

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

Leonel da Silva Teixeira

**Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação
de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ICEx/DQ.1004^a

T.460^a

Leonel da Silva Teixeira

**Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação
de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos**

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor - Ciências Química

Belo Horizonte

2014

T266d
2014
T
Teixeira, Leonel da Silva
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos [manuscrito] / Leonel da Silva Teixeira. 2014.
[xix], 132 f.: il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientadora: Cláudia Carvalhinho Windmöller.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: f. 122-132.

1. Química analítica - Teses 2. Fertilizantes orgânicos - Teses 3. Preparação de amostra (Química) - Teses 4. Microondas - Teses 5. Ultrassom - Teses 6. Espectroscopia de absorção atômica - teses I. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora II. Windmöller, Cláudia Carvalhinho, Coorientadora III. Título.

CDU 043



"Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Micronutrientes e Contaminantes em Fertilizantes Orgânicos"

Leonel da Silva Teixeira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



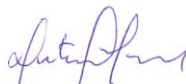
Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG



Profa. Cláudia Carvalhinho Windmöller - Coorientadora
UFMG



Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira
EMBRAPA



Prof. Antônio Augusto Neves
UFV



Profa. Leticia Malta Costa
UFMG



Prof. Fernando Barboza Egreja Filho
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Química (DQ), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) por disponibilizar sua infraestrutura para a determinação dos elementos avaliados neste trabalho.

À Profa Dra Clésia Cristina Nascentes pela orientação, incentivo, paciência e compreensão, que muito contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação profissional e pessoal.

À Profa Dra Cláudia Carvalhinho Windmüller pela co-orientação e disponibilidade.

Aos professores, Ana Rita de Araújo Nogueira, Antônio Augusto Neves, Fernando Barboza Egreja Filho e Letícia Costa Malta por aceitarem participar da banca avaliadora e pelas valiosas sugestões para melhoria do trabalho.

À Heulla pela amizade e pela excelente parceria durante toda a realização do trabalho.

Aos técnicos Gustavo e Sandra pelas inúmeras determinações de Cr e Mo realizadas ao longo do trabalho.

Aos funcionários do DQ/UFMG: Carlos, Kátia, Lilian, Luís, Marluce, Paulete e Paulo pela atenção e disponibilidade.

Ao pessoal do laboratório de Espectrometria atômica e preparo de amostras pela amizade e colaboração.

À Silvéria grande amiga que esteve presente durante todo o período do doutorado. Obrigado pelos momentos de descontração, informação e pela força nos momentos difíceis.

Ao Cleiton e à Darliane pelo convívio, conversas e amizade.

Ao Frank pela amizade, pelas conversas e pelas discussões sobre os mais variados temas de química.

Às amigas Deyse, Patrícia e Rita Flávia sempre dispostas a ajudar no que fosse possível.

À Lívia e a Thaís que contribuíram para elaboração de parte deste trabalho.

Aos amigos do DQ, Fernando, Isabela, Jaqueline Magalhães, Jaqueline Martins, Júlio, Júnia, Lidiane, Liliane, Lucas, Márcio, Marcus, Maria José, Marília, Vanessa e Virgínia pelo convívio, colaboração e momentos de descontração.

A todos meus familiares pelo apoio incondicional e compreensão, em especial, a minha mãe Letice, a minha vó Hilda, a minha vó Helena, ao meu pai José Daniel e ao meu irmão Rafael.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Nesta tese foram desenvolvidos e validados quatro métodos analíticos para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos empregando a espectrometria de absorção atômica com chama no modo sequencial – FS FAAS (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn) e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos no modo sequencial – FS HG AA (As e Se) como técnicas de determinação. O foco do desenvolvimento foi a etapa de preparo de amostra, visando maior frequência analítica, menor consumo de reagentes e menor geração de resíduos, além é claro, eficiência, veracidade e precisão adequados. Nos métodos desenvolvidos foram empregadas diferentes fontes de energia para a disponibilização do analito: aquecimento convencional por condução em sistema aberto (bloco digestor), radiação micro-ondas em sistema fechado (forno de micro-ondas com cavidade) e ondas ultrassônicas em reator do tipo *cup-horn*. Nas etapas de otimização foram usadas estratégias univariadas e multivariadas.

Após otimização, o procedimento de decomposição assistida por micro-ondas em forno com cavidade consistiu em adicionar 4,50 mL de HNO₃ concentrado à 200,0 mg de amostra, seguido da adição de 2,00 mL de H₂O₂ e 1,5 mL de HCl, nesta ordem. Em seguida, os frascos de PFA foram fechados e submetidos ao programa de aquecimento (10 min até 200 °C e 15 min a 200 °C). As recuperações e a precisão do método foram avaliadas pela análise (n=7) do material de referência certificado de lodo de esgoto (CRM029-50 FLUKA) e variaram de 84 a 98 % e de 2 a 5 %, respectivamente, para os elementos determinados (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn).

O procedimento de extração em bloco digestor para a determinação do teor total de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn envolveu a adição de 2,50 mL de água régia a 250,0 mg de amostra, contato por 20 min, submissão a aquecimento a 130 °C por 50 min, adição de 2,00 mL de H₂O₂, mais aquecimento por 25 min a 130°C. As recuperações dos analitos presentes no CRM029-50 foram superiores a 93 % e os desvios padrão relativos (DPR) dos resultados foram inferiores a 4% para as análises realizadas com sete repetições.

A determinação sequencial de As e Se foi realizada a partir dos extratos do procedimento com água régia em bloco digestor. As condições de geração de hidretos otimizadas foram: extrato preparado de forma a conter HCl 7,0 mol L⁻¹,

solução redutora: NaBH_4 4 % (m v^{-1}) + KI 10 % m v^{-1} em NaOH 0,5% (m v^{-1}) e solução ácida de HCl 6,0 mol L^{-1} . Os valores de recuperação para o CRM029-50 foram 97 e 111 % para As e Se, respectivamente. Já a precisão, em termos de DPR foi 4 e 5 % para As e Se, respectivamente.

O procedimento otimizado de extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo *cup-horn* consistiu em adicionar 500 μL de mistura ácida (HNO_3 - HCl - HCl , 5:3:3, v:v:v) a 120,0 mg de amostra. Contato por 20 minutos, adição de 500 μL de água deionizada e sonicação por 10 minutos com amplitude 50%. As recuperações para o CRM029-50 foram 100, 109, 96, 92, 101, 104 e 102% para Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn, respectivamente.

Os métodos desenvolvidos apresentaram parâmetros de desempenho adequados à legislação brasileira vigente. Além disso, quando comparado aos métodos reconhecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, apresentaram vantagens como, menor consumo de reagente e maior frequência analítica.

Palavras-chave: fertilizante orgânico, preparo de amostra, micro-ondas, ultrassom, FS FAAS e FS HG AAS.

ABSTRACT

In this work, four analytical methods were developed and validated for the determination of contaminants and micro-nutrient in organic fertilizers employing Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry - FS FAAS (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn) and Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry – HG AAS (As e Se). The sample preparation step was the main focus, seeking higher analytical frequency, lower reagent consumption and less waste, moreover with adequate accuracy and precision. Different energy sources were employed to make available the analytes: conventional heating in open system (block digester), microwave radiation in closed system (microwave oven) and ultrasonic energy in reactor cup-horn. Univariate and multivariate strategies were used in the methods optimization.

After optimization, the decomposition procedure assisted by microwave consisted of adding 4.50 mL of concentrated HNO₃ in 200.0 mg of the sample, followed by addition of 2.00 mL of H₂O₂ and 1.5 mL of HCl. Then the flasks were closed and subjected to heating program (10 min until 200 °C and 15 min at 200 °C). The recoveries and precision of the method evaluated by analysis (n = 7) of the certified reference material of sewage sludge (CRM029-50 FLUKA) ranged 84-98% and 2-5%, respectively, for the determined elements (Cd , Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb and Zn).

The extraction procedure in block digester for determining the total content of analytes involved the addition of 2.50 mL of aqua regia in 250.0 mg sample, 20 min contact, heating at 130 °C for 50 min, addition of 2.00 mL of H₂O₂ and further heating at 130 °C for 25 min. The recoveries of the analytes present CRM029-50 sample were greater than 93% and relative standard deviation (RSD) were less than 4% for the analyzes conducted with seven replicates.

The sequential determination of As and Se by HG-AAS was performed from the extracts of the digestion block procedure. The optimized conditions for hydrides generation were: extract samples in HCl 7.0 mol L⁻¹, solution reductive: NaBH₄ 4% (v m⁻¹) + KI 10% v m⁻¹ in 0.5% NaOH (v m⁻¹) and acidic solution of HCl 6.0 mol L⁻¹. The recoveries for the CRM029-50 were 97 and 111% for As and Se, respectively. Precision was 4 e 5% for As and Se, respectively.

The optimized procedure of extraction assisted by ultrasound consisted of adding 500 μL of acid mixture ($\text{HNO}_3\text{-HCl-HCl}$, 5:3:3, v:v:v) in 120.0 mg of sample, 20 min contact, adding 500 μL deionized water and sonication for 10 min with 50% amplitude. The recoveries for the CRM029-50 were 100, 109, 96, 92, 101, 104 and 102% for Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn, respectively.

The developed methods presented suitable performance to meet the Brazilian legislation. Moreover, these methods has advantages as lower reagent consumption and higher analytical frequency when they compared to recognized methods by the Brazilian agencies

Keywords: organic fertilizer, sample preparation, microwave, ultrasound, FS FAAS and FS HG AAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de fertilizantes (total e importado) nos últimos três anos ¹	6
Figura 2. Esquema representativo do aquecimento condutivo (a) e aquecimento por radiação micro-ondas (b), adaptação ³⁵	15
Figura 3. Esquema representativo da interação das micro-ondas com os componentes da mistura reacional: migração iônica (a.1 - a.3) e rotação de dipolo (b.1 - b.2), adaptação ³⁵	17
Figura 4. Dinâmica temporal de uma bolha de cavitação e sua relação com os ciclos de rarefação e compressão da onda acústica, adaptação ³⁵	20
Figura 5. Colapso das bolhas no interior de um meio líquido.....	20
Figura 6. Esquema representativo do sistema ótico de um instrumento FS FAAS com feixe duplo. LCO's – lâmpadas de catodo oco, D2 lâmpada de deutério, CRF – combinador rotativo de feixes. Adaptação ⁶⁰	25
Figura 7. Sistema sonoreator do tipo <i>cup horn</i> empregado no procedimento de extração proposto: Esquema (a), fotografia (b) e tubo de polipropileno com capacidade para 5,0 mL.....	35
Figura 8. Etapas do programa de aquecimento I para digestão das amostras de fertilizantes.....	38
Figura 9. Etapas do programa de aquecimento II para digestão das amostras de fertilizantes.....	38
Figura 10. Esquema do gerador de hidretos usado na determinação de As e Se, Adaptação ⁹⁵	48
Figura 11. Resíduos remanescentes após o procedimento II (HNO ₃ concentrado e programa de aquecimento I), amostras de esterco de boi (a) e de lodo de esgoto de Belo Horizonte (b).	56
Figura 12. Resíduos remanescentes da amostra lodo de esgoto de Belo Horizonte: Procedimento com água régia (a) e procedimento com água régia invertida (b), ambos com o programa de aquecimento I.....	56
Figura 13. Digerido obtido com o procedimento empregando água régia, HF (procedimento VI) e programa de aquecimento I (a) e resíduo aderido fortemente aos frascos de PFA após a realização do procedimento VI (b).....	58

Figura 14. Resíduos remanescentes da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte após aplicação do procedimento com HNO ₃ e HF (a) e do procedimento com água régia invertida e HF (b), ambos com o programa de aquecimento I.....	58
Figura 15. Concentrações médias (n = 3) de Fe e Zn determinadas a partir dos diferentes procedimentos aplicados à amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte. Todos os procedimentos com o programa de aquecimento I.....	59
Figura 16. Concentrações médias (n = 3) de Cr, Cu, Mn, Ni, e Pb determinadas a partir dos diferentes procedimentos aplicados à amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte. Todos os procedimentos com programa de aquecimento I. (Concentração de Cd e Co < LQ).	60
Figura 17. Valores de absorvância do Cr (1,0 mg L ⁻¹) medidos com chama ar/acetileno (Δ) e óxido nitroso/acetileno (○) na presença de diferentes concentrações de C _{org}	64
Figura 18. Valores de absorvância do Cr (1,5 mg L ⁻¹) medidos com chama ar/acetileno e óxido nitroso/acetileno, com ou sem adição de NH ₄ Cl para diferentes razões Fe:Cr.....	65
Figura 19. Concentrações médias (n = 3) de Fe e Zn extraídas da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte com os diferentes extratores avaliados.	70
Figura 20. Concentrações médias (n = 3) de Cr, Cu, Mn, Ni, e Pb extraídas da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte com os diferentes extratores avaliados.	70
Figura 21. Gráfico de Pareto com as respostas múltiplas do planejamento fatorial completo 2 ⁴	71
Figura 22. Superfícies de resposta obtidas com o planejamento composto central (CCD) 2 ³ , tempo vs. volume de H ₂ O ₂ (a), temperatura vs. volume de H ₂ O ₂ (b) e tempo vs. temperatura (c).	73
Figura 23. Curva analítica sem matriz para Pb (a) e gráfico de resíduos (b).	76
Figura 24. Curva analítica sem matriz para Pb (a) e gráficos de resíduos (b), após exclusão do valor extremo confirmado pelo teste de Jackknife.	76
Figura 25. Gráficos de probabilidade normal (a) e gráficos de Durbin-Watson (b) para a curva analítica de Pb sem presença de matriz. Onde: e _i = resíduo da regressão e q _i = valor normal esperado.....	78
Figura 26. Gráfico representando a homoscedasticidade das variâncias para a curva de Pb sem matriz nos grupos 1 e 2.....	79

Figura 27. Curvas com matriz para Pb, esterco de boi (a), farinha de sangue (c), lodo de esgoto (e) e torta de mamona (g) e gráficos de resíduo para cada caso, após exclusão dos valores extremos. Concentração dos extratos nos pontos da curva igual a 90%, v v ⁻¹	82
Figura 28. Curvas analíticas de As e Se obtidas com as diferentes condições avaliadas para a geração de hidretos: (●) KI+NaBH ₄ no canal do redutor sem aquecimento da solução amostra, (○)KI+NaBH ₄ no canal do redutor com aquecimento da solução amostra, (▲) KI e NaBH ₄ em diferentes canais sem aquecimento e (Δ) KI e NaBH ₄ em diferentes canais com aquecimento.....	95
Figura 29. Concentrações de As determinadas na ausência dos componentes da matriz (●) e na presença dos componentes da matriz do AOQ (■) e da TMA (Δ) com as quatro combinações de condições para a geração de hidreto. Concentração preparadas: 2,0; 10,0 e 20,0 µg L ⁻¹	96
Figura 30. Concentrações de Se determinadas na ausência dos componentes da matriz (●) e na presença dos componentes da matriz do AOQ (■) e da TMA (Δ) com as quatro combinações de condições para a geração de hidreto. Concentrações preparadas: 5,0; 40,0 e 80,0 µg L ⁻¹	97
Figura 31. Sinais de absorção medidos para duas concentrações de As e Se quando foram empregadas diferentes concentrações de HCl e NaBH ₄	99
Figura 32. Recuperação do padrão de As (10,0 µg L ⁻¹) e Se (40,0 µg L ⁻¹) adicionados ao extrato da amostra adubo orgânico quaresmeira (AOQ). Valor de referência: concentração determinada a partir de soluções preparadas com os padrões e reagentes.	100
Figura 33. Curvas analíticas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva de As, equações para os dois modelos avaliados e gráficos de resíduos.....	104
Figura 34. Curvas analíticas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva de Se, equações para os dois modelos avaliados e gráficos de resíduos.....	105
Figura 35. Gráfico de Pareto obtido com planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻² usando as respostas múltiplas.....	111
Figura 36. Recuperação dos metais com e sem adição de 100,0 µL de HF 40% (m m ⁻¹), considerando como referência as concentrações determinadas a partir do procedimento de digestão em forno de micro-ondas. Amostra: composto de lixo.	

Condições fixadas: 0,5 mL da mistura ácida (HCl+HNO₃, 1:1, v v⁻¹), 0,5 mL de água deionizada, 10 minutos de sonicação com amplitude de 50%. Cd e Co < LQ. 112

Figura 37. Recuperações obtidas com os experimentos do planejamento composto central 2³. Condições fixadas: massa (120 mg), volume do extrator (1,0 mL), volume final (10,0 mL), tempo de sonicação (10 min) e amplitude (50%). Repetição no ponto central, experimento 15, (n=3), DPR < 5% para todos os metais. Cd e Co < LQ.... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações dos fertilizantes orgânicos simples ²	9
Tabela 2. Especificações dos fertilizantes orgânicos mistos ²	10
Tabela 3. Teores mínimos de macronutrientes secundários e micronutrientes especificados pelo MAPA ²	10
Tabela 4. Limites máximos de contaminantes minerais admitidos em fertilizantes orgânicos ³	11
Tabela 5. Limitações e propriedades dos ácidos e misturas comumente empregados em dissolução de amostras ³⁵	14
Tabela 6. Condições de medidas para determinação de 6 elementos em 10 amostras e estimativa do tempo de determinação por FAAS convencional e sequencial	25
Tabela 7. Condições instrumentais empregadas para as determinações dos diferentes elementos	34
Tabela 8. Resíduos e fertilizantes orgânicos comerciais avaliados neste trabalho ...	37
Tabela 9. Condições específicas de cada procedimento de preparo das amostras avaliado no forno de micro-ondas com cavidade	40
Tabela 10. Condições de cada ensaio do planejamento fatorial completo 2 ⁴ com repetição no ponto central para o procedimento de extração em bloco digestor	43
Tabela 11. Condições de cada ensaio do planejamento composto central 2 ³ com repetição no ponto central para o procedimento de extração em bloco digestor	44
Tabela 12. Concentração dos pontos de cada curva de calibração usada na avaliação do efeito de matriz na determinação de metais em fertilizantes orgânicos	45
Tabela 13. Concentração de extrato/digerido em cada ponto da curva de adição padrão para as diferentes amostras avaliadas.....	46
Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻² usado para identificação dos fatores que afetam significativamente a extração do analitos em sonoreator do tipo <i>cup horn</i>	49
Tabela 15. Matriz do planejamento composto central 2 ³ usado para a otimização da proporção dos ácidos empregados na extração dos analitos em sonoreator do tipo <i>cup horn</i>	50
Tabela 16. Valores referentes à caracterização físico-químicas das amostras.....	53

Tabela 17. Valores de concentração média (n=3) de micronutrientes e contaminantes inorgânicos presentes na amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte para os diferentes procedimentos avaliados.....	62
Tabela 18. Concentrações determinadas com o procedimento VII (água régia invertida e programa de aquecimento I) e com o procedimento IX (reagentes separados e programa de aquecimento II).....	67
Tabela 19. Valores de concentração média (n=3) de micronutrientes e contaminantes inorgânicos presentes na amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte para cada extrator avaliado para o procedimento de extração em bloco digestor	69
Tabela 20. Valores críticos para o procedimento de extração, obtidos pela metodologia de superfície de resposta.....	74
Tabela 21. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade para a curva analítica de Pb sem presença de matriz	78
Tabela 22. Faixas de concentração das curvas analíticas, com e sem matriz, que apresentaram relação linear confirmada após avaliação das premissas dos resíduos, significância regressão e falta de ajuste.....	80
Tabela 23. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise da significância da regressão e desvio da linearidade para as quatro matrizes estudadas.....	83
Tabela 24. Inclinações e interceptos com seus respectivos desvios padrão e valores de coeficiente de correlação para as curvas de Pb preparadas em diferentes meios	84
Tabela 25. Equação do modelo de regressão linear, coeficiente de determinação, LD e LQ estimados e valores de LQ determinados experimentalmente com seus respectivos valores de recuperação e desvio padrão relativo (n=7). Procedimento com bloco digestor	85
Tabela 26. Equação do modelo de regressão linear, coeficiente de determinação, LD e LQ estimados e valores de LQ determinados experimentalmente com seus respectivos valores de recuperação e desvio padrão relativo (n=7). Procedimento com forno de micro-ondas.....	85
Tabela 27. Concentrações determinadas para o MRC de lodo de esgoto, precisão e recuperação para os dois métodos desenvolvidos.....	87

Tabela 28. Concentrações dos analitos presentes em amostras de resíduos orgânicos usados como fertilizantes, valores de DPR e valores de recuperação para o método com bloco em relação o método com forno de micro-ondas (n=3).....	89
Tabela 29. Diferentes combinações de condições usadas para a determinação sequencial de As e Se em amostras de fertilizante orgânico	92
Tabela 30. Concentrações de HCl (canal 2) e NaBH ₄ (canal 3) avaliadas para a geração de hidretos simultânea de As e Se.....	98
Tabela 31. Concentrações de As determinadas na ausência e na presença de Se, concentrações de As determinados na amostra de adubo orgânico quaresmeira (AOQ) fortificada e valores de recuperação (n = 3).....	101
Tabela 32. Concentrações de Se determinadas na ausência e na presença de As, concentrações de Se determinadas na amostra de adubo orgânico quaresmeira (AOQ) fortificada e valores de recuperação (n = 3).....	101
Tabela 33. Concentrações de As e Se, referência e determinada, e valores de recuperação para o material de referência certificado de lodo de esgoto (n = 3)....	102
Tabela 34. Concentrações de As determinadas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva analítica empregando ajuste polinomial de segundo grau	106
Tabela 35. Concentrações de Se determinadas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva analítica empregando ajuste polinomial de segundo grau	106
Tabela 36. Valores de recuperação e concentrações de As determinadas na presença e na ausência das matrizes das amostras AOQ e TMA (n = 3).....	107
Tabela 37. Valores de recuperação e concentrações de Se determinadas na presença e na ausência das matrizes das amostras AOQ e TMA (n = 3).....	107
Tabela 38. Valores de LD e LQ referentes à técnica e ao método para As e Se (n = 10)	108
Tabela 39. Concentração de referência, concentração determinada, recuperação e DPR obtidos com a análise do MRC de lodo de esgoto (n = 7)	108
Tabela 40. Concentrações de As e Se das cinco amostras de fertilizante orgânico avaliadas, determinadas pelo método desenvolvido (n = 3).....	109
Tabela 41. Condições otimizadas para o procedimento de extração assistida por ultrassom para constituintes inorgânicos em fertilizantes orgânicos	114

Tabela 42. Faixa linear, regressão, coeficiente de determinação (R^2), LD, LQ e valores da legislação	116
Tabela 43. Valores de concentração certificados e determinados dos elementos em MRC de lodo de esgoto (média desvio \pm padrão, n = 5), valores de recuperação e precisão para o método proposto.....	116
Tabela 44. Concentrações determinadas usando o método de referência (decomposição assistida por micro-ondas) e o método proposto (extração assistida por ultrassom) e valores de recuperação.	118
Tabela 45. Principais parâmetros dos procedimentos de preparo das amostras	121

LISTA DE ACRÔNIMOS

AGE	Assessoria de Gestão Estratégica
ANDA	Associação Nacional para Difusão de Adubos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Planejamento composto central (CCD – <i>Composite central design</i>)
CE	Condutividade elétrica
CTC	Capacidade de troca catiônica
C-Total	Carbono total
CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Geração de Vapor Frio (CV AAS – <i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i>)
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS – <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FDACS	Departamento de Agricultura e Serviços aos Consumidores da Flórida (FDACS – <i>Florida Department of Agriculture and Consumer Services</i>)
FS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama no modo sequencial rápido (FS FAAS – <i>Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>).
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS – <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HG AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HG AAS – <i>Hydrite Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES – <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
LAFC	Laboratório de fertilizantes e corretivos
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Matéria orgânica
MRC	Material de Referência Certificado
N-Total	Nitrogênio total
PC	Ponto central
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA - <i>United State Enviroment Protection Agency</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos gerais.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Consumo de fertilizantes no Brasil	5
3.2. Fertilizantes orgânicos: Efeitos nos solos.....	6
3.3. O uso de resíduos orgânicos como fertilizantes.....	7
3.4. Legislação	9
3.5 Etapa de preparo de amostra.....	11
3.6. Técnicas empregadas para determinação de contaminantes inorgânicos	23
3.6.1. Espectrometria de absorção atômica com chama no modo sequencial (FS FAAS).....	24
3.6.2 Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS)	25
3.7. Otimização multivariada no desenvolvimento de métodos analíticos.....	29
3.8. Validação de métodos analíticos.....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1. Reagentes e instrumentação.....	34
4.2. Amostras e Material de Referência Certificado (MRC).....	36
4.2.1. Caracterização das amostras estudadas	36
4.3. Procedimento de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade.....	37
4.3.1. Procedimento geral	37
4.3.2. Otimização do procedimento de decomposição assistida por radiação micro- ondas	39
4.4. Otimização do procedimento de extração ácida em bloco digestor	39
4.4.1. Procedimento geral	39
4.4.2. Avaliação do extrator por meio de procedimento univariado	41
4.4.3. Planejamento fatorial completo 2^4 com repetição no PC.....	42
4.4.4. Planejamento composto central 2^3 (CCD).....	42
4.5. Validação dos métodos de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade e de extração em bloco digestor	42
4.5.1. Linearidade.....	42

4.5.2. Efeito de matriz	45
Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni e Pb	46
4.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação	46
4.5.4. Veracidade e precisão.....	47
4.6. Otimização da geração de hidretos para determinação sequencial de As e Se.	47
4.7. Extração assistida por ultrassom.....	48
4.7.1. Otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo <i>cup horn</i>	48
4.7.2. Análise de fertilizantes orgânicos pelo procedimento otimizado de extração assistida por ultrassom.....	50
4.8. Validação do método de extração assistida por ultrassom e do método para determinação de As e Se	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Caracterização físico-química das amostras.....	52
5.2. Desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos por FS FAAS após procedimentos de digestão assistido por radiação micro-ondas em forno com cavidade	54
5.2.1 Seleção da amostra para a otimização e condições pré-estabelecidas	54
5.2.2. Avaliação quantitativa dos resíduos sólidos provenientes das amostras de fertilizantes após diferentes procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas.....	55
5.2.3. Avaliação dos diferentes procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas quando às concentrações determinadas	58
5.2.4. Avaliação das interferências químicas sobre a determinação de Cr	63
5.2.5. Redução do tempo do programa de aquecimento do forno de micro-ondas...66	
5.3. Desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos por FS FAAS empregando bloco digestor	67
5.3.1 Avaliação do extrator por meio de procedimento univariado.....	68
5.3.2. Planejamento fatorial completo 2^4 com repetição no ponto central	70
5.3.3. Planejamento composto central 2^3 (CCD)	72
5.4. Validação dos métodos analíticos empregando forno de micro-ondas com cavidade e bloco digestor.....	75

5.4.1. Linearidade.....	75
5.4.2. Efeito de matriz	80
5.4.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	84
5.4.4. Veracidade e precisão.....	86
5.4.5. Métodos desenvolvidos (micro-ondas e bloco digestor) aplicados para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de fertilizantes orgânicos.....	88
5.4.5. Conclusão	91
5.5. Desenvolvimento de método analítico para determinação sequencial de As e Se em fertilizante orgânico empregando FS HG AAS e extração em bloco digestor	91
5.5.1. Avaliação das condições de geração de hidretos: aquecimento para pré- redução do Se e ordem da adição de KI.	92
5.5.2. Avaliação das concentrações de HCl e NaBH ₄	97
5.5.3. Estudo da interferência mútua e Adição/Recuperação.....	100
5.5.4. Avaliação das concentrações de HCl com MRC	101
5.5.5. Parâmetros de desempenho do método	103
5.5.5.1. Linearidade.....	103
5.5.5.2. Efeito de matriz	106
5.5.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação	108
5.5.5.4. Precisão e veracidade	108
5.5.5.5. Aplicação do método	109
5.5.6 Conclusão	109
5.6. Desenvolvimento de método para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes orgânicos por FS FAAS empregando extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo <i>cup-horn</i>	110
5.6.1. Otimização do procedimento.....	110
5.6.1.1. Planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻²	110
5.6.1.2. Planejamento composto central 2 ³	113
5.6.2. Parâmetros de desempenho do método analítico	115
5.6.3. Aplicação do método desenvolvido para analisar de fertilizantes orgânicos .	117
5.6.4. Conclusão	119
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

1. INTRODUÇÃO

A falta de auto-suficiência brasileira na produção de fertilizantes faz com que as importações fiquem em torno de 60% dos produtos que chegam aos agricultores. Situação econômica pouco confortável para um país que, atualmente, é um dos grandes destaques no cenário agrícola mundial¹.

Neste contexto, o uso de resíduos orgânicos de origem agroindustrial, urbana ou industrial na produção de fertilizantes orgânicos pode contribuir para redução da dependência externa de alguns insumos químicos, uma vez que, os resíduos orgânicos contêm nutrientes e altos teores de matéria orgânica. Embora, de modo geral, os nutrientes presentes nos fertilizantes orgânicos estejam em baixas concentrações quando comparados aos fertilizantes inorgânicos e ainda apresentem baixa disponibilidade no momento da aplicação, a matéria orgânica (MO) também pode contribuir para a redução da quantidade de nutrientes requeridas por meio de adubação. Na maioria dos casos, a aplicação de MO leva à melhoria substancial das propriedades físico-químicas do solo, como por exemplo, aumento da estruturação do solo, proporcionando maior capacidade de retenção de água e maior aeração do solo, aumento da capacidade de reter calor e aumento da capacidade de troca catiônica (CTC). Tais alterações nas características do solo culminam na redução das perdas de nutrientes por lixiviação, uma vez que os solos apresentarão maior capacidade de reter os nutrientes na forma trocável e maior capacidade de reter água. Além disso, os nutrientes que inicialmente não estavam biodisponíveis no momento da aplicação podem ser parcialmente disponibilizados por meio de transformações químicas da MO, causadas pela atividade dos micro-organismos ao longo do tempo.

Por outro lado, a possibilidade da presença de contaminantes inorgânicos, tais como As, Cd, Pb, Hg e Ni em alguns desses resíduos faz com que seu uso seja monitorado com rigor, uma vez que poderia afetar a saúde da população. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelas especificações dos fertilizantes orgânicos simples² e por estabelecer os limites máximos de contaminantes admitidos nestes produtos³.

Para a determinação de micronutrientes em fertilizantes orgânicos, o manual de métodos oficiais para análise de fertilizantes do MAPA⁴ contempla um método analítico que envolve a calcinação da amostra em mufla, à temperatura de 500-

550°C por uma hora e a solubilização das cinzas com ácido clorídrico em duas etapas. Neste caso, as principais desvantagens do método são a alta temperatura empregada e o tempo de análise. Para a determinação de contaminantes inorgânicos em fertilizantes orgânicos, o manual ainda não contempla métodos oficiais do Brasil. Entretanto, o MAPA reconhece por meio da instrução normativa nº 24, de 20 de junho de 2007⁵, alguns métodos analíticos da Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA - *United State Enviroment Protection Agency*) para a determinação desses contaminantes. Especificamente os métodos: USEPA 3050-B⁶: digestão ácida de sedimentos, lodos e solos em bloco digestor; USEPA 3051-A⁷: digestão ácida de sedimentos, lodos, solos e óleos em forno de micro-ondas com cavidade; USEPA 7061-A⁸: arsênio (absorção atômica, geração de hidreto); e USEPA 7741-A⁹: selênio (absorção atômica, geração de hidreto). Além desses, o MAPA também reconhece um método analítico do Departamento de Agricultura e Serviços aos consumidores da Flórida (FDACS – *Florida Department of Agriculture and Consumer Services*), o método FM 902¹⁰: extração ácida em bloco digestor para fertilizante e determinação simultânea de elementos traços por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). De modo geral, os métodos mencionados apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, o fato de não serem específicos para as matrizes de fertilizantes orgânicos, consumirem grandes volumes de ácido concentrado (superiores a 10,0 mL) e requererem muitas etapas para o preparo da amostra.

Desde modo, métodos analíticos específicos para as matrizes de fertilizantes orgânicos, que apresentem parâmetros de desempenho adequados e que sejam preferencialmente rápidos, seguros e econômicos, são importantes para garantir a conformidade com a legislação vigente.

Dentro deste contexto, a etapa de preparo de amostra é crucial, pois é a etapa que requer mais tempo e é onde a amostra é extensivamente manipulada, afetando significativamente a frequência analítica e podendo alterar a veracidade e precisão do método. A depender das condições experimentais (temperatura, concentração dos reagentes e tipo de sistema usado, fechado ou aberto) empregadas nesta etapa, os riscos de perdas por volatilização e/ou contaminações em função da adição de reagentes poderão ser minimizadas.

Outro ponto importante que envolve o desenvolvimento de métodos é a questão da validação, pois nesta etapa são determinados parâmetros que permitem avaliar se o método desenvolvido é adequado para seu propósito.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos para determinação de micronutrientes e contaminantes inorgânicos, através da decomposição por via úmida em sistema fechado (forno de micro-ondas com cavidade), extração em sistema aberto com bloco digestor e extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo *cup-horn*. A espectrometria de absorção atômica sequencial com atomização em chama (FS FAAS – *Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometry*) foi empregada para a quantificação dos elementos Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn. Para a determinação de As e Se foi usada a espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS – *Hidride Geration Atomic Absorption Spectrometry*), após o procedimento de extração em bloco digestor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos rápidos, simples, de baixo custo e que apresentem precisão e veracidade adequadas para a determinação de micronutrientes e contaminantes inorgânicos presentes em resíduos orgânicos e fertilizantes orgânicos comerciais.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar as amostras estudadas neste trabalho por meio dos parâmetros: pH, condutividade elétrica (CE), carbono total (C-Total), matéria orgânica (MO), nitrogênio total (N-Total) e relação C/N;
- Desenvolver, otimizar de forma univariada e validar um método analítico para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb e Zn empregando forno de micro-ondas com cavidade para decomposição das amostras e espectrometria de absorção atômica com chama no modo sequencial (FS FAAS) para quantificação;
- Desenvolver, otimizar com técnicas multivariadas e validar um método analítico para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb e Zn empregando extração ácida em bloco digestor como procedimento de preparo das amostras e quantificação por FS FAAS;
- Desenvolver, otimizar com técnica univariada e validar método analítico para determinação sequencial de As e Se por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS) após extração ácida em bloco digestor;
- Desenvolver, otimizar com técnicas multivariadas e validar método analítico para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn empregando extração em

sonoreator do tipo cup-horn como procedimento de preparo das amostras e quantificação por FS FAAS.

- Aplicar os métodos desenvolvidos para o controle de qualidade de fertilizantes orgânicos comerciais e resíduos orgânicos usados como matéria-prima na produção de fertilizantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Consumo de fertilizantes no Brasil

Os solos brasileiros possuem, em sua maioria, limitações de fertilidade natural, tornando-se altamente produtivos quando utilizados com manejo técnico, o qual inclui, além de outras práticas, o uso intensivo de fertilizantes. Esses são compostos por macronutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio), macronutrientes secundários (cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (especialmente boro, zinco, enxofre, cloro, cobre, ferro e manganês) e são capazes de aumentar as características de fertilidade dos solos para os níveis exigidos pelos cultivares, tornando-os mais produtivos¹¹. Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), o Brasil é altamente dependente da importação de fertilizantes, a qual, atualmente, corresponde cerca de 60% dos produtos que chegam aos consumidores finais, colocando o Brasil entre os maiores importadores de fertilizantes do mundo. A produção e a importação de fertilizantes em toneladas, referentes aos últimos três anos, são apresentados na Figura 1¹.

Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a demanda brasileira de fertilizantes será de 30,6 milhões de toneladas em 2016 e, se não houver incremento na capacidade nacional de produção, cerca de 70% da demanda interna de fertilizantes será mantida com importações¹². Desta maneira o aumento da produção interna de fertilizantes torna-se extremamente necessário, caso contrário o preço dos produtos agrícolas continuará sendo altamente dependente dos preços estabelecidos pelos países exportadores de fertilizantes e/ou matéria-prima.

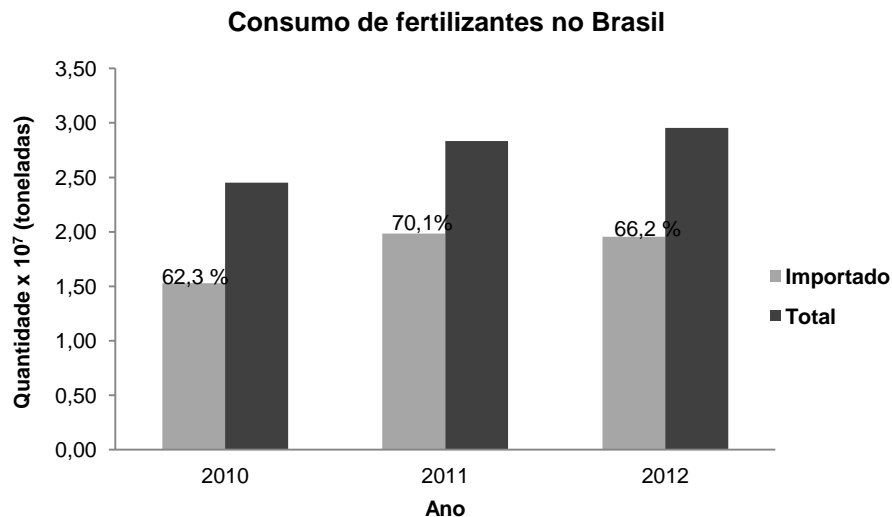


Figura 1. Consumo de fertilizantes (total e importado) nos últimos três anos¹.

3.2. Fertilizantes orgânicos: Efeitos nos solos

Os fertilizantes orgânicos, além de contribuírem no suprimento de alguns nutrientes necessários aos vegetais, atuam principalmente como condicionadores do solo, ou seja, promovem melhoria das propriedades físico-químicas do solo, aumentando a capacidade de retenção de água, a condutividade elétrica, a porosidade total, a resistência à erosão hídrica e eólica, a capacidade de retenção de cátions e o pH, além de reduzir a densidade do solo e o grau de compactação^{13, 14}. Tais alterações nas propriedades físico-químicas, proporcionadas pela presença da matéria orgânica, somada ao fornecimento de nutrientes, estimulam o crescimento radicular e, conseqüentemente, aumentam a produção de biomassa¹⁵.

Na literatura encontram-se relatos de experimentos que confirmam a ação da matéria orgânica fornecida aos solos por meio da aplicação de resíduos orgânicos como fertilizantes.

Tejada e Gonzalez¹⁶ ao avaliarem o manejo de solos empregando-se resíduo de algodão e esterco de galinha, por um período de quatro anos, de modo geral, verificaram que ocorreu redução da instabilidade de agregados, da densidade e da perda dos nutrientes, carbono orgânico, NO_3^- , NH_4^+ , P e K, por água de chuva simulada. Leroy e colaboradores¹⁴ também verificaram aumento significativo da estabilidade dos agregados e da condutividade elétrica quando se utilizou os resíduos orgânicos (esterco de boi, mistura de esterco de boi com resíduos vegetais, mistura de restos de frutas com resíduos vegetais e podas de jardins) como

condicionadores do solo pelo período de um ano. Alcantara et al.¹⁷ concluíram que a aplicação de lodo doméstico e industrial a um latossolo brasileiro resultou no aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) e dos teores de P e N. Singh e co-autores¹⁸ avaliaram o efeito de fertilizantes orgânico e inorgânico na fitodisponibilidade de metais pesados em solo irrigados com efluente de estação de tratamento de esgoto por um período de 20 anos. Para tal, três formas de adubação (esterco bovino, fertilizante inorgânico comercial (NPK) e mistura de esterco bovino + uréia) aplicadas à plantação de beterraba foram comparadas com o controle sem nenhum tipo de adubação. Os autores concluíram que aplicação de esterco sozinho ou em combinação com uréia são formas de manejo adequadas para solos irrigados com efluentes, uma vez que tais tratamentos proporcionaram uma menor fitodisponibilidade de Cd, Cu, Pb, Zn, Mn, Ni e Cr, além de requererem menor investimento.

Assim, fica evidente que a aplicação de matéria orgânica, de maneira controlada, como forma de manejo de áreas cultivadas promove o condicionamento dos solos.

3.3. O uso de resíduos orgânicos como fertilizantes

Embora o uso de fertilizantes produzidos a partir de resíduos orgânicos após simples compostagem seja uma prática comum entre muitos agricultores, tal prática ainda não alcançou o mercado nacional, devido ao fato de apresentarem baixos teores de nutrientes e baixa disponibilidade, quando comparado aos fertilizantes inorgânicos. Estercos de boi¹⁹⁻²¹, de porco¹⁹⁻²³, de ovelha²⁰, de galinha¹⁹⁻²⁵, de pato²⁴ e de codorna²¹, resíduos da indústria de alimento^{23, 26-28}, lodo doméstico^{21-23, 26} e industrial, compostos provenientes de resíduos de madeira²³, farelo de soja^{19, 23, 29} e resíduos de ervilha¹⁹ são alguns dos resíduos orgânicos compostados usados como fertilizantes orgânicos.

A aplicação desses resíduos como fertilizante orgânico, além de promover o condicionamento do solo, resulta em redução de gastos associados ao acondicionamento legal desses resíduos e a prevenção de possíveis impactos ambientais causados por descartes inadequados. Contudo, é necessário usar tecnologia para tornar esses produtos mais atrativos aos consumidores. No Brasil, já existem parcerias com empresas privadas a fim de conseguir produzir fertilizantes a

partir de resíduos industriais com apoio do governo federal³⁰. Tal cenário indica que o uso de resíduos tende a aumentar substancialmente nos próximos anos e, proporcionalmente, o risco de acúmulo de contaminantes inorgânicos em áreas cultiváveis. O risco existe se esta prática não for rigorosamente monitorada quanto aos teores de contaminantes permitidos. Pois, embora a possibilidade de se encontrar metais tóxicos em resíduos gerados a partir de restos de vegetais, frutas, alimentos, bagaço de cana, entre outros, seja pequena, o mesmo não pode ser esperado de resíduos gerados a partir da compostagem de lixo urbano e resíduos gerados em estações de tratamento de lodo de esgoto doméstico e industrial. O fato de alguns resíduos apresentarem teores de elementos tóxicos, como por exemplo, Cd, Cr, Pb e Zn acima do máximo permitido pela legislação vigente³, requer que o uso como fertilizante seja constantemente monitorado³¹. Principalmente, quando se leva em consideração que os contaminantes inorgânicos não são degradados ao longo do processo de compostagem e que, frequentemente, tornam-se mais concentrados, devido à degradação microbiana e à perda de carbono e água, comparando ao resíduo de partida³².

Silva e co-autores³³ a partir de um experimento de campo realizado em Jaguariúna, estado de São Paulo, Brasil, verificaram aumento dos níveis de Cu, Zn, Cr, Mo, Ni, Pb e Cd na camada superficial do latossolo (0 - 20 cm) devido à correção do solo com diferentes quantidades de lodo de esgoto de diversas origens.

Alcantara e colaboradores¹⁷ ao avaliarem os efeitos da aplicação de lodo de esgoto a um latossolo destinado à lavoura de milho, por um período de cinco anos, constataram aumento significativo das concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn presentes em folhas e grãos de milho; aumento das concentrações de Cr, Cu, Ni e Zn no solo e alteração na distribuição dos elementos nos diferentes compartimentos do solo, uma vez que os teores de metais na fase labil aumentaram com a taxa de aplicação, confirmando o fornecimento de alguns micronutrientes (Cu, Fe, Mn, e Zn biodisponíveis), aumento da concentração de elementos tóxicos (Cr e Ni) no solo e alteração das propriedades físico-químicas do solo.

Nachman et al.³⁴ compararam os teores de arsênio presentes em amostras de fertilizantes orgânicos pelotizados produzidos a partir de resíduos de granja (FPRG) e lodo de esgoto (FPLE). As concentrações médias de As para seis amostras de FPRG variaram de 15,4 a 25,2 mg kg⁻¹, enquanto que as concentrações de As para quatro amostras de FPLE variaram de 3,1 a 5,1 mg kg⁻¹. O fato da concentração

média de As nas amostras de FPRG ser cinco vezes maior que a concentração média apresentada pelas amostras FPLE é explicado pelo uso de compostos orgânicos que contêm As em sua estrutura para combater parasitas intestinais e promover crescimento e pigmentação das aves. De acordo com a legislação vigente no Brasil, o limite máximo estabelecido para As em fertilizantes orgânicos é 20 mg kg⁻¹, de forma que das seis amostras de FPRG, duas apresentaram concentrações superiores a esse limite e, portanto, não poderiam ser aplicadas ao solo.

3.4. Legislação

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelas definições, classificações, garantias e especificações referentes aos fertilizantes orgânicos e às matérias-primas empregadas em sua produção, bem como registros, rotulagem e embalagens dos produtos finais². Na Tabela 1 é apresentada a relação dos fertilizantes orgânicos simples reconhecidos pela legislação brasileira com suas respectivas especificações, já na Tabela 2 são apresentadas as especificações dos fertilizantes orgânicos mistos.

Tabela 1. Especificações dos fertilizantes orgânicos simples²

Orgânico simples processado	Umidade % máxima	pH mínimo	C orgânico ¹ % mínima	N % mín.	CTC ¹	CTC/C ¹
Estercos e camas	40		20	1		
Tortas vegetais	40		35	5		
Turfa	40		15	0,5		
Linhita	40		20	0,5		
Leonardita,	40	Conforme	25	0,5	Conforme	Conforme
Vinhaça ³	-	Declarado ²	3	-	Declarado ²	Declarado ²
Parâmetros de referência para outros fertilizantes orgânicos simples	40		15	0,5		

¹Valores expressos em base seca, umidade determinada a 65°C.

²É obrigatória a declaração no processo de registro de produto.

³Deverá ser declarado o teor de potássio.

CTC – Capacidade de troca catiônica.

Tabela 2. Especificações dos fertilizantes orgânicos mistos²

Garantia	Misto/Composto				Vermicomposto
	Classe				
	A	B	C	D	Classes A, B, C e D
Umidade (Máxima)	50	50	50	70	50
N Total % (Mínimo)				0,5	
Carbono orgânico ¹			15		10
CTC ^{1,2}			Conforme declarado		
pH (Mínimo)	6,0	6,0	6,5	6,0	6,0
Relação C/N (Máxima)			20		14
Relações CTC/C ^{1,2}			Conforme declarado		
Outros nutrientes			Conforme declarado		

¹Valores expressos em base seca, umidade determinada a 65°C.

²É obrigatória a declaração no processo de registro do produto.

As especificações previstas pela legislação referentes aos teores mínimos de macronutrientes secundários e micronutrientes presentes nos fertilizantes orgânicos sólidos e líquidos reconhecidos pelo MAPA são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Teores mínimos de macronutrientes secundários e micronutrientes especificados pelo MAPA²

Nutriente	Tipo do fertilizante orgânico			
	Teor total mínimo (%)		Teor solúvel em H ₂ O (%)	
	Aplicação no solo		Via foliar, fertirrigação e hidroponia	
	Sólido	Fluido	Sólido	Fluido
Cálcio (Ca)	1	0,5	0,5	0,3
Magnésio (Mg)	1	0,5	0,5	0,3
Enxofre (S)	1	0,5	0,5	0,3
Boro (B)	0,03	0,01	0,02	0,01
Cloro (Cl)	0,1	0,1	0,1	0,1
Cobalto (Co)	0,005	0,005	0,005	0,005
Cobre (Cu)	0,05	0,05	0,05	0,05
Ferro (Fe)	0,2	0,1	0,1	0,02
Manganês (Mn)	0,05	0,05	0,1	0,02
Molibdênio (Mo)	0,005	0,005	0,02	0,005
Níquel (Ni)	0,005	0,005	0,005	0,005
Silício (Si)	1	0,5	0,5	0,05
Zinco (Zn)	0,1	0,05	0,1	0,05

Com relação aos contaminantes, uma das ações mais sérias adotadas pelos órgãos federais competentes no Brasil foi a publicação da Instrução Normativa SDA nº 27, de 05 de junho de 2006, onde foi estabelecido as concentrações máximas para agentes fitotóxicos (metais tóxicos, Tabela 4), patogênicos e pragas³.

Tabela 4. Limites máximos de contaminantes minerais admitidos em fertilizantes orgânicos³

Contaminante	Valor máximo admitido (mg kg ⁻¹)
Arsênio (As)	20,00
Cádmio (Cd)	3,00
Chumbo (Pb)	150,00
Cromo (Cr)	200,00
Mercúrio (Hg)	1,00
Níquel (Ni)	70,00
Selênio (Se)	80,00

Para atender à legislação, os fertilizantes têm que passar por processos de análise, nos quais tanto o teor de nutrientes quanto de contaminantes sejam determinados com adequada precisão e veracidade. Essa demanda requer o desenvolvimento de métodos que apresentem versatilidade, rapidez e baixo custo. Considerando-se a grande diversidade de materiais utilizados como fertilizantes orgânicos, a etapa de preparo da amostra deve ser cuidadosamente otimizada e criticamente avaliada.

3.5 Etapa de preparo de amostra

Dentro da sequência analítica; constituída basicamente das etapas: definição do problema analítico, escolha do método, amostragem, preparo de amostras, determinação da espécie química de interesse e interpretação dos resultados; a etapa de preparo de amostras é a mais crítica, uma vez que é a etapa que requer mais tempo e é onde a probabilidade de ocorrência de erros é maior³⁵. Estima-se que essa etapa requer, em média, mais de 60% do tempo total dispensado à análise e seja responsável por 20 a 30% dos erros analíticos³⁶.

Entende-se por preparo de amostra toda e qualquer manipulação da amostra desde o término da amostragem até a determinação do analito, como por exemplo, procedimentos de secagem e moagem, dissolução com água ou com outros

reagentes apropriados (com ou sem aquecimento), diluições, pré-concentração por meio de evaporação de solventes ou extrações, conversão do analito em espécie química apropriada, entre outras. A seleção do procedimento de preparo de amostra depende, da definição do problema analítico a partir do qual deve se considerar uma série de fatores, tais como: técnica empregada para a determinação, cujos limites de detecção e interferências são cruciais para a escolha do método de preparo; características da amostra; natureza química do analito; exatidão e precisão requeridas. Assim, antes de selecionar um determinado pré-tratamento é necessário ter o problema analítico bem definido, o que idealmente, deveria envolver o conhecimento, pelo menos parcial, da amostra³⁵.

A maioria das técnicas empregadas em análises químicas requer que o analito seja disponibilizado em uma solução compatível com o equipamento, salvo os casos, em que é possível a análise direta de amostras sólidas. Infelizmente, a maioria das amostras é insolúvel em água, sendo assim necessário o uso de ácidos ou misturas ácidas com aquecimento para conseguir a dissolução/decomposição da amostra. Devido à ampla variedade de matrizes com características bem diferentes, mais ou menos resistentes aos ataques ácidos, pesquisadores buscam encontrar o método mais apropriado para cada situação, sempre que possível, objetivando redução de custos e tempo, minimização da contaminação e perdas por volatilização e segurança dos analistas.

Com relação à composição química das amostras, estas são classificadas em: inorgânicas, orgânicas e mistas (fração inorgânica e orgânica). As análises que objetivam a determinação do teor total, frequentemente, requerem a dissolução completa da amostra. Para as amostras orgânicas e mistas, os procedimentos de decomposição são divididos em via seca e via úmida. Os procedimentos por via seca são constituídos normalmente de duas etapas: queima da matéria orgânica (tradicionalmente feito em muflas) e dissolução das cinzas (fração inorgânica) por meio de ácidos³⁷. Apesar da simplicidade, esse procedimento apresenta como desvantagem grande possibilidade de perdas do analito por volatilização em função das altas temperaturas associadas à etapa de queima. Deste modo, decomposições por via úmida, são preferidas sempre que possível, uma vez que neste tipo de decomposição são empregadas misturas ácidas oxidantes com aquecimento em temperaturas mais baixas que as empregadas na calcinação.

Os ácidos comumente empregados nas decomposições apresentam grau de periculosidade e propriedades (oxidante, redutora e complexante) diferentes. Desta maneira, a escolha de um em detrimento ao outro, ou ainda o uso de misturas vai depender das características da amostra e propriedades químicas das espécies de interesse. Na Tabela 5 são apresentados os principais ácidos e misturas com suas propriedades e limitações. Além das associações de dois ou mais ácidos, são empregados outros reagentes com finalidade de auxiliar a decomposição. Dentro desta categoria estão os agentes oxidantes (H_2O_2 , Br_2 e $KClO_3$), eletrólitos inertes (Na_2SO_4 , K_2SO_4 ou $(NH_4)_2SO_4$) com intuito de aumentar a temperatura de ebulição do ácido, agentes complexantes (ácido tartárico, cítrico e láctico) para evitar que íons metálicos sejam precipitados e por último, catalisadores para aumentar a velocidade de dissolução³⁵.

O aquecimento associado às decomposições por via úmida pode ser efetuado em sistemas abertos (bloco digestor e forno de micro-ondas com radiação focalizada) ou em sistemas fechados (forno de micro-ondas com cavidade e bombas de digestão)³⁵. A energia requerida como parte das condições experimentais para a decomposição da amostra pode ser fornecida por aquecimento condutivo ou aquecimento por radiação³⁵.

Na Figura 2 é apresentado um esquema representativo de como ocorre o aquecimento condutivo e com radiação eletromagnética. No primeiro caso o aquecimento ocorre de fora para dentro por meio de uma fonte externa de energia térmica, como por exemplo, bloco digestor, placas de aquecimento e mufla. Esse tipo de aquecimento é considerado indireto e lento por primeiro ser necessário aquecer o recipiente para, só depois, por processos de condução e convecção, ocorrer o aquecimento da amostra (Figura 2. a).

Nos segundo caso, o fornecimento de energia para a decomposição da amostra se dá por meio do emprego de ondas eletromagnéticas, no caso micro-ondas. Neste caso, o aquecimento ocorre de dentro para fora por ser resultado da interação onda e espécies presentes no meio de propagação, sendo, portanto um aquecimento direto e rápido (Figura 2. b).

Tabela 5. Limitações e propriedades dos ácidos e misturas comumente empregados em dissolução de amostras³⁵

Ácido ou mistura ácida	Propriedade	Limitações
HNO ₃ (65 a 69 % m v ⁻¹)	Oxidante	Elementos como Al, B, Cr, Ga, In, Nb, Ti, Ta, Th, Zr e Hf são passivados por meio da formação de óxidos insolúveis se for atacado diretamente o metal
H ₂ SO ₄ (98% m v ⁻¹)	Oxidante e desidratante	Formação de sulfatos levemente solúveis (CaSO ₄) e insolúveis (BaSO ₄ , SrSO ₄ e PbSO ₄), além da formação de sulfatos duplos com metais em estados de oxidação alto (Cr ³⁺ , Al ³⁺ , terras raras).
HClO ₄ (60 a 72% m v ⁻¹)	Altamente oxidante	Formação dos percloratos KClO ₄ , RbClO ₄ e CsClO ₄ insolúveis. Risco de explosões.
HCl (37% m v ⁻¹)	Complexante, produz complexo (íons cloretos) com constante de formação grande com vários íons metálicos.	Não possui capacidade oxidante significativa, formação de cloretos pouco solúveis (PbCl ₂) e insolúveis (Hg ₂ Cl ₂ , AgCl e TlCl) em água.
HF (36 % m v ⁻¹)	Complexante, formação de fluorocomplexos com muitos elementos.	Vidraria não pode ser usada quando estiver usando o HF, em função da reação com óxido de silício.
HNO ₃ :HCl (1:3, água régia e 3:1, água régia invertida)	Oxidante e complexante. Os íons cloretos são responsáveis pela formação de complexos, já o cloro molecular e o cloreto de nitrosila, formados pela oxidação do HCl pelo HNO ₃ , são responsáveis pela oxidação.	As mesmas dos ácidos formadores da mistura. Além de poder atacar eletrodos de platina.

Por esse motivo procedimentos assistidos por micro-ondas podem ser mais vantajosos que os procedimentos com aquecimento condutivo, uma vez que podem contribuir para a redução do tempo de análise^{35, 38}.

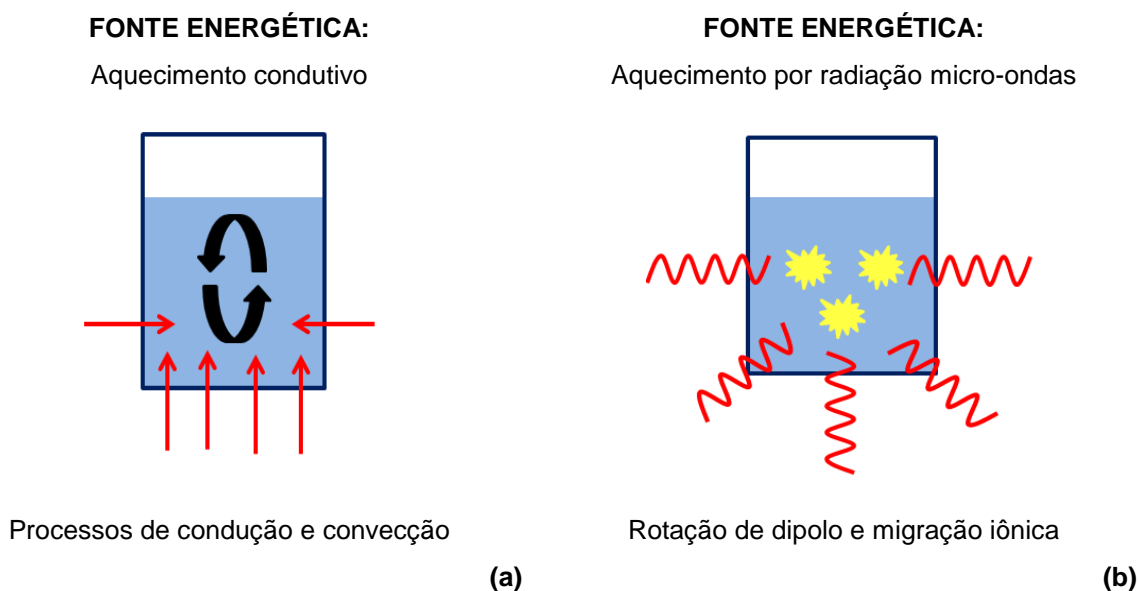


Figura 2. Esquema representativo do aquecimento condutivo (a) e aquecimento por radiação micro-ondas (b), adaptação³⁵.

A radiação micro-ondas, atualmente, é a mais empregada em procedimentos de decomposição de amostras. São ondas eletromagnéticas não ionizantes, constituídas por campos elétricos e magnéticos que oscilam com o tempo em frequência que pode variar de 300 a 300000 MHz, sendo a frequência utilizada em fornos igual a 2,45 GHz. Em função dos campos, a radiação micro-ondas pode interagir com o meio no qual se propaga por dois mecanismos: migração iônica e rotação de dipolo (Figura 3), sendo que a migração iônica é resultado da interação da onda com os íons dissolvidos na solução e a rotação de dipolo é resultado da interação da onda com moléculas que apresentam momento de dipolo permanente ou induzido. O aquecimento a partir dessas interações é explicado da seguinte forma: na Figura 3 (a.1 – a.3) é mostrada uma sequência de três momentos, para um íon carregado negativamente sob influência do campo elétrico da onda. No primeiro momento observa-se que o íon é atraído pela porção positiva do campo elétrico, no segundo momento o mesmo íon é repelido pela porção negativa do campo elétrico, já no terceiro momento o íon é atraído novamente. Uma vez que no meio reacional também existem íons com carga positiva e que estes se movem em

sentido oposto aos íons negativos, o resultado desta agitação é o atrito e o consequente aumento de temperatura^{35, 39}. Já para o caso da rotação de dipolo, na Figura 3 (b.1 – b.3) também é apresentada uma sequência de três momentos para uma molécula de água sob influência do campo elétrico da onda.

No início, o momento de dipolo da molécula de água está alinhado com o campo; em seguida, o momento de dipolo gira numa tentativa de seguir o campo, por último, o momento de dipolo gira em sentido oposto para tentar alinhar com o campo. Neste processo durante o alinhamento das moléculas com o campo ocorre absorção de energia da onda, porém cada vez que o campo é alternado, ocorre uma tendência das moléculas voltarem ao estado de desordem, neste momento, denominado tempo de relaxação ocorre dissipação de energia absorvida na forma de calor aumentando a temperatura do meio^{35, 39}.

Diante das diferentes possibilidades de decomposição por via úmida cabe ao químico selecionar o método mais adequado levando em consideração, tipo de amostra, características do analito e disponibilidade de equipamentos.

Com relação ao desenvolvimento de métodos para análise de fertilizantes orgânicos / resíduos orgânicos, a maioria dos trabalhos, relatados na literatura, foca somente em lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto doméstico e industrial. Poucos são os trabalhos que avaliam a decomposição de um grupo de resíduos orgânicos por diferentes métodos. Em trabalhos que estudam a viabilidade da aplicação à agricultura, a caracterização desses resíduos quanto à composição química inorgânica, geralmente é feita por meio de métodos oficiais para amostras com matrizes orgânicas, o que não significa que seja o método mais adequado.

Sastre e colaboradores⁴⁰ avaliaram diferentes procedimentos para a determinação de Cd, Cu, Pb e Zn presentes em amostras ambientais. Tal estudo envolveu procedimentos de digestão total assistida por micro-ondas focalizada e com mistura ácida (HNO_3 , HF, HClO_4 e H_2O_2), extração com água régia e extração com HNO_3 em bloco digestor, sendo que as duas extrações foram realizadas com uso de condensador. Ao compararem a eficiência dos procedimentos de extração com a digestão total concluíram que, para amostras com baixo teor de matéria orgânica, os resultados da digestão total e da extração com água régia foram semelhantes e que, para amostras com teores de matéria orgânica superiores a 70%, o procedimento de extração com HNO_3 pode ser usado em vez da digestão total assistida com micro-ondas.

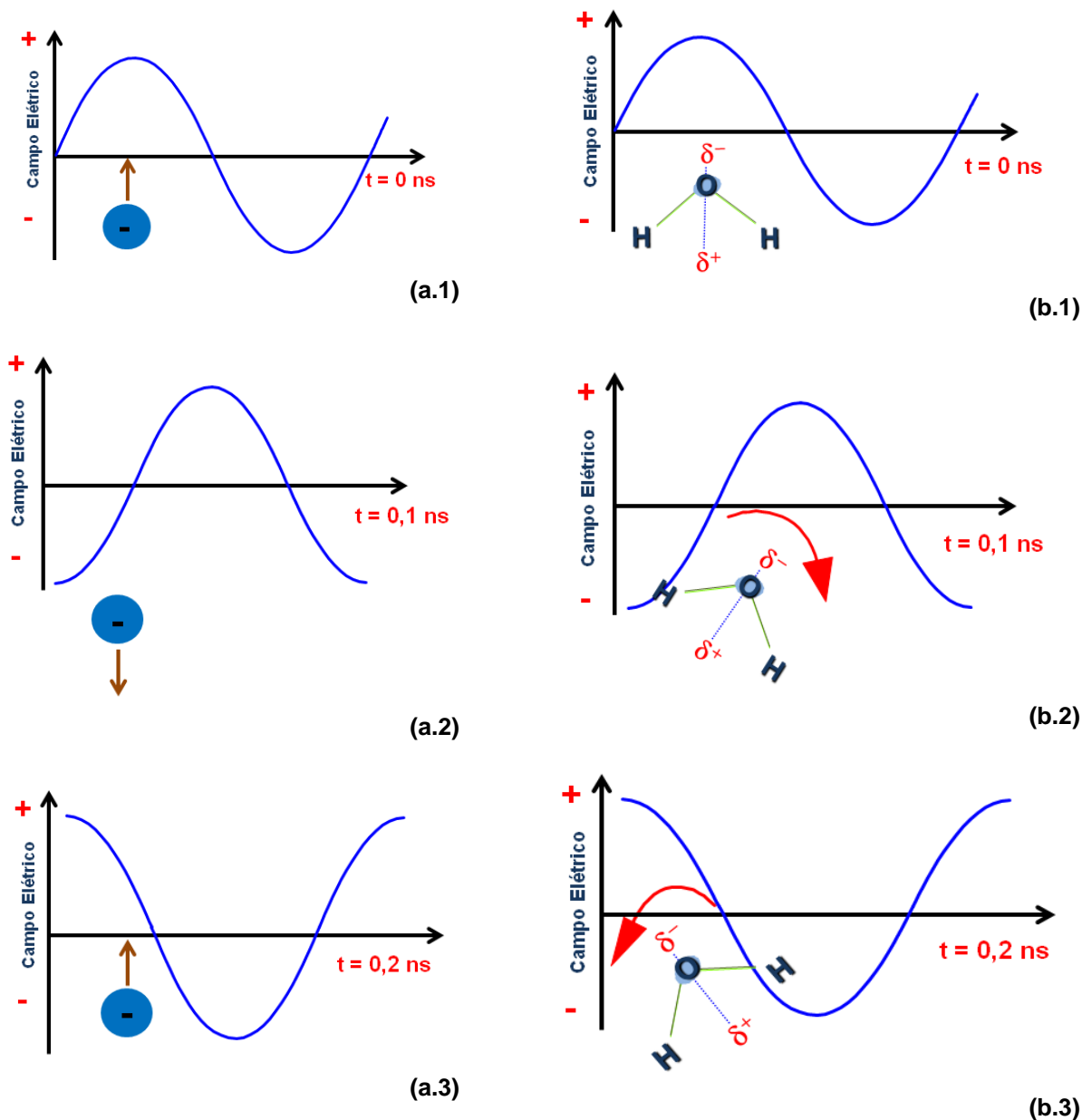


Figura 3. Esquema representativo da interação das micro-ondas com os componentes da mistura reacional: migração iônica (a.1 - a.3) e rotação de dipolo (b.1 - b.2), adaptação³⁵.

Hseu²³ determinou a concentração dos metais Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn presentes em nove resíduos (esterco suíno, cama de aviário, resíduos alimentares, lodo de esgoto municipal, farelo de soja, resíduos de madeira, farinha de osso e guano) obtidas por quatro métodos de digestão (digestão com HNO₃, digestão nítrico-perclórica, digestão com H₂SO₄ e digestão em forno mufla com dissolução das cinzas com HNO₃ e HCl). A digestão com HNO₃ apresentou os melhores resultados para a maioria dos casos e, portanto foi o método recomendado pelo

autor. A digestão com H_2SO_4 não mostrou-se eficiente para o caso do Pb. Já a digestão nítrico-perclórica, além de apresentar maior risco aos analistas, apresentou os menores teores determinados.

Melo e colaboradores²¹ estudaram a influência da massa de amostra (100 e 200 mg) e diferentes procedimentos de digestão (nítrico-perclórica, digestão com água régia, digestão em forno de micro-ondas e em forno tipo mufla com dissolução das cinzas com HNO_3) na recuperação de P, K, Ca, Mg e S presentes em resíduos de diversas origens (esterco bovino e suíno, esterco de galinha e de codorna, lodo de esgoto, composto e material húmico). Neste trabalho, concluíram que a digestão nítrico-perclórica com 200,0 mg de amostra proporcionou as maiores recuperações dos nutrientes na maioria dos casos avaliados. Por outro lado, a digestão com água régia levou aos menores conteúdos de nutrientes determinados.

Nachman e colaboradores³⁴ ao determinarem arsênio presente em amostras de fertilizantes pelotizados produzidos a partir de resíduos de granja ou lodo de esgoto, empregando dois procedimentos de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (200,0 mg de amostra + 10 mL de HNO_3 ou 200,0 mg de amostra + 9 mL HNO_3 + 3 mL de HF), constataram que, embora o procedimento em que se usou HF proporcionasse valores de concentração ligeiramente maiores que os proporcionados pelo outro procedimento, tais valores não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança, indicando que para o caso específico dessas amostras, o arsênio não estava retido na fração silicatada e que portanto o uso de HF é dispensável.

Os procedimentos de decomposição por via úmida, geralmente, empregam grandes volumes de ácidos concentrados (na ordem de mililitros), altas temperaturas e tempos de aquecimento longos. Entretanto, nem sempre é necessário destruir a matriz completamente, uma vez que, nestes casos, seria possível extrair quantitativamente o analito para a solução em contato com amostra. Nos procedimentos de extração são empregadas condições brandas, quando comparadas às utilizadas na decomposição por via úmida, resultando assim, em redução das perdas por volatilização, das contaminações e dos custos com reagentes. Porém, não é possível identificar quais são os casos em que uma extração seria suficiente para disponibilização quantitativa do analito somente a partir das características físico-químicas das amostras. É necessário que um número de amostras suficiente para representar uma classe seja analisado com um método

de decomposição total validado e com um método de extração. Após determinação do analito a partir dos dois métodos verifica-se se existe diferença significativa entre os valores de concentração determinados, no caso de ser confirmada diferença significativa, o método de extração avaliado não pode ser empregado para avaliar o teor total do analito na amostra.

Ultimamente, a radiação ultrassônica tem sido aplicada para aumentar a eficiência dos procedimentos de extração. A frequência empregada em tais procedimentos varia de 20 a 100 kHz. Dentro dessa faixa de frequência o ultrassom é capaz de alterar o meio no qual se propaga por um fenômeno denominado de cavitação acústica. O meio sobre a influência do ultrassom sofre variações de pressão, de modo que se houver redução de pressão suficiente durante a etapa de descompressão, ocorre rompimento das interações entre as moléculas do líquido, resultando em uma cavidade no interior do mesmo. Após a formação do núcleo, devido ao ciclo de compressão e descompressão a bolha pode crescer até o colapso em um momento de compressão (Figura 4). Durante o momento de descompressão, após a nucleação, moléculas gasosas dissolvidas no líquido são transferidas para interior das bolhas, região de menor pressão (Figura 5. a), no momento seguinte durante a compressão, parte das moléculas gasosas que entraram saem, mas a maioria permanece dentro da bolha de modo que com o passar do tempo ocorre crescimento da bolha até um diâmetro crítico (Figura 5. c). Na próxima etapa de compressão ocorre o colapso da bolha gerando ondas de choque responsáveis por colisões que elevam a temperatura e pressão a valores pontuais extremos (Figura 5. d). Estima-se que a temperatura pontual chegue próximo de 5500°C e a pressão próxima de 500 atm. Além disso, o resultado das colisões é a formação de radicais livres, aumentando desta forma a atividade reacional do meio.

Em sistemas heterogêneos, na interface sólido-líquido, a natureza da destruição das microbolhas de cavitação ocorre de forma diferente. O colapso ocorre de forma não simétrica. Nestes casos, as microbolhas próximas às superfícies sofrem maior pressão no sentido da superfície sólida, resultando na deformação das bolhas e, conseqüentemente, no momento do colapso, são formados microjatos direcionados para a superfície sólida^{35, 41}.

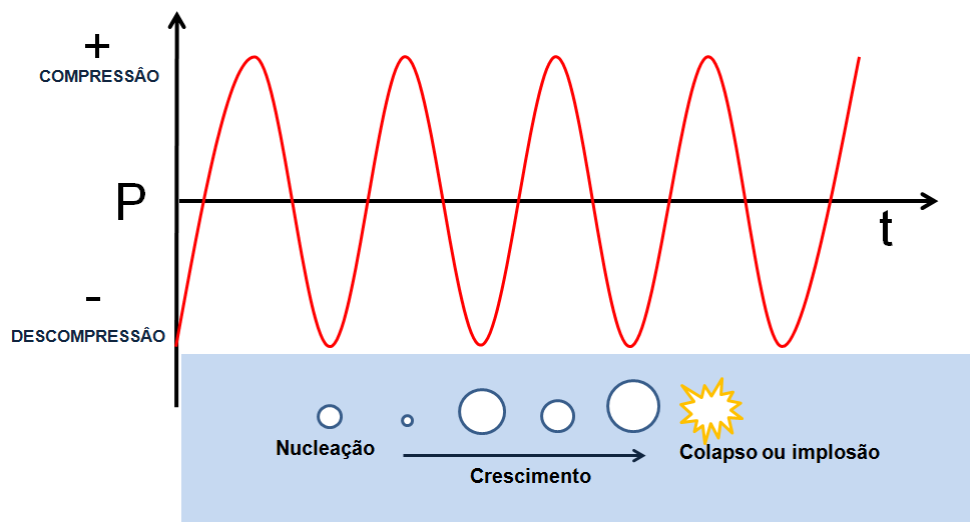


Figura 4. Dinâmica temporal de uma bolha de cavitação e sua relação com os ciclos de rarefação e compressão da onda acústica, adaptação³⁵.

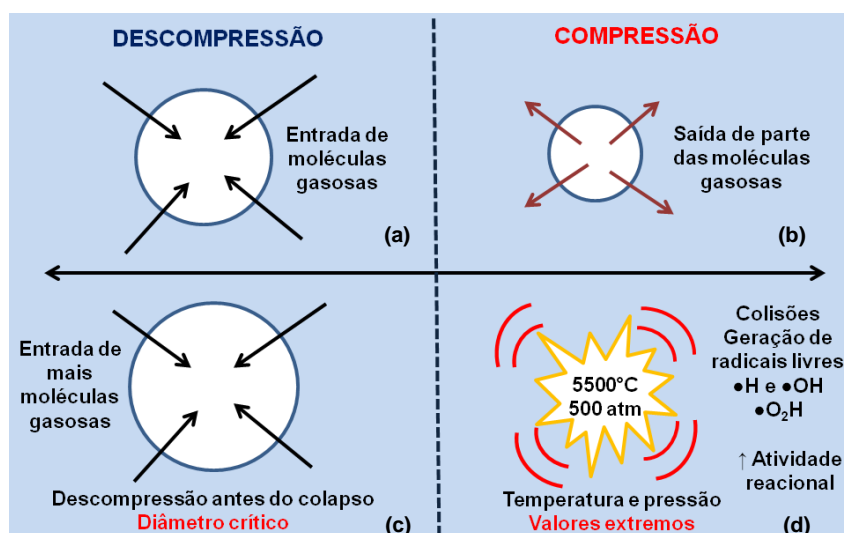


Figura 5. Colapso das bolhas no interior de um meio líquido.

Em função disto, a dissolução de amostras sólidas em solução ácida ou extração quantitativa a partir de suspensões da amostra finamente fragmentada, pode ser acelerada pelos seguintes efeitos sobre as partículas sólidas: pode ocorrer erosão de superfícies e fragmentação de partículas, aumentando a área reacional; devido às altas temperaturas pontuais pode ocorrer fusão da partícula, o que também aumenta área reacional; e redução de formação de filmes insolúveis, uma vez que em alguns casos as partículas sólidas podem ser encobertas por películas de óxidos insolúveis, cuja remoção facilita a penetração do ácido para o interior do

sólido. Além é claro, do aumento de espécies reativas, devido à formação de radicais livres que podem contribuir para a oxidação da matéria orgânica^{35, 41, 42}. Tais motivos são responsáveis por extrações quantitativas com condições brandas (soluções ácidas diluídas, pequenas quantidades de reagentes e amostras, temperatura e pressão ambientes) para muitos casos. Assim, de modo geral, os procedimentos assistidos por ultrassom estão de acordo com os princípios da química verde garantindo maior economia e menor impacto ao ambiente pelas quantidades de resíduos reduzidas⁴³.

Por esses motivos, vários estudos envolvendo a extração assistida por ultrassom de constituintes inorgânicos em amostras biológicas e ambientais⁴⁴⁻⁵⁴, comprimidos⁵⁵, combustível⁵⁶ e adubo inorgânico⁵⁷, têm sido relatados na literatura, o que confirma a eficácia do uso de ultrassom em procedimentos analíticos. Os procedimentos com ultrassom podem ser realizados com banho ultrassônico, com sonda ultrassônica ou com sonoreator do tipo *cup-horn*. A última opção apresenta-se como uma alternativa interessante para métodos analíticos, já que sua configuração, tubos fixos por um suporte, imersos na água do sonoreator; permite a sonicação de até oito amostras simultaneamente com distribuição homogênea da radiação ultrassônica, deste modo, garantindo a repetitividade das análises, o que, dificilmente, seria conseguido para o caso do banho de ultrassônico⁵¹. Além disso, procedimentos com sonoreator do tipo *cup-horn* diminuem o risco de contaminação quando comparados às extrações em meio ácido com sonda ultrassônica, levando em consideração que a sonda é introduzida diretamente na amostra e, portanto, pode ocorrer corrosão da sonda, o que nestes casos, inevitavelmente, resultaria na lixiviação de contaminantes para a amostra, especialmente quando são empregadas soluções de HF. Outro ponto a salientar refere-se ao fato do uso da sonda limitar consideravelmente a frequência analítica, já que as amostras têm de ser processadas individualmente^{51, 58}.

Como exemplos do emprego do ultrassom em procedimentos analíticos, seguem a descrição de três trabalhos: Hristozov e co-autores⁵⁹ avaliaram o uso de extração assistida por radiação ultrassônica (sonda revestida por vidro) como método de preparo de amostra para determinação de oito elementos (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn), presentes em amostra de lodo de esgoto, por meio da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para verificar a exatidão do método, compararam os resultados de extração com os

obtidos por um método de referência (decomposição em forno de micro-ondas com cavidade); além de avaliarem as recuperações obtidas quando foi analisado um material de referência certificado (BCR 146R). Usando as condições otimizadas (mistura de 5,0 mL de HNO₃ e 5,0 mL de HCl, 10 min de agitação magnética, previamente, 80% de amplitude, 20 min de sonicação com borbulhamento de ar e temperatura de 90 °C) foram obtidas extrações quantitativas somente para Cd, Cu, Pb e Zn. Recuperações de 75, 84, 81 % foram obtidas para Cr, Mn e Ni, respectivamente. Já o Co não foi detectado. Kazi e colaboradores⁴⁶ propuseram um procedimento de preparo de amostra baseado na extração ácida em banho ultrassônico para determinação do teor total dos metais Cd, Cr, Ni e Pb presentes em amostras biológicas e ambientais. A determinação foi feita por meio da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Foram avaliados quatro extratores para o procedimento: (1) HNO₃-HClO₄-HF (2:1:1, v:v:v), (2) HNO₃-HCl (1:3, v:v), (3) HNO₃-H₂O₂ (2:1, v:v) e (4) HNO₃. Os extratores 1 e 2 foram aplicados às amostras ambientais (sedimento, solo e lodo de esgoto) e 3 e 4 foram aplicados às amostras biológicas (vegetais, grãos, frango e músculo). As faixas de recuperação dos metais variaram de 96,2 a 102% para amostras biológicas e 96,3 a 98,6% para amostras ambientais. De La Calle e co-autores⁵¹ avaliaram a extração de Cd, Cr, Mn, Ni e Pb em diversos materiais de referência certificado, englobando amostras biológicas e ambientais. Dentre as amostras biológicas; amostras de tecido animal e amostras de tecidos vegetais; e com relação às ambientais; amostras de sedimento de rio, solo e lodo de esgoto. As condições de extração avaliadas com um estudo univariado foram: massa de amostra (3-25 mg), concentração de HNO₃ (1-10 %, v v⁻¹), concentração de HCl (5-20 %, v v⁻¹), concentração de HF (10-40 %, v v⁻¹), amplitude (40– 90%), tempo de sonicação (5 - 30 min) e H₂O₂ 5% v v⁻¹ (sim ou não). De modo geral o procedimento consistiu da medida da massa diretamente no eppendorf, adição de 1,0 mL do extrator, sonicação, centrifugação e determinação por GF AAS. As condições ótimas encontradas para a amostra de lodo de esgoto foram: 3,0 mg de amostra + 1,0 mL do extrator (HNO₃ 5% e HF 20%, não foi necessário adicionar H₂O₂ e HCl), sonicação por 5 minutos com 60% de amplitude. As recuperações dos analitos variam de 95,6 a 103,6 % e a precisão para cada caso variou de 1,82 a 7,04 % indicando que o método é exato e preciso e, portanto, um método eficiente para a extração destes metais em lodo de esgoto.

3.6. Técnicas empregadas para determinação de contaminantes inorgânicos

A maioria das determinações de metais em amostras ambientais é realizada por técnicas espectroscópicas. Os elementos Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn normalmente são quantificados por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) ou por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), sendo que as duas primeiras, no modo monoelementar, em geral são as mais usadas. Já os elementos As, Hg, Sb, e Se, frequentemente, são determinados por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS – *Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*) para o Hg, espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS – *Hidride Geration Atomic Absorption Spectrometry*) e ICP OES para os outros elementos. A escolha de uma técnica em relação à outra dependerá da disponibilidade de equipamento, número de analitos de interesse, verbas disponíveis para análise, concentração e propriedades químicas do analito.

Uma vez que o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos para quantificação de micronutrientes e contaminantes inorgânicos em fertilizantes na faixa de concentração mg kg^{-1} e que possam ser implementados em laboratórios de análise de rotina, entende-se que técnicas multielementares são desejáveis, devido à maior frequência analítica. A técnica ICP OES, embora seja uma técnica multielementar, ainda é tida como segunda opção em análises de rotina para os elementos em questão, em função dos custos de manutenção e operação elevados, como por exemplo, grande consumo de argônio e desgaste acelerado da tocha.

Sendo assim, a espectrometria de absorção atômica no modo sequencial com atomização em chama apresenta-se como uma alternativa interessante para análises de fertilizantes. Esse equipamento apresenta as vantagens da FAAS, tais como fácil manuseio e baixo custo de operação em relação às outras técnicas e permite a determinação de uma série de elementos de forma sequencial, tão rápida

(em média, 5 analitos por min) ou até mais que um ICP OES sequencial permite analisar⁶⁰.

3.6.1. Espectrometria de absorção atômica com chama no modo sequencial (FS FAAS)

Os princípios envolvidos na quantificação por FS FAAS são os mesmos da técnica convencional e podem ser encontrados facilmente na literatura⁶¹⁻⁶³, já que é uma técnica consolidada e presente na maioria dos laboratórios de rotina para determinar metais em amostras biológicas, ambientais e de alimentos⁶³. A diferença é que os equipamentos confeccionados para FS FAAS trabalham com todas as lâmpadas ao mesmo tempo e com posição fixa, sem a necessidade de realinhamento para as diferentes determinações, visto que um espelho motorizado é responsável por direcionar sequencialmente os feixes de cada lâmpada para o atomizador de forma rápida. Um monocromador com alta velocidade de varredura (2000 nm min^{-1}) consegue selecionar o comprimento de onda desejado, em ordem crescente de comprimento de onda (Figura 6), garantindo o mínimo de tempo para a determinação de vários elementos.

Além disso, a FS FAAS permite selecionar alguns das condições de operação, como por exemplo, a estequiometria da chama de forma independente para cada elemento^{60, 64}. Assim, quando uma amostra é aspirada todos os elementos de interesse presentes na amostra, em teores acima do LQ da técnica, são determinados de uma só vez para cada amostra, porém de forma sequencial, para só depois dar início às determinações da próxima amostra. Outra vantagem que a FS FAAS apresenta em relação à FAAS é a possibilidade de se usar a técnica do padrão interno, técnica eficiente para contornar interferências⁶⁰.

Com a finalidade demonstrar a diferença entre o tempo de determinação das duas modalidades da técnica, na Tabela 6 são apresentadas estimativas do tempo necessário para determinar 6 elementos em 10 amostras por FAAS convencional e FS FAAS. Observa-se, para as condições de medidas especificadas, uma redução de aproximadamente 50% do tempo de determinação quando a FS FAAS é utilizada.

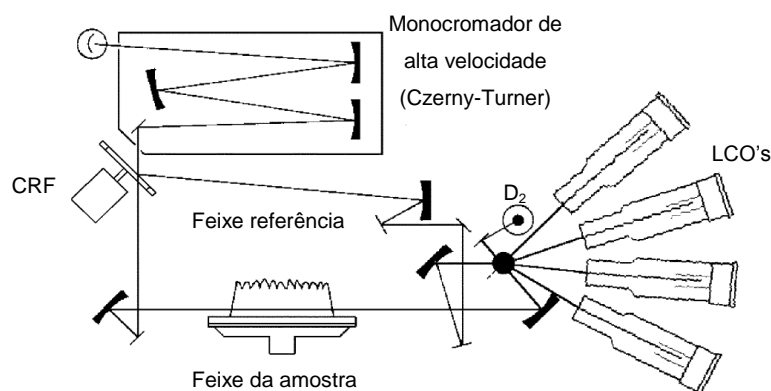


Figura 6. Esquema representativo do sistema óptico de um instrumento FS FAAS com feixe duplo. LCO's – lâmpadas de cátodo oco, D₂ lâmpada de deutério, CRF – combinador rotativo de feixes. Adaptação⁶⁰.

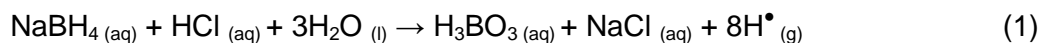
Tabela 6. Condições de medidas para determinação de 6 elementos em 10 amostras e estimativa do tempo de determinação por FAAS convencional e sequencial

Tempo de delay (s)	2,0
Tempo de cada medida (s)	1,5
Replicata de medida	3
Pontos da curva incluindo o zero	6
Número de elementos determinados	6
Número de amostras	10
Tempo para trocar o frasco com a amostra e limpar o capilar (s)	5
FAAS convencional (um elemento por vez)	
Tempo para a curva (s)	69
Tempo para dez amostras (s)	115
Tempo total de determinação de seis elementos nas dez amostras	1104
FAAS sequencial (seis elementos por vez)	
Tempo para a curva – 6 elementos sequencialmente (s)	204
Tempo para dez amostras (s)	340
Tempo total de determinação de seis elementos nas dez amostras (s)	544
Redução de aproximadamente 50% do tempo de determinação	

3.6.2 Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS)

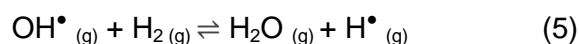
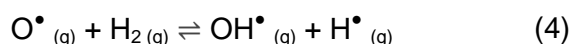
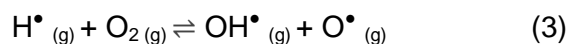
Dentre as técnicas de determinação de elementos formadores de hidretos, tais como As e Se, a mais comumente empregada, é espectrometria de absorção

atômica com geração de hidretos. Tal técnica se baseia na conversão do analito em uma espécie volátil, o hidreto, com subsequente transporte até a cela de atomização. O processo de geração de hidretos e determinação do elemento incluem quatro etapas: (1) geração do hidreto, (2) coleta ou captura do hidreto formado, caso seja necessário a realização de pré-concentração, (3) transferência do hidreto até o atomizador e (4) degradação do hidreto/ atomização do analito. Ao longo do desenvolvimento da técnica, diferentes reagentes foram empregados para a geração do hidreto, dentre eles: zinco metálico/HCl, suspensão de alumínio/HCl e mistura de magnésio e cloreto de titânio em meio de HCl e H₂SO₄^{65, 66}. Entretanto, tais reagentes reduzem somente As, Se e Sb, são responsáveis por altos valores de brancos (devido à baixa pureza) e não garantem a reprodutibilidade das leituras, desta forma, restringindo o uso da técnica. Atualmente, o tetraidroborato de sódio (NaBH₄) estabilizado em solução básica de NaOH ou KOH é o redutor empregado na grande maioria dos casos. Tal redutor ampliou o número de elementos que podem ser determinados por geração de hidretos, incluindo também Bi, Cd, Ge, Pb, Sn, Te, P, Ti e In, o que torna a técnica mais atraente⁶⁵. As equações 1 e 2 representam a decomposição do NaBH₄ e posterior redução da espécie de interesse, respectivamente⁶⁵.



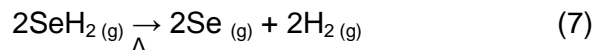
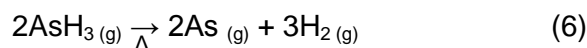
onde m pode ser ou não igual a n e X é a espécie de interesse.

Embora o mecanismo de formação de radicais H não seja exatamente conhecido, supõe-se que traços de oxigênio desempenha papel fundamental na geração desses radicais, conforme as equações 3 a 5⁶⁷.



Na cela de atomização aquecida acredita-se que a degradação dos hidretos de As e Se ocorra via interação com os átomos de hidrogênio, ao invés da

decomposição térmica^{67, 68}. As equações 6 e 7 representam a degradação dos hidretos de As e Se, respectivamente.



Como vantagens da técnica podemos citar maior sensibilidade frente à possibilidade de pré-concentração e atenuação do efeito de matriz na etapa de atomização devido à separação do analito da matriz da amostra. Entretanto, embora seja compreensível a redução do efeito de matriz, esta pode se fazer presente nos diferentes estágios da técnica, sendo que sua magnitude dependerá de vários fatores, tais como, o tipo de sistema usado na etapa geração do hidreto, as concentrações do agente redutor e do ácido, ordem de mistura dos reagentes usados e o tipo de atomizador⁶⁶. As interferências de matriz podem afetar a formação do hidreto ou reduzir sua liberação da fase líquida. De acordo com as fontes de origem, as interferências são classificadas como interferência da fase líquida e interferência da fase vapor. Na fase líquida temos a interferência do próprio composto de interesse e a interferência devido aos componentes da matriz. No primeiro caso, a interferência está relacionada com a cinética de formação do hidreto. O analito pode estar presente na amostra em diferentes estados de oxidação, os quais apresentam cinética de formação de hidretos diferentes. Redução da sensibilidade devido às diferenças na cinética de reação com NaBH_4 pode ser contornada com uma etapa de pré-redução do analito, visto que de modo geral, estados de oxidação menores são reduzidos em menor tempo. Como exemplo, é desejável que o As(V) seja reduzido a As(III) e o Se(VI) a Se(IV). Neste sentido, reagentes pré-redutores, tais como, KI, L-cisteína e tiouréia, têm sido usados com grande sucesso. No caso específico do Se, a pré-redução tem sido realizada com $\text{HCl } 7,0 \text{ mol L}^{-1}$ e aquecimento, uma vez que o KI pode reduzir o Se a Se elementar, o qual pode ser perdido em sistemas em bateladas. Já o uso da tiouréia ou da L-cisteína não é adequado para o Se pelo fato do grupo (-SH) presente nessas moléculas reagir com o Se formando o bis-alquiltio-seleneto (RS-Se-SR) impedito a formação do hidreto⁶⁹. Adicionalmente, espécies orgânicas também apresentam cinética de formação de hidreto diferentes, inclusive, algumas espécies orgânicas como, por exemplo, arsenobetaína; não formam hidretos⁷⁰.

Já com relação às interferências dos componentes da matriz, tem-se a interferência de elementos de transição, tais como Co, Cu, Fe e Ni^{71, 72}; e de outros elementos formadores de hidretos além do analito⁷³. Assim, na fase inicial do processo de geração do hidreto existe uma competição entre analito e os interferentes pelo NaBH₄. Aqueles elementos que tiverem maior cinética serão reduzidos em primeiro lugar até o término do redutor, em outras palavras, depressão do sinal do analito pode ser esperada quando interferentes que fazem parte da matriz da amostra reagem mais rapidamente com NaBH₄ que a própria espécie de interesse. No caso da interferência dos elementos de transição, alguns trabalhos reportados na literatura^{71, 74} descrevem a formação de precipitados desses elementos a partir da redução com NaBH₄. Como esses precipitados são coloidais, possivelmente a interferência se dá pela co-precipitação da espécie de interesse e degradação do hidreto do analito já formado, uma vez que metais são responsáveis por catalisar a hidrogenação⁷¹. Welz e Melcher⁷⁵ constataram que a combinação de altas concentrações de HCl e baixas concentrações de NaBH₄ culmina na redução da interferência por metais de transição. Altas concentrações de HCl aumentam a solubilidade do boreto metálico formado e menor quantidade de NaBH₄ reduzirá a quantidade de precipitado do interferente. Vale salientar que dentre as três possibilidades de HG AAS, determinação em batelada, em fluxo contínuo e por injeção em fluxo; as interferências apresentarão menor magnitude quando as determinações forem realizadas em fluxo pelo fato dos reagentes ficarem em contato por menor tempo. Ainda com relação a redução da interferência, a ordem de adição dos reagentes desempenha importante papel, por exemplo, a adição de altas concentrações de HCl antes do NaBH₄ favorecerá, previamente, a formação de complexos metal-cloreto e, conseqüentemente, atenuará a formação de precipitados. Pierre e Brown⁷⁶ verificaram que adicionar o NaBH₄ primeiro levava à formação de precipitado branco, porém quando adicionaram o HCl primeiro não foi observado a presença do precipitado branco no meio reacional.

No caso das interferências da fase gasosa, estas podem ocorrer no volume morto do frasco de reação, na linha de transporte ou no atomizador. Dois grupos de interferências podem ser diferenciados: as interferências de transporte, as quais ocorrem após a liberação do hidreto no caminho até a cela de atomização, nesta etapa pode ocorrer atrasos ou perdas da espécie volátil; e as interferências no processo de atomização, relacionadas com os mecanismos de atomização; em que

presença de hidretos de outros elementos pode consumir preferencialmente os radicais hidrogênios afetando negativamente a atomização do analito⁶⁵.

3.7. Otimização multivariada no desenvolvimento de métodos analíticos

A otimização multivariada permite a avaliação simultânea de todos os fatores que influenciam a propriedade monitorada. Já na otimização univariada, enquanto um fator é avaliado, os outros permanecem constantes⁷⁷.

As principais vantagens proporcionadas pelo emprego da otimização multivariada quando comparado aos procedimentos univariados são, em princípio, a redução do número de experimentos para encontrar as condições experimentais que fornecem a melhor resposta analítica e a possibilidade de identificar possíveis efeitos significativos resultantes da interação entre duas ou mais variáveis. Em face do exposto, a otimização multivariada tem ganhado destaque na academia e na indústria. Basicamente, um procedimento de otimização é constituído de três etapas: (1) Triagem das variáveis (planejamentos fracionários), (2) avaliação da influência das variáveis (planejamentos fatoriais completos) e (3) otimização (Metodologia da superfície de resposta). Na primeira etapa identifica(m)-se, entre as variáveis estudadas, qual ou quais, realmente, apresenta(m) um efeito significativo sobre o sistema e, conseqüentemente, sobre a resposta monitorada. Na segunda etapa ocorre a identificação da região em que se conseguem as melhores respostas e na última etapa, por meio do estudo das variáveis em um número de níveis maior, dentro da região encontrada na segunda etapa, chega-se a superfície de resposta, através da qual obtém-se o ponto crítico (valores dos níveis de cada variável correspondentes à condição ótima)⁷⁸.

Lavilla et al.⁷⁹ empregaram o planejamento fatorial fracionário saturado, Plackett-Burman, para selecionar as melhores condições de dissolução de amostras de lodo de esgoto. Tal dissolução foi efetuada por diferentes procedimentos de digestão: com bomba de digestão a baixa pressão (aquecimento por meio de forno de micro-ondas comercial com controle de pressão), com bomba de digestão a média pressão (aquecimento por meio de forno de micro-ondas doméstico) e com bomba de digestão a alta pressão (aquecimento por meio de chapa aquecedora subsidiada com banho de areia). As variáveis avaliadas foram: potência de radiação aplicada (nos casos em que foi usado micro-ondas), tempo de digestão, tempo de

pré-digestão, volume de HNO₃, volume de HCl e volume de HF. Os teores dos elementos estudados (Cu, Cr, Ni, Pb e Zn) obtidos para cada método e determinados por FAAS não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos valores certificados do material de referência (BCR 145R) ao nível de 95% de confiança. Apesar dos métodos apresentarem a mesma eficiência para dissolução das amostras, os autores recomendam a digestão com bomba de digestão em forno comercial por ser o método mais rápido e seguro, embora requiera um investimento inicial alto.

Hristozov e co-autores⁵⁹ otimizaram dois procedimentos de pré-tratamento de amostras de lodo, decomposição assistida por micro-ondas e extração assistida por radiação ultrassônica, empregando diferentes tipos de planejamento experimentais. Para o procedimento de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade, os autores selecionaram as condições mais adequadas por meio de um planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾. Nesta etapa foram avaliados os fatores: pressão, tempo de decomposição, volume de HNO₃, volume de HCl e volume de HF. Para o procedimento de extração com sonda ultrassônica, as variáveis que apresentaram efeito sobre o procedimento foram identificadas por meio de um planejamento Plackett-Burman, no qual foram estudados os fatores: amplitude, tempo de sonicação, temperatura, volume da mistura ácida, composição da mistura, emprego de borbulhamento de ar ou não e tempo de agitação magnética. Por último otimizaram as variáveis amplitude e tempo de sonicação por meio de um planejamento fatorial completo 3². A partir dos resultados encontrados, os autores, concluíram que a otimização efetuada por meio de planejamentos experimentais é uma alternativa eficiente e prática, uma vez que foi necessário poucos experimentos para otimizar sete variáveis.

Lopes e colaboradores⁸⁰ aplicaram técnicas multivariadas na otimização de um método para determinar As e Se biodisponíveis presentes em sedimentos empregando HG ICP OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e com geração de hidreto). Neste estudo avaliou-se os efeitos dos fatores vazão da solução amostra, vazão da solução de NaBH₄, vazão da solução de HCl (todas vazões em mL min⁻¹) e pressão do nebulizador (bar) por meio de um planejamento fatorial completo 2⁴ e a otimização, propriamente dita, foi realizada por um planejamento Doehlert. As respostas avaliadas nos planejamentos foram respostas múltiplas, referentes ao As e Se, as quais permitem avaliar o efeito

dos fatores estudados sobre a determinação dos dois elementos simultaneamente. A abordagem de otimização adotada pelos autores proporcionou um procedimento preciso e exato com limites de detecção e de quantificação adequados para a proposta.

3.8. Validação de métodos analíticos.

Os parâmetros determinados na validação de métodos analíticos têm como objetivo demonstrar se o método em questão, nas condições em que é praticado, apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida⁸¹. Os parâmetros frequentemente determinados são: linearidade, efeito de matriz, seletividade, faixa linear, faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, veracidade e robustez⁸¹⁻⁸⁴. No Brasil, os órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁸⁵ e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)⁸⁶. Embora exista um consenso quanto aos parâmetros de desempenho determinados na etapa de validação, as formas como tais parâmetros são calculados podem diferir de um guia para outro^{81, 84, 87, 88}, cabendo ao analista identificar qual é a forma mais adequada para o seu propósito, levando em consideração, eficiência e praticidade.

A faixa linear é definida como a região da curva analítica onde a resposta medida é proporcional à concentração do analito ou ainda como a faixa de concentração onde a sensibilidade permanece constante⁸¹. Comumente, a linearidade é verificada por meio do coeficiente de correlação (r) associado à regressão linear obtida para a relação concentração versus sinal analítico. Recomenda-se que para garantir tal linearidade o valor de r deva ser superior a 0,999. Entretanto valores de r próximo da unidade não garantem que exista uma relação linear. Assim, uma forma mais confiável de avaliar tal parâmetro é o teste de significância da regressão e do desvio da linearidade a partir da análise de variância (ANOVA)⁸⁹. O efeito de matriz é definido como a influência dos componentes da matriz na resposta do analito, podendo ser o aumento ou redução do sinal medido, de forma a afetar significativamente a exatidão dos resultados finais⁸⁴. Assim, uma forma de identificar tais efeitos é realizar determinações dos analitos, para valores de concentração que abranjam toda a faixa de trabalho, na presença e na ausência

da matriz da amostra e, posteriormente comparar, por meio de testes estatísticos, os valores encontrados em cada situação. O cuidado em preparar ensaios ao longo de toda faixa de trabalho reside no fato de existir a possibilidade da magnitude do efeito depender da concentração do analito⁸¹. Uma segunda maneira de avaliar o efeito de matriz é construir duas curvas de calibração, uma por padrões externos (padrão mais branco analítico) e uma de adição de padrão (padrão mais matriz da amostra), em seguida, comparar as inclinações do modelo de regressão de cada curva ao nível de confiança desejado⁹⁰. Nos casos em que for constatada diferença estatística significativa, identifica-se o efeito de matriz. Embora seja menos moroso usar curva de calibração por padrões externos, nem sempre é possível utilizá-la, portanto, é necessário avaliar o efeito de matriz de forma a identificar e estimar as fontes de erro inerente a cada método⁸¹.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser confiavelmente, distinguido de zero. Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza⁸¹. A precisão é um parâmetro que informa a dispersão dos resultados em torno da média, determinados sobre condições pré-estabelecidas, sendo, comumente, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). A precisão pode ser determinada de três formas: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A exatidão de um método analítico é definida como a concordância entre o resultado final determinado pelo método avaliado e o valor de referência aceito como verdadeiro, levando em consideração a incerteza associada ao valor⁸¹. Experimentos para a avaliação da veracidade podem consistir da análise de materiais de referência certificado (MRC) com matrizes semelhantes ao propósito do método desenvolvido, comparação dos teores determinados pelo método proposto com de um método oficialmente validado e por último, experimentos de adição/recuperação, no qual quantidades conhecidas dos analitos são adicionadas nas amostras analisadas⁸⁴. Das três opções a adição/recuperação é a menos recomendada pelo fato de não garantir a mesma interação entre analito e componentes da matriz da amostra, podendo levar a falsas inferências sobre a exatidão do novo método analítico.

A robustez de um método nos informa se pequenas variações nas condições experimentais terão efeito significativo sobre os resultados finais. Portanto, a

robustez não se trata de um parâmetro numérico. Quando é constatado que um método é robusto, apenas pode-se afirmar que não há alteração significativa no resultado quando as condições experimentais avaliadas variarem dentro da faixa estudada. Assim, um método robusto pode apresentar portabilidade, ou seja, tal método pode ser aplicado em local diferente de onde foi validado sem perda de suas características metrológicas e de desempenho analítico⁸⁸.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e instrumentação

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram: HNO₃ (65%, m m⁻¹), HCl (37%, m m⁻¹), H₂O₂ (30%, m m⁻¹), HF (40%, m m⁻¹), ácido bórico (H₃BO₃), tiouréia (H₂NCSNH₂), borohidreto de sódio (NaBH₄) e soluções de referência de 1000 mg L⁻¹ dos elementos As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn, sendo todos estes reagentes de mesma procedência (Merck, Darmstadt, Alemanha). Água deionizada obtida com um sistema de purificação de água Milli-Q, modelo Direct-Q 3, Water Purification System (Millipore, EUA) foi utilizada em todos os procedimentos realizados. Para determinação dos analitos foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo SpectrAA 220 com modo sequencial (Varian, Mulgrave, Austrália), equipado com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério (Norwalk, CT, EUA) e com sistema de geração de hidretos, modelo VGA77. As condições instrumentais usadas para a determinação dos elementos são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições instrumentais empregadas para as determinações dos diferentes elementos

Elemento	λ (nm)	Largura da fenda (nm)	Corrente (mA)	Chama – Fluxo de gases (L min ⁻¹)		Tempo de medida (s)	Delay (s)
				Oxidante	Acetileno		
As	193,7	0,5	10	12,90 ^a	1,80		15,0
Cd	228,8	0,5	4	12,2 ^a	2,00		2,00
Co	240,7	0,2	10	12,2 ^a	2,00		2,00
Cr	357,9	0,2	10	12,2 ^a	3,00		2,00
Cr ^c	357,9	0,2	6	6,60 ^b	11,00		2,00
Cu	324,8	0,5	10	12,2 ^a	2,00		2,00
Fe	248,3	0,2	10	12,2 ^a	2,00	1,50	2,00
Mn	279,5	0,2	10	12,2 ^a	2,00		2,00
Mo ^c	313,3	0,5	10	7,60 ^b	11,00		2,00
Ni	232,0	0,2	10	12,2 ^a	2,00		2,00
Pb	217,0	1,0	9	12,2 ^a	2,00		2,00
Se	196,0	0,5	10	12,90 ^a	1,80		15,0
Zn	213,9	1,0	5	12,2 ^a	2,00		2,00

^aAr, ^bÓxido nítrico e ^cAlCl₃ 1 g L⁻¹ como supressor de ionização⁴

Para o procedimento de extração ácida utilizou-se um bloco digestor com capacidade para 40 tubos de 100 mL (Quimis, São Paulo, Brasil). Um forno de micro-ondas fechado com cavidade modelo ETHOS 1 - Advanced Microwave Digestion System foi utilizado para decomposição das amostras (Milestone, Sorisole, Itália). Um processador ultrassônico modelo VCX 550 (SONICS, Newtown, CT, EUA) operando com 500 watts e 20 kHz com o acessório *cup horn* (Figura 7) foi usado para o procedimento de extração assistido por ultrassom. Uma estufa com circulação e renovação de ar modelo TE 394/1 (TECNAL, São Paulo, Brasil) foi utilizada para secagem das amostras e uma balança analítica com sensibilidade de 0,0001 g modelo AX 200 (SHIMADZU do Brasil comércio LDTA, São Paulo, Brasil) foi empregada para as medidas de massa. Para a centrifugação dos extratos foi utilizada uma centrífuga modelo 206-BL (FANEN, Guarulhos, Brasil).

Um pHmetro modelo MB-10 (Marte, São Paulo, Brasil), um condutivímetro modelo Q405M (Químis, São Paulo, Brasil) e um analisador elementar modelo CHN 2400 (Perkin-Elmer, Shelton, US) foram usados para a caracterização das amostras.

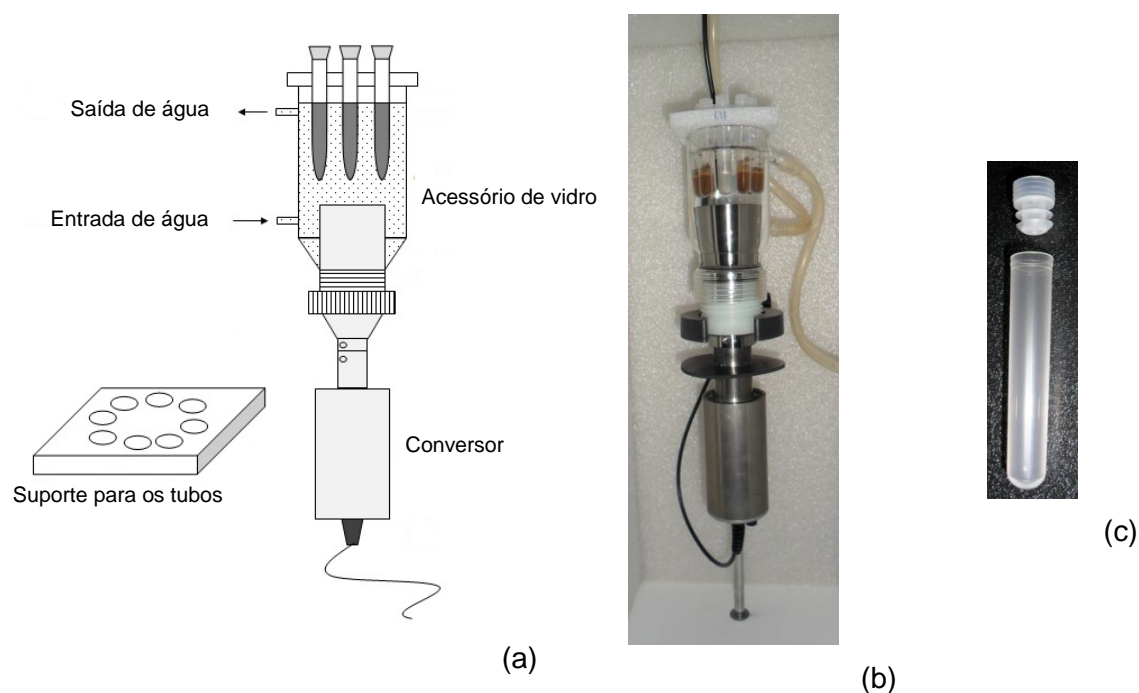


Figura 7. Sistema sonoreator do tipo *cup horn* empregado no procedimento de extração proposto: Esquema (a), fotografia (b) e tubo de polipropileno com capacidade para 5,0 mL.

4.2. Amostras e Material de Referência Certificado (MRC)

As amostras usadas neste trabalho são elencadas na Tabela 8, sendo oito amostras de resíduos orgânicos e cinco amostras de fertilizantes disponíveis comercialmente. A amostra LBH foi coletada na estação de tratamento de esgoto (ETE) da bacia do Onça, localizada no bairro Ribeiro de Abreu, zona norte de Belo Horizonte. A amostragem foi feita em vários pontos de duas pilhas de lodo, tentando-se obter uma amostra representativa. No laboratório, a amostra LBH foi seca em estufa com aeração forçada à 65°C até massa constante, triturada em grau de ágata e passadas por peneira de 0,5 mm de diâmetro⁴. As outras amostras de resíduos orgânicos foram adquiridas junto ao laboratório de fertilizantes e corretivos (LAFC) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Todas as amostras foram previamente secas, moídas e peneiradas de acordo com o manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos⁴. Para o caso do procedimento de extração assistida por ultrassom, as amostras foram trituradas novamente e passadas por peneira com diâmetro de 0,3 mm. Já as amostras de fertilizantes comerciais foram adquiridas no comércio das cidades de Belo Horizonte e Paracatu de Minas e submetidas ao mesmo procedimento de pré-tratamento das demais amostras. O material de referência certificado de lodo de esgoto, CRM209-50 (FLUKA, US) foi usado para avaliar a veracidade dos métodos desenvolvidos.

4.2.1. Caracterização das amostras estudadas

Os valores de pH e condutividade elétrica foram determinados de acordo com o Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organominerais e Corretivos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁴. O Teor de matéria orgânica (MO), carbono orgânico (C-Total), nitrogênio total (N-Total), relação C/N foram determinados a partir da análise elementar das amostras.

Tabela 8. Resíduos e fertilizantes orgânicos comerciais avaliados neste trabalho

Identificação	Categoria	Origem	Descrição
FS	Resíduo	IMA	Farinha de sangue de frigorífico de aves
EB	Resíduo	IMA	Esterco de boi
MA-IMA	Resíduo	IMA	Torta de mamona
CLF	Resíduo	IMA	Composto de lixo proveniente de uma fazenda
LOP	Resíduo	IMA	Lodo de estação de tratamento de esgoto - Cidade de origem: Ouro Preto
LBH ¹	Resíduo	Coletada (Belo Horizonte)	Lodo de estação de tratamento de esgoto - Bacia do Onça
VGR	Fertilizante orgânico	Comprada (Mercado central de Belo Horizonte)	Composto orgânico para plantas. Uma mistura de torta de mamona em flocos + composto de lixo + minerais.
TMA	Fertilizante orgânico	Comprada (Mercado central de Belo Horizonte)	Torta de mamona
AOQ ²	Fertilizante orgânico	Comprada (Cidade: Paracatu de Minas)	Adubo Orgânico Quaresmeira Indicação do rótulo: Composto de lixo, esterco, matéria seca, calcário dolomítico, fosfato natural, cinzas e húmus de minhoca.
HM	Fertilizante orgânico	Comprada (Cidade: Paracatu de Minas)	Húmus de minhoca Sem nenhuma caracterização no rótulo.
TV	Fertilizante orgânico	Comprada (Cidade: Paracatu de Minas)	Terra vegetal, composta com turfa. Sem nenhuma caracterização no rótulo.

¹Amostra usada para otimização dos procedimentos com bloco digestor e forno de micro-ondas.

²Amostra usada na otimização do procedimento com sonoreator ultrassônico.

4.3. Procedimento de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade

4.3.1. Procedimento geral

As massas de amostras foram medidas diretamente nos frascos de perfluoroalcoxi (PFA) do forno de micro-ondas. Em seguida, foi adicionado o ácido concentrado ou a mistura de ácidos. Após o tempo de contato prévio, foram adicionados 2,00 mL de H₂O₂ e os frascos foram submetidos a um dos programas de aquecimento do forno de micro-ondas (Figuras 8 e 9). Após o resfriamento dos frascos (temperatura ambiente), o digerido foi transferido quantitativamente para tubos Falcon graduados, onde o volume final desejado foi ajustado. Os sobrenadantes, obtidos após centrifugação a 3500 rpm durante 5 min, foram

armazenados em geladeira para posterior quantificação dos elementos por FS FAAS. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, sendo obtidos também os brancos analíticos para cada caso. As curvas analíticas utilizadas para a determinação dos elementos foram preparadas em meio contendo os reagentes empregados em cada procedimento. O procedimento que forneceu maior concentração do analito na amostra, identificado pelo teste Tukey ao nível de 95% de confiança, foi selecionado para ser validado.

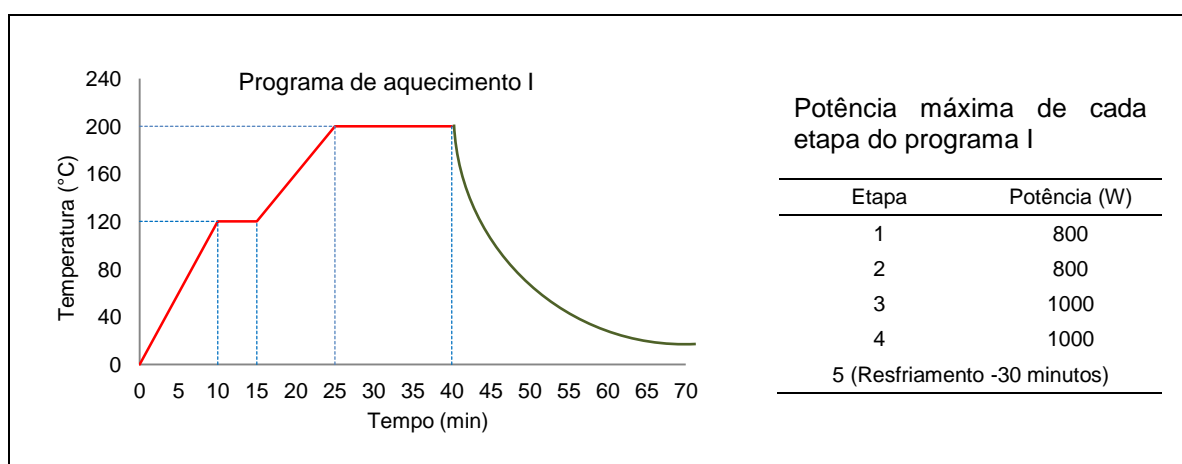


Figura 8. Etapas do programa de aquecimento I para digestão das amostras de fertilizantes.

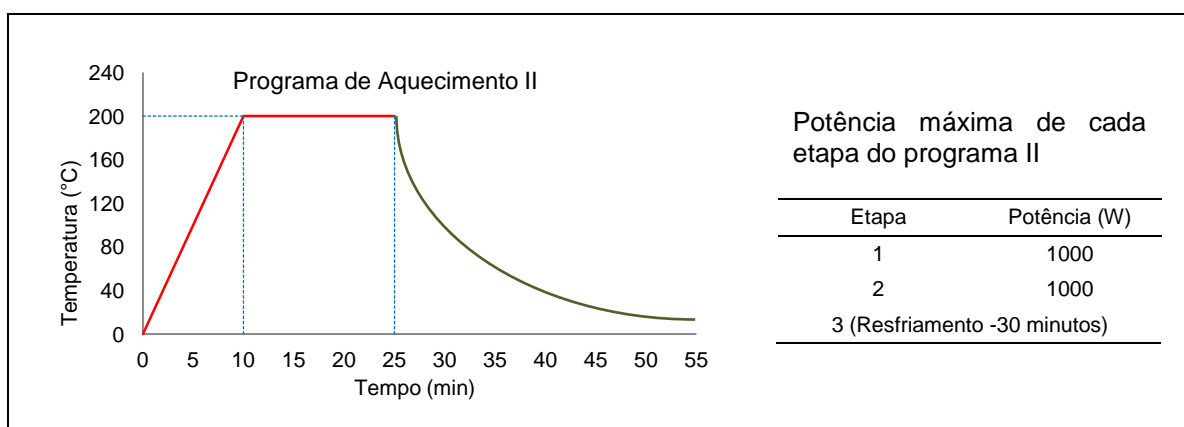


Figura 9. Etapas do programa de aquecimento II para digestão das amostras de fertilizantes.

4.3.2. Otimização do procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas

A otimização do procedimento foi realizada com a amostra de lodo de esgoto coletada em Belo Horizonte (LBH). Inicialmente, foi usado o programa de aquecimento I apresentado na Figura 8 e as condições avaliadas foram: a massa de amostra, tipo de ácido ou mistura ácida, tempo prévio de contato entre amostra e ácido e a solubilização do material silicatado com adição do HF diretamente ao resíduo sólido mais sonicação por 15 min em banho ultrassônico. Esse estudo foi realizado de forma univariada, resultando em diferentes procedimentos. As condições empregadas em cada procedimento são mostradas na Tabela 9. Por último, foi avaliado um procedimento empregando o programa de aquecimento II (Figura 9), o qual apresenta menor tempo de aquecimento. Neste caso, os reagentes foram adicionados diretamente sobre a amostra com ordem de adição definida: primeiro fez-se a adição de 4,50 mL de HNO_3 , seguido de 2,00 mL de H_2O_2 e por último 1,50 mL de HCl. A cada adição a mistura resultante foi agitada manualmente. Os frascos foram submetidos ao aquecimento sem o tempo de contato prévio.

4.4. Otimização do procedimento de extração ácida em bloco digestor

4.4.1. Procedimento geral

Toda a etapa de otimização também foi realizada com amostra de lodo de estação de tratamento de esgoto coletada em Belo Horizonte (LBH). De modo geral, os procedimentos desta etapa consistiram em: medir, diretamente nos tubos de vidro do bloco digestor, aproximadamente 250,0 mg de amostra, sobre os quais foi adicionado o ácido ou a mistura de ácidos. Em seguida, os tubos foram submetidos ao aquecimento à temperatura e tempo pré-estabelecidos para cada etapa do procedimento de otimização adotado. Transcorrido dois terços do tempo de aquecimento, os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionou-se o H_2O_2 , esperou-se 5 min e retornou-se ao processo de aquecimento. Todos os procedimentos foram realizados com uso de condensadores nas extremidades dos tubos.

Tabela 9. Condições específicas de cada procedimento de preparo das amostras avaliado no forno de micro-ondas com cavidade

Procedimento	Massa de amostra (mg)	Volume de HNO ₃ (mL)	Volume de água régia ^a (mL)	Volume de água régia invertida ^b (mL)	Volume de HF (mL)	Volume de HCl (mL)	Tempo de contato prévio (h)	Volume de H ₂ O ₂ ^c (mL)	Volume final após decomposição ^d (mL)
Programa de aquecimento I									
Sem HF									
I	150,0	6,0	-	-	-	-	16	2,0	15
II	200,0	6,0	-	-	-	-	1	2,0	20
III	200,0	-	6,0	-	-	-	1	2,0	20
IV	200,0	-	-	6,0	-	-	1	2,0	20
Com HF ^e									
V	150,0	5,0	-	-	1,0 ^f	-	16	2,0	15
VI	150,0	-	5,0	-	1,0 ^f	-	16	2,0	15
VII	200,0	-	6,0	-	1,0 ^g	-	1	2,0	20
VIII	200,0	-	-	5,0	1,0 ^f	-	16	2,0	15
Programa de aquecimento II									
Sem HF									
IX	200,0	4,5	-	-	-	1,5	-	2,0	20

^aMistura HNO₃:HCl, 1:3, v:v; ^bMistura HNO₃:HCl, 3:1, v:v; ^cAdição após o tempo de prévio de contato; ^dVolume final ajustado com água deionizada após programa de aquecimento;

^eTodos os procedimentos com adição de 500 mg de H₃BO₃; ^fAdição no frasco antes do programa de aquecimento; ^gAdição no resíduo sólido remanescente após submissão do programa de aquecimento.

Terminado o tempo de aquecimento, tanto a parte sólida quanto a parte líquida foram transferidas para tubo falcon graduados, onde o volume foi aferido para 25,0 mL com água deionizada. Por último, efetuou-se a centrifugação dos tubos a 3500 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi armazenado em geladeira para posterior quantificação dos metais por meio da FS FAAS e o resíduo foi descartado. Brancos analíticos foram realizados para todas as etapas. As concentrações dos analitos obtidas com diferentes condições da otimização multivariada foram convertidas em resposta múltipla por meio dos passos descritos a seguir:

Normalização das respostas: Dentro do conjunto de respostas (concentrações) obtidas para um determinado analito, identificou-se qual apresentou maior valor. Em seguida, efetuou-se a divisão de todas as respostas por este valor, de forma que uma resposta fosse igual a 1 e o restante menor que 1. Este procedimento foi realizado para cada analito individualmente.

Somatório das respostas normalizadas: Efetuou-se o somatório das respostas normalizadas de cada metal dentro de um mesmo ensaio.

Assim, a resposta múltipla referente a cada ensaio foi calculada a partir da equação 8:

$$R_{\text{múltipla}_n} = \frac{r_n(A_1)}{MR(A_1)} + \frac{r_n(A_2)}{MR(A_2)} + \dots + \frac{r_n(A_j)}{MR(A_j)} \quad (8)$$

em que $R_{\text{múltipla}_n}$ é a resposta múltipla do n-ésimo ensaio, $r_n(A_j)$ é a resposta referente ao analito j obtida com n-ésimo ensaio e $MR(A_j)$ é a maior resposta encontrada para o analito j⁸⁰.

As respostas múltiplas calculadas foram processadas pelo *software* STATISTICA[®] versão 7.0 para obtenção dos gráficos de Pareto ou superfícies de respostas, sempre usando nível de confiança de 95%.

4.4.2. Avaliação do extrator por meio de procedimento univariado

Um estudo univariado para avaliar a eficiência de quatro extratores (HNO₃ concentrado, HCl concentrado, água régia e água régia invertida) no procedimento

em questão foi realizado. Nesta etapa, as condições experimentais foram fixadas em: 250,0 mg de amostra, 2,50 mL do extrator, 1,00 mL de H₂O₂ e 90 min de aquecimento a 90°C. Aplicou-se o teste Tukey ao nível de 95% de confiança às concentrações determinadas com cada extrator.

4.4.3. Planejamento fatorial completo 2⁴ com repetição no PC

Um planejamento fatorial (2⁴ + PC) foi realizado para avaliar o efeito de volume de água régia, volume de H₂O₂, tempo e temperatura de aquecimento sobre a eficiência da extração ácida em bloco digestor. As condições de cada ensaio do planejamento são apresentadas na Tabela 10. A partir do gráfico de Pareto, foram identificadas as variáveis que apresentaram efeito significativo.

4.4.4. Planejamento composto central 2³ (CCD)

Neste ponto da otimização, um planejamento composto central 2³ foi realizado com as variáveis que apresentaram efeito significativo no planejamento anterior. As variáveis e os níveis avaliados em cada ensaio são apresentados Tabela 11. A partir da superfície de resposta obtida, determinaram-se as condições ótimas para a extração.

4.5. Validação dos métodos de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade e de extração em bloco digestor

O procedimento de validação usado nesta etapa do trabalho baseou-se no guia de validação do INMETRO⁸¹, Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA⁸⁸, guia de validação da IUPAC⁸⁴ e no trabalho de Souza e Junqueira⁸⁹.

4.5.1. Linearidade

Para avaliar a linearidade foram construídas curvas analíticas multielementares (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn) em meios contendo água régia 10%, v v⁻¹, (procedimento do bloco digestor), e em meio contendo HNO₃ 22% v v⁻¹ e 7% v v⁻¹ (procedimento do micro-ondas).

Tabela 10. Condições de cada ensaio do planejamento fatorial completo 2^4 com repetição no ponto central para o procedimento de extração em bloco digestor

Condições fixas				
Massa de amostra: 250,0 mg				
Volume final: 25,0 mL				
Presença de condensador				
Variáveis	Níveis			
	-1 (Baixo)	0 (Médio)	+1 (Alto)	
1) Volume de Água Régia (mL)	2,00	3,50	5,00	
2) Volume de H ₂ O ₂ (mL)	0	0,75	1,50	
3) Tempo (min)	15	45	75	
4) Temperatura (°C)	65	90	115	
Ensaio	Vol. de AR (mL)	Vol. de H ₂ O ₂	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
PC*	0	0	0	0

*Repetição no PC (n=3)

Branco analítico foram preparados e tiveram suas absorvâncias medidas como ferramenta de controle interno de qualidade e para ajuste do zero do equipamento. Todas as medidas de absorvância foram realizadas de forma aleatória. Inicialmente, testes preliminares foram realizados com faixas de concentração mais amplas. Após construção de gráficos concentração versus absorvância e inspeção visual da relação existente entre concentração e absorvância, chegou-se as faixas que aparentemente seriam lineares. Por último, para confirmação da linearidade na faixa reduzida, uma avaliação mais criteriosa, por meio de testes estatísticos, foi realizada.

Tabela 11. Condições de cada ensaio do planejamento composto central 2^3 com repetição no ponto central para o procedimento de extração em bloco digestor

Condições fixas					
Massa de amostra: 250,0 mg					
Volume de água régia: 2,50 mL					
Volume final: 25,0 mL					
Presença de condensador					
Variáveis	Níveis				
	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Volume de H ₂ O ₂ (mL)	0,65	1,00	1,50	2,00	2,35
Tempo (min)	50	60	75	90	100
Temperatura (°C)	86	100	120	140	153
Ensaio	Volume de H ₂ O ₂ (mL)	Tempo (min)		Temperatura (°C)	
1	-	-		-	
2	+	-		-	
3	-	+		-	
4	+	+		-	
5	-	-		+	
6	+	-		+	
7	-	+		+	
8	+	+		+	
9	-1,682	0		0	
10	+1,682	0		0	
11	0	-1,682		0	
12	0	+1,682		0	
13	0	0		-1,682	
14	0	0		+1,682	
PC*	0	0		0	

*Repetição no PC (n = 3)

Nesta etapa as curvas foram preparadas com pelo menos seis níveis de concentração igualmente espaçados, preparados independentemente com três replicatas para cada nível. A primeira avaliação estatística dos dados foi a verificação da existência de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife⁹¹. Em seguida, a adequação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMOQ) para obtenção dos parâmetros de regressão linear, $y_i = \beta x_i + \alpha$, onde α é o intercepto e β a inclinação, foi verificada por meio de testes de premissas, os quais são divididos em dois grupos: premissas dos resíduos para regressão, incluindo testes de normalidade (Teste de Ryan-Joiner⁹²), independência (Teste de Durbin e Watson⁹³) e homoscedasticidade (Teste de Levene com modificações feitas por Brown e Forsythe⁹⁴) e premissas do modelo, em que foram

realizados testes de significância da regressão e do desvio de linearidade (Teste F-ANOVA⁸⁹). A seleção dos testes empregados e a sequência de aplicação foram sugeridas por Souza e colaboradores^{89, 91}.

4.5.2. Efeito de matriz

Geralmente, a avaliação do efeito de matriz é feito por meio da comparação das inclinações correspondentes à curva de calibração externa e à curva de calibração contendo os componentes da matriz da amostra, dependendo do caso, construída por ajuste de matriz ou adição de padrão. Visto que os métodos desenvolvidos devem atender amostras com matrizes bem distintas, os resíduos de esterco de boi (EB), farinha de sangue (FS), folhas e galhos de mamona triturados (MA-IMA) e lodo de esgoto (LBH) foram selecionadas como representantes dos diferentes grupos de resíduos orgânicos, a saber, estercos, resíduos de origem animal, resíduos de origem vegetal, e lodos de estações de tratamento de efluentes.

A concentração de cada ponto das faixas avaliadas é apresentada na Tabela 12. O volume de digerido/extrato adicionado a cada ponto da curva foi calculado de tal forma que o volume adicionado contribuísse com uma quantidade de analito que correspondesse a um quarto da faixa linear. Na Tabela 13 são apresentadas as proporções dos extratos/digeridos para as amostras avaliadas. Não foi avaliado o efeito de matriz sobre a determinação de Fe para todos os resíduos em função de terem sido necessárias diluições superiores a 100 vezes para sua determinação, já no caso do Zn não foi avaliado o efeito de matriz para a amostra LBH, uma vez que a construção da curva de adição padrão resultaria em uma diluição de aproximadamente 40 vezes.

Tabela 12. Concentração dos pontos de cada curva de calibração usada na avaliação do efeito de matriz na determinação de metais em fertilizantes orgânicos

Elementos	Pontos - mg L ⁻¹						
	0	1	2	3	4	5	6
Cd	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12
Zn	0	0,12	0,24	0,36	0,48	0,60	0,72
Co, Cu e Ni	0	0,30	0,60	0,90	1,20	1,50	1,80
Fe e Mn	0	0,35	0,70	1,05	1,40	1,75	2,10
Cr, Mn e Pb	0	0,40	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40

Tabela 13. Concentração de extrato/digerido em cada ponto da curva de adição padrão para as diferentes amostras avaliadas

Resíduo	Concentração de Extrato (% v v ⁻¹)	Elementos
FS MA-IMA	90	Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn
EB	90	Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni e Pb
	15	Mn e Zn
LBH	90	Cd, Co, Mo, Ni e Pb
	20	Cr, Cu e Mn

FS – Farinha de sangue, MA-IMA – Torta de mamona proveniente do IMA, EB – Esterco de boi e LBH – Lodo de estação de tratamento de esgoto.

Os dados obtidos para as curvas foram avaliados quanto às premissas dos resíduos e do modelo usado, como descrito no item linearidade. Confirmada as premissas, as inclinações e os interceptos das curvas foram comparados por meio do teste t para variâncias combinadas ou distintas⁸⁸.

4.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir das medidas de 10 brancos analíticos e empregando-se as equações 9 e 10, respectivamente.

$$LD = 0 + 3 \cdot S \quad (9) \qquad LQ = 0 + 10 \cdot S \quad (10)$$

onde S é o desvio padrão das concentrações calculadas a partir dos sinais de absorvância referentes aos brancos analíticos e os limites calculados a partir das equações 9 e 10 representam os limites da técnica analítica, porém quando os mesmos são multiplicados pela diluição referente a razão massa de amostra/volume final do extrato, obtêm-se os limites do método analítico.

Os LQs calculados a partir dos brancos analíticos foram avaliados para se verificar se nessa concentração era possível obter a precisão e veracidade requeridas para o método. Foi avaliada uma faixa de concentração em torno do valor calculado pela equação 10. Para isso, soluções contendo concentrações iguais ou

próximas ao LQ calculado foram submetidas a todo procedimento de preparo de amostra, em 7 replicatas. As concentrações avaliadas para o LQ para todos os elementos foram: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg kg⁻¹.

4.5.4. Veracidade e precisão

A veracidade e a precisão dos métodos foram avaliadas a partir da análise de material de referência certificado de lodo de esgoto, realizada com sete repetições independentes.

A precisão foi estimada em termos de repetitividade e determinada pelo coeficiente de variação, de acordo com a equação 11:

$$CV (\%) = \frac{S \times 100}{\bar{C}} \quad (11)$$

onde S é desvio padrão referente aos resultados obtidos com as replicatas e \bar{C} é a concentração média.

A veracidade foi determinada em termos da recuperação do analito presente no MRC de lodo de esgoto, como mostra a equação 12.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor observado} \times 100}{\text{Valor esperado}} \quad (12)$$

4.6. Otimização da geração de hidretos para determinação sequencial de As e Se

O extrato obtido com o procedimento otimizado de extração ácida em bloco digestor foi empregado para se avaliar as condições da etapa de geração de hidretos, de forma univariada. Usando como referência o método analítico para determinação sequencial de As e Se em águas⁹⁵, foram realizadas modificações, tais como alteração na ordem de adição dos reagentes, retirada da etapa de aquecimento prévio para pré-redução do Se, aumento da concentração de NaBH₄ e redução da concentração de HCl, com a finalidade de tornar o método adequado

para amostras de fertilizantes orgânicos. A seguir é descrito o método e na Figura 10 é apresentado o esquema do sistema gerador de hidretos utilizado para os estudos.

Método sugerido pelo fabricante do equipamento para determinação sequencial de As e Se:

Canal 1: Amostra, a qual deve ser preparada em HCl 7,0 mol L⁻¹ e submetida ao aquecimento por 30 minutos a 70°C para redução do Se (VI) a Se (IV)

Canal 2: Ácido clorídrico concentrado

Canal 3: 0,6% (m v⁻¹) NaBH₄ em 0,5% (m v⁻¹) e KI 10% (m v⁻¹)

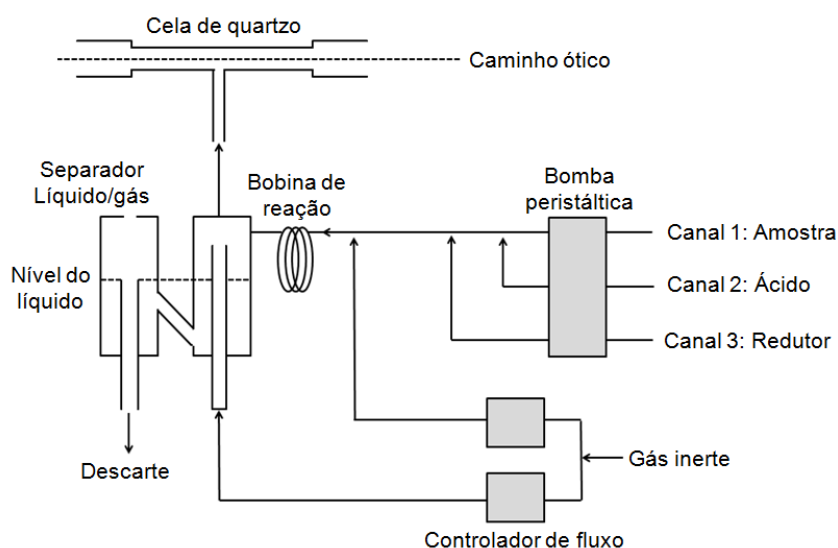


Figura 10. Esquema do gerador de hidretos usado na determinação de As e Se, Adaptação⁹⁵.

4.7. Extração assistida por ultrassom

4.7.1. Otimização do procedimento de extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo *cup horn*.

O procedimento de extração foi realizado usando o sonoreator do tipo *cup-horn*, descrito anteriormente. A otimização multivariada foi empregada para se avaliar as condições de extração. Inicialmente, os fatores: extrator, volume de

extrator, presença de HF, amplitude e tempo de sonicação foram estudados por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} (Tabela 14).

Para determinar as condições experimentais que, simultaneamente, propiciassem a extração quantitativa de todos os elementos, adotou-se a resposta múltipla⁸⁰ descrita no item 4.4.1.

Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usado para identificação dos fatores que afetam significativamente a extração do analitos em sonoreator do tipo *cup horn*

Experimento	Extrator	Volume de HF	Volume de extrator	Tempo	Amplitude
		(μ L)	(mL)	(min)	(%)
1	HNO ₃ ^a	0	1,00	10	60
2	HNO ₃ +HCl ^a	0	1,00	20	40
3	HNO ₃ ^a	100	1,00	20	40
4	HNO ₃ +HCl ^a	100	1,00	10	60
5	HNO ₃ ^b	0	1,50	20	60
6	HNO ₃ +HCl ^b	0	1,50	10	40
7	HNO ₃ ^b	100	1,50	10	40
8	HNO ₃ +HCl ^b	100	1,50	20	60

^a500 μ L; ^b750 μ L.

Mistura ácida: HNO₃+HCl (1:1, v:v)

A proporção dos ácidos concentrados HNO₃, HCl e HF foi otimizada utilizando um planejamento composto central 2^3 (Tabela 15). Os outros fatores foram fixados a partir dos resultados obtidos no planejamento fracionário 2^{5-2} . Em todos os experimentos do planejamento, a mistura de ácidos concentrados permaneceu em contato com a massa de amostra (aproximadamente 120 mg) durante 20 minutos. Água deionizada foi adicionada antes do início da sonicação para proporcionar o volume final do extrator.

Tabela 15. Matriz do planejamento composto central 2³ usado para a otimização da proporção dos ácidos empregados na extração dos analitos em sonoreator do tipo *cup horn*

Experimento	Volume (µL)		
	HNO ₃	HCl	HF
1	140	140	70
2	260	140	70
3	140	260	70
4	260	260	70
5	140	140	130
6	260	140	130
7	140	260	130
8	260	260	130
9	100	200	100
10	300	200	100
11	200	100	100
12	200	300	100
13	200	200	50
14	200	200	150
PC ^a	200	200	100

^aPonto central (Condições experimentais intermediárias).

4.7.2. Análise de fertilizantes orgânicos pelo procedimento otimizado de extração assistida por ultrassom.

A massa de amostra foi medida diretamente nos tubos de polipropileno (5,0 mL de capacidade). Em seguida, foram adicionados 0,50 mL da mistura de ácidos concentrados (HNO₃-HCl-HF, 5:3:3, v:v:v). Após 20 min de contato, foram adicionados 0,50 mL de água deionizada. Os tubos foram submetidos à sonicação durante 10 min com uma amplitude de 50%. Para evitar o aquecimento do sistema durante a sonicação, um fluxo de água a temperatura ambiente foi mantido durante todo o procedimento de extração. Terminada a sonicação, todo material sonicado foi transferido para tubos de centrifuga com capacidade para 15,0 mL, onde 1,50 mL de H₃BO₃ 4% (m v⁻¹) foram adicionados e o volume final ajustado para 10,0 mL com água deionizada. Por fim, a amostra foi centrifugada por 5 min com rotação de 3500 rpm antes da determinação do teor de metais no sobrenadante por FS FAAS.

4.8. Validação do método de extração assistida por ultrassom e do método para determinação de As e Se

Na validação dos métodos de extração assistida por ultrassom e do método para determinação de As e Se foram determinados os parâmetros: faixa linear, efeito de matriz, LD, LQ, precisão (em termos de repetitividade) e veracidade com material de referência certificado de lodo de esgoto (CRM029-50, FLUKA). Neste ponto do trabalho, a linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação ($> 0,99$) e pela inspeção visual dos gráficos de resíduos. Na validação do método de extração assistida por ultrassom, o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas foi usado como método de referência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química das amostras

Na Tabela 16 são apresentados os valores referentes à caracterização das amostras estudadas. Observa-se que os valores de pH variaram de 4,57 para a amostra de lodo de esgoto de Ouro Preto (LOP) a 8,25 para a amostra de esterco de boi (EB). Conforme os valores estabelecidos pelo MAPA (Tabelas 2), as amostras húmus de minhoca (HM) e LOP apresentaram valores de pH inferiores ao mínimo especificado e, portanto, não passariam no controle de qualidade. Para tortas vegetais não há um valor mínimo fixado (Tabela 1), logo a amostra de torta de mamona (TMA) está em conformidade com a legislação. Com relação aos teores de matéria orgânica (MO), a legislação brasileira estabelece o teor mínimo de 15% para fertilizantes orgânicos sólidos. Dentre as amostras estudadas, somente a amostra de terra vegetal apresentou valor inferior ao mínimo fixado (7,74%). As demais amostras apresentaram altos teores de MO, variando de 31,4 a 82,2%. Os valores de condutividade variaram de 1,56 a 36,2 dS m⁻¹, sendo que os maiores valores estão associados às amostras FS e MA-IMA, logo essas amostras apresentam maior concentração de espécies inorgânicas prontamente disponíveis quando comparado às outras amostras. É recomendável que a relação C/N de fertilizantes orgânicos esteja entre 15 e 20. Relações superiores a 20 comprometem a liberação de nitrogênio para as plantas. Nos casos em que as relações são superiores a 30, possivelmente, será estabelecida uma condição de competição entre micro-organismos e plantas pelo nitrogênio, ou seja, os micro-organismos, para utilizarem a matéria orgânica como fonte de energia, passarão a consumir o nitrogênio inorgânico presente na solução do solo. No Brasil, a relação C/N máxima aceitável é 20, deste modo, as amostras terra vegetal (TV) e torta de mamona do IMA não se enquadram ao padrão de qualidade estabelecido pela legislação vigente, visto que apresentaram C/N iguais a 49,9 e 25,6, respectivamente. As demais amostras apresentaram C/N variando de 3,51 a 18,5.

Tabela 16. Valores referentes à caracterização físico-químicas das amostras

	pH ^a	CE ^b (dS m ⁻¹)	C-Total ^c (%)	MO ^d (%)	H (%)	N-Total ^c (%)	C/N
Adubo Orgânico Quaresmeira (AOQ)	6,32 ± 0,02	9,20 ± 0,15	18,2 ± 0,3	31,4 ± 0,5	2,67 ± 0,11	1,38 ± 0,12	13,3
Torta de mamona + composto de lixo + minerais (VGR)	7,40 ± 0,04	10,8 ± 0,1	22,5 ± 1,0	38,8 ± 1,7	2,55 ± 0,18	3,35 ± 0,21	6,73
Terra vegetal (TV)	7,04 ± 0,06	1,56 ± 0,03	4,49 ± 0,59	7,74 ± 1,02	0,51 ± 0,00	0,09 ± 0,00	49,9
Húmus de minhoca (HM)	4,97 ± 0,07	9,00 ± 0,16	21,0 ± 0,6	36,1 ± 1,1	2,46 ± 0,28	1,14 ± 0,18	18,5
Torta de mamona (TMA)	5,64 ± 0,06	14,9 ± 0,3	27,6 ± 0,6	47,8 ± 1,0	3,20 ± 0,04	3,69 ± 0,29	7,49
Lodo de esgoto de Belo Horizonte (LBH)	6,32 ± 0,06	11,4 ± 0,1	26,7 ± 0,3	46,1 ± 0,4	4,08 ± 0,04	2,98 ± 0,01	8,98
Lodo de esgoto de Ouro Preto (LOP)	4,57 ± 0,03	21,7 ± 0,5	28,9 ± 0,2	49,8 ± 0,3	4,52 ± 0,06	3,65 ± 0,06	7,92
Composto de lixo de fazenda (CLF)	6,99 ± 0,06	15,7 ± 0,3	20,1 ± 0,4	34,6 ± 0,6	2,61 ± 0,01	1,92 ± 0,14	10,5
Material de referência de lodo de esgoto (MRC209)	7,13 ± 0,03	25,8 ± 0,5	30,0 ± 0,5	51,8 ± 0,8	4,82 ± 0,16	4,48 ± 0,10	6,70
Esterco de boi (EB)	8,25 ± 0,00	18,7 ± 0,3	22,1 ± 0,1	38,1 ± 0,1	3,43 ± 0,12	1,60 ± 0,11	13,8
Farinha de sangue (FS)	6,88 ± 0,03	28,8 ± 0,4	47,7 ± 0,1	82,2 ± 0,2	6,90 ± 0,22	13,6 ± 0,1	3,51
Torta de mamona do IMA (MA-IMA)	6,64 ± 0,05	36,2 ± 0,8	40,3 ± 0,7	69,4 ± 1,2	5,46 ± 0,24	1,57 ± 0,10	25,6

^aCaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (1,0 g : 5,0 mL); ^bCondutividade elétrica em água (1,0 g : 10,0 mL); ^cAnálise elementar (CHN); ^dMO = C-total*1,724.

5.2. Desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos por FS FAAS após procedimentos de digestão assistido por radiação micro-ondas em forno com cavidade

5.2.1 Seleção da amostra para a otimização e condições pré-estabelecidas

O procedimento que foi desenvolvido visava à determinação de metais tóxicos e micronutrientes em amostras de fertilizantes orgânicos e em resíduos orgânicos. Assim, esse procedimento deveria atender desde amostras com relativa facilidade de decomposição até amostras mais complexas, com diferentes características, como por exemplo, grau de polimerização da matéria orgânica e presença ou ausência de silicatos. Para isso, foi necessário selecionar uma amostra que levasse em consideração tais variações para se realizar a otimização do método.

Dentre as amostras disponíveis, o lodo da ETE de Belo Horizonte (LBH) foi a amostra que mais se adequou aos experimentos de otimização e validação, pois apresentava teores quantificáveis de metais tóxicos pela técnica FS FAAS, alto teor de matéria orgânica e quantidade de amostra suficiente para os numerosos experimentos que essas etapas exigiam, além, é claro, de possuir uma matriz considerada complexa. Deste modo, um procedimento de decomposição eficiente para esta amostra, muito provavelmente atenderia as demais amostras.

Pelo fato das amostras esterco de boi (EB), farinha de sangue (FS) e torta de mamona do IMA (MA-IMA) apresentarem matrizes muito diferentes da matriz da amostra de lodo de esgoto (LBH), alguns dos procedimentos de decomposição avaliados foram testados com a finalidade de confirmar a resistência dessas amostras aos procedimentos de decomposição.

Em função dos teores estabelecidos pela legislação, dos teores de metais encontrados na amostra selecionada e da sensibilidade da técnica usada para determinação dos elementos foi fixada a proporção volume final do digerido e massa de amostra em 100:1, volume(mL): massa(g) para todos os procedimentos. Outro fator limitante das condições avaliadas foi o volume mínimo de 8,0 mL dentro dos frascos reacionais de perfluoroalcoxi (PFA) do forno de micro-ondas, recomendado pelo fabricante. Este volume é necessário para que o sensor de temperatura entre em contato com a amostra dentro do frasco de referência e permita que as medidas

de temperatura sejam realizadas de forma eficiente ao longo de todo o procedimento de digestão.

5.2.2. Avaliação quantitativa dos resíduos sólidos provenientes das amostras de fertilizantes após diferentes procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas

Como os fornos de micro-ondas com cavidade são sistemas fechados que permitem o uso de condições mais drásticas de decomposição (altas pressões e temperaturas), sem perdas significativas do analito por volatilização, inicialmente, buscou-se desenvolver um método de decomposição que destruísse totalmente a matriz das amostras. Desta forma, este método após validação proporcionaria valores de referência para o desenvolvimento do procedimento de extração no bloco digestor (condições brandas), já que ambos os métodos tem a finalidade de atender uma série de amostras com características bem distintas.

Antes de chegar ao programa de aquecimento usado nos procedimentos avaliados, testes preliminares com a amostra LBH foram realizados empregando-se tempo de aquecimento e temperatura menores, com ácido nítrico concentrado e com água régia. Entretanto, como não obteve-se êxito, utilizou-se às condições limites de temperatura e potência do equipamento (Figura 8). Mesmo assim, não foi possível destruir totalmente a matéria orgânica de todas as amostras. Vale a pena ressaltar que o tempo de contato prévio evitou formação de grande quantidade de espuma, além de evitar o transbordamento da amostra do frasco reacional do forno de micro-ondas quando o H_2O_2 era adicionado.

Apesar da natureza orgânica das amostras sugerir o HNO_3 concentrado como melhor opção para destruição da matriz orgânica, utilizando-se apenas esse ácido (procedimento I e II, Tabela 9) conseguiu-se a destruição total da matriz, apenas para as amostras TMA-IMA e FS. O mesmo procedimento não foi eficiente na destruição da matriz das amostras EB e LBH, uma vez, que quantidades consideráveis de resíduos sólidos orgânicos e inorgânicos persistiram após o procedimento de decomposição (Figura 11).

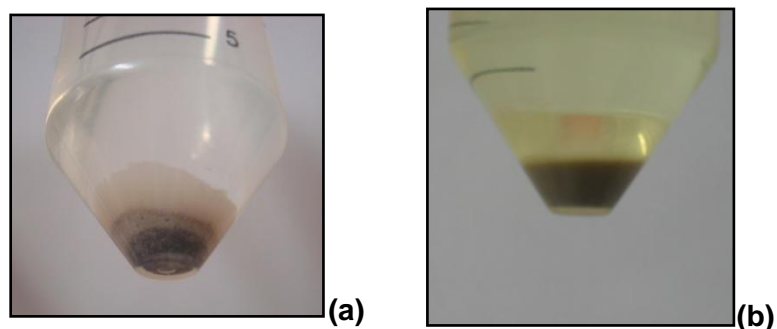


Figura 11. Resíduos remanescentes após o procedimento II (HNO_3 concentrado e programa de aquecimento I), amostras de esterco de boi (a) e de lodo de esgoto de Belo Horizonte (b).

Deste modo, optou-se fazer testes com a mistura dos ácidos HNO_3 e HCl na proporção de formação de água régia ($\text{HNO}_3\text{-HCl}$, 1:3, v:v) e água régia invertida ($\text{HNO}_3\text{-HCl}$, 3:1, v:v) com intuito de conseguir redução dos resíduos remanescentes, uma vez que misturas contendo tais ácidos geram o cloro molecular e cloreto de nitrosila (NOCl) como produto da oxidação do HCl pelo HNO_3 , produtos que possuem alto poder oxidante e são intensamente reativos³⁵. Entretanto, como mostrado na Figura 12, o uso dessas soluções não resultou em redução dos resíduos remanescentes quando se aplicou os procedimentos III e IV (Tabela 9) à amostra LBH.

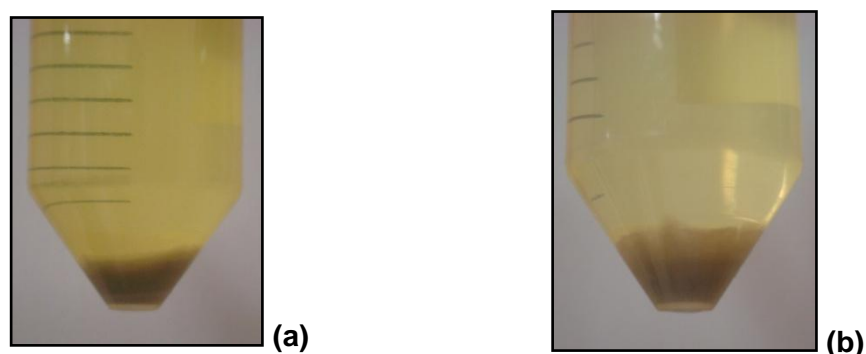


Figura 12. Resíduos remanescentes da amostra lodo de esgoto de Belo Horizonte: Procedimento com água régia (a) e procedimento com água régia invertida (b), ambos com o programa de aquecimento I.

Nos resíduos remanescentes após as tentativas de decomposição das amostras esterco de boi e lodo de esgoto de Belo Horizonte foram identificados

crystalos brancos mais densos que o restante dos resíduos, possivelmente silicatos, em quantidades bem menores que os resíduos leves e amorfos (matéria orgânica não oxidada), escuros ou claros, dependendo da amostra. A matéria orgânica altamente resistente, possivelmente está associada aos compostos de silício.

Para se destruir os resíduos silicatados empregou-se o ácido fluorídrico nos procedimentos. O procedimento VII (digestão com água régia e adição posterior de HF ao resíduo remanescente) é uma adaptação do método da literatura⁹⁶. Empregou-se a radiação ultrassônica, inicialmente, para ajudar na dissolução dos silicatos e posteriormente para auxiliar na solubilização do ácido bórico (H_3BO_3). Ainda assim, a combinação água régia no forno de micro-ondas, ácido fluorídrico e radiação ultrassônica não foi suficiente para destruir de forma satisfatória a matriz das amostras EB e LBH, mesmo tendo observado pequena redução na quantidade de resíduos. Aparentemente, os silicatos foram solubilizados, mas a matriz orgânica, não. As últimas tentativas para efetuar-se a destruição total da matriz foram a redução da massa de amostra de 200 para 150 mg e adição de 1,0 mL de HF à amostra antes do programa de aquecimento do forno de micro-ondas. Embora o digerido de LBH obtido com o procedimento VI (água régia + HF) se apresentasse límpido e sem resíduos (Figura 13. a), não ocorreu destruição total, uma vez que um resíduo preto (Figura 13. b) ficou aderido fortemente à parede dos frascos de PFA. Para conseguir limpar os frascos foi necessário um procedimento mais drástico, com ácidos concentrados e com rodadas de limpeza no forno de micro-ondas. Desta forma, esse procedimento não seria viável para ser empregado como um procedimento de rotina.

O procedimento V (HNO_3 + HF), também não foi eficiente para destruir toda a matriz da amostra LBH, porém observou-se redução significativa da quantidade de resíduo remanescente (Figura 14. a). Resultado semelhante foi obtido quando o procedimento VIII (água régia invertida + HF) foi aplicado à amostra LBH (Figura 14. b).

Levando-se em consideração apenas a quantidade de resíduo remanescente e questões práticas com relação à limpeza dos frascos, os melhores procedimentos de decomposição foram V e VIII. Porém, como em nenhum caso foi constatado a completa solubilização da amostra, as concentrações determinadas para os analitos estudados foram o parâmetro de seleção do procedimento de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade.

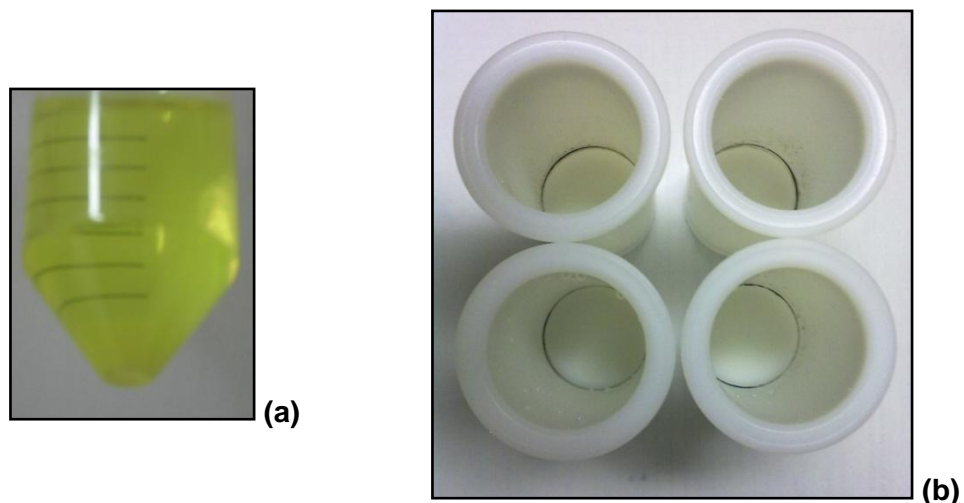


Figura 13. Digerido obtido com o procedimento empregando água régia, HF (procedimento VI) e programa de aquecimento I (a) e resíduo aderido fortemente aos frascos de PFA após a realização do procedimento VI (b).



Figura 14. Resíduos remanescentes da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte após aplicação do procedimento com HNO_3 e HF (a) e do procedimento com água régia invertida e HF (b), ambos com o programa de aquecimento I.

5.2.3. Avaliação dos diferentes procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas quando às concentrações determinadas

Nesta etapa, foram determinados Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn nos digeridos da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte obtidos após diferentes procedimentos de decomposição. Com exceção do cromo, os valores obtidos pelos procedimentos não apresentaram grandes diferenças (Figuras 15 e 16). Entretanto,

foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para alguns analitos quando foi aplicado o teste Tukey ao nível de 95% de confiança (Tabela 17).

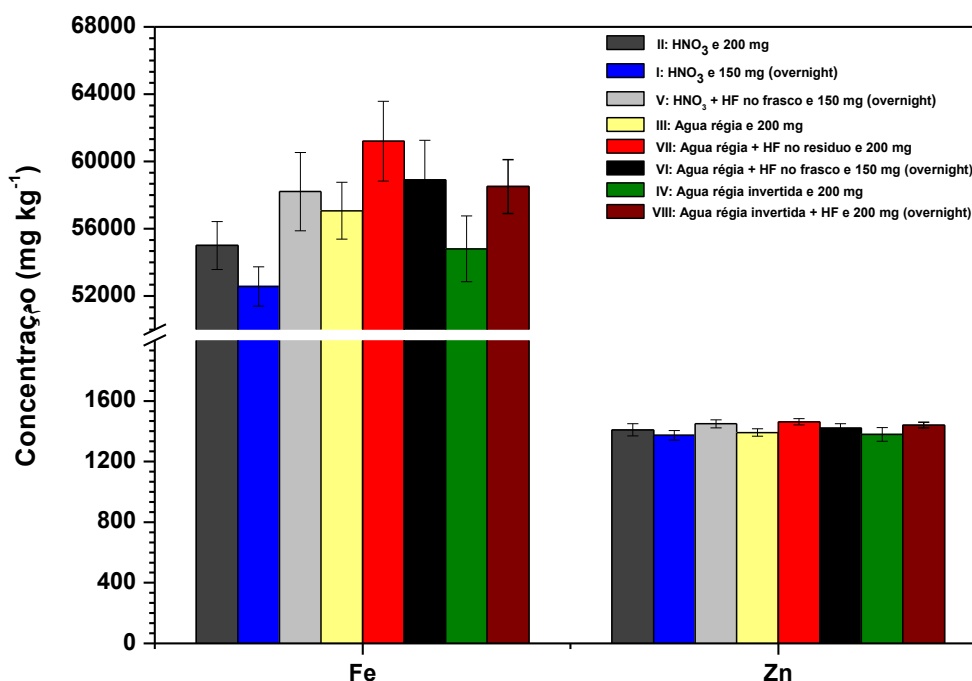


Figura 15. Concentrações médias ($n = 3$) de Fe e Zn determinadas a partir dos diferentes procedimentos aplicados à amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte. Todos os procedimentos com o programa de aquecimento I.

Em geral, os procedimentos I e II proporcionaram as menores concentrações, indicando que a mistura dos ácidos HNO₃ e HCl é a melhor opção para este tipo de amostra. A natureza mista da amostra de lodo de esgoto (LBH), orgânica e inorgânica, justifica o sucesso da mistura frente ao nítrico concentrado, uma vez que o ácido clorídrico apresenta propriedade complexante, responsável, em parte, pela dissolução da fração inorgânica não silicatada, além da presença de cloro molecular e cloreto de nitrosila, altamente oxidantes³⁵.

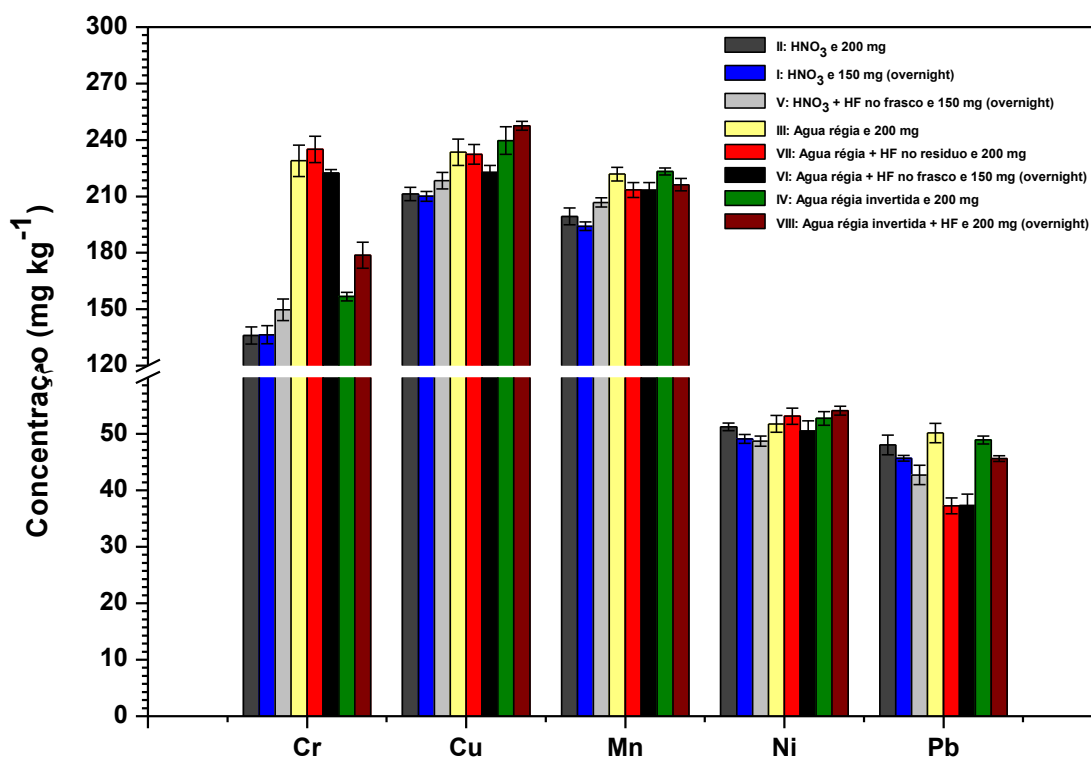
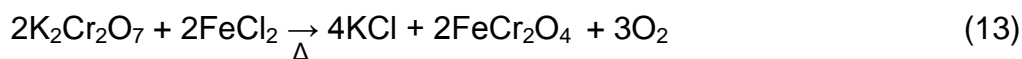
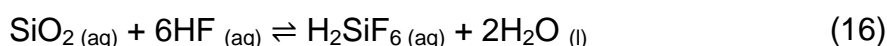
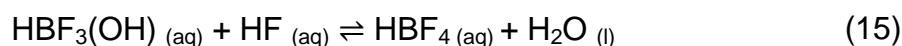
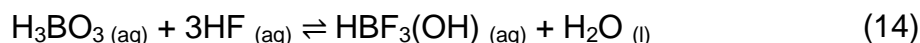


Figura 16. Concentrações médias ($n = 3$) de Cr, Cu, Mn, Ni, e Pb determinadas a partir dos diferentes procedimentos aplicados à amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte. Todos os procedimentos com programa de aquecimento I. (Concentração de Cd e Co < LQ).

Com relação à determinação do Cr vale ressaltar que as medidas, neste ponto do trabalho, foram realizadas com chama do tipo ar/acetileno redutora. Uma vez que, caso fosse possível realizar a determinação do Cr com este tipo de chama, o Cr poderia ser determinado sequencialmente junto com os demais elementos contribuindo para a redução do tempo requerido para a determinação dos elementos. As concentrações de Cr nos procedimentos III, VI e VII foram nitidamente superiores às determinadas com os outros procedimentos. Estudos^{97, 98} indicam que pode ocorrer depressão do sinal de absorção do cromo quando sua determinação é realizada em condições oxidantes (mistura ácida oxidante, HNO_3 mais H_2O_2) e na presença de altas concentrações de Fe. Segundo Krug e co-autores⁹⁸ tal interferência ocorre em função da formação da cromita (FeCr_2O_7), um óxido de cromo duplo refratário que é formado antes da volatilização, conforme a equação 13⁹⁸. Assim, é compreensível que os procedimentos que empregaram menores quantidades de HNO_3 proporcionassem as maiores concentrações de Cr.



Dentre os procedimentos com a mistura de HNO_3 e HCl , em geral, os procedimentos com HF forneceram concentrações ligeiramente maiores que os procedimentos sem HF , entretanto, quando foi aplicado o teste Tukey ao nível de 95% de confiança não foi verificada diferença estatística (Tabela 17). Apenas para o Pb foi verificado, após teste estatístico, que os menores valores estavam associados aos procedimentos com HF . Nestes procedimentos foram adicionados aproximadamente, 500 mg de H_3BO_3 com a finalidade de complexar o excesso de íons fluoretos, de acordo com as etapas representadas pelas equações 14 e 15, evitando possíveis corrosões das partes do equipamento constituídas de vidro³⁵ (Equação 16), como por exemplo, a pérola de impacto.



Possivelmente, um meio com maior concentração salina pode ter sido responsável por uma interferência que resultou em menor sinal de absorção do Pb . Além disso, os menores valores, entre todos os procedimentos, são associados aos métodos VI e VII. Segundo Hristozov e colaboradores⁵⁹ a determinação de Pb é altamente influenciada pela presença de HCl e HF no meio em função da possibilidade de formação de diferentes tipos de sais halogenados com baixa solubilidade.

Procedimentos que visam a determinação de uma série de analitos, como neste caso, dificilmente contemplam as melhores condições de determinação para todos os analitos, assim optou-se por selecionar um procedimento que atendesse o maior número de analitos e que apresentasse maior simplicidade e menor custo. No caso, os resultados indicam que está ocorrendo solubilização dos analitos sem a necessidade de destruição total amostra, ou seja, sem adição de HF . Assim, os procedimentos com água régia (III) ou com água régia invertida (IV) seriam suficientes para a quantificação da maioria dos analitos presentes em lodo de esgoto.

Tabela 17. Valores de concentração média (n=3) de micronutrientes e contaminantes inorgânicos presentes na amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte para os diferentes procedimentos avaliados

Procedimento	Reagentes	Concentração ± desvio padrão (mg kg ⁻¹)								
		Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
II	HNO ₃	<LQ	<LQ	136,0a ± 4,5	211,2a ± 3,6	55006ab ± 1426	199,3ab ± 4,5	51,24abcd ± 0,67	48,03cd ± 1,75	1409abc ± 41
I	HNO ₃ (<i>overnight</i>)	<LQ	<LQ	136,4ab ± 4,8	210,0a ± 2,6	52564a ± 1167	194,1a ± 2,2	49,11ab ± 0,80	45,67bc ± 0,50	1373a ± 32
V	HNO ₃ + HF (<i>overnight</i>)	<LQ	<LQ	149,7bc ± 5,7	218,3ab ± 4,4	58201bc ± 2328	206,8bc ± 2,4	48,68a ± 0,90	42,72b ± 1,73	1449bc ± 26
III	Água régia	<LQ	<LQ	228,9e ± 8,4	233,5cd ± 7,0	57070abc ± 1693	221,9e ± 3,6	51,76bcd ± 1,49	50,16d ± 1,72	1392abc ± 24
VII	Água régia + HF no resíduo	<LQ	<LQ	235,0e ± 7,0	232,4cd ± 5,2	61205c ± 2368	213,4cd ± 4,0	53,13cd ± 1,41	37,24a ± 1,39	1462c ± 20
VI	Água régia + HF no frasco (<i>overnight</i>)	<LQ	<LQ	222,5e ± 1,9	222,8bc ± 3,8	58900bc ± 2356	213,3cd ± 4,1	50,49abc ± 1,82	37,30a ± 2,04	1421bc ± 28
IV	Água régia invertida	<LQ	<LQ	156,7c ± 2,3	239,7de ± 7,3	54801ab ± 1956	223,3e ± 1,9	52,73cd ± 1,22	48,91cd ± 0,70	1379ab ± 45
VIII	Água régia invertida + HF (<i>overnight</i>)	<LQ	<LQ	178,7d ± 6,9	247,56e ± 2,3	58507bc ± 1608	216,2de ± 3,3	54,11d ± 0,78	45,62bc ± 0,51	1441abc ± 18

As médias seguidas de uma mesma letra, dentro de uma mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

A determinação do Cr foi o único caso em que foi observada uma diferença significativa entre concentrações determinadas com os dois procedimentos, com maior concentração quando a água régia foi empregada. Porém, os procedimentos com a água régia deixam os frascos de digestão impregnados com pontos pretos de difícil remoção. Assumindo a hipótese que essa diferença era devida a interferências durante a determinação e não devido à diferença de eficiência de extração dos procedimentos, foi realizado um estudo para avaliar e entender as supostas interferências antes de definir qual procedimento seria mais adequado.

5.2.4. Avaliação das interferências químicas sobre a determinação de Cr

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a interferência do Fe e do carbono orgânico residual (C_{org}) e possíveis formas de atenuá-las. Até este ponto do trabalho somente chama do tipo ar/acetileno redutora havia sido utilizada para as determinações de cromo.

O estudo para avaliar a interferência do C_{org} constituiu do preparo de soluções de Cr $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meios contendo concentrações crescentes de C (glicose) nas condições de acidez do digerido obtido com o procedimento assistido por radiação micro-ondas (água régia invertida, 30% v v⁻¹). Os sinais de absorvância foram medidos com chama ar/acetileno e chama óxido nitroso/acetileno, pois embora a chama ar/acetileno redutora possa ser usada satisfatoriamente para determinação de Cr, na literatura é relatado o uso da chama de óxido nitroso/acetileno para correções de interferências químicas⁹⁸. Os resultados obtidos com a chama ar/acetileno (Figura 17) mostram que o carbono orgânico residual foi responsável pelo aumento do sinal médio de absorvância em torno de 44% quando a chama ar/acetileno foi usada para a atomização, confirmando uma substancial interferência do C_{org} quando a atomização ocorre com chama deste tipo. Já os valores de absorvâncias obtidos com chama óxido nitroso/acetileno (Figura 17) mostram que em média o carbono orgânico residual causa redução do sinal em 12% para a condição de acidez avaliada, confirmando a eficiência para atenuar tal interferência. Outro ponto relevante se refere ao aumento de sensibilidade devido ao aumento de temperatura. O sinal de absorvância aumenta por um fator de 4,3 vezes quando a chama óxido nitroso/acetileno é empregada para a determinação.

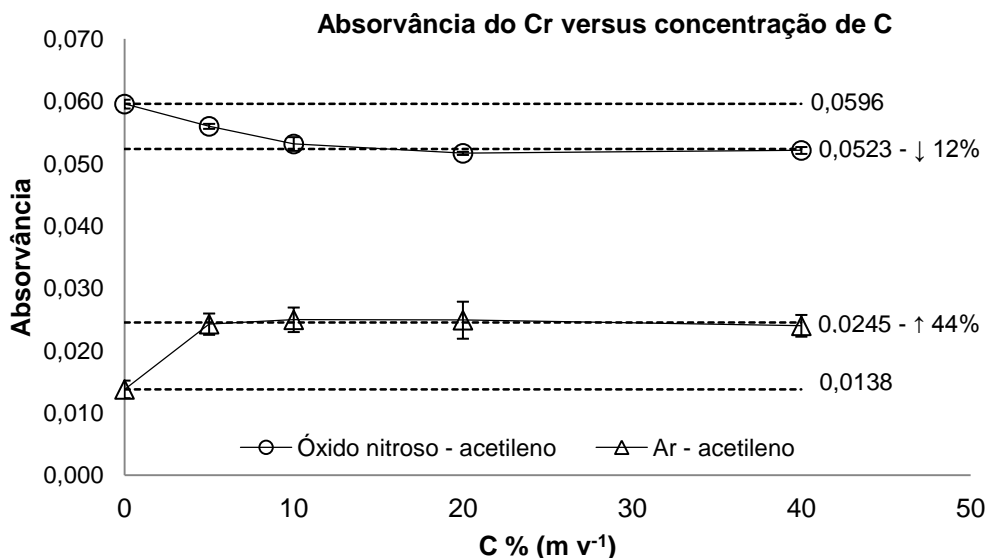


Figura 17. Valores de absorvância do Cr ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) medidos com chama ar/acetileno (Δ) e óxido nitroso/acetileno (\circ) na presença de diferentes concentrações de C_{org} .

O experimento para avaliar a interferência do Fe consistiu do preparo de soluções contendo $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr em concentrações crescentes de Fe. Na literatura⁹⁹ é reportado o uso de cloreto de amônio para atenuar tal interferência, assim o uso deste sal também foi avaliado. Os sinais de absorvância foram medidos empregando as duas chamas. Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos para este estudo. Quando a chama do tipo ar/acetileno foi empregada para as medidas, observa-se que o Fe, mesmo em pequenas quantidades, foi responsável pela depressão do sinal de absorção em aproximadamente 56% e que o uso de NH_4Cl reduz tal depressão para 10%. Quando a chama óxido nitroso/acetileno foi usada para as medidas, a interferência do ferro não foi expressiva para as diferentes razões Fe:Cr, na presença ou ausência do NH_4Cl . Neste caso, também foi observado o aumento da sensibilidade (1,5 vezes maior) em função do tipo de chama usada. Deste modo, foi constatado que a chama óxido nitroso/acetileno realmente é a melhor opção para a determinação de Cr, tanto pelo fato de atenuar as interferências químicas quanto pelo aumento da sensibilidade.

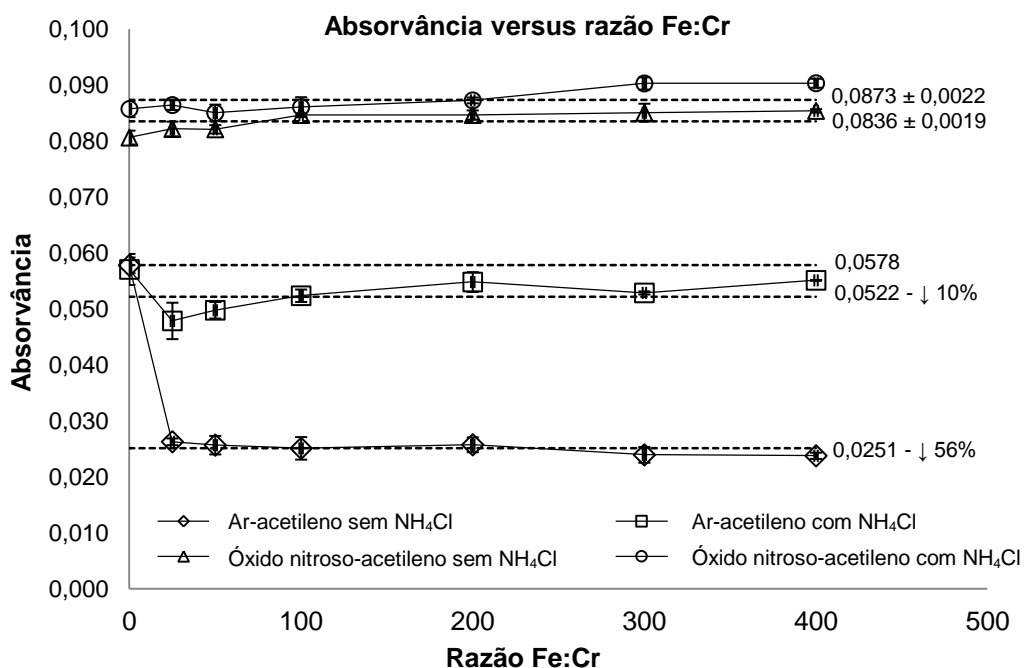


Figura 18. Valores de absorvância do Cr ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) medidos com chama ar/acetileno e óxido nitroso/acetileno, com ou sem adição de NH_4Cl para diferentes razões Fe:Cr.

Após concluir que a melhor opção foi a utilização da chama óxido nitroso/acetileno optou-se pelo procedimento com água régia invertida. Possivelmente, os maiores valores de concentração observados pelo método com água régia deve-se ao maior teor de carbono orgânico residual, visto que esta mistura ácida contém maior porcentagem de ácido clorídrico e, portanto é menos eficiente para a oxidação da matéria orgânica quando comparada à água régia invertida que contém maior porcentagem de ácido nítrico. Assim, os maiores valores eram devidos a uma interferência positiva do carbono orgânico residual.

Toda especulação realizada aqui será devidamente confirmada na etapa de validação, mais especificamente no parâmetro de desempenho veracidade do método pela análise do material de referência certificado. Vale ressaltar que o procedimento em bloco digestor estava sendo desenvolvido paralelamente ao método com micro-ondas. Resultados semelhantes para o Cr também foram encontrados para o bloco digestor, porém não foi verificado nenhum empecilho prático (formação de resíduos pretos fortemente aderidos aos frascos) quando a água régia foi utilizada. Assim, esta mistura ácida foi eleita como melhor opção para o procedimento em bloco digestor.

Embora o molibdênio não tenha sido estudado na etapa de otimização, o uso da chama óxido nitroso/acetileno para o Cr, abriu possibilidade deste elemento ser determinado sequencialmente com o Cr, visto que o Mo também é um micronutriente e exige chamas com temperatura mais elevada para sua determinação. Deste modo, este elemento será incluído na etapa de validação.

5.2.5. Redução do tempo do programa de aquecimento do forno de micro-ondas

Identificada a água régia invertida sem o uso de HF (procedimento VII), como melhor opção para o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas e levando-se em consideração questões de economia e praticidade; ainda restavam dois pontos a serem melhorados. Primeiro ponto é o longo tempo do programa de aquecimento (40 min de aquecimento mais 30 min de resfriamento), visto que inicialmente buscavam-se as condições que propiciassem a destruição total da amostra. O segundo ponto está no fato de que mesmo deixando a amostra em contato com a mistura ácida por uma hora, no momento de adicionar o H_2O_2 ocorria a formação de grande quantidade de espuma, sendo que para alguns casos, como por exemplo, esterco de boi, parte da amostra transbordava dos frascos. Diante disso, avaliou-se um programa de aquecimento com 25 min de aquecimento, uma rampa de 10 min até 200 °C mais 15 min a 200 °C (Figura 9) e avaliou-se a possibilidade de adicionar os ácidos separadamente, sem a mistura prévia do HNO_3 e HCl , sobre a amostra no frasco do forno de micro-ondas, na ordem: HNO_3 (4,50 mL), H_2O_2 (2,00 mL) e HCl (1,50 mL), sem deixar em contato por uma hora. Após a adição dos reagentes de decomposição, os frascos foram lacrados e submetidos ao programa de aquecimento.

Não foi verificada formação significativa de espuma quando os reagentes foram adicionados separadamente. A adição de HNO_3 e H_2O_2 à amostra antes da adição do HCl reduziu a liberação de gases resultantes da reação do HNO_3 com HCl . Logo, menor quantidade de espuma foi formada.

As concentrações determinadas com o novo procedimento são apresentadas na Tabela 18 onde pode-se verificar que não há diferença significativa (tese t de Student, 95%) entre as concentrações obtidas pelos dois procedimentos para um mesmo elemento. Portanto, a adição dos ácidos sem a mistura prévia e a redução

do tempo de aquecimento não interferiram na extração dos elementos estudados. Assim, o procedimento de decomposição assistida por micro-ondas otimizado ficou definido como: 200 mg de amostra + 4,50 mL de HNO₃ + 2,00 mL de H₂O₂ + 1,50 ml de HCl, nesta ordem de adição, seguida da submissão ao programa II de aquecimento (10 min até 200 °C e 15 min a 200 °C) sem o tempo de contato.

Tabela 18. Concentrações determinadas com o procedimento VII (água régia invertida e programa de aquecimento I) e com o procedimento IX (reagentes separados e programa de aquecimento II)

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)	
	Procedimento VII	Procedimento IX
	Água régia invertida e programa I	Reagentes separados e programa II
Cd	< LQ	< LQ
Co	< LQ	< LQ
Cr*	162 ^a ± 2	177 ^a ± 2
Cu	240 ^a ± 7	227 ^a ± 5
Fe	54801 ^a ± 1956	53349 ^a ± 1550
Mn	223 ^a ± 2	224 ^a ± 5
Ni	52,7 ^a ± 1,2	53,0 ^a ± 1,8
Pb	48,9 ^a ± 0,7	50,1 ^a ± 1,9
Zn	1379 ^a ± 45	1368 ^a ± 31

*óxido nitroso/acetileno. As médias seguidas de uma mesma letra, dentro de uma mesma linha não diferem entre si pelo teste de t ao nível de 95% de confiança.

5.3. Desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de micronutrientes e contaminantes em fertilizantes orgânicos por FS FAAS empregando bloco digestor

As condições experimentais que permitiram extrair eficientemente os metais presentes nas matrizes foram obtidas por meio de estudos univariados, no caso da seleção do extrator, e multivariados para os outros fatores. De modo geral, a seleção dos níveis das variáveis foi feita a partir de métodos semelhantes, já descritos na literatura, e também da necessidade de empregar condições mais brandas, sempre que possível, visando economia, redução de contaminação (volume menores de reagentes) e perdas do analito. Nesta etapa trabalhou-se apenas com a amostra LBH pelos motivos expostos no item 5.2.1.

5.3.1 Avaliação do extrator por meio de procedimento univariado

Inicialmente, foi avaliada a eficiência de quatro possíveis extratores para o procedimento de extração ácida em bloco digestor. Assim, em um estudo univariado foram avaliados HNO_3 concentrado, HCl concentrado, água régia e água régia invertida.

As concentrações dos analitos obtidas com cada extrator são mostradas na Tabela 19. De modo geral, os extratores HCl , água régia (AR) e água régia invertida (ARI), proporcionaram concentrações próximas e maiores que HNO_3 (Figuras 19 e 20) confirmando o efeito do HCl no procedimento de extração, já constatado pelos experimentos de otimização do procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas. Após aplicação do teste Tukey ao nível de 95% constatou-se que para a maioria dos elementos o uso de AR ou ARI não proporcionou extrações estatisticamente diferentes (Tabela 19). Apenas no caso do Cr o HCl concentrado sozinho proporcionou a maior concentração extraída, porém como já mencionado, tal diferença entre os valores determinados com diferentes extratores pode ser justificada pela interferência das altas concentrações de Fe e condições oxidantes, neste caso, o HCl concentrado sozinho não é eficiente para oxidar a matéria orgânica, assim o extrato apresenta maior teor de carbono residual, o qual na chama irá gerar condições redutoras, aumentando o sinal de absorção do Cr. Frisando que o desenvolvimento deste procedimento foi realizado paralelamente ao desenvolvimento do procedimento de decomposição assistida por micro-ondas e que portanto neste ponto as determinações de Cr ainda estavam sendo realizadas com chama do tipo ar/acetileno redutora.

Considerando a natureza orgânica das amostras, o fato do HCl apresentar propriedades complexantes, ser mais barato e, geralmente, apresentar menos contaminantes, dentre as duas misturas ácidas, optou-se pela água régia (HCl-HNO_3 na razão 3:1) pelo fato desta apresentar maior quantidade de HCl .

Tabela 19. Valores de concentração média (n=3) de micronutrientes e contaminantes inorgânicos presentes na amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte para cada extrator avaliado para o procedimento de extração em bloco digestor

Extrator	Concentração ± desvio padrão (mg kg ⁻¹)								
	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
HNO ₃	<LQ	<LQ	254,2a ± 7,3	227,1a ± 2,8	53417a ± 1730	188,6a ± 2,9	41,87a ± 0,39	46,07a ± 1,09	1476ab ± 12
HCl	<LQ	<LQ	379,2c ± 3,3	220,6a ± 4,5	59044a ± 875	206,5b ± 3,9	46,66b ± 1,45	46,73a ± 1,12	1451a ± 19
Água régia (AR)	<LQ	<LQ	300,6b ± 1,8	227,1a ± 3,4	58195a ± 386	201,8b ± 3,1	51,61c ± 1,16	45,59a ± 1,05	1505ab ± 20
Água régia invertida (ARI)	<LQ	<LQ	258,5a ± 2,0	239,3b ± 6,4	55490a ± 2343	204,7b ± 3,60	46,25b ± 1,43	47,81a ± 1,65	1508b ± 23

Médias seguidas por letras iguais dentro de uma mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

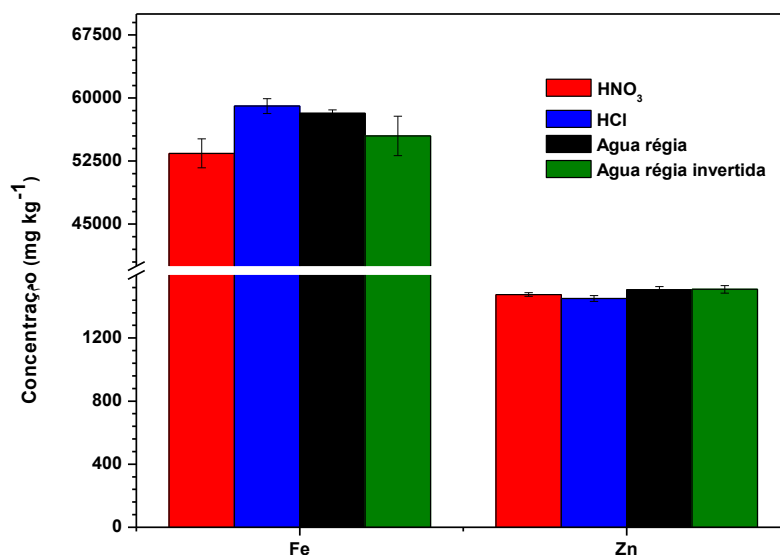


Figura 19. Concentrações médias ($n = 3$) de Fe e Zn extraídas da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte com os diferentes extratores avaliados.

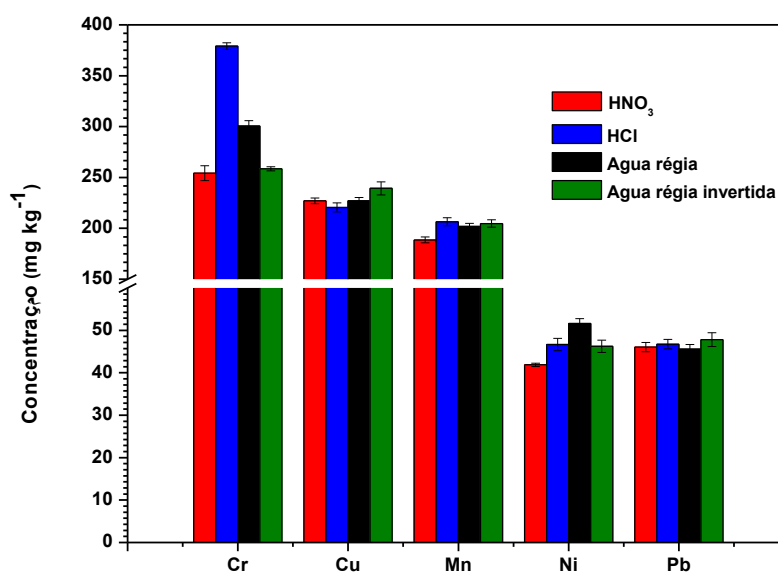


Figura 20. Concentrações médias ($n = 3$) de Cr, Cu, Mn, Ni, e Pb extraídas da amostra de lodo de esgoto de Belo Horizonte com os diferentes extratores avaliados.

5.3.2. Planejamento fatorial completo 2^4 com repetição no ponto central

Definido a água régia como extrator, fez-se necessário estudar as outras variáveis para esse extrator. Deste modo, foi avaliado o efeito das variáveis, volume de água régia (2,00 e 5,00 mL), volume de H₂O₂ (0 e 1,50 mL), tempo (15 e 75 min) e temperatura (65 e 115 °C) sobre a eficiência da extração ácida em bloco digestor

por meio de um planejamento fatorial completo 2^4 . O gráfico de Pareto (Figura 21) construído com as respostas múltiplas mostra que as quatro variáveis avaliadas apresentaram efeito significativo sobre o procedimento. As variáveis, temperatura, tempo e volume de H_2O_2 apresentaram efeito significativo e positivo e a variável volume de água régia apresentou efeito significativo negativo, indicando que, entre os níveis estudados, consegue-se extrair maior quantidade dos analitos quando forem empregados 2,00 mL de água régia; 1,50 mL de H_2O_2 e aquecimento a $115\text{ }^\circ\text{C}$ durante 75 minutos. Assim, dentre os níveis avaliados verifica-se que é necessário maior quantidade de energia, maior quantidade do H_2O_2 e maior tempo para promover a extração. O fato de menores volumes de água régia fornecerem maiores concentrações extraídas possivelmente está relacionado com as limitações do sistema empregado para a extração, uma vez que foi observado, logo no início do aquecimento, formação de espuma, sendo que nos ensaios com maiores volume de água régia a quantidade formada também foi maior e subiu até bem próximo da extremidade superior do tubo, permitindo que uma quantidade considerável de amostra ficasse aderida às paredes, prejudicando a extração do analito. A partir desse ponto, optou-se por sempre deixar a amostra em contato com a mistura ácida por 20 minutos sem aquecimento para atenuar a formação de espuma. Supostamente, ocorre oxidação parcial das substâncias responsáveis por reter os gases liberados (formação de espuma) no início do aquecimento nesse período de tempo.

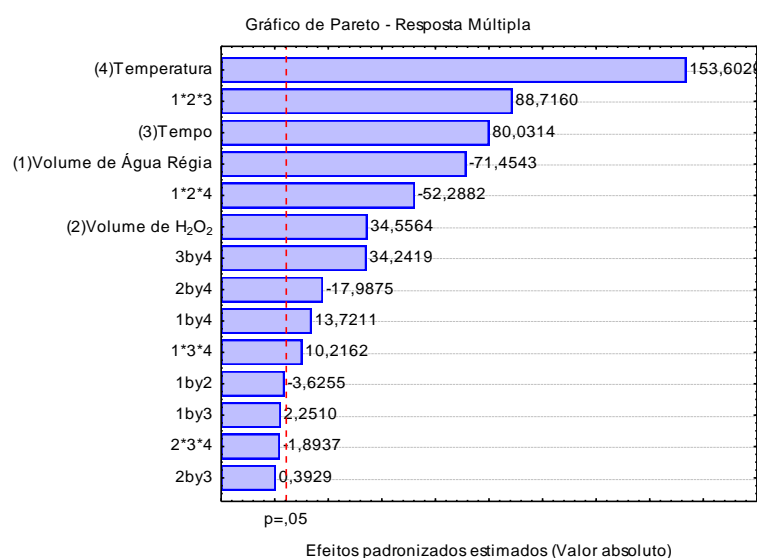


Figura 21. Gráfico de Pareto com as respostas múltiplas do planejamento fatorial completo 2^4

Além dos efeitos principais significativos, na Figura 21, são observadas interações significativas de segunda (1^*4 , 2^*4 e 3^*4) e terceira (1^*2^*3 , 1^*2^*4 e 1^*3^*4) ordem. De modo geral, tais interações podem ser justificadas da seguinte forma: as interações 2^*4 e 1^*2^*4 foram negativas, pois maiores temperaturas podem resultar na decomposição do peróxido de hidrogênio antes que este desempenhe sua função de agente oxidante auxiliar e a água régia pode perder sua eficiência de extração, por meio de intensa liberação de gases oxidantes nas temperaturas mais elevadas. As interações 1^*2^*3 , 1^*3^*4 e 3^*4 foram positivas indicando que um maior tempo de aquecimento aliado às maiores temperaturas e volumes dos reagentes melhora a eficiência de extração. Já que todas variáveis estudadas apresentaram efeitos principais significativos, a seleção dos níveis avaliados no próximo planejamento foi baseada somente nos efeitos principais. O planejamento fatorial completo indicou quais as variáveis afetam significativamente o processo e pode também ser utilizado para se definir a região que deve ser estudada na próxima etapa, na qual se obtém a superfície de resposta, que fornecerá as condições ótimas para o procedimento.

5.3.3. Planejamento composto central 2^3 (CCD)

Com a finalidade de se encontrar as condições ideais para o procedimento de extração em bloco digestor, utilizou-se a metodologia da superfície de resposta (MSR). Para isso, realizou-se o planejamento composto central (CCD) em que as variáveis estudadas foram avaliadas em um número maior de níveis. A partir dos resultados encontrados no planejamento completo 2^4 , foram selecionadas as variáveis e os níveis que foram estudados nesta etapa. Como para o volume de água régia o planejamento anterior indicou o menor volume avaliado (2,00 mL) como melhor condição, no CCD deveria ter sido estudados volumes em torno de 2,00 mL. Entretanto, foi observado, em testes prévios, que o uso de volumes menores de extrator permite que parte da amostra seque nas paredes do tubo de vidro no bloco digestor, dificultando o procedimento de limpeza dos mesmos e, além disso, por tratar-se de uma amostra com densidade pequena, volumes menores que 2,00 mL resultavam na formação de uma pasta (amostra + água régia). Assim, fixou-se o volume de água régia em 2,50 mL, permitindo uma mistura da amostra com a água régia numa proporção adequada para extração, sem formação de grandes quantidades de espuma. Diante disso, apenas as variáveis: volume de H_2O_2 (0,65 a

2,35 mL), temperatura (86 a 153 °C) e tempo (50 a 100 min) foram avaliadas. As superfícies de respostas obtidas usando as respostas múltiplas são apresentadas na Figura 22, onde pode se observar as regiões (em vermelho escuro) que se consegue extrair maior quantidade dos analitos.

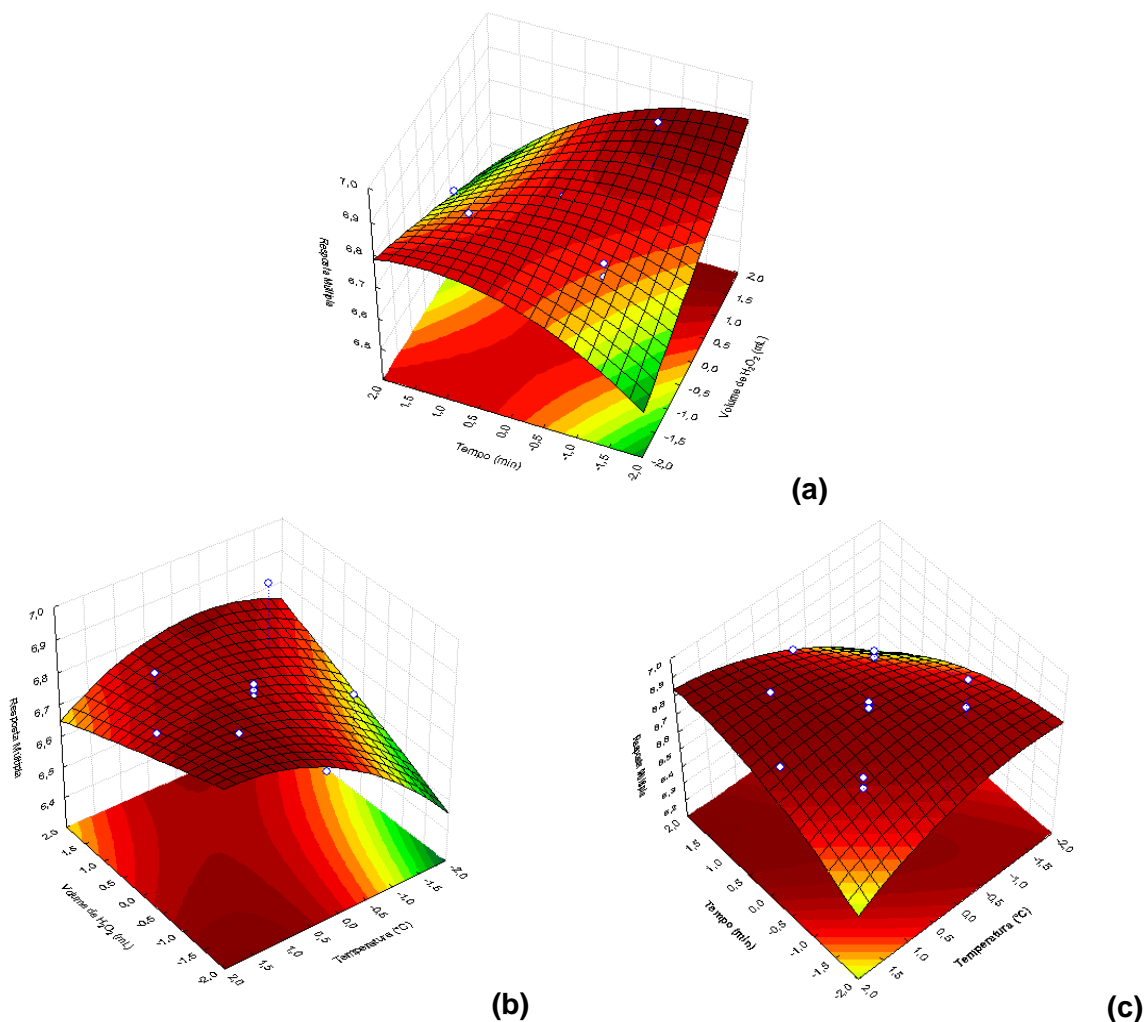


Figura 22. Superfícies de resposta obtidas com o planejamento composto central (CCD) 2^3 , tempo vs. volume de H₂O₂ (a), temperatura vs. volume de H₂O₂ (b) e tempo vs. temperatura (c).

No caso, as melhores respostas são observadas quando o processo de extração foi realizado com temperaturas mais elevadas, menores intervalos de tempo e maiores quantidades de H₂O₂. A equação que correlaciona a resposta múltipla com as variáveis estudadas é dada a seguir (Equação 16):

$$R_{\text{Múltipla}} = 6,79 + 1,89 \times 10^{-2} \cdot VP - 2,72 \times 10^{-3} \cdot VP^2 - 3,09 \times 10^{-2} \cdot t - 4,68 \times 10^{-2} \cdot t^2 + 7,60 \times 10^{-2} \cdot TA - 5,17 \times 10^{-2} \cdot TA^2 - 7,44 \times 10^{-2} \cdot VP \cdot t - 6,26 \times 10^{-2} \cdot VP \cdot TA + 1,01 \times 10^{-2} \cdot t \cdot TA \quad (16)$$

onde $R_{\text{Múltipla}}$ é a resposta múltipla, VP é o volume de H_2O_2 , t é o tempo e TA é a temperatura e aquecimento.

Os valores críticos (codificados e reais), níveis em se conseguiu melhor extração, obtidos pela metodologia da superfície de resposta são mostrados na Tabela 20. Assim, as condições otimizadas para a validação do procedimento de extração foram: 250 mg de amostra + 2,50 mL de água régia + 1,5 mL de H_2O_2 aquecidos a 130 °C durante 75 minutos.

Tabela 20. Valores críticos para o procedimento de extração, obtidos pela metodologia de superfície de resposta

Variável	Valor crítico		
	Codificado	Real	Valor usado
Volume de H_2O_2 (mL)	0,315	1,66	1,50
Temperatura (°C)	0,423	128,46	130
Tempo (min)	-0,125	73,13	75

Os trabalhos reportados na literatura visando a determinação do teor total de metais em resíduos orgânicos e empregando bloco digestor, geralmente, apresentam muitas etapas (sucessivas adições de ácidos), são lentos e empregam grandes volumes de reagentes, uma vez que têm como finalidade destruir o máximo da matriz^{21, 23}. Um procedimento de extração visando a determinação do teor total de metais, semelhante ao desenvolvido neste trabalho, foi proposto por Sastre e colaboradores⁴⁰ para a determinação de Cd, Cu, Pb e Zn presentes em amostras ambientais com teores de matéria orgânica inferiores a 70%. Neste procedimento, aproximadamente, 3,0 g de amostra permanece em contato com 28,0 mL de água régia por 16h, em seguida a mistura é aquecida em bloco digestor a 130 °C por 2 h em refluxo. Percebe-se que o método de extração proposto apresenta vantagens em relação aos descritos na literatura: menor consumo de amostra e de reagentes e um tempo de preparo muito menor.

5.4. Validação dos métodos analíticos empregando forno de micro-ondas com cavidade e bloco digestor

Considerando o grande volume de valores estimados para a aplicação dos testes estatísticos na etapa de verificação de premissas e avaliação do efeito de matriz (dez elementos e quatro amostras diferentes), optou-se por apresentar os resultados e discussão completos somente para um elemento (Pb) na ausência e presença das quatro matrizes avaliadas para o procedimento de extração em bloco. O mesmo tratamento foi realizado para todos os analitos em todas as amostras e para o procedimento com micro-ondas. A faixa linear, os valores referentes ao LD, LQ, precisão e veracidade serão apresentados para todos os casos.

5.4.1. Linearidade

Inicialmente, todos os valores de absorvância medidos foram usados para a obtenção do modelo de regressão, determinado pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os resíduos calculados a partir da regressão foram plotados em gráficos do tipo concentração versus resíduo. A inspeção visual inicial dos gráficos de resíduos é fundamental para identificar previamente evidências quanto à falta de ajuste ao modelo de regressão utilizado e presença de valores extremos. Resíduos com dispersão em formatos cônicos (<) são indicativos de heteroscedasticidade, já formatos do tipo “U” ou “U invertido” sugerem desvio da linearidade⁹¹. Na Figura 23 são apresentados a curva analítica de Pb sem matriz (meio: reagentes do procedimento do bloco digestor) e o gráfico de resíduos, onde pode-se observar que os resíduos apresentaram uma dispersão totalmente aleatória em torno do valor zero, indicando que o modelo de regressão linear é adequado para descrever a relação entre absorvância e concentração de Pb. Vale ressaltar que esta análise é preliminar e deverá ser confirmada posteriormente com teste estatístico específico. As duas linhas pontilhadas nos gráficos de resíduos (Figura 23 .b) definem a faixa de variação aceitável para os resíduos gerados pela regressão. Os pontos que não se encontram dentro dessa região são suspeitos de serem *outliers* ou valores extremos, tais valores podem influenciar as estimativas dos parâmetros de regressão, podendo ser fonte de erro nos resultados finais.

Para o caso da Figura 23 o resíduo suspeito de ser um valor extremo foi formalmente avaliado pelo método dos resíduos padronizados Jackknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jackknife (J_{ei}), calculado para cada nível de concentração da curva analítica. Valores de J_{ei} maiores que o t crítico são considerados valores extremos. O teste de Jackknife confirmou a suspeita e o valor foi excluído. Na Figura 24 são apresentados a curva sem matriz e o gráfico de resíduos após exclusão do valor extremo. Verifica-se que todos os resíduos se encontram dentro da nova faixa de aceitação para a variância dos resíduos. Tal procedimento, confirmação do valor extremo (teste de Jackknife), exclusão, geração de novo modelo de regressão, nova verificação e exclusão, pode ser repetido até a exclusão de no máximo 22% dos pontos.

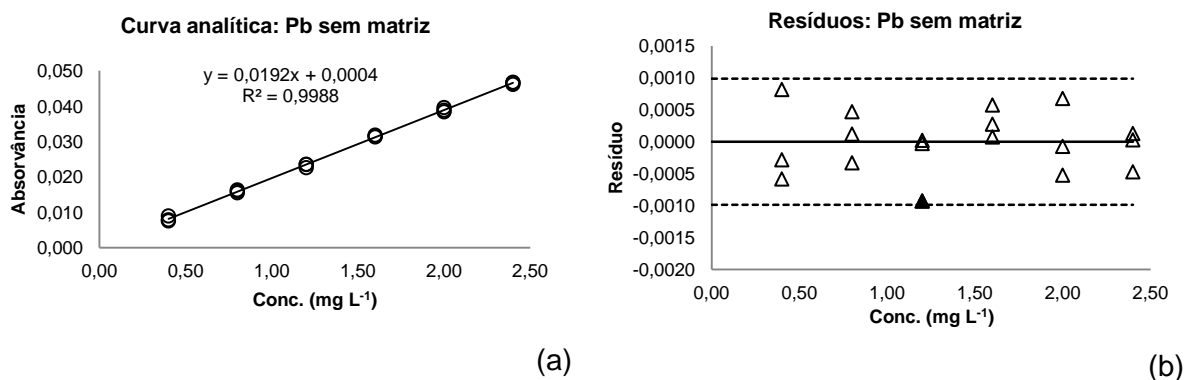


Figura 23. Curva analítica sem matriz para Pb (a) e gráfico de resíduos (b).

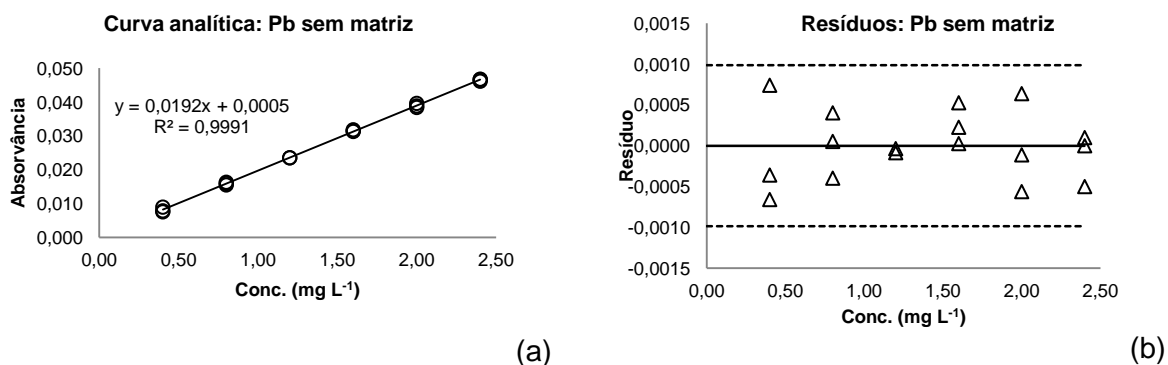


Figura 24. Curva analítica sem matriz para Pb (a) e gráficos de resíduos (b), após exclusão do valor extremo confirmado pelo teste de Jackknife.

Em seguida, foram aplicados os testes para avaliar a normalidade (Teste de Ryan-Joiner⁹²), independência (Teste de Durbin e Watson⁹³) e homoscedasticidade (Teste de Levene com modificações feitas por Brown e Forsythe⁹⁴) dos resíduos e,

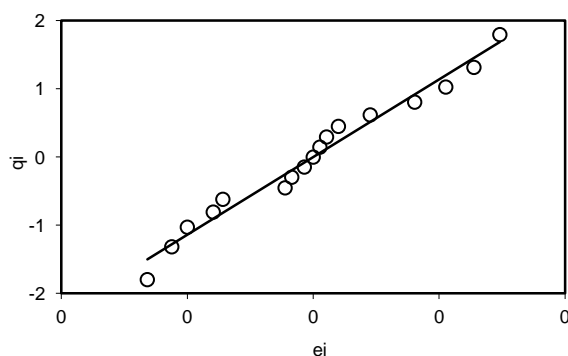
por último, teste para avaliar a significância da regressão e desvio da linearidade (Teste F- ANOVA⁸⁹). Os resultados para o Pb na ausência de matriz são apresentados resumidamente na Tabela 21. Observa-se que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, uma vez que o coeficiente de correlação R calculado (0,987) foi maior que o $R_{\text{crítico}}$ (0,955) do teste de Ryan-Joiner para $\alpha = 0,05$. O gráfico, resíduos da regressão (e_i) em função do valor normal esperado (q_i) é apresentado na Figura 25. a. A independência dos resíduos foi confirmada pelo teste aplicado. O valor de d calculado d (2,3401) se encontra dentro do intervalo ($1,380 < d < 2,620$) que não indica autocorrelação dos resíduos de acordo com o teste de Durbin-Watson. O gráfico construído com os pontos calculados para teste de Durbin-Watson da Figura 25. b mostra os pontos distribuídos aleatoriamente por todos os quadrantes, não sendo observadas tendências positivas ou negativas.

O teste de Levene modificado por Brown-Forsythe foi utilizado para avaliar a homoscedasticidade dos resíduos. O tratamento dos dados consistiu em dividir os resíduos em dois grupos, garantindo que cada grupo apresente o mesmo número de níveis de concentração e que as replicatas de um mesmo nível de concentração não se encontrem em grupos diferentes. Em seguida, as variâncias dos grupos foram comparadas. A estatística do teste foi o t de Levene (t_L), sendo que para os casos em que o t_L for menor que t crítico ($t_{(\alpha;n_1+n_2-2)}$), tem-se homoscedasticidade confirmada.

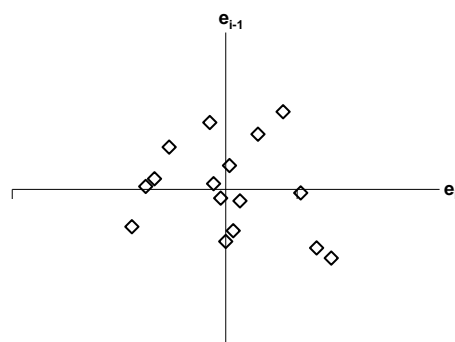
Na Tabela 21, observa-se $t_L(0,0236)$ foi menor que $t_{\text{crítico}}$ (2,131), constatando a que a variância dos resíduos obtidos para Pb sem matriz não diferem entre si. O gráfico dos resíduos médios dos dois grupos, grupo 1 (0,40 a 1,20 mg L⁻¹) e grupo 2 (1,60 a 2,40 mg L⁻¹), apresentado na Figura 26 evidencia a homoscedasticidade das variâncias dos dois grupos.

Tabela 21. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade para a curva analítica de Pb sem presença de matriz

Estadística	Curva analítica de Pb sem matriz
Número de observações	
n	17
Normalidade (Teste de Ryan-Joiner)	
R	0,9872
R _{crítico}	0,9437
α	0,05
Independência (Teste de Durbin e Watson)	
d	2,3401
Não há autocorrelação	1,380 < d < 2,620
α	0,05
Homoscedasticidade (Teste de Brown e Forsythe)	
t _L	0,0236
t _{crítico}	2,131
Regressão (Teste F – ANOVA)	
F _{Estimado}	1,67 x 10 ⁴
F _{Crítico}	4,543
α	0,05
Desvio da linearidade (Teste F – ANOVA)	
F _{Estimado}	0,322
F _{Crítico}	3,357
α	0,05



(a)



(b)

Figura 25. Gráficos de probabilidade normal (a) e gráficos de Durbin-Watson (b) para a curva analítica de Pb sem presença de matriz. Onde: e_i = resíduo da regressão e q_i = valor normal esperado.

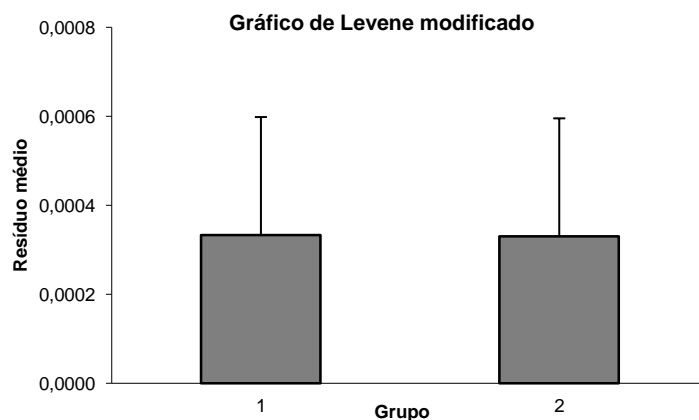


Figura 26. Gráfico representando a homoscedasticidade das variâncias para a curva de Pb sem matriz nos grupos 1 e 2.

A avaliação da significância da regressão foi testada a partir da hipótese nula de que a regressão linear não é significativa contra a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa. Assim, a hipótese nula foi rejeitada quando a F_{Estimado} foi maior que o valor crítico $F_{(\alpha;1;n-2)}$. Já para a avaliação da significância a linearidade, a hipótese nula testada foi de que o modelo linear simples é correto contra a segunda hipótese de que o modelo linear não é correto. A hipótese nula foi rejeitada quando o F_{Estimado} foi maior que o valor crítico $F_{(\alpha;u-2;n-u)}$, onde n é o número de pontos e u é o número de níveis de concentração da faixa estudada. Os valores de F_{Estimado} calculado a partir da ANOVA, apresentados na Tabela 21, confirmam a significância da regressão e o não desvio da linearidade. Assim, pode-se afirmar que a faixa linear obtida para Pb foi até $2,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Como já mencionado anteriormente, o mesmo procedimento apresentado para o Pb foi realizado para os outros elementos, incluindo também o procedimento assistido por radiação micro-ondas. As faixas lineares para os elementos estudados são apresentados na Tabela 22. Vale ressaltar que a faixa do Cd foi selecionada em função do limite máximo permitido pela legislação e da diluição em função do preparo da amostra. As outras faixas são as maiores que atendem todas as premissas.

Tabela 22. Faixas de concentração das curvas analíticas, com e sem matriz, que apresentaram relação linear confirmada após avaliação das premissas dos resíduos, significância regressão e falta de ajuste.

Elementos	Faixa de concentração ¹ (mg L ⁻¹)
	Linearidade confirmada
Cd	0,02 - 0,12
Zn	0,12 - 0,72
Co, Cu e Ni	0,30 - 1,80
Fe e Mn	0,35 - 2,10
Cr, Mn e Pb	0,40 - 2,40

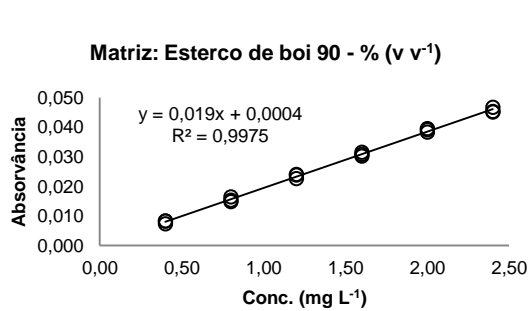
¹Para o procedimento com radiação micro-ondas e em bloco digestor

5.4.2. Efeito de matriz

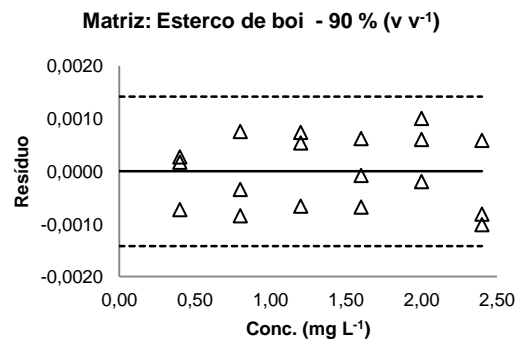
O efeito de matriz foi avaliado para quatro amostras com matrizes bem distintas, esterco de boi (EB), farinha de sangue (FS), lodo de esgoto de Belo Horizonte (LBH) e torta de mamona do IMA (MA-IMA), como descrito nos procedimentos. Para alguns elementos, a amostra branca não estava disponível, sendo necessário construir curvas de adição padrão com diferentes quantidades de matriz, no caso, diferentes porcentagens do extrato ou digerido (% v v⁻¹), levando-se em consideração a faixa linear obtida para a curva de calibração sem matriz. Antes de se realizar a comparação das inclinações e interceptos para inferir sobre a ausência ou presença do efeito de matriz, foi necessário verificar todas as premissas referentes aos resíduos e a regressão para as curvas construídas com os diferentes meios. Na Figura 27 são apresentadas as curvas analíticas para Pb e os gráficos dos resíduos obtidos após as etapas: identificação de valores suspeitos de serem extremos, confirmação pelo teste de Jacknife e exclusão. Observa-se que para todos os quatro casos em questão, os resíduos encontram-se dentro da faixa aceitável de variação.

Os valores calculados para as curvas de calibração de Pb nos testes estatísticos que confirmam a normalidade, independência e homoscedasticidade das variâncias dos resíduos, bem como os valores que confirmam a significância da regressão e o não desvio da linearidade são apresentados na Tabela 23. Observa-

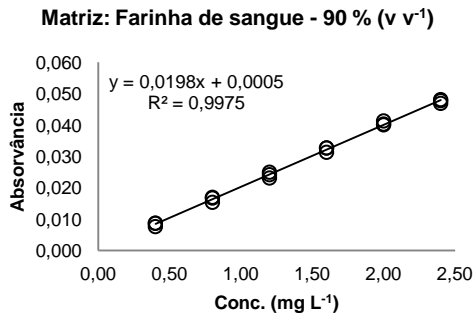
se que todas as premissas foram atendidas e que os componentes das diferentes matrizes não afetaram a faixa linear obtida para o Pb na ausência dos componentes da matriz. As equações de regressão ($y_i = \beta x_i + \alpha$) do Pb obtidas para os diferentes meios são apresentadas na Tabela 24. Confirmada a relação linear na presença da matriz partiu-se para os testes de comparação para as inclinações (β) e os interceptos (α). Não foi observado efeito de matriz pelo teste t, ao nível de confiança de 95%, entre a curva preparada com padrão mais reagente e a curva preparada com padrão mais matriz para grande maioria dos casos. Os poucos casos em que o teste t indicou efeito significativo, a diferença entre as inclinações ficou em torno de 5% e, portanto foi desconsiderada.



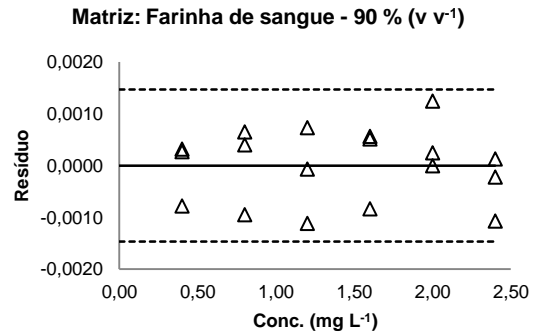
(a)



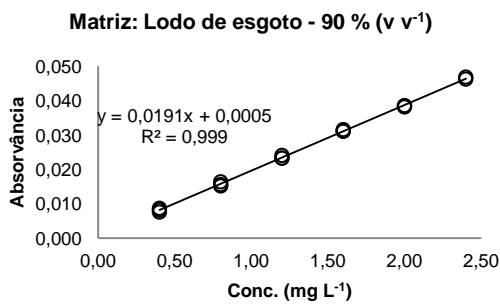
(b)



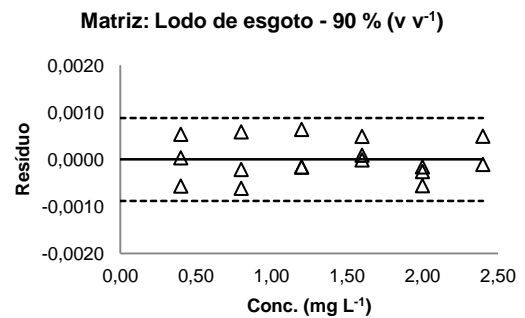
(c)



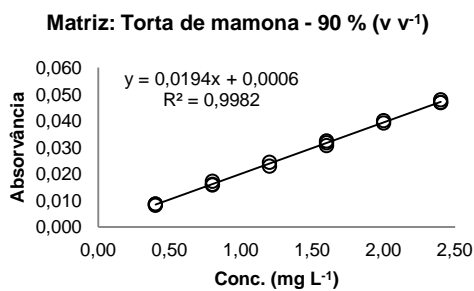
(d)



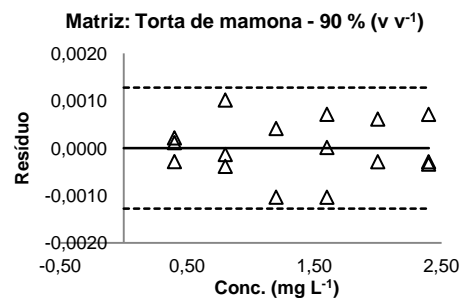
(e)



(f)



(g)



(h)

Figura 27. Curvas com matriz para Pb, esterco de boi (a), farinha de sangue (c), lodo de esgoto (e) e torta de mamona (g) e gráficos de resíduo para cada caso, após exclusão dos valores extremos. Concentração dos extratos nos pontos da curva igual a 90%, v v⁻¹.

Tabela 23. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise da significância da regressão e desvio da linearidade para as quatro matrizes estudadas

Estatística	Matriz 1 Esterco de boi	Matriz 2 Farinha de sangue	Matriz 3 Lodo de esgoto	Matriz 4 Torta de mamona
Número de observações				
n	18	18	17	16
Normalidade (Teste de Ryan-Joiner)				
R	0,9634	0,9713	0,9642	0,9798
R _{crítico}	0,9461	0,9461	0,9437	0,9411
α	0,05	0,05	0,05	0,05
Independência (Teste de Durbin e Watson)				
d	2,2007	2,2092	2,4851	2,726
Não há autocorrelação	1,391 < d < 2,609	1,391 < d < 2,609	1,380 < d < 2,620	1,088 < d < 2,912
α	0,10	0,10	0,10	0,01
Homoscedasticidade (Teste de Brown e Forsythe)				
t _L	0,282	0,150	0,378	0,273
t _{crítico}	2,120	2,120	2,131	2,145
Regressão (Teste F – ANOVA)				
F _{Estimado}	6,408 x 10 ³	6,446 x 10 ³	1,470 x 10 ⁴	7,883 x 10 ³
F _{Crítico}	4,494	4,494	4,543	4,600
α	0,05	0,05	0,05	0,05
Desvio da linearidade (Teste F – ANOVA)				
F _{Estimado}	0,676	0,565	0,694	0,183
F _{Crítico}	3,259	3,259	3,357	3,478
α	0,05	0,05	0,05	0,05

Tabela 24. Inclinações e interceptos com seus respectivos desvios padrão e valores de coeficiente de correlação para as curvas de Pb preparadas em diferentes meios

Meio	Curvas analíticas de Pb		
	Inclinação ± s	Intercepto ± s	r
Reagentes	0,0192 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	0,9996
Esterco de boi	0,0190 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0004	0,9988
Farinha de sangue	0,0198 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0004	0,9988
Lodo de esgoto	0,0191 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	0,9995
Torta de mamona	0,0194 ± 0,0002	0,0006 ± 0,0003	0,9991

5.4.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Nas Tabelas 25 e 26 são apresentados os valores de LD e LQ estimados e os valores de LQ determinados experimentalmente, para os procedimentos em bloco digestor e em forno de micro-ondas, respectivamente. A determinação do LQ experimental do método analítico consistiu em identificar qual seria a menor concentração na amostra (mg kg^{-1}), por meio de ensaios experimentais, que se pode determinar com precisão e exatidão, a partir do método proposto, incluindo na determinação desses parâmetros, todos procedimentos de preparo de amostra (diluições e aquecimento).

De modo geral, observa-se que os valores de LQ determinados experimentalmente foram maiores que os valores estimados, confirmando a importância de verificar o valor de LQ estimado a partir de brancos analíticos. Comparando os valores de LQ obtidos para os métodos com os teores mínimos de nutrientes² e com os teores máximos de contaminantes inorgânicos³ estabelecidos pelo MAPA, verifica-se que os métodos desenvolvidos atendem a legislação vigente.

Tabela 25. Equação do modelo de regressão linear, coeficiente de determinação, LD e LQ estimados e valores de LQ determinados experimentalmente com seus respectivos valores de recuperação e desvio padrão relativo (n=7). Procedimento com bloco digestor

Elemento	Equação da regressão	R ²	Estimado (mg kg ⁻¹)		Experimental (mg kg ⁻¹)			Limites da legislação ^{2,3}	
			LD	LQ	Absorvância média da concentração para LQ	LQ	Recuperação (%)	DPR (%)	(mg kg ⁻¹)
Cd	y = 0,3230x - 0,0001	0,9997	0,2	0,8	0,0066 ± 0,0005	2	97	8	<3,0
Co	y = 0,0714x + 0,0001	0,9999	3	10	0,0063 ± 0,0006	10	87	10	>50,0
Cr	y = 0,0376x - 0,0001	0,9999	10	34	0,0089 ± 0,0002	20	120	2	<200,0
Cu	y = 0,1108x + 0,0004	0,9999	1	3	0,0053 ± 0,0003	5	89	7	>500,0
Fe	y = 0,0683x + 0,0007	0,9998	5	18	0,0156 ± 0,0015	20	109	10	>2000,0
Mn	y = 0,1610x + 0,0010	0,9995	2	5	0,0148 ± 0,0007	10	86	5	>500,0
Mo	y = 0,0198x + 0,0001	0,9997	6	21	0,0047 ± 0,0001	20	115	2	>50,0
Ni	y = 0,0653x + 0,0026	0,9971	5	17	0,0145 ± 0,0014	20	91	12	>50,0 ^a e <70,0 ^b
Pb	y = 0,0270x + 0,0006	0,9988	3	8	0,0054 ± 0,0002	20	89	4	<150,0
Zn	y = 0,3939x + 0,0032	0,9990	1	2	0,0209 ± 0,0026	5	90	15	>1000,0

^aMicronutriente e ^bcontaminante

Tabela 26. Equação do modelo de regressão linear, coeficiente de determinação, LD e LQ estimados e valores de LQ determinados experimentalmente com seus respectivos valores de recuperação e desvio padrão relativo (n=7). Procedimento com forno de micro-ondas

Elemento	Equação da regressão	R ²	Estimado (mg kg ⁻¹)		Experimental (mg kg ⁻¹)			Limites da legislação ^{2,3}	
			LD	LQ	Absorvância média da concentração para LQ	LQ	Recuperação (%)	DPR (%)	(mg kg ⁻¹)
Cd	y = 0,3461x - 0,0003	0,9993	0,2	0,7	0,0060 ± 0,0004	2	93	7	<3,0
Co	y = 0,0777x + 0,0002	0,9994	2	6	0,0080 ± 0,0006	10	100	7	>50,0
Cr	y = 0,0416x - 0,0005	0,9996	6	21	0,0089 ± 0,0001	20	113	2	<200,0
Cu	y = 0,1162x + 0,0001	0,9998	1	5	0,0054 ± 0,0003	5	91	6	>500,0
Fe	y = 0,0731x + 0,0007	0,9991	2	7	0,0138 ± 0,0005	20	89	4	>2000,0
Mn	y = 0,1746x + 0,0008	0,9996	2	7	0,0096 ± 0,0008	5	101	9	>500,0
Mo	y = 0,0224x - 0,0001	0,9998	5	16	0,0038 ± 0,0001	20	86	2	>50,0
Ni	y = 0,0710x - 0,0002	0,9912	2	7	0,0121 ± 0,0012	20	86	10	>50,0 ^a e <70,0 ^b
Pb	y = 0,0290x + 0,0003	0,9997	3	11	0,0060 ± 0,0003	20	99	5	<150,0
Zn	y = 0,4131x + 0,0024	0,9994	1	3	0,0202 ± 0,0021	5	86	12	>1000,0

^aMicronutriente e ^bcontaminante

5.4.4. Veracidade e precisão

Para estimar a veracidade dos métodos, o MRC de lodo de esgoto (CRM209-50 FLUKA) foi analisado (sete repetições independentes) pelos dois métodos propostos e a veracidade foi avaliada em função das recuperações dos analitos presentes no MRC. Hibbert¹⁰⁰ utiliza a faixa de 80 a 120% de recuperação para qualquer faixa de concentração como parâmetro para classificar os métodos como exatos. Já Taveniers e colaboradores⁸² consideram as faixas de recuperação de 80 a 110% e de 90 a 107%, respectivamente, para concentrações na ordem 10 e 100 mg kg⁻¹ para avaliar a veracidade.

Os valores certificados do MRC, as concentrações determinadas e as recuperações a partir dos métodos desenvolvidos são apresentados na Tabela 27. Observa-se que as recuperações em porcentagem associadas ao MRC variaram de 92,8 ± 3,4% a 112 ± 1% e de 84,0 ± 4,1% a 98,5 ± 2,6% para os métodos com bloco digestor e com forno de micro-ondas, respectivamente. Conclui-se que os métodos desenvolvidos apresentam boa veracidade.

A precisão neste trabalho foi avaliada em termos de repetitividade a partir das análises do MRC (sete repetições independentes). Valores de desvio padrão relativo (DPR - %) inferiores a 4 e a 8%, para faixas de concentração na ordem de porcentagem (g g⁻¹) e ppm (mg kg⁻¹), respectivamente, foram estabelecidos como valores indicativos de boa precisão⁸².

A precisão expressa pelos valores de DPR (%) é mostrada na Tabela 27. Observa-se que todos os valores ficaram bem abaixo de 8,0%, sendo que para o método com bloco digestor, tais valores variaram de 0,69 a 4,33% e para o método com micro-ondas variaram de 1,56 a 4,92%, indicando que os dois métodos apresentam boa precisão, em termos de repetitividade.

A partir dos parâmetros de desempenho determinados na etapa de validação fica demonstrado que os dois métodos desenvolvidos são adequados para o controle de qualidade de fertilizantes orgânicos e matérias primas.

Tabela 27. Concentrações determinadas para o MRC de logo de esgoto, precisão e recuperação para os dois métodos desenvolvidos

Elemento	Valor certificado		Procedimento com micro-ondas				Procedimento com bloco digestor					
			Valor determinado		DPR (%)	Recuperação		Valor determinado		DPR(%)	Recuperação	
	$x \pm s$ (mg kg ⁻¹)		$x \pm s$ (mg kg ⁻¹)			$x \pm s$ (%)		$x \pm s$ (mg kg ⁻¹)			$x \pm s$ (%)	
Cd	487	± 17,5	409	± 20	4,92	84,0	± 4,1	452	± 16	3,62	92,8	± 3,4
Co	5,7	± 0,236	<LQ		-	-		<LQ		-	-	
Cr	345	± 15,1	317	± 5	1,56	91,9	± 1,4	329	± 14	4,33	95,3	± 4,1
Cu	1100	± 24	976	± 21	2,10	88,7	± 1,9	1058	± 22	2,10	96,2	± 2,0
Fe	20700	± 1360	20379	± 542	2,66	98,5	± 2,6	20177	± 610	3,02	97,5	± 3,0
Mn	399	± 14,3	381	± 18	4,83	95,4	± 4,6	428	± 17	4,02	107	± 4
Mo	19,1	± 0,934	<LQ		-	-		<LQ		-	-	
Ni	172	± 8,31	166	± 4	2,64	96,3	± 2,5	193	± 1	0,69	112	± 1
Pb	300	± 11,8	274	± 7	2,71	91,4	± 2,5	327	± 5	1,50	109	± 2
Zn	1400	± 33,8	1271	± 33	2,59	90,8	± 2,4	1342	± 24	1,79	95,8	± 1,7

5.4.5. Métodos desenvolvidos (micro-ondas e bloco digestor) aplicados para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de fertilizantes orgânicos.

Os métodos desenvolvidos foram usados para determinar micronutrientes e contaminantes em amostras de resíduos com potencial de serem aplicados como fertilizante orgânico (farinha de sangue, torta de mamona – IMA, esterco de boi, esterco de galinha, lodo de frigorífico, composto de lixo, lodo de esgoto da cidade de Ouro Preto e lodo de esgoto da cidade de Belo Horizonte). Na Tabela 28 são mostrados os teores determinados com os dois métodos desenvolvidos. Pelo fato do procedimento com micro-ondas empregar condições experimentais mais drásticas que as condições do bloco digestor, ele foi considerado como método de referência e os valores de recuperação para o método do bloco digestor foram calculados (Tabela 28). De modo geral, observa-se que os métodos forneceram concentrações que não diferem estatisticamente para a maioria dos casos. Quando os valores determinados pelo método com bloco digestor foram estatisticamente menores, constatou-se que foram superiores a 80% de recuperação e que estão dentro dos padrões de exatidão adotados neste trabalho^{82, 100}. Assim, o método com bloco digestor é eficiente para analisar fertilizantes e resíduos orgânicos com vantagens econômicas e maior frequência analítica, quando comparado ao procedimento com forno de micro-ondas com cavidade.

Embora nenhuma amostra contenha todos micronutrientes com os teores mínimos estabelecidos, isto não é impedimento para usá-las como fertilizantes orgânicos, apenas não são consideradas como fonte do nutriente que está abaixo do mínimo requerido. Assim, em relação ao teor de nutriente, todas poderiam ser usadas como fertilizantes. Por outro lado, as amostras de composto de lixo e lodo de esgoto de Ouro Preto não estão de acordo com a legislação vigente por apresentar contaminantes (Cr nas duas amostras e Ni no lodo) acima dos limites máximos permitidos não podendo ser aplicadas ao solo.

Tabela 28. Concentrações dos analitos presentes em amostras de resíduos orgânicos usados como fertilizantes, valores de DPR e valores de recuperação para o método com bloco em relação o método com forno de micro-ondas (n=3)

Elemento	Micro-ondas			Bloco digestor			Recuperação		
	x ± s (mg L ⁻¹)			Precisão (%)	x ± s (mg L ⁻¹)			Precisão (%)	(%)
Farinha de sangue									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	<LQ			-	<LQ			-	-
Cu	<LQ			-	<LQ			-	-
Fe	149	±	7	4,42	129,7	±	4,9	3,79	87,1
Mn	11,9	±	0,5	4,19	10,2	±	0,3	2,46	85,6
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	<LQ			-	<LQ			-	-
Pb	<LQ			-	<LQ			-	-
Zn	13,6	±	0,3	2,17	13,2	±	0,3	2,23	97,3
Torta de mamona – IMA									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	<LQ			-	<LQ			-	-
Cu	10,5	±	0,3	3,26	10,5	±	0,6	5,23	99,9
Fe	520	±	10	1,88	450	±	4	0,982	86,7
Mn	37,0	±	1,4	3,78	31,6	±	0,6	1,89	85,5
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	<LQ			-	<LQ			-	-
Pb	<LQ			-	<LQ			-	-
Zn	16,7	±	0,3	1,59	16,9	±	1,0	5,68	102
Esterco de boi									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	109	±	3	3,18	97,9	±	3,8	6,22	90,1
Cu	58,5	±	1,1	1,84	56,5	±	1,7	2,99	96,6
Fe	68214	±	996	1,46	61431	±	1874	3,05	90,1
Mn	157	±	4	2,33	140	±	6	4,42	89,1
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	31,8	±	2,0	6,41	28,5	±	1,1	4,01	89,8
Pb	<LQ			-	<LQ			-	-
Zn	157	±	3	1,75	149	±	1	0,783	95,0

Esterco de galinha									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	<LQ			-	<LQ			-	-
Cu	574	±	17	2,97	578	±	15	2,68	101
Fe	1498	±	30	2,00	1314	±	21	1,57	87,7
Mn	267	±	10	3,64	252	±	2	0,789	94,4
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	<LQ			-	<LQ			-	-
Pb	<LQ			-	<LQ			--	-
Zn	552	±	11	1,94	532	±	3	0,63	96,4
Lodo de frigorífico									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	116	±	0,643	0,551	120	±	4	3,05	103
Cu	106	±	1	0,612	107	±	3	2,63	102
Fe	20486	±	723	3,53	17812	±	296	1,66	86,9
Mn	142	±	6	4,44	120	±	3	2,85	84,8
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	59,3	±	1,3	2,26	49,9	±	1,3	2,66	84,2
Pb	28,2	±	0,4	1,56	27,9	±	1,3	4,75	98,9
Zn	162	±	3	1,74	173	±	3	1,49	107
Composto de lixo									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	211	±	9	4,46	204	±	8	3,90	97
Cu	120	±	5	4,22	116	±	2	1,74	97
Fe	28194	±	150	0,53	24211	±	637	2,63	86
Mn	2015	±	67	3,32	1858,69	±	13,31	0,724	92
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	52,0	±	1,0	1,95	44,3	±	0,1	0,303	85
Pb	31,0	±	0,5	1,64	29,6	±	0,6	2,17	95
Zn	378	±	14	3,74	413	±	16	3,92	109
Lodo de esgoto - Ouro Preto									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	464	±	3	0,612	442	±	13	3,00	95
Cu	491	±	13	2,60	491	±	3	0,632	100
Fe	51712	±	532	1,03	47322	±	292	0,629	92

Mn	251	±	7	2,63	238	±	2	0,921	95
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	151	±	3	1,78	139	±	3	1,88	92
Pb	88,1	±	1,7	1,93	90,8	±	1,7	1,90	103
Zn	6936	±	276	3,98	6840	±	77	1,12	99
Lodo de esgoto - Belo Horizonte									
Cd	<LQ			-	<LQ			-	-
Co	<LQ			-	<LQ			-	-
Cr	177	±	2	1,02	187	±	5	2,50	106
Cu	227	±	5	2,20	224	±	5	2,11	99
Fe	53349	±	1550	2,91	53871	±	694	1,29	101
Mn	224	±	5	2,34	210	±	3	1,22	94
Mo	<LQ			-	<LQ			-	-
Ni	53,0	±	1,8	3,43	54,5	±	1,7	3,19	103
Pb	50,1	±	1,9	3,86	44,9	±	1,4	3,19	90
Zn	1368	±	31	2,28	1387	±	11	0,808	101

5.4.5. Conclusão

Os dois métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho para determinação do teor total de micronutrientes e contaminantes (Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn) por FS FAAS empregando bloco digestor e micro-ondas apresentaram limites de quantificação, precisão e exatidão adequados com a proposta do métodos. O procedimento com bloco digestor requer merecido destaque para a determinação destes elementos, uma vez que, emprega menor quantidade de reagentes, apresenta maior frequência analítica e demanda menor investimento para aquisição do equipamento, quando comparado com método com forno de micro-ondas com cavidade.

5.5. Desenvolvimento de método analítico para determinação sequencial de As e Se em fertilizante orgânico empregando FS HG AAS e extração em bloco digestor

A determinação de As e Se sequencial é importante pelo fato de reduzir consideravelmente o tempo de determinação. Vale ressaltar que as determinações por HG AAS demandam um tempo maior, uma vez que os reagentes responsáveis pela geração de hidreto devem ser adicionados momentos antes de determinação.

Como a geração de hidretos ocorre de forma simultânea, na cela de atomização chegarão os hidretos de diferentes elementos, os quais poderão ser determinados sequencialmente, sem a necessidade de repetir todo procedimento de geração de hidreto para cada elemento. Deste modo, é possível minimizar consumo de reagentes, tempo e amostra. No caso específico dos elementos As e Se, estes exigem condições diferentes para a geração de hidretos e a matriz da amostra pode influenciar fortemente na determinação. Diante disso, se faz necessário otimizar criteriosamente as condições de geração de hidretos simultânea.

5.5.1. Avaliação das condições de geração de hidretos: aquecimento para pré-redução do Se e ordem da adição de KI.

Todas as propostas de modificação das condições de determinação por geração de hidretos foram aplicadas para determinar sequencialmente As e Se presentes em soluções preparadas com os padrões e reagentes e em soluções preparadas com os padrões, reagentes e matriz da amostra. No caso, foram utilizadas duas amostras de fertilizantes comerciais com matrizes bem distintas: Adubo Orgânico Quaresmeira (AOQ) e Torta de Mamona (TMA). As modificações experimentais avaliadas (I, II, III e IV) são apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29. Diferentes combinações de condições usadas para a determinação sequencial de As e Se em amostras de fertilizante orgânico

Condição	Canal	Solução	Aquecimento ^a
I ^b	Canal 1:	Amostra preparada em HCl 7,0 mol L ⁻¹	Com
	Canal 2:	HCl 37 % (m m ⁻¹)	-
	Canal 3:	NaBH ₄ 0,6 % (m v ⁻¹) + KI 10 % (m v ⁻¹) em NaOH 0,5 % (m v ⁻¹)	-
II	Canal 1:	Amostra preparada em HCl 7,0 mol L ⁻¹	Sem
	Canal 2:	HCl 37 % (m m ⁻¹)	-
	Canal 3:	NaBH ₄ 0,6 % (m v ⁻¹) + KI 10 % (m v ⁻¹) em NaOH 0,5 % (m v ⁻¹)	-
III	Canal 1:	Amostra preparada em HCl 7,0 mol L ⁻¹	Com
	Canal 2:	KI 10 % (m v ⁻¹)	-
	Canal 3:	NaBH ₄ 0,6 % (m v ⁻¹) em NaOH 0,5 % (m v ⁻¹)	-
IV	Canal 1:	Amostra preparada em HCl 7,0 mol L ⁻¹	Sem
	Canal 2:	KI 10 % (m v ⁻¹)	-
	Canal 3:	NaBH ₄ 0,6 % (m v ⁻¹) em NaOH 0,5 % (m v ⁻¹)	-

^aAquecimento da solução amostra em banho-maria a 70° C durante 30 minutos para pré-redução do Se.

^bCombinação de condições recomendada pelo fabricante do equipamento para determinação sequencial de As e Se em águas.

Tais modificações são justificadas da seguinte forma: a etapa de aquecimento tem como finalidade pré-reduzir o Se(VI) a Se(IV) e o KI tem a função de pré-reduzir o As(V) a As(III). O método proposto pelo fabricante emprega o pré-redutor (KI) junto com redutor (NaBH_4). O selênio é reduzido pelo KI com grande facilidade, inclusive pode ser reduzido a selênio elementar. Motivo pelo qual o uso de KI é desencorajado quando a determinação de Se é realizada em batelada, uma vez que o selênio elementar é volátil e, portanto, poderia ser perdido por volatilização. Como o sistema de geração de hidretos em questão é em fluxo contínuo, existiria a possibilidade da etapa de aquecimento ser desnecessária, se o KI fosse introduzido separadamente do NaBH_4 , no canal do ácido. Nesta nova configuração o KI entraria em contato com amostra antes do NaBH_4 . Este tempo de contato adicional, quando comparado ao método de referência, poderia ser suficiente para reduzir completamente o Se, sem a necessidade de aquecimento. Inicialmente, foi suposto que a substituição do HCl 37% (m m^{-1}) pela solução de KI 10% (m v^{-1}) no canal 2, o que não provocaria uma redução significativa do sinal de absorção ou que pelo menos a alteração proposta compensaria possíveis perdas de sinal. A estimativa da redução da concentração de ácido após a mistura do conteúdo dos três canais foi efetuada da seguinte maneira: os fluxos para a amostra, o ácido e o redutor foram de 8,0; 1,0 e 1,0 mL min^{-1} , respectivamente. Considerando-se que amostra foi preparada de modo a conter $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e a concentração do HCl 37% é 12 mol L^{-1} , quando o ácido concentrado foi usado no canal 2, a concentração de HCl final foi $6,8 \text{ mol L}^{-1}$ e quando o ácido foi substituído pela solução de KI a concentração final de HCl foi $5,6 \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, esta alteração provocou uma redução de 20% na concentração de HCl final no interior do sistema de geração de hidreto.

A retirada da etapa de aquecimento sem prejuízos significativos ao sinal de absorção deixaria o método analítico mais atrativo para laboratórios que fazem análises de rotina, uma vez que proporcionaria aumento na frequência analítica do método. Além disso, quando amostras são submetidas a aquecimento brando, em torno de $70 \text{ }^\circ\text{C}$, ocorre o favorecimento de perdas por volatilização.

Na Figura 28 são apresentadas as curvas analíticas para As e Se, preparadas somente com padrões e reagentes, obtidas com as diferentes condições para a geração de hidretos. Observa-se que a combinação de condições que resultou em

maior sinal de absorvância foi a combinação II, Canal 1: amostra preparada em HCl 7,0 mol L⁻¹ (sem aquecimento); canal 2: HCl concentrado (37%, m m⁻¹) e canal 3: NaBH₄ 0,6% (m v⁻¹) + KI 10%(m v⁻¹) em NaOH 0,5% (m v⁻¹). Pode-se concluir que o aquecimento não é necessário e que o efeito da concentração de HCl é preponderante sobre o efeito do KI. Entretanto, até o momento não foi considerado a possível interferência de componentes presentes na matriz da amostra.

É pertinente pontuar que, para este método, optou-se por trabalhar com a calibração polinomial, visto que para ajustes lineares, a faixa de concentração seria reduzida drasticamente e não atenderia aos valores estabelecidos na legislação (20,0 e 80,0 mg kg⁻¹, respectivamente para As e Se) mesmo após a diluição de 20 vezes que foi incluída para que os extratos de amostras com os valores máximos permitidos estivessem no centro de faixa selecionada. Vale ressaltar que essa diluição foi realizada com ácido clorídrico 7,0 mol L⁻¹, a fim de se manter a acidez da amostra. Desta forma, a diluição final para a determinação de As e Se foi de 2000 vezes e as seguintes faixas de concentração foram usadas: 0 – 20,0 e 0 – 80 µg L⁻¹ para As e Se, respectivamente. Como mencionado anteriormente a amostra AOQ já possui As em sua composição, assim, nos estudos de adição e recuperação, pelo fato de ter sido usado um ajuste polinomial, não seria possível simplesmente descontar os valores de absorção medidos para a amostra sem adição de analito, pois a inclinação da curva varia com a faixa de concentração. Cientes dessa questão, primeiramente, foram calculadas as concentrações para todas as soluções e a subtração do arsênio, originalmente presente na amostra, foi realizada em termos de concentração. Para ser mantido um padrão na forma de apresentação dos resultados o mesmo foi realizado para o caso do Se.

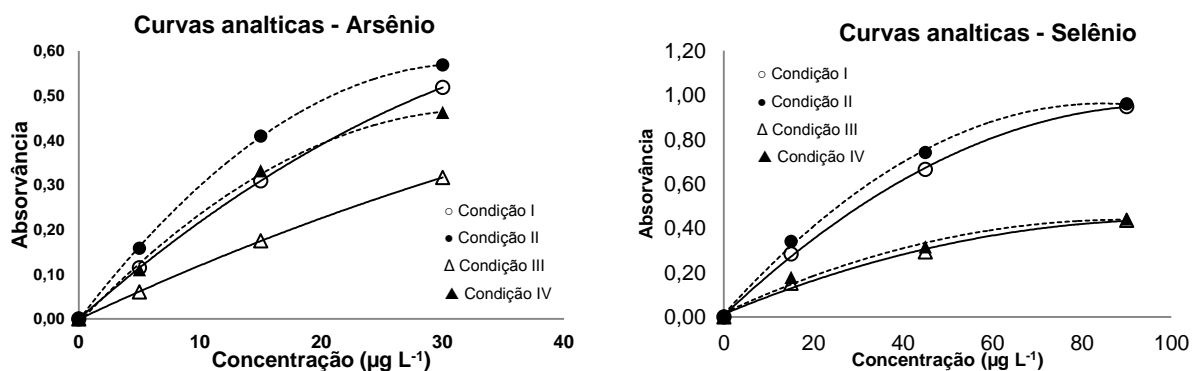


Figura 28. Curvas analíticas de As e Se obtidas com as diferentes condições avaliadas para a geração de hidretos: (●) KI+NaBH₄ no canal do redutor sem aquecimento da solução amostra, (○)KI+NaBH₄ no canal do redutor com aquecimento da solução amostra, (▲) KI e NaBH₄ em diferentes canais sem aquecimento e (Δ) KI e NaBH₄ em diferentes canais com aquecimento.

Nas Figuras 29 e 30 são apresentadas as concentrações de As e Se determinadas, em três níveis de concentração, na presença e na ausência das matrizes das amostras AOQ e TMA, para as diferentes combinações de condições. De acordo com a forma de apresentação dos resultados, a inexistência de efeito de matriz só seria verificada se a reta referente às concentrações determinadas na presença de matriz fosse coincidente com a reta referente às concentrações determinadas na ausência de matriz. Entretanto, observa-se na Figura 29, que os componentes da matriz interferiram na determinação de As para as quatro condições experimentais avaliadas, sendo que tal interferência se mostrou menos acentuada para a combinação II. Estes resultados estão de acordo com os resultados da Figura 28 no quesito aquecimento dispensável, pois mesmo na presença de interferentes da matriz, os melhores resultados foram observados quando as soluções amostras não foram submetidas ao aquecimento antes de determinação, em outras palavras, a etapa de aquecimento não seria justificada para possíveis atenuações do efeito de matriz, pelo menos para o caso de fertilizantes orgânicos. Para a determinação de Se, comportamento semelhante foi observado, entretanto o efeito de matriz foi menos pronunciado, sendo que para a combinação de condições II, o efeito de matriz não foi significativo.

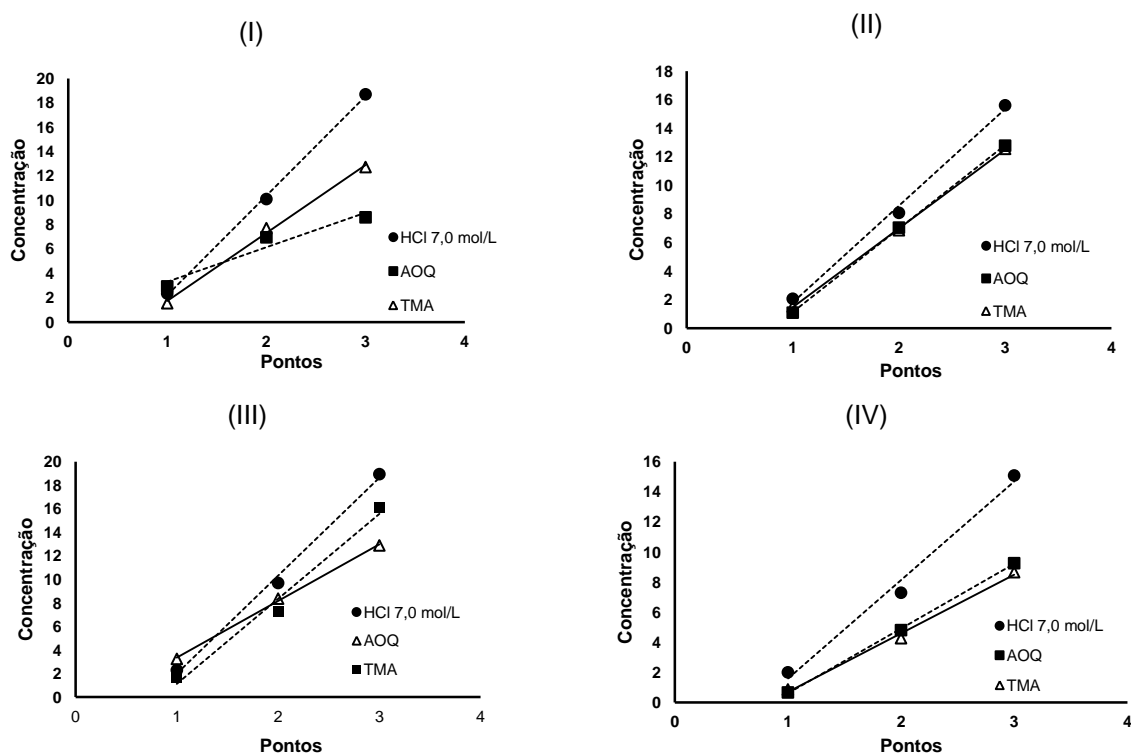


Figura 29. Concentrações de As determinadas na ausência dos componentes da matriz (●) e na presença dos componentes da matriz do AOQ (■) e da TMA (Δ) com as quatro combinações de condições para a geração de hidreto. Concentração preparadas: 2,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O fato do aquecimento favorecer o efeito dos interferentes da matriz pode ser visto sob duas ópticas: (1) o aquecimento pode culminar na transformação das espécies interferentes, o que as tornariam mais reativas, de tal modo que o redutor, inicialmente adicionado para reduzir o analito, seja consumido preferencialmente pelos interferentes e uma fração considerável do analito não seja convertida no hidreto volátil ou (2) na condição de aquecimento a reação entre o interferente e o analito é favorecida, impedindo que o analito seja convertido na forma de hidreto.

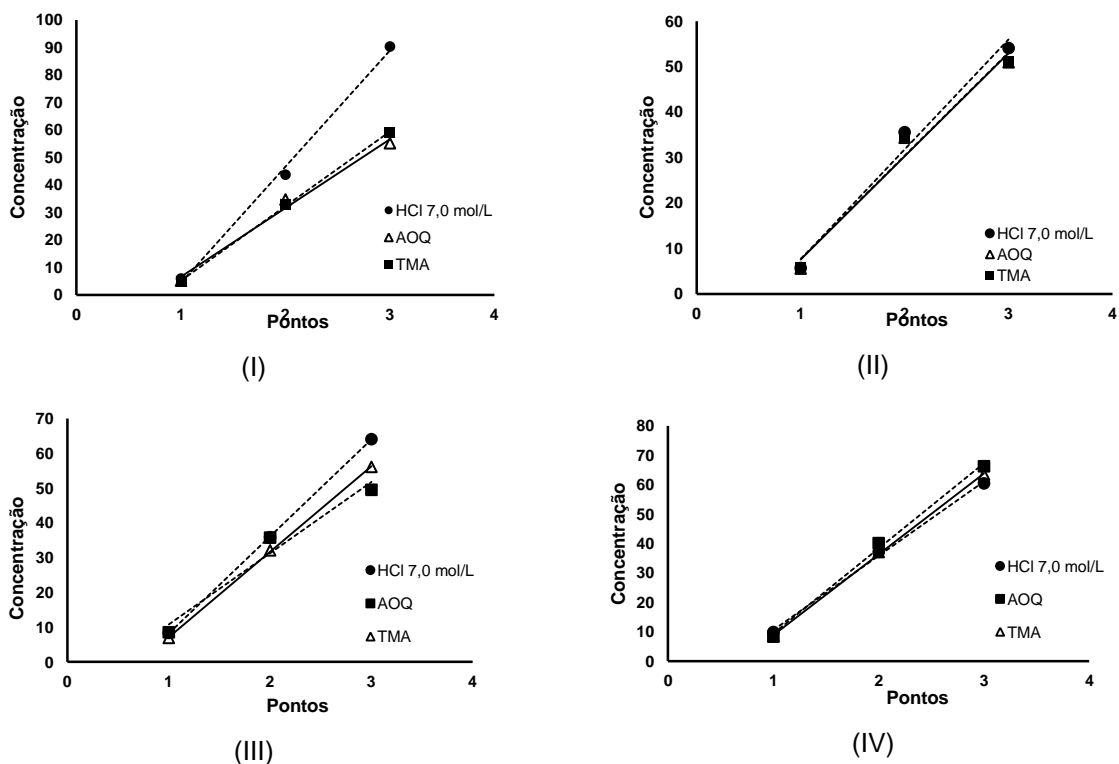


Figura 30. Concentrações de Se determinadas na ausência dos componentes da matriz (●) e na presença dos componentes da matriz do AOQ (■) e da TMA (Δ) com as quatro combinações de condições para a geração de hidreto. Concentrações preparadas: 5,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.5.2. Avaliação das concentrações de HCl e NaBH_4

Após concluir que a etapa de aquecimento seria dispensável, buscou-se encontrar a proporção adequada de reagentes que pudessem reduzir o efeito de matriz. Além disso, caso fosse possível, com os novos estudos pretendia-se reduzir a concentração de HCl no canal 2, visto que durante as medidas percebia-se forte cheiro de HCl e as mangueiras usadas para transportá-lo tornavam-se inutilizáveis rapidamente. Caso a redução da concentração fosse possível, conseguir-se-ia economizar com reagente e material, além, é claro, de fornecer condições de trabalho mais seguras para o analista.

Diante do exposto anteriormente, resolveu-se aumentar a concentração de NaBH_4 no canal 3 e reduzir a concentração de HCl no canal 2. A concentração de

KI, por já ser relativamente alta, 10% (m v⁻¹) não foi avaliada e, portanto, foi mantida constante. Assim as concentrações avaliadas são apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30. Concentrações de HCl (canal 2) e NaBH₄ (canal 3) avaliadas para a geração de hidretos simultânea de As e Se

Experimento	Canal 2 : HCl (mol L ⁻¹)	Canal 3: NaBH ₄ (% m v ⁻¹)
1		1,0
2	12,0	2,0
3		4,0
4		1,0
5	10,0	2,0
6		4,0
7		1,0
8	6,0	2,0
9		4,0

Na Figura 31 são apresentados os sinais de absorvância referentes a duas concentrações de As e Se em meio contendo somente HCl 7,0 mol L⁻¹, medidos para as nove combinações de concentrações de HCl e NaBH₄, mantendo constantes a concentração de KI em 10% (m v⁻¹) no canal 3 e o preparo da amostra em HCl 7,0 mol L⁻¹. De uma forma geral, verifica-se que a redução da concentração de HCl e o aumento da concentração de NaBH₄ resultam na queda do sinal, demonstrando que seria ideal trabalhar com baixas concentrações de NaBH₄ e HCl concentrado.

Por outro lado, ao comparar os valores referentes às porcentagens de recuperação das concentrações adicionadas no extrato da amostra AOQ, foi verificado que as maiores recuperações foram obtidas quando as concentrações de ácido foram 10,0 ou 6,0 mol L⁻¹ e a concentração de NaBH₄ foi igual a 4% (Figura 32), ou seja, os experimentos 6 e 9 apresentaram as maiores recuperações (Exp. 6: As = 102 ± 20% e Se = 86 ± 5%; Exp. 9: As = 98 ± 14% e Se = 85 ± 4%), sendo que, as condições do experimento 9 são mais atrativas do ponto de vista econômico e de segurança do analista, uma vez que HCl 50% (v v⁻¹) foi usado.

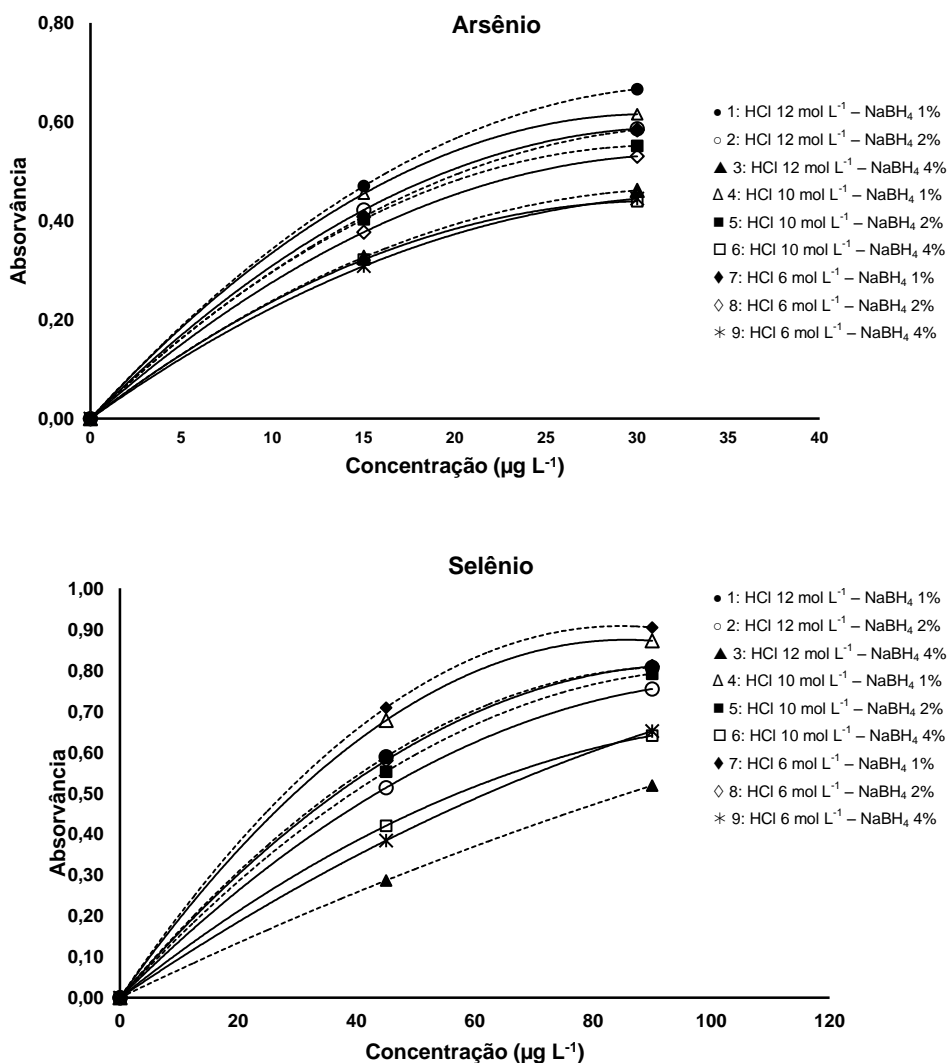


Figura 31. Sinais de absorção medidos para duas concentrações de As e Se quando foram empregadas diferentes concentrações de HCl e NaBH₄.

A atenuação do efeito de matriz observado quando foi utilizada maior concentração de NaBH₄ pode ser explicada da seguinte maneira: de acordo com a literatura⁷¹⁻⁷³, inicialmente existe uma competição entre os possíveis interferentes (Co, Cu, Fe e Ni) e os analitos pelo redutor, no caso de quantidade de NaBH₄ insuficiente para a redução de todas espécies, serão reduzidos aqueles que apresentarem cinética de redução favorável. Provavelmente, os interferentes estavam sendo reduzidos preferencialmente, impedindo a formação dos hidreto dos analitos.

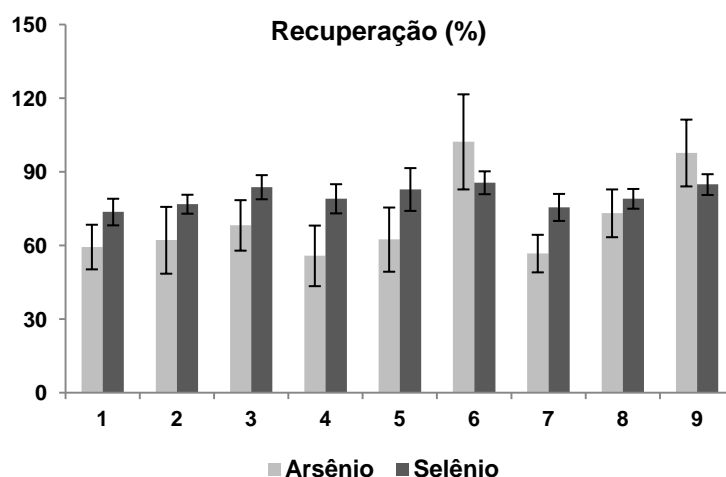


Figura 32. Recuperação do padrão de As ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e Se ($40,0 \mu\text{g L}^{-1}$) adicionados ao extrato da amostra adubo orgânico quaresmeira (AOQ). Valor de referência: concentração determinada a partir de soluções preparadas com os padrões e reagentes.

5.5.3. Estudo da interferência mútua e Adição/Recuperação

Definida a concentração de NaBH_4 em 4% (m v^{-1}) como a melhor condição para fertilizante orgânico, foram realizados experimentos para avaliar a interferência de As na determinação de Se e vice-versa, para tal foram preparadas soluções contendo padrão de Se e As individualmente e juntos. Em seguida, as concentrações de cada elemento foram determinadas e comparadas entre si. Além deste experimento, foi realizada a fortificação da amostra AOQ com As e Se nas concentrações de $20,0$ e $80,0 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, para avaliar se estava ocorrendo perdas dos analitos durante o procedimento de preparo da amostra. Como evidenciado anteriormente, o HCl desempenha papel primordial na geração de hidretos, por esse motivo, optou-se por realizar as determinações empregando soluções de HCl $6,0$ e $10,0 \text{ mol L}^{-1}$ no canal 2.

Nas Tabelas 31 e 32 são apresentados os valores determinados para os dois elementos para as diferentes situações avaliadas. As concentrações de As e Se determinadas para as condições previamente apresentadas e os valores de recuperação para cada caso evidenciaram que a presença de Se não interfere significativamente na determinação de As. Desta forma pode-se concluir que o método é robusto quanto a presença de um segundo elemento formador de hidreto,

e, além disso, pode-se afirmar que os analitos estudados não são perdidos por volatilização durante o procedimento de preparo da amostra, visto que as concentrações determinadas foram muito próximas às concentrações adicionadas, sendo que para As a recuperações foram superiores a 90% para as duas concentração de HCl e para o Se a recuperações foram superiores a 94%, também para as duas concentrações de HCl avaliadas.

Tabela 31. Concentrações de As determinadas na ausência e na presença de Se, concentrações de As determinados na amostra de adubo orgânico quaresmeira (AOQ) fortificada e valores de recuperação (n = 3)

	Média ± desvio padrão			
	HCl 6,0 mol L ⁻¹		HCl 10,0 mol L ⁻¹	
	Conc. de As (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Conc. de As (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
As na ausência de Se ^a	22,7 ± 0,4	–	22,7 ± 0,7	–
As na presença de Se ^a	20,9 ± 0,4	91,9 ± 1,6	21,3 ± 1,1	94,0 ± 4,7
As na presença de Se - AOQ ^b	21,0 ± 1,5	92,5 ± 6,8	20,5 ± 3,1	90,2 ± 13,5

^aMeio contendo somente HCl 7,0 mol L⁻¹.

^bAmostra AOQ fortificada com As e Se nas concentrações 20,0 e 80,0 mg kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 32. Concentrações de Se determinadas na ausência e na presença de As, concentrações de Se determinadas na amostra de adubo orgânico quaresmeira (AOQ) fortificada e valores de recuperação (n = 3)

	Média ± desvio padrão			
	HCl 6,0 mol L ⁻¹		HCl 10,0 mol L ⁻¹	
	Conc. de Se (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Conc. de Se (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
Se na ausência de As ^a	73,4 ± 1,3	–	81,9 ± 0,7	–
Se na presença de As ^a	78,6 ± 0,7	107 ± 1	81,9 ± 1,4	100 ± 2
Se na presença de As - AOQ ^b	80,2 ± 1,9	109 ± 3	77,2 ± 3,2	94,3 ± 3,9

^aMeio contendo somente HCl 7,0 mol L⁻¹.

^bAmostra AOQ fortificada com As e Se nas concentrações 20,0 e 80,0 mg kg⁻¹, respectivamente.

5.5.4. Avaliação das concentrações de HCl com MRC

Para as condições experimentais avaliadas, concluiu-se que o uso de HCl 6,0 ou 10,0 mol L⁻¹ no canal 2 fornecem resultados que não diferem estatisticamente e que a melhor opção, por questão de economia, seria usar HCl 6,0 mol L⁻¹.

Entretanto, considerando a diversidade de matrizes que as amostras de fertilizantes orgânicos podem apresentar, existe a possibilidade de outros elementos, além do As e Se estarem presentes, podendo ser convertidos aos seus respectivos hidretos ou interferirem na formação do hidreto. Assim, um material de referência certificado de lodo de esgoto, contendo, além de As e Se, outros elementos formadores de hidreto, tais como Cd, Hg e Pb, e metais de transição, como Fe, Ni e Co, reconhecidamente interferentes na geração de hidreto, foi analisado empregando-se as duas concentrações do ácido no canal 2. Sabe-se que as altas concentrações HCl empregadas na geração de hidreto dos métodos reportados na literatura são justificadas por atenuar os efeitos causados por possíveis interferentes. Os resultados obtidos nessa etapa do trabalho são apresentados na Tabela 33. A análise dos resultados obtidos confirmam que o HCl 6,0 mol L⁻¹ pode ser empregado na canal 2, sem perdas significativas da veracidade do método. Assim, o método otimizado para a determinação sequencial de As e Se em fertilizantes orgânicos apresenta as seguintes condições:

Canal (1): Amostra preparada em HCl 7,0 mol L⁻¹, sem aquecimento prévio para pré-redução do Se.

Canal (2): Ácido clorídrico 6,0 mol L⁻¹.

Canal (3): NaBH₄ 4% (m v⁻¹) + KI 10 % (m v⁻¹) em NaOH 0,5% (m v⁻¹)

Nas novas condições de geração de hidreto foi possível minimizar o efeito de matriz de modo a viabilizar a determinação sequencial de As e Se em fertilizantes orgânicos por meio de curvas analíticas preparadas em meio ácido. Desta forma, esse método evita o uso de estratégias de calibração mais demoradas, como adição de padrão.

Tabela 33. Concentrações de As e Se, referência e determinada, e valores de recuperação para o material de referência certificado de lodo de esgoto (n = 3)

Elemento	Concentração - HCl	Média ± desvio padrão (mg kg ⁻¹)		Recuperação (%)
	Canal 2	Valor de referência	Valor determinado	
As	6,0	27,4 ± 2,8	24,4 ± 1,4	88,9 ± 4,9
	10,0		25,9 ± 1,7	94,5 ± 6,3
Se	6,0	25,4 ± 3,3	29,2 ± 2,0	115 ± 8
	10,0		28,1 ± 2,1	111 ± 8

5.5.5. Parâmetros de desempenho do método

Após otimizar a etapa de geração de hidretos para a determinação sequencial de As e Se, determinou-se os parâmetros de desempenho do método: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), efeito de matriz para as amostras adubo orgânico quaresmeira (AOQ) e torta de mamona (TMA), precisão e veracidade.

5.5.5.1. Linearidade

Conforme comentado anteriormente, neste trabalho optou-se trabalhar com ajuste polinomial de segundo grau, sendo verificado que a relação linear entre absorvância e concentração existe para faixas de concentração muito reduzidas. Considerando que os teores máximos de As e Se permitidos pelo MAPA são relativamente altos, 20,0 e 80,0 mg kg⁻¹, respectivamente, seria necessário realizar diluições muito grandes, o que aumentaria a probabilidade de erros. Nas Figuras 33 e 34 são apresentadas as curvas analíticas com diferentes números de pontos para As e Se, as equações dos modelos linear e polinomial e os gráficos de resíduos para cada caso. Verifica-se que o ajuste polinomial é o mais adequado para os dois analitos, uma vez que os resíduos gerados com o ajuste linear são maiores e apresentam tendência evidente. Vale salientar que no caso de ajuste polinomial, o número mínimo de pontos da curva ou o intervalo máximo de concentração entre os pontos é mais crítico. Quanto maior o número de pontos da curva, maior será a veracidade das concentrações determinadas. Considerando que a inclinação da curva de segundo grau varia em função da concentração, um grande intervalo entre os pontos, implica em uma seção da curva com menor confiabilidade.

Assim com a finalidade de se verificar a confiabilidade das curvas analíticas em função do intervalo de concentração entre os pontos, foram preparadas soluções em três níveis de concentração (triplicata), abrangendo toda faixa de concentração fixada para cada elemento. Em seguida, as concentrações dessas soluções foram determinadas com curvas construídas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos (Figura 33 e 34).

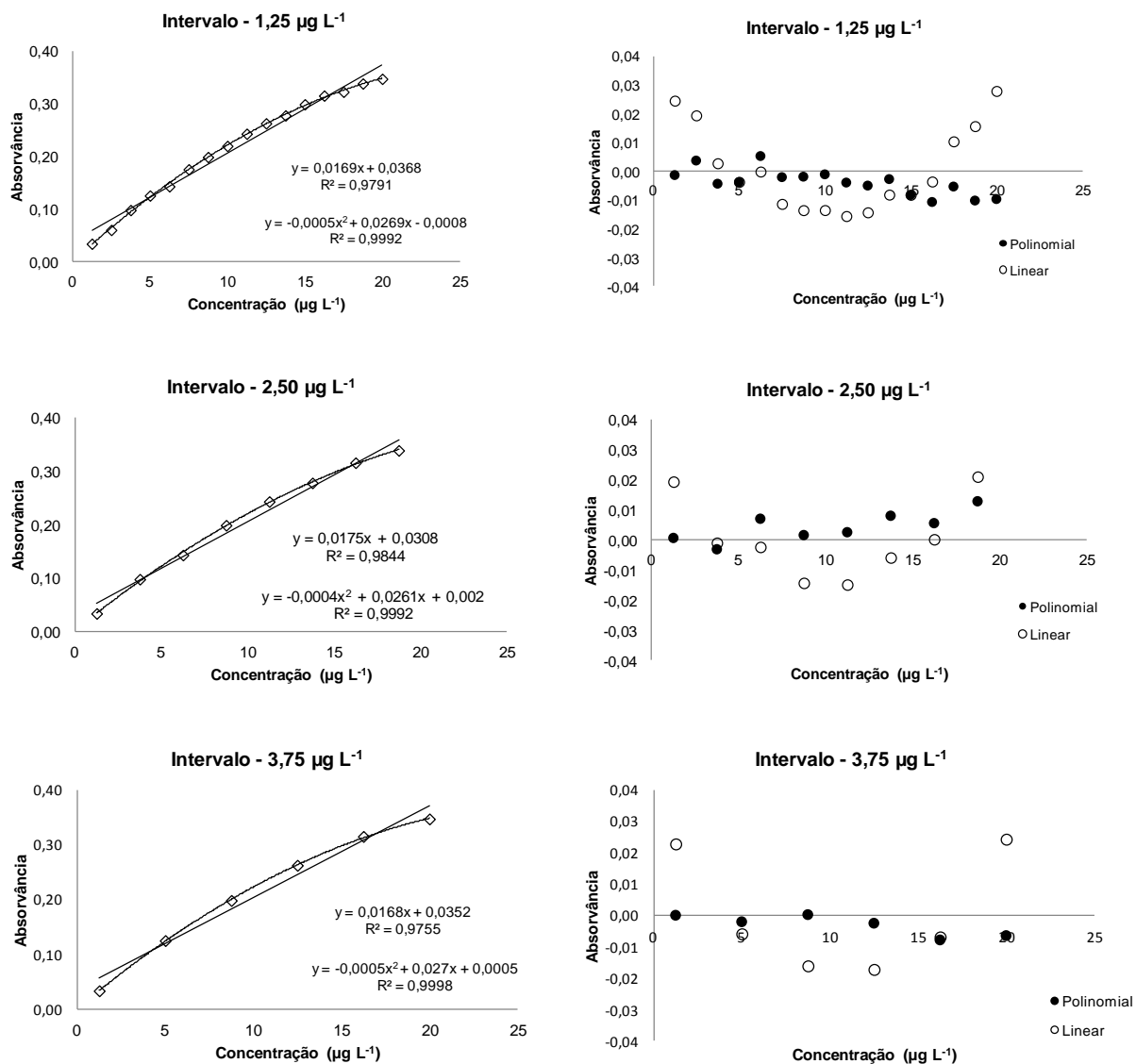


Figura 33. Curvas analíticas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva de As, equações para os dois modelos avaliados e gráficos de resíduos.

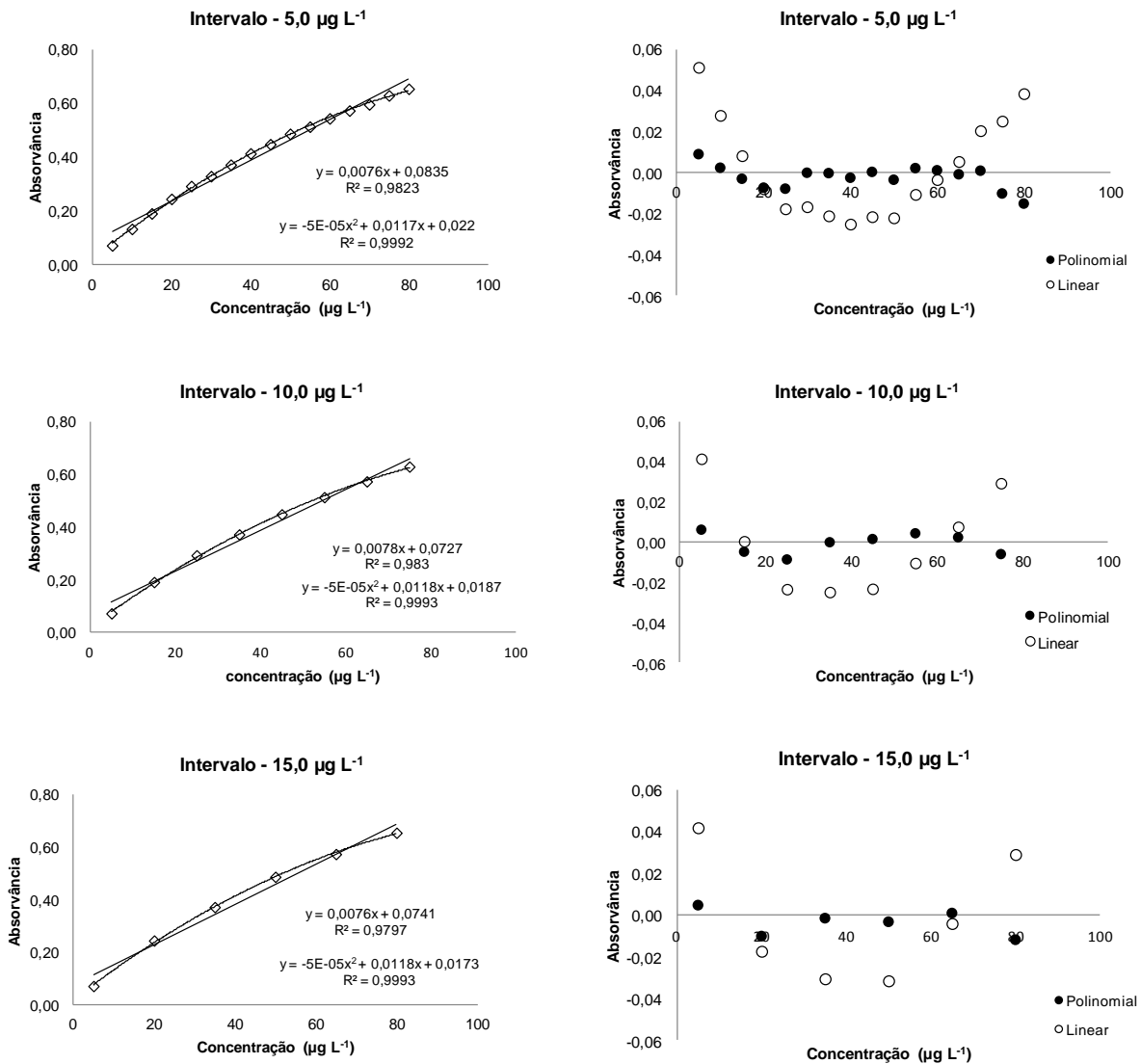


Figura 34. Curvas analíticas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva de Se, equações para os dois modelos avaliados e gráficos de resíduos.

As concentrações determinadas de As e Se para cada caso são apresentadas nas Tabelas 34 e 35. Observa-se que as curvas construídas com 16 pontos ou 6 pontos não forneceram concentrações estatisticamente diferentes para o caso dos dois elementos em questão, indicando que pode-se usar curvas analíticas com 6 pontos e ajuste polinomial de segundo grau sem afetar significativamente a veracidade dos resultados finais.

Tabela 34. Concentrações de As determinadas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva analítica empregando ajuste polinomial de segundo grau

Nível	Concentração de As ($\mu\text{g L}^{-1}$)								
	Intervalo 1			Intervalo 2			Intervalo 3		
	1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$			2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$			3,75 $\mu\text{g L}^{-1}$		
	(16 pontos)			(8 pontos)			(6 pontos)		
2,50	2,49	±	0,16	2,54	±	0,16	2,43	±	0,16
10,0	9,79	±	0,35	9,63	±	0,33	9,65	±	0,35
17,5	17,5	±	0,1	16,0	±	0,1	17,2	±	0,1

Tabela 35. Concentrações de Se determinadas com diferentes intervalos de concentração entre os pontos da curva analítica empregando ajuste polinomial de segundo grau

Nível	Concentração de Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)								
	Intervalo 1			Intervalo 2			Intervalo 3		
	5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$			10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$			15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		
	(16 pontos)			(8 pontos)			(6 pontos)		
10,0	9,63	±	0,75	9,85	±	0,75	9,98	±	0,75
40,0	39,5	±	0,7	39,4	±	0,7	39,6	±	0,7
70,0	68,1	±	2,6	67,4	±	2,5	67,7	±	2,5

5.5.5.2. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado por meio da adição dos padrões de As e Se nos extratos de duas amostras de fertilizante orgânico (AOQ e TMA), as quais foram fortificadas em três níveis de concentração. Em seguida, as concentrações de As e Se foram determinadas na ausência e na presença dos componentes da matriz foram comparadas. Os valores determinados são apresentados nas Tabelas 36 e 37. Observa-se que as concentrações de As e Se, determinadas na ausência e na presença da matriz, não apresentaram diferenças significativas para as três concentrações avaliadas, indicando que não há efeito de matriz e, portanto a etapa de determinação pode ser realizada empregando-se curvas analíticas preparadas com os reagentes empregados no procedimento de preparo de amostras.

Tabela 36. Valores de recuperação e concentrações de As determinadas na presença e na ausência das matrizes das amostras AOQ e TMA (n = 3)

Amostra: Adubo orgânico quaresmeira – AOQ				
Níveis	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	(padrão + reagentes)	(padrão + reagentes + matriz)		
As	1	4,01 \pm 0,05	3,95 \pm 0,53	98,6 \pm 13,2
	2	20,6 \pm 0,8	19,3 \pm 0,9	93,5 \pm 4,2
	3	40,2 \pm 1,1	40,1 \pm 4,7	99,7 \pm 11,6
Amostra: Torta de mamona – TMA				
Níveis	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	(padrão + reagentes)	(padrão + reagentes + matriz)		
As	1	4,01 \pm 0,05	3,68 \pm 0,11	91,8 \pm 2,7
	2	20,6 \pm 0,8	18,5 \pm 0,5	90,1 \pm 2,5
	3	40,2 \pm 1,1	34,8 \pm 0,4	86,5 \pm 0,9

Tabela 37. Valores de recuperação e concentrações de Se determinadas na presença e na ausência das matrizes das amostras AOQ e TMA (n = 3)

Amostra: Adubo orgânico quaresmeira – AOQ				
Níveis	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	(padrão + reagentes)	(padrão + reagentes + matriz)		
Se	1	6,43 \pm 0,14	6,21 \pm 0,24	96,7 \pm 3,7
	2	47,3 \pm 0,7	46,0 \pm 0,5	97,3 \pm 1,0
	3	98,0 \pm 1,8	91,8 \pm 1,8	93,7 \pm 1,8
Amostra: Torta de mamona – TMA				
Níveis	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	(padrão + reagentes)	(padrão + reagentes + matriz)		
Se	1	6,43 \pm 0,14	7,09 \pm 0,20	110 \pm 3
	2	47,3 \pm 0,7	49,5 \pm 0,3	105 \pm 1
	3	98,0 \pm 1,78	104 \pm 1	106 \pm 1

5.5.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O LD e LQ foram determinados conforme uma das opções apresentada pelo INMETRO, o qual estabelece $LD = \bar{X} + t * S$ e $LQ = \bar{X} + 10 * S$, onde \bar{X} é o valor médio da concentração determinada a partir de 10 replicatas independentes de uma amostra branca e o S o desvio padrão do valor de \bar{X} . A amostra húmus de minhoca (HU) foi utilizada para o cálculo do LD e LQ. Os valores de absorvâncias medidos para os dez extratos brancos foram substituídos nas equações polinomiais obtidas para cada elemento para o cálculo dos limites. Os valores de LD e LQ são apresentados na Tabela 38, onde se observa que os LQs obtidos para os dois analitos estão de acordo com a proposta do método.

Tabela 38. Valores de LD e LQ referentes à técnica e ao método para As e Se (n = 10)

	As		Se	
	Técnica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Método (mg kg^{-1})	Técnica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Método (mg kg^{-1})
LD	0,2	0,4	0,3	0,5
LQ	0,5	1,0	0,7	1,5

5.5.5.4. Precisão e veracidade

A precisão, expressa em termos do desvio padrão relativo, foi avaliada em condições de repetitividade e a veracidade em termos da recuperação do analito. Nesta etapa, foi utilizado material de referência certificado de lodo de esgoto (CRM029-50 da FLUKA). Os resultados determinados são apresentados na Tabela 39. Observa-se que tanto a veracidade quanto a precisão estão dentro da faixa aceitável para as concentrações em questão⁸².

Tabela 39. Concentração de referência, concentração determinada, recuperação e DPR obtidos com a análise do MRC de lodo de esgoto (n = 7)

Elemento	Concentração (mg kg^{-1})		Recuperação (%)	DPR (%)
	Valor de referência	Valor determinado		
As	27,4 \pm 2,8	26,5 \pm 1,2	96,7 \pm 4,3	4,46
Se	25,4 \pm 3,3	28,2 \pm 1,3	111 \pm 5	4,56

5.5.5.5. Aplicação do método

O método foi aplicado para analisar as amostras de fertilizantes comerciais adquiridas em estabelecimento local: Adubo orgânico quaresmeira (AOQ), torta de mamona (TMA), mistura de compostagem, torta de mamona e minerais vendido com o nome de Viagra (VGR), húmus de minhoca (HM) e terra vegetal (TV). Os teores de As e Se determinados são apresentados na Tabela 40. Observa-se que a amostra AOQ é a única que não está em conformidade com a legislação brasileira, pelo fato de apresentar teor de As acima do máximo permitido ($20,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e não deveria estar disponível comercialmente. Com relação ao conteúdo de Se, todas as amostras apresentaram teores inferiores ao limite de quantificação do método, sendo adequadas para consumo.

Tabela 40. Concentrações de As e Se das cinco amostras de fertilizante orgânico avaliadas, determinadas pelo método desenvolvido ($n = 3$).

Amostra	Concentração \pm desvio padrão (mg Kg^{-1})	
	Arsênio	Selênio
AOQ	24,5 \pm 0,4	< LQ
TMA	2,04 \pm 0,14	< LQ
VGR	0,773 \pm 0,034	< LQ
HM	< LQ	< LQ
TV	< LQ	< LQ

5.5.6 Conclusão

Os parâmetros de desempenho determinados demonstraram que a quantificação sequencial de As e Se em fertilizantes orgânicos a partir de extração em bloco digestor e determinação por geração de hidretos é um método simples, rápido e econômico. Além disso, apresenta precisão, veracidade e LQ adequados com a legislação vigente. Portanto, o método apresenta potencial para ser implementado em laboratórios de análise de rotina que fazem controle de qualidade desses produtos.

5.6. Desenvolvimento de método para determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes orgânicos por FS FAAS empregando extração assistida por ultrassom em sonoreator do tipo *cup-horn*

5.6.1. Otimização do procedimento

A amostra de fertilizante orgânico comercial, composto de lixo urbano, foi empregada nas etapas de otimização do método. Em experimentos preliminares, observaram-se os maiores valores de percentagem de extração, quando a mistura de ácidos concentrados ($\text{HNO}_3 + \text{HCl} + \text{HF}$) foi deixada em contato com a amostra durante 20 min antes do início da sonicação. Além disso, tal contato atenuou a formação de espuma verificada para alguns casos, visto que o processo de sonicação aumenta a taxa de liberação de gases, resultando em maior quantidade de espuma em intervalos de tempo menores. Como o procedimento de extração ocorre em tubos de dimensões reduzidas (5,0 mL), a probabilidade de perdas indesejáveis de amostra seriam maiores. Em todos os ensaios, a massa da amostra foi fixada em 120,0 mg, pois verificou-se que massas menores não eram representativas da amostra, tal fato foi evidenciado pelos valores de desvio padrão relativo (DPR) superiores a 10%. Por outro lado, quando massas superiores a 120 mg foram avaliadas, observou-se uma diminuição na percentagem de extração de metais.

5.6.1.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} (Tabela 14) indicaram que os fatores: HF, composição do extrator e volume extrator, apresentaram efeitos significativos (Figura 35). Por outro lado, nos níveis de estudos, o tempo de sonicação e amplitude não afetaram de forma significativa o processo de extração dos metais.

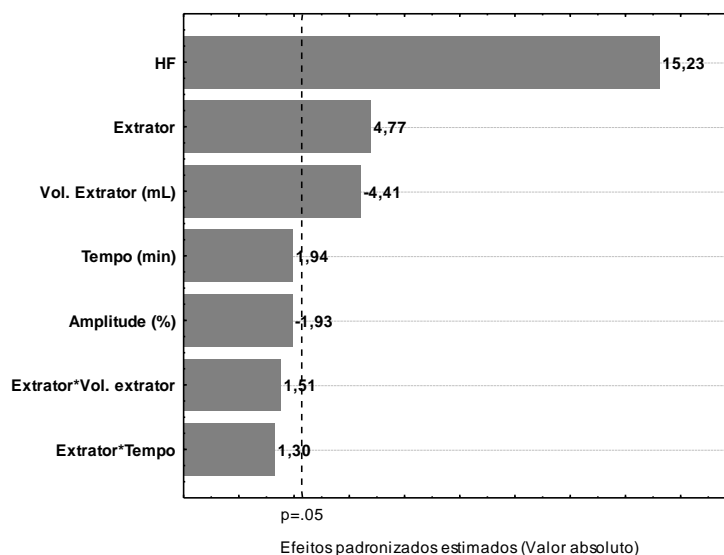


Figura 35. Gráfico de Pareto obtido com planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} usando as respostas múltiplas.

Dentre os fatores avaliados, HF apresentou o maior efeito sobre a extração dos metais, sendo este efeito positivo. A adição de HF foi responsável por um aumento médio de 20% na extração dos analitos (Figura 36), considerando como referência os valores de concentração determinados com o procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade. O importante papel do HF em procedimentos de extração assistidos por ultrassom foi demonstrado na análise do composto de lixo urbano, cuja matriz é considerada complexa, apresentando componentes orgânicos e inorgânicos, inclusive óxidos de silício. Para este tipo de amostra, condições brandas de extração, temperatura ambiente e ácido diluído, na grande maioria dos casos, não seriam suficientes para extrair quantitativamente os elementos da amostra. No entanto, pelo fato do HF ser capaz de solubilizar os óxidos de silício e os aluminossilicatos, o mesmo desestabiliza os agregados (componentes orgânicos e inorgânicos), favorecendo a fragmentação das partículas sólidas, resultando em maior extração devido ao aumento da área superficial. Além disso, os íons fluoreto podem complexar os íons metálicos, favorecendo a solubilização da fração inorgânica não silicatada⁹⁶.

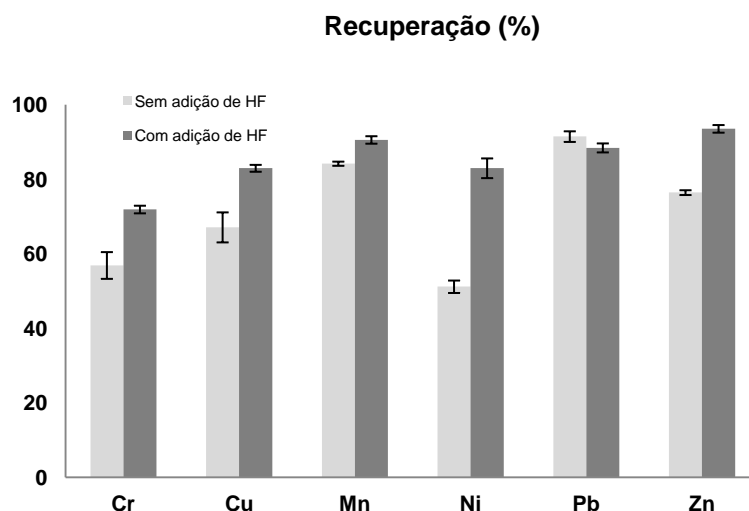


Figura 36. Recuperação dos metais com e sem adição de 100,0 μL de HF 40% (m m^{-1}), considerando como referência as concentrações determinadas a partir do procedimento de digestão em forno de micro-ondas. Amostra: composto de lixo. Condições fixadas: 0,5 mL da mistura ácida ($\text{HCl}+\text{HNO}_3$, 1:1, v v^{-1}), 0,5 mL de água deionizada, 10 minutos de sonicação com amplitude de 50%. Cd e Co < LQ.

A composição do extrator exerceu um efeito significativo positivo sobre a porcentagem de extração, indicando que a presença de HCl é importante para o processo de extração. Possivelmente, os íons cloreto complexam íons metálicos o que favorece a solubilização de minerais. Adicionalmente, a mistura prévia de ácido nítrico com ácido clorídrico culmina na formação de cloreto de nitrosila (NOCl)³⁵, espécie altamente oxidante que provavelmente contribui para desestabilização/fragmentação dos agregados por meio da oxidação parcial do compostos orgânicos.

O volume do extrator foi significativo e negativo (Figura 35). Este resultado pode ser explicado por dois motivos: primeiro, os volumes finais mais elevados resultaram em concentrações mais baixas de HF, uma vez que o volume de HF (40 %, m m^{-1}), foi mantido constante (100 μL) e, segundo, observou-se que as partículas sólidas nos tubos contendo maiores volumes finais foram agitadas com menor turbulência. Tal redução, possivelmente, leva a uma menor fragmentação das partículas, conduzindo a áreas superficiais menores e, portanto, afetando negativamente a eficiência de extração.

5.6.1.2. Planejamento composto central 2³

Com base nos resultados obtidos com planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻², a amplitude, o volume de extrator e tempo de sonicação foram fixados em 50%, 1,0 mL e 10 min, respectivamente. Embora os resultados do planejamento fracionário indicassem a utilização de menores volumes (efeito significativo negativo), o volume do extrator foi fixado em 1,00 mL. A escolha é justificada por questões práticas: a mistura (amostra + extrator) produzida após sonicação apresentou-se como uma pasta quando volumes de extrator menores que 1,0 mL foram avaliados, dificultando a transferência quantitativa da amostra para os tubos de centrifugação.

Com relação à proporção dos três ácidos empregados no procedimento, inicialmente, pretendeu-se otimizá-la empregando um planejamento composto central 2³ com repetição no ponto central (PC). Entretanto, a superfície de resposta obtida (modelo matemático) não apresentou ajuste adequado aos dados experimentais. Diante disso e constatando que as percentagens de recuperação foram superiores a 85% para a maioria dos experimentos, selecionou-se a proporção de ácido que resultou na maior eficiência de extração para a maioria dos elementos.

Na Figura 37 são apresentadas as recuperações de cada metal para as diferentes proporções de ácido avaliadas. Apenas a extração de Cr foi significativamente influenciada pela composição do extrator. As maiores recuperações foram observadas para os experimentos 6 e 14. A proporção de ácidos do experimento 6 (260, 140 e 130 µL de HNO₃, HCl e HF, respectivamente) foi considerada como sendo ótima para a extração de metais a partir de fertilizantes orgânicos, pois emprega maior quantidade de HNO₃, que é responsável pela oxidação parcial da matéria orgânica, e utilizado menor quantidade de HF, exigindo menores quantidades de H₃BO₃ para neutralizar os íons fluoreto em excesso⁹⁶.

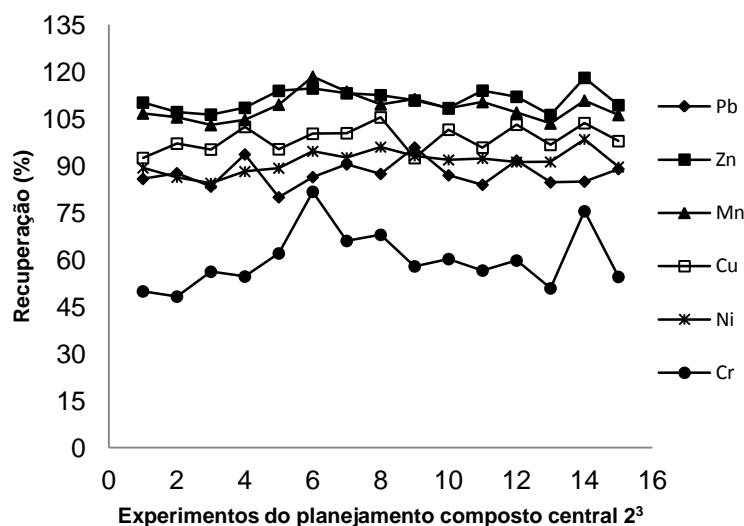


Figura 37. Recuperações obtidas com os experimentos do planejamento composto central 2^3 . Condições fixadas: massa (120 mg), volume do extrator (1,0 mL), volume final (10,0 mL), tempo de sonicação (10 min) e amplitude (50%). Repetição no ponto central, experimento 15, (n=3), DPR < 5% para todos os metais. Cd e Co < LQ.

Assim, as condições ideais para o procedimento de extração assistida por ultrassom de metais em fertilizante orgânico, obtido a partir de experimentos preliminares e otimização multivariada, estão resumidos na Tabela 41.

Tabela 41. Condições otimizadas para o procedimento de extração assistida por ultrassom para constituintes inorgânicos em fertilizantes orgânicos

Fator	Valor
Massa (mg)	120
Volume da mistura de ácidos HNO ₃ :HCl:HF (5:3:3) (µL)	500
Tempo de contato com a mistura ácida (min)	20
Volume de água deionizada (µL)	500
Amplitude (%)	50
Pulso (s)	2 on, 1 off
Tempo de sonicação (min)	10
Temperatura (°C)	25

A partir destas condições, verifica-se que o método desenvolvido é uma alternativa interessante para a análise dos fertilizantes orgânicos, em comparação com os métodos convencionais baseados na decomposição com ácidos concentrados, seja em forno de micro-ondas com cavidade, seja em bloco digestor,

apresentando algumas vantagens: (i) requer menor quantidade de reagentes e amostras, garantindo a redução de custos e geração de resíduos; (ii) todo procedimento de extração é realizado à pressão atmosférica e a temperatura ambiente, garantindo a segurança do operador; (iii) redução das perdas de analito por volatilização e (iv) boa frequência analítica, pois permite o processamento de até 16 amostras/hora com determinação de vários analitos.

5.6.2. Parâmetros de desempenho do método analítico

O desempenho do método analítico foi avaliado pela linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e veracidade. Esta avaliação foi realizada através de testes experimentais, utilizando soluções padrão, branco analítico e material de referência certificado de lodo de esgoto, de acordo com as recomendações da Comissão Europeia¹⁰¹.

As características analíticas do método proposto foram obtidas para os oito elementos estudados nas condições otimizadas. Na Tabela 42 são apresentadas as faixas lineares empregadas para a calibração do equipamento, os coeficientes de determinação (R^2), utilizados para avaliar a linearidade ($r > 0,99$) e os valores de LD e LQ, determinados como $3*s/m$, e $10*s/m$, respectivamente, onde s é o desvio padrão correspondente à absorvância de 10 brancos analíticos e m é a inclinação da curva de analítica.

Os valores de LQ exibidos pelo método desenvolvido são adequados para a determinação desses elementos em fertilizantes orgânicos, conforme os teores máximos de contaminantes e mínimos de micronutrientes estabelecidos pela legislação vigente^{2, 3} (Tabela 42).

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade e expressa como desvio padrão relativo (% DPR), o qual foi determinado a partir de cinco replicatas independentes do MRC de lodo de esgoto. Os valores de DPR variaram de 0,58 a 5,6% para os elementos em questão (Tabela 43). Os baixos valores de DPR observados (<6%) refletem a simplicidade do procedimento proposto.

Tabela 42. Faixa linear, regressão, coeficiente de determinação (R^2), LD, LQ e valores da legislação

Elemento	Faixa linear	Regressão	Coeficiente de determinação (R^2)	LD	LQ	Limites da legislação ^a
	mg L ⁻¹			mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹
Cd	0 – 0,6	Y = 0,1686X + 0,0010	0,9997	0,237	0,789	< 3
Co		Y = 0,0620X + 0,0023	0,9994	2,84	9,47	> 50
Cr		Y = 0,0369X + 0,0004	0,9998	2,17	7,24	< 200
Cu		Y = 0,1047X + 0,0025	0,9998	0,604	2,01	> 500
Mn	0 – 2,5	Y = 0,1608X + 0,0049	0,9995	0,623	2,08	> 500
Ni		Y = 0,0364X + 0,0004	0,9995	3,78	12,6	> 50 ^b , < 70 ^c
Pb		Y = 0,0369X + 0,0006	0,9999	2,39	7,98	< 150
Zn	0 – 0,6	Y = 0,5213X + 0,0027	0,9997	1,15	3,84	> 1000

^aLegislação brasileira^{2,3}

^bMicronutriente.

^cContaminante.

A veracidade foi avaliada em termos da percentagem de recuperação de analitos, a qual variou de 92 a 109 % para os diferentes elementos (Tabela 43). Assim, pode se afirmar que o método proposto apresenta parâmetros de desempenho adequados para a determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes orgânicos.

Tabela 43. Valores de concentração certificados e determinados dos elementos em MRC de lodo de esgoto (média desvio \pm padrão, n = 5), valores de recuperação e precisão para o método proposto.

Elemento	Valor certificado	Valor determinado	Recuperação	DPR
	(x \pm s) mg kg ⁻¹	(x \pm s) mg kg ⁻¹	(x \pm s) %	%
Cd	487 \pm 18	487 \pm 5	100 \pm 1	0,930
Co	5,70 \pm 0,24	< LQ	-	-
Cr	345 \pm 15	377 \pm 14	109 \pm 4	3,74
Cu	1100 \pm 24	1058 \pm 6	96,1 \pm 0,6	0,58
Mn	399 \pm 14	367 \pm 3	92,0 \pm 0,7	0,787
Ni	172 \pm 8	173 \pm 4	101 \pm 2	2,43
Pb	300 \pm 12	311 \pm 9	104 \pm 3	2,83
Zn	1400 \pm 34	1427 \pm 80	102 \pm 6	5,61

5.6.3. Aplicação do método desenvolvido para analisar de fertilizantes orgânicos

O procedimento de extração otimizado foi utilizado para analisar amostras de fertilizantes orgânicos comerciais e possíveis matérias-primas, tais como o lodo de esgoto e composto de lixo. Os resultados obtidos usando o método proposto foram comparados com aqueles obtidos pelo procedimento de decomposição em forno de micro-ondas com cavidade desenvolvido neste trabalho. Na Tabela 44 são apresentadas as concentrações determinadas usando os dois métodos e as recuperações obtidas por meio do procedimento de extração assistida por ultrassom.

As recuperações variaram de (80 ± 2) a $(118 \pm 2)\%$, o que está de acordo com Comissão Europeia¹⁰¹, a qual afirma que recuperações de 80 a 120% são aceitáveis para a faixa de concentração em questão. Vale ressaltar que na maioria dos casos, os valores de recuperação obtidos foram superiores a 90%, indicando que o procedimento de extração proposto permite a extração quantitativa dos analitos sobre condições brandas.

Com relação à composição das amostras analisadas, nenhuma das amostras analisadas apresentou teor de Cd acima do LQ do método, indicando que as amostras estão em conformidade com a legislação brasileira^{2, 3}, a qual estabelece $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ para a concentração máxima permitida em fertilizantes orgânicos. Por outro lado, as amostras de esgoto de Ouro Preto (LOP) e composto de lixo de fazenda (CLF) não podem ser aplicadas ao solo, pois apresentam teores de contaminantes acima do máximo permitido. Especificamente, Cr e Ni para a amostra LOP e Ni para a amostra CLF.

No que diz respeito ao teor de micronutrientes, algumas das amostras apresentaram teores inferiores ao mínimo estabelecido pelo MAPA, neste caso, o teor desses elementos não deverão ser especificados no rótulo do produto, indicando que tais produtos não servem como fonte desses nutrientes.

Tabela 44. Concentrações determinadas usando o método de referência (decomposição assistida por micro-ondas) e o método proposto (extração assistida por ultrassom) e valores de recuperação.

Elemento	Método de referência	Método proposto	
	MW	US	Recuperação
	(x ± s) mg kg ⁻¹	(x ± s) mg kg ⁻¹	(x ± s) %
Fertilizante orgânico ^a (AOQ)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	121 ± 3	100 ± 4	82,6 ± 3,3
Cu	59,9 ± 0,7	52,9 ± 0,6	88,4 ± 0,9
Mn	528 ± 20	480 ± 13	90,8 ± 2,5
Ni	37,9 ± 0,8	33,3 ± 0,9	88,0 ± 2,5
Pb	61,8 ± 0,6	57,1 ± 1,8	92,4 ± 2,9
Zn	483 ± 1	478 ± 9	100 ± 1
Composto de lixo + torta de mamona + minerais ^a (VGR)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	50,5 ± 2,6	40,6 ± 1,1	80,4 ± 2,1
Cu	16,9 ± 0,5	15,2 ± 0,7	90,3 ± 4,2
Mn	333 ± 17	328 ± 9	98,5 ± 2,7
Ni	8,13 ± 0,97	8,95 ± 0,74	110 ± 9
Pb	<LOQ	<LOQ	-
Zn	61,2 ± 3,9	61,5 ± 0,8	100 ± 1
Húmus de minhoca ^a (HM)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	126 ± 4	118 ± 2	93,8 ± 2,0
Cu	161 ± 3	142 ± 2	88,4 ± 1,5
Mn	274 ± 4	258 ± 6	94,1 ± 2,0
Ni	21,7 ± 4,0	25,3 ± 0,5	117 ± 2
Pb	66,8 ± 3,9	57,0 ± 0,4	85,3 ± 0,6
Zn	67,8 ± 1,8	68,1 ± 0,9	101 ± 1
Terra vegetal ^a (TV)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	83,0 ± 5,0	71,5 ± 3,8	86,2 ± 4,6
Cu	11,6 ± 0,5	10,1 ± 0,3	87,9 ± 2,5
Mn	241 ± 7	200 ± 4	83,2 ± 1,9
Ni	19,6 ± 1,8	19,0 ± 0,7	96,6 ± 3,5
Pb	<LQ	<LQ	-
Zn	25,8 ± 0,2	21,2 ± 0,3	82,3 ± 1,0
Lodo de esgoto – Belo Horizonte ^b (LBH)			

Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	177 ± 2	163 ± 3	92,1 ± 1,9
Cu	227 ± 5	224 ± 5	98,6 ± 2,2
Mn	224 ± 5	212 ± 6	94,8 ± 2,9
Ni	53,0 ± 1,8	44,5 ± 0,6	83,8 ± 1,1
Pb	50,1 ± 1,9	54,0 ± 0,4	109 ± 1
Zn	1368 ± 31	1442 ± 33	105 ± 2
Lodo de esgoto – Ouro Preto ^b (LOP)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	34,0 ± 1,2	34,2 ± 2,2	101 ± 6
Cr	464 ± 3	546 ± 11	117 ± 2
Cu	491 ± 13	447 ± 7	91,1 ± 1,5
Mn	251 ± 7	236 ± 5	94,2 ± 1,9
Ni	151 ± 7	138 ± 1	91,5 ± 0,5
Pb	88,1 ± 1,7	89,7 ± 6,4	98,8 ± 7,1
Zn	6936 ± 276	7282 ± 371	105 ± 5
Composto de lixo de fazenda ^b (CLF)			
Cd	<LQ	<LQ	-
Co	<LQ	<LQ	-
Cr	211 ± 9	188 ± 1	89,1 ± 0,6
Cu	120 ± 5	99,4 ± 1,4	82,8 ± 1,1
Mn	2015 ± 67	1917 ± 45	95,1 ± 2,2
Ni	52,1 ± 1	47,3 ± 0,2	90,9 ± 0,4
Pb	31,0 ± 0,5	27,7 ± 1,6	92,2 ± 5,3
Zn	378 ± 14	365 ± 19	96,5 ± 5,0

^aFertilizante orgânico comercial

^bMateria-prima

5.6.4. Conclusão

O método desenvolvido neste trabalho apresenta-se como uma alternativa interessante para a determinação de Co, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes e resíduos orgânicos, uma vez que é um procedimento simples e rápido, requer menores quantidades de reagentes e é realizado à temperatura ambiente, evitando perdas de analito por volatilização. A análise das amostras de fertilizantes orgânicos e resíduos orgânicos demonstraram a importância do controle de qualidade destes produtos, uma vez que foi constatado que duas amostras apresentaram teores de Cr e Ni acima dos teores permitidos pela legislação. Assim, o método proposto fornece importantes contribuições para o campo da química analítica verde, além de ser economicamente viável para o controle de qualidade de fertilizantes orgânicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Métodos analíticos simples, de baixo custo e com bom desempenho analítico são fundamentais para o controle de qualidade de fertilizantes orgânicos produzidos a partir de resíduos urbanos, industriais ou agroindustriais. Neste contexto, os quatro métodos desenvolvidos neste trabalho apresentam-se como alternativas interessantes para o monitoramento desses produtos quando comparados aos métodos recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Os três procedimentos de preparo de amostras propostos mostraram-se eficientes, porém com características diferentes. A decomposição assistida por radiação micro-ondas envolveu as condições experimentais mais drásticas, maior temperatura, alta pressão e requereu maiores quantidades de reagentes. Em termos de destruição da matriz da amostra é o mais eficiente. No procedimento de extração em bloco digestor foram empregadas condições experimentais intermediárias, sendo que o destaque, em relação à decomposição assistida por micro-ondas, é a maior frequência analítica e redução na quantidade de reagente utilizada. Por último, o procedimento de extração assistida por ultrassom, cujas condições experimentais foram as mais brandas, temperatura ambiente, tempo de extração pequeno e menor quantidade de reagentes. As características de cada procedimento são resumidas na Tabela 45. Vale ressaltar que os três procedimentos de preparo foram eficientes em disponibilizar o analito para a solução.

Adicionalmente, a determinação por FS FAAS permitiu a determinação dos elementos em menor tempo quando comparado ao FAAS no modo monoelementar, contribuindo para o aumento da frequência analítica. No caso dos elementos formadores de hidreto, foi possível realizar a determinação sequencial de As e Se a partir da extração em bloco digestor, empregando as mesmas condições experimentais para a geração do hidreto, sem a necessidade de aquecimento para a pré-redução do Se.

Assim, o trabalho realizado traz importantes contribuições para a área de Química Analítica, uma vez que foram desenvolvidos quatro métodos analíticos simples, rápidos e eficientes para a determinação de elementos em fertilizantes orgânicos empregando diferentes fontes de energia para a disponibilização dos analitos para uma solução compatível com a técnica de determinação.

Tabela 45. Principais parâmetros dos procedimentos de preparo das amostras

Parâmetro	Procedimento		
	Bloco digestor	Forno de micro-ondas	Sonoreator ultrassônico
Massa de amostra (mg)	250	200	150
Volume de reagente (mL)	2,50 de água régia	4,5 (HNO ₃) + 2,0 (H ₂ O ₂) + 1,5 (HCl)	0,5 da mistura ácida HNO ₃ +HCl+HF (5:3:3)
Temperatura (°C)	130	200	25 (ambiente)
Tipo de sistema	Aberto	Fechado	Aberto
Número de amostra por hora	24 ^a	10 ^b	16 ^c
Custo do equipamento (reais)	5.000,00	80.000,00	15.000,00

^a20 min de contato+75 min de aquecimento.

^b25 min de aquecimento+30 min de resfriamento.

^c20 min de contato+15 min de sonicação (pulso (s): 2 on, 1off).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDA, A. N. p. D. d. A. Indicadores do setor de fertilizantes no Brasil nos últimos três anos. <http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00> (acessado em 21.10.2013).
2. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 25. 23 de junho de 2009: Brasília, 2009.
3. MAPA, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 27. 05 de junho de 2006: Brasília, 2006.
4. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Métodos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organominerais e Corretivos. Brasília, 2007.
5. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº24, 20 de Junho de 2007. Brasília, 2007.
6. USEPA. Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Método 3050B. Método de digestão ácida de sedimento, lodos e solos em bloco digestor. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf> (acessado em 18 01 2014).
7. USEPA. Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Método 3051A. Digestão ácida de sedimentos, lodos, solos e óleos em forno de micro-ondas com cavidade. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf> (acessado em 18 01 2014).
8. USEPA. Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Arsênio (absorção atômica, geração de hidreto). <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7061a.pdf> (acessado em 18 01 2014).
9. USEPA. Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Selênio (absorção atômica, hidreto gasoso).

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7741a.pdf> (acessado em 18 01 2014).

10. FDACS. Departamento de Agricultura e Serviços aos Consumidores da Flórida. Método FM-902. Análises de fertilizantes para determinação simultânea de elementos traços por ICP-OES. <http://www.flaes.org/aes-fsflab/methodsanalysis.html> (acessado em 18 01 2014).

11. Nicolella, A. C.; Dragone, D. S.; Bacha, C. J. C., Determinantes da demanda de fertilizantes no Brasil no período de 1970 a 2002. *Revista de Economia e Sociologia Rural* **2005**, 43, 81-100.

12. MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Demanda Brasileira por Fertilizante será 30,6 milhões de toneladas em 2016. <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=20741> (acessado em 10.05.2011).

13. Celik, I.; Ortas, I.; Kilic, S., Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil. *Soil & Tillage Research* **2004**, 78 (1), 59-67.

14. Leroy, B. L. M.; Herath, H.; Sleutel, S.; De Neve, S.; Gabriels, D.; Reheul, D.; Moens, M., The quality of exogenous organic matter: short-term effects on soil physical properties and soil organic matter fractions. *Soil Use and Management* **2008**, 24 (2), 139-147.

15. Darwish, O. H.; Persaud, N.; Martens, D. C., Effect of long-term application of animal manure on physical-properties of 3 soils. *Plant and Soil* **1995**, 176 (2), 289-295.

16. Tejada, M.; Gonzalez, J. L., Influence of two organic amendments on the soil physical properties, soil losses, sediments and runoff water quality. *Geoderma* **2008**, 145 (3-4), 325-334.

17. Alcantara, S.; Perez, D. V.; Almeida, M. R. A.; Silva, G. M.; Polidoro, J. C.; Bettiol, W., Chemical Changes and Heavy Metal Partitioning in an Oxisol Cultivated with Maize (*Zea mays*, L.) after 5 Years Disposal of a Domestic and an Industrial Sewage Sludge. *Water Air and Soil Pollution* **2009**, 203 (1-4), 3-16.

18. Singh, A.; Agrawal, M.; Marshall, F. M., The role of organic vs. inorganic fertilizers in reducing phytoavailability of heavy metals in a wastewater-irrigated area. *Ecological Engineering* **2010**, *36* (12), 1733-1740.
19. Chang, E. H.; Chung, R. S.; Wang, F. N., Effect of different types of organic fertilizers on the chemical properties and enzymatic activities of an Oxisol under intensive cultivation of vegetables for 4 years. *Soil Science and Plant Nutrition* **2008**, *54* (4), 587-599.
20. Xiong, X. O.; Li, Y. X.; Li, W.; Lin, C. Y.; Han, W.; Yang, M., Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture. *Resources Conservation and Recycling* **2010**, *54* (11), 985-990.
21. Melo, L. C. A.; Silva, C. A., Influência de métodos de digestão e massa de amostra na recuperação de nutrientes em resíduos orgânicos. *Química Nova* **2008**, *31* (3), 556-561.
22. He, M. M.; Li, W. H.; Liang, X. Q.; Wu, D. L.; Tian, G. M., Effect of composting process on phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead in sewage sludge and swine manure. *Waste Management* **2009**, *29* (2), 590-597.
23. Hseu, Z. Y., Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology* **2004**, *95* (1), 53-59.
24. Faridullah; Irshad, M.; Yamamoto, S.; Honna, T.; Eneji, A. E., Characterization of trace elements in chicken and duck litter ash. *Waste Management* **2009**, *29* (1), 265-271.
25. Posmanik, R.; Bar Sinay, B.; Golan, R.; Nejidat, A.; Gross, A., Reuse of Stabilized Fowl Manure as Soil Amendment and Its Implication on Organic Agriculture Nutrition Management. *Water Air and Soil Pollution* **2011**, *216* (1-4), 537-545.
26. Skjelhaugen, O. J., A farmer-operated system for recycling organic wastes. *Journal of Agricultural Engineering Research* **1999**, *73* (4), 373-382.

27. Onay, T. T.; Coptu, N. K.; Demirel, B.; Bacioglu, A., Impact of food waste fraction in municipal solid waste on sorption of heavy metals. *Waste Management & Research* **2010**, 28 (10), 936-943.
28. Stabnikova, O.; Ding, H. B.; Tay, J. H.; Wang, J. Y., Biotechnology for aerobic conversion of food waste into organic fertilizer. *Waste Management & Research* **2005**, 23 (1), 39-47.
29. Hasegawa, N.; Fukumoto, Y.; Minoda, M.; Plikomol, A.; Kubo, M., Promotion of plant and root growth by soybean meal degradation products. *Biotechnology Letters* **2002**, 24 (18), 1483-1486.
30. Santos, E. Parceria para desenvolvimento de fertilizante orgânico tecnológico. http://www.cnps.embrapa.br/noticias/banco_noticias/20081226.html (acessado em 06 05 2011).
31. Papadimitriou, E. K.; Barton, J. R.; Stentiford, E. I., Sources and levels of potentially toxic elements in the biodegradable fraction of autoclaved non-segregated household waste and its compost/digestate. *Waste Management & Research* **2008**, 26 (5), 419-430.
32. Farrell, M.; Jones, D. L., Critical evaluation of municipal solid waste composting and potential compost markets. *Bioresource Technology* **2009**, 100 (19), 4301-4310.
33. Silva, C. A.; Rangel, O. J. P.; Dynia, J. F.; Bettioli, W.; Manzatto, C. V., Heavy metals availability for corn cultivated in a latosol successively amended with sewage sludges. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo* **2006**, 30 (2), 353-364.
34. Nachman, K. E.; Mihalic, J. N.; Burke, T. A.; Geyh, A. S., Comparison of arsenic content in pelletized poultry house waste and biosolids fertilizer. *Chemosphere* **2008**, 71 (3), 500-506.
35. Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. Piracicaba, 2010; p 340.
36. Matusiewicz, H., *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Amsterdam, 2003.

37. Hoenig, M., Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps. *Talanta* **2001**, *54* (6), 1021-1038.
38. Smith, F. E.; Arsenault, E. A., Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta* **1996**, *43* (8), 1207-1268.
39. Kingston, H. M., *Introduction to Microwave Sample Preparation*. ACS Professional Reference Book: Washington, 1988; p 264.
40. Sastre, J.; Sahuquillo, A.; Vidal, M.; Rauret, G., Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *462* (1), 59-72.
41. Suslick, K. S.; Didenko, Y.; Fang, M. M.; Hyeon, T.; Kolbeck, K. J.; McNamara, W. B.; Mdeleleni, M. M.; Wong, M., Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **1999**, *357* (1751), 335-353.
42. Suslick, K. S.; Price, G. J., Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review of Materials Science* **1999**, *29*, 295-326.
43. Bendicho, C.; De La Calle, I.; Pena, F.; Costas, M.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I., Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *31*.
44. De La Calle, I.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I.; Bendicho, C., Analytical evaluation of a cup-horn sonoreactor used for ultrasound-assisted extraction of trace metals from troublesome matrices. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2009**, *64* (9), 874-883.
45. de Vallejuelo, S. F. O.; Barrena, A.; Arana, G.; de Diego, A.; Madariaga, J. M., Ultrasound energy focused in a glass probe: An approach to the simultaneous and fast extraction of trace elements from sediments. *Talanta* **2009**, *80* (2), 434-439.
46. Kazi, T. G.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Afridi, H. I.; Jalbani, N.; Sarfraz, R. A.; Ansari, R., Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *161* (2-3), 1391-1398.

47. Costas, M.; Lavilla, I.; Gil, S.; Pena, F.; de la Calle, I.; Cabaleiro, N.; Bendicho, C., Evaluation of ultrasound-assisted extraction as sample pre-treatment for quantitative determination of rare earth elements in marine biological tissues by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 679 (1-2), 49-55.
48. Pontes, F. V. M.; Mendes, B. A. D.; de Souza, E. M. F.; Ferreira, F. N.; da Silva, L. I. D.; Carneiro, M. C.; Monteiro, M. I. C.; de Almeida, M. D.; Neto, A. A.; Vaitsman, D. S., Determination of metals in coal fly ashes using ultrasound-assisted digestion followed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 659 (1-2), 55-59.
49. Pereira, S.; Fonseca, L. P.; Capelo, J. L.; Armas, T.; Vilhena, F.; Pinto, A. P.; Goncalves, M. L. S.; Mota, A. M., Comparative study between probe focussed sonication and conventional stirring in the evaluation of cadmium and copper in plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 398 (5), 2315-2324.
50. Shah, A. Q.; Kazi, T. G.; Arain, M. B.; Baig, J. A.; Afridi, H. I.; Jamali, M. K.; Jalbani, N.; Kandhro, G. A., Optimization of Ultrasonic-Assisted Acid Extraction of Mercury in Muscle Tissues of Fishes Using Multivariate Strategy. *Journal of Aoac International* **2009**, 92 (5), 1580-1586.
51. De La Calle, I.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I.; Bendicho, C., Ultrasound-assisted extraction of antimony and cobalt from inorganic environmental samples using a cup-horn sonoreactor prior to their determination by electrothermal-atomic absorption spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2011**, 91 (14), 1401-1411.
52. Santos, W. P. C.; Castro, J. T.; Bezerra, M. A.; Fernandes, A. P.; Ferreira, S. L. C.; Korn, M. G. A., Application of multivariate optimization in the development of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES. *Microchemical Journal* **2009**, 91 (2), 153-158.
53. Nascentes, C. C.; Korn, M.; Arruda, M. A. Z., A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* **2001**, 69 (1), 37-43.

54. Kazi, T. G.; Jalbani, N.; Arain, M. B.; Jamali, M. K.; Afridi, H. I.; Shah, A. Q., Determination of toxic elements in different brands of cigarette by atomic absorption spectrometry using ultrasonic assisted acid digestion. *Environmental Monitoring and Assessment* **2009**, *154* (1-4), 155-167.
55. De Paula, C. E. R.; Caldas, L. F. S.; Brum, D. M.; Cassella, R. J., Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentrations of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, *74*, 284 – 290.
56. Santos, D. S. S.; Korn, M. G. A.; Guida, M. A. B.; dos Santos, G. L.; Lemos, V. A.; Teixeira, L. S. G., Determination of Copper, Iron, Lead and Zinc in Gasoline by Sequential Multi-Element Flame Atomic Absorption Spectrometry after Solid Phase Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**, *22* (3), 552-557.
57. Lima, A. F.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A., Alternative Analytical Method for Metal Determination in Inorganic Fertilizers Based on Ultrasound-Assisted Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**, *22* (8), 1519-1524.
58. Junior, D. S.; Krug, F. J.; Pereira, M. D.; Korn, M., Currents on ultrasound-assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination. *Applied Spectroscopy Reviews* **2006**, *41* (3), 305-321.
59. Hristozov, D.; Domini, C. E.; Kmetov, V.; Stefanova, V.; Georgieva, D.; Canals, A., Direct ultrasound-assisted extraction of heavy metals from sewage sludge samples for ICP-OES analysis. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *516* (1-2), 187-196.
60. Projahn, H. D.; Steeg, U.; Sanders, J.; Vanclay, E., Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378* (4), 1083-1087.
61. Amorim, F. A. C.; Lobo, I. P.; Santos, V.; Ferreira, S. L. C., Atomic absorption spectrometry: the way for multielement determinations. *Quimica Nova* **2008**, *31* (7), 1784-1790.
62. Welz, B.; Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*. 3 ed.; 2005; p 941.

63. Bings, N. H.; Bogaerts, A.; Broekaert, J. A. C., Atomic Spectroscopy: A Review. *Analytical Chemistry* **2010**, 82 (12), 4653-4681.
64. Amorim, F. A. C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C., Espectrometria de absorção atômica: O caminho para determinações multi-elementares. *Química Nova* **2008**, 31 (7), 1784-1790.
65. Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C., A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química nova* **2002**, 25 (6B), 1132-1144.
66. Kumar, A. R.; Riyazuddin, P., Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2010**, 29 (2), 166-176.
67. Bax, D.; Vanelderren, J. T.; Agterdenbos, J., The determination of arsenic with hydride generation AAS – A Study of the factors influencing the reactions in the absorption cuvette. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1986**, 41 (9), 1007-1013.
68. Bax, D.; Peters, F. F.; Vannoort, J. P. M.; Agterdenbos, J., The determination of selenium with hydride generation AAS 2. The role of sodium-borohydride and of hydrogen gas. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1986**, 41 (3), 275-282.
69. Marcucci, K.; Zamboni, R.; D'Ulivo, A., Studies in hydride generation atomic fluorescence determination of selenium and tellurium. Part 2 - effect of thiourea and thiols. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2001**, 56 (4), 393-407.
70. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D., Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* **2004**, 129 (5), 373-395.
71. Welz, B.; Melcher, M., Mechanisms of transition-metal interferences in generation atomic-absorption spectrometry 2. Influence of the valency state of arsenic on the degree of signal depression caused by copper, iron and nickel. *Analyst* **1984**, 109 (5), 573-575.

72. Welz, B.; Melcher, M., Mechanisms of transition-metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry 1. Influence of cobalt, copper iron and nickel on selenium determination. *Analyst* **1984**, 109 (5), 569-572.
73. Welz, B.; Melcher, M., Mutual interactions of elements in the hydride technique in atomic-absorption spectrometry 1. Influence of selenium on arsenic determination. *Analytica Chimica Acta* **1981**, 131 (NOV), 17-25.
74. Bye, R., Interferences from bivalent-cations in the determination of selenium by hydride-generation and atomic-absorption spectrometry – A discussion of the claim that the metal-ions are reduced to the metallic state by sodium-borohydride. *Talanta* **1986**, 33 (8), 705-706.
75. Welz, B.; Schubertjacobs, M., Mechanisms of transition-metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry 4. Influence of acid and tetrahydroborate concentrations on interferences in arsenic and selenium determinations. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1986**, 1 (1), 23-27.
76. Pierce, F. D.; Brown, H. R., Comparison of inorganic interferences in atomic-absorption spectrometric determination of arsenic and selenium. *Analytical Chemistry* **1977**, 49 (9), 1417-1422.
77. Soylak, M.; Narin, I.; Bezerra, M. D. A.; Ferreira, S. L. C., Factorial design in the optimization of preconcentration procedure for lead determination by FAAS. *Talanta* **2005**, 65 (4), 895-899.
78. Neto, B. d. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., *Como Fazer Experimentos*. 3 ed.; Campinas, 2007; p 480.
79. Lavilla, I.; Perez-Cid, B.; Bendicho, C., Optimization of digestion methods for sewage sludge using the Plackett-Burman saturated design. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, 361 (2), 164-167.
80. Lopes, W. D.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; de Carvalho, M. D. B.; Bezerra, M. A., Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. *Talanta* **2009**, 79 (5), 1276-1282.

81. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos; DOQ-CGRE-008. 2010.
82. Taverniers, I.; Van Bockstaele, E.; De Loose, M., Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23 (7), 480-490.
83. Ribeiro, F. A. D.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; da Silva, L. R.; Schneider, R. P., Validation spreadsheet: A new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods. *Quimica Nova* **2008**, 31 (1), 164-171.
84. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. 2002.
85. ANVISA <http://www.anvisa.gov.br> (acessado em 27 06 2011).
86. INMETRO <http://www.inmetro.gov.br> (acessado em 27 06 2011).
87. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 19 dez. 2002.
88. MAPA, Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Brasília, 2011.
89. de Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G., A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 552 (1-2).
90. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometric and Qualimetrics: Part A*. 1 ed.; Amsteram, 1997; p 207-211.
91. Souza, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, tese, Belo Horizonte, 2007.
92. Ryan, T. A.; Joiner, B. L. Normal probability plots and tests for normality. Pennsylvania State University, 1976.

93. Durbin, J.; Watson, G. S., Testing for serial correlation in least squares regression II. *Biometrika* **1951**, 38, 159-178.
94. Brown, M. B.; Forsythe, A. B., Robust tests for equality of variances. *J. Am. Stat. Assoc.* **1974**, 69 (346), 364-367.
95. Brodie, k.; Frary, B.; Sturman, B.; Voth, L., An automated vapor generation accessory for atomic absorption analysis. *Application Note - VARIAN* **1983**.
96. Vieira, E. C.; Kamogawa, M. Y.; Lemos, S. G.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A., Decomposição de amostras de solos assistida por radiação microondas: Estratégia para evitar a formação de fluoretos insolúveis. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* **2005**, 29, 547-553.
97. Zemberyova, M.; Bartekova, J.; Bajcan, D.; Smolkova, R., The study of interference effects and their elimination in the determination of chromium by flame AAS. *Chemical Papers* **2003**, 57 (3), 172-175.
98. Krug, F. J.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, P. V., Espectrometria de absorção atômica. Parte 1. Fundamentos e atomização com chama. 2004.
99. Roos, J. T. H., Mechanisms of interference and releasing action in atomic-absorption spectrometry 4. Releasing effect of ammonium chloride on chromium in an air-acetylene flame. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1972**, B 27 (11), 473-478.
100. Hibbert, D. B., Method validation of modern analytical techniques. *Accreditation and Quality Assurance* **1999**, 4 (8), 352-356.
101. EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Decision 2002/657 of 12 august 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities. 2002.