por exemplo, utilizou a técnica para avaliar os teores de mercúrio em cabelos de crianças

residentes em área de garimpo no município de Chapada de Natividade, em Tocantins.

O equipamento Analisador Direto de Mercúrio utilizado nesse trabalho foi o DMA-80 Evo, versão TriCell com feixe duplo, da Milestone. Vale ressaltar que o DMA da Milestone apresenta três versões: Dual Cell com feixe simples, Dual Cell com feixe duplo e TriCell com feixe duplo. As principais diferenças entre elas estão relacionadas ao limite de detecção, à faixa de trabalho e à precisão. Dentre as três versões, a TriCell com feixe duplo apresenta o menor limite de detecção, a maior faixa de trabalho e maior precisão. A Tabela 1 sintetiza as características de cada versão (ANALÍTICA, 2021).

Tabela 1: Características das três versões disponíveis para o DMA-80 Evo, Milestone.

	Dual Cell com feixe simples	Dua Cell com feixe duplo	TriCell com feixe duplo
Limite de detecção (ng)	0,003	0,001	0,0003
Faixa de trabalho (ng)	0,03 a 1500	0,01 a 1500	0,003 a 1500
Precisão (ng)	≤ 1% em 10 ng de Hg	≤ 1% em 5 ng de Hg	≤ 1% em 1 ng de Hg

Fonte: Analítica, 2021.

O equipamento possui diversas vantagens operacionais por possuir uma tecnologia fácil de usar, com calibração duradoura para todo tipo de matriz (sólida, líquida ou gasosa) e sem efeito de memória devido a função de autobranqueamento (MILESTONE, 2021). O efeito de memória está relacionado à saturação do sistema após a retenção demasiada de Hg. Para que isso não ocorra, a função autobranqueamento é acionada automaticamente quando uma amostra apresenta alta concentração de mercúrio. Ao perceber tal situação, o equipamento realiza leituras sem que haja amostra até que a concentração retorne ao nível desejado.

Vale ressaltar que em técnicas de ICP o mercúrio adere facilmente às paredes do sistema de introdução de amostra e isso causa efeito de memória. Para solucionar esse problema, é necessário aumentar o tempo de lavagem entre as leituras das amostras e, até mesmo, utilizar uma solução contendo ouro para minimizar os efeitos de memória (ANALÍTICA, 2021).

Segundo o Manual de Garantia Analítica, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a validação de um método analítico em DMA dispensa a etapa de seletividade pois a técnica é isenta de efeito de matriz (MAURÍCIO *et al.*, 2011). Isso porque o Hg fica retido no amalgamador e os outros materiais volatilizados são eliminados. Depois, o amalgamador é aquecido e apenas o vapor de mercúrio é liberado e detectado por absorção atômica.

2.7 Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF)

A análise por fluorescência de raios-X (XRF) baseia-se na medição das intensidades dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra sólida ou líquida, quando irradiada com elétrons, prótons, raios-X ou gama com energias apropriadas. Quando os elétrons da camada mais interna do átomo (ex.: K e L) interagem com fótons com energia na região dos raios X, ocorre a foto ejeção desses elétrons, criando-se uma vacância. Para promover a estabilidade, imediatamente as vagas eletrônicas são preenchidas pelos elétrons das camadas mais próximas. Como resultado, há um excesso de energia no processo, que é manifestado na forma de emissão de raios X de comprimentos de onda característicos de cada átomo presente na amostra.

Dependendo do arranjo instrumental, tem-se diferentes técnicas, como Fluorescência de Raios-X com Dispersão por Comprimento de Onda (WDXRF), com Energia Dispersiva (EDXRF) e induzida por Radiação Síncrotron (RXRF). Como variante da EDXRF, tem-se a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF), que apresenta vantagens como o uso de pequenas quantidades de amostra e menores valores de limite de detecção em relação a EDXRF (SANTOS *et al.*, 2013).

A TXRF é uma técnica utilizada para analisar diversas amostras. Essa técnica analítica permite analisar amostras em quantidades diminutas ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$). Nesse trabalho, por exemplo, apenas 10 μL da amostra foram depositados sobre o disco de quartzo. Além disso, é uma técnica capaz de quantificar analitos em níveis de traço, ou seja, em concentrações muito baixas (na escala de $\mu\text{g}/\text{L}$).

As amostras que serão analisadas pela TXRF devem ser depositadas sobre o centro de um disco (de acrílico ou de quartzo, a depender do tipo de matriz), de maneira que forme um filme fino, com espessura inferior a 100 μm para análises quantitativas e

menor que 500 μm para análises qualitativas. Além de fino, o filme deve ser homogêneo para garantir uma leitura eficaz. Vale ressaltar que o diâmetro do filme deve ser de, no máximo, 10 milímetros. A Figura 2 ilustra o disco contendo a amostra em forma de filme.

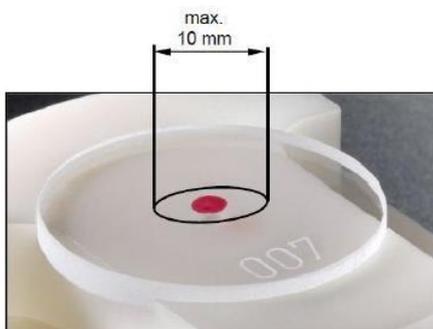


Figura 2: Ilustração do filme fino de amostra sobre o disco.

Fonte: BRUKER

Nessa técnica, assim como em todas as outras que utilizam a fluorescência de raios-X como fonte de excitação dos átomos, os raios-X emitidos pelos tubos excitam os elementos químicos presentes na amostra, que emitem linhas espectrais características de cada um deles. Isso porque quando o átomo é excitado os elétrons do seu nível mais externo migram para preencher a vacância da camada seguinte. Essa transição eletrônica resulta em perda de energia, que é convertida em fóton de raios-X. As intensidades das linhas espectrais emitidas estão relacionadas às concentrações dos elementos (NASCIMENTO FILHO, 1999).

A Figura 3 ilustra o processo de incidência e reflexão total dos raios-X sobre a amostra, assim como a posição do detector em relação à amostra.

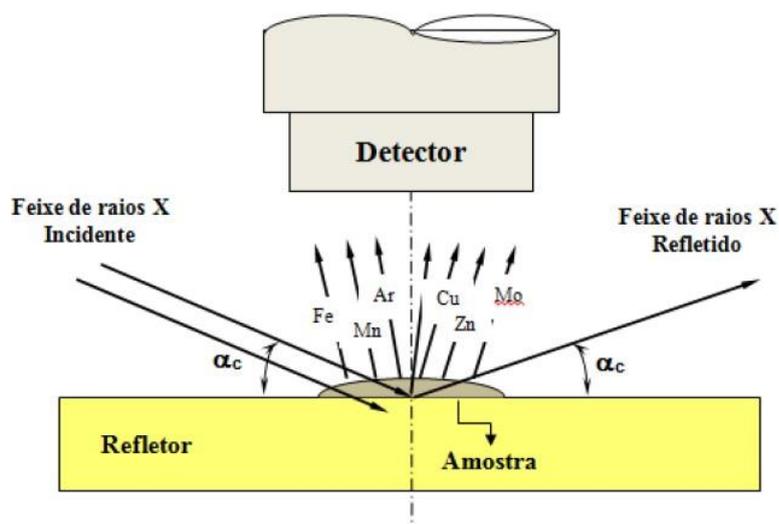


Figura 3: Esquema ilustrativo da incidência e da reflexão do raios-X sobre a amostra, e da posição do detector

Fonte: ARAÚJO, 2018

Dessa forma, percebe-se que a fluorescência de raios-X é composta por três etapas principais: excitação dos elementos presentes na amostra, emissão de raios-X característicos de cada um dos elementos e detecção desses raios-X emitidos de forma a relacioná-los à concentração de cada componente.

Quando a fluorescência de raios-X se dá por reflexão total, significa dizer que o raio incidido sobre a amostra foi totalmente refletido por ela, não havendo a ocorrência de fenômenos como a refração, por exemplo. Para que ocorra a reflexão total, é necessário que o ângulo de incidência seja menor que o ângulo crítico (nesse ângulo, o raio não é refletido e nem refratado, ou seja, permanece no plano da interface de separação entre os meios). A Figura 4 ilustra o exposto.

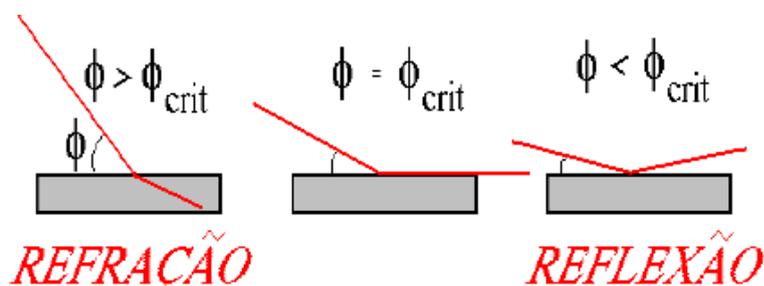


Figura 4: Ilustração dos fenômenos de refração e reflexão a depender da relação entre os ângulos de incidência e crítico.

Fonte: NASCIMENTO FILHO, 1999.

A reflexão total dos raios-X garante maior eficiência na interação entre os raios-X e a amostra. Isso porque quando há reflexão total dos raios-X eles interagem com a amostra tanto no momento de penetração quanto no momento de reflexão dos raios. Ou seja, há interação entre os raios e a amostra em dois momentos, intensificando a fluorescência. No caso da refração, por exemplo, só há interação dos raios no momento da incidência, fato que reduz pela metade a interação entre os raios e a amostra.

Recomenda-se o uso de um elemento químico como padrão interno. Isso porque ao adicionar o padrão interno à amostra haverá correção, por meio da normalização, das instabilidades do sistema e de erros operacionais. Nesse trabalho, utilizou-se o Gálio (Ga). Vale lembrar que o elemento químico selecionado como padrão interno não pode estar presente na amostra e não deve sofrer sobreposição espectral (NASCIMENTO FILHO, 1999).

Por ser uma técnica que não destrói a amostra e que é capaz de analisar vários elementos simultaneamente, a TXRF vem se tornando promissora e tem sido aplicada em várias áreas. Ferreira *et al.* (2019) usou a TXRF para identificar e discriminar resíduos de disparo de arma de fogo coletados das mãos dos atiradores. Já Pierangeli *et al.* (2015), utilizou para analisar elementos-traço em áreas de vegetação nativa e agricultura intensiva do estado do Mato Grosso.

Além disso, a técnica apresenta algumas vantagens frente ao ICP-MS, como por exemplo: não utiliza gases durante a análise e não há etapa de limpeza interna entre as análises. Possibilita a análise de amostras com mínimo preparo e requer poucos μL ou μg de amostra. Essas e outras características colaboram para que a TXRF seja uma técnica verde. Além disso, ela não sofre efeito de memória frente ao uso contínuo do equipamento para detecção de metais e não requer o preparo de curvas de calibração, bastando a adição do padrão interno para a determinação multielementar.

O equipamento utilizado nesse trabalho foi o espectrômetro TXRF S4 T-STAR, da Bruker. Ele permite analisar amostras em suspensões, pós, nanopartículas e filmes, além de possuir baixo limite de detecção (na faixa de sub ppb) e baixo custo operacional, uma vez que não requer o uso de gases e nem infraestrutura de laboratório sofisticada (BRUKER, 2021).

Assim como a técnica DMA, a TXRF também dispensa a etapa de seletividade durante a validação do método. Como nessa técnica não é necessário construir uma curva de calibração, não se realiza o estudo de linearidade (podendo-se determinar simultaneamente elementos em baixas e em altas concentrações) e nem efeito de matriz, uma vez que ao trabalhar com filme fino, as interferências são minimizadas. Além disso, o padrão interno é adicionado em cada amostra a ser analisada.

Para obtenção de exatidão adequada, o elemento escolhido como padrão interno, não deve estar presente na amostra, ou ocorrer em baixíssimas concentrações, e não deve interferir no(s) elemento(s) a ser(em) quantificado(s). Sendo assim, padrões internos mais comumente utilizados são Ga, Y e Ge (NASCIMENTO FILHO, 1999).

Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a que relaciona a intensidade dos raios-X característicos, com a sensibilidade elementar, como apresentado na equação 1 seguir:

$$I_i = C_i \cdot S_i \quad (1)$$

Em que:

I_i = intensidade (cps) da linha característica $K\alpha$ ou $L\alpha$ emitida;

C_i = concentração (ppm) do analito i na solução pipetada no disco;

S_i = sensibilidade elementar do sistema (cps/ppm) para o analito i .

Para se obter a intensidade do padrão interno, a equação 1 é descrita desta maneira:

$$I_p = C_p \cdot S_p \quad (2)$$

Para calcular a concentração de um analito, é necessário conhecer o valor da sensibilidade relativa $[S](i)$ deste elemento. Este é um valor adimensional que indica uma relação entre a intensidade do pico do analito e quantidade na amostra. Em geral, as sensibilidades relativas podem ser determinadas pelo cálculo de parâmetros fundamentais como probabilidades de excitação, eficiência do detector etc. No entanto, uma maneira mais fácil de se obter o valor de $[S](i)$ é analisar uma solução

multielementar de concentrações conhecidas, e calcular o fator de sensibilidade que baseia-se no pico de cada elemento.

Então, o valor da sensibilidade relativa $[[S'](i)$ pode ser determinado efetuando a divisão entre as equações 1 e 2 que, em outras palavras, significa a razão entre a sensibilidade do analito S_i e a sensibilidade do padrão interno S_p (equação 3).

$$S'_i = \frac{I_i \cdot G_p}{I_p \cdot G_i} \quad (3)$$

Sendo assim, para o cálculo da concentração do analito (equação 4), basta rearranjar a equação 3:

$$C_i = \frac{I_i \cdot G_p}{I_p \cdot S'_i} \quad (4)$$

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver métodos analíticos para determinação de metais e metaloides em amostras de sangue animal utilizando as técnicas DMA e TXRF.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um método para determinação de mercúrio em sangue animal utilizando o DMA;
- Desenvolver um método para determinação dos metais e metaloides arsênio, cromo, níquel e selênio em sangue animal por TXRF;
- Validar os métodos desenvolvidos.

4. METODOLOGIA

4.1 Instrumentação e materiais

- Agitador Vortex (KASVI);
- Analisador Direto de Mercúrio (Milestone, DMA-80 EVO);
- Balança analítica (Mettler-Toledo);
- Discos de quartzo de 30 mm de diâmetro e uma espessura de $3,0 \pm 0,1$ mm (Bruker);

- Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total S4 T-Star (Bruker);
- Estufas de secagem (SolidStreet e Tecnal)
- Micropipetas de volumes variados;
- Purificador de Água (Elga-Veolia-PURELAB);
- Repipetador automático.

4.2 Reagentes e Soluções

- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA);
- Ácido nítrico concentrado destilado;
- Água Milli-Q;
- Butanol;
- Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH);
- Solução de silicone e isopropanol (Serva);
- Solução padrão de gálio MRC 1 g/L (Assurance);
- Solução padrão de mercúrio MRC 1 g/L (Inorganic Ventures);
- Soluções padrão monoelementar para cada metal (prata, bário, chumbo, urânio, cobre, manganês, ferro, cobalto, mercúrio, antimônio, selênio, arsênio, cádmio, cromo, níquel e zinco) MRC 1g/L;
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Preparo de soluções utilizadas para a determinação de mercúrio

A solução de HNO_3 2% v/v foi preparada em um tubo *Corning®* de 50 mL, adicionando-se 1 mL de HNO_3 concentrado destilado e completando o volume para 50 mL com água Milli-Q. Já a solução de Triton X-100 0,1% m/v foi preparada após solubilizar 0,05 g de Triton X-100 em água ultrapura suficiente para completar o volume para 50 mL. Para preparar a solução de Triton X-100 0,2%, solubilizou-se 0,1 g de Triton X-100 em água ultrapura suficiente para completar o volume de 50 mL.

A solução padrão de mercúrio na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada da seguinte forma: em um tubo *Corning®* de 15 mL, pipetou-se 50 μL de solução padrão de

mercúrio MRC 1 g/L e completou-se o volume para 5 mL utilizando solução aquosa de ácido nítrico 2% v/v. Dessa forma, tem-se a solução padrão de mercúrio 10 µg/mL.

Para o preparo da solução padrão de 50 µg/mL de Hg, em um tubo *Corning*® de 15 mL pipetou-se 25 µL da solução de 10 µg/mL, 2.475 µL de solução de Triton X-100 0,1% e 2.500 µL de água ultrapura, totalizando 5 mL.

4.3.2 Preparo da amostra para análise por DMA

O preparo da amostra foi feito pipetando 100 µL de sangue e 100 µL de solução de Triton X-100 0,1% m/v em um *ependorf*, o que resultou em uma solução de sangue e Triton X-100 na proporção 1:1 v/v. Vale destacar que as amostras de sangue utilizadas nesse trabalho foram coletadas de bovinos em situações de rotina por médicos veterinários residentes e foram cedidas pela Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Desta forma, não foi necessária a submissão de pedido de autorização no Comitê de Ética em Pesquisa. Além disso, fez-se um *pool* com as amostras de sangue de forma que a quantidade fosse suficiente para executar todos os experimentos demandados na validação. O sangue bovino foi escolhido para os estudos de otimização e validação pela disponibilidade e, de forma geral, maior complexidade em relação ao sangue de animais silvestres. Apesar das técnicas analíticas serem isentas do efeito de matriz, a formação do filme fino é influenciada pelas características das amostras.

4.3.3 Otimização do método analítico

Para análise utilizando DMA, parâmetros como temperaturas inicial de trabalho, de secagem/decomposição e de atomização devem ser considerados. Além disso, o tempo de execução de cada etapa também deve ser definido.

O método desenvolvido nesse trabalho passou pela etapa prévia de otimização. Nela, as condições temperatura e tempo de aquecimento foram combinadas de quatro maneiras diferentes, preparando a curva somente em ácido e na presença da matriz sangue, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Condições avaliadas para otimizar o método analítico para DMA.

Condições avaliadas	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Meio
1	250	60	Ácido nítrico 2%
2	300	30	Ácido nítrico 2%
3	250	60	Sangue/Triton 0,1%
4	300	30	Sangue/Triton 0,1%

As curvas analíticas construídas nessa etapa foram feitas em três níveis de massa de Hg, 1, 3 e 5 ng. Para isso, pipetou-se na barca os respectivos volumes de 10, 30 e 50 µL da solução de 0,1 ppm de Hg. Além disso, nas condições 3 e 4 também foi adicionado 25 µL de sangue e Triton X-100 0,1% na proporção 1:1.

Feito isso, a condição que gerou melhores resultados foi escolhida para ser utilizada na validação.

4.3.4 Parâmetros de validação

Os parâmetros de validação analisados foram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

A linearidade é a capacidade que o método possui de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração ou à quantidade do analito na amostra (MAURÍCIO *et al.*, 2011). Nesse trabalho, a curva de calibração foi construída com cinco níveis de massa (0,5; 1,25; 2,0; 2,75; e 3,5 nanogramas de Hg), sendo cada um deles feito em sextuplicata. Então, pipetou-se 10, 25, 40, 55 e 70 µL de solução 50 µg/mL de Hg em cada barca do equipamento.

O LD é definido como sendo a concentração mínima detectável de um elemento presente em uma amostra. Nesse trabalho, o LD foi estimado analisando vinte e um brancos analíticos (solução de Triton X-100 0,05%). O cálculo que fornece como resultado o valor do LD foi feito multiplicando por três o valor do desvio padrão da média dos ensaios com a matriz branca (em ng) (MAURÍCIO *et al.*, 2011).

O LQ é a menor concentração que pode ser quantificada considerando a incerteza máxima aceitável. O cálculo do LQ foi feito multiplicando por 10 o valor do desvio padrão da média dos ensaios com a matriz branca (ng) (MAURÍCIO *et al.*, 2011).

A precisão indica o quão próximo as medidas estão umas das outras. Ela estabelece relação entre os dados obtidos em uma análise e está associada aos conceitos de repetibilidade e precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade analisa as medidas que tenham sido obtidas sob as mesmas condições (analista, laboratório e dia de análise), com curto intervalo de tempo. Já a precisão intermediária analisa as variações dos valores medidos em uma mesma amostra, porém, havendo diferença em uma ou mais nas condições citadas. A avaliação da reprodutibilidade envolve estudos interlaboratoriais e, portanto, esse parâmetro não foi avaliado nesse trabalho.

A repetibilidade foi feita da seguinte maneira: em cada barca, adicionou-se determinado volume de solução 0,05 µg/mL de Hg de acordo com o nível da curva, e 25 µL de solução de sangue e Triton X-100 0,1% na proporção 1:1 v/v. Os níveis da curva selecionados foram, em massa de Hg, 0,5 e 2,0 nanogramas. Por isso, os volumes pipetados da solução 0,05 µg/mL de Hg foram, respectivamente, 10 e 40 µL. Esses níveis correspondem ao 1º (LQ) e 3º ponto da curva de calibração. Cada leitura foi feita em sextuplicata. A precisão intermediária foi feita da mesma maneira, porém, variando a analista e o dia de análise.

A exatidão indica a proximidade entre os valores reais e os obtidos experimentalmente. Esse parâmetro pode ser determinado pela análise de materiais de referência certificados (MRC) na matriz ou por ensaios de adição e recuperação. Nesse trabalho, esse parâmetro foi avaliado por estudos de adição e recuperação, nas mesmas condições utilizadas no estudo de repetibilidade e precisão intermediária (adição de 0,5 e 2,0 ng de Hg). Nesse sentido, a amostra de sangue utilizada no estudo (amostra branca) foi analisada também, a fim de descontar alguma possível contaminação da mesma.

A robustez está relacionada ao quão sensível é o resultado analítico frente a pequenas variações nas condições experimentais do procedimento. Durante a execução desse estudo, variou-se os parâmetros temperatura e tempo de secagem/decomposição da amostra, temperatura e tempo de atomização, o tipo de pipetagem e a concentração

da solução diluente da amostra. Para esse estudo, em cada condição utilizou-se 40 μL da solução 50 $\mu\text{g/L}$ de Hg e 25 μL da amostra de sangue bovino diluída 1:1 com Triton X-100 0,1% e 0,2% v/v. O estudo foi realizado em duplicata.

O procedimento analítico é considerado robusto quando não há alteração significativa no resultado da análise após variar as condições experimentais. Ser robusto significa produzir resultados reprodutíveis ao longo do tempo e em lugares diferentes no mundo (MAURÍCIO *et al.*, 2011).

4.3.5 Preparo de soluções para análise por TXRF

- *Solução de gálio 10 $\mu\text{g/mL}$*
Em um microtubo, pipetou-se 20 μL da solução MRC de gálio 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 1980 μL da solução de ácido nítrico 2%.
- *Solução contendo metais para a fortificação 10 $\mu\text{g/mL}$*
Em um tubo *Corning*® de 50 mL, pipetou-se 500 μL de solução multielementar de cada metal na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (prata, bário, chumbo, urânio, cobre, manganês, ferro, cobalto, mercúrio, antimônio, selênio, arsênio, cádmio, cromo, níquel e zinco) e completou-se o volume para 50 mL com ácido nítrico a 2%.
- *Solução contendo metais para a fortificação 2,5 $\mu\text{g/mL}$*
Pipetou-se, em um tubo *Corning*® de 15 mL, 1.250 μL da solução multielementar a 10 $\mu\text{g/mL}$ e 3,7 mL de água ultrapura. O volume final da solução foi de 5 mL.
- *Solução contendo metais para a fortificação 1 $\mu\text{g/mL}$*
Pipetou-se, em um tubo *Corning*® de 15 mL, 500 μL da solução multielementar a 10 $\mu\text{g/mL}$ e 4,5 mL de água ultrapura a fim de completar o volume da solução para 5 mL.
- *Solução contendo metais para a fortificação 100 $\mu\text{g/L}$*

Pipetou-se, em um *ependorf*, 100 μL da solução multielementar a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 900 μL de água ultrapura.

- *Solução de diluente alcalino*

A composição da solução de diluente alcalino foi de 2% de butanol, 0,5% de TMAH, 0,005% de EDTA e de 0,005% Triton X-100. Essas porcentagens estão representadas em m/v.

- *Solução aquosa de Triton X-100 0,5% m/m*

Para o preparo dessa solução, mediu-se a massa de 0,25 gramas de Triton X-100 em um tubo *Corning*® e o volume foi completado para 50 mL utilizando água ultrapura.

4.3.6 Preparo de amostra e brancos para análise por TXRF

- *Amostra de sangue fortificada a 250 $\mu\text{g}/\text{L}$*

Pipetou-se 100 μL de solução contendo metais para fortificação a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 900 μL de sangue em um *ependorf*.

- *Amostra de sangue fortificada com metais a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$*

Em um *ependorf*, pipetou-se 100 μL de solução contendo metais para fortificação a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 900 μL de sangue.

- *Amostra de sangue fortificado com metais 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$*

Pipetou-se 50 μL de sangue fortificado com metais a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 10 μL de gálio a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 190 μL de água ultrapura.

- *Amostra de sangue fortificado com metais 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$*

Pipetou-se 50 μL de sangue fortificado com metais a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 μL de gálio a 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 190 μL de água ultrapura.

Foram preparadas também amostras de branco para metais mantendo as mesmas proporções citadas acima, porém substituindo as soluções fortificadoras por água ultrapura.

- *Branco de água fortificada com metais 20 µg/L*
Pipetou-se 50 µL de solução fortificadora contendo os metais a 100 µg/L, 10 µL de solução de gálio a 10 µg/mL e 190 µL de água ultrapura.

Também foi preparada uma solução de branco para metais substituindo a solução fortificadora por água ultrapura e mantendo as mesmas proporções.

Todas as soluções supramencionadas, tanto de reagentes quanto de amostra de sangue, foram homogeneizadas no vórtex por 1 minuto.

4.3.7 Otimização do método analítico para TXRF

Para as análises por TXRF, o procedimento geral consistiu em pipetar 10 µL de cada solução/amostra em discos de quartzo previamente limpos e hidrofobizados com uma solução de silicone em isopropanol e esses conjuntos amostra e disco foram aquecidos na estufa, à 60°C, durante 30 minutos. Ao final, formou-se um filme homogêneo de amostra sobre o disco com espessura e características aceitáveis para que a leitura no equipamento pudesse ser realizada. O metal Gálio foi utilizado como padrão interno na concentração de 400 µg/L. As condições instrumentais utilizadas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições instrumentais do equipamento TXRF.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO UTILIZADA
Tubo de raios-X	Molibdênio
Voltagem	50 kV
Corrente	1000 µA
Detector	Silicon-drift detector
Resolução (Mn Kα a 10 kcps)	< 150
Atmosfera	ar
Temperatura	< 25°C

Para a otimização do método analítico a ser utilizando na TXRF, avaliou-se inicialmente o preparo da amostra de sangue, onde foram estudados dois diluentes e dois fatores de diluição. Os diluentes foram solução aquosa de Triton X-100 0,5% m/m e diluente alcalino, e os fatores de diluição foram 1:1 e 1:4 (sangue:diluyente). A Tabela 4 resume as informações apresentadas.

Tabela 4: Estudos iniciais para otimização do método analítico no TXRF.

Experimento	Volume de SF*	Volume de DA***
A	100 µL	100 µL
B	100 µL	400 µL
	Volume de SB**	Volume de DA***
C	100 µL	100 µL
D	100 µL	400 µL
	Volume de SF*	Volume de triton
E	100 µL	100 µL
F	100 µL	400 µL
	Volume de SB**	Volume de triton
G	100 µL	100 µL
H	100 µL	400 µL

* Sangue fortificado

** Sangue branco (sem fortificação)

*** Diluente Alcalino

Cada uma dessas soluções foi preparada e analisada nas condições descritas como procedimento geral. A porcentagem de recuperação foi utilizada para avaliação dos resultados.

4.3.8 Parâmetros de validação para TXRF

Como já descrito na revisão bibliográfica, essa técnica não requer o preparo de curva de calibração e é isenta de efeitos de matriz. Desta forma, os parâmetros de validação analisados foram LD, LQ, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

Nesse trabalho, a estimativa de LD é fornecida pelo software do equipamento, com base na relação sinal/ruído. A estimativa do LQ foi realizada multiplicando-se os valores de LD por 3,3. Para confirmação do LQ, analisou-se as mesmas sete replicatas de branco de água fortificada com 20 µg/L dos metais. Avaliou-se a porcentagem de recuperação e o coeficiente de variação (%) para verificar se esse valor de LQ é adequado. Vale ressaltar que a concentração média determinada nos brancos de água não fortificada com metais foi descontada do valor da concentração experimental para a amostra fortificada.

A repetibilidade foi feita a partir da leitura de sete amostras de sangue fortificado em dois níveis de concentração, sendo o primeiro na concentração de 20 µg/L dos metais

e o segundo na de 50 µg/L. Também foi realizada a leitura de dois brancos de sangue não fortificado com metais a fim de descontar o valor na concentração experimental.

Os experimentos para a precisão intermediária foram feitos da mesma forma que os da repetibilidade, porém, variando a analista e o dia de análise.

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da precisão também foram utilizados para verificar se o método apresenta exatidão adequada. Calculou-se a % de recuperação para cada nível estudado.

A robustez foi feita de forma similar ao estudo descrito para o DMA, variando os parâmetros, tempo entre preparo da amostra e leitura no equipamento, tempo de secagem, temperatura de secagem e estufas com e sem ventilação interna.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico no DMA

5.1.1 Otimização do método analítico

A determinação de Hg por DMA é simples e pode ser implementada após uma avaliação do programa de temperatura utilizado.

A Tabela 5 compila os resultados das inclinações das retas obtidas para cada condição avaliada.

Tabela 5: Condições avaliadas para otimização do método desenvolvido no DMA e as respectivas inclinações das curvas.

Condições avaliadas	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Diluyente	Inclinação da reta
1	250	60	Ácido nítrico 2%	0,0819 ± 0,0017
2	300	30	Ácido nítrico 2%	0,0816 ± 0,0011
3	250	60	Sangue/Triton 0,1%	0,0820 ± 0,0023
4	300	30	Sangue/Triton 0,1%	0,0848 ± 0,0018

Utilizando a ferramenta “análise de dados” do software Microsoft Excel, analisou-se a estatística da regressão para cada curva construída. A comparação dos interceptos e das inclinações das curvas feitas com e sem matriz sangue demonstrou que a matriz não afetou a sensibilidade da curva e, portanto, não houve efeito de matriz. Isso

comprova o que já foi discutido anteriormente. Eles também demonstraram não haver grandes diferenças entre as condições avaliadas.

Após observar os resultados gerados, como não houve diferença significativa entre a inclinação das curvas obtidas nas diferentes condições, optou-se por trabalhar com a condição 2 (300 °C e 30 s) para minimizar o tempo de análise.

A Tabela 6 mostra como ficou o programa de aquecimento para quantificação de mercúrio em amostras de sangue animal.

Tabela 6: Programa de aquecimento para quantificação de mercúrio em amostra de sangue animal.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Aquecimento	300	1
Aquecimento	300	30
Atomização	650	30
Atomização	650	180
Purga	-	30

A temperatura inicial de trabalho foi de 250 °C. Ela é a temperatura mínima para que o processo se inicie. Antes de pegar a primeira barca, o braço automático do equipamento se aquece até 250 °C, e entre uma leitura e outra, ele resfria para que esteja com a temperatura de 250 °C antes de pegar a próxima barca.

A linha 1 da tabela mostra uma rampa de aquecimento que ocorre em 1 segundo para que a temperatura seja elevada de 250 °C para 300 °C. A linha 2 refere-se à etapa de aquecimento ou secagem, que é realizada durante 30 segundos, a 300 °C. Nessa etapa a amostra é seca e decomposta. Essa etapa foi a selecionada para ser otimizada. Conforme mostra a tabela 4 a temperatura e o tempo de secagem testados variaram entre 200 e 300 °C, e 30 e 60 s. Os melhores resultados foram obtidos com a temperatura a 300 °C e o tempo a 30 s.

A linha 3 relata a rampa de aquecimento para a etapa de atomização. A temperatura aumentou de 300 para 650 °C em 30 segundos. Já a linha 4 mostra o patamar dessa etapa, que foi realizada durante 3 minutos a 650 °C. A etapa de atomização não foi otimizada porque o princípio da técnica consiste no aquecimento da amostra à

temperatura variável entre 600 e 700 °C. Nessa etapa há a conversão catalítica dos íons Hg^+ e Hg^{2+} em Hg^0 .

O tempo de purga, o de amalgamador e o de gravação do sinal foram de 30, 12 e 24 segundos. Além disso, a unidade de medida da amostra foi dada em mL por estar no estado líquido. A Tabela 7 sintetiza essas informações.

Tabela 7: Condições de análise do método utilizado para análise por DMA.

Condições de análise	
Temperatura inicial de trabalho	250 °C
Tempo de purga	30 s
Tempo no amalgamador	12 s
Tempo de gravação de sinal	24 s
Unidade da amostra	mL

Vale ressaltar que as barcas utilizadas foram lavadas com água e detergente apropriado e o excesso de água foi retirado com papel toalha. Feito isso, elas foram inseridas novamente no equipamento e foram limpas, individualmente, durante um minuto e meio a 650 °C.

5.1.2 Etapas da validação do método analítico para Hg

5.1.2.1 Linearidade

Para verificar a linearidade, aplicou-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) nos valores obtidos para a absorvância do Hg em função da sua massa presente na amostra.

A presença de *outliers* foi detectada comparando os resíduos pelo teste-t. Esse teste estabelece que determinado valor é outlier se $t_{calc} > t_{crit,bilateral}$, e é representado pela equação 5 a seguir.

$$t_{calc} = \frac{|e_i|}{S_{res,i, norm}} \quad (5)$$

Nessa equação, e_i é o resíduo referente ao ponto de valor duvidoso, S_{res} o desvio padrão amostral dos resíduos da leitura. As variáveis e_i e S_{res} foram calculadas a partir das equações 6 e 7 a seguir, sendo N o número de leituras, y_i a i-ésima resposta instrumental obtida e \hat{y} o respectivo i-ésimo valor da ordenada estimada pelo MMQP.

$$e_i = y_i - \hat{y} \quad (6)$$

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N e_i^2}{N-1}} \quad (7)$$

A quantidade de *outliers* que podem ser removidos é de 0,22 N. Nesse trabalho, o número total de leituras foi 3. Isso porque, conforme já mencionado, a curva de calibração foi construída com cinco níveis de massa (0,5, 1,25, 2,0, 2,75, e 3,5 nanogramas) de Hg, sendo cada um deles em sextuplicata. Então, pipetou-se 10, 25, 40, 55 e 70 μL de solução 50 ng/mL de Hg em cada barca. Além disso, foi feita a leitura de 3 brancos de solução de Triton X-100.

Dessa forma, a quantidade estabelecida de *outliers* que poderiam ser removidos foi de sete. A Figura 5 ilustra o gráfico construído a partir dos resultados obtidos após retirar sete valores considerados *outliers*. Esse gráfico foi utilizado como curva de calibração para as análises posteriores.

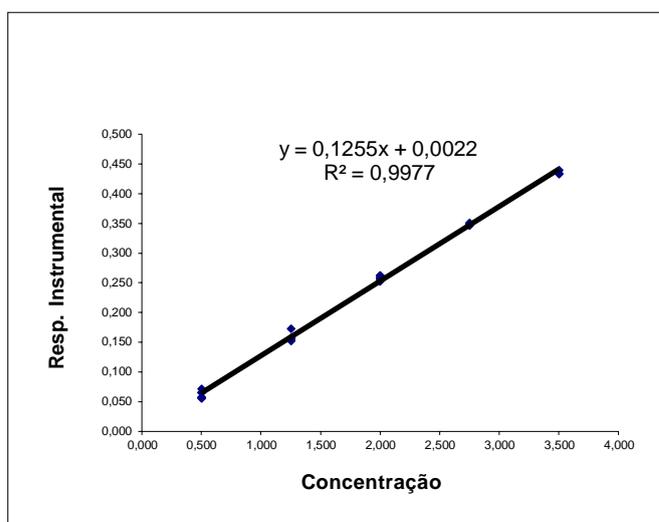


Figura 5: Gráfico obtido para a curva de calibração na validação de método analítico por DMA.

O modelo também foi avaliado quanto à normalidade da distribuição dos resíduos, à independência e à homoscedasticidade deles. Para isso, utilizou-se os testes de Anderson-Darling, Durbin-Watson e Levene, nessa ordem.

Para fazer o teste de Anderson-Darling (normalidade), deve-se ordenar os resíduos, calcular a probabilidade acumulada do resíduo padronizado (p_i), calcular as

quantidades (h_i), o valor de A, a estatística AA, o valor do p-teste e verificar os critérios de aceitação.

O cálculo da probabilidade acumulada do resíduo padronizado (p_i) é representado pela equação 8 a seguir, em que \bar{e} é a massa, σ_e o desvio padrão dos resíduos e P a probabilidade acumulada da distribuição Normal Padrão.

$$p_i = P \left\{ \frac{e_i - \bar{e}}{\sigma_e} \right\} \quad (8)$$

Para calcular as quantidades (h_i), foi utilizada a equação 9 a seguir.

$$h_i = (2i - 1)[\ln(p_i) + \ln(1 - p_{N+1-i})] \quad (9)$$

No cálculo de A, utilizou-se a equação 10, em que \bar{h} é a média de h_i .

$$A = -N - \bar{h} \quad (10)$$

O valor de AA foi obtido a partir da equação 11.

$$AA = \left(1 + \frac{0,75}{N} + \frac{2,25}{N^2} \right) A \quad (11)$$

Como o valor de AA foi de 0,558, utilizou-se a equação 12 para calcular o p-valor.

$$p - \text{valor} = \exp(0,9177 - 4,279 AA - 1,38 AA^2) \quad (12)$$

Sendo a hipótese nula H_0 , os dados seguem a distribuição normal e $\alpha = 0,05$, p-valor $< 0,05$ H_0 é rejeitada e, portanto, os resíduos não seguem a distribuição normal. Se p-valor $> 0,05$, aceita-se H_0 . Nesse trabalho, p-valor foi igual a 0,15. Por isso, os resíduos seguiram a distribuição normal.

A Figura 6 representa o gráfico obtido a partir dos resultados experimentais e após realizar o teste de Anderson-Darling. Esse gráfico ilustra que os resíduos seguiram a distribuição normal.

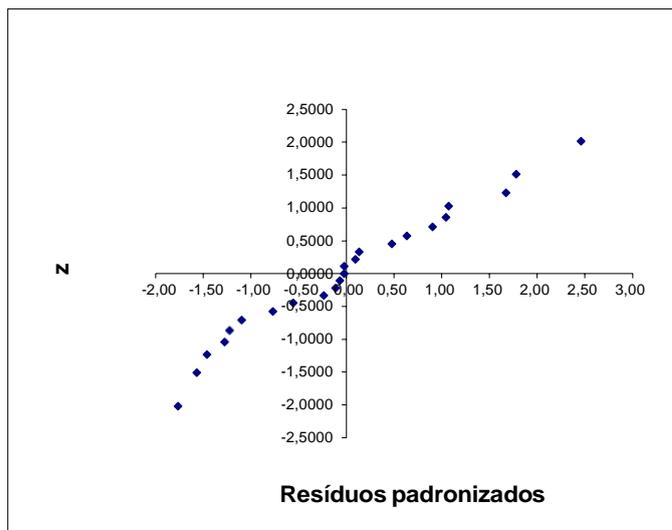


Figura 6: Gráfico referente à normalidade dos resíduos na validação de método por DMA.

O teste de Durbin-Watson, utilizado para calcular a independência dos resíduos, foi realizado utilizando-se a equação 13.

$$D_w = \frac{\sum_{i=2}^N (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^N e_i^2} \quad (13)$$

Feito isso, em seguida, o valor de D_w foi comparado com os valores críticos do limite inferior (D_L) e do superior (D_U), que foram calculados a partir das equações 14 e 15.

$$D_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{N}} - \frac{3,4148}{N} + \frac{16,6400}{N^2} \quad (14)$$

$$D_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{N}} + \frac{1,3862}{N} + \frac{16,3662}{N^2} \quad (15)$$

Se $D_w > D_U$, não há autocorrelação e, portanto, os resíduos são independentes. Se $D_L < D_w < D_U$, o teste é inconclusivo e se $D_w \leq D_L$ os resíduos apresentam correlação. Nesse trabalho, D_w foi maior que D_U , sendo D_w igual a 1,7139, D_U igual a 1,4375 e D_L igual a 1,2504. Dessa forma, os resíduos foram considerados independentes.

A Figura 7 ilustra o gráfico obtido a partir dos resultados experimentais e confirma o comportamento independente dos resíduos.

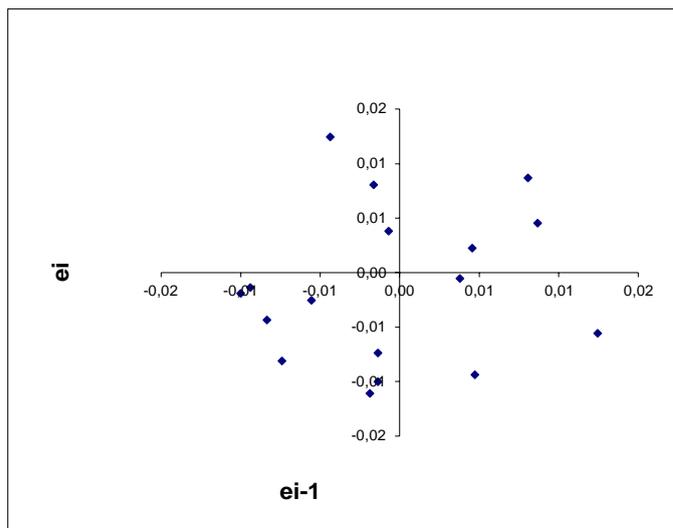


Figura 7: Gráfico ilustrativo da independência dos resíduos na validação de método por DMA.

Visando analisar a homoscedasticidade dos resíduos, o teste de Levene foi realizado utilizando-se a equação 16 a seguir, em que n_j é o número de replicatas do nível j , m representa o número de níveis, z_j é média de z_{ju} do nível j e \bar{z} é a média de todos os z_{ju} .

$$F_{calc} = \frac{\sum_{j=1}^m n_j (\bar{z}_j - \bar{z})^2}{m-1} \quad (16)$$

$$\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{u=1}^{n_j} (z_{ju} - z_j)^2}{\sum_{j=1}^m (n_j - 1)}$$

O valor de z_{ju} foi calculado com a equação 17, em que e_{ju} é o resíduo correspondente à u -ésima replicata do nível j e Med_{e_j} é a mediana dos resíduos do nível j .

$$z_{ju} = |e_{ju} - Med_{e_j}| \quad (17)$$

Após os cálculos, o valor do F_{calc} foi comparado com o do F_{tab} [$\alpha = 0,05$; $m - 1$; $\sum_{j=1}^m (n_j - 1)$]. O teste estabelece que os resíduos são homocedásticos se $F_{calc} \leq F_{tab}$.

Nesse trabalho, o valor do F_{calc} foi de 0,1849 e o do F_{tab} foi de 4,54. Sendo assim, os resíduos foram considerados homocedásticos.

A equação da reta obtida a partir dos dados foi $y = 0,1255 x + 0,0022$, com o valor de R^2 sendo 0,9977. Sendo R^2 o valor que indica o quão próximo estão os valores da linha de regressão ajustada, quanto mais próximo de 0,1 (ou 100%), melhor é o

modelo linear. Percebe-se que o método desenvolvido produziu um gráfico que demonstrou haver proporcionalidade direta entre os resultados e a concentração do analito na amostra. Além disso, apresentou valores bem próximos à linha de regressão. Dessa forma, o parâmetro linearidade foi atendido.

Para confirmar a linearidade dos valores, o teste-t foi realizado pela equação 18, em que r_w é o coeficiente de correlação ponderado.

$$t_{r_w} = r_w \left| \frac{\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r_w^2}} \right| \quad (18)$$

O cálculo de r_w foi feito utilizando a equação 19, em que j é o j -ésimo termo do i -ésimo nível e w_i é o peso correspondente ao nível i .

$$r_w = \frac{s_{xyw}}{\sqrt{s_{xxw} s_{yyw}}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (y_{ij} - \bar{y})^2}} \quad (19)$$

O valor de w_i foi calculado com o auxílio da equação 20, em que $\bar{s}_{y_i}^2$ é a média das variâncias das respostas instrumentais e $s_{y_i}^2$ é a variância das respostas instrumentais no nível i .

$$w_i = \frac{\bar{s}_{y_i}^2}{s_{y_i}^2} \quad (20)$$

Ao final, o valor de t_{r_w} (99,7639) foi maior que o de t_{tab} (2,4138) considerando $\alpha = 0,05$ e $N-2$. Por isso, a hipótese nula H_0 foi rejeitada, $r_w = 0,9989$, ou seja, houve correlação linear entre os dados testados.

5.1.2.2 Limites de detecção e quantificação

Após a leitura de 21 brancos da solução de Triton X-100 0,1%, com as absorvâncias obtidas calculou-se as quantidades em ng (usando a curva de calibração) e o desvio padrão desse conjunto foi empregado nas equações 21 e 22 a seguir a fim de calcular o LD e o LQ.

$$LD = 3 \times s \quad (21)$$

$$LQ = 10 \times s \quad (22)$$

Sendo s o desvio padrão das quantidades de Hg obtidas para 21 brancos analíticos, o resultado obtido para o LD foi 0,018 ng e para o LQ foi 0,054 ng.

Nesse caso a faixa de trabalho da técnica é de 0,054 a 3,5 ng de Hg, que se considerarmos o volume de amostra depositado na barquinha como 25 μL e a diluição do sangue na proporção 1:1 corresponde a uma faixa de trabalho do método de 4,32 a 280 $\mu\text{g/L}$. Esse pequeno volume de amostra foi avaliado, pois em algumas situações a quantidade de amostra disponível pode ser bem pequena. Entretanto, essa faixa de trabalho pode ser reduzida, empregando-se volumes maiores de amostras. Por exemplo, adicionando-se 100 μL de amostra diluída na mesma proporção (1:1), a faixa de trabalho vai de 1,08 a 70 $\mu\text{g/L}$.

5.1.2.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada a partir dos valores de HORRAT, com base em desvios padrão relativo experimental e teórico em cada nível de massa. Utilizou-se, então, o valor de $DPR_{Horwitz}$ (%) teórico obtido a partir da equação 23, em que C é a concentração expressa em porcentagem massa/massa para o DMA.

$$DPR_{Horwitz}(\%) = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (23)$$

O valor de HORRAT foi calculado utilizando a equação 24 a seguir, em que DPR é o desvio padrão relativo obtido a partir dos dados experimentais e $PDPR_R$ é o desvio padrão relativo predito, na concentração em porcentagem massa/massa de interesse.

$$HORRAT = \frac{DPR}{PDPR_R} = \frac{DPR}{2C^{0,15}} \quad (24)$$

Para que um método seja repetitivo, o valor de DPR deve ser menor que $2/3$ do $DPR_{Horwitz}$ e o de HORRAT deve ser menor ou igual a 2. Os resultados obtidos estão na Tabela 8

Tabela 8: Valores referentes ao teste de HORRAT para repetibilidade no DMA.

	Massa (ng)	DPR Horwitz	$2/3$ DPR Horwitz	DPR	HORRAT
Repetibilidade	0,50	50,2	33,47	7,86	0,16
	2,00	40,8	27,2	2,80	0,07

Frisa-se que $2/3$ do $DPR_{Horwitz}$ é igual a 33,47 para o nível 0,5 ng e 27,2 para o 2,0 ng. Dessa forma, os valores obtidos para DPR (7,86 e 2,80) e para HORRAT (0,16 e 0,07) atendem aos critérios estabelecidos e, por isso, o método é considerado repetível.

5.1.2.4 Precisão Intermediária

Na análise da precisão intermediária, foram utilizadas as mesmas equações (23 e 24) do tópico anterior e os mesmos valores referência para aceitação. Os resultados, que indicam que o método é reproduzível, encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Valores referentes ao teste de HORRAT para precisão intermediária no DMA.

	Massa (ng)	DPR Horwitz	$2/3$ DPR Horwitz	DPR	HORRAT
Precisão intermediária	0,50	50,2	33,47	8,00	0,16
	2,00	40,8	27,2	4,10	0,10

5.1.2.5 Tendência ou recuperação

A recuperação foi calculada pela equação 25, em que M_{Det} é a concentração em massa determinada do analito na amostra fortificada, M_{Am} é a massa do analito existente na matriz branca, ou seja, antes da fortificação. e a M_{For} é a massa teórica de analito adicionado à amostra branca. A M_{Am} foi determinada a partir de análise de uma triplicata de amostra sem fortificação.

$$\%recuperação = \frac{(M_{Det} - M_{Am})}{M_{For}} \times 100 \quad (25)$$

Os resultados obtidos para a recuperação tanto da repetibilidade quanto da precisão intermediária variaram, em média de 104,9% e 109,6%. Como a faixa aceitável para esse parâmetro é de 80% a 120% verifica-se que, o método obteve exatidão adequada.

5.1.2.6 Robustez

Na análise da robustez, foi utilizado o teste de Youden. Para isso, foram calculadas a média e a variância (s_i^2) para cada análise em duplicata. Os efeitos de cada parâmetro variado foram calculados utilizando a equação 26, em que A corresponde ao parâmetro avaliado.

$$Efeito A = \frac{\frac{\sum \text{médias das respostas para A no nível nominal}}{4}}{\frac{\sum \text{média das respostas para A no nível avaliado}}{4}} \quad (26)$$

Em seguida, estimou-se a variância dos efeitos (s^2) pela equação 27, em que $u_i = N - 1$ graus de liberdade de cada ensaio. Nesse trabalho, N foi igual a 2 pelos experimentos terem sido feitos em duplicata.

$$s^2 = \frac{\sum u_i s_i^2}{\sum u_i} \quad (27)$$

O erro padrão do efeito (E) foi calculado utilizando a equação 28 a seguir, sendo a raiz quadrada da variância (desvio padrão) dividido por dois.

$$E = \frac{\sqrt{s^2}}{2} \quad (28)$$

O valor obtido para E foi multiplicado por 2,306, que é o valor do t de *Student* para oito graus de liberdade, com 95% de confiança para experimentos realizados em duplicata. O resultado dessa multiplicação refere-se à linha de significância (LS) do efeito, ou seja, estabelece que a partir desse valor o efeito se torna significativo.

Por isso, se o valor absoluto do efeito for maior que o valor de LS, o respectivo fator é considerado significativo a um nível de confiança de 95%, e deve ser implementado um maior controle sobre o mesmo durante o preparo da amostra de forma que ele não sofra variações.

Feito isso, utilizou-se o teste F para analisar se havia diferença estatística significativa entre os valores dos resultados obtidos para cada condição.

Para finalizar, o desvio padrão dos efeitos (S_{Di}) foi calculado a partir da equação 29 a seguir, em que D_i^2 é o quadrado do valor de cada efeito.

$$S_{Di} = \sqrt{2 \times \frac{\sum D_i^2}{7}} \quad (29)$$

O S_{Di} foi comparado com o desvio padrão obtido em condições de precisão intermediária. O valor de S_{Di} deve ser menor do que o valor obtido em condições de precisão intermediária.

As variações dos parâmetros realizadas nos testes de robustez desenvolvidos nesse trabalho estão demonstradas na Tabela 10.

Tabela 10: Valores do nível baixo e do nível alto referentes a cada fator alterado na validação no DMA.

FATOR	NÍVEL BAIXO	NÍVEL ALTO
Temperatura secagem (°C)	280,000	300,000
Tempo secagem (s)	27,000	30,000
Temperatura atomização (°C)	600,00	650,00
Tempo atomização (s)	2,50	3,00
Pipetagem	Repipetador (repipe.)	Micropipeta (micropi.)
Triton (%)	0,10	0,05

As condições descritas no nível alto foram as utilizadas nos experimentos, ou seja, compõem o nível nominal. As descritas na coluna nível baixo foram determinadas para avaliar a robustez do método.

A Tabela 11 a seguir resume o planejamento experimental realizado a fim de otimizar os experimentos. Vale ressaltar que cada experimento foi feito em duplicata e a média dos valores de seus resultados foi utilizada para concluir acerca da robustez do método. Esses resultados também estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11: Planejamento experimental para os experimentos referentes a robustez para validação no DMA.

FATOR	EXPERIMENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura pirólise (°C)	300	300	300	300	280	280	280	280
Tempo pirólise (s)	30	30	27	27	30	30	27	27
Temperatura atomização (°C)	650	600	650	600	650	600	650	600
Tempo atomização (s)	3	3	2,5	2,5	2,5	2,5	3	3
Pipetagem	micropi.	repipe.	micropi.	repipe.	repipe.	micropi.	repipe.	micropi.
Triton (%)	0,05	0,1	0,1	0,05	0,05	0,1	0,1	0,05
Média dos sinais	0,0131	0,0111	0,0096	0,00925	0,0097	0,011	0,01145	0,0105

Utilizando o teste de Youden previamente descrito e com o auxílio das ferramentas de cálculo do Microsoft Excel, conclui-se que os fatores em conjunto não alteram o resultado. A única variável que demonstrou alteração significativa diante da variação foi a “tempo de atomização”. Uma explicação para tal fato é que no tempo de 2,5 segundos não foi atomizado todo o mercúrio presente na amostra, sendo necessário que essa etapa ocorra em três segundos. Dessa forma, ao manter controlado o tempo

de atomização em três segundos, que é a condição de fato utilizada, o método se torna robusto.

A Tabela 12 resume as informações obtidas após a validação do método analítico por DMA.

Tabela 12: Resumo dos dados e das informações obtidas após validação de método no DMA.

Linearidade	Repetibilidade		Precisão intermediária		Robustez	LD (ng)	LQ (ng)
	0,50 ng de Hg	2,00 ng de Hg	0,50 ng de Hg	2,00 ng de Hg			
$y = 0,1255x + 0,0022$, $R^2 = 0,9977$	HORRAT = 0,16	HORRAT = 0,07	HORRAT = 0,16	HORRAT = 0,10	Significativo apenas para tempo de atomização	0,018	Teórico 0,054
	DPR Horwitz = 50,2	DPR Horwitz = 40,8	DPR Horwitz = 50,2	DPR Horwitz = 40,8			
	2/3 de DPR H = 33,45	2/3 de DPR H = 27,20	2/3 de DPR H = 33,45	2/3 de DPR H = 27,20			
	DPR = 7,86	DPR = 2,80	DPR = 8,00	DPR = 4,10			
	Recuperação: 109,7%	Recuperação: 105,7%	Recuperação: 104,7%	Recuperação: 109,5%			

5.2 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico no TXRF

5.2.1 Otimização do método analítico

Nas análises por TXRF a formação do filme fino é uma das etapas mais críticas, principalmente para amostras sem digestão como é o caso deste trabalho. Desta forma, a etapa inicial foi avaliar diferentes condições para o tratamento simplificado da amostra, que possibilitassem a obtenção de um filme adequado e resultados analíticos satisfatórios.

Na Tabela 13 são apresentadas as % de recuperação para As, Cr, Ni e Se quando se utilizou diferentes diluentes em duas diluições distintas (baseando-se na Tabela 4 desse trabalho). Na Figura 8 pode-se visualizar os aspectos dos filmes formados ao utilizar diluente alcalino e solução de Triton X-100 0,5%.

Tabela 13: Porcentagens de recuperação para cada metal na fase de otimização do método para TXRF.

METAL	EXPERIMENTO							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Arsênio	51,38	63,52	108,32	127,62	48,4	63,82	87,16	136,16
Crômio	41,76	42,34	70,7	79,62	36,64	43,92	72,32	90,04
Níquel	22,94	23,88	49,86	56,32	25,5	21,2	52,18	46,62
Selênio	26,22	29,82	52,32	60,06	27,14	27,34	50,88	63,22

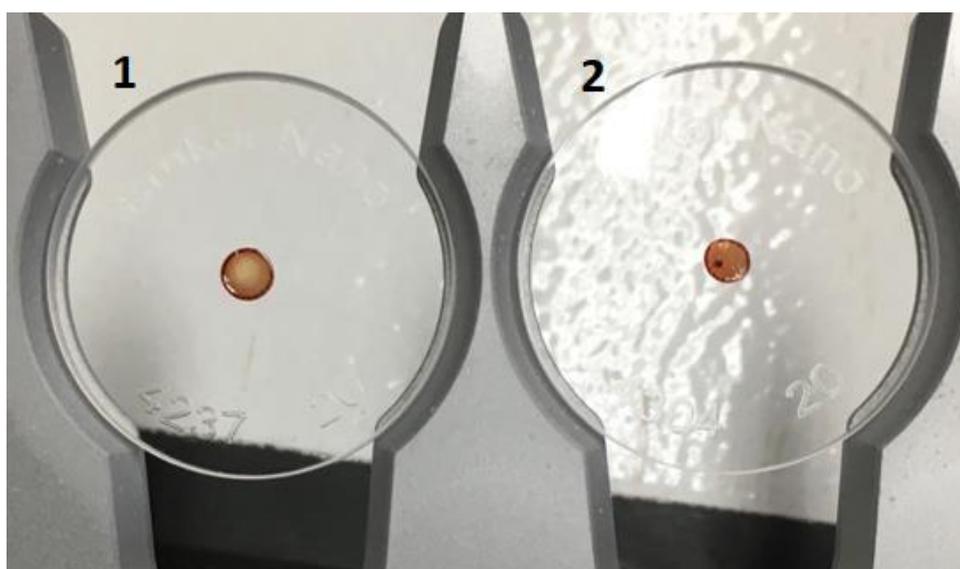


Figura 8: Filmes formados a partir do preparo da amostra com diluente alcalino (1) e com Triton X-100 0,5% (2).

Inicialmente, os filmes feitos a partir de amostras diluídas em diluente alcalino foram satisfatórios. Entretanto, à medida que o tempo entre o preparo do filme e a leitura no equipamento aumentava, as bordas do filme se desprendiam do disco, além de craquelarem. Em casos assim, as amostras não podem ser analisadas, pois além de prejudicar os resultados analíticos, pode causar algum dano no detector. As Figuras 9 e 10 ilustram o comportamento do filme após se passar um tempo entre o preparo da amostra e a leitura no equipamento.

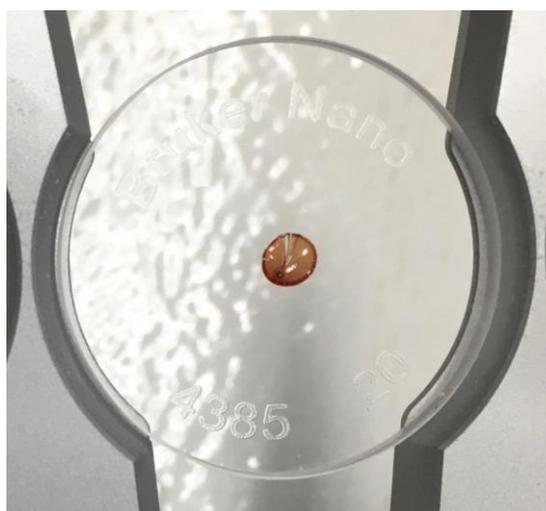


Figura 9: Craquelamento do filme e desprendimento de suas bordas após o preparo com diluente alcalino.



Figura 10: Craquelamento do filme e desprendimento de suas bordas após o preparo com Triton X-100 0,5%.

Diante disso, realizou-se um teste em que a amostra de sangue foi diluída em água ultrapura e foi depositada sobre o disco sem que ele estivesse sido siliconizado previamente. Essa etapa de siliconização do disco de quartzo é realizada a fim de que a amostra líquida não se espalhe pelo disco. Isso porque a sua superfície é hidrofílica e o silicone auxilia na hidrofobização do disco.

Após a realização desse teste, constatou-se que a melhor maneira de se obter um filme que atendesse aos critérios de aceitação para leitura por TXRF foi diluindo o sangue em água ultrapura e utilizando discos de quartzo não siliconizados. Dessa forma, obteve-se um filme fino, com espessura inferior a 500 µm, homogêneo e com o diâmetro menor que 10 milímetros. Caso a espessura do filme não fosse fina, o detector poderia ser danificado e, até mesmo, contaminado ao encostar na amostra no momento da leitura. Em relação a homogeneidade, um filme heterogêneo não garantiria a eficácia da leitura.

Evidentemente, os resultados analíticos também devem ser considerados e para avaliar a % de recuperação obtida nessas condições, analisou-se duas amostras de sangue bovino fortificadas com 100 µg/L dos analitos, empregando-se uma diluição de 1:5 e 400 µg/L de Ga como padrão interno. Os resultados médios das recuperações para os metais podem ser visualizados na Tabela 14. Todos ficaram dentro da faixa aceitável de 80 a 120%.

Tabela 14: Recuperação média para cada metal após o filme ter sido preparado com água e sem ser siliconizado.

METAL	Recuperação média (%)
Arsênio	92,81
Crômio	89,45
Níquel	81,79
Selênio	97,99

Na Figura 11 é possível observar a aparência do filme gerado e na 12 o espectro obtido após a leitura dessas amostras.



Figura 11: Filme formado sobre o disco não siliconizado após utilizar água ultrapura como diluente.

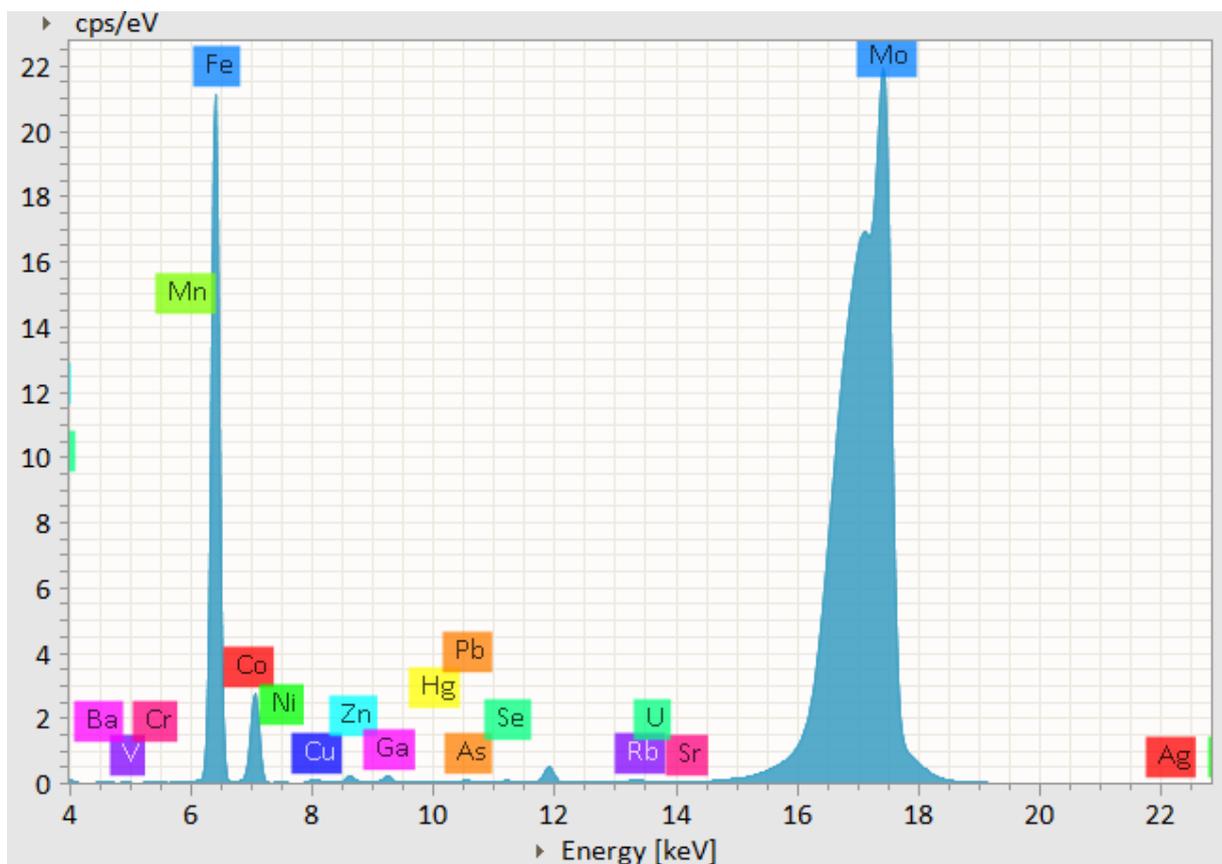


Figura 12: Espectro obtido após análise da amostra de sangue fortificado com metais a 100 µg/L.

5.2.2 Etapas da validação do método analítico

Assim como a técnica DMA, a TXRF também dispensa a etapa de seletividade na validação de um método analítico. Além disso, a técnica dispensa a etapa linearidade por que utiliza o padrão interno para quantificação. Os critérios utilizados para avaliar as outras etapas (limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e robustez) foram os mesmos descritos nos tópicos 5.1.2.2, 5.1.2.3, 5.1.2.4 e 5.1.2.6 desse trabalho, respectivamente, e a recuperação (avaliação da exatidão) obtida nas etapas de repetibilidade e precisão intermediária foi semelhante ao tópico 5.1.2.5.

Uma diferença entre as duas validações é que a do DMA foi feita em unidade de massa (ng) e a do TXRF em concentração ($\mu\text{g/L}$). A seguir, serão mostrados os resultados obtidos em cada uma das etapas da validação do método analítico para os metais arsênio, cromo, níquel e selênio.

5.2.2.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção são fornecidos pelo próprio equipamento após as análises. O cálculo para o LQ foi feito da mesma maneira descrita no tópico 5.1.2.2 e a sua confirmação foi feita analisando as recuperações para cada metal. Tanto o valor médio encontrado para o LD quanto o para o LQ foram baixos, ou seja, satisfatórios. Os valores das recuperações médias para cada metal foram acima de 80%, ou seja, atenderam à faixa de recuperação aceitável (de 80% a 120%). A Tabela 15 demonstra os resultados para LD, LQ e recuperação para cada metal.

Tabela 15: Valores de LD, LQ e recuperação para cada metal.

Metal	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)
Arsênio	0,15	0,51	99,5
Crômio	0,31	1,03	97,7
Níquel	0,21	0,68	98,1
Selênio	0,10	0,32	99,7

Vale destacar que essa etapa da validação para TXRF foi feita sem a utilização da matriz sangue. Ou seja, ao contrário dos experimentos realizados no DMA para análise de LQ e LD, não foram feitas leituras de amostra de sangue fortificado com metais. Isso porque havia disponíveis amostras brancas para mercúrio, mas não para

arsênio, cromo, níquel e selênio, que mesmo em baixas concentrações afetariam a avaliação dos limites de detecção e quantificação. Dessa forma, caso as leituras tivessem sido feitas das amostras de sangue fortificada com esses metais, haveria um erro no resultado. Por isso, ficou estabelecido que a etapa de determinação de LD e LQ para o TXRF seria feita a partir de amostras brancas do diluente que, nesse caso, foi a água ultrapura.

5.2.2.2 Repetibilidade e exatidão

Na análise da repetibilidade para o TXRF foram utilizadas as mesmas equações (23 e 24) do tópico 5.1.2.3 e os mesmos valores referência para aceitação, porém, o cálculo foi feito utilizando as concentrações dos metais, e não a massa como foi para o mercúrio no DMA. Os resultados obtidos após os experimentos encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Valores referentes ao teste de HORRAT para repetibilidade no TXRF (n=6).

	Metal	Concentração (µg/L)	DPR Horwitz	$\frac{2}{3}$ DPR Horwitz	DPR (%)	HORRAT	Recuperação (%)
Repetibilidade	Arsênio	20	28,83	19,22	5,63	0,20	107,7
		50	25,12	16,75	3,28	0,13	106,1
	Cromo	20	28,83	19,22	9,01	0,31	92,03
		50	25,12	16,75	7,09	0,28	81,18
	Níquel	20	28,83	19,22	8,95	0,31	83,86
		50	25,12	16,75	2,08	0,08	80,09
	Selênio	20	28,83	19,22	4,53	0,16	95,68
		50	25,12	16,75	4,83	0,19	94,00

Os resultados acima mostram que o método é repetível uma vez que o valor de DPR é menor que $\frac{2}{3}$ do $DPR_{Horwitz}$ e o de HORRAT deve ser menor ou igual a 2. Vale ressaltar que as recuperações para cada metal ficaram entre 80% e 120%, que é a faixa aceitável para a exatidão do método.

5.2.2.3 Precisão intermediária

A análise da precisão intermediária do método, foi feita da mesma forma descrita no tópico 5.1.2.4, porém, variando o dia de análise e a analista. Os resultados demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores referentes ao teste de HORRAT para precisão intermediária no TXRF (n=12).

	Metal	Concentração (µg/L)	DPR Horwitz	$\frac{2}{3}$ DPR Horwitz	DPR (%)	HORRAT	Recuperação (%)
Precisão intermediária	Arsênio	20	28,83	19,22	5,70	0,20	115,0
		50	25,12	16,75	6,70	0,27	114,7
	Crômio	20	28,83	19,22	13,30	0,46	104,2
		50	25,12	16,75	12,30	0,49	95,88
	Níquel	20	28,83	19,22	6,70	0,23	85,74
		50	25,12	16,75	5,70	0,25	87,97
	Selênio	20	28,83	19,22	6,30	0,22	106,6
		50	25,12	16,75	11,70	0,52	111,3

Esses resultados indicam que o método é reprodutível para os metais descritos. Isso porque os valores de DPR foram todos menores $\frac{2}{3}$ do $DPR_{Horwitz}$ e os de HORRAT menores que 2. Além disso, as recuperações ficaram dentro da faixa aceitável, de 80% a 120%.

5.2.2.4 Robustez

A análise de robustez para o método desenvolvido no TXRF foi realizada utilizando os mesmos cálculos e os mesmos critérios de aceitação descritos no tópico 5.1.2.6. As variações dos parâmetros realizadas na robustez estão demonstradas na Tabela 18.

Tabela 18: Valores do nível baixo e do nível alto referentes a cada fator alterado na validação no TXRF.

FATOR	NÍVEL BAIXO	NÍVEL ALTO
Estufa	Com circulação de ar	Sem circulação de ar
Tempo entre preparo e leitura	24 horas	imediatamente
Tempo de secagem (min)	35	30
Temperatura de secagem (°C)	65	60

A Tabela 19 resume o planejamento experimental realizado a fim de otimizar os experimentos.

Tabela 19: Planejamento experimental para os experimentos referentes a robustez para validação no TXRF.

FATOR	EXPERIMENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Estufa	Com	Com	Com	Com	Sem	Sem	Sem	Sem
Tempo entre preparo e leitura	Imediato	Imediato	24 hrs	24 hrs	Imediato	Imediato	24 hrs	24 hrs
Tempo de secagem (min)	60	60	65	65	65	65	60	60
Temperatura de secagem (°C)	30	35	30	35	30	35	30	35

Cada experimento foi feito em duplicata e a média dos valores dos resultados para cada um dos metais foi utilizada para concluir acerca da robustez do método. A Tabela 20 demonstra os valores dessas médias das concentrações.

Tabela 20: Valor médio das concentrações para cada metal nos experimentos realizados para analisar a robustez do método.

METAL	EXPERIMENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Arsênio	54,82	54,91	62,11	61,43	54,5	54,68	55,88	57,32
Crômio	68,75	70,79	70,01	76,21	72,05	71,71	74,23	77,38
Níquel	42,06	41,06	45,18	44,74	42,7	43,73	44,93	44,81
Selênio	55,89	54,76	61,63	64,42	60,41	58,16	60,08	59,93

Utilizando os mesmos testes descritos no tópico 5.1.2.6, pôde-se concluir que apenas o fator “tempo entre preparo e leitura” foi significativo para níquel e para selênio. Dessa forma, a leitura dos elementos níquel e selênio devem ser feitas de maneira imediata após o preparo da amostra. Para crômio, nenhuma variação dos fatores foi significativa. Já para o arsênio, as alterações tanto no fator “tempo entre preparo e leitura” quanto no “tempo de secagem” foram significativos. Desta forma, na implementação do método na rotina, os filmes devem ser preparados no momento das análises e o tempo de secagem deve ser de 30 minutos para que haja uma condição de análise comum para todos os analitos. As variações nos fatores “estufa” e “temperatura de secagem” não influenciaram os resultados para nenhum metal.

A Tabela 21 resume as informações mencionadas, em que “sim” se refere ao fator que sofreu influência e “não” para aquele que não sofreu.

Tabela 21: Resumo dos resultados da influência da variação de cada fator na robustez do método.

FATOR	METAL			
	Arsênio	Crômio	Níquel	Selênio
Estufa	Não	Não	Não	Não
Tempo entre preparo e leitura	Sim	Não	Sim	Sim
Tempo de secagem (min)	Sim	Não	Não	Não
Temperatura de secagem (°C)	Não	Não	Não	Não

A Tabela 22 resume os resultados obtidos para todas as etapas da validação do método analítico no TXRF.

Tabela 22: Resumo dos dados e das informações obtidas após validação de método no TXRF.

Metal	Repetibilidade		Precisão intermediária		LD	LQ	Recuperação LQ	Robustez
	20 µg/L	50 µg/L	20 µg/L	50 µg/L				
Arsênio	HORRAT = 0,20	HORRAT = 0,13	HORRAT = 0,20	HORRAT = 0,27	0,15	0,51	99,50%	Significativo para tempo entre preparo e leitura e de secagem
	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12				
	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12				
	DPR = 5,63	DPR = 3,28	DPR = 5,70	DPR = 6,70				
	Recuperação = 107,7%	Recuperação = 106,1%	Recuperação = 115,0%	Recuperação = 114,7%				
Crômio	HORRAT = 0,45	HORRAT = 0,28	HORRAT = 0,46	HORRAT = 0,49	0,31	1,03	97,70%	Sem alterações significativas
	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12				
	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12				
	DPR = 13,04	DPR = 6,92	DPR = 13,3	DPR = 12,3				
	Recuperação = 92,03%	Recuperação = 81,18%	Recuperação = 104,2%	Recuperação = 95,88%				
Níquel	HORRAT = 0,20	HORRAT = 0,12	HORRAT = 0,23	HORRAT = 0,23	0,21	0,68	98,10%	Significativo apenas para tempo entre preparo e leitura
	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12				
	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12				
	DPR = 5,89	DPR = 3,01	DPR = 6,7	DPR = 5,7				
	Recuperação = 83,86%	Recuperação = 80,09%	Recuperação = 85,74%	Recuperação = 87,97%				
Selênio	HORRAT = 0,16	HORRAT = 0,19	HORRAT = 0,22	HORRAT = 0,52	0,1	0,32	99,70%	Significativo apenas para tempo entre preparo e leitura
	DPR Horwitz = 28,83	DPR Horwitz = 25,12	DPR Horwitz = 28,33	DPR Horwitz = 25,12				
	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12	2/3 de DPR Horwitz = 19,22	2/3 de DPR Horwitz = 25,12				
	DPR = 4,53	DPR = 4,83	DPR = 6,30	DPR = 11,70				
	Recuperação = 95,68%	Recuperação = 94,00%	Recuperação =					

=111,33%

Recuperação

6. CONCLUSÃO

Métodos simples e com sensibilidade adequada foram desenvolvidos e validados para a determinação de Hg, As, Cr, Ni e Se em sangue animal. Tais métodos foram propostos visando a aplicação para análise de pequenas quantidades de amostra (poucos μL), o que pode ser limitante para outras técnicas analíticas. A determinação destes metais, que podem apresentar efeitos tóxicos, é importante na avaliação de impactos ambientais ocorridos por diversas fontes. Além disso, as contaminações por metais tóxicos envolvendo animais domésticos também podem ser analisadas utilizando os métodos desenvolvidos.

Após finalizados os experimentos, pôde-se concluir que as validações dos métodos analíticos, tanto para mercúrio em DMA quanto para arsênio, crômio, níquel e selênio no TXRF foram bem sucedidas e os resultados obtidos atendem os parâmetros estabelecidos para validação.

A confirmação de que é possível analisar amostras de sangue animal utilizando as duas técnicas previamente mencionadas contribui para ampliar as opções de técnicas disponíveis para os analistas de laboratório. Além disso, a DMA e a TRXF oferecem diversas vantagens frente às metodologias analíticas clássicas, conforme apresentado nesse trabalho.

Como perspectiva futura tem-se o aperfeiçoamento da etapa de preparo da amostra a fim de validar outros metais utilizando o método desenvolvido. Além disso, a análise de outras matrizes biológicas, como soro, urina e leite, também é um dos objetivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANALÍTICA. **Análise de mercúrio - Por que determinar Mercúrio?: mercúrio e sua toxicidade para os seres vivos.** Mercúrio e sua toxicidade para os seres vivos. Disponível em: <https://www.analiticaweb.com.br/p.php?tit=analizador-de-mercúrio-por-combustao-dma-80&Bid=p59a98f51c78c2>. Acesso em: 28 dez. 2021.

ARAÚJO, Ubiratan Barbosa de. **Desenvolvimento e Caracterização de um Sistema Automatizado Portátil de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.** 2018. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

ARBEX, Marcos Abdo *et al.* **A poluição do ar e o sistema respiratório.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* São Paulo, p. 643-655. 22 ago. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/sD3cLkXqQwmDFpgzsyj7gBm/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 jan. 2022.

BAÊTA, A. P. **Mercúrio Total e Metilmercúrio em Diferentes Espécies de Peixes da Baía de Guanabara**. Cp.3. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2004. (Dissertação de Mestrado). Disponível em: http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0220296_04_cap_03.pdf. Acesso em: 01 jan. 2022.

BIOCIÊNCIAS, Instituto de. **Como são e para que servem as penas das aves?** Universidade Estadual Paulista. Disponível em: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Animais_JD_Botanico/aves/aves_biologia_geral_penas.htm. Acesso em: 19 jan. 2022.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner *et al.* **Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense**. Scientia Chromatographica, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a04.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2022.

BRANDÃO, Poliane Aparecida Alves. **Determinação de estanho em tecidos de ratas por ICP-MS**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/1497/1/Determina%C3%A7%C3%A3o%20de%20estanho%20em%20tecidos%20de%20ratas%20por%20ICP-MS.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Laudo Técnico Preliminar: impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de fundão, em mariana, minas gerais**. Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf. Acesso em: 16 jan. 2022.

BRASIL. Lei nº 9.605/1998, de 12 de fevereiro de 1998. **Lei Nº 9.605, de 12 de Fevereiro de 1998**. Brasília, Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Acesso em: 17 jan. 2022.

BRASIL. **Lei Nº 12.334**. Brasília, DF, 20 set. 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12334.htm. Acesso em: 18 jan. 2022.

BRUKER. **ESPECTRÔMETROS TXRF S4 T-STAR**. 2021. Disponível em: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/elemental-analyzers/txrf-spectrometers/s4-t-star.html>. Acesso em: 29 dez. 2021.

CALDAS, Luiz Fernando S. *et al.* **Avaliação de diferentes métodos para a determinação de cobre em óleo mineral isolante por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. Química Nova, [s. l], v. 37, n. 5, p. 776-782, 08 maio 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/QmmPFZKcpBQ9SFpcVcQpcMp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 jan. 2022.

CAMPOS, Dr. Mario Julio Avila. **Cádmio**. Laboratório de Anaeróbios. Disponível em: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=49&lang=br. Acesso em: 07 jan. 2022.

CAMPOS, Dr. Mario Julio Avila. **Chumbo**. Laboratório de Anaeróbios. Disponível em: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=41%3Achumbo-pb&catid=14%3Atemas-nao-listado&lang=br. Acesso em: 07 jan. 2022.

CHEIS, Daiana. **Os Danos Que O Cromo Hexavalente Pode Causar À Saúde**. 2013. Disponível em: [https://www.revistatae.com.br/Artigo/538/os-danos-que-o-cromo-hexavalente-pode-causar-a-saude#:~:text=A%20toxicidade%20do%20cromo%20est%C3%A1,e%20corrosiva%20no%20corpo%20humano.&text=A%20inala%C3%A7%C3%A3o%2C%20por%20exemplo%2C%20do,\(isto%20%C3%A9%2C%20cancer%C3%ADgeno\)..](https://www.revistatae.com.br/Artigo/538/os-danos-que-o-cromo-hexavalente-pode-causar-a-saude#:~:text=A%20toxicidade%20do%20cromo%20est%C3%A1,e%20corrosiva%20no%20corpo%20humano.&text=A%20inala%C3%A7%C3%A3o%2C%20por%20exemplo%2C%20do,(isto%20%C3%A9%2C%20cancer%C3%ADgeno)..) Acesso em: 18 jan. 2022.

COLASSO, Camila. **Toxicologia do Mercúrio: entenda como funciona**. 2020. Disponível em: <https://www.chemicalrisk.com.br/toxicologia-do-mercurio/#:~:text=A%20ingest%C3%A3o%20do%20merc%C3%BArio%20elementar,trato%20gastrointestinal%20%C3%A9%20bem%20limitada.&text=A%20inala%C3%A7%C3%A3o%20do%20vapor%20de,atinge%20o%20Sistema%20Nervoso%20Central..> Acesso em: 18 jan. 2022.

COLASSO, Camilla. **Toxicologia do chumbo: saiba tudo sobre os riscos à saúde e as aplicações da substância**. 2020. Disponível em: <https://www.chemicalrisk.com.br/toxicologia-do-chumbo/#:~:text=O%20chumbo%20pode%20provocar%20uma,de%20neuropatia%20perif%C3%A9rica%20e%20hipertens%C3%A3o..> Acesso em: 18 jan. 2022.

COSTA, Aristóteles Gomes *et al.* **Metais tóxicos e seus efeitos sobre a reprodução dos animais**. Revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 108-124, mar. 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/54993>. Acesso em: 10 jan. 2022.

D'AMATO, Claudio *et al.* **DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão**. Química Nova, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 995-1002, nov. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000600017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BzwyjybkzCgvjX6tpykf9gf/?lang=pt>. Acesso em: 08 mar. 2022.

DIAS, Adriano de Oliveira *et al.* MARIANA, O MAIOR DESASTRE AMBIENTAL DO BRASIL: UMA ANÁLISE DO CONFLITO SOCIOAMBIENTAL. In: LAWING, Nilzo Ivo *et al.* (org.). **Planejamento e Gestão Territorial: a Sustentabilidade dos Ecossistemas Urbanos**. Santa Catarina: Insular, 2015. p. 457-476. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/5996/1/CAP20.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2022.

DIAS, Diogo Lopes. **Química Verde**. Disponível em: <https://www.manualdaquimica.com/quimica-ambiental/quimica-verde.htm>. Acesso em: 18 jan. 2022.

ESTEVES, Alessandra; ANDRADE, Juliana (ed.). **Especial: Segurança de Barragens: empresas investem em tecnologia e gestão para reduzir acidentes**.

Empresas investem em tecnologia e gestão para reduzir acidentes. Disponível em: <https://memoria.ebc.com.br/seguranca-de-barragens>. Acesso em: 08 mar. 2022.

FELICIANO, Guilherme Guimaraes; PASQUALETO, Olívia de Quintana Figueiredo. **MEIO AMBIENTE LABORAL EQUILIBRADO: ANÁLISE DO CASO BRUMADINHO**. Veredas do Direito: Direito Ambiental e Desenvolvimento Sustentável, Belo Horizonte, v. 16, n. 36, p. 191-216, 4 dez. 2019. Disponível em: <http://revista.domhelder.edu.br/index.php/veredas/article/view/1556>. Acesso em: 16 jan. 2022.

FERREIRA, Luisa P. *et al.* **Feasibility of a New Method for Identification and Discrimination of Gunshot Residues by Total Reflection X-Ray Fluorescence and Principal Component Analysis**. Journal Of The Brazilian Chemical Society, Brasil, v. 30, n. 12, p. 2582-2589, dez. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/XCHmsJJwVMcLBNL4vhPtzR/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 15 jan. 2022.

GONÇALVES, Maiara Aline. **Aspectos Clinicopatológicos da Intoxicação por Arsênio Orgânico em Bovinos**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/133182#:~:text=As%20principais%20altera%C3%A7%C3%B5es%20macrosc%C3%B3picas%20consistiram,e%20hemorragia%20multifocal%20nas%20serosas..> Acesso em: 07 jan. 2022.

KRUG, Francisco J. *et al.* **Guia Prático de Perguntas e Respostas sobre ICP-OES, ICP-MS e Preparo de Amostras**. São Paulo, 2001. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/45709/guia-pratico-de-perguntas-e-respostas-sobre-icp-oes-icp-ms-e-preparo-de-amostras>. Acesso em: 02 jan. 2022.

MATTHEWS, P.J. Control of metal application rates from sewage sludge utilization in agriculture. CRC Crit. Rev. Environ. Control, v.14, p.199-250, 1984.

MAURÍCIO, Ângelo de Queiroz *et al.* **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura – Binagr, 2011. 227 p. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MELENDEZ-PEREZ, Jose J.; FOSTIER, Anne H.. **Assessment of Direct Mercury Analyzer® to quantify mercury in soils and leaf samples**. Journal Of The Brazilian Chemical Society. Campinas, p. 1880-1886. nov. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/3z7C8FDcTbPRk4SQBtRH8Hq/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 16 jan. 2022.

MELO, Eduardo Pimenta de Almeida. **A Importância da Validação de Métodos Analíticos**. 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/>. Acesso em: 28 dez. 2021.

MENDONÇA, Tasso. **A importância da mineração na economia brasileira**. 2021. Disponível em: <https://diariodocomercio.com.br/opiniao/a-importancia-da-mineracao-na-economia-brasileira/#:~:text=A%20minera%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A9%20respons%C3%A1vel%20por,de%20insumos%20diretamente%20ao%20agroneg%C3%B3cio..> Acesso em: 08 mar. 2022.

MILESTONE. **DMA-80 evo.** Disponível em: <https://www.milestonesrl.com/es/productos/determinacion-de-mercurio/dma-80-evo>. Acesso em: 23 dez. 2021.

MENDES, Seyna Ueno Rabelo. **Avaliação dos teores de mercúrio em cabelos de crianças residentes em área de garimpo no município de chapada de natividade-Tocantins.** 2017. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-10082017-095454/publico/2017MendesAvaliacao.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

NASCIMENTO FILHO, Virgílio F.. **Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF).** Campinas: Depto de Ciências Exatas/Esalq, 1999. Disponível em: <http://www.fem.unicamp.br/~giorgia/fluorescencia.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2022.

NASCIMENTO, Bruno Lucio Meneses *et al.* **Comportamento e avaliação de metais potencialmente tóxicos (Cu (II), Cr (III), Pb(II) e Fe(III)) em águas superficiais dos Riachos Capivara e Bacuri.** Imperatriz-MA, Brasil. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, [s. l], v. 20, n. 3, p. 369-378, set. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/VgZJSgr5hpNBr6nspDhYT4b/?lang=pt#>. Acesso em: 16 jan. 2022.

ONU. **A ONU e o meio ambiente.** 2020. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/91223-onu-e-o-meio-ambiente>. Acesso em: 17 jan. 2022.

PATRA, Manomita *et al.* **Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance.** Environmental And Experimental Botany, v. 52, n. 3, p. 199-223, 26 fev. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847204000346?via%3Dihub>. Acesso em: 07 jan. 2022.

PAVESI, Thelma. **Importância toxicológica da exposição a níquel, cobalto e cromo: a dermatite de contato a metais e a susceptibilidade genética a cromo.** 2020. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências - Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/47643/2/thelma_pavesi_ensp_dout_2020.pdf. Acesso em: 19 jan. 2022.

PIERANGELI, Maria Aparecida Pereira *et al.* **Elementos-traço em áreas de vegetação nativa e agricultura intensiva do estado de Mato Grosso determinados por fluorescência de raios-x por reflexão total.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, [s. l], v. 39, p. 1048-1057, mar. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/a/g8YWvsWpQhVGmgmk8dQxWwP/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2022.

POTT, Crisla Maciel; ESTRELA, Carina Costa. **Histórico ambiental: desastres ambientais e o despertar de um novo pensamento.** Estudos Avançados, [s. l], v. 31, n. 9, p. 271-283, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ea/a/pL9zbDbZCwW68Z7PMF5fCdp/?lang=pt>. Acesso em: 16 jan. 2022.

REDAÇÃO, Da. **Lama das barragens já matou 11 toneladas de peixes, diz IBAMA**. 2015. Disponível em: <https://veja.abril.com.br/politica/lama-das-barragens-ja-matou-11-toneladas-de-peixes-diz-ibama/>. Acesso em: 16 jan. 2022.

ROCHA, Siomara Dias da. **Otimização de métodos para determinação de mercúrio lábil e total em sólidos em suspensão e metilmercúrio em ambientes de águas pretas amazônicas**. 2021. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/8550>. Acesso em: 17 jan. 2022.

RODRIGUES, Jairo Lisboa. **Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma**. 2010. 140 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-13082010-100725/publico/Teseespeciacaomercuriojairo.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

SALABERT, André. **Intoxicações em Aves e Animais Silvestres**. 2014. Núcleo de Internação para Aves e Animais Silvestres. Disponível em: <http://www.niaas.com.br/news/intoxica%C3%A7%C3%B5es-em-aves-e-animais-silvestres/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

SANTIAGO, Antonio Dias *et al.* **Calagem**. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_34_711200516717.html. Acesso em: 16 jan. 2022.

SANTOS, Cristiane Aparecida dos *et al.* **Descrição dos Desastres em Mariana e Brumadinho Sob o Olhar da Perícia Criminal: Uma Revisão Sistemática**. Brazilian Journal Of Forensic Sciences, Medical Law And Bioethics. Belo Horizonte, p. 350-375. abr. 2021. Disponível em: <https://www.ipebj.com.br/bjfs/index.php/bjfs/article/view/828>. Acesso em: 17 jan. 2022.

SANTOS, Elenir Souza *et al.* **Espectrometria de Fluorescência de Raios-x na Determinação de Espécies Químicas**. Enciclopédia Biosfera, [s. l], v. 9, n. 17, p. 13-32, 01 dez. 2013. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/MULTIDISCIPLINAR/espectrometria.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2022.

SANTOS, Lisia Maria G. dos *et al.* **Determinação simultânea de As, Cd e Pb em amostras de água purificada para hemodiálise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, após otimização multivariada baseada no uso de planejamento experimental**. Química Nova, [s. l], v. 31, n. 5, p. 975-979, 24 jul. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/b5g9CtHtbpHSgfnYTNqQBSP/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 19 jan. 2022.

SILVA, Danielle Letícia da *et al.* **O maior desastre ambiental brasileiro: de Mariana (MG) a Regência (ES)**. Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico, Minas Gerais, v. 24, n. 1-2, p. 136-158, 25 maio 2018. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em:

<https://periodicos.ufmg.br/index.php/mhnb/article/view/6264/3853>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SOARES, Liliane Catone *et al.* **Mercúrio em Solos da Região Sudeste do Brasil sem Influência Antropogênica e sua Correlação com as Características Químicas e Físicas**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, [s. l], v. 39, n. 3, p. 903-914, 21 jan. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/i/2015.v39n3/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

TECHNOLOGIES, Dc Tech Laboratory. **Espectroscopia de Absorção Atômica: detalhamento de técnicas de atomização**. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/espectroscopia-de-absorcao-atomica-detalhamento-de-tecnicas-atomizadores/>. Acesso em: 02 jan. 2022.

VIEIRA, Luiz Marques; ALHO, Cleber J. R.. **BIOMAGNIFICAÇÃO DE MERCÚRIO NO PANTANAL, BRASIL**. In: III SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL - OS DESAFIOS DO NOVO MILÊNIO, 2000, Corumbá-Ms. Disponível em: <https://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Bioticos/VIEIRA-081.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2022.

VIRGA, Rossana Helena Pitta *et al.* **Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis**. Food Science And Technology: Ciência e Tecnologia de Alimentos, [s. l], v. 27, n. 4, p. 779-785, out. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/dHWCfH7Tvsb9HtTQgmKSbQy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 jan. 2022.

ZUCOLOTO, Alexandre Dias *et al.* **Manual de Toxicologia Clínica: orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas**. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/MANUAL%20DE%20TOXICOLOGIA%20CL%C3%8DNICA%20-%20COVISA%202017.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2022.