

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Graciela Marini Heidrich

**Desenvolvimento de metodologia para análise de especiação de
cromo em fertilizantes orgânicos**

Santa Maria, RS

2022

Graciela Marini Heidrich

Desenvolvimento de metodologia para análise de especiação de cromo em fertilizantes orgânicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Heidrich, Graciela Marini
Desenvolvimento de metodologia para análise de
especiação de cromo em fertilizantes orgânicos / Graciela
Marini Heidrich.- 2022.
85 p.; 30 cm

Orientador: Valderi Luiz Dressler
Coorientador: Rodrigo Cordeiro Bolzan
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Especiação de cromo 2. fertilizante orgânico 3.
cromatografia 4. preparo de amostra 5. legislação I.
Dressler, Valderi Luiz II. Bolzan, Rodrigo Cordeiro
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GRACIELA MARINI HEIDRICH, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Desenvolvimento de metodologia para análise de especiação de cromo em fertilizantes orgânicos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Aprovado em 28 de outubro de 2022:

Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Ana Rita De Araújo Nogueira, Dra. (EMBRAPA)

Clarissa Marques Moreira Dos Santos, Dra. (UFPEL)

Fabiane Goldschmidt Antes, Dra. (EMBRAPA)

Francisco Da Cunha Rosa, Dr. (IFRS)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)** pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa e pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pela amizade e pelo exemplo profissional.

A Dra. **Ana Rita De Araújo Nogueira**, a Prof^a. Dra. **Clarissa Marques Moreira Dos Santos**, a Dra. **Fabiane Goldschmidt Antes** e ao Prof. Dr. **Francisco Da Cunha Rosa**, pela participação na banca examinadora desta tese e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao **Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA-RS)** pela disponibilização da amostra e por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e aos colegas do **LAQIA** e **CEPETRO**, pelo convívio, amizade e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao **Arthur, Cristiane e Flávia**, pela ajuda durante o desenvolvimento das atividades. Em especial, as amigas que me incentivaram a crescer profissionalmente e humanamente: **Angélica, Kéllen, Keiti, Michele, Sindy, Suelen, Tássia, Thaís e Vinícius**.

Aos meus pais **Lucila** e **Mario**, pelo apoio e incentivo durante o doutorado.

“Temos que continuar aprendendo.

Temos que estar abertos.

E temos que estar prontos para espalhar nosso
conhecimento a fim de chegar a uma compreensão
mais elevada da realidade.”

Thich Nhat Hanh

RESUMO

Desenvolvimento de metodologia para análise de especiação de cromo em fertilizantes orgânicos

AUTORA: Graciela Marini Heidrich
ORIENTADOR: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para análise de especiação de cromo em fertilizante orgânico por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). Para a avaliação da metodologia foram utilizadas diferentes amostras de fertilizante orgânico, com distintos teores de matéria orgânica. Primeiramente as amostras foram submetidas a um processo de decomposição ácida para a determinação de cromo total por ICP-MS e posteriormente foram avaliadas condições de extração e determinação de Cr(VI). Para as otimizações iniciais deste trabalho foi utilizado o Método EPA 3060A como referência e adaptações foram realizadas. Este método consiste na extração alcalina (pH 11,5), usando uma solução a $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ e aquecimento a $90-95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. A análise de especiação foi feita pela técnica de LC-ICP-MS, onde foram avaliadas as condições da LC: tipo de coluna de separação, tipo e concentração da fase móvel e vazão. Foram escolhidas como as melhores condições a coluna dionex AG7 e pré-coluna C18 e a fase móvel de solução de HNO_3 15 mmol L^{-1} na vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para a validação desta metodologia, foram avaliadas algumas figuras de mérito, como linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), robustez e exatidão. As condições de preparo de amostra para a determinação de Cr(VI) também foram avaliadas utilizando $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,50 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ difenilcarbazida com $2,40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$, $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$ e H_2O como solventes extratores. A melhor condição de extração para Cr(VI) foi utilizando 25 mg de amostra e 10 mL $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,50 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. Concentrações de $0,14 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ e $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ foram avaliadas a fim de evitar interferências e possíveis danos a coluna cromatográfica. $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ foi a melhor condição, visto que não houve alteração significativa entre as diferentes concentrações de solvente extrator, se tornando apta para o uso na extração das demais avaliações. Como método comparativo, os mesmos extratos foram analisados por cromatografia iônica-espectrofotometria no visível (IC-Vis), para a determinação de Cr(VI) baseado no método oficial EPA 218.7, na qual foi obtido uma boa concordância entre as duas técnicas.

Palavras-chave: Especiação de cromo, fertilizante orgânico, cromatografia, preparo de amostra, legislação

ABSTRACT

Methodology development for chromium speciation analysis in organic fertilizers

AUTHOR: Graciela Marini Heidrich
ADVISOR: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

In this work, a methodology was developed for the analysis of chromium speciation in organic fertilizer by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). For the evaluation of the methodology, different samples of organic fertilizer were used, with different contents of organic matter, where, firstly, the samples were submitted to an acid decomposition process for determination of total chromium and later conditions of extraction and determination of Cr(VI). For the initial optimizations of this work, the EPA 3060A Method was used as a reference and adaptations were made. This method consists of alkaline extraction (pH 11,5), using a solution of $0.28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ with $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ and heating at $90\text{-}95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min. Speciation analysis was performed using the LC-ICP-MS technique, where liquid chromatography conditions were evaluated, such as the type of separation column, type and concentration of the mobile phase and flow rate. The dionex AG7 column and pre-column C18, the mobile phase $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} were optimized as the best conditions. For the validation of this methodology, some figures of merit were evaluated, such as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision (repeatability and intra-laboratory reproducibility), robustness and accuracy. The sample preparation conditions for the determination of Cr(VI) were also evaluated using $0.28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ with $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, 0.02 mmol L^{-1} diphenylcarbazide with $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$, $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$ and H_2O as extracting solvents. The best extraction condition for Cr(VI) was $0.28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ with $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, using 10 mL and 20 mg of sample. Concentrations of $0.14 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0.25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ and $0.07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0.125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ were evaluated to avoid interference and possible damage to the chromatographic column. $0.07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0.125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ was the best condition, since there was no significant change between the different extractor solvent concentrations, making it suitable for use in the extraction of the other evaluations. As a comparative method, the same extracts were analyzed by ion chromatography-visible spectrophotometry (IC-Vis), for the determination of Cr(VI) based on the official EPA 218.7 method, in which a good agreement was obtained between the two techniques.

Keywords: Chromium speciation, organic fertilizer, chromatography, sample preparation, legislation

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Espécies trivalentes e hexavalentes de Cr em ambientes aquáticos em função de Eh vs. pH. 10
- FIGURA 2 - Sistema LC-ICP-MS. 1 - fase móvel; 2 - degaseificador à vácuo; 3 - bomba de LC; 4 - injetor e alça de amostragem; 5 - coluna de troca aniônica; 6 - nebulizador; 7 - câmara de nebulização; 8 e 9 - ICP-MS. 31
- FIGURA 3 - Desenvolvimento de metodologia para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico por LC-ICP-MS. 33
- FIGURA 4 - Procedimento de extração alcalina para determinação de Cr(VI). 38
- FIGURA 5 - Espectros na região do visível obtidos por espectrofotometria. A) solução extratora acidificada e adicionada difenilcarbazida. B) 1,0 mg L⁻¹ de Cr(VI). C) extrato da amostra, sem adição da difenilcarbazida. D) extrato da amostra após a complexação. 39
- FIGURA 6 - Aspecto das soluções analisadas por espectrofotometria no Vis. 39
- FIGURA 7 - Efeito do tempo, temperatura e solução extratora na extração de Cr(VI) em fertilizante orgânico. 40
- FIGURA 8 - Cromatogramas obtidos para Cr(III) e Cr(VI) após extração utilizando diferentes soluções extradoras. Condições de análise de acordo com a Tabela 6. 42
- FIGURA 9 - Cromatogramas para as diferentes concentrações de solução extratora. a) padrão 10 µg L⁻¹, b) branco. 44
- FIGURA 10 - Efeito da relação massa de amostra e volume de solvente extrator na extração. 45
- FIGURA 11 - Efeito da massa de amostra na extração de Cr(VI). *Adição do equivalente a 30 µg L⁻¹ de Cr(VI). 47
- FIGURA 12 - Avaliação da estabilidade de Cr(VI) na amostra "A" com a adição do equivalente à 20 µg L⁻¹ de Cr(VI). A amostra foi mantida sob refrigeração (em torno de 4 °C) durante 3 meses. 48
- FIGURA 13 - Cromatogramas obtidos para uma solução de 2,5 µg L⁻¹ de Cr(III) e Cr(VI) preparada no meio extrator e um extrato de uma amostra com e sem o uso da cela de reação. 50
- FIGURA 14 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo 10 µg L⁻¹ de Cr(III) e 10 µg L⁻¹ de Cr(VI). Coluna de

- troca aniônica PRP-X100. A) Condição de eluição: 0,06 mol L⁻¹ HNO₃, pH 1,3, vazão 1,0 mL min⁻¹. B) Condição de eluição: 0,06 mol L⁻¹ HNO₃, pH 8,5, vazão 1,0 mL min⁻¹.51
- FIGURA 15 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo 10 µg L⁻¹ de Cr(III) e 10 µg L⁻¹ de Cr(VI). Coluna de troca aniônica PRP-X100. A) Condição de eluição: 2,0 mmol L⁻¹ (NH₄)₂CO₃, pH 10, vazão 1,0 mL min⁻¹. B) Condição de eluição: 40 mmol L⁻¹ (NH₄)₂CO₃, pH 10, vazão 1,0 mL min⁻¹.52
- FIGURA 16 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo 10 µg L⁻¹ de Cr(III) e 10 µg L⁻¹ de Cr(VI). Condição de eluição: 10 mmol L⁻¹ HNO₃, pH 2, com adição de 0,3 mmol L⁻¹ EDTA, vazão 0,5 mL min⁻¹. Coluna de troca aniônica AG7.53
- FIGURA 17 - Cromatogramas obtidos para as avaliações da fase móvel HNO₃ utilizando uma solução padrão de 10 µg L⁻¹ de Cr(VI).54
- FIGURA 18 - Cromatogramas obtidos nas avaliações da fase móvel NH₄NO₃ utilizando uma solução de referência de 10 µg L⁻¹ de Cr(VI).55
- FIGURA 19 - Cromatogramas correspondentes a 10 µg L⁻¹ das espécies de Cr em função da vazão de fase móvel 15 mmol L⁻¹ HNO₃.56
- FIGURA 20 - Curvas de regressão linear para Cr(VI) para os isótopos ⁵²Cr e ⁵³Cr. .59
- FIGURA 21 - Curvas de regressão linear para Cr(VI) para os isótopos ⁵²Cr e ⁵³Cr, na faixa linear de 1 a 20 µg L⁻¹.59
- FIGURA 22 - Aspecto visual dos extratos das amostras de fertilizante orgânico utilizado neste trabalho.64
- FIGURA 23 - Cromatogramas obtidos para um material de referência certificado, uma amostra diluída 10x e uma solução a 30 µg L⁻¹ de Cr(VI) e Cr(III).65
- FIGURA 24 - Cromatogramas obtidos após a injeção de 100 µL de solução de referência e a amostra A. A) Extração em meio alcalino e quantificação por LC-ICP-MS, a amostra foi diluída 100x; B) a mesma amostra "A" ampliada 10 vezes.65
- FIGURA 25 - Comparação dos resultados em concentração obtidos pelas técnicas de LC-ICP-MS e IC-Vis.66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Interferências espectrais relacionadas a quantificação de cromo por ICP-MS.....	18
TABELA 2 - Resumo das metodologias analíticas aplicadas para a especiação de Cr em diversas matrizes.	21
TABELA 3 - Condições instrumentais empregadas para a determinação de Cr total, elementos essenciais e não essenciais da amostra e para a análise de especiação de Cr por LC-ICP-MS.	25
TABELA 4 - Teor de umidade e cinzas das amostras de fertilizante orgânico determinados com base nos métodos ASTM D 2216-98 e D 2974-00. .	34
TABELA 5 - Resultado da concentração dos elementos essenciais e não essenciais das amostras de fertilizante orgânico após digestão por via úmida assistida por micro-ondas baseada no método 3051A da EPA. Determinações feitas por (a) ICP-OES e (b) ICP-MS, n = 3.....	36
TABELA 6 - Condições para avaliação da composição da solução extratora.	41
TABELA 7 - Concentração das soluções de calibração e área dos picos (contagens) cromatográficos correspondentes ao Cr(VI), para 9 curvas de calibração.	57
TABELA 8 - Área dos picos cromatográficos correspondentes ao branco, média e desvio padrão das 10 leituras, LOD e LOQ.....	60
TABELA 9 - Variações de condições experimentais para avaliação da robustez.	61
TABELA 10 - Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para Cr(VI).....	63
TABELA 11 - Concentrações de Cr(VI) por LC-ICP-MS e IC-Vis e Cr total por ICP-OES. Os resultados representam a média e desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.	67
TABELA 12 - Resumo dos procedimentos oficiais para determinação de Cr(VI) e do método proposto neste trabalho.....	67

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	do inglês, <i>American Society for Testing and Materials</i>
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês, <i>Certified Reference Material</i>
DPC	Difenilcarbazida
DRC	Cela de reação, do inglês, <i>Direct Reaction Cell</i>
DRX	Difração de raios X
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América, do inglês, <i>Environmental Protection Agency</i>
FD	Fator de diluição
ICP OES	Espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado
IC-Vis	Cromatografia de íons com detector no visível
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC-ICP-MS	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuário
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIST	do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
P.A.	Para Análise
RP	Fase reversa
UV	Ultravioleta
XANES	Espectroscopia de absorção de raios-X
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X

SUMÁRIO

1 Introdução	5
2 Revisão de Literatura	7
2.1 Fertilizantes orgânicos	7
2.2 Química do cromo	8
2.2.1 Influência do pH	9
2.2.2 Reação de oxidação e redução	10
2.2.3 Reação de precipitação e dissolução	11
2.2.4 Adsorção e dessorção.....	12
2.3 Legislação sobre Cr em fertilizante orgânico.....	12
2.4 Técnicas de determinação de espécies de Cr	13
2.4.1 Determinação direta na amostra sólida.....	14
2.4.2 Determinação espectrofotométrica de Cr(VI)	15
2.4.3 Métodos eletroanalíticos.....	16
2.4.4 Técnicas de espectrometria atômica	16
2.4.4.1 Especificação por LC-ICP-MS	17
2.5 Métodos de extração	20
3 OBJETIVOS	23
4 Materiais e métodos	24
4.1 Instrumentação.....	24
4.2 Reagentes e soluções	26
4.3 Amostra e material de referência certificado	27
4.4 Preparo de amostra para determinação de Cr total e caracterização elementar	29
4.5 Extração de Cr(VI).....	29
4.5.1 Escolha do tipo e concentração da solução extratora	29
4.5.2 Tempo de extração	30
4.5.3 Temperatura de extração	30
4.7 Desenvolvimento de Análise de especificação de Cr(VI) por LC-ICP-MS	30
4.8 Análise de especificação de Cr(VI) por IC-Vis	31
5 Resultados e discussão.....	34
5.1 Determinação do teor de umidade e teor de cinzas	34
5.2 Determinação de Cr total e caracterização elementar	34
5.3 Avaliação do procedimento de extração alcalina e quantificação de Cr(VI) por UV-Vis.....	37
5.4 Avaliação de procedimentos de extração de Cr(VI)	41
5.4.1 Composição de solução extratora	41

5.4.2. Avaliação da proporção de massa de amostra e volume do solvente extrator	45
5.4.3 Efeito da massa de amostra	46
5.4.4 Estudo da estabilidade de Cr(VI) em relação ao tempo	47
5.5 Otimização do sistema LC-ICP-MS para análise de especiação de Cr.....	48
5.5.1 Ajuste do instrumento ICP-MS	49
5.5.2 Escolha da coluna de troca iônica	50
5.5.3 Escolha da fase móvel e sua concentração	54
5.5.4 Avaliação da vazão de fase móvel	56
5.6 Validação do método.....	56
5.6.1. Linearidade.....	57
5.6.2 Limites de Detecção e Quantificação	60
5.6.3 Robustez	61
5.6.4 Recuperação do Analito, Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial .	62
5.6.5 Veracidade	64
5.7 Quantificação de Cr(VI)	64
6 Conclusão	69

1 INTRODUÇÃO

A presença de cromo no ambiente pode decorrer naturalmente, como em rochas, ou por fonte antropogênica. Nem sempre a disposição deste elemento é um indicativo de contaminação, o que vai depender de sua concentração e, principalmente, da forma química, para a qual há duas espécies mais estáveis: o cromo trivalente (Cr(III)) e o cromo hexavalente (Cr(VI)). O Cr(III), em determinadas concentrações, é essencial ao ser humano, enquanto o Cr(VI) é altamente tóxico para humanos, animais e plantas (NAMIEŚNIK e RABAJCZYK, 2012).

A contaminação de Cr(III) e Cr(VI) no ambiente, seja em água de superfície, solo, sedimentos ou plantas, pode ser proveniente da disposição inadequada de resíduos sólidos, como subprodutos da galvanoplastia, curtimento de couro, escória da liga ferro-cromo e até mesmo de insumos utilizados em plantações. O uso de fertilizante no setor agrícola, por exemplo, é amplo e praticamente indispensável. Desse modo, inovações quanto a produção destes insumos também tem surgido no decorrer dos anos, entre elas está o reaproveitamento de resíduos industriais para a produção de fertilizantes orgânicos. Apesar de atender praticamente todos os requisitos de um bom nutriente e contribuir com o meio ambiente, há uma preocupação quanto a concentração de elementos considerados tóxicos, proveniente do resíduo, estarem presentes nestes fertilizantes (KRÜGER *et al.*, 2017).

No caso do reaproveitamento do resíduo da indústria de curtume para produção de fertilizante orgânico, o monitoramento da concentração de cromo é essencial, uma vez que o principal tratamento do couro ainda é a base de sulfato básico de cromo(III). A estabilidade das espécies de Cr está relacionada a diversos fatores, entre eles o pH e o potencial redox do meio em que se encontra, podendo ocorrer a interconversão das espécies no ambiente (KOTAZ *et al.*, 2000). Desse modo, a quantificação de cromo total não oferece informações suficientes quanto à sua toxicidade e aos efeitos adversos. Inclusive em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), alterou a Normativa de contaminantes em fertilizantes orgânicos, exigindo o controle de Cr(VI) e suprimindo a recomendação para cromo total (MAPA, 2016).

Para tanto, são necessárias metodologias capazes de separar e quantificar estas espécies de cromo. Na literatura há estudos reportados sobre análise de especiação de cromo em diversas matrizes, como em solo, água, produtos

alimentícios, farmacêuticos, entre outros, utilizando diversas metodologias. Porém, ainda se observa dificuldades na quantificação de espécies de cromo em amostras com elevado teor orgânico.

Portanto, neste trabalho foi proposto um método de especificação de cromo utilizando separação por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), buscando uma alta seletividade e baixos limites de detecção. Também, foi proposto um procedimento de preparo de amostra compatível com a técnica de detecção e que seja efetivo na extração da espécie de Cr(VI). Como método de comparação foi utilizada a cromatografia de íons com detector ultravioleta-visível (IC-UV-Vis), com condições já otimizadas previamente pelo fabricante para determinação de Cr(VI).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERTILIZANTES ORGÂNICOS

Os fertilizantes orgânicos são insumos utilizados para manter a fertilidade do solo, sendo aplicados em grande volume e de forma periódica. São de natureza fundamentalmente orgânica, com composição ou adição de alguns micronutrientes, que são elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas. A obtenção do fertilizante orgânico pode ser por diferentes processos, entre eles, físicos, químicos, físico-químicos e bioquímicos. As matérias-primas podem ser de origem industrial, urbana, rural, vegetal ou animal, enriquecido ou não de nutrientes minerais (EMBRAPA, 2014). Desse modo, o MAPA classifica os fertilizantes orgânicos em duas classes de acordo com a matéria-prima utilizada, conforme descrito a seguir (MAPA, 2020):

- Classe A: em sua produção é utilizada matéria-prima gerada nas atividades extrativas, agropecuárias, industriais, agroindustriais e comerciais, incluindo aquelas de origem mineral, vegetal, animal, lodos industriais e agroindustriais de sistema de tratamento de águas residuárias com uso autorizado pelo órgão ambiental, resíduos de frutas, legumes, verduras e restos de alimentos gerados em pré e pós-consumo, segregados na fonte geradora e recolhidos por coleta diferenciada, todos isentos de despejos ou contaminantes sanitários, resultando em um produto que pode ser usado na agricultura de forma segura.

- Classe B: em sua produção são utilizadas quaisquer quantidades de matérias-primas orgânicas geradas nas atividades urbanas, industriais e agroindustriais, incluindo a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos da coleta convencional, lodos gerados em estações de tratamento de esgotos, lodos industriais e agroindustriais gerados em sistemas de tratamento de águas residuárias contendo qualquer quantidade de despejos ou contaminantes sanitários, todos com seu uso autorizado pelo órgão ambiental, resultando em um produto seguro para ser utilizado na agricultura.

A produção de cada classe de fertilizantes vai depender da disponibilidade da matéria-prima em cada região, tornando assim, um produto com preço mais acessível e que contribui com a sustentabilidade, oferecendo um destino a esses materiais e otimizando seu aproveitamento (LEE *et al.*, 2018).

Esta produção está sendo uma alternativa para aproveitar resíduos industriais, entre eles o da indústria de curtume, na qual toneladas de resíduos são gerados por mês, podendo causar um impacto ambiental se não forem tomadas as devidas providências. Os resíduos de curtume possuem propriedades requeridas para ser um bom nutriente para plantas, pois são constituídos de materiais orgânicos de origem animal misturado com sais inorgânicos, como N, Ca, S, P, Mg e K (CIAVATTA *et al.*, 2012). Porém, o processo de curtimento mais utilizado pelas indústrias de couro brasileira é o tratamento com sais de cromo. Este resíduo possui elevada concentração de Cr(III), sendo classificado como resíduo perigoso Classe I, segundo a norma brasileira NBR-10004 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

A ocorrência de cromo em fertilizantes orgânicos derivados de curtumes tem despertado preocupação com uma possível contaminação do solo, da água e das culturas (GIACOMETTI *et al.*, 2012). Devido à possibilidade de redução ou oxidação das espécies de cromo no solo, é inevitável o surgimento do interesse na identificação das espécies presentes, visando um monitoramento ambiental mais adequado, quando comparado com a quantificação total desse elemento (CIAVATTA *et al.*, 2012).

2.2 QUÍMICA DO CROMO

O cromo é encontrado de forma natural em rochas, animais, plantas e solos, onde pode ocorrer a combinação com outros elementos para formar vários compostos. Possui aplicação em diversas indústrias, incluindo metalúrgica, galvanização, produção de tintas, curtimento, entre outras (NAMIEŚNIK *et al.*, 2012).

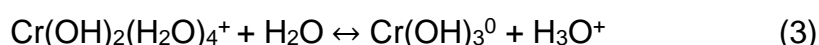
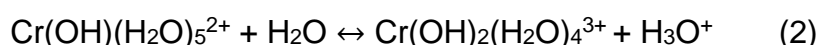
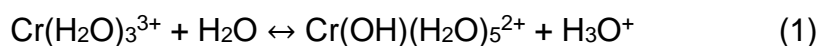
Existem três principais estados de oxidação do cromo: cromo elementar (Cr(0)), cromo trivalente e cromo hexavalente. Os estados intermediários Cr(II), Cr(IV) e Cr(V) são espécies instáveis da reação de oxidação e redução do Cr(III) e Cr(VI) (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2012). O Cr(III), em determinada quantidade, é reconhecido como um elemento essencial aos seres humanos, atuando no metabolismo relacionado com glicose, insulina e proteínas. Porém, o Cr(VI) é biologicamente tóxico, por ser solúvel e permeável através das membranas biológicas, podendo interagir com as proteínas e ácidos nucleicos. Sendo assim, a espécie Cr(VI) é considerada mutagênica e carcinogênica em humanos e animais (ANDERSON E KOZLOVSKY, 1985; WANG, 1989).

No ambiente, a forma química do cromo depende de vários fatores, dentre eles as transformações químicas que afetam sua mobilidade e biodisponibilidade. O Cr(III) é considerado uma espécie estável, porém pode ser oxidado para Cr(VI) por agentes oxidantes naturais, e é encontrado naturalmente em rochas como a cromita. O Cr(VI) é o segundo estado mais estável do cromo, porém, pode ser facilmente reduzido para Cr(III) por diferentes agentes redutores como Fe(II), fosfato, sulfato, sulfito e matéria orgânica. Em pH neutro, o Cr(III) possui a tendência de ser relativamente inerte e precipita, sendo facilmente adsorvido em fases sólidas e, desta forma, as espécies de Cr(III) tem pouca mobilidade no solo e água, enquanto as espécies de Cr(VI) são mais móveis (KOTAS *et al.*, 2000).

No solo, as espécies de cromo podem sofrer uma série de transformações e mudanças sobre influências de vários processos físico-químicos, como variações de pH, reações redox, precipitação/dissolução e adsorção/dessorção.

2.2.1 Influência do pH

Em soluções aquosas, o Cr(III) existe como um complexo hexa-aqua $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, que possui produto de hidrólise demonstrado pelas equações (1), (2) e (3).



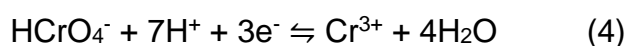
A presença dessas espécies hidroxiladas no ambiente está relacionada ao pH. Em soluções mais ácidas ($\text{pH} \approx 4$), Cr(III) é a espécie predominante do Cr e sob condições levemente ácidas a sua hidrólise gera $\text{Cr}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$. Entre a faixa de pH do neutro para alcalino, o Cr(III) tende a precipitar como $\text{Cr}(\text{OH})_3$, muito pouco solúvel. Como consequência, em pH típico para água natural (aproximadamente de 4 a 9) a espécie $\text{Cr}(\text{OH})_2^{2+}$ é a predominante, já as espécies $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ e Cr(III) predominam em meio ácido, enquanto que as espécies $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ e $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ são mais estáveis em meio alcalino (MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

No caso do Cr(VI), sua concentração total e o valor do pH determinam as frações relativas das espécies que ocorrem em solução. O ácido crômico (H_2CrO_4) está presente em meio ácido e é apenas observado em pH abaixo de 1. Como

resultado da dissociação de cromatos e dicromatos, os seguintes produtos são formados: hidrogenocromato (HCrO_4^-) em pH em torno de 1,0 à 6,5 e em concentração de Cr(VI) abaixo de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; no entanto, dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) é prevalente em soluções mais concentradas ($> 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e cromato (CrO_4^{2-}) em pH menor que 6,5 (KOTAS *et al.*, 2000).

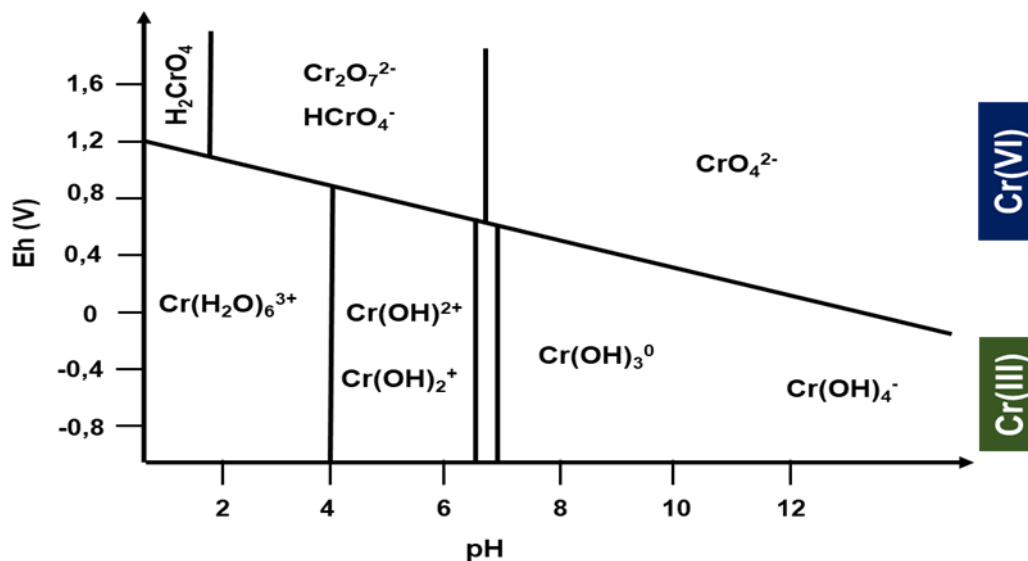
2.2.2 Reação de oxidação e redução

O potencial redox (Eh) e o pH possuem uma função crucial na interconversão de ambos os estados de oxidação do cromo. O Cr(VI), sob condições ácidas, exibe um alto valor Eh positivo, o que significa que é um forte agente oxidante e é instável na presença de doadores de elétrons (Equação 4), como matéria orgânica, Fe^{2+} , S^{2-} , bem como a atividade de microorganismos.



Em pH neutro, o equilíbrio entre Cr(III) e Cr(VI) é dado pelo oxigênio contido na solução. Em contraste, em meio alcalino, o caráter oxidante do cromo hexavalente é muito menos eficaz e, portanto, possui uma tendência a permanecer nesse estado em vez de ser reduzido. Dessa forma, a relação Eh vs. pH depende do meio em que as espécies se encontram. Na Figura 1, está demonstrado um diagrama da distribuição das espécies de Cr em soluções aquosas aeradas e sem a presença de complexantes.

Figura 1 - Espécies trivalentes e hexavalentes de Cr em ambientes aquáticos em função de Eh vs. pH.



Fonte: KOTAZ, 2000.

A concentração de redutores e oxidantes também regula o comportamento redox do cromo. Mesmo que o valor de Eh para Cr(VI)/Cr(III) seja alto, existem vários oxidantes no ambiente aquático que podem oxidar o Cr(III) para Cr(VI). Entretanto, apenas alguns deles são encontrados em níveis de concentração suficientes para converter a espécie (ZAYED *et al.*, 2015).

2.2.3 Reação de precipitação e dissolução

Precipitação e dissolução são outros importantes aspectos que influenciam a distribuição das espécies de cromo no ambiente. Na questão da estabilidade, compostos de Cr(III) são estáveis em solo, enquanto o Cr(VI) é mais instável e é facilmente mobilizado em solos alcalinos e ácidos. Sob condições predominantes em águas de superfície, a solubilidade do Cr(III) é limitada pela formação de hidróxidos de cromo insolúveis com estruturas minerais (ex: $(\text{Cr,Fe})(\text{OH})_3$), que possui uma solubilidade ainda menor do que o $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Em condições neutras e básicas, o Cr(III) pode formar compostos polinucleares, onde, em condições adequadas, precipitam como hidróxido de cromo.

A maioria dos compostos de Cr(VI) (cromatos e dicromatos) é solúvel em água em uma ampla faixa de pH. Os sais de metais alcalinos de Cr(VI), como o Na^+ e K^+ , são solúveis em água. Entretanto, eles também podem existir como minerais sólidos. Quando estão combinados a outros cátions, entre eles os sais de cátions divalentes

(Ba²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺), esses compostos são pouco solúveis, enquanto os cromatos de chumbo e zinco são praticamente insolúveis em água, à temperatura ambiente (ZAYED *et al.*, 2015; MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

2.2.4 Adsorção e dessorção

A concentração de cromo em sistemas aquáticos naturais também é controlada por reações de adsorção e dessorção. A sorção causa a migração do íon cromo da fase aquosa para a superfície de sedimentos suspensos e sedimentados. O equilíbrio deste processo depende de condições ambientais complexas, como pH, área de superfície ou densidade de locais ativos. O cromo hexavalente pode ser adsorvido por sólidos minerais, dentre eles óxidos de ferro e alumínio. Óxidos de ferro são adsorventes dominantes em solos ácidos a neutros em lençóis freáticos. A adsorção de Cr(VI) dissolvido é maior em pH mais baixo. No entanto, os ânions de Cr(VI) geralmente são fracamente adsorvidos em minerais devido a repulsão da carga negativa das partículas do solo. Por outro lado, as espécies de Cr(III) são atraídas parcialmente para a superfície por cargas negativas, como silicatos, e o Cr(III) ligado organicamente também pode adsorver ou dessorver a partir de substâncias orgânicas (ZAYED *et al.*, 2015; MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

2.3 LEGISLAÇÃO SOBRE Cr EM FERTILIZANTE ORGÂNICO

O Cr(VI) possui propriedades diferentes ao Cr(III) em termos de toxicidade, sendo que a espécie de Cr(III), em uma determinada concentração, é essencial ao metabolismo humano e vegetal, enquanto que o Cr(VI) possui características altamente tóxicas. A exposição ocupacional e ambiental ao Cr(VI) está vinculada a uma variedade de doenças inflamatórias, degenerativas e cancerígenas (SCHARF *et al.*, 2014). Além disso, o Cr(VI) é tóxico para muitas plantas, animais e bactérias. No solo, uma contaminação causada por esta espécie altera as estruturas nas comunidades microbianas, reduzindo seu crescimento e prejudicando importantes atividades enzimáticas (Mishra *et al.*, 2016).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) estabeleceu legislação contendo os limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos. Dentre os contaminantes, foi incluído o Cr(VI), tendo como

valor máximo permitido de 2 mg kg^{-1} (Instrução Normativa DAS N° 27, 05 de junho de 2006, alterada pela IN DAS n° 7, de 12/04/2016, republicada em 02/05/2016)].

2.4 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE Cr

A determinação elementar é realizada com objetivo de quantificar primordialmente a sua concentração total, porém, esta informação é relativamente insuficiente em casos que se queira avaliar as reações dos elementos em processos ambientais e toxicológicos. Pois, os elementos podem existir em diferentes formas e espécies químicas e assim possuir distintas propriedades. A caracterização completa de um elemento fornece informações mais apuradas sobre sua toxicidade, potencial de acúmulo, mobilidade, interação e possíveis efeitos fisiológicos (LUND, 1990).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a análise de especiação foi definida como a “atividade analítica de identificação e/ou medida da quantidade de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra” (TEMPLETON *et al.*, 2000), sendo uma importante ferramenta na investigação da toxicidade e da disponibilidade dos elementos. Dessa forma, as aplicações da análise de especiação produzem informações relevantes na área química, farmacêutica, alimentícia e ambiental.

Devido às diferenças significativas nas propriedades bioquímicas de ambas as espécies de Cr, existe a necessidade do monitoramento dessas espécies, envolvendo a separação, identificação e quantificação. Em consequência, a análise de especiação assume um papel importante. Porém, algumas dificuldades são encontradas na análise, entre elas (JÓZSEF *et al.*, 2019):

- Extração das espécies: o processo de extração das espécies da matriz da amostra ainda é um fator crítico para os métodos de análise de especiação, na qual a natureza das espécies e amostras influenciam diretamente na escolha do procedimento de extração.
- Coleta e preservação de amostras: o processo de amostragem, bem como a preservação da amostra, são parâmetros que podem influenciar significativamente na estabilidade das espécies. No caso da especiação de cromo em matrizes aquosas, não é aconselhado a acidificação do meio como modo de preservação, devido ao equilíbrio de oxi-redução do cromo.

- Padrão das espécies: uma das dificuldades é encontrar padrões estáveis de diversas espécies de interesse.
- Validação: a avaliação dos métodos de especiação é dificultada pela pouca disponibilidade de materiais de referência certificados (CRM). Portanto, geralmente, essas avaliações são realizadas através de testes de adição e recuperação do analito.

Vários métodos analíticos utilizando diferentes sistemas de separação e detecção são descritas na literatura para a análise de especiação de cromo. Alguns autores dividem os métodos de análise de especiação em categorias, entre elas pode-se citar, técnicas que permitem a especiação de Cr diretamente na amostra sólida, outra reúne metodologias na qual a espécie é isolada e determinada, e, por fim, um método que envolve o uso de técnicas hífenadas, que é o acoplamento de um sistema de separação e quantificação (SÉBY *et al.*, 2018). Nesta revisão, serão discutidos alguns destes métodos de determinação das espécies de cromo.

2.4.1 Determinação direta na amostra sólida

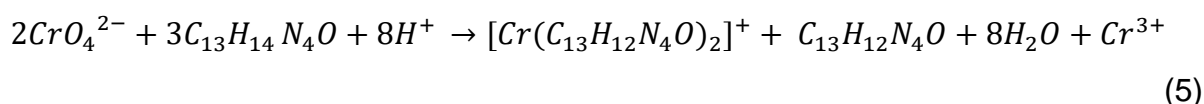
Métodos baseados na espectroscopia de raios-X têm sido frequentemente utilizados em estudos de especiação, com a vantagem de envolver uma técnica não destrutiva e permitir a análise direta em sólidos, sem a necessidade do preparo de amostra para a extração das espécies, tornando-se assim um método mais rápido e confiável para a análise de especiação. Na espectroscopia de raios-X, faz-se o uso do padrão característico de linhas espectrais de absorção ou de emissão de raios-X quando os átomos são excitados. Com o avanço tecnológico no desenvolvimento de novos detectores de estado sólido (Si ou Ge), fontes de radiação muito intensas (radiação síncrotron) e sistemas ópticos de alta performance, a espectroscopia de raios-X tem se tornado em uma técnica altamente confiável, muito precisa e com alto poder de resolução, podendo atingir limites de detecção satisfatórios ou melhores do que aqueles obtidos por técnicas analíticas convencionais.

As técnicas mais empregadas são a espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), espectroscopia de absorção de raios-X (XANES) e difração de raios-X (DRX). No trabalho de MALHERBE *et al.*, (2011), os autores avaliaram o desempenho do procedimento de extração do método EPA 3060A, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) como meio extrator e posterior determinação

por cromatografia a líquido (LC-ICP-MS). Este método foi comparado com o método XANES, que possibilita a quantificação de Cr(VI) diretamente no estado sólido, na qual foi feita a análise no extrato e na amostra sólida. Os resultados obtidos em ambos os métodos foram comparados para três amostras sólidas com diferentes matrizes: um solo contendo resíduo de processamento de minério de cromita, um solo argiloso e borra de tinta. Os resultados mostraram que os teores de Cr(VI) determinados pelos dois métodos diferem significativamente e que o procedimento do Método EPA 3060A subestimou o teor de Cr(VI) em todas as amostras estudadas. O baixo rendimento de extração do método EPA 3060A foi considerado o principal motivo. No entanto, ao contrário de outras técnicas em escala de laboratório, a XANES requer equipamentos muito grandes e a disponibilidade de tempo do instrumento pode ser muito escassa, além do alto custo de operação.

2.4.2 Determinação espectrofotométrica de Cr(VI)

Métodos espectrofotométricos podem ser utilizados para a determinação das espécies de cromo usando reagentes para formar espécies absorventes da radiação eletromagnética e que apresentam seletividade na resposta. O método EPA 7196 (espectrofotometria UV-Vis) (USEPA, 1995) é recomendado para determinação de Cr(VI), tanto em amostras aquosas, quanto em sólidas, após a sua extração. O método é baseado na reação de Cr(VI) com a difenilcarbazida, que, segundo o mecanismo mais aceito, a reação ocorre em meio ácido ($\text{pH} \approx 2$), na qual o Cr(VI) oxida a difenilcarbazida para difenilcarbazona, sendo o Cr(VI) reduzido à Cr(III), de acordo com a Equação 5. Os íons Cr(III) reagem com a forma enol da carbazona gerada, formando um complexo vermelho-violeta que absorve na região de 540-554 nm.



Apesar de sua simplicidade, o método sofre interferência devido à presença de compostos que podem reagir com a difenilcarbazida, resultando na formação de complexos que absorvem no mesmo comprimento de onda do complexo difenilcarbazona-Cr(III). Dentre os interferentes podem-se citar os complexos com

Mo(VI), Cu(II), Fe(II), Hg(II) e V(V). Além disso, o baixo pH necessário para a formação do complexo difenilcarbazona-Cr(III) e presença de Fe(II), sulfeto, sulfito e alguns compostos orgânicos podem reduzir o Cr(VI) levando à sua perda durante a análise e, conseqüentemente, subestimação da concentração de Cr(VI). Para separar o Cr(VI) dessas espécies, a cromatografia de íons pode ser usada. No método 7199 da USEPA (USEPA, 1996), o Cr(VI) é cromatograficamente separado dessas interferências antes da derivatização com difenilcarbazona.

As principais desvantagens desta técnica são o elevado limite de detecção (em torno de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$) e a susceptibilidade a interferências. Em solos, além dos compostos já citados, é comum a presença de compostos húmicos, os quais são extraídos durante o procedimento de extração, que podem interferir na determinação de Cr(VI), pois eles também absorvem na faixa de 540 nm (PETTINE *et al.*, 2005).

2.4.3 Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos são utilizados para a determinação direta de Cr(VI) em amostras sólidas após extração. O método mais comum é a voltametria utilizando a redução do Cr(VI) a Cr(III), chegando à detectar níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, sem pré-concentração, e a ng L^{-1} após uma etapa de deposição, na qual o analito é pré-concentrado no eletrodo de trabalho. Além disso, esse método é de baixo custo de operação comparado as técnicas espectrométricas, e possui alta sensibilidade (BOBROWSKI, KRÓLICKA, ZAREBSKI, 2009).

Diversos trabalhos têm utilizado a voltametria como técnica para análise de especiação de cromo. Entre eles pode-se citar o de GRABARCZYK, (2008), que utilizou voltametria por adsorção para especiação de cromo em água de rio. Cr(III) e Cr(VI) foram determinadas simultaneamente, após a complexação do Cr(III) com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético), possibilitando assim a determinação de Cr(VI) em baixas concentrações. Esta técnica também pode ser aplicada para a análise de amostras com matrizes mais complexas, como solo, após uma etapa de extração das espécies de cromo (GRABARCZYK, KOROLCZUK, TYSZCZUK, 2006).

2.4.4 Técnicas de espectrometria atômica

Técnicas de espectrometria atômica, como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e com atomização eletrotérmica (ETAAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), podem ser utilizadas para a determinação das espécies de cromo quando combinadas a um método de separação química ou física das espécies de interesse (RAKHUNDE *et al.*, 2012). Entre estas técnicas, o acoplamento de cromatografia a líquido (LC) ao ICP-MS têm sido frequentemente utilizados para a especificação de Cr.

2.4.4.1 Especificação por LC-ICP-MS

A cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) é utilizada como um método analítico para a separação, seguida da quantificação das espécies de cromo. A LC possui diferentes mecanismos de separação, dentre eles estão fase reversa, pareamento de íons, troca catiônica e troca aniônica. O mecanismo de separação de troca iônica é usado para separação de íons e substâncias ionizadas, pois utiliza o mecanismo de equilíbrio de troca e interação eletrostática entre uma fase estacionária, que contém cargas na superfície, e íons de carga opostas presentes na fase móvel. A cromatografia de troca iônica pode ser usada no modo catiônico ou aniônico. A força iônica do soluto, a temperatura, o pH, a concentração e a vazão da fase móvel influenciam na separação dos analitos (WANG *et al.*, 2010).

O uso da ICP-MS como detector tem vantagens na análise de especificação devido à sua capacidade de análise multielementar, obtenção de baixos LOD (na faixa de ng g^{-1} ou pg g^{-1}), além da possibilidade de determinação isotópica (RAY *et al.*, 2004). No entanto, a ICP-MS também possui limitações, tanto de interferências espectrais, como não espectrais.

- Interferências espectrais na determinação de cromo

As interferências espectrais na determinação de Cr por ICP-MS ocorrem principalmente devido à formação de íons poliatômicos e isobáricos, que têm as mesmas razões massa/carga (m/z) do analito. A determinação de cromo por ICP-MS pode ser feita através dos seus quatro isótopos naturais, sendo 4,3% de ^{50}Cr , 83,8% de ^{52}Cr , 9,5% de ^{53}Cr e 2,4% de ^{54}Cr . No entanto, todos esses isótopos são afetados por algumas espécies poliatômicas, formadas por interação entre constituintes do

plasma gasoso (Ar) e da matriz, como descrito na Tabela 1 (MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Interferências espectrais relacionadas a quantificação de cromo por ICP-MS.

Isótopo	Interferências	
	Isobáricas	Poliatômicas
^{50}Cr (4,3%)	$^{50}\text{V}^+$, $^{50}\text{Ti}^+$	$^{15}\text{N}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$
^{52}Cr (83,8%)	-	$^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^1\text{H}^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
^{53}Cr (9,5%)	-	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^1\text{H}^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
^{54}Cr (2,4%)	$^{54}\text{Fe}^+$	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^1\text{H}^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$

As interferências poliatômicas sobre o $^{52}\text{Cr}^+$, incluindo $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ e $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, são as mais frequentes em ICP-MS. Apesar do fato da determinação de cromo apresentar alguma dificuldade, o ^{52}Cr é o isótopo mais utilizado por ser o mais abundante (83,8%). Além disso, interferências podem ser causadas por isótopos de outros elementos (isóbaros) que se sobrepõem a íons com mesma massa nominal do analito (MARKIEWICZ *et al.*, 2015). Entretanto, somente o V e o Ti interferem no ^{50}Cr e o Fe no ^{54}Cr , isótopos de menor abundância natural.

Uma variedade de abordagens pode ser aplicada para superar efetivamente interferências causadas em decorrência do poder de resolução limitado do separador de massa do tipo quadrupolo (resolução de aproximadamente 0,7 u.m.a). Para contornar interferências devido a íons isobáricos e duplamente carregados, o uso de isótopos alternativos do analito são recomendados, pois o separador de massa do tipo quadrupolo não tem resolução suficiente. Além disso, o uso de célula de colisão multipolar (hexapolo ou octapolo) ou célula de reação (quadrupolo), correção matemática, plasma frio, espectrômetro de massa de alta resolução ou otimização da separação cromatográfica reduzem ou contornam as interferências poliatômicas (MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

- Interferências não-espectrais

As interferências não espectrais são induzidas pela matriz da amostra ou fases móveis quando compostos orgânicos ou sais inorgânicos são utilizados. Elas contribuem para obstruir o nebulizador e podem se acumular na tocha e na interface do instrumento, causando distorções na intensidade de sinal, tanto crescente como decrescentes. Além disso, os componentes da amostra podem interferir através da modificação das características de ionização. Medidas incorretas decorrentes de

interferências não espectrais são geralmente superados pelo uso de procedimentos de calibração adequados, por exemplo, adição de padrão, ajuste de matriz ou uso de padrão interno (MARKIEWICZ *et al.*, 2015).

Outra alternativa para correção de interferência não espectral refere-se ao uso da diluição isotópica (IDMS), permitindo uma quantificação mais precisa e exata e, na análise de especiação, permitindo mensurar e monitorar a interconversão das espécies. O princípio de diluição isotópica baseia-se na adição (*spike*) à amostra de uma quantidade conhecida de um ou mais isótopos estáveis enriquecidos. Geralmente a adição é feita com um dos isótopos menos abundantes, tomando-se o de maior abundância natural como isótopo de referência. Assim, no caso do cromo, pode ser adicionado $^{53}\text{Cr(VI)}$ enriquecido na determinação de Cr(VI) (GONZÁLEZ *et al.*, 2005). É importante destacar que a diluição isotópica não corrige interferências espectrais, sendo necessário verificar previamente se há alguma interferência espectral sobre um dos isótopos utilizados na determinação.

O Método EPA 6800 (USEPA 6800, 2007) aborda duas metodologias de aplicação da diluição isotópica. A primeira é a aplicação da diluição isotópica para a determinação da concentração total de elementos ou moléculas e a segunda é a aplicação para especiação com diluição isotópica por espectrometria de massa (SIDMS) para determinação de espécies elementares ou moleculares. No trabalho de CAPORALE *et al.*, 2019, os autores utilizaram o método de diluição isotópica para quantificar Cr(VI) em solo contaminado, onde adicionaram uma quantidade conhecida do isótopo enriquecido $^{50}\text{Cr(VI)}$ na amostra antes do procedimento de extração.

A fim de ganhar especificidade na determinação de espécies de Cr e minimizar sua conversão redox durante a análise, o acoplamento entre LC e detectores altamente sensíveis como ICP-MS é cada vez mais utilizado. A cromatografia de íons (IC) e a cromatografia de fase reversa (RP) são os métodos de separação mais utilizados da LC para análise de especiação. Colunas de troca aniônica e catiônica têm sido usadas para especiação de cromo. Esses métodos permitem uma determinação precisa do Cr(VI), porém a análise do Cr(III) ainda é considerada mais difícil, devido à sua hidrólise e/ou sua forte retenção na coluna. Para determinar simultaneamente as duas espécies de cromo, pode ser adicionado o complexante EDTA junto à fase móvel para formar um complexo carregado negativamente com Cr(III). Porém, a reação da complexação do Cr(III) com EDTA é cineticamente desfavorecida e este procedimento necessita de aquecimento em torno de 70 °C e pH

em tono de 7. A complexação do Cr(III) com EDTA deve ser feita tanto nas soluções de calibração, quanto na amostra em solução. Entretanto, os agentes complexantes podem ter alta concentração de sais e os eluentes com carbono ou cloro podem gerar interferências poliatômicas e interferir na medição dos isótopos de cromo mais abundantes por ICP-MS. (SÉBY, VACCHINA, 2018)

2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Outro fator importante a ser considerado na determinação das espécies de Cr é o preparo da amostra, o qual é uma etapa crítica, pois o procedimento de extração deve ser eficiente para extrair as espécies de forma quantitativa, sem a interconversão entre os estados de oxidação das diferentes espécies de Cr e, também, assegurar a compatibilidade do meio extrator (solvente) com a técnica de separação e detecção.

Neste caso, o procedimento de extração a ser usado deve manter o equilíbrio estabelecido entre as formas químicas do elemento na amostra (HERNANDEZ *et al.*, 2017). Para extrair Cr(VI) de uma matriz sólida, dois critérios devem ser analisados: I) a solução de extração deve solubilizar todas as formas de Cr(VI); II) as condições da extração não devem induzir a redução ou oxidação das espécies de Cr.

Há poucos trabalhos relacionados à determinação das espécies de cromo em fertilizantes, devido à dificuldade de preparo de amostra em uma matriz considerada complexa, bem como o uso de uma técnica de quantificação compatível ao preparo de amostra. O Método EPA 3060A (USEPA 3060A, 1995) é o método oficial dos Estados Unidos para a extração de Cr(VI) na forma solúvel, adsorvida e precipitada em solo, sedimentos e lodo. Este método consiste na extração alcalina, usando uma solução de $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ e aquecimento a $90-95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 minutos para solubilizar o Cr(VI), e para evitar a redução para Cr(III) utilizando Mg^{2+} em uma solução tampão. Entretanto, apesar de ser um método relativamente seletivo, a extração alcalina de Cr(VI) também extrai compostos húmicos de cor escura, dificultando a determinação colorimétrica.

Na Tabela 2 estão relacionados alguns trabalhos de análise de especiação de cromo em amostras de diversas matrizes, mencionando os métodos de preparo e as técnicas de detecção.

Tabela 2 - Resumo das metodologias analíticas aplicadas para a especiação de Cr em diversas matrizes.

Solução extratora	Matriz	Procedimento de extração	Técnica de determinação	Referência
1,0 mol L ⁻¹ NH ₄ NO ₃	Fertilizante e solo	Agitação por 2h em temperatura ambiente Banho de ultrassom	UV-Vis	SAGER, 2005
NaOH (concentração variou entre as amostras de 21,6 a 54,1 mol L ⁻¹)	Produtos lácteos e cereais		HPLC-ICP MS	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2017
0,05 mol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0,05 mol L ⁻¹ NH ₄ OH	Revestimento contra corrosão utilizado na indústria automotiva	Sonicação	HPLC-ICP MS	SÉBY <i>et al.</i> , 2008
0,05 mol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ + NH ₄ OH + 0,02 mol L ⁻¹ DTPA H ₂ O	Solo	Agitação magnética por 10 min a 40 °C	Voltametria	GRABARCZYK <i>et al.</i> , 2006
	Suplemento alimentar	Radiação micro-ondas por 30 min a 90 °C	HPLC-ICP MS	ARAUJO <i>et al.</i> , 2017
50 µmol mL ⁻¹ Na ₂ -EDTA	Solo	Radiação micro-ondas por 5 min a 80 °C	LC-ICP MS	CAPORALE, A. G. <i>et al.</i> , 2019
0,1 mol L ⁻¹ tiourea bis-[2-hidroxi-1-naftaldeído]	Água de resíduo industrial	Pré-concentração por extração em ponto nuvem	FAAS	KIRAN <i>et al.</i> , 2008
0,4% v/v HF e 2% Triton X-100	Óleo comestível de origem animal	Radiação micro-ondas por 45 min a 90 °C	LC-ICP-MS	LIN <i>et al.</i> , 2016
Cr(VI): 0,5 mol L ⁻¹ NaOH+ 0,28 mol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ Cr(III): 50 mmol L ⁻¹ EDTA (pH=10)	Solo	Cr(VI): Radiação micro-ondas por 1 hora a 90 °C Cr(III): Radiação micro-ondas por 5 min a 90 °C e 5 min a 110 °C	LC-ICP-MS	WOLLE <i>et al.</i> , 2014
10 mM EDTA, pH = 10,5	Tecido biológico	Agitação por vortex durante 60 min a temperatura ambiente	HPLC-ICP MS	PECHANCOVÁ, R., GALLO, J., MILDE, D.,

2,4 m mol L ⁻¹ EDTA 0,02 m mol L ⁻¹ DPC	Carne e laticínios	Aquecimento por 25 min a 70°C com a solução de EDTA, após resfriar, foi adicionado à solução de DPC e novamente aquecido por 25 min a 70°C	HPLC-ICP MS	PLUHÁČEK, T. 2020 SARAIVA <i>et al.</i> 2021
0,5 mol L ⁻¹ NaOH+ 0,28 mol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ 2% (m v ⁻¹) NaCl, 0,3% (v v ⁻¹) Triton X-100, 0,05% (m v ⁻¹) 1,5 difenilcarbazida	Suplemento alimentar Fertilizante orgânico	Radiação micro-ondas por 1 hora a 95 °C Extração ponto nuvem	IC-ICP MS UV-Vís	MARTONE <i>et al.</i> 2013 SÁ <i>et al.</i> 2021

3 OBJETIVOS

A determinação da espécie de Cr(VI) é de suma importância, uma vez que a determinação de Cr total não oferece informações suficientes sobre a toxicidade. Devido a isso, este trabalho tem como objetivo propor uma metodologia de separação e quantificação de Cr(VI) em fertilizante orgânico, com sensibilidade que atenda a legislação vigente no Brasil (de acordo com MAPA, a concentração limite de Cr(VI) em fertilizantes orgânicos é de 2 mg kg^{-1}), avaliando métodos de separação e quantificação utilizando técnicas de LC-ICP-MS e IC-UV-Vis. Outro objetivo é, avaliar um método de preparo de amostras eficiente na extração de Cr(VI) e adequado com o método de quantificação, e avaliar o procedimento de extração alcalina e quantificação de Cr(VI) por UV-Vis, como já descrito na literatura, porém aplicado a amostra de fertilizante orgânico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A decomposição da amostra foi feita em um forno de micro-ondas modelo *Ultrawave (Microwave digestion System, Milestone, Itália)*, que possui câmara única de reação feita de aço e revestida com frasco de PTFE (politetrafluoretileno), cuja cavidade é pressurizada a 40 bar com argônio (pureza 99,0, White Martins, Brasil). O sistema é equipado com 15 frascos de PTFE, com capacidade para 15 mL e a temperatura e pressão máxima de trabalho são de 300 °C e 199 bar, respectivamente. O programa de aquecimento consiste de uma rampa de 15 min com tempo de permanência por 35 min, com pressão, temperatura e potência da radiação micro-ondas máximas de 160 bar, 250 °C e 1500 W, respectivamente.

Uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g foi utilizada para pesagem das amostras.

Para a moagem das amostras de fertilizante foi utilizado um moinho de bolas (modelo PM 200, Retsch, GmbH Hann) equipado com frascos recobertos com ZrO₂, com volume interno de 50 mL e esferas de ZrO₂ de 20 mm.

Uma centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Brasil) com capacidade para 16 frascos de 15 mL foi utilizada para a centrifugação das soluções das amostras após as extrações. Uma chapa de aquecimento (Fisatom, Brasil) foi utilizada para a etapa de extração.

O teor de umidade e o teor de cinzas foram feitos de acordo com as normas ASTM D 2216-98 e ASTM D 2974-00, respectivamente. Para a determinação do teor de umidade foi utilizada uma estufa convencional com circulação de ar (modelo 400/2ND, Nova Ética, Brasil) e para a determinação do teor de cinzas foi empregado um forno tipo mufla (modelo MR 170 E, Heraeus, Hanau, Alemanha).

Para uma caracterização elementar foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Optima 4300 DV, PerkinElmer). O equipamento foi operado com visualização axial do plasma e equipado com nebulizador do tipo GemCone acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica (PerkinElmer). Também foi utilizado para a quantificação um ICP-MS (PerkinElmer SCIEX, ELAN DRC II, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA) e câmara de nebulização ciclônica de quartzo do tipo *baffled* (Glass

Expansion, Austrália), tocha e tubo injetor de quartzo com 2 mm de d.i.. Para a geração do plasma, em ICP OES e ICP-MS, foi utilizado argônio 99,998% de pureza (White Martins, Brasil).

Visando a determinação espectrofotométrica de Cr(VI) foi utilizado um espectrofotômetro Vis (modelo USB2000+UV-VIS, Ocean Optics, EUA), provido de uma cubeta de poliestireno com capacidade de 1,5 mL e 10 mm de caminho óptico.

A separação das espécies de Cr foi realizada em um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para cromatografia a líquido de alta pressão (PerkinElmer, Series 200 LC Pump) equipada com uma válvula injetora manual Rheodyne (7725i, EUA), alça de amostragem de poli(éter-cetona) (PEEK) (100 e 200 μ L), um degaseificador à vácuo (PerkinElmer, Series 200 Vacuum Degasser, EUA), uma coluna de guarda Dionex IonPac AG7 (2 x 50 mm), uma coluna de troca aniônica (Hamilton, PRP-X100, 250 x 4,1 mm d.i. com partículas de 10 μ m, Suíça) e coluna de guarda (Hamilton, com partículas de 10 μ m, Suíça). A saída da coluna cromatográfica foi acoplada ao nebulizador do ICP-MS.

Na Tabela 3, estão descritas as condições operacionais utilizadas neste trabalho para a determinação de Cr total e outros elementos considerados essenciais e não essenciais para nutrição de plantas, das amostras de fertilizante orgânico por ICP OES e ICP-MS, e para a análise de especiação de Cr(VI) por LC-ICP-MS.

Tabela 3 - Condições instrumentais empregadas para a determinação de Cr total, elementos essenciais e não essenciais e para a análise de especiação de Cr por LC-ICP-MS.

Cr total por ICP OES	
Potência RF, W	1400
Vazão do gás do plasma, L min ⁻¹	15
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,20
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	0,70
Linha de emissão, nm	Al (167,078), As (189,042), B (249,773), Ca (422,673), Cd (214,438), Cr (267,716), Cu (327,396), Fe (259,941), K (766,491), Mg (280,270), Mn (257,611), Na (588,995), Ni (231,604), P (177,495), Pb (168,215), S (180,731), Se (196,090), Zn (213,856)
ICP-MS	
Potência RF, W	1300
Vazão do gás do plasma, L min ⁻¹	15
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1,2

Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	1,14
<i>Dwell time</i> , ms	50
Sweeps per Reading	1
Leituras por replicatas	500
Replicatas	1
Isótopos monitorados	⁵⁰ Cr, ⁵² Cr, ⁵³ Cr
Especiação de Cr por LC-ICP-MS	
Coluna	Troca aniônica Dionex AG7
Fase móvel	15 mM HNO ₃
Vazão, mL min ⁻¹	0,5
Volume de amostra, µL	100

Outra técnica utilizada para determinação de Cr(VI) foi a IC-Vis, composto por um cromatógrafo de íons Dionex ICS 5000+ (Thermo Scientific) equipado com módulo contendo duas bombas, uma para eluição isocrática, com um canal, e outra que possibilita a eluição por gradiente, com quatro canais, (DP 5000+ Dual Gradient/isocratic Pump), compartimento de duas colunas, duas supressoras e dois detectores de condutividade (DC Detector and Chromatography), um amostrador automático (AS-AP Autosampler), dois detectores de condutividade (ICS-5000 Analytical CD Conductivity Detector) e um sistema de geração de eluente (EG Eluent Generator) com solução saturada de hidróxido de potássio (EGC 500 KOH). Para a separação de cromo por troca iônica foi utilizada uma coluna analítica AS11-HC- 4 µm (2x250 mm), pré-coluna dionex AGH11-HC-4 µm (2x50 mm), utilizando a supressão eletrolítica (AERS 500 2mm Anion Electrolytically Regenerated Suppressor) e um detector por UV (ICS-Series Variable Wavelength Detector VWD). Como eluente foi utilizado

250 mmol L⁻¹ de sulfato de amônio em 100 mmol L⁻¹ de hidróxido de amônio a uma vazão de 0,360 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A reação pós coluna é feita com uma solução de 2 mmol L⁻¹ de difenilcarbazida em meio contendo 10% de metanol e 0,5 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico, seguido então de leitura de absorbância em 530 nm.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em coluna de troca iônica e posteriormente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, EUA), obtendo

resistividade final de 18,2 M Ω cm. Em todos os experimentos foi utilizada água (ultrapura) no preparo de soluções e amostras. Ácido nítrico P.A. (65%, 1,4 kg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido clorídrico P.A. (37%, 1,19 kg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha), passaram por um processo de purificação em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália). Ácido fluorídrico P.A. (40% 1,15 kg L⁻¹, Sigma Aldrich) foi utilizado neste estudo, porém sem purificação prévia.

Para a extração e quantificação de Cr(VI), foram utilizados difenilcarbazida (Merck, Alemanha), carbonato de sódio P.A. (Proquimios, Brasil), hidróxido de sódio (Vetec, Brasil), EDTA dissódico P.A. (Nuclear, Brasil), ácido sulfúrico e acetona (Sigma-Aldrich, Alemanha). Na análise de especiação por LC-ICP-MS foi utilizado nitrato de amônio (Merck, Alemanha) e ácido nítrico como fase móvel.

Uma solução de referência contendo 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI) foi preparada a partir da dissolução de K₂CrO₄ (Merck, Alemanha) em água. A solução de referência de Cr(III) foi preparada a partir da dissolução de CrCl₃.6H₂O (Vetec, Brasil) a 1000 mg L⁻¹ de Cr(III). Para a determinação de cromo total e demais elementos por ICP OES e ICP-MS, as soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução multielementar contendo 10 mg L⁻¹ dos analitos (SCP33MS, SCP Science, Quebec, Canadá).

4.3 AMOSTRA E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

Uma amostra de fertilizante orgânico, obtido a partir de resíduos de couro, foi fornecido pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA) de Porto Alegre - RS. A amostra foi fornecida seca e na forma de pó (diâmetro de partícula menor do que 100 μ m) e sem maiores informações. As demais amostras de fertilizante orgânico foram obtidas em comércio local. O nome comercial foi ocultado e as amostras foram renomeadas conforme descritas no Quadro 1, assim como sua classificação de acordo com o MAPA, 2020. Onde, a Classe A, em sua produção é utilizada matéria-prima de origem vegetal, animal ou de processamentos da agroindústria, no qual não foi utilizado metais ou compostos orgânicos potencialmente tóxicos e na Classe B, em sua produção é utilizada matéria-prima proveniente de processamento da atividade industrial ou da agroindústria, no qual metais ou compostos orgânicos potencialmente tóxicos foram utilizados no processo.

Quadro 1 - Identificação das amostras e suas classificações.

Amostra A	Disponibilizado pelo LFDA
Amostra B	Classe B
Amostra C	Classe A
Amostra D	Classe A
Amostra E	Classe B
Amostra F	Classe A

Para avaliar a exatidão do método proposto, foram utilizados os seguintes materiais de referência certificados (CRM): *San Joaquim Soil* (SRM 2709, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, EUA) e *Chromium Cr(VI) Soil* (CRM041, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany).

4.4 Teor de umidade e teor de cinza em fertilizantes

Devido ao cancelamento sem substituição das normas ABNT NBR 11487 e 11488 para determinação da umidade e do teor de matéria orgânica em fertilizantes orgânicos, respectivamente, o teor de umidade das amostras foi determinado de acordo com a norma ASTM D 2216-98, 1998, e o teor de cinzas totais de acordo com a norma ASTM D 2974-00, 2000.

Para a determinação da umidade, exatamente cerca de 10 g de amostra foram transferidas para um cadinho de porcelana (previamente lavado e seco a 115 °C por 1 h) e submetidas ao aquecimento em estufa com circulação de ar na temperatura de 110°C, efetuando pesagens a cada 2 h até massa constante.

Após a determinação do teor de umidade, as amostras foram submetidas ao aquecimento em um forno tipo mufla a 450 °C (rampa de 20 °C min⁻¹, permanecendo a 450 °C por 180 min) para a determinação do teor de cinzas. Em seguida, o cadinho contendo a amostra foi imediatamente armazenado em um dessecador. Após atingir a temperatura ambiente, o cadinho foi pesado e o teor de cinza foi calculado.

Os procedimentos de determinação dos teores de umidade e cinza foram feitos em triplicata.

4.4 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Cr TOTAL E CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR

Para determinação de Cr total e demais elementos, as amostras foram decompostas com ácido em sistema fechado, utilizando forno de micro-ondas Ultrawave (Milestone). Foram pesados, em torno de 150 mg da amostra em triplicata e transferida para o frasco de decomposição juntamente com 5 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} , 0,5 mL de HCl 12 mol L^{-1} e 0,5 mL de HF 23 mol L^{-1} . Os frascos foram devidamente fechados e submetidos ao aquecimento de acordo com o programa descrito no item 4.1 *Instrumentação*, sugerido pelo fabricante do sistema. A escolha dos volumes de ácido utilizados foi feita a partir dos métodos EPA 3051A e 3052 (USEPA 3052, 1996; USEPA 30501A, 2007), o volume reduzido de HF foi selecionado considerando a concentração máxima permitida para introdução desse ácido nos equipamentos de ICP OES e ICP-MS (estabelecido como sendo 0,5% de HF na solução final), evitando assim, danos às peças de vidro ou quartzo dos equipamentos.

Após o arrefecimento, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno, avolumadas a 25 mL com água ultrapura e armazenadas à temperatura ambiente até a etapa de quantificação.

4.5 EXTRAÇÃO DE Cr(VI)

Para a extração de Cr(VI), foram avaliados parâmetros como o tipo da solução extratora, a concentração da solução extratora, o tempo de extração e a temperatura de extração. Foi utilizado o Método EPA3060A como referência e algumas adaptações foram realizadas. Este método consiste na extração alcalina, usando uma solução a 0,28 mol L^{-1} Na_2CO_3 com 0,5 mol L^{-1} NaOH e aquecimento a 90-95 °C por 60 min. Outras soluções extratoras avaliadas foram escolhidas em função de estudos prévios reportados na literatura (WOLF, R, E., MORRISON, J, M., GOLDHABER, M, B. 2007 e SARAIVA. M, 2021). Todas as extrações foram realizadas em banho maria, com controle de temperatura.

4.5.1 Escolha do tipo e concentração da solução extratora

As soluções extratoras avaliadas quanto a eficiência de extração do Cr(VI) foram: mistura alcalina de $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ difenilcarbazida com $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA e apenas H_2O . Nessa avaliação, foram fixadas inicialmente as seguintes condições: 100 mg de amostra, 10 mL de solução extratora, tempo de extração de 60 min e temperatura de extração de 90°C .

4.5.2 Tempo de extração

O tempo de extração foi avaliado com a melhor condição de solvente extrator escolhida anteriormente, variou-se o tempo de extração nos seguintes valores: 20, 30 e 90 min.

4.5.3 Temperatura de extração

A avaliação da temperatura de extração foi feita para amostra "A", sendo fixadas as condições de 200 mg de amostra, 10 mL da solução extratora $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ com $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ e tempo de extração de 60 min. As temperaturas avaliadas foram 25, 50 e 90°C .

4.5.4 Estudo da estabilidade de Cr(VI)

O efeito da estabilidade da espécie de Cr(VI) foi estudada usando cerca de 100 mg da amostra "A" e feita a extração alcalina de acordo como descrito no item 4.5 *Extração de Cr(VI)* e adicionado o equivalente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução de referência de Cr(VI), sendo mantida sob refrigeração (em torno de 4°C) e avaliada durante 3 meses através da recuperação de Cr(VI).

4.7 DESENVOLVIMENTO DE ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Cr(VI) POR LC-ICP-MS

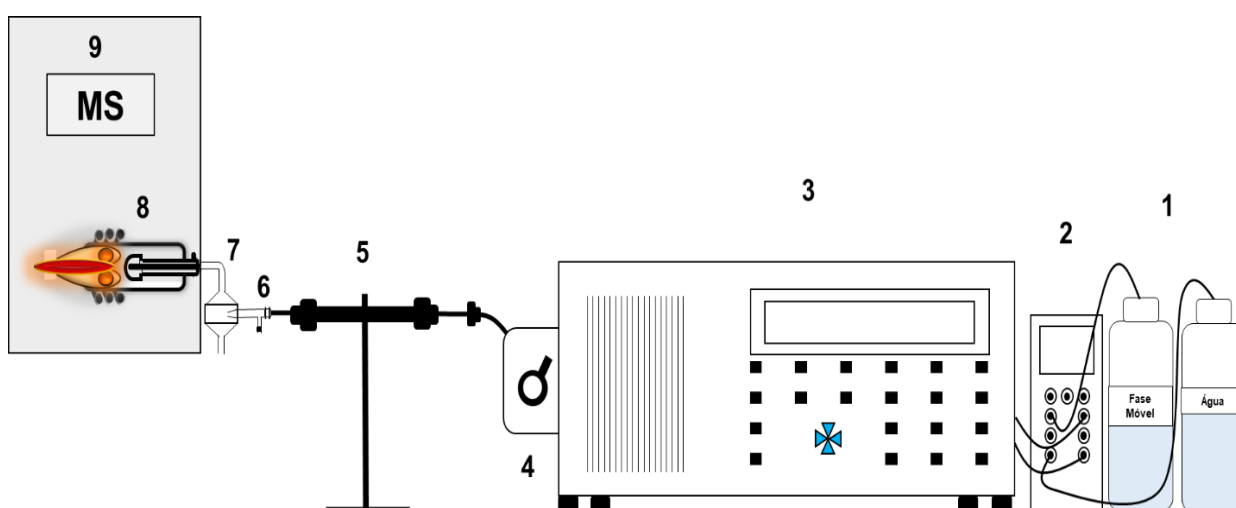
Para o desenvolvimento de uma metodologia de análise de especiação de Cr(VI) em fertilizante orgânico por LC-ICP-MS foi feita a determinação de alguns parâmetros da validação. Para isso, seguiu-se as recomendações e critérios de aceitação descritos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica de Resíduos e

Contaminantes em Alimentos, elaborado pelo MAPA em 2011. Os parâmetros avaliados foram: efeito de matriz, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), robustez e exatidão. Para condução dos estudos de validação adotou-se como referência o regulamento do MAPA, que estabelece 2 mg kg^{-1} como a concentração máxima de Cr(VI) permitida em fertilizante orgânico.

Para a quantificação de Cr(VI) foram realizados alguns ajustes para obter as melhores condições de análise. No instrumento ICP-MS foi feito o ajuste das condições da cela dinâmica de reação (DRC) a fim de minimizar os possíveis efeitos de interferências de íons poliatômicas.

Para a separação das espécies de Cr por LC, foi testada a coluna de troca iônica Hamilton PRP-X100 e Dionex AG7, juntamente com a avaliação das fases móveis HNO_3 e $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, variando a concentração, a fim de verificar o efeito sobre a separação das espécies. O sistema de LC-ICP-MS utilizado pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Sistema LC-ICP-MS. 1 - fase móvel; 2 - degaseificador à vácuo; 3 - bomba de LC; 4 - injetor e alça de amostragem; 5 - coluna de troca aniônica; 6 - nebulizador; 7 - câmara de nebulização; 8 e 9 - ICP-MS.

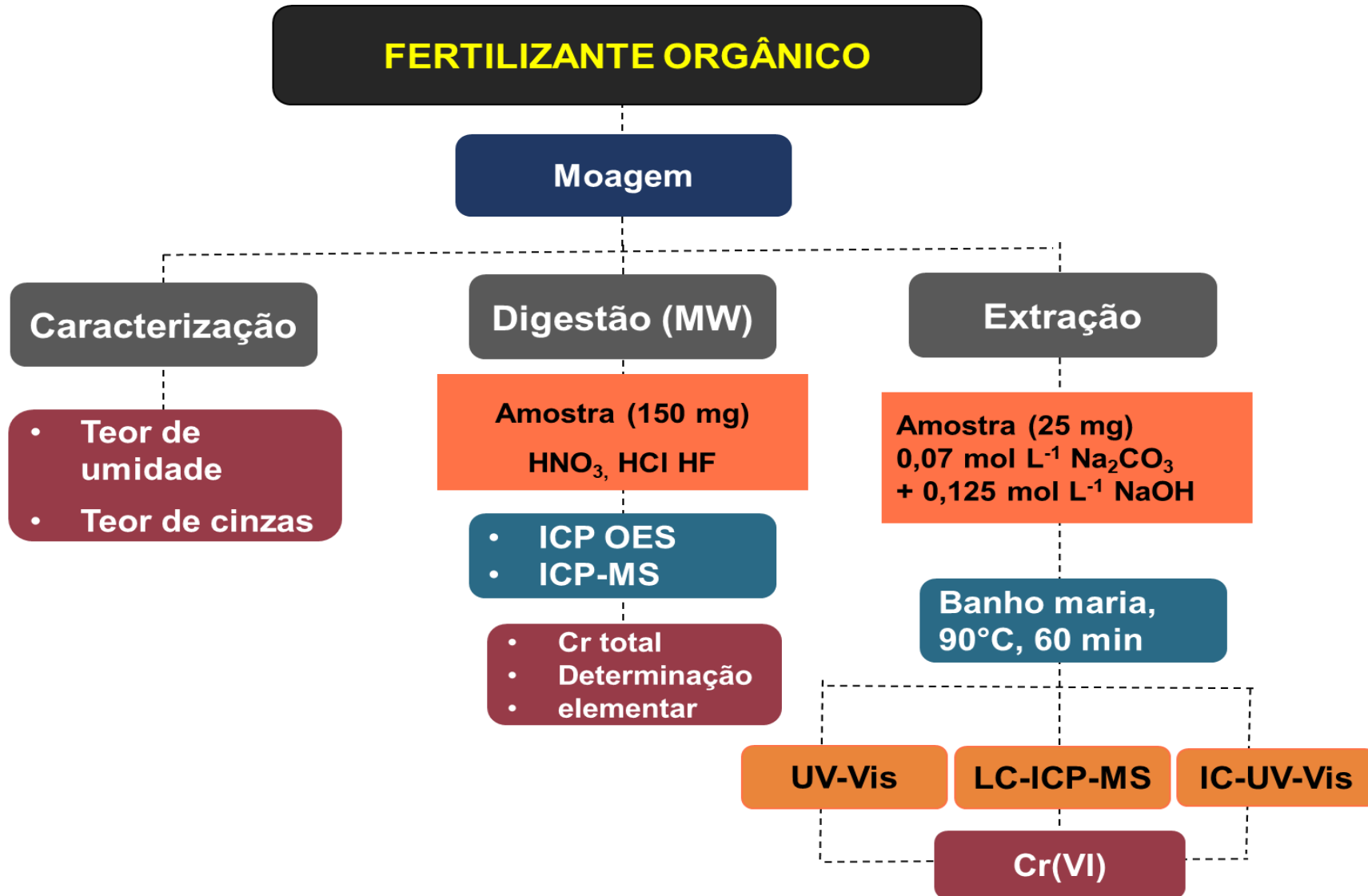


4.8 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Cr(VI) POR IC-Vis

A cromatografia de íons com detector UV-Vis foi utilizada para determinação de Cr(VI) e as condições iniciais que foram utilizadas neste estudo foram as mesmas já otimizadas anteriormente pelo fabricante para determinação de Cr(VI) em água, águas residuais e extratos de resíduos sólidos (Thermo Fischer Scientific) e baseado no método EPA 218.7 (USEPA 218.7, 2011). Este método é baseado na troca aniônica utilizando uma coluna de separação Dionex IonPac AS7 (4 × 250 mm) e detecção a 530 nm após reação do Cr(VI) pós-coluna com difenilcarbazida. As amostras passaram pela etapa de extração conforme descrito no item 4.5 *Extração de Cr(VI)*, centrifugadas, filtradas e diluídas antes da injeção. Para determinação de Cr(VI) por IC-Vis, a curva de calibração foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de Cr(VI) preparada a partir da dissolução de K₂CrO₄ e avolumadas com água ultrapura. A faixa linear compreendia de 1 a 1000 µg L⁻¹ de Cr(VI).

Na Figura 3, está mostrado o fluxograma de um esquema geral do desenvolvimento de metodologia testada para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico.

Figura 3 - Procedimento de metodologia para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico por LC-ICP-MS



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho, no qual foram avaliadas as condições de extração e determinação de Cr(VI) por espectrofotometria e análise de especiação por LC-ICP-MS e IC-Vis. Além disso, também são apresentados os dados da composição elementar das amostras.

5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E TEOR DE CINZAS

Os teores de umidade e cinzas foram determinados nas amostras de fertilizante orgânico, de acordo com as normas ASTM D 2216-98 e D 2974-00. Os resultados dessas determinações estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de umidade e cinzas das amostras de fertilizante orgânico determinados com base nos métodos ASTM D 2216-98 e D 2974-00.

Amostra	Teor de umidade (%)	Teor de cinzas (%)
A	10,8 ± 0,1	91,4 ± 0,1
B	19,2 ± 1,0	17,9 ± 0,3
C	13,2 ± 0,2	60,5 ± 0,4
D	9,2 ± 0,4	39,6 ± 0,3
E	9,7 ± 0,3	69,0 ± 1,0
F	13,3 ± 0,2	48,0 ± 0,3

De acordo com o resultado do teor de cinzas, pode-se verificar que o teor variou entre amostras, demonstrando características diferentes na matriz, podendo assim afetar nas condições de extração e na interconversão das espécies de Cr. Uma vez que o teor de cinzas se refere ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, pode-se inferir que as amostras que obtiveram menores teores de cinzas, continham em sua composição total, uma maior porcentagem de matéria orgânica, podendo ser compostos de ácidos húmicos que favorecem a redução do Cr(VI) para Cr(III). Não foi realizado nenhuma análise do teor de carbono orgânico para avaliar a composição nestas amostras.

5.2 DETERMINAÇÃO DE Cr TOTAL E CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR

As amostras de fertilizante orgânico foram decompostas em forno de micro-ondas para determinação de Cr total e para a caracterização elementar, conforme descrito no item 4.4 (*Preparo de amostra para determinação de Cr total e caracterização elementar*). O valor obtido para Cr total e de outros elementos nas amostras, estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado da concentração dos elementos essenciais e não essenciais das amostras de fertilizante orgânico após digestão por via úmida assistida por micro-ondas baseada no método 3051A da EPA. Determinações feitas por ^aICP-OES e ^bICP-MS, n = 3.

Analito	Amostra A ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra B ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra C ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra D ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra E ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra F ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al ^a	7,73 ± 0,14*	15,4 ± 1,2*	15,7 ± 1,2*	12,2 ± 2,3*	3,77 ± 0,24*	10,8 ± 0,4*
As ^b	1,84 ± 0,43	4,41 ± 0,68	4,27 ± 0,78	9,45 ± 0,58	< 1,37	< 1,37
Ba ^b	8,53 ± 2,89	202 ± 3	411 ± 68	79,9 ± 4,0	57,8 ± 1,02	104 ± 2
Ca ^a	2,36 ± 0,18*	28,5 ± 0,9*	44,4 ± 3,5*	3,63 ± 0,23*	29,2 ± 1,5*	103 ± 2*
Cd ^b	0,01 ± 0,02	0,30 ± 0,06	1,88 ± 0,35	2,02 ± 0,43	0,318 ± 0,010	0,123 ± 0,010
Cr ^b	25,6 ± 1,2 ^a	35,9 ± 1,9	53,3 ± 2,9	34,3 ± 2,9	14,5 ± 1,3	11,2 ± 0,7
Cu ^b	5,51 ± 2,03	88,1 ± 3,1	106 ± 1	13,7 ± 1,2	640 ± 17	333 ± 3
Fe ^a	0,761 ± 0,090*	15,2 ± 0,8*	8,72 ± 0,67*	9,58 ± 0,77*	7,41 ± 0,33*	14,2 ± 0,5*
K ^a	0,272 ± 0,014*	5,66 ± 0,127*	11,8 ± 0,4*	53,1 ± 7,4*	32,6 ± 1,9*	26,9 ± 0,572*
Mn ^b	7,35 ± 2,27	474 ± 21	1027 ± 97	146 ± 7	475 ± 4	942 ± 14
Mg ^a	0,978 ± 0,074*	2,92 ± 0,20*	10,8 ± 0,8*	1,86 ± 0,45*	13,2 ± 0,5*	16,2 ± 0,3*
Na ^a	7,39 ± 2,2*	1,73 ± 0,84*	2,46 ± 0,10*	1,67 ± 0,052*	4,80 ± 0,32*	6,71 ± 0,19*
Ni ^b	3,65 ± 1,24	24,3 ± 1,8	36,8 ± 2,6	10,8 ± 0,1	<0,42	<0,42
P ^a	1,71 ± 0,08*	2,41 ± 0,19*	5,21 ± 0,44*	38,6 ± 5,2*	14,0 ± 0,4*	19,1 ± 0,3*
Pb ^b	2,17 ± 0,55	25,7 ± 1,8	60,2 ± 6,8	10,2 ± 0,1	1,76 ± 0,05	5,11 ± 0,17
S ^a	18,5 ± 0,7*	3,18 ± 0,4*	6,19 ± 0,3*	19,9 ± 1,7*	9,89 ± 0,08*	8,08 ± 0,2*
Sr ^b	6,61 ± 2,10	124 ± 1	254 ± 39	33,8 ± 2,7	116 ± 2	548 ± 11
Zn ^a	< 6,9	231 ± 13	19,3 ± 0,9*	50,1 ± 9,3	646 ± 8	11,7 ± 0,02*

*Valores expressos em mg g⁻¹.

De acordo com os resultados obtidos, o fertilizante orgânico referente a amostra "A" contém cerca de 2,6% de cromo em sua composição, sendo uma concentração relativamente alta para a finalidade deste produto. Antes da mudança da Instrução Normativa SDA Nº 27 (MAPA, 2006), na qual era monitorado apenas a concentração total de cromo, estaria acima da concentração permitida que é de $200 \mu\text{g g}^{-1}$, demonstrando assim a importância da análise de especiação. As demais amostras possuem concentração de Cr total na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo assim, ainda é necessária a análise da concentração de Cr(VI) para avaliar a toxicidade.

Para verificar a veracidade da quantificação de cromo total, foi utilizado o material de referência certificado de solo (NIST 2709a), que possui valor certificado de $130 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ de cromo, sendo aplicado o mesmo procedimento de decomposição das amostras e condições de determinação. Obteve-se a concentração de $128 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$. A recuperação foi de $98,4 \pm 3\%$, o que indica uma veracidade adequada do procedimento de determinação de cromo total.

Outros elementos considerados essenciais e não essenciais para nutrição de plantas, também foram monitorados. No caso dos essenciais, não está definida uma concentração ideal, pois isto vai depender da matéria-prima utilizada na produção destes fertilizantes, da própria espécie vegetal e, em casos que há a necessidade, é feita a adição de nutrientes. Porém, no caso dos elementos não essenciais e até mesmo tóxicos, como, por exemplo, As, Cd e Pb, há um limite máximo estabelecido pelo MAPA, de 20, 3 e 150 mg kg^{-1} , respectivamente. Nas amostras avaliadas, estes elementos estão abaixo da concentração máxima permitida.

Também há uma preocupação destes elementos serem possíveis interferentes na análise de especiação de Cr, uma vez que já é conhecido o potencial redutor do Fe sobre o Cr(VI), que pode interferir no preparo de amostra e até mesmo na preservação da mesma. Para a análise de especiação por LC-ICP-MS, também há a possibilidade de ocorrer interferência isobárica, como por exemplo o ^{54}Fe e ^{54}Cr , ou poliatômica, no caso da formação da espécie $^1\text{H}^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$ e do $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, que possuem a mesma m/z nominal do ^{53}Cr .

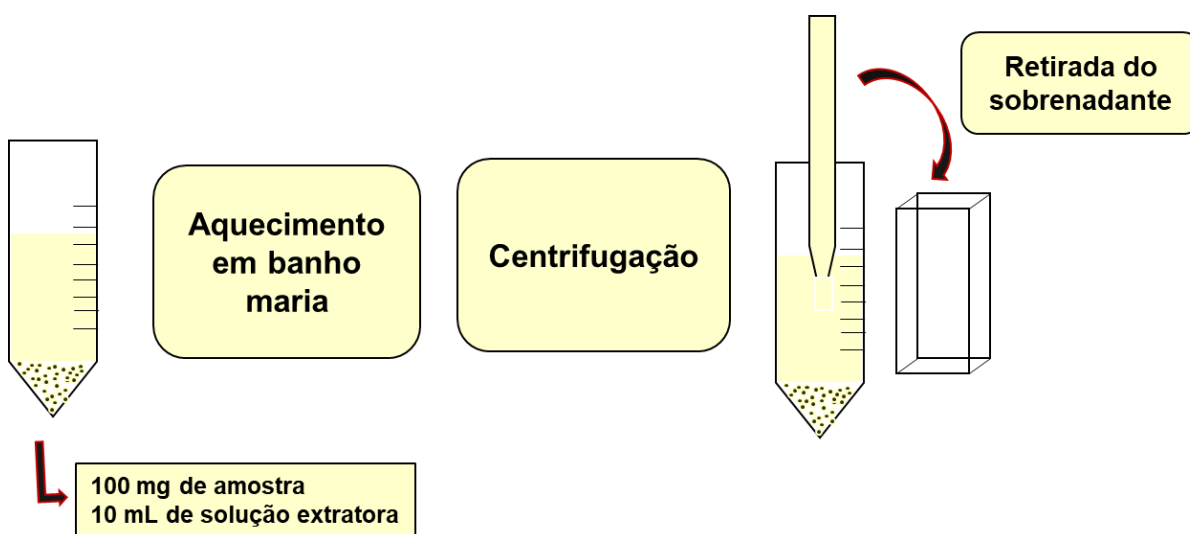
5.3 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ALCALINA E QUANTIFICAÇÃO DE Cr(VI) POR UV-VIS

A extração de Cr(VI) de fertilizante orgânico foi feita utilizando solução alcalina, sob aquecimento, de acordo com o método EPA 3060A, alterando apenas a massa de amostra, na qual é indicado 2,5 g no método, e nesta avaliação foram utilizados 100 mg. O meio alcalino foi empregado por minimizar os riscos de redução do Cr(VI) a Cr(III) (USEPA,1995).

Nesta etapa, foi feita a otimização das condições de extração, onde foram avaliados o tempo (5 a 60 min), a temperatura (25 a 90 °C) e o solvente extrator (1,0 mol L⁻¹ NaOH, 0,28 mol L⁻¹ Na₂CO₃ e a mistura de 1,0 mol L⁻¹ NaOH + 0,28 mol L⁻¹ Na₂CO₃). As extrações foram feitas em banho-maria.

Para cada teste foram pesados aproximadamente 100 mg do fertilizante e transferidos para frasco de polipropileno com capacidade de 15 mL. Foram então adicionados 10 mL da solução extratora e submetidos ao aquecimento em banho maria. A temperatura foi controlada com auxílio de um termômetro digital. O processo de extração está demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Procedimento de extração alcalina para determinação de Cr(VI).



Após esta etapa, o extrato foi centrifugado e somente o sobrenadante foi analisado, utilizando na técnica por espectrofotometria no visível. Para isso, o sobrenadante foi acidificado até pH 2,0, adicionando H₂SO₄ 6,0 mol L⁻¹, e a absorbância foi monitorada em 542 nm, 544 nm e 546 nm, com o objetivo de verificar possível interferência da matriz. O espectro está mostrado na Figura 5C. Para a complexação do Cr(VI) foi adicionado 1,0 mL de solução de difenilcarbazida (0,5% em acetona:água 1:1) à 10 mL da amostra e novamente analisada por espectrofotometria

nos mesmos comprimentos de onda. O espectro do complexo está mostrado na Figura 5D. O branco é composto pela solução extratora, o qual também teve o meio acidificado para pH 2,0 e adicionada difenilcarbazida. Nas Figuras 5A e 5B podem ser observados os espectros do branco e do padrão 1,0 mg L⁻¹ de Cr(VI). E na Figura 6, está mostrado o aspecto visual das soluções que foram medidas por UV-Vis.

Figura 5 - Espectros na região do visível obtidos por espectrofotometria. A) solução extratora acidificada e adicionada difenilcarbazida. B) 1,0 mg L⁻¹ de Cr(VI) com difenilcarbazida. C) extrato da amostra, sem adição da difenilcarbazida. D) extrato da amostra após a complexação.

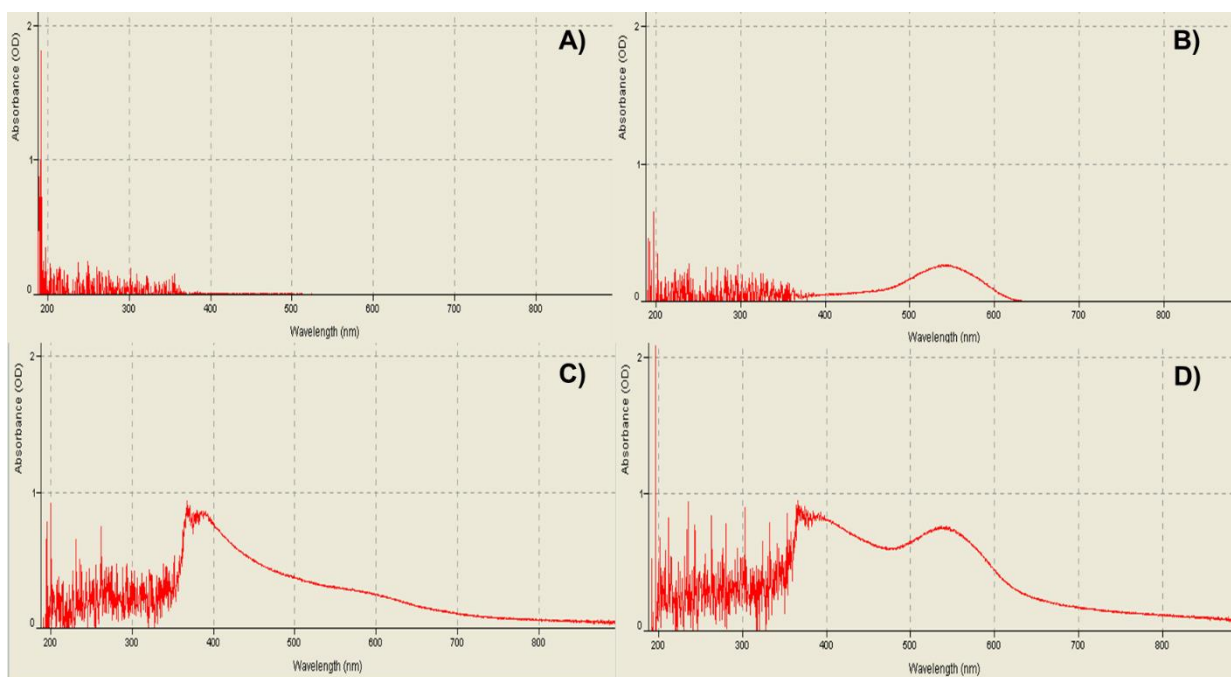
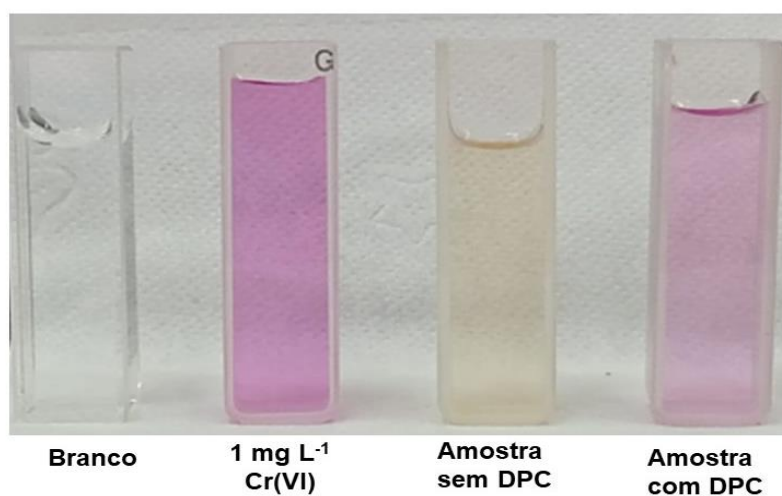
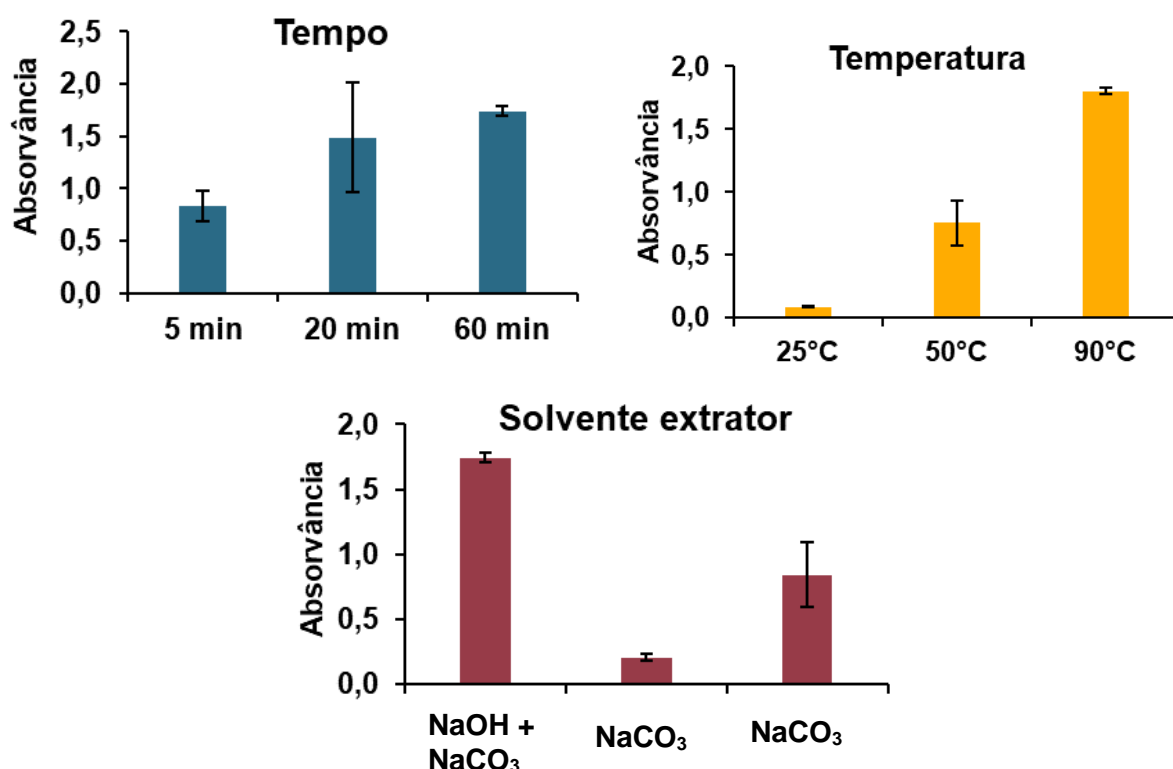


Figura 6 - Aspecto das soluções analisadas por espectrofotometria no Vis.



Na Figura 7, têm-se os resultados da otimização das condições de extração, sendo avaliado o tempo, temperatura e solvente extrator. Estes testes foram feitos com amostra de fertilizante orgânico enriquecida com Cr(VI) a um nível de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ na solução final.

Figura 7 - Efeito do tempo, temperatura e solução extratora na extração de Cr(VI) em fertilizante orgânico.



Conforme os resultados, observa-se que as melhores condições de extração foram obtidas em 60 min, à 90 °C e com solução extratora $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$, cujas condições são semelhantes àquelas descritas por GRABARCZYK *et al.* (2006).

O teste de adição e recuperação do analito foi feito para avaliar a exatidão dos resultados. Para tal, foi adicionada à amostra “A” uma quantidade equivalente de solução de referência de Cr(VI) para obter uma solução final com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr(VI) e submetido ao processo de extração. Foi obtida recuperação de Cr(VI) superior à 90%. As demais amostras utilizadas neste trabalho ficaram abaixo do LOQ que é de $0,48 \text{ mg g}^{-1}$ não sendo possível obter a quantificação de Cr(VI) por UV-Vis.

5.4 AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE Cr(VI)

Dessa forma, para garantir a qualidade da análise de especiação de Cr(VI) por LC-ICP-MS, a composição da solução extratora, assim como a concentração, o volume da mesma e a massa de amostra foram avaliadas, visando a extração quantitativa de Cr(VI) em fertilizante orgânico.

5.4.1 Composição de solução extratora

A composição da solução extratora deve ser cuidadosamente escolhida, pois o processo de lixiviação pode levar a interconversão de espécies de Cr. As soluções de extração e suas respectivas condições avaliadas estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições para avaliação da composição da solução extratora.

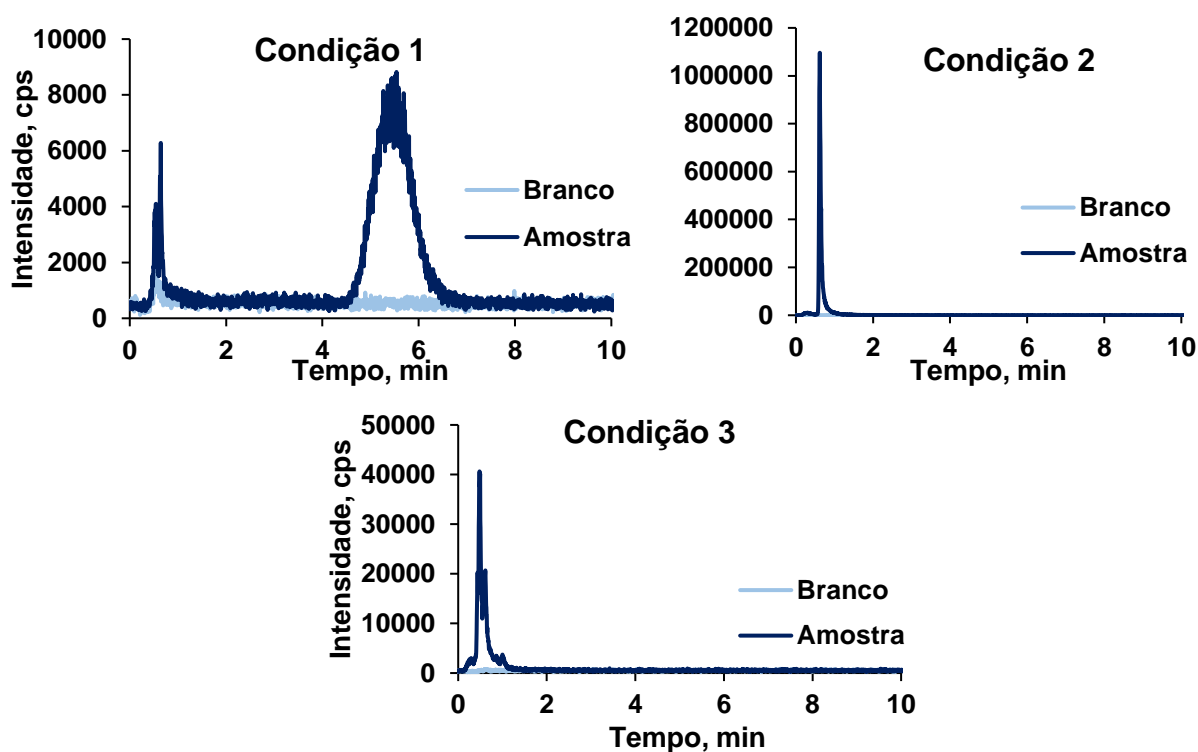
	CONDIÇÃO 1	CONDIÇÃO 2	CONDIÇÃO 3
Reagente	Na ₂ CO ₃ + NaOH	EDTA + difenilcarbazida	H ₂ O
Concentração	0,28 mol L ⁻¹ + 0,5 mol L ⁻¹	2,4 mmol L ⁻¹ + 0,02 mmol L ⁻¹	-
Volume	10 mL	16 mL	10 mL
Tempo de reação	60 min	85 min	60 min
Aquecimento	90 °C	70 °C	90 °C

A condição 1 se refere ao método EPA 3060A (USEPA, 1995), que foi desenvolvido para extrair quantitativamente “formas solúveis, adsorvidas e precipitadas” de Cr(VI) de sedimentos, solos e materiais similares, evitando a ocorrência de reação redox de Cr(VI) a Cr(III) ou vice-versa. O pH alto (>11,5) da solução de extração evita a redução de Cr(VI) por matéria orgânica ou compostos inorgânicos e também previne a adsorção de Cr(VI), que pode estar presente como o íon poliatômico CrO₄²⁻ em superfícies minerais. Os valores elevados de pH e concentração de carbonato (0,28 mol L⁻¹) auxiliam na dissolução de outras formas de sais de cromato insolúveis, como o PbCrO₄ e BaCrO₄ (VOGEL, 1981).

A condição 2 trata da complexação de Cr(III) com EDTA e por derivatização de Cr(VI) com 1,5-difenilcarbazida. Por este procedimento o Cr(VI) é primeiro reduzido a Cr(III). Para a extração, foram pesados com exatidão em torno de 100 mg da amostra "A" e transferida para um frasco de 50 mL de polipropileno, juntamente com 16 mL de uma solução de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA, em seguida foi colocado no sistema de bloco de aquecimento, onde a mistura foi aquecida a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 min. Após a solução ser arrefecida (aproximadamente 15 min), foram adicionados $200 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução à $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de DPC, o meio foi acidificado com H_2SO_4 e, então, o volume final ajustado a 20 mL com água ultrapura. A mistura foi novamente aquecida a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 25 minutos. O extrato foi arrefecido à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrado utilizando filtros de PTFE de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro de poro, antes da análise (no mesmo dia).

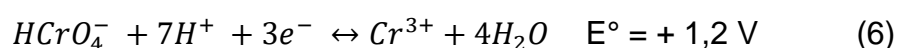
A análise de Cr(VI) por LC-ICP-MS para avaliação da solução extratora foi feita de acordo com o que será mostrado a seguir no item 5.7 *Quantificação de Cr(VI)*. Os cromatogramas obtidos das soluções extratoras para Cr(III) e Cr(VI) em fertilizante orgânico (amostra "A") estão mostrados na Figura 8.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos para Cr(III) e Cr(VI) após extração utilizando diferentes soluções extratoras. Condições de análise de acordo com a Tabela 6.

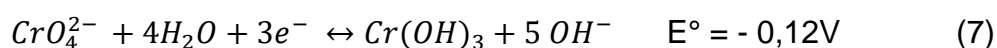


Dentre as condições avaliadas, somente a condição 1 proporcionou a separação das espécies de Cr(III) e Cr(VI). Os meios alcalinos têm sido sugeridos para extração de Cr(VI) devido sua estabilidade na solução, enquanto que as espécies de Cr(III) formam hidróxidos ou carbonatos pouco solúveis. O Cr(VI) pode ser reduzido por vários redutores inorgânicos como Fe(II) e sulfeto, e/ou por compostos orgânicos incluindo ácidos carboxílicos, aldeídos, fenóis, ácidos húmicos entre outros. Contudo, a extração sob condições alcalinas previne a transferência de elétrons do Fe(II), isto ocorre, porque o Fe(II) é rapidamente oxidado pelo oxigênio dissolvido sob condições fortemente alcalinas, tornando mais difícil a interação desse íon com o Cr(VI) (PETTINE, 1998).

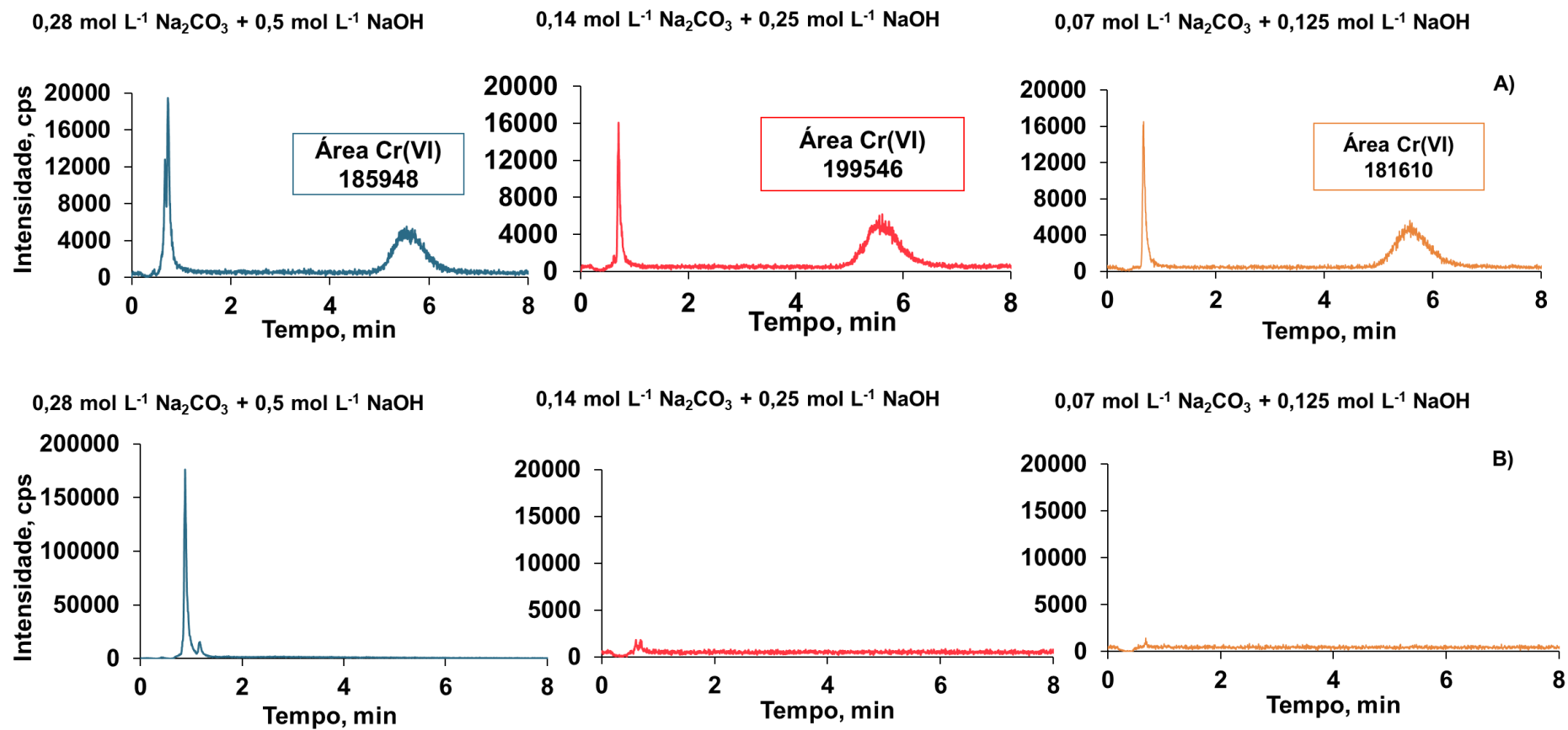
O Cr(VI) em solução ácida tem alto potencial de redução, portanto é um agente oxidante forte e instável na presença de doadores de elétrons. Na equação 6, a redução de HCrO_4^- é acompanhada pelo consumo de H^+ .



A equação mostra que em meio contendo íons H^+ e na presença de doadores de elétrons, HCrO_4^- tende a ser reduzido a Cr(III). Em soluções alcalinas, o Cr(VI) possui menor poder oxidante, portanto, os riscos de ocorrer a redução de Cr(VI) para Cr(III) durante a extração é menor.



Na Equação 7, em meio alcalino, observa-se que o potencial de redução do cromo é baixo, o que explica a tendência do cromo permanecer na forma de CrO_4^{2-} . Dessa maneira, a solução de $0,28 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ foi a condição escolhida para realizar as extrações de Cr(VI) de fertilizantes orgânicos. Para evitar interferências e possíveis danos à coluna cromatográfica, optou-se por realizar alguns testes com concentrações menores da mesma mistura extratora, sem perder a eficiência de extração. Foram avaliadas as concentrações de $0,14 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ e $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, mantendo as condições de extração já otimizadas. Os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 9.

Figura 9 - Cromatogramas para as diferentes concentrações de solução extratora. A) padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$, B) branco.

De acordo com os cromatogramas obtidos e a área do pico de Cr(VI), é possível observar que não houve alteração significativa entre as diferentes concentrações de solvente extrator. Porém, com a concentração de $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, interferências do carbono, como os íons poliatômicos como $^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$ e $^{13}\text{C}^{40}\text{Ar}$, proveniente da solução extratora sobre o ^{52}Cr e ^{53}Cr são minimizadas, sendo assim, a melhor opção para extração de Cr(VI) em fertilizante orgânico. Além disso, a coluna de separação pode ser prejudicada na presença de maiores concentrações de sais.

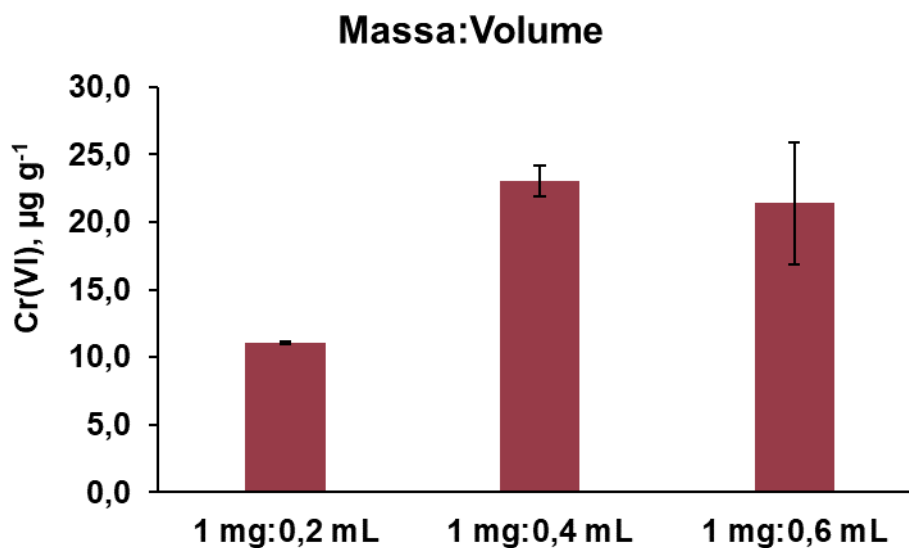
5.4.2. Avaliação da proporção de massa de amostra e volume do solvente extrator

Com o objetivo de se obter uma melhor eficiência de extração, foi avaliada a proporção de massa de amostra com volume de solvente extrator. Para isso, foram feitos testes fixando-se a massa de amostra em 50 mg e variando-se o volume de solvente extrator nas seguintes proporções.

- 50 mg de amostra em 10 mL de solvente extrator (1,0 mg:0,2 mL)
- 50 mg de amostra em 20 mL de solvente extrator (1,0 mg:0,4 mL)
- 50 mg de amostra em 30 mL de solvente extrator (1,0 mg:0,6 mL)

Neste teste foi utilizada a amostra “D” enriquecida à $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI), sendo submetida ao processo de extração com $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Os resultados estão mostrados na Figura 10.

Figura 10 - Efeito da relação massa de amostra e volume de solvente extrator na extração de Cr(VI).



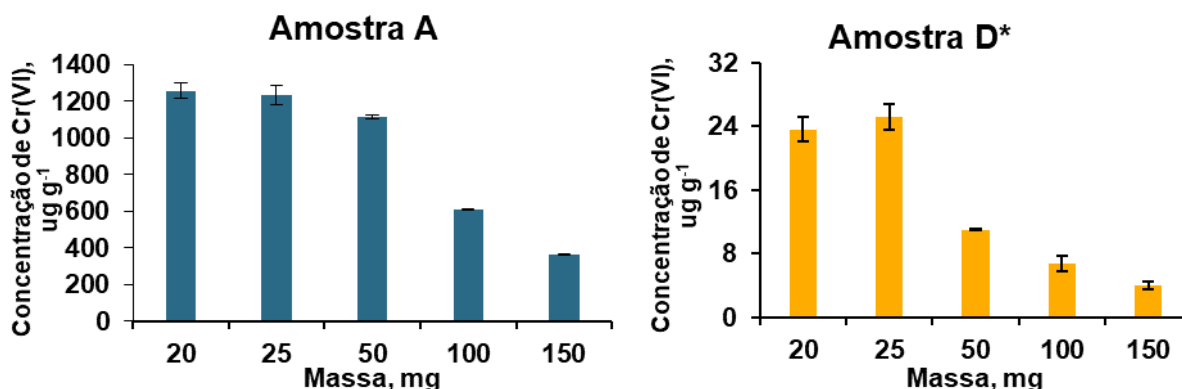
De acordo com os resultados obtidos, a proporção de 1,0 mg:0,4 mL resultou numa maior eficiência de extração entre as condições avaliadas, sendo então utilizada para a extração e posterior determinação de Cr(VI).

5.4.3 Efeito da massa de amostra

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), propôs o procedimento 3060A para extração de Cr(VI) em sedimentos, solos e materiais similares. Entretanto, a aplicação deste procedimento, sem o ajuste apropriado, pode resultar numa extração não quantitativa do analito em fertilizantes orgânicos, em decorrência de diferenças na composição da matriz destes materiais.

Dessa forma, para a avaliação do efeito da massa de amostra, foram utilizadas as massas de 20, 25, 50, 100 e 150 mg de amostra. Duas amostras foram selecionados para a avaliação do efeito da massa, a amostra "A", na qual a concentração de Cr é elevada, e a amostra "B", que possui baixa concentração de Cr. Devido à baixa concentração de Cr na amostra "B" foi feita a adição do equivalente a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) na solução final. Ambas as amostras foram extraídas com 10 mL de $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Após a extração, a solução foi centrifugada e analisada por LC-ICP-MS. O efeito das diferentes quantidades de massa de amostra pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Efeito da massa de amostra na extração de Cr(VI). *Adição equivalente a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) a solução final.



Na análise de especiação, a oxirredução entre as espécies precisa ser evitada e espera-se que a extração de Cr(VI) da amostra seja quantitativa. Como pode ser observado no resultado da avaliação de massa de amostra, à medida que aumenta a massa, ocorre a redução do sinal de Cr(VI). Este fato pode estar associado à presença de substâncias húmicas, que são concomitantemente extraídas, reduzindo assim o Cr(VI) a Cr(III). A amostra “D” possui um teor cinzas menor comparado a amostra “A”, indicando um teor compostos orgânicos mais elevado, e este efeito de redução de sinal pode ser observado com mais intensidade na amostra “D”.

Assim, a massa de amostra recomendada pelo procedimento 3060A, de 2,5 g, não está em conformidade para o fertilizante orgânico, pois todo Cr(VI) poderia ser reduzido durante a etapa de extração. Sendo então, selecionada a massa de 25 mg para a determinação de Cr(VI) nos estudos posteriores.

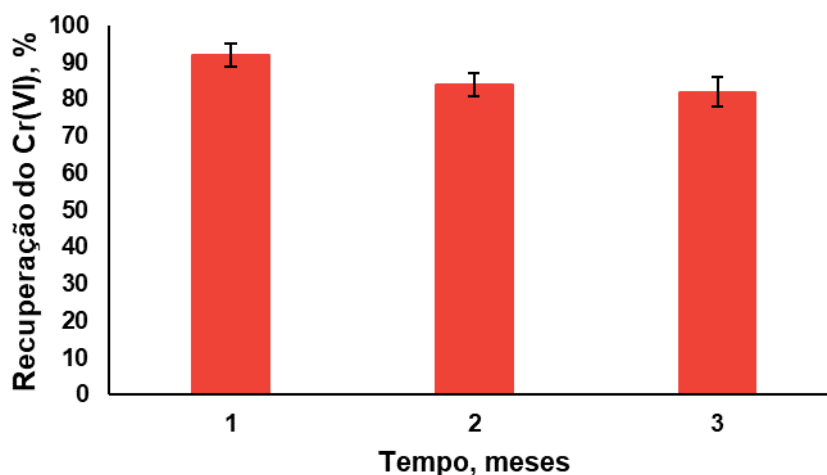
5.4.4 Estudo da estabilidade de Cr(VI) em relação ao tempo

Uma das principais dificuldades na análise de especiação é prevenir a interconversão das espécies químicas no procedimento de extração, armazenagem das soluções e no processo de separação. No caso do Cr(VI), os compostos húmicos contidos na matéria orgânica podem interagir com as espécies de Cr, causando a interconversão. De acordo com um estudo desenvolvido para avaliar o mecanismo de interação de ácidos húmicos com Cr(VI), Zhang *et al.* (2017), concluíram que os grupos carboxílicos e fenólicos destes compostos reduzem e complexam Cr(VI) para Cr(III) em meio ácido. Os mecanismos de interação ocorrem em 3 estágios: (i) Cr(VI)

é adsorvido pelos grupos carbonil e ésteres; (ii) redução do Cr(VI) para Cr(III) por polissacarídeos e fenóis e (iii) complexação do Cr(III) reduzido, por grupos carboxílicos.

Devido à alta concentração de compostos húmicos em fertilizantes orgânicos, é esperado que o Cr(VI) esteja em baixas concentrações. A estabilidade do Cr(VI) foi estudada através da adição/recuperação do analito, onde o extrato foi armazenado durante o período de 3 meses sob refrigeração (cerca de 4 °C), sendo o efeito observado na Figura 12.

Figura 12 - Avaliação da estabilidade de Cr(VI) na amostra "A" com a adição do equivalente à 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). A amostra foi mantida sob refrigeração (em torno de 4 °C) durante 3 meses.



De acordo com a análise da estabilidade do Cr(VI), é possível observar um decréscimo na taxa de recuperação, devido a isso, para as demais análises, neste trabalho, todos os extratos foram analisados no mesmo dia do procedimento de extração, para prevenir a redução da espécie de Cr(VI) para Cr(III), uma vez que as demais amostras possuem um teor de matéria orgânica maior do que a amostra "A" avaliada, podendo ser um fator para que ocorra a redução do Cr(VI).

5.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Cr

A seguir serão descritos os procedimentos adotados para a otimização das condições de operação do sistema LC-ICP-MS com troca iônica empregado para análise de especiação de Cr nas amostras de fertilizante orgânico.

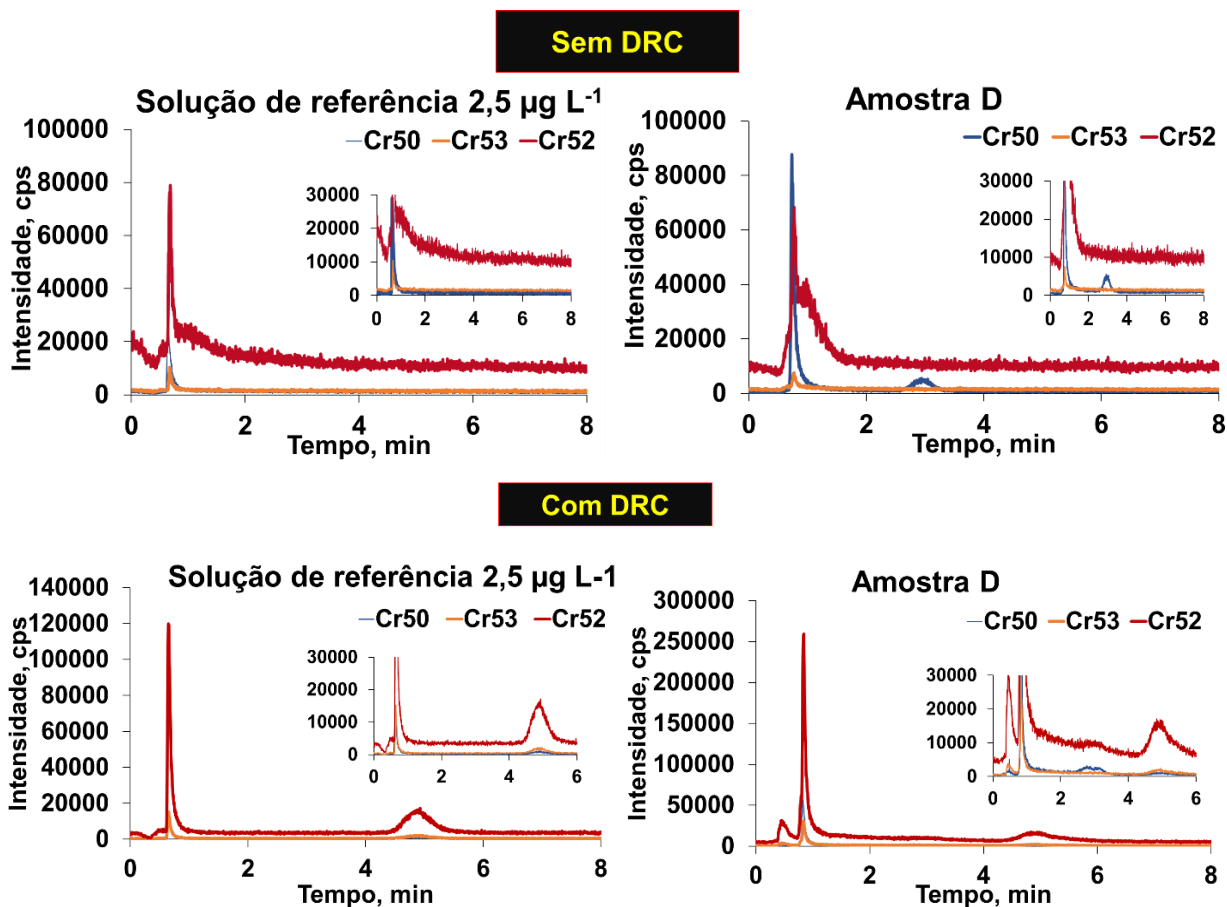
Para a otimização das condições de separação avaliou-se a coluna de separação cromatográfica, o tipo, a concentração e a vazão de fase móvel. Em cada avaliação, adotou-se como parâmetro para a escolha da condição mais adequada a separação das espécies de cromo, com menor tempo de retenção possível e a melhor sensibilidade.

5.5.1 Ajuste do instrumento ICP-MS

A determinação das espécies de cromo por ICP-MS é feita utilizando os isótopos mais abundantes ^{50}Cr (4,4%), ^{52}Cr (83,8%) e ^{53}Cr (9,5%). Porém as amostras de fertilizante orgânico e a solução extratora contém uma grande quantidade de compostos contendo carbono, que podem causar interferências espectrais durante a determinação. O equipamento de ICP-MS, utilizado neste trabalho, é equipado com cela dinâmica de reação (DRC) configurada para trabalhar com amônia. A DRC é eficiente para a eliminação de íons poliatômicos de carbono que interferem nos núclídeos de cromo, com reação com amônia.

Na Figura 13, estão mostrados os cromatogramas obtidos para uma solução de referência preparada em 10 mL de meio extrator ($0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$) e um extrato de uma amostra com e sem o uso da DRC. É possível observar que sem o uso da DRC não é possível detectar o Cr(VI), tanto na solução de referência, quanto na amostra. Porém, com o uso da DRC há um aumento na intensidade do sinal em função da possibilidade de poder aumentar a vazão do gás nebulizador, que passou de $1,10$ para $1,14 \text{ L min}^{-1}$, aumentando assim a sensibilidade.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos para uma solução de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) e Cr(VI) preparada no meio extrator e um extrato de uma amostra com e sem o uso da cela de reação ativa.



Durante a determinação de cromo com a cela de reação ativa, foi monitorada a razão massa/carga 50, 52 e 53 (^{50}Cr , ^{52}Cr e ^{53}Cr). Neste estudo, foi avaliada a vazão do gás amônia para obter a maior intensidade de Cr fixando o parâmetro q (RPq) em 0,25. A otimização foi feita utilizando uma solução de metanol a 1% e uma solução de referência de Cr(III) e Cr(VI) na concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A vazão de gás NH_3 com melhor resposta (redução da interferência espectral) foi de $0,55 \text{ mL min}^{-1}$.

5.5.2 Escolha da coluna de troca iônica

Os testes iniciais para a separação das espécies de Cr foram feitos com solução de concentração conhecida, tomando como referência alguns trabalhos já publicados (JABLOŃSKA-CZAPLA, M. *et al.* 2014; SARAIVA, M., JITARU, P., SLOTH, J, J. 2021). O primeiro parâmetro avaliado foi a escolha da coluna de troca iônica, onde a separação é dependente da afinidade das espécies da fase estacionária com

o analito e a fase móvel. A coluna de troca aniônica é uma das fases estacionárias mais empregadas em análise de especiação de cromo. Neste trabalho, foram avaliadas as colunas cromatográficas PRP-X100 (marca Hamilton) e a coluna AG7 (marca Dionex).

As condições cromatográficas inicialmente testadas foram adaptadas de KINGSTON *et al.* (1998) e de acordo com a sugestão do fabricante da coluna PRP X-100 (Hamilton), utilizada para a separação das espécies de Cr.

Figura 14 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Coluna de troca aniônica PRP-X100. A) Condição de eluição: $0,06 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, pH 1,3, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. B) Condição de eluição: $0,06 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, pH 8,5, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

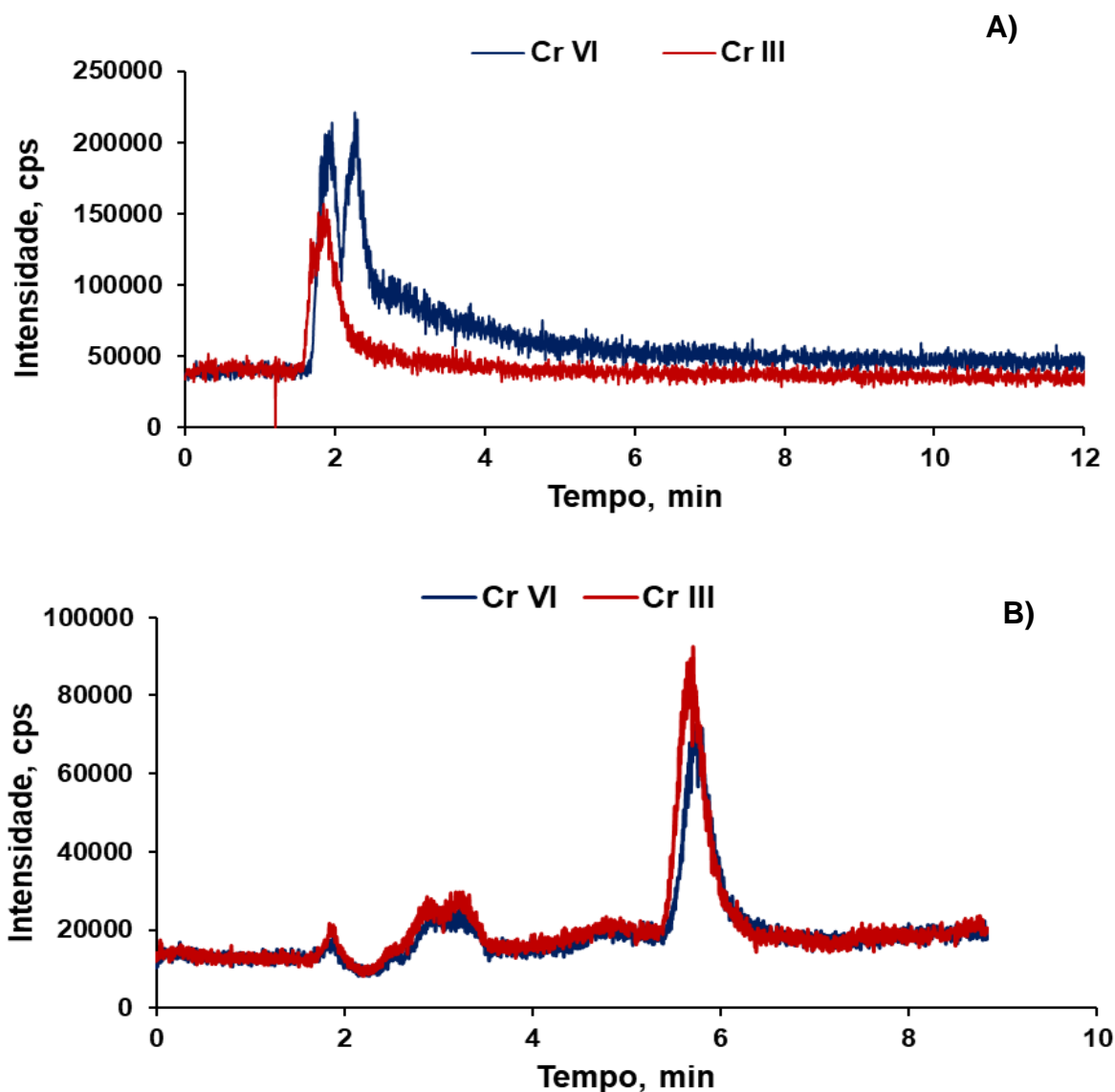
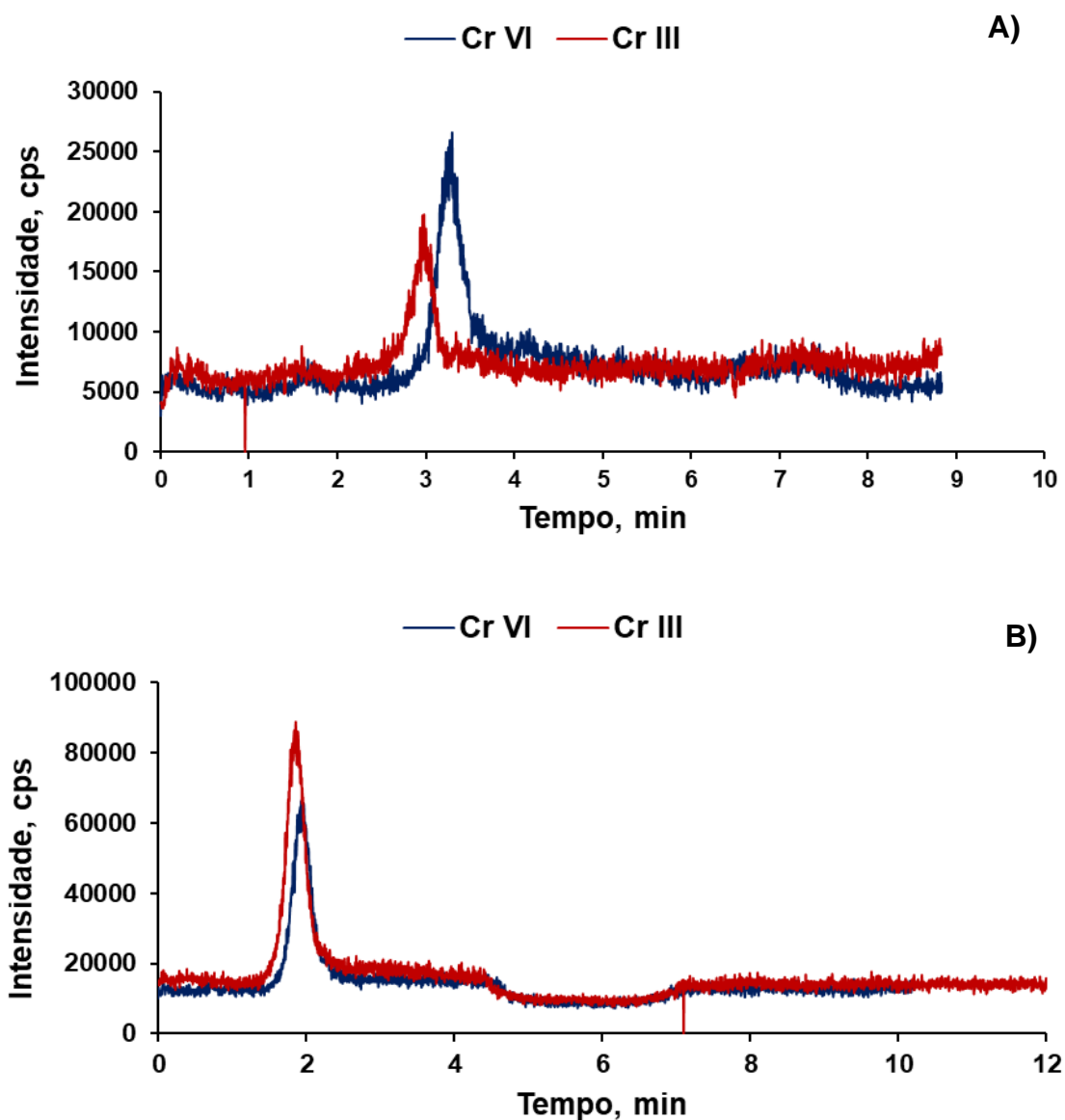


Figura 15 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Coluna de troca aniônica PRP-X100. A) Condição de eluição: $2,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 10, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. B) Condição de eluição: $40 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 10,0, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



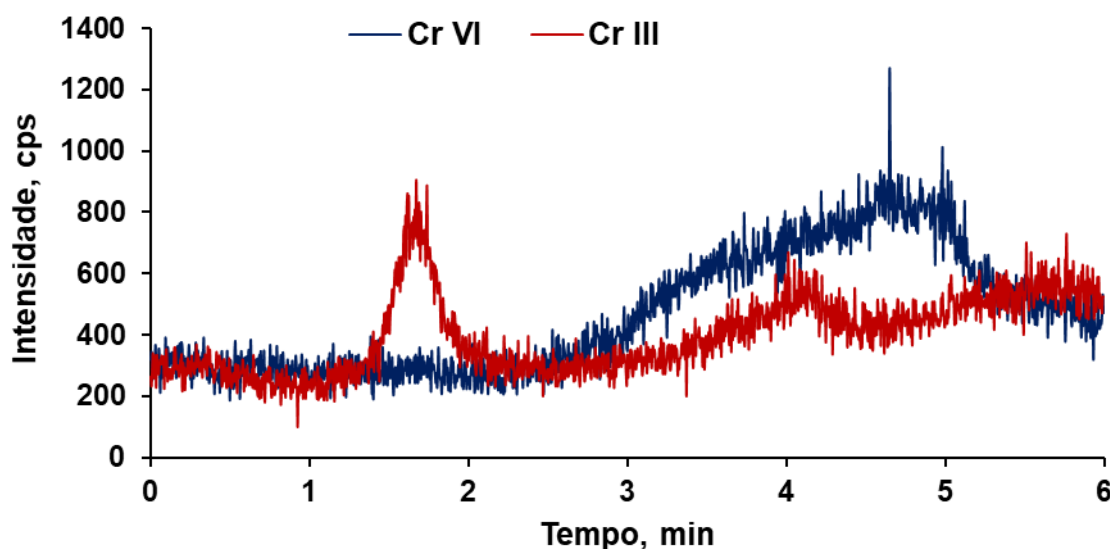
Conforme pode ser observado nas Figuras 14 e 15, não foi possível encontrar uma condição para separar as espécies de Cr(III) e Cr(VI) utilizando a coluna de troca aniônica PRP-X100. A complexação do Cr(III) com EDTA, seria uma alternativa para tentar separar as duas espécies. Conforme descrito no trabalho de CAPORALE *et al.* (2019) o uso do EDTA como agente extrator demonstrou ser eficiente na separação das espécies de Cr utilizando uma coluna de separação aniônica. Além do mais, este método possui algumas vantagens comparado ao método de extração alcalina, entre

elas, o complexo de Cr(III) com EDTA previne a sua oxidação para Cr(VI) e a complexação do EDTA com outros elementos (ex. Ba, Pb, Sr, Zn) facilita a extração de Cr(VI) de amostras sólidas, pois estes elementos combinados ao Cr formam cromatos insolúveis. Entretanto, essa condição não foi avaliada no presente estudo.

Quanto à fase móvel, há estudos sobre a influência da força iônica do meio no tempo de retenção das espécies, na qual a adição de um agente de ajuste de força iônica pode melhorar a separação das espécies (LIN *et al.*, 2016). Outro fator importante na separação é o pH da fase móvel, sendo observado no trabalho de WANG *et al.* (2010) que com o aumento do pH há um aumento no tempo de retenção de Cr(VI) e do complexo Cr(III)-EDTA, pois é conhecido que em pH entre 3,5 e 5,5, a principal forma do Cr(VI) é HCrO_4^- , enquanto em pH 7,0 a principal forma de Cr(VI) é CrO_4^{2-} , que pode causar um aumento na interação entre Cr(VI) e a coluna, aumentando o tempo de retenção. Sendo assim, o pH ideal está em valores na faixa de 3,5.

Visto que a separação das espécies de cromo não foi satisfatória nas condições estudadas com a coluna PRP-X100, foi avaliada a coluna AG7, utilizando como fase móvel uma solução de $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, pH 2,0. Os resultados podem ser visualizados na Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma obtido por LC-ICP-MS a partir de uma solução de referência contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Condição de eluição: $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, pH 2,0, com adição de $0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$, vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna de troca aniônica AG7.



Sendo então possível observar na Figura 16 a separação das duas espécies de cromo. Assim, se optou por buscar melhores condições de separação de cromo com essa coluna (AG7). Em outros trabalhos, como o de MÄDLER *et al.* (2016), também foi utilizada a coluna de separação do tipo AG7 para separação de Cr(VI) em solo e sedimento, posterior a uma etapa de extração com solução de NaOH e Na₂CO₃. Os autores conseguiram quantificar Cr(VI) com níveis de concentração abaixo de 0,5 µg g⁻¹.

5.5.3 Escolha da fase móvel e sua concentração

Na escolha da fase móvel, foi considerada como melhor aquela em que se obteve melhor resolução dos picos na separação das espécies de Cr e em menor tempo de corrida cromatográfica, além da compatibilidade da fase móvel com o instrumento de ICP-MS, uma vez que altos teores de solventes orgânicos ou sais podem causar instabilidade do plasma ou extingui-lo, formar interferências devido a íons poliatômicos e formar depósitos de carbono ou sais na interface do instrumento.

Ao contrário da maioria dos trabalhos (SADEGHI, A, S., ZERAATKAR, M. 2014 e LESNIEWSKA, B. GODLEWSKA, Z, Y. 2019), a adição de metanol juntamente à fase móvel não foi adotada neste trabalho. A adição de um solvente orgânico à fase móvel leva a uma separação com menores tempos de retenção e estreitamento de picos cromatográficos (LESNIEWSKA, B. GODLEWSKA, Z, Y. 2019). No entanto, sem o uso do metanol se reduz a possibilidade de interferências poliatômicas na determinação de ⁵²Cr e ⁵³Cr, previne-se o acúmulo de carbono na interface do instrumento e possíveis entupimentos. Apesar da ausência de metanol, o tempo total de análise foi considerado satisfatório, menos de 10 min.

Como fase móvel, foram avaliadas soluções de HNO₃ e NH₄NO₃ em diferentes concentrações. Os cromatogramas obtidos estão mostrados nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos para as avaliações da fase móvel HNO₃ utilizando uma solução padrão de 10 µg L⁻¹ de Cr(VI).

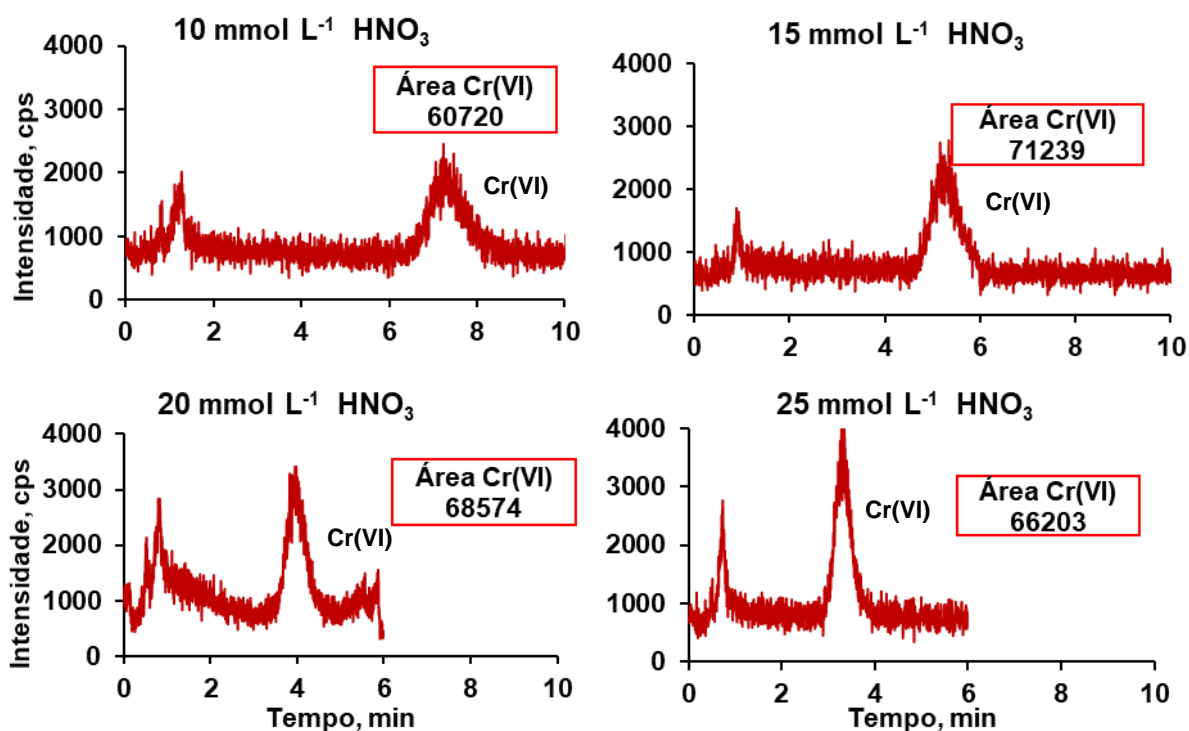
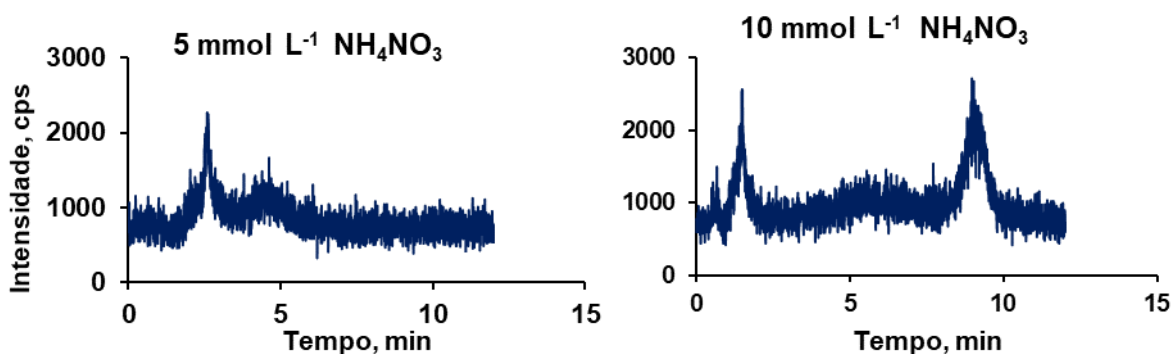


Figura 18 - Cromatogramas obtidos nas avaliações da fase móvel NH₄NO₃ utilizando uma solução de referência de 10 µg L⁻¹ de Cr(VI).

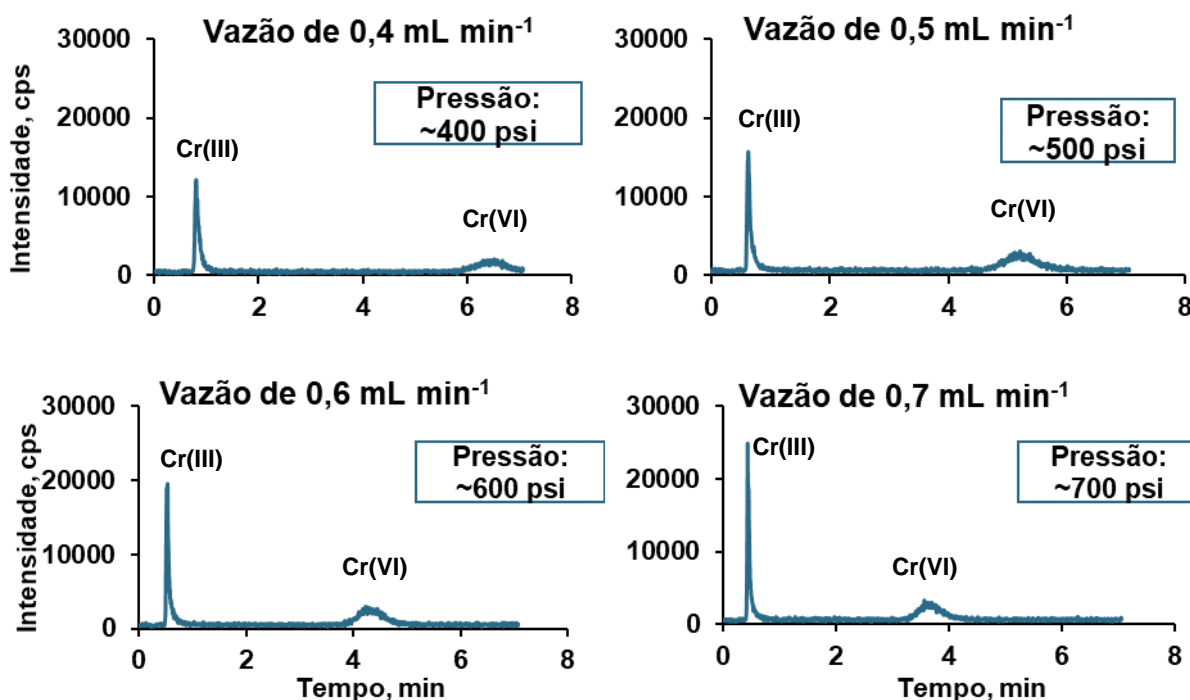


Dentre as condições avaliadas, apenas a fase móvel a 5,0 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃ não levou a separação das duas espécies de Cr em um tempo menor do que 12 min. Com as demais condições se obteve boa separação das duas espécies, inclusive com valores de área de pico próximos. Porém, a fase móvel de 15 mmol L⁻¹ de HNO₃ foi escolhida como a condição de separação para os demais testes, devido a boa resolução de separação e boa sensibilidade, com a obtenção de área de pico maior quando comparadas a outras concentrações da fase móvel.

5.5.4 Avaliação da vazão de fase móvel

A vazão da fase móvel foi avaliada de 0,4 a 0,7 mL min⁻¹. A vazão de 0,5 mL min⁻¹ foi escolhida por proporcionar menor tempo de retenção, com boa separação cromatográfica. Vazões superiores a esta aumentam a pressão do sistema, podendo ser prejudicial. Os cromatogramas obtidos nesta avaliação estão mostrados na Figura 19, bem como a pressão do sistema para cada vazão avaliada.

Figura 19 - Cromatogramas correspondentes a 10 µg L⁻¹ das espécies de Cr em função da vazão de fase móvel 15 mmol L⁻¹ HNO₃.



5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico proposto é adequado para sua finalidade, a fim de garantir que a metodologia seja exata e precisa, além de estável, reproduzível para uma faixa específica de concentração do analito a ser quantificado.

Com isso, o método é considerado validado quando este é avaliado segundo uma série de parâmetros estabelecidos, dentre eles estão: linearidade (faixa de trabalho), precisão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, exatidão, reprodutibilidade e repetitividade.

A validação da metodologia proposta neste trabalho para determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico, seguiu o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do MAPA (MAPA, 2016).

5.6.1. Linearidade

Para avaliação da linearidade, a faixa de trabalho foi definida com base na faixa de concentração do analito que se espera determinar nas amostras. Desse modo, a construção da curva de calibração para Cr(VI) teve como concentrações as soluções de calibração 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram preparadas 9 curvas de calibração, cada uma em dias diferentes. Na Tabela 7 são apresentadas as intensidades dos sinais individuais medidos para cada nível de concentração e Cr(VI) para os isótopos de ^{52}Cr e ^{53}Cr .

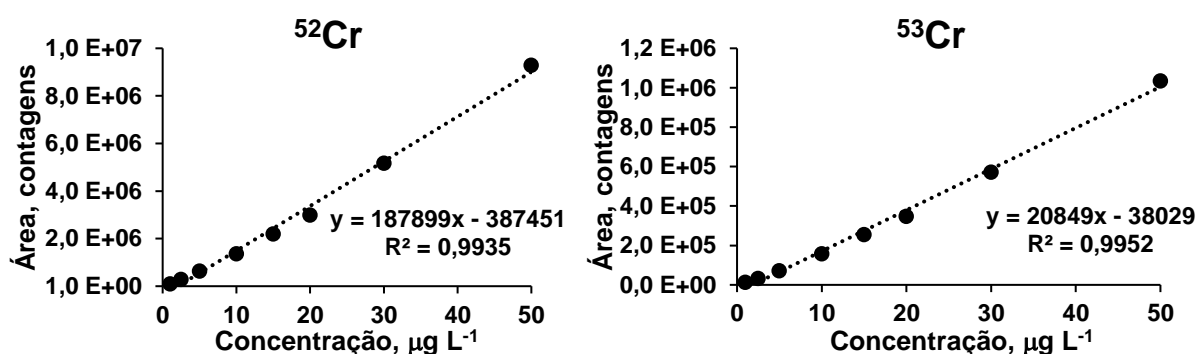
Tabela 7 - Concentração das soluções de calibração e área dos picos (contagens) cromatográficos correspondentes ao Cr(VI), para 9 curvas de calibração.

Cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área (contagens)	
	^{52}Cr	^{53}Cr
1,0	125976	14180
1,0	126295	12187
1,0	53062	6965
1,0	11860	1240
1,0	10186	10185
1,0	80415	16181
1,0	197331	23301
1,0	126914	15281
1,0	142987	16810
2,5	311254	36742
2,5	364784	41565
2,5	171817	20918
2,5	68558	7467
2,5	200150	22501
2,5	326942	43060
2,5	334766	36953
2,5	377140	41860
2,5	367959	43022
5,0	754281	85873
5,0	754177	84936
5,0	399240	47981
5,0	208285	22153
5,0	420465	49174
5,0	807199	93443
5,0	759424	83080

5,0	767631	86198
5,0	754966	84690
10	1543110	180098
10	1687070	193110
10	916863	107348
10	401879	50940
10	934894	108366
10	1705230	195581
10	1625000	185247
10	1651025	193122
10	1693665	193314
15	2450810	284831
15	2713900	315375
15	1536960	177870
15	677669	82450
15	1565660	180937
15	2837255	326768
15	2648585	308050
15	2563025	299272
15	2720665	316146
20	3156495	365220
20	3419885	395195
20	2258155	261447
20	890811	108010
20	2289380	264141
20	3917715	456892
20	3724440	432974
20	3579660	416491
20	3648640	421491
30	4820445	563382
30	5958420	693472
30	3804115	448475
30	4906755	548976
30	3871945	451590
30	6175890	451353
30	5758230	678083
30	5220795	604907
30	5965390	695066
50	8537680	1007845
50	10384300	1212170
50	7539380	885966
50	8964321	1007845
50	7573150	889088
50	10948400	723019
50	9778030	1150975
50	9522665	1126845
50	10351800	1214275

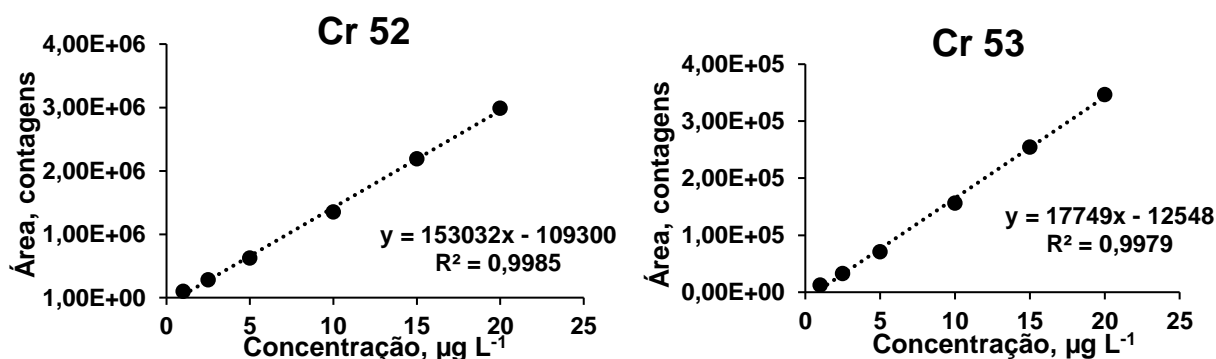
Conforme os resultados da Tabela 7 e a construção da curvas de regressão linear para Cr(VI), em ambos os isótopos mais abundantes de Cr (Figura 20), os intervalos lineares obtidos neste estudo foram de 1,0 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cr(VI) e a curva de calibração para determinação de Cr(VI) deve ser construída dentro da faixa linear de trabalho obtida e para concentrações mais elevadas devem ser feitas diluições das amostras.

Figura 20 - Curvas de regressão linear para Cr(VI) para os isótopos ^{52}Cr e ^{53}Cr .



De acordo com o guia de validação do MAPA (MAPA, 2016), a faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio e sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração. Desse modo, optou-se por trabalhar no intervalo de linearidade de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI), com o isótopo ^{52}Cr .

Figura 21 - Curvas de regressão linear para Cr(VI) para os isótopos ^{52}Cr e ^{53}Cr , na faixa linear de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.



5.6.2 Limites de Detecção e Quantificação

Em geral, o LOD é definido como a menor concentração que pode ser detectada com um determinado nível de confiança e LOQ como a menor concentração que pode ser quantificada. Para calcular os valores de LOD e LOQ, foram feitas 10 medições do branco da curva de calibração, seguindo as orientações do documento DOQ-CGCRE-008107 do INMETRO (INMETRO, 2018). Assim, o LOD e LOQ foram estimados pelas Equações (8) e (9), considerando a área do pico do branco.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{b} \times FD \quad (8)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{b} \times FD \quad (9)$$

Onde,

s: desvio padrão do sinal analítico do branco;

b: coeficiente angular da equação de regressão linear;

FD: fator de diluição da amostra.

Na Tabela 8, estão descritas as áreas correspondentes as 10 leituras do branco, que consiste do mesmo meio da solução extratora utilizada para extrair Cr(VI) nas amostras de fertilizantes. O LOD e LOQ estão expressos em massa, e foram consideradas a diluição em que a amostra foi submetida e a massa de amostra analisada.

Tabela 8 - Área dos picos cromatográficos correspondentes ao branco, média e desvio padrão das 10 leituras, LOD e LOQ.

Replicatas	Área Integrada	
	⁵² Cr	⁵³ Cr
1	183	0
2	958	668
3	8611	1883
4	1515	233
5	1273	0
6	0	1944
7	227	0
8	12633	2780
9	0	0
10	0	0
Média	2540	751
Desvio padrão	4399	1050
Coeficiente angular ^a	153032	17749
LOD, ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^b	0,06	0,12
LOQ, ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^b	0,16	0,35

^a informado na Figura 21; ^b considerando 0,025 g de amostra de fertilizante e fator de diluição (FD) de 5 vezes.

5.6.3 Robustez

O estudo da robustez foi realizado para demonstrar a estabilidade do procedimento sob pequenas variações das condições experimentais. Esse estudo foi feito com a amostra “A” e extração alcalina com $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3 + 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. Os fatores e suas pequenas variações foram a temperatura de extração, tempo de extração, massa de amostra, volume de injeção no sistema cromatográfico do LC-ICP-MS, os equipamentos utilizados para determinação de Cr(VI) e os diferentes dias de análise. Todos os fatores foram avaliados variando um fator por vez, como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Variações de condições experimentais para avaliação da robustez.

Condição	Cr(VI), $\mu\text{g g}^{-1}$	Condição	Cr(VI), $\mu\text{g g}^{-1}$
Temperatura de extração – 90°C	1237 ± 52	Temperatura de extração – 95°C	1230 ± 49
Tempo de extração – 60 min	1237 ± 52	Tempo de extração – 70 min	1222 ± 71
Massa de amostra – 25 mg	1237 ± 52	Massa de amostra – 30 mg	1158 ± 41
Volume de injeção, 100 μL	1237 ± 52	Volume de injeção, 200 μL	1228 ± 32
Equipamento, LC-ICP-MS	1237 ± 52	Equipamento, IC-Vis	1236 ± 26
Dia de análise, 1	1237 ± 52	Dia de análise ,60	1226 ± 65

Neste caso foi verificado, através do estudo de robustez, que a resposta do procedimento analítico em função da concentração de Cr(VI) obtida é fracamente influenciada por pequenas variações dos fatores, demonstrando que o procedimento analítico pode ser classificado como: “Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina”, de acordo com o Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2016).

5.6.4 Recuperação do Analito, Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial

Os ensaios de adição/recuperação do analito, de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial do método foram conduzidos mediante análise da amostra “D”, na qual, seis réplicas dessa amostra foram fortificadas para obter dois níveis diferentes de concentração de Cr(VI): $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$. A adição dos analitos ($100 \mu\text{L}$ e $500 \mu\text{L}$ de solução a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI)) às replicatas da amostra foram realizadas antes da etapa de extração (descrita no item 4.5 *Extração de Cr(VI)*). Os resultados obtidos na análise dessas replicatas foram utilizados para avaliação da recuperação e repetitividade.

Para avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial repetiu-se este mesmo procedimento quatro vezes, em dias distintos: no 1º, 2º e 3º dia o analista foi o mesmo e no 4º dia um analista diferente conduziu a análise. Na Tabela 10 estão mostrados os resultados obtidos, em relação à recuperação dos analitos, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial.

Tabela 10 - Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para Cr(VI).

Replicatas	Amostra Fortificada, 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr(VI)				Amostra Fortificada, 2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr(VI)				
	Dia da análise				Dia da análise				
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	6,30	6,75	6,63	6,36	8,41	8,96	7,95	8,17	
2	6,58	6,54	6,42	6,21	8,72	8,70	8,26	8,19	
3	6,39	7,11	6,60	7,04	7,70	9,24	8,68	9,13	
4	6,79	6,63	6,22	6,68	8,79	8,30	8,71	9,16	
5	6,37	6,80	6,26	6,70	8,51	8,55	8,36	9,30	
6	6,87	6,58	6,86	7,03	8,29	9,02	8,81	9,48	
Repetibilidade	Concentração média, $\mu\text{g g}^{-1}$	6,55	6,73	6,50	6,69	8,41	8,79	8,46	8,90
	Desvio padrão	0,23	0,21	0,24	0,34	0,39	0,34	0,32	0,57
	Desvio padrão relativo, %	3,51	3,12	3,69	5,08	4,63	3,86	3,78	6,40
	Recuperação média, %	97,8	100	97,0	99,8	101	106	101	107
Reprodutibilidade Intralaboratorial	Concentração média, $\mu\text{g g}^{-1}$	6,62				8,64			
	Desvio padrão	0,06				0,11			
	Recuperação média, %	98,8				104			

Os resultados obtidos nos testes de repetibilidade, expressos pelo desvio padrão relativo das medidas de 6 replicatas das amostras, estão entre 3,1 à 6,4%, o que revela uma boa precisão intermediária do método.

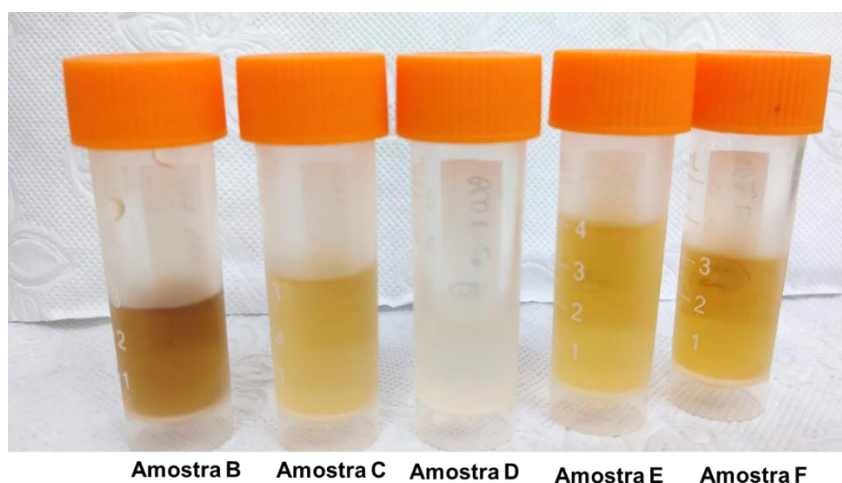
5.6.5 Veracidade

Além dos estudos de adição e recuperação do analito, adicionado a uma amostra de fertilizante orgânico, a veracidade do método também foi avaliada através da análise de um material de referência certificado de solo, aplicando-se as mesmas condições de extração e quantificação das amostras, obtendo-se o valor de $182 \pm 16 \mu\text{g g}^{-1}$ Cr(VI) com 89% de concordância com o valor de referência (teste t a 95% de confiança) de $203 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$.

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE Cr(VI)

Após a avaliação de alguns parâmetros de validação do método, o mesmo foi aplicado na determinação da concentração de Cr(VI) em 6 amostras de fertilizantes orgânicos obtidos no comércio local. A descrição e as características dos fertilizantes orgânicos analisados são informadas no item 4.3 *Amostra e material de referência certificado*. O procedimento de extração está descrito no item 4.5 *Extração de Cr(VI)*. Na Figura 22 é possível observar o aspecto visual da solução obtida com a extração alcalina, posterior a etapa de centrifugação e filtração utilizando filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

Figura 22 - Aspecto visual dos extratos das amostras de fertilizante orgânico utilizado neste trabalho.



A coloração variou para cada amostra, isto se deve possivelmente a sua composição. Sendo assim, para evitar interferência causada pelo carbono presente na matriz, as amostras foram diluídas. Posteriormente, os extratos alcalinos foram quantificados pelo método desenvolvido neste trabalho utilizando a técnica de LC-ICP-MS, monitorando o ^{52}Cr . Para o controle de qualidade, em cada batelada foi analisada uma solução de referência e um material de referência certificado. Nos extratos obtidos da amostra "A", material de referência certificado e de solução de referência de Cr(VI) e Cr(III), foram observados sinais no tempo de retenção entre 5 e 7 min, o que indica a presença de Cr(VI) (Figura 23).

Figura 23 - Cromatogramas obtidos para um material de referência certificado, uma amostra diluída 10x e uma solução a $30\ \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) e Cr(III).

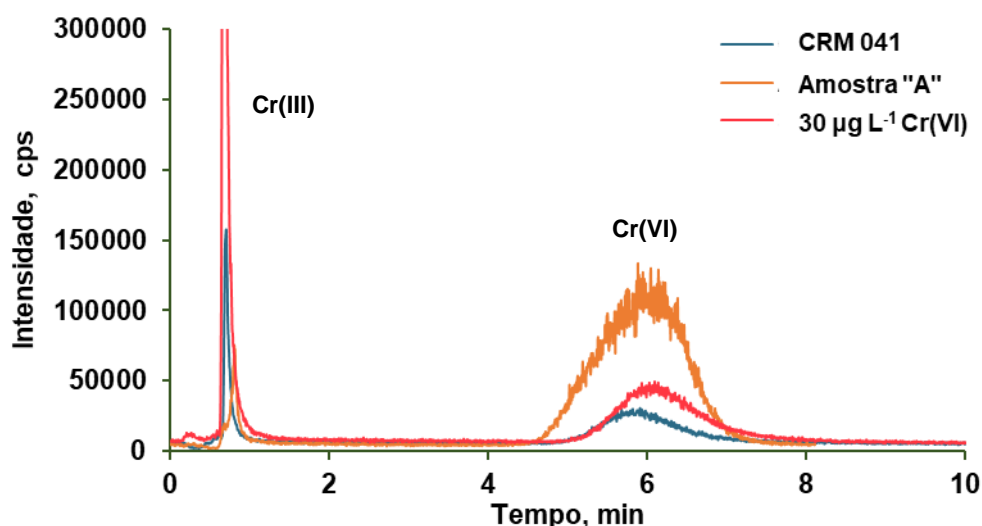
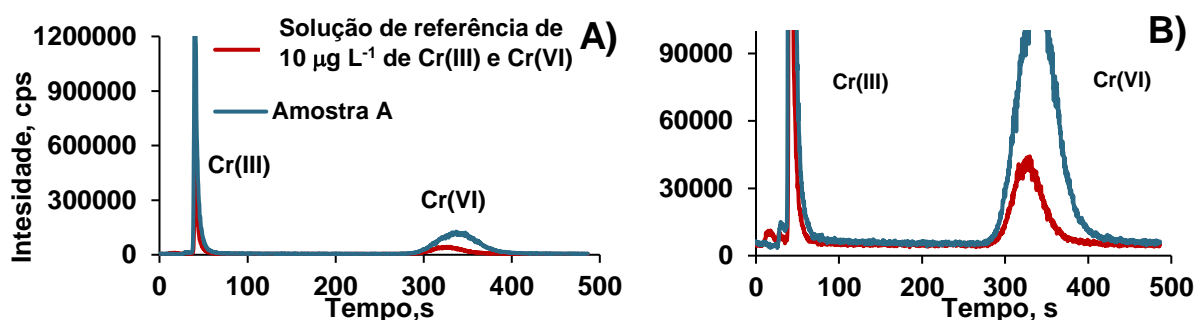


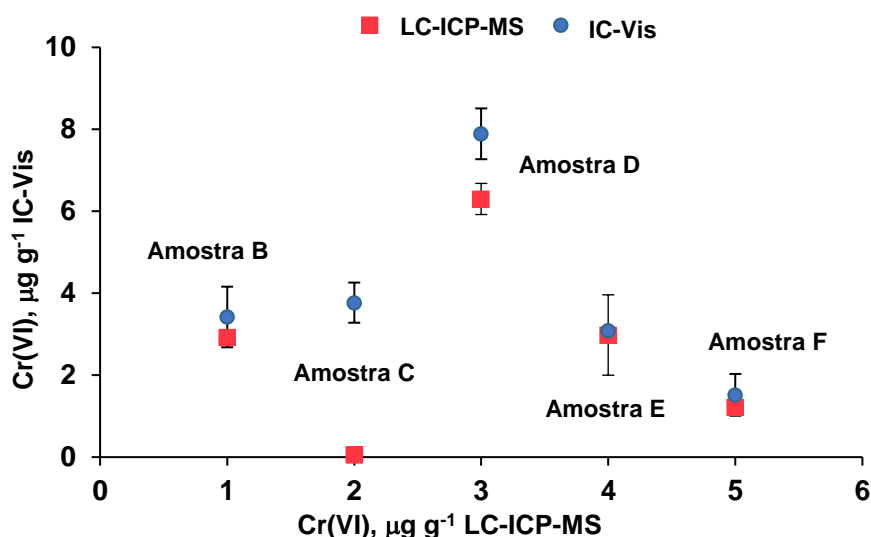
Figura 24 - Cromatogramas obtidos após a injeção de $100\ \mu\text{L}$ de solução de referência e a amostra A. A) Extração em meio alcalino e quantificação por LC-ICP-MS, a amostra foi diluída 100x; B) mesmo cromatograma da amostra "A" ampliada 10 vezes.



Para a quantificação de Cr(VI) nos extratos por LC-ICP-MS foi construída uma curva de calibração de 1,0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, as quais foram feitas em duplicata para cada ponto, e em meio alcalino na concentração final 0,7 mmol L^{-1} Na_2CO_3 + 1,25 mmol L^{-1} NaOH . Para obtenção da relação entre a concentração e os valores dos sinais para as soluções de referência, foi feita a integração da área de pico utilizando o software Origin 8. As amostras foram diluídas em água em um fator de 5 vezes, exceto a amostra “A” que foi diluída 100x devido à alta concentração de Cr total. Em seguida, os extratos foram injetados no sistema de cromatografia iônica e, após a separação, os cromatogramas foram exportados e as áreas dos picos foram integradas e o valor calculado.

Os mesmos extratos também foram medidos pela técnica de IC-Vis, como outro método de determinação de Cr(VI). Os resultados obtidos tanto para técnica de LC-ICP-MS e IC-Vis, estão correlacionados na Figura 25.

Figura 25 - Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de LC-ICP-MS e IC-Vis.



De acordo com os resultados, é possível observar uma boa concordância entre as duas técnicas, exceto para a amostra “C” na qual o resultado para Cr(VI) por LC-ICP-MS ficou abaixo do limite de quantificação. A análise em ambas as técnicas foi repetida, obtendo o mesmo resultado.

Foi feita a determinação da concentração de Cr total nos extratos analisados por especiação, para avaliar a extração comparando com o resultado de Cr total obtido

por ICP OES após a decomposição total da amostra. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentrações de Cr(VI) por LC-ICP-MS e IC-Vis e Cr total por ICP-OES. Os resultados representam a média e desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Amostra	Cr(VI), $\mu\text{g g}^{-1}$ LC-ICP-MS	Cr(VI), $\mu\text{g g}^{-1}$ IC-Vis	Cr total, $\mu\text{g g}^{-1}$	Cr total após extração, $\mu\text{g g}^{-1}$
A	1237 \pm 52	1236 \pm 26	25698 \pm 1191	24987 \pm 1228
B	2,92 \pm 0,17	3,42 \pm 0,74	35,9 \pm 1,9	34,1 \pm 1,8
C	< 0,06	3,77 \pm 0,49	53,3 \pm 2,9	50,1 \pm 3,2
D	6,30 \pm 0,38	7,89 \pm 0,62	34,3 \pm 2,9	31,2 \pm 1,8
E	2,98 \pm 0,98	3,09 \pm 0,06	14,5 \pm 1,3	11,9 \pm 1,7
F	1,22 \pm 0,03	1,52 \pm 0,51	11,2 \pm 0,7	10,8 \pm 1,3
CRM	186 \pm 6	190 \pm 2	-	181 \pm 7,8

Não foi possível realizar a quantificação de Cr(III) por LC-ICP-MS e IC-Vis devido a possível formação de compostos pouco solúveis, como a forma de Cr(OH)₃, em meio alcalino. Desta forma, não foi possível realizar o somatório das espécies de Cr(III) e Cr(VI) para comparar com o resultado de Cr total obtido por ICP OES após a decomposição da amostra.

Na Tabela 12 está descrito um resumo dos métodos já existentes para determinação de Cr(VI) juntamente com o método proposto neste trabalho. É possível observar que os métodos oficiais foram propostos para determinação de Cr(VI) em matrizes aquosas, como água potável, água residual, resíduo doméstico e industrial, o que torna o método menos suscetível a possíveis interferências causadas pela matriz, como por exemplo o teor de matéria orgânica presente na matriz de fertilizante orgânico. O método proposto neste trabalho, foi adequado para quantificação de Cr(VI) em matriz com elevado teor de matéria orgânica, com boa sensibilidade para quantificação na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, na qual atende a Instrução Normativa DAS N° 27 (MAPA, 2016), com limite máximo permitido de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr(VI) em fertilizante orgânico.

Tabela 12 - Resumo dos procedimentos oficiais para determinação de Cr(VI) e do método proposto neste trabalho.

	EPA 7196	EPA 218.7	ISO/CD 24384	Método proposto
Analito	Cr(VI) dissolvido	Cr(VI)	Cr(III) e Cr(VI)	Cr(VI)
Método	Colorimétrico	IC	LC-ICP-MS	LC-ICP-MS
Amostra	Resíduo doméstico e industrial e água de lençol freático	Água potável	Água residual, água de superfície e água de lençol freático	Fertilizante orgânico
LOD	ppm	Ppb	Ppb	ppb
Limitações	Interferências Preparo de amostra laborioso Falta de sensibilidade	Requer derivatização pós-coluna	Pré-tratamento com agente quelante Preparo de amostra laborioso	Preparo de amostra laborioso

6 CONCLUSÃO

Devido o limite de detecção da espectrofotometria, não foi possível quantificar Cr(VI) em todas as amostras de fertilizante utilizando a técnica de UV-Vis, reforçando a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia para especiação de Cr por uma técnica mais sensível para atender as demandas de análises de Cr(VI) em fertilizante orgânico.

Dentre as avaliações das condições de extração de espécies de cromo, o procedimento de extração em meio alcalino, utilizando 10 mL de solução extratora ($0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ com $0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$), para uma massa de 25 mg de amostra e aquecimento em banho-maria à $90 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 60 min, demonstrou ser eficiente para as amostras de fertilizante orgânico utilizadas neste trabalho e para o CRM.

Para a determinação de Cr(VI) em fertilizante orgânico, acoplamento do LC ao ICP-MS promoveu boa precisão e exatidão. A otimização das condições cromatográficas possibilitou a separação e eluição de Cr(VI) em menos de 8 min por corrida cromatográfica, sendo considerado um curto período de tempo para uma análise cromatográfica. Isto implica consideravelmente em um menor custo total de análise e aumenta a frequência analítica das medidas.

Com base nos resultados obtidos na validação do método, este novo procedimento foi adequado para a análise de uma seleção de amostras de fertilizante orgânico.

De acordo com o método proposto, as amostras de fertilizante orgânico A, B, D e E possuem concentração de Cr(VI) acima do limite máximo permitido pela legislação 2 mg kg^{-1} . É importante considerar que o fertilizante orgânico tem como finalidade seu uso em plantas e solo, e sua disposição no ambiente vai depender de diversos fatores do solo no qual foi aplicado, assim como pode ser reduzido para Cr(III), sua forma menos tóxica, ou então permanecer na forma de Cr(VI), podendo causar danos ambientais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Chromium**, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, EUA, 2012. Acesso em 20/03/2020. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/>>.

ANDERSON, R. A.; KOZLOVSKY, A.S. **Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.41, n. 6, p. 1177-1183, 1985.

ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS, ASTM D 2216-98, Standard Test Methods for Moisture, Ash, and Organic Matter of Peat and Other Organic Soils, 1998.

ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS, ASTM D 2974-00, Standard Test Methods for Moisture, Ash, and Organic Matter of Peat and Other Organic Soils, 2000.

ARAUJO, U. B. *et al.* **Simultaneous determination and speciation analysis of arsenic and chromium in iron supplements used for iron-deficiency anemia treatment by HPLC-ICP-MS**. Talanta, v. 1, n. 170, p. 523-529, 2017.

BOBROWSKI, Andrezj, KRÓLICKA, Agnieszka, ZAREBSKI, Jerzy. **Characteristics of voltammetric determination and speciation of chromium – A review**. Electroanalysis, v. 21. p. 1449-1458, 2009.

CAPORALE, A. G. *et al.* **Hexavalent chromium quantification by isotope dilution mass spectrometry in potentially contaminated soils from south Italy**. Chemosphere, v. 233, p. 92-100, 2019.

CIAVATTA, C. *et al.* **Chromium-containing organic fertilizers from tanned hides and skins: a review on chemical, environmental, agronomical and legislative aspects**. Journal of Environmental Protection, v.3, n. 11, p. 1532-1541, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção de fertilizante orgânico de origem 100% vegetal por meio da compostagem**. Acesso em 30/03/2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>.

GIACOMETTI, C. *et al.* **Soil application of tannery land plaster: effects on nitrogen mineralization and soil biochemical properties**. Applied and Environmental Soil Science, 395453, 2012.

GONZÁLEZ, P. R. *et al.* **Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review**. Spectrochimica Acta Part B, v. 60, n. 2, p. 151 – 207, 2005.

GRABARCZYK, M.; KOROLCZUK, M.; TYSZCZUK, K. **Extraction and determination of hexavalent chromium in soil samples**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 386, n.2, p. 357–362, 2006.

GRABARCZYK, M.; **Speciation Analysis of Chromium by Adsorptive Stripping Voltammetry in Tap and River Water Samples**. *Electroanalysis*, v. 20, n. 20, p. 2217-2222. 2008.

INMETRO. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**. Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. (DOQ-CGCRE-008), Revisão 07 - Julho de 2018.

HAMILTON, <https://craft-labs.s3.amazonaws.com/File-Uploads/HPLC_AppNote_Hexavalent-Chromium-Determination_-Anion-exchange_PRP-X100.pdf?mtime=20180626154933>, acesso dia 31 de janeiro de 2020.

HERNANDEZ, F. *et al.* **Optimisation of selective alkaline extraction for Cr(VI) determination in dairy and cereal products by HPIC–ICPMS using an experimental design**. *Food Chemistry*, v. 214, p. 339–346, 2017.

HWEE, L. *et al.* **Sustainable approach to biotransform industrial sludge into organic fertilizer via vermicomposting: a mini-review**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 93, n. 4, p. 925-935, 2018.

JABLOŃSKA-CZAPLA, M. *et al.* **Development and validation of HPLC–ICP-MS method for the determination inorganic Cr, As and Sb speciation forms and its application for Pławniowice reservoir (Poland) water and bottom sediments variability study**. *Talanta*, v. 120, p. 475-483, 2014.

JÓZSEF, P.; DÁVID, N.; SÁNDOR, K.; ÁRON, B. **A comparison study of analytical performance of chromium speciation methods**. *Microchemical Journal*, v. 149, p. 1039-1058, 2019.

KIRAN, K. *et al.* **Speciation determination of chromium (III) and (VI) using preconcentration cloud point extraction with flame atomic absorption spectrometry (FAAS)**. *Journal of Hazardous Materials*, v. 150 n. 3, p. 582–586, 2008.

KINGSTON *et al.* **Accuracy in species analysis: speciated isotope dilution mass spectrometry (SIDMS) exemplified by the evaluation of chromium species**. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 27, p. 299-309, 1998.

KOTÁS, J.; STASICKA, Z. **Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation**. *Environmental Pollution*, v. 107, n. 3, p. 263-283, 2000.

KRÜGER, O. *et al.* **Determination of chromium (VI) in primary and secondary fertilizer and their respective precursors**. *Chemosphere*, v. 182, p. 48-53, 2017.

LESNIEWSKA, B. GODLEWSKA, Z, Y. **Speciation of chromium in alkaline soil extracts by an ion-pair reversed phase HPLC-ICP-MS method**. *Molecules*. v. 24, n. 6, 2019.

LIN, Y. A. *et al.* **Speciation of chromium in edible animal oils after microwave extraction and liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry**. *Microchemical Journal*, v. 128, p. 274–278, 2016.

LUND, W. **Speciation analysis - why and how?**. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, v. 337, p. 557- 564, 1990.

MÄDLER *et al.* **Trace-Level Analysis of Hexavalent Chromium in Lake Sediment Samples Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry**, Journal of Environmental Protection, v. 7, p. 422-443, 2016.

MALHERBE, J., *et al.* **Evaluation of Hexavalent Chromium Extraction Method EPA Method 3060A for Soils Using XANES Spectroscopy**. Environmental Science Technology, v. 45, p. 10492-10500, 2011.

MARKIEWICZ, B. *et al.* **Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological**. Talanta, v.132, p. 814-828, 2015.

MARTONE, N., *et al.* **Determination of Chromium species in dietary supplements using speciated isotope dilution mass spectrometry with mass balance**. Journal Agricultural and food chemistry, v. 61, p. 9966-9976, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 61, de 08 de julho de 2020. Acesso em 26/07/2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 27, 05 DE JUNHO DE 2006. Acesso em 07/08/2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>>.

MISHRA, S.; BHARAGAVA, R. N. **Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies**. Journal of Environmental Science and Health, Part C, v. 34, n. 1, p. 1–32, 2016.

NAMIEŚNIK, A.; RABAJCZYK, A. **Speciation Analysis of Chromium in Environmental Samples**. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 42, n.4, p. 327-377, 2012.

O'BRIEN, P.; WANG, G. **Coordination chemistry and the carcinogenicity and mutagenicity of chromium (VI)**. Environmental Geochemistry Health, v.11, n.3, p. 77-85, 1989.

PECHANCOVÁ, R., GALLO, J., MILDE, D., PLUHÁČEK, T. **Ion-exchange HPLC-ICP-MS: A new window to chromium speciation in biological tissues**. Talanta, v. 218, 121150, 2020.

PETTINE, M.; CAPRI, S. **Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—a review**. Analytica Chimica Acta, v. 540, n. 2, p. 231-238, 2005.

PETTINE, M. *et al.* **The reduction of chromium (VI) by iron (II) in aqueous solutions**. Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 62, 1509, 1998.

PITA DE SÁ, I., SOUZA, G, B., NOGUEIRA, A, R, A. **Chromium speciation in organic fertilizer by cloud point extraction and optimization through experimental Doehlert design as support for legislative aspects.** *Microchemical Journal*, v.160, Part A, 105618, 2021.

RAKHUNDE, R. *et al.* **Chemical Speciation of Chromium in Water: A Review.** *Environmental Science and Technology*, v.42, n. 7, p. 776-810, 2012.

RAY S. J. *et al.* **Plasma-source mass spectrometry for speciation analysis: state-of-the art.** *Journal of Chromatography A*, v. 1050, n.1 p. 3-34, 2004.

SADEGHI, A, S., ZERAATKAR, M. **Solid-phase extraction and HPLC-UV detection of Cr(III) and Cr(VI) using ionic liquid-functionalized silica as a hydrophobic sorbent.** *Analytical Methods*, v. 6, p. 4867-4877, 2014.

SAGER, M. **About Chromium (VI) extraction from fertilizers and soils.** *Economic and Environmental Geology*, v.38, p. 657-662, 2005.

SARAIVA, M., JITARU, P., SLOTH, J, J. **Development and validation of a single run method based on species specific isotope dilution and HPLC-ICP-MS for simultaneous species interconversion correction and speciation analysis of Cr(III)/Cr(VI) in meat and dairy products.** *Talanta*, v. 222, 121538, 2021.

SCHARF, B. *et al.* **Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity.** *International Journal of Scientific Reports*, v. 4, p. 1-12, 2014.

SÉBY, F. *et al.* **Development of analytical procedures for the determination of hexavalent chromium in corrosion prevention coatings used in the automotive industry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 2, p. 587-597, 2008.

SÉBY, F., VACCHINA, V. **Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental, industrial and food matrices.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 104, p. 54-68, 2018.

TEMPLETON, D. M., *et al.* **Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitons structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000).** *Pure and Applied Chemistry*, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. **Determination of Cr(VI) in Water, Waste Water, and Solid Waste Extracts.** Technical Note 26, Thermo Fischer Scientific.

UNDERWOOD, E.J. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**, 4^a ed., Academic Press Inc., New-York, EUA, p. 258-270, 1977.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), **Alkaline digestion of hexavalent chromium, Method 3060A**, in: *Test Methods for Evaluating Solid Waste-Physical/Chemical Methods*, Government Printing Office, Washington, EUA, 1995.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Chromium, Hexavalent (Colorimetric)**. Method 7196A, in Test Methods for Evaluating Solid Waste-Physical/ Chemical Methods, Government Printing Office, Washington, EUA, 1995.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Determination of hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial wastewater effluents by ion chromatography**, Method 7199A, in Test Methods for Evaluating Solid Waste, Government Printing Office, Washington, EUA, 1996.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Method 6800: Elemental and Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EUA, 2007.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices**, Government Printing Office, Washington, EUA 3052, 1996.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils**, Government Printing Office, Washington, EUA 3051A, 2007.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Method 218.7: Determination of Hexavalent Chromium in Drinking Water by Ion Chromatography with Post-Column Derivatization and UV-Visible Spectroscopic Detection**, Washington, EUA 218.7, 2011.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5 ed. Mestre Jou, 1981.

WANG, H.J. *et al.* **Using ion-pair reversed-phase HPLC ICP-MS to simultaneously determine Cr(III) and Cr(VI) in urine of chromate workers**. Talanta, v. 81, p. 1856-1860, 2010.

WOLF, R, E., MORRISON, J, M., GOLDHABER, M, B. **Simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) using reversed-phased ion-pairing liquid chromatography with dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. v. 22, p. 1051–1060, 2007.

WOLLE, M, M. *et al.* **Optimization and validation of strategies for quantifying chromium species in soil based on speciated isotope dilution mass spectrometry with mass balance**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 29, 1640, 2014.

ZHANG, L. *et al.* **Mechanism study of humic acid functional groups for Cr(VI) retention: Two-dimensional FTIR and ¹³C CP/MAS NMR correlation spectroscopic analysis**. Environ Pollution, v. 225, p. 86-92, 2017.

ZAYED, A. M., TERRY, N. **Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation**. *Plant and Soil*, v. 249, p. 139-156, 2003.