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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS SEQUENCIAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS EM MATRIZES COMPLEXAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diana Tomazi Muratt

Santa Maria, RS, Brasil

2013

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS SEQUENCIAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS EM MATRIZES COMPLEXAS

Diana Tomazi Muratt

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química Analítica**.

Orientador: Professor Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil
2013

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS SEQUENCIAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS EM MATRIZES COMPLEXAS

elaborada por
Diana Tomazi Muratt

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Simone Stülp, Dra. (UNIVATES)

Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)

Dedico este trabalho à minha mãe Odete;
por todo seu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, não apenas pela orientação, mas também pela atenção, paciência, disposição e compreensão ao longo desses dois anos. Ainda, pela oportunidade a mim dada de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero Nascimento pela co-autoria neste trabalho.

À Prof. Dr[a]. Simone Stülp (UNIVATES) e à Prof. Dr[a]. Carine Viana Silva (UFSM) pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

À toda minha família, em especial, ao Seu Delmar Walmir Muratt e à Dona Odete Tomazi Muratt, que mesmo de longe sempre estiveram muito presentes, "sem vocês eu nada seria". Às minhas irmãs, Marina e Lenise, sempre prontas a ajudar nos momentos de dificuldade, às minhas sobrinhas, Milena e Melissa, por trazerem mais brilho à minha vida.

Para todos os "Lachenianos". Em especial, à Valéria Dal Prá, Carolina Dolwitsch, Mariana Bortoluzzi, Marlise Ferreira e à companheira de indiadas, Géssica D. Silveira, por sempre estarem comigo, nos momentos alegres ou difíceis, sempre com uma palavra, serei eternamente grata a Deus por vocês estarem na minha vida.

À Patrícia Mattiazi, Marlei Veiga e ao Lucas Bressan, por dividirem comigo ótimos momentos de trabalho. À Larissa Muller pelas inúmeras caronas e pela parceria nas madrugadas. À Mariele Martini, Ana Paula Moreira, Gabriela Zemolim, Carla Sant'Ana Luciana Gobo, Thais Dal Molin, pelo apoio. Ao Alexandre Schneider, à Bruna Wietham e à Ananda Guarda pelos "conhecimentos voltamétricos" compartilhados. Ao Alex Colim, Luis Claussem e ao Luiz Ferraz, pela disponibilidade quando precisei de ajuda.

Aos meus queridos químicos, à Daiane Roman, ao Guilherme Paveglio, Josias Merib, Giovanni Pedroso, à Cassiele Nascimento, pela ajuda mesmo que algumas vezes a distância.

À Joice Ceolin, a quem já considero como irmã, pela amizade sincera.

A todos os funcionários e professores que colaboraram de uma forma ou de outra.

A todos aqueles que não foram citados, mas que também contribuíram em algum aspecto sintam-se aqui, reconhecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

"A Deus pela força"

Era o sabiá andarilho
Do céu de todos os meus,
Do céu pintado por Deus
Para o olhar de quem sente
Sabiá de canto dolente
Pousou pra ouvir o que tenho
E sentiu porque mantenho
As precisões de cantar,
Não me peçam pra parar
Quem não sabe de onde venho!

- Lisandro Amaral –

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS SEQUENCIAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS EM MATRIZES COMPLEXAS

AUTORA: DIANA TOMAZI MURATT

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de agosto de 2013.

Elementos tóxicos estão em contínuo acúmulo no ambiente principalmente devido a atividades antropogênicas. Neste trabalho, foi desenvolvido um método voltamétrico de análise sequencial para aplicação em matrizes de natureza complexa. Utilizando uma mistura de complexantes orgânicos, SVRS (violeta de solocromo), DMG (dimetilglioxima), 8-Hidroxiquinolina (oxina), CA (ácido cloranílico) e DTPA (ácido dietilenotriamino pentaacético) foi possível determinar 13 elementos em dois diferentes métodos. De acordo com as constantes de formação com os respectivos ligantes foi determinado no método 1, etapa 1 Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+} na presença de SVRS por AdSV (*Adsorptive Stripping Voltammetry).* Na etapa 2 determinou-se Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} por ASV. Na etapa 3, foram determinados Ni^{2+} e Co^{2+}, na presença de DMG e oxina. No método 2, U^{6+} e V^{5+} foram determinados por AdSV na presença de CA (ácido cloranílico), $Cr_{(total)}$ foi determinado na sequência na presença de DTPA por AdSV e por fim, Tl^{+} foi determinado por ASV. Os dados obtidos para as figuras de mérito mostraram que o método proposto é adequado para as amostras de matrizes complexas estudadas (materiais certificados e compostos vegetais comerciais). Concentrações altas para alguns elementos foram encontradas nas amostras comerciais. Este dado indica que as espécies translocam-se através do meio em que estão inseridos estando suscetíveis a entrar em contato com o ser humano.

Palavras-chave: voltametria de redissolução, complexantes orgânicos, elementos tóxicos, metais pesados, matrizes complexas.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation

Postgraduate Program in Chemistry

Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF VOLTAMMETRIC SEQUENTIAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF ELEMENTS IN COMPLEX MATRICES

AUTHOR: DIANA TOMAZI MURATT

ADVISOR: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Place and Date of Defense: Santa Maria, August 7, 2013.

Toxic elements are in continuous accumulation in the environment mainly due to anthropogenic activities. In this work, a voltammetric method of sequential analysis for application in matrices of complex characteristics was developed. Using an organic mixture complexing, SVRS (alizarin violet) DMG (dimethylglyoxime), 8-hydroxyquinoline (oxine), CA (chloranilic acid) and DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) 13 elements could be determined at two different methods. According to the formation constants with their respective ligands, in method 1, step were determined Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+} SVRS in the presence of AdSV (Adsorptive Stripping Voltammetry). In step 2 were determined Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} and Cu^{2+} by ASV. In step 3, were determined Ni^{2+} and Co^{2+} in the presence of DMG and oxine. In method 2, V^{5+} and U^{6+} were determined by AdSV in the presence of CA (chloranilic acid), $Cr_{(total)}$ was analyzed in sequence by the presence of DTPA by AdSV and finally Tl^{+} was determined by ASV. The data for the figures of merit showed that the proposed method is suitable for samples of complex matrices studied (certified materials and commercial plant compounds). High concentrations for some elements were found in commercial samples. It indicates that the species translocates through the environment in which they are insert, being susceptible to contact with humans.

Keywords: stripping voltammetry, complexing organic, toxic elements, heavy metals, complex matrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da absorção de elementos pela planta através do sistema radicular.22
Figura 2: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos.....25
Figura 3: Representação do processo de absorção e emissão de energia pelo átomo. 31
Figura 4: Potenciostato Metrohm utilizado para adquirir os voltamogramas. 32
Figura 5: Espectrômetros de Absorção Atômica utilizados: Forno de grafite e Geração de Hidretos respectivamente. 33
Figura 6: Representação da estrutura molecular do complexante Violeta de Solocromo. 43
Figura 7: Representação da estrutura molecular do complexante Dimetilglioxima e 8-hidroquinolina.....45
Figura 8: Efeito de Vanádio na determinação de Cobalto (Etapa 3 – Sequencial 1) (a) Varredura 1: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} , Varredura 2: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} V 10 µg.L^{-1},na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1}; (b) Ni 50 µg.L^{-1}, Co 100µg.L^{-1}, V 50 µg.L^{-1}, na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1} e oxina 0,02 mmol.L^{-1}. 46
Figura 9: Voltamogramas obtidos pelo método 1(a) Al 30µg.L^{-1}, Fe 150µg.L^{-1}, Mo 150µg.L^{-1}; na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1} (b) Zn 150 µg.L^{-1}, Cd 150 µg.L^{-1}, Pb 150µg.L^{-1}, Cu 150µg.L^{-1} na presença de tampão acetato pH 4,6 (c) Ni 150µg.L^{-1} e Co 150µg.L^{-1} na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1} e Oxina 0,02mmol.L^{-1}.....47
Figura 10: Representação da estrutura molecular do composto ácido cloranílico. 48
Figura 11: Representação da estrutura molecular do composto ácido dietileno triamino pentaacético. 49
Figura 12: Voltamogramas obtidos pelo método 2 (d) U 60 µg.L^{-1}, V 60 µg.L^{-1}; Pb 60 µg.L^{-1}, Cd 60 µg.L^{-1}, Zn 150 µg.L^{-1} na presença de CA 1.10^{-4}mol.L^{-1} (e) Cr 150 µg.L^{-1} na presença de DTPA 0,075mol.L^{-1} (f) Tl 100 µg.L^{-1} na presença de tampão amônio pH 9,5. 51
Figura 13: Voltamograma com os elementos Ni 40 µg.L^{-1} Fe 20 µg.L^{-1} na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1}. 56
Figura 14: Voltamograma com os elementos U 100 µg.L^{-1}, Al 50 µg.L^{-1}, Fe 50 µg.L^{-1} e Mo 50 µg.L^{-1}; na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1}.....57
Figura 15: Voltamogramas para os elementos Cd 60 µg.L^{-1}, Mo 50 µg.L^{-1}; na presença de CA 1.10^{-3} mol.L^{-1}. 58
Figura 16: Voltamograma para os elementos: Varredura 1: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} , Varredura 2: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} V 10 µg.L^{-1}; na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1}.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites estabelecidos para metais pesados em fertilizantes. 23
Tabela 2: Faixa de limites estabelecidos para metais pesados em diversos alimentos. 24
Tabela 3: Ligantes orgânicos mais comuns utilizados em SV. 28
Tabela 4: Programação de temperatura para determinação de Pb, Ni e Cr 34
Tabela 5: Métodos sequenciais otimizados: Eletrólitos e parâmetros. 38
Tabela 6: Mecanismos de reação para Al, Fe e Mo, na presença de SVRS e tampão acetato em pH 4,6 por AdCSV. 44
Tabela 7: Mecanismos de reação para Zn, Cd, Pb e Cu, na presença de SVRS e tampão acetato em pH 4,6 por ASV. 44
Tabela 8: Mecanismos de reação para Ni e Co, na presença de DMG/oxina em pH 8,0 por AdCSV. 46
Tabela 9: Mecanismos de reação para U, V, Cd, Pb, e Zn, na presença de CA em pH 2,3 por AdCSV. 49
Tabela 10: Mecanismos de reação para Cr, na presença de DTPA (1) e NO^{3-}(2) em pH 6,2 por AdCSV. 50
Tabela 11: Mecanismos de reação para Tl, na presença de Tampão Acetato pH4.6 – ASV. 50
Tabela 12: Constantes de formação (β) conhecidas para alguns elementos. 52
Tabela 13: Ensaio para determinação da influência do interferente Ni na análise de Fe. 56
Tabela 14: Influência dos interferentes detectados em analitos nos métodos 1 e 2. 59
Tabela 15: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Al através da Sequencial 1. 60
Tabela 16: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Al através da Sequencial 1. . 60
Tabela 17: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Fe através da Sequencial 1. 61
Tabela 18: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Fe através da Sequencial 1. . 61
Tabela 19: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Mo através da Sequencial 1. 62
Tabela 20: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Mo através da Sequencial 1. 62
Tabela 21: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Zn através da Sequencial 1. 63
Tabela 22: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Zn através da Sequencial 1. . 63
Tabela 23: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cd através da Sequencial 1. 64
Tabela 24: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cd através da Sequencial 1.. 64

Tabela 25: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Pb através da Sequencial 1.65
Tabela 26: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Pb através da Sequencial 1. . 65
Tabela 27: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cu através da Sequencial 1. 66
Tabela 28: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cu através da Sequencial 1.. 66
Tabela 29: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Ni através da Sequencial 1.67
Tabela 30: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Ni através da Sequencial 1. . 67
Tabela 31: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Co através da Sequencial 1. 68
Tabela 32: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Co através da Sequencial 1.. 68
Tabela 33: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para U através da Sequencial 2. 69
Tabela 34: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de U através da Sequencial 2.... 69
Tabela 35: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para V através da Sequencial 2. 70
Tabela 36: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de V através da Sequencial 2.... 70
Tabela 37: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cr através da Sequencial 2.71
Tabela 38: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cr através da Sequencial 2. . 71
Tabela 39: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Tl através da Sequencial 2. 72
Tabela 40: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Tl através da Sequencial 2.. 72
Tabela 41: Limites de detecção e quantificação para os elementos na análise sequencial..... 73
Tabela 42: Comparativo AAS x VA para Pb, Ni e Cr..... 74
Tabela 43: Resultados obtidos para elementos presentes em amostras de referência certificadas (SRMs). 75
Tabela 44: Elementos determinados pelos métodos 1 e 2, em amostras de origem vegetal. 76
Tabela 45: Relação Tempo x Obtenção de resultados para 13 elementos pelo método SV proposto. 78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação gráfica da curva padrão de Al obtida através da Sequencial 1.....60
Gráfico 2: Representação gráfica da curva padrão de Fe obtida através da Sequencial 1.....61
Gráfico 3: Representação gráfica da curva padrão de Mo obtida através da Sequencial 1. 62
Gráfico 4: Representação gráfica da curva padrão de Zn obtida através da Sequencial 1. 63
Gráfico 5: Representação gráfica da curva padrão de Cd obtida através da Sequencial 1.....64
Gráfico 6: Representação gráfica da curva padrão de Pb obtida através da Sequencial 1. 65
Gráfico 7: Representação gráfica da curva padrão de Cu obtida através da Sequencial 1. 66
Gráfico 8: Representação gráfica da curva padrão de Ni obtida através da Sequencial 1.....67
Gráfico 9: Representação gráfica da curva padrão de Co obtida através da Sequencial 1. 68
Gráfico 10: Representação gráfica da curva padrão de U obtida através da Sequencial 2.....69
Gráfico 11: Representação gráfica da curva padrão de V obtida através da Sequencial 2.....70
Gráfico 12: Representação gráfica da curva padrão de Cr obtida através da Sequencial 2.....71
Gráfico 13: Representação gráfica da curva padrão de Tl obtida através da Sequencial 2. 72

LISTA DE FLUXOGRAMAS E APÊNDICES

Fluxograma 1: Condições da célula Voltamétrica para execução das duas análises sequenciais. 54

Apêndice 1: Elementos determinados por AAS em fitoterápicos como contaminantes. 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*

AdSV – do inglês, *Adsorptive Stripping Voltammetry*

AES – do inglês, *Atomic Emssion Spectrometry*

ANOVA – do inglês *Analysis of Variance*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CA – Ácido cloranílico

DMG – Dimetilglioxima

DTPA – Ácido dietileno triamino pentaacético

EPA – do inglês, *Environmental Protection Agency*

HMDE – do inglês, *Hanging Mercury Drop Electrode*

ICH – do inglês, *International Conference on Harmonisation*

ICP – do inglês, *Inductively Coupled Plasma*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento

MFE – do inglês, *Mercury Film Electrode*

MME – do inglês, *Multi Mode Electrode*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

SA – Ácido sulfosalicílico

SRM – do inglês, *Standard Reference Material*

SV – do inglês, *Stripping Voltametry*

SUMÁRIO

RESUMO 7

ABSTRACT 8

LISTA DE FIGURAS 9

LISTA DE GRÁFICOS 12

LISTA DE FLUXOGRAMAS E APÊNDICES 13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 14

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVOS 19

3 REFERENCIAL TEÓRICO 20

3.1 Caracterização dos elementos estudados 20

3.2 Legislação envolvendo contaminantes em alimentos e solos 23

3.3 Métodos eletroanalíticos – Voltametria 25

3.4 Métodos voltamétricos simultâneos e sequenciais 26

3.5 Espectrometria de absorção atômica 30

4 MATERIAIS E MÉTODOS 32

4.1 Instrumentação 32

4.1.1 Voltametria de Redissolução 32

4.1.2 Absorção Atômica 33

4.2 Reagentes e Soluções 35

4.3 Caracterização das amostras 36

4.4 Tratamento das amostras 37

4.5 Sequência analítica proposta 38

4.6 Validação de metodologia analítica 39

5 RESULTADOS 42

5.1 Análise sequencial por voltametria de redissolução 42

5.1.1 Determinação de elementos empregando violeta de solocromo (SVRS), dimetilglioxima (DMG) e oxina como complexantes 42

5.1.2 Determinação de elementos empregando ácido cloranílico (CA) e ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA) 47

5.1.3 Determinação sequencial de elementos empregando misturas de ligantes 51

5.2 Validação de Metodologia da Análise Sequencial 55

5.2.1 Seletividade 55

5.2.2 Linearidade 59

5.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) 73

5.2.4 Precisão 73

5.2.5 Exatidão 74

5.3 Aplicação dos métodos sequenciais em amostras de origem vegetal 76

6 CONCLUSÃO 79

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

REFERÊNCIAS 81

APÊNDICES 86

1 INTRODUÇÃO

A cada dia cresce a preocupação com a presença de substâncias danosas à saúde humana, seja de origem orgânica ou inorgânica, em produtos presentes na cadeia alimentar. A alimentação é a principal via de entrada destas espécies que podem se bioacumular no organismo. Em se tratando de metais pesados e elementos químicos tóxicos, pode-se dizer que estão presentes naturalmente no ambiente, possuem diferentes características, podendo ser encontrados de maneira livre ou combinados. Em suas diferentes formas disponíveis, há diferenciação na sua absorção ou toxicidade aos organismos vivos. Alguns desses elementos são considerados essenciais para a sobrevivência humana devido a participação em processos químico-biológicos, sendo que outros, por sua vez, são tóxicos até mesmo em baixas concentrações (NAVA, et al., 2011).

Tais substâncias estão em contínuo acúmulo no ambiente devido também a atividades antropogênicas (LOCATELLI, 2007) e desta forma, são diversas as matrizes que podem apresentar a presença destas espécies. Podem-se citar desde pesticidas a fertilizantes agrícolas, formulações farmacêuticas, bem como plantas, alimentos, águas, solos e organismos vivos (ABOU-ARAB, et al., 1999).

Os vegetais são capazes de absorver numerosos componentes do solo, além dos necessários para seu desenvolvimento, principalmente através das raízes. Podem-se citar como principais exemplos o Arsênio (As), o Cádmio (Cd), o Cromo (Cr), o Mercúrio (Hg), o Chumbo (Pb) e o Urânio (U). É importante ressaltar ainda, que micronutrientes podem vir a se tornar tóxicos quando absorvidos acima de certos limites (PERALTA-VIDEA et al., 2009).

Dentre as formas mais comuns de estudar e quantificar estes analitos em diferentes matrizes estão as técnicas de absorção atômica (AAS – *Atomic Absorption Spectrometry*) e emissão atômica (AES – *Atomic Emission Spectrometry*). A AAS é consolidada através de vários estudos já realizados, como uma ferramenta bastante sensível e aplicável a diversas áreas. Entretanto, esta técnica é monoelementar, tornando a obtenção de resultados por vezes demorada e trabalhosa. Para ICPs (ICP – *Inductively Coupled Plasma*) que utilizam o princípio da emissão atômica, onde apesar de serem multielementares e atomizarem praticamente todos os elementos da tabela periódica, proporcionam altos custos de obtenção e manutenção.

Neste contexto, é interessante o desenvolvimento de métodos utilizando técnicas alternativas que sejam comparáveis em termos de qualidade, sensibilidade e exatidão, porém, menos dispendiosas, em um tempo semelhante de análise. Uma alternativa que vem ganhando espaço, dentre os métodos eletroanalíticos, apresenta-se a voltametria de redissolução que utiliza ligantes orgânicos (SV – *Stripping Voltammetric*) para viabilizar determinações simultâneas e sequencias de vários elementos. Esta técnica vem mostrando-se bastante vantajosa, por apresentar dados comparáveis com as técnicas já consagradas e além disso, proporcionar análises rápidas e de baixo custo.

2 OBJETIVOS

Geral

- Desenvolver um novo método para determinação simultânea e sequencial de vários elementos em diferentes matrizes de natureza complexa, através da voltametria de redissolução com eletrodo de mercúrio.

Específicos

- Investigar figuras de mérito para assegurar a confiabilidade do método (especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão);
- Aplicar o método em amostras reais de suplementos alimentares.
- Realizar análises comparativa pela técnica de absorção atômica com diferentes sistemas de atomização.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Caracterização dos elementos estudados

Poucos são os elementos que participam de processos químico-biológicos e fisiológicos, essenciais para a manutenção da vida humana. Estas espécies precisam ser adquiridas através da alimentação, algumas em grandes quantidades ao dia para formar os principais eletrólitos, manter a homeostase e as estruturas corporais. Por outro lado, alguns elementos precisam ser adquiridos, mas ao contrário, não é necessário ingerir grandes quantidades. Estes são elementos que participam de inúmeros processos bioquímicos vitais para uma boa saúde (SILVA, et al., 2005).

Entretanto, quando há uma extrapolação da quantidade ideal a ser consumida, seja até mesmo das espécies essenciais, estas podem vir a apresentar toxicidade, potencializando ou anulando reações metabólicas ou anabólicas. Para as plantas, isso também ocorre de maneira similar. Zn por exemplo, é um metal essencial no metabolismo de proteínas, carboidratos e auxinas (hormônios). O zinco é adicionado ao solo através de fertilizantes para melhorar a produtividade, mas ao passo que carregam os elementos de interesse, também possuem em sua composição outros compostos contaminantes (NAVA, et al., 2011).

Sendo assim, estando presentes no solo estas espécies, normalmente metais tóxicos, estão disponíveis para serem absorvidas pelas plantas e desta forma, entrarem na cadeia alimentar. A atividade siderúrgica em crescimento no Brasil proporciona a formação de “escória” (subproduto de mineração), que é um problema devido a falta de um destino adequado, justamente devido a sua composição possuir altas concentrações de metais desconhecidos. Em alguns casos é possível fazer a reutilização desta mistura no melhoramento nutricional de lavouras agrícolas como fontes principalmente de Ca, Mg e Si e também como corretivo de acidez (SOBRAL, et al., 2011).

A contaminação do ecossistema, principalmente do solo, com metais pesados é considerada uma questão ambiental global. Estes metais podem provir tanto de fontes naturais, seja intemperismo ou erosão de rochas e minérios, bem como de fontes antropogênicas, tais como mineração, fundição, recursos energéticos, galvanoplastia,

produção de combustível, transmissão de energia, agricultura intensiva e irrigação com uso de águas residuais (MUHAMMAD, TAHIR SHAH, KHAN, 2011).

Por outro lado, a adubação do solo através de fertilizantes, aumenta a eficiência e qualidade na recuperação do produto de atividades agrícolas. Estas formulações inorgânicas contêm principalmente sais de fosfato, nitrato e potássio. A indústria deste gênero é considerada como fonte potencial de metais pesados, tendo-se como exemplos mais comuns o Hg, Cd, As, Pb, Cu e Ni e também os radionuclídeos naturais como U^{238}, Th^{232} e Po^{210} (SAVCI, 2012; SUSSA, et al., 2009). Devido ao fato de que estes fertilizantes não são suficientemente purificados durante o processo de fabricação e por razões econômicas, eles carregam, dentre outros, estes elementos como contaminantes.

Além dos fertilizantes, metais pesados frequentemente também fazem parte dos compostos ativos de pesticidas. A soma destes dois fatores tem como consequência o aumento da concentração destes contaminantes no solo e consequentemente na planta. Devido a intensidade com que são aplicados no atividade agrícola (GIMENO-GARCÍA, ANDREU, BOLUDA; 1996), são capazes de entrar na cadeia alimentar através da absorção pelas raízes dos vegetais (SAVCI, 2012).

Especificamente sobre plantas, sabe-se que desde os primórdios da humanidade, vegetais têm sido usadas para fins medicinais e alimentícios em razão os benefícios observados (SUSSA, el al., 2009). Estas plantas e seus preparados são amplamente utilizados por seres humanos em todo o mundo (ARPADJAN et al., 2008). Entretanto, a segurança da sua utilização vem sendo constantemente questionada, devido a relatos do desenvolvimento de doenças e até caso morte associados ao seu uso (CALDAS, MACHADO, 2004). Neste contexto, estudos mostram que altos níveis de metais tóxicos podem ocorrer em preparados medicinais quando eles são usados como ingredientes ativos, ou mesmo quando essas plantas originam-se de áreas onde há incidência de poluição ambiental (CALDAS, MACHADO, 2004).

Os mecanismos de “transferência” da espécie para a planta dependem do elemento e das condições do meio em que estão inseridos (tanto químico quanto físicos) (REDLING, 2006). A Figura 1 mostra simplificadamente, como os elementos estão presentes no solo, estando disponíveis para serem absorvidos.

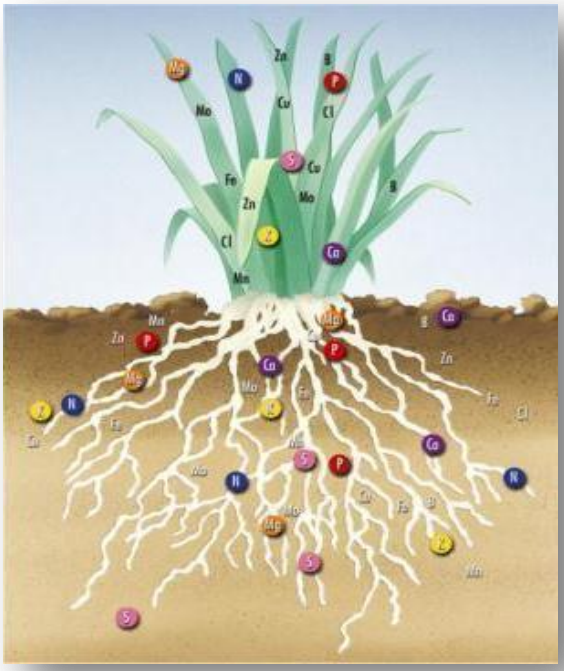


Figura 1: Representação da absorção de elementos pela planta através do sistema radicular.

Pelo fato de plantas medicinais, fitoterápicos, suplementos alimentares, extratos e produtos manipulados serem originados basicamente de plantas, ou seja, material vegetal bruto, tem-se buscado a obtenção de maior quantidade de informações sobre sua composição. Através de diferentes técnicas analíticas, no intuito de alertar sobre o seu consumo, em razão aos com possíveis elementos como contaminantes, bem como adulterantes orgânicos presentes em sua formulação. O conhecimento da sua concentração pode ser útil para verificar possíveis interferências na atividade terapêutica e, em função da sua concentração, também podem representar uma ameaça para a saúde humana (SUSSA, et al., 2009).

Todos esses produtos de origem vegetal possuem matrizes de grande interesse analítico, pois são comercializados livremente em larga escala. Por serem naturais, muitas vezes são considerados isentos de contra indicações, tornando o seu consumo desenfreado. Como não são comprovados cientificamente os efeitos benéficos ou mesmo colaterais de muitos destes compostos, principalmente a longo prazo, o uso contínuo ou desorientado pode ser prejudicial ao ser humano.

3.2 Legislação envolvendo contaminantes em alimentos e solos

Nem todas as matrizes estudadas neste trabalho estão abrangidas na legislação, em se tratando de limites aceitos de metais pesados, ou elementos tóxicos. Compete ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) a regulamentação dos limites aceitos destas espécies em matrizes como fertilizantes e solos. Essa legislação engloba limites mínimos, no caso de macronutrientes, e limites máximos no caso de elementos traços como contaminantes.

Além disso, o MAPA também dispõe sobre condições de armazenamento e embalagens de vários produtos. Neste contexto, a instrução normativa nº 14, de 15 de dezembro de 2004 trata das definições e normas em relação as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos substratos para plantas, havendo referência de não tolerância por contaminação por metais pesados tóxicos.

Para compostos utilizados na melhoria das condições minerais do solo, há limites estabelecidos pela instrução normativa nº 27 de 25 de junho de 2006, que podem ser visualizados na Tabela 1. Não apenas fertilizantes são regulamentados, mas também compostos utilizados para correção de pH (muito ácidos ou muito básicos), para substratos para plantas e para condicionadores de solo. Outro tipo, menos comum, de fertilizante, mas que também é aplicado a esta regulamentação, é o fertilizante orgânico, que também pode apresentar contaminação por estes metais.

Tabela 1: Limites estabelecidos para metais pesados em fertilizantes.

Metal (mg.kg^{-1})	*Fertilizantes com N, P, macronutrientes secundários com até 5% de P_2O_5*	*Corretivos de Acidez e Alcalinidade*	*Substratos para Plantas e Condicionadores de Solo*	*Fertilizantes Orgânicos*
As	10	-	20	20
Cd	20	20	8,0	3,0
Pb	100	1000	300	150
Cr	200	-	500	200
Hg	0,2	-	2,5	1,0
Ni	-	-	175	70
Se	-	-	80	80

Observa-se que para elementos como o Urânio, não há limites estabelecidos. Também sabe-se que essa contaminação existe naturalmente, principalmente nos fertilizantes fosfatados.

Na área de alimentos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), possui normas que regulamentas a presença dos principais elementos considerados tóxicos ao ser humano. São citados limites toleráveis em diversos tipos de matrizes, de açúcares, derivados do leite, bebidas, cereais entre outros. A Tabela 2 mostra as faixas em que são tolerados os principais elementos em alimentos, de acordo com a Portaria N º 685, de 27 de agosto de 1998 e com o Decreto Nº 55.871, de 26 de março de 1965.

Para formulações fitoterápicas, não há limites estabelecidos para estas espécies químicas. Apenas, há referência, quando do processo de registro destes compostos vegetais, de que deve ser executado um estudo envolvendo metais pesados tóxicos, mas não são definidos limites toleráveis.

Neste âmbito, tem-se mais um indício da necessidade de estudos com estes produtos de matriz complexa, pois não existindo legislação limitante, é difícil realizar um controle que garanta a qualidade do produto e o uso seguro dos mesmos.

Tabela 2: Faixa de limites estabelecidos para metais pesados em diversos alimentos.

Metal	***Faixa ($mg.kg^{-1}$)***
As	0,1 – 1,0
Cu	0,1 – 30
Sn	150 – 250
Pb	0,05 – 2,0
Cd	0,2 – 1,0
Hg	0,01 – 1,0
Sb	0,2 – 2,0
Cr	0,1
Ni	0,1 – 5,0
Se	0,05 – 5,0
Zn	5,0 – 50

3.3 Métodos eletroanalíticos – Voltametria

Dentre os métodos eletroanalíticos, a voltametria é bastante utilizada na determinação de espécies elementares inorgânicas e compostos orgânicos com boa precisão e rapidez em análise de traços. Consiste em uma técnica eletroquímica desenvolvida por Heyrovsky e Kuceras em 1922, que utilizaram um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e como eletrodo de referência um eletrodo de calomelano saturado. Assim, a primeira técnica voltamétrica desenvolvida foi a polarografia. Resumidamente, a voltametria é um conjunto de técnicas onde, durante um processo eletroquímico, se observa uma relação entre corrente (*i*) que é medida e potencial (*E*) que é aplicado (HARRIS, 2012).

Dentre as técnicas voltamétricas atualmente mais utilizadas, os métodos voltamétricos de redissolução são preferíveis devido a maior sensibilidade apresentada em relação aos demais. Através de uma etapa de pré-concentração antes da medida propriamente dita, onde aplica-se um potencial favorável à redução das espécies no eletrodo, que ficam concentradas no mesmo, os limites de detecção podem chegar a valores inferiores a 10^{-7} – 10^{-8} mol.L^{-1} (HENZE, 2001). De forma geral, os métodos voltamétricos apresentam como vantagens principais, a redução no tempo de análise e do volume de amostra utilizado, sendo ainda uma técnica não destrutiva.

A determinação é feita em uma célula padrão com três eletrodos, conforme a figura a seguir:

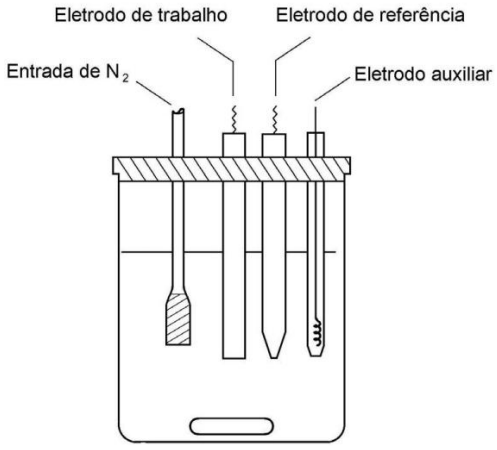


Figura 2: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos.

Os potenciais de pré-concentraçao e de varredura são aplicados entre o eletrodo de trabalho, de pequena área e portanto, polarizável, e o eletrodo auxiliar, para não haver perturbação do eletrodo de referência, podendo este ser um eletrodo de calomelano ou Ag/AgCl.

3.4 Métodos voltamétricos simultâneos e sequenciais

De forma geral, os métodos voltamétricos apresentam como vantagens principais, a redução no tempo de análise e do volume de amostra utilizado, bem como a capacidade de monitorar simultaneamente vários elementos (COLOMBO, VAN DEN BERG, 1997). A técnica voltamétrica pode certamente ser uma boa alternativa a espectroscopia atômica, pois não necessita de um equipamento muito dispendioso e, em particular, permite determinações de componentes múltiplos em uma única vez (LOCATELLI, 2007). Por esta razão, porém, pode acontecer de alguns elementos possuírem interferência mútua no sinal eletroquímico (MELUCCI, LOCATELLI, 2007).

Os métodos simultâneos são preferíveis, pois viabilizam o estudo de vários elementos em apenas uma célula de medida. Porém, para determinação direta, por voltametria é necessário que os elementos sejam solúveis no eletrodo de Hg (formação de ligas metálicas). Para os elementos que não são solúveis, uma boa alternativa é a utilização de complexantes, que formam compostos metal-ligante, capazes de serem adsorvidos na superfície do eletrodo. Este tipo de determinação é chamada de Voltametria Adsortiva de Redissolução (catódica ou anódica), AdSV, (do inglês, *Adsorptive Stripping Voltammetry*), onde a deposição do analito ocorre pela sua adsorção física na superfície do eletrodo, e não pela deposição eletrolítica (SKOOG et al., 2005).

A aplicação desta técnica é das mais variadas, porém, ainda é pouco estudada. Existem alguns trabalhos reportados na literatura que utilizam esta técnica. Em 1997, Colombo e Van Den Berg, descreveram um método para determinação simultânea de vários elementos traço em água do mar, através da voltametria de redissolução catódica, com uma mistura de ligantes. Os elementos Cu, Cd, Ni, Pb, Co e Zn foram determinados na presença dos ligantes oxina e dimetiglioxima. Em outra medida sequencial, também foi possível determinar Cu, Cd, Zn e Pb utilizando apenas o ligante oxina. Ainda, Cu, Ni e Co foram determinados simultaneamente com o ligante nioxima e ácido sulfosalicílico (SA), sendo que são utilizados

diferentes condições voltamétricas e diferentes eletrólitos de suporte em cada método, bem como, pHs adequados.

No ano de 2000, Ghoneim descreveu uma sequência analítica onde conseguiu determinar Cd, Pb, Cu, Sb, Bi, Se, Zn, Mn, Ni, Co e Fe em amostras de água, usando DMG e 5-Br-PADAP como complexantes.

Já em 2003, Locatelli mostrou a possibilidade de determinação de metais pesados em matrizes de interesse alimentar, utilizando voltametria sequencial. O trabalho demonstrou que a determinação de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada, seguida da determinação de As(III) e Se(IV) por voltametria de redissolução catódica de onda quadrada, seguida ainda da determinação de Mn(II) e Fe(III) por voltametria de onda quadrada na presença de cloreto cúprico e dicloreto de hidrazina.

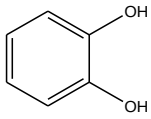
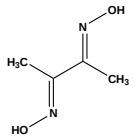
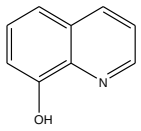
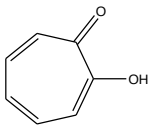
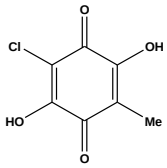
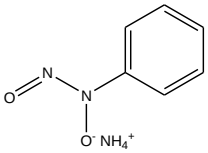
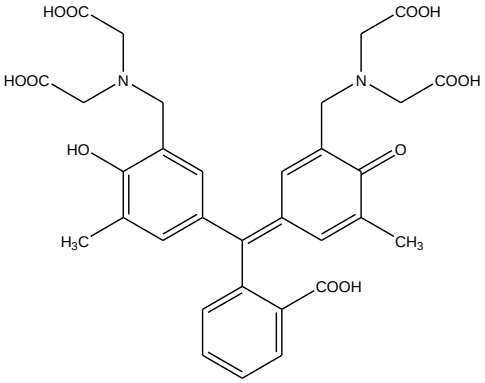
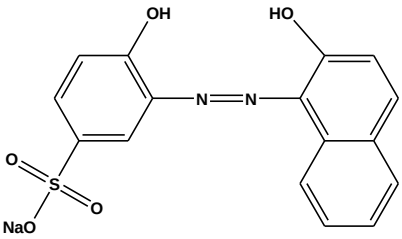
Em 2005, Locatelli e colaboradores, publicaram um trabalho determinando Pt(II), Pd(II), Rh(III) e Pb(II) em amostras de vegetais, utilizando métodos sequenciais na presença de DMG, hidrazina e formaldeído. Em 2007, Melucci e Locatelli, descreveram um método sequencial para determinação de Zn(II), Cr(VI), Cu(II), Sb(III), Sn(II), Pb(II), Fe(III), Mn(II) e Mo(VI) em matrizes de interesse alimentar, utilizando como complexante citrato de amônio dibásico.

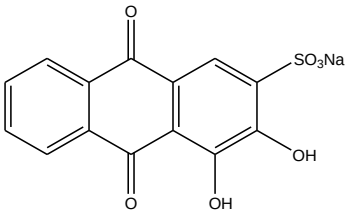
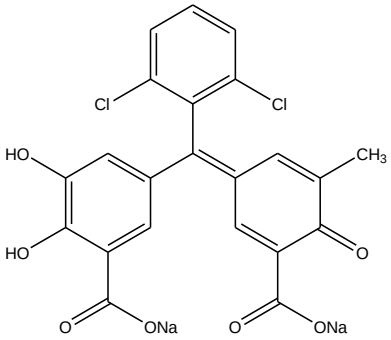
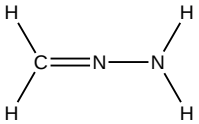
Ainda em 2007, Carvalho e colaboradores descreveram um método para determinação comparativa simultânea de Cd, Pb, Tl e Cu em amostras altamente salinas (água do mar, fluidos hidrotermais, e concentrados de diálise) por ASV usando como eletrodos de trabalho, um filme de mercúrio (MFE – do inglês, *Mercury film electrode*) e um filme de bismuto (BiFE – do inglês, *Bismuth film electrode*) tendo como comparativo, um eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE – do inglês, *hanging* mercury *drop electrode*), mostrando que além dos ligantes, os eletrodos também podem ser "adaptados", ampliando assim, a aplicabilidade da técnica.

Neste mesmo ano, Locatelli ainda publicaria um estudo onde determinou Cu(II), Cr(VI), Tl(I), Pb(II), Sn(II), Sb(III) e Zn(II) em citrato de amônio dibásico. Esses estudos envolvendo mistura de ligantes não são muito comuns como se pode perceber, onde alguns ficam em débito quando trata-se de estudos de interferências mútuas.

A Tabela 3 traz as substâncias orgânicas mais comuns utilizadas em voltametria sequencial, suas estruturas e os elementos determinados.

Tabela 3: Ligantes orgânicos mais comuns utilizados em SV.

Complexante	*Estrutura*	*Elementos*	*Referência*
Catechol		U, Cu, Fe, V, Ge, Sb, Sn, As	Henze (2001)
Dimetilglioxima		Co, Ni,Pd	Henze (2001)
Oxina		Mo, Cu, Cd, Pb, Ni, Zn	Colombo e Van Den Berg (1997)
Tropolon		Mo, Sn	Henze (2001)
Ácido Cloranílico		U, Mo, Sn, V, Sb	Sander (1999)
Cupferrom		U, Mo, Tl	Henze (2001)
o-kresolophthalexon OCP		Ce, La, Pr	Henze (2001)
Violeta de Solocromo		Al, Fe	Locatelli (2003)

Alizarinrot S, DASA		Al	Henze (2001)
Cromazurol B		Th, U	Henze (2001)
Formazon		Pt	Henze (2001)

Assim como nos demais tipos de voltametria, a do tipo adsortiva, também realiza uma etapa de pré-concentração. Neste caso, é a substância eletroativa que é depositada na superfície do eletrodo, sendo que no caso de metais, isto é feito através de seus íons complexos. Desta forma, a determinação não depende da solubilidade do elemento no eletrodo de mercúrio e sim, da formação do complexo em condições adequadas. Assim, adicionando-se uma solução do complexante à célula eletroquímica na presença do íon, o complexo formado é quem irá depositar-se na superfície do eletrodo. Além disso, essa característica possibilita a aplicação desta técnica a uma infinidade de substâncias orgânicas.

Utilizando a técnica voltamétrica adequada, geralmente no sentido catódico, o mecanismo de determinação consiste basicamente, depois de adsorvido o complexo, na redução do analito a partir do ponto onde o potencial atingir o valor do potencial de decomposição do complexo, característico para cada espécie.

A reação eletródica pode ser representada por M – metal, L – ligante, a seguir:

$$\mathbf{ML_n^{n+}{}_{(ads)} + n\,\bar{e} \leftrightarrow M^0 + nL}$$

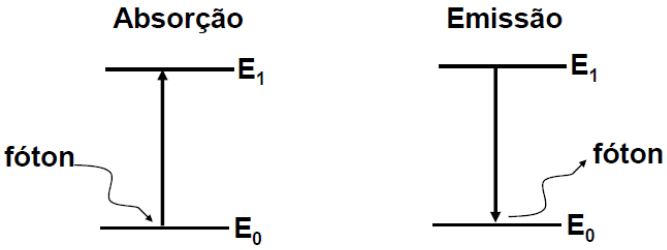
3.5 Espectrometria de absorção atômica

Os primeiros estudos referentes a interação de luz com matéria, datam de 1802 momento em que Wollaston e Fraunhofer observaram a existência de linhas escuras no espectro da luz solar, indicando a absorção de parte da energia, por alguma espécie presente no caminho. Já em 1860, Kirchhoff estabeleceu a seguinte lei: "Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles são capazes de emitir", sendo considerado ate hoje, o principio fundamental da absorção atômica (KRUG, NÓBREGA, OLIVEIRA, 2004).

Desde então, diversos foram os avanços realizados nesta área, principalmente devido a sua importante aplicabilidade na determinação elementar em uma ampla faixa de concentração, dependendo da matriz estudada. O princípio de absorção e emissão estão intrinsicamente ligados e ditam a forma química pela qual são determinados e quantificados os analitos em uma determinada amostra.

Cada elemento é capaz de absorver quantidades características de energia, fazendo com que este passe de um estado menos energético para um estado de maior energia, ou seja excitado. Em 1900, Plank estabeleceu uma lei quântica para este processo, no qual um átomo pode absorver somente radiação em um comprimento de onda especifico. Por esta razão, fontes constituídas do mesmo elemento de interesse, são usadas para excitar átomos que estão presentes no atomizador, pois tal fonte fornece o exato comprimento de onda necessário para proporcionar este estado energético. Estas fontes são chamadas de lâmpadas de cátodo oco ou LCO.

O princípio de determinação pode ser observado na Figura 3, onde um átomo presente em um estado de menor energia (fundamental) absorve energia proveniente de um fóton, passando para um estado de maior energia (excitado), onde logo em seguida esta mesma energia é emitida e o átomo volta para o mesmo estado energético.



$$h\nu = E_1 - E_0$$

Figura 3: Representação do processo de absorção e emissão de energia pelo átomo.

Em termos de quantificação, quanto maior a quantidade de átomos presentes no estado fundamental no atomizador, que pode ser uma chama, um forno de grafite ou um sistema de geração de hidretos voláteis, maior será a absorção observada, de acordo com a Lei de Lambert-Beer, onde:

$$A = \alpha \cdot l \cdot C$$

A é a absorbância,

α é a absortividade molar,

C é a concentração.

Nestes termos, a absorbância é diretamente proporcional ao vapor atômico no atomizador, que é proporcional a concentração original do elemento na amostra.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

4.1.1 Voltametria de Redissolução

A obtenção dos voltamogramas foi realizada em uma célula padrão com três eletrodos. O potenciostato e os eletrodos foram adquiridos da Metrohm, e possuem as seguintes especificações:

- Potenciostato 693 VA Processor e 746 VA Processor;
- Stand 694 VA Stand;
- Eletrodo de Mercúrio (MME), operando no modo HDME;
- Eletrodo de referência – Ag/AgCl com KCl 3 $mol.L^{-1}$;
- Contra eletrodo – Platina.

Figura 4: Potenciostato Metrohm utilizado para adquirir os voltamogramas.

4.1.2 Absorção Atômica

Dois tipos de atomizadores foram utilizados para determinar alguns dos elementos do método, de uma forma comparativa, nas amostras trabalhadas. Um sistema de geração de hidretos foi utilizado para determinar Arsênio (a quente) e Mercúrio (a frio), através de equipamento da Varian, modelo SpectrAA 200, utilizando acessório VGA 77 (do inglês, *Vapor Generation Acessory*) como sistema gerador de hidretos. Para determinação dos elementos, Chumbo, Cromo e Níquel, foi utilizado equipamento da Analytik jena, modelo ZEEnit 600, com auto-amostrador MPE 60.

Figura 5: Espectrômetros de Absorção Atômica utilizados: Forno de grafite e Geração de Hidretos respectivamente.

Os métodos utilizados em AAS estão descritos a seguir, pois já estavam previamente otimizados por trabalhos no grupo de pesquisa. Ambos os métodos utilizam gás argônio ultrapuro como gás inerte, volume de amostra de 20 μL e correção de fundo por efeito Zeeman. Para os três elementos a curva analítica foi preparada com os mesmos pontos de concentração, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu g.L^{-1}$ a partir da diluição de padrões aquosos.

Condições do equipamento específicas para cada elemento:

- Lâmpada de cátodo oco de chumbo: λ 283,3 nm, corrente 4 a 10 mA, fenda 0,8 nm.
- Lâmpada de cátodo oco de níquel: λ 232,0 nm, corrente 5 a 10 mA, fenda 0,2 nm.
- Lâmpadas de cátodo oco de cromo: λ 357,9 nm, corrente 4 a 15 mA, fenda 0,2 nm,

Tabela 4: Programação de temperatura para determinação de Pb, Ni e Cr

Chumbo	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tempo (s)
Secagem	90	5	34,0
Secagem	105	3	25,0
Secagem	110	2	12,5
Pirólise	800	250	13,2
Pirólise	800	0	4,0
Atomização	1400	1500	4,4
Limpeza	2300	500	5,6
Níquel	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tempo (s)
Secagem	90	5	34,0
Secagem	105	3	25,0
Secagem	110	2	12,5
Pirólise	1100	250	14,0
Pirólise	1100	0	6,0
Atomização	2350	1300	6,0
Limpeza	2400	500	4,1
Cromo	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tempo (s)
Secagem	90	5	34,0
Secagem	105	3	25,0
Secagem	110	2	12,5
Pirólise	950	250	13,4
Pirólise	950	0	6,0
Atomização	2450	Full Power	5,0
Limpeza	2550	500	4,2

4.2 Reagentes e Soluções

A água utilizada para os experimentos passou por processos de destilação, deionização e purificação através de um sistema MilliQ, resistividade 18,2 $\mu\Omega$ cm^{-1} (Millipore, Bedford, MA, USA).

Os gases utilizados (nitrogênio e argônio) foram ambos de grau supra puro, para ambas as técnicas.

A massa dos reagentes sólidos foi obtida em balanças analíticas Sartorius (Goettingen, Alemanha), com 0,1 mg de precisão. A determinação do pH foi executada com pHmetro da Metrhom (827) com um eletrodo de vidro combinado. As soluções de calibração utilizadas, consistem em padrões de pH 4,0 e 7,0 da Digimed.

As soluções estoque e de trabalho dos elementos foram obtidas pela diluição dos padrões certificados SpecSol, rastreáveis ao NIST (*National Institute, Standards and Technology*, USA).

Todos os reagentes sólidos, bem como os complexantes utilizados foram de grau analítico e preparados de acordo com sua estabilidade. O ácido cloranílico (CA) precisa ser preparado semanalmente, devido a sua instabilidade. A concentração da solução de trabalho deste complexante é 1.10^{-2} mol L^{-1} em água purificada. O violeta de solocromo (SVRS) também é preparado em água purificada, pela dissolução do pó em quantidade suficiente para obtenção de 2 mmol L^{-1}.

O ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) é preparado em água purificada pela pesagem de pó suficiente para obtenção de 0,05 mol L^{-1}, juntamente com $NaNO_3$ (2,5 mmol L^{-1}) e CH_3COONa (0,2 mmol L^{-1}). A dimetilglioxima é preparada frequentemente (devido a sua cristalização) em etanol na concentração de 0,1 mol L^{-1}. A oxina é preparada pela dissolução do pó em água purificada até obtenção da concentração de 0,01 mol L^{-1} sendo esta a solução de trabalho.

Para fins de tamponamento, dois tampões também são preparados. O tampão acetato de amônio é obtido pela dissolução de 18,5 mL de hidróxido de amônio e 27,75 mL de ácido acético em balão volumétrico de 250 mL (pH 4.6). O tampão cloreto de amônio/amônia é

preparado através da mistura de 20 mL de NH_4OH e 13,38 g de NH_4Cl em balão volumétrico de 500 mL (pH 9.5).

Para ajustes de pH necessários, soluções a 10% v/v e m/v de ácido nítrico e hidróxido de sódio, respectivamente, foram preparadas.

4.3 Caracterização das amostras

Neste trabalho foram utilizadas diversas amostras, de matrizes bastante diferentes e complexas.

Quatro amostras certificadas obtidas a partir do NIST foram utilizadas.

1 – SRM 1570a (folhas de espinafre) contendo os analitos de interesse Cd, Co, Cu, Ni, V e Zn;

2 – SRM 695 (fertilizante) contendo os analitos de interesse Fe, Zn, Cd, Mo, Cr, Ni, Co, Pb, Cu e V;

3 – SRM 8415 (ovo em pó) contendo os analitos de interesse Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mo, V e Zn;

4 – SRM 2384 (chocolate) contendo os analitos de interesse Fe, Cu e Zn.

Para análise de amostras "reais", o conteúdo de cápsulas de diferentes compostos vegetais foi utilizado. A descrição pode ser observada a seguir (Código RS: amostras obtidas no Rio Grande do Sul; Código BR: amostras obtidas em vários estados do Brasil).

RS 16 – Cápsulas do complexo emagrecedor (Magridiet), contendo Cáscara Sagrada, Alcachofra, Carqueja, Fucus, Cadinha, Sene, Spirulina, Maracujá.

RS 41 – Cápsulas de Naturviva, contendo fibras de Chitosan, Spirulina, ácido cítrico, gelatina e óxido de titânio.

RS 98 – Cápsulas do complexo emagrecedor (Magri), contendo Chitosan 400 mg e vitamina C.

BR 49 – Cápsulas do composto de Cáscara Sagrada 500 mg.

BR 80 – Cápsulas do composto emagrecedor contendo Spirulina, Glucomanham, Colágeno, Gelatina.

BR 83 – Cápsulas do composto emagrecedor (Plus La Santé), contendo *Caralluma fimbriata* 500 mg.

4.4 Tratamento das amostras

Todas as amostras foram submetidas à decomposição ácida da matéria orgânica, tendo-se como base o método da EPA 3050B (do inglês, *United States Environmental Protetion Agency*), onde se utiliza HNO_3 concentrado associado com H_2O_2 (30% v/v) sob aquecimento.

Para as amostras de compostos vegetais (especificadas no item anterior), 10 cápsulas do mesmo foram pesadas para obter-se o peso médio e misturadas. Aproximadamente 0,5 g de amostra na forma de um pó fino, foram utilizadas para o processo de decomposição da matéria orgânica.

Para os SRMs, quantidade suficiente do pó foi pesado (1 a 2 g dependendo da amostra) tendo em vista as diluições das etapas da mineralização e determinação na célula.

Para todos os tipos de amostras, o volume de 10 mL de ácido nítrico foi adicionado à amostra em tubos de ensaio deixando-se a mistura em repouso por aproximadamente 12 horas. Após este tempo, o sistema foi gradualmente aquecido. A mistura de matéria orgânica (basicamente carbono e oxigênio) juntamente com $HNO_{3(conc.)}$ resulta em uma reação que libera vapores nitrosos (NO_x). Ao passo que a emissão destes vapores é reduzida, é adicionado ao tubo sob aquecimento, até 3 mL de peróxido de hidrogênio, para aumentar o poder oxidativo do meio, auxiliar a eliminação deste gás da solução, evitando assim, interferências.

Após este processo, as amostras “reais” foram aferidas a 50 mL para serem submetidas ao método voltamétrico e espectrométrico. As amostras certificadas foram aferidas no volume de 10 mL.

4.5 Sequência analítica proposta

As condições otimizadas em meio aquoso para determinação de 13 elementos em duas sequencias analíticas, estão resumidas na Tabela 5 que pode ser visualizada a seguir.

Tabela 5: Métodos sequenciais otimizados: Eletrólitos e parâmetros.

Método	**I**		**II**	
Elementos	**Eletrólito de Suporte**	**Parâmetros SV**	**Eletrólito de Suporte**	**Parâmetros SV**
Al *Fe* *Mo*	SVRS 2 mmol.L^{-1} Tampão Acetato de Amônio pH 4,6	E_{pc} 60 s (-600 mV) U início -100 mV U final -900 mV Varredura 20 mV/s	____	____
Zn *Cu* *Cd* *Pb*	SVRS 2 mmol.L^{-1} Tampão Acetato de Amônio pH 4,6	E_{pc} 60 s (-1150 mV) U início -1150 mV U final 150 mV Varredura 60 mV/s	____	____
Ni *Co*	DMG 0,5 mmol.L^{-1} Oxina 0,02 mmol.L^{-1} Tampão Cloreto de Amônio pH 9,5 pH 8,0	E_{pc} 60 s (-500 mV) U início -600 mV U final -1300 mV Varredura 20 mV/s	____	____
U *V*	____	____	CA 1.10^{-4} mol.L^{-1} KNO_3 0,1 mol.L^{-1} pH ajustado para 2,3	E_{pc} 30 s (-25 mV) U início -10 mV U final -500 mV Varredura 20 mV/s
Cr	____	____	DTPA 0,075 mol.L^{-1} pH ajustado para 6,2	E_{pc} 10 s (-900 mV) U início -1000 mV U final -1500 mV Varredura 20 mV/s
Tl	____	____	DTPA 0,075 mol.L^{-1} Tampão Acetato de Amônio pH 4,6	E_{pc} 180 s (-800 mV) U início -800 mV U final -200 mV Varredura 20 mV/s

*Devido a cinética lenta de formação do complexo Al-SVRS, a solução de medida é aquecida a 40ºC por 10 minutos.

**E_{pc}: potencial de pré-concentração.

***U início/Final: Faixa de varredura.

4.6 Validação de metodologia analítica

A química analítica é uma ferramenta essencial em diversas áreas da ciência. O conhecimento da composição de produtos comercializáveis é fundamental para que o mesmo seja aprovado, ou não, para consumo humano. Neste sentido, alguns parâmetros são essenciais para assegurar a confiabilidade de um método desenvolvido, ou mesmo, para revalidação de um já existente. Atualmente existe uma crescente demanda em se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI, et al. 2004).

O processo conhecido como validação é a garantia de que o método ou metodologia gera dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados e com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

Para o método proposto neste trabalho, alguns parâmetros são avaliados para justamente, garantir a qualidade dos resultados obtidos. Existem vários órgãos que especificam sobre os itens necessários a serem estudados em processos de validação de um método. Pode-se citar a ANVISA, o ICH (do inglês, *International Conference on Harmonisation*) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). A seguir, segundo o INMETRO, estão alguns dos parâmetros necessários para validação:

- *Seletividade*: consiste na habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes presentes na matriz da amostra, que podem acentuar ou inibir a detecção ou quantificação do analito de interesse. Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, sugere-se a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais.

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

- *Linearidade*: A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha

impacto indesejável na resposta. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. Através do método dos mínimos quadrados (regressão linear) é possível fazer a verificação deste item. Uma alternativa para avaliar a linearidade seria a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão. Neste trabalho, a análise estatística foi realizado através desta ferramenta, utilizando um n=3 em 6 pontos de concentração para cada elemento.

- *Faixa Linear*: todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

- *Limite de detecção* (LD): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada pelo método em questão, mas não necessariamente quantificada. Pode ser expresso como:

LD = 3 x S / b

onde S, é o desvio padrão absoluto (estimado pelo desvio padrão do intercepto), e b é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

- *Limite de quantificação* (LQ): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida pelo método em questão. Pode ser expresso como:

LQ = 10 x S / b

onde S é o desvio padrão absoluto (estimado pelo desvio padrão do intercepto) e b é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

- *Precisão*: pode ser avaliada através de formas diferentes. Neste trabalho, parâmetros relacionados a repetitividade (intra-dia, mesmo observador, mesmo procedimento de medição, mesmo instrumento sob mesmas condições e mesmo local em menor tempo possível) e precisão intermediária (duas técnicas diferentes – SV e AAS) foram avaliadas. Podem usualmente ser expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$\textbf{C.V.} = \text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

onde DP é o desvio padrão, CMD é a concentração media determinada e o DPR é o desvio padrão relativo.

- *Exatidão*: a exatidão é avaliada numericamente a através da *tendência*. Sempre que possível, os materiais de referência certificados (SRMs) devem ser utilizados no processo de validação de um método. Um SRM possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro, e uma incerteza associada. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise sequencial por voltametria de redissolução

Os métodos analíticos, de uma forma geral, são desenvolvidos com o objetivo de detectar e quantificar a menor quantidade possível do analito em questão, com alta especificidade e exatidão. Em se tratando de métodos voltamétricos, a voltametria de redissolução, que utiliza uma etapa de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo, antes da determinação, é a mais empregada quando em análise de traços. Por outro lado, alguns elementos possuem pouca solubilidade no eletrodo de mercúrio, ou não são eletroativos, diminuindo a sensibilidade e algumas vezes, impossibilitando a sua determinação.

O uso de substâncias orgânicas (ligantes) que possuam propriedades eletroativas promove uma nova possibilidade nos métodos de redissolução. Nestes casos, a formação de complexos, que por sua vez ficam adsorvidos na superfície do eletrodo, é capaz de promover a sua detectabilidade. O uso destes compostos, também cria a possibilidade de determinar um número maior de componentes em uma única célula de medida, dependendo do pH e das constantes de formação dos complexos envolvidos.

5.1.1 Determinação de elementos empregando violeta de solocromo (SVRS), dimetilglioxima (DMG) e oxina como complexantes

O violeta de solocromo ou alizarina (SVRS) é encontrado na forma de um ácido livre, sendo facilmente solúvel em água. Existem alguns trabalhos utilizando-o em espectrofotometria (DANTAS, COSTA, FERREIRA, 1999), sendo que atualmente, é bastante utilizado como ligante em determinações por voltametria. Os primeiros estudos realizados neste sentido foram feitos por Willard e Dean em 1950, que observaram uma cinética lenta na formação do complexo Al(III)-SVRS, o qual em pH 4,7 necessita de 5 horas à temperatura ambiente, 5 minutos a 50 °C e 2 minutos a 60 °C para formar-se. Mais tarde, o SVRS foi estudado por Locatelli (2003), que conseguiu determinar, em fluidos de diálise, Al^{3+} e Fe^{3+}

simultaneamente. A seguir (Figura 6) pode ser observada a estrutura molecular do ligante, que possui uma hidroxila ligada ao naftaleno, o que confere características mais ácidas a este hidrogênio em relação ao hidrogênio da hidroxila do benzeno, devido ao maior número de estruturas de ressonância.

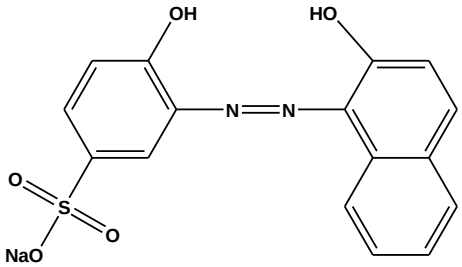


Figura 6: Representação da estrutura molecular do complexante Violeta de Solocromo.

Para o método proposto neste trabalho, todas as etapas foram primeiramente executadas em soluções aquosas. Na primeira etapa, utilizou-se o referido complexante para a determinação de Al^{3+} e Fe^{3+} segundo método descrito por Locatelli em 2003. Com intuito de determinar outros elementos nas mesmas condições e também, identificar possíveis interferências, vários elementos foram adicionados à mesma célula de trabalho para execução da varredura. Os seguintes íons foram testados: Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Tl^{+}, $Mn^{2+,}$ Sn^{4+}, U^{6+}, V^{5+} e Cr^{6+}. Nas condições desta varredura (Tabela 5), Alumínio apresenta sinal em aproximadamente -0,45V, Ferro em aproximadamente -0,55V e o Molibdênio apresentou sinal em -0,7V, podendo-se visualizar então, sinais para Al, Fe e Mo na mesma etapa em diferentes potenciais (Figura 9, faixa de varredura -0,3 a -0,8 V). De acordo com Garmatz (2007), há a possibilidade desta determinação, devido ao fato do SVRS, formar complexos de Al^{3+}, $Fe^{3+,}$ Ti^{4+}, V^{3+}, V^{5+}, Mo^{3+}, Cd^{2+}, Ga^{3+}, Y, Zr, Tl^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+} e metais alcalinos. O mecanismo proposto esta detalhado na Tabela 6.

Tabela 6: Mecanismos de reação para Al, Fe e Mo, na presença de SVRS e tampão acetato em pH 4,6 por AdCSV.

Reação no Eletrodo/Solução	*Potencial (V)*
$Al^{3+}_{(sol.)}$ + SVRS ↔ Al(III)-$SVRS_{(ads)}$ Hg	E= -0,1
Al(III)-$SVRS_{(ads)}$ Hg ↔ $Al^{3+}_{(sol.)}$ + SVRS + Hg	E= -0,4
$Fe^{3+}_{(sol.)}$ + SVRS ↔ Fe(III)-$SVRS_{(ads)}$ Hg	E= -0,1
Fe(III)-$SVRS_{(ads)}$ Hg ↔ $Fe^{3+}_{(sol.)}$ + SVRS + Hg	E= -0,58
$Mo^{6+}_{(sol.)}$ + SVRS ↔ Mo(VI)-$SVRS_{(ads)}$ Hg	E= -0,1
Mo(VI)-$SVRS_{(ads)}$ Hg ↔ $Mo^{6+}_{(sol.)}$ + SVRS + Hg	E= -0,7

Em uma segunda varredura, em sequência, utilizando a mesma célula de trabalho, baseando-se em condições disponíveis em método padronizado (Boletim de Aplicação número 231/2e), quatro elementos podem ser determinados simultaneamente (Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} e Cu^{2+}), em tampão acetato em pH 4.6. Neste caso, também foram investigados todos os elementos já citados, adicionando-os na célula voltamétrica, a fim de assegurar a ausência de interferentes e também na tentativa de incluir mais elementos em uma mesma varredura.

Os sinais referentes aos elementos são encontrados na seguinte ordem: Zinco em aproximadamente -1,0V, cádmio em -0,6V, chumbo em -0,45V e cobre em aproximadamente -0,18V. Neste caso, não há necessidade de utilização de ligantes para realizar a determinação, devido ao fato de que estes metais são solúveis no mercúrio, sendo a voltametria de redissolução anódica (ASV), adequada para esta varredura. Os mecanismos propostos para estes quatro elementos, podem ser observados na tabela a seguir:

Tabela 7: Mecanismos de reação para Zn, Cd, Pb e Cu, na presença de SVRS e tampão acetato em pH 4,6 por ASV.

Reação no Eletrodo/Solução	*Potencial (V)*
$Zn^{2+}_{(sol.)}$ + 2ē ↔ Zn(Hg)	E= -1,15
Zn(Hg) ↔ $Zn^{2+}_{(sol.)}$ + Hg + 2ē	E= -1,0
$Cd^{2+}_{(sol.)}$ + 2ē ↔ Cd(Hg)	E= -1,15
Cd(Hg) ↔ $Cd^{2+}_{(sol.)}$ + Hg + 2ē	E= -0,6
$Pb^{2+}_{(sol.)}$ + 2ē ↔ Pb(Hg)	E= -1,15
Pb(Hg) ↔ $Pb^{2+}_{(sol.)}$ + Hg + 2ē	E= -0,56
$Cu^{2+}_{(sol.)}$ + 2ē ↔ Cu(Hg)	E= -1,15
Cu(Hg) ↔ $Cu^{2+}_{(sol.)}$ + Hg + 2ē	E= -0,18

Nenhum dos outros elementos testados apresentou sinal na faixa de varredura para esta condição; logo, nenhum elemento foi adicionado à sequencial e nenhuma interferência foi detectada. O complexante SVRS, usado na etapa descrita anteriormente, pode estar presente nesta mesma célula, em caso de análise sequencial durante a execução desta varredura, pois não impede a determinação de nenhum dos quatro elementos. Porém, sendo uma substância eletroativa, proporciona um sinal entre Pb e Cu, na faixa de -0,3V, o que não impossibilita as suas determinações (Figura 9).

Em uma terceira etapa, tendo-se como base o método proposto por Colombo e Van Den Berg (1997), é possível executar-se a determinação simultânea de Ni, Co, Cu, Cd, Pb e Zn por voltametria adsortiva de redissolução catódica, utilizando uma mistura dos ligantes dimetilglioxima (DMG) e 8-hidroquinolina (oxina).

A dimetilglioxima é um composto orgânico, que ocorre na forma de um sal branco, solúvel em etanol e éter e insolúvel em água. É capaz de formar complexos com Ni e Co, estando fundamentado na literatura através de estudos já realizados que estabeleceram os mecanismos de adsorção no mercúrio (KOROLCZUK, TYSZCZUK, GRABARSZYK, 2005; MEYER, NEEB, 1983). A 8-hidroxiquinolina, também conhecida como oxina, é um composto orgânico aromático, bem caracterizado que reage com mais de 60 íons metálicos, para formar complexos cujas constantes de formação são bastante variadas (AZEREDO, AZEREDO, 1996). Na sequência, a estrutura da dimetilglioxima (a) e da oxina (b) podem ser observadas.

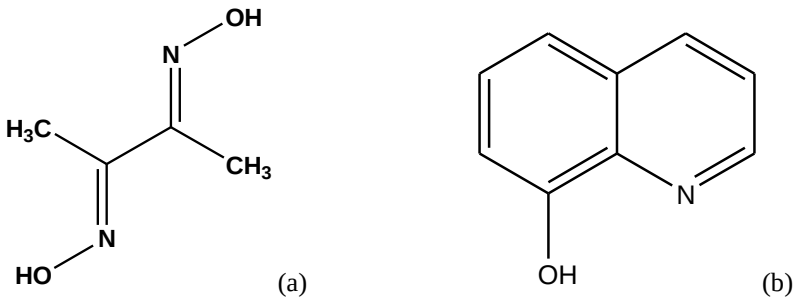


Figura 7: Representação da estrutura molecular do complexante Dimetilglioxima e 8-hidroquinolina.

Assim, na terceira etapa do método foi possível determinar Ni^{2+} e Co^{2+} por voltametria adsortiva de redissolução catódica, utilizando os dois complexantes associados. Entretanto, como já mencionado, sabe-se que apenas a dimetilglioxima seria suficiente para determinação

desses elementos. Porém, foi verificado interferência de V na determinação de Co, em baixas concentrações. O uso da oxina neste caso é justificado, pois a determinação de Co pode ser executada sem observação do sinal interferente, devido a provável complexação do vanádio. Este efeito pode ser observado na Figura 8, onde em um primeiro momento não há a presença de oxina (a), e em sequência, há a presença da oxina (b). Os mecanismos de reação para os dois elementos determinados nesta etapa estão na Tabela 8.

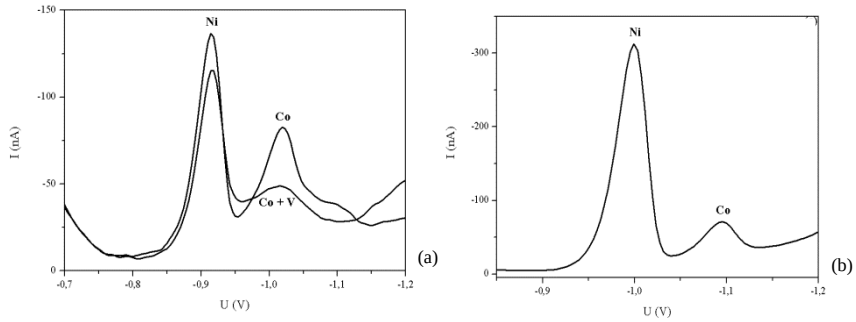


Figura 8: Efeito de Vanádio na determinação de Cobalto (Etapa 3 – Sequencial 1) (a) Varredura 1: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} , Varredura 2: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} V 10 µg.L^{-1},na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1}; (b) Ni 50 µg.L^{-1}, Co 100µg.L^{-1}, V 50 µg.L^{-1}, na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1} e oxina 0,02 mmol.L^{-1}.

Tabela 8: Mecanismos de reação para Ni e Co, na presença de DMG/oxina em pH 8,0 por AdCSV.

Reação no Eletrodo/Solução	*Potencial (V)*
$Ni^{2+}{}_{(sol.)}$ + DMG ↔ Ni(II)-$DMG_{(ads)}$ Hg	E= -0,85
Ni(II)-$DMG_{(ads)}$ Hg + 2ē ↔ $[Ni(II)DMG]^{2-}$	E= -1,0
$Co^{2+}{}_{(sol.)}$ + DMG ↔ Co(II)-$DMG_{(ads)}$ Hg	E= -0,85
Co(II)-$DMG_{(ads)}$ Hg +2ē ↔ $[Co(II)DMG]^{2-}$	E= -1,1

Outros ligantes também foram testados nesta mesma análise sequencial, sendo estes, o ácido cloranílico e o citrato de amônio dibásico. Como a etapa de determinação de Al, Fe e Mo requer um aquecimento prévio, esta foi estabelecida, para fins de praticidade, como sendo sempre a primeira etapa de toda a sequencial voltamétrica. Logo, ao testar-se CA após esta etapa, nenhum sinal útil foi observado, o que similarmente ocorreu para as outras etapas. O mesmo aconteceu para o citrato de amônio dibásico, que não apresentou em nenhuma etapa sinal passível de ser utilizado.

O ácido cloranílico já foi empregado na determinação de Mo(VI), U(VI), V(V) e Sb(III) por voltametria adsortiva de redissolução (SANDER, 1999) e Sb(III) e (V) (WAGNER, SANDER, HENZE, 1996). O citrato de amônio, foi utilizado para determinação de Zn(II), Cr(VI), Cu(II), Sb(III), Sn(II), Pb(II), Fe(III), Mn(II) e Mo(VI) em matrizes complexas de alimentos (LOCATELLI, MELUCCI, 2006). As constantes de formação entre os elementos e os ligantes, são o principal fator envolvido na escolha da ordem de uso em voltametria sequencial. Este conteúdo será melhor discutido no item 5.1.3.

Portanto, fazendo-se uso destes três primeiros complexantes, foi possível determinar em sequência na mesma célula, os seguintes elementos:

- Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+} na presença de SVRS;

- Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} em tampão acetato pH 4.6;

- Ni^{2+}, Co^{2+}, na presença de DMG e oxina.

A seguir podem ser observados os sinais obtidos para cada um dos elementos a partir desta análise sequencial:

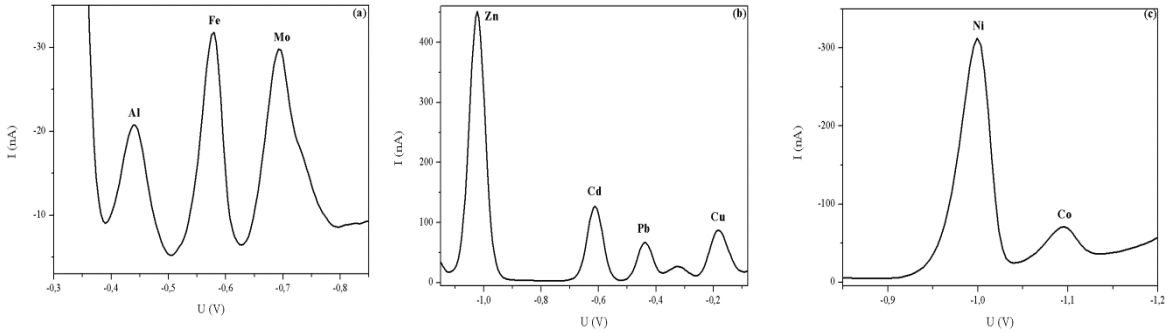


Figura 9: Voltamogramas obtidos pelo método 1(a) Al 30µg.L^{-1}, Fe 150µg.L^{-1}, Mo 150µg.L^{-1}; na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1} (b) Zn 150 µg.L^{-1}, Cd 150 µg.L^{-1}, Pb 150µg.L^{-1}, Cu 150µg.L^{-1} na presença de tampão acetato pH 4,6 (c) Ni 150µg.L^{-1} e Co 150µg.L^{-1} na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1} e Oxina 0,02mmol.L^{-1}.

5.1.2 Determinação de elementos empregando ácido cloranílico (CA) e ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA)

O ácido cloranílico (2,5-dicloro-3,6-diidroxi-pbenzoquinona) é um composto organoclorado, utilizado como complexante em determinações voltamétricas (WAGNER, SANDER, HENZE, 1996), métodos espectrofotométricos e também como agente precipitante

na determinação de Ca, Sr e Zr (SILVEIRA, VARGAS, ROSA, 2007). Moderadamente solúvel em água, é um pó de coloração alaranjada que quando dissolvido apresenta coloração roxo escuro. A estrutura do CA pode ser observada na figura abaixo.

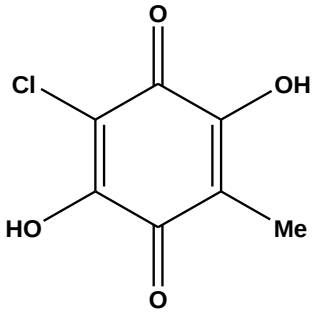


Figura 10: Representação da estrutura molecular do composto ácido cloranílico.

Com base no método proposto por Sander (1999), que utilizou ácido cloranílico na determinação de Mo^{6+}, U^{6+}, V^{5+} e Sb^{3+}, uma nova sequência voltamétrica foi sugerida (SANT'ANA, 2011). Na presença deste complexante, é possível determinar U^{6+}, V^{5+}, Pb^{2+}, Cd^{2+} e Zn^{2+} por voltametria adsortiva de redissolução catódica. Nesta etapa, onde estes cinco elementos podem ser detectados simultaneamente, também executou-se um estudo na tentativa de abranger mais elementos em uma só varredura. Os mesmos íons testados anteriormente também foram aqui avaliados: Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Tl^{+}, $Mn^{2+,}$ Sn^{4+}, U^{6+}, V^{5+} e Cr^{6+}. Novamente, nenhum novo elemento foi detectado nestas condições. Como Cd, Pb e Zn podem ser determinados em duas varreduras (com CA e tampão acetato), optou-se mais tarde, por utilizar o método descrito primeiramente para determinar estes analitos, devido a maior sensibilidade e estabilidade da linha base observada durante a validação da metodologia. Os sinais obtidos para U, V, Cd, Pb e Zn, podem ser observados na Figura 12 e os mecanismos de reação na Tabela 9.

Na etapa testada subsequentemente, foi utilizado o complexante ácido dietileno triamino pentaacético para determinação de Cr. Este ligante é um dos mais utilizados quando se deseja realizar estudos com cromo, pelo fato deste complexo já estar bem elucidado na literatura (ARANCIBIA et al., 2012; GOLIMOWSKI, VALENTA, NÜRNBERG, 1985).

Tabela 9: Mecanismos de reação para U, V, Cd, Pb, e Zn, na presença de CA em pH 2,3 por AdCSV.

Reação no Eletrodo/Solução	*Potencial (V)*
$U^{6+}_{(sol.)} + CA \leftrightarrow U(VI)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg$	E= 0,05
$U(VI)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg + 3\bar{e} \leftrightarrow U^{3+}_{(sol.)} + CA + Hg$	E= -0,10
$V^{5+}_{(sol.)} + CA \leftrightarrow V(V)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg$	E= 0,05
$V(V)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg + 2\bar{e} \leftrightarrow V^{3+}_{(sol.)} + CA + Hg$	E= -0,15
$Pb^{2+}_{(sol.)} + CA \rightarrow Pb(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg$	E= 0,05
$Pb(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg + 2\bar{e} \rightarrow CA + Pb(Hg)$	E= -0,4
$Cd^{2+}_{(sol.)} + CA \rightarrow Cd(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg$	E= 0,05
$Cd(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg + 2\bar{e} \rightarrow CA + Cd(Hg)$	E= -0,6
$Zn^{2+}_{(sol.)} + CA \rightarrow Zn(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg$	E= 0,05
$Zn(II)\text{-}CA_{(ads)}\,Hg + 2\bar{e} \rightarrow CA + Zn(Hg)$	E= -1,0

O DTPA é um composto, estruturalmente bastante semelhante ao EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético, um dos principais agentes complexantes utilizado em inúmeras áreas) sendo ambos muito aproveitados como agentes quelantes. Possuem vários sítios ativos disponíveis e são capazes de interagir principalmente com metais, formando complexos bastante estáveis. A estrutura desta substância pode ser visualizada a seguir.

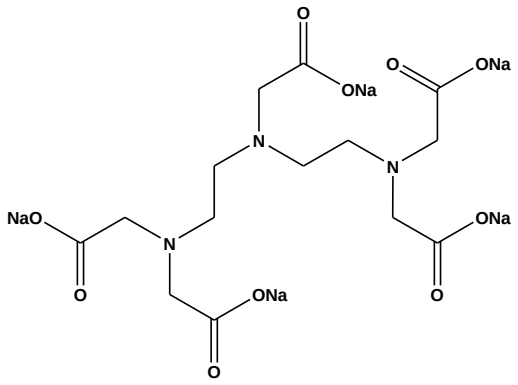


Figura 11: Representação da estrutura molecular do composto ácido dietileno triamino pentaacético.

Nesta etapa, também foi executada investigação de possíveis interferentes. Felizmente, o método apresentou alta especificidade para cromo, onde os mecanismos envolvidos na interface solução x eletrodo, são apresentados na Tabela 10. Observa-se que o mecanismo é mais complexo que em relação aos demais propostos. Isso ocorre devido ao fato do cromo

possuir dois estados de oxidação e ambos serem eletroativos (Cr^{6+} e Cr^{3+}). Além disso, na presença de íons NO_3^- (oxidantes), considerado um catalisador da reação, há aumento da sensibilidade do método (SANDER, NAVRÁTIL, NOVOTNÝ, 2003; KOROLKZUK, 2000).

Tabela 10: Mecanismos de reação para Cr, na presença de DTPA (1) e NO^{3-}(2) em pH 6,2 por AdCSV.

Reação no Eletrodo/Solução (1)	*Potencial (V)*
Cr(III)-DTPA + Hg ↔ Cr(III)-DTPA $_{(ads)}$ Hg	E= -1,0
Cr(III)-DTPA $_{(ads)}$ Hg + ē ↔ Cr^{2+} + DTPA	E= -1,25
Cr^{6+} + 3ē + Hg ↔ Cr^{3+}(Hg)	E= -1,0
Cr^{3+}(Hg) + DTPA ↔ Cr(III)DTPA $_{(ads)}$ Hg	E= -1,0
Cr(III)DTPA $_{(ads)}$ Hg + ē ↔ Cr^{2+} + DTPA	E= -1,25
Reação no Eletrodo/Solução (2)	*Potencial*
Cr^{2+} + NO_3^- ↔ Cr^{3+} + ē	-
Cr(III)-DTPA + Hg ↔ Cr(III)-DTPA $_{(ads)}$ Hg	E= -1,0
Cr(III)-DTPA $_{(ads)}$ Hg + ē ↔ Cr^{2+} + DTPA	E= -1,25

Na terceira etapa proposta para este método, foi adicionado à célula, tampão acetato pH 4.6, para executar a determinação de Tálio. Neste caso, não é necessário a adição de outro complexante e nem mesmo o DTPA impede a sua determinação. Ao contrário, os metais que estão presentes na célula, provenientes das outras etapas estão complexados pelo mesmo, evitando interferências na determinação do Tl. Esta metodologia é encontrada em alguns trabalhos na literatura, podendo-se citar Nascimento et al. (2011), Carvalho et al. (2007), Krasnodębska-Ostręga, Stryjewska e Golimowski (2005).

Após obtenção do sinal para Tl, os mesmos elementos investigados nas outras etapas, também foram aqui avaliados. Nenhum destes apresentou sinal; logo, nenhum elemento foi adicionado na análise sequencial e nenhuma interferência foi detectada. Os mecanismos para a análise de Tl^+ podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11: Mecanismos de reação para Tl, na presença de Tampão Acetato pH4.6 – ASV.

Reação no Eletrodo/Solução	*Potencial (V)*
$Tl^+_{(sol.)}$ + ē ↔ Tl(Hg)	E= -0,8
Tl(Hg) ↔ $Tl^{1+}_{(sol.)}$ + Hg + ē	E= -0,5

Portanto, fazendo-se uso destes dois complexantes (CA e DTPA), nesta ordem, foi possível determinar em sequência na mesma célula, os seguintes elementos:

- U^{6+}, V^{5+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} na presença de CA em pH 2,3;

- Cr^{6+} na presença de DTPA em pH 6,2;

- Tl^{+}, na presença de DTPA em pH 4,6.

A seguir podem ser observados os sinais obtidos para cada um dos elementos:

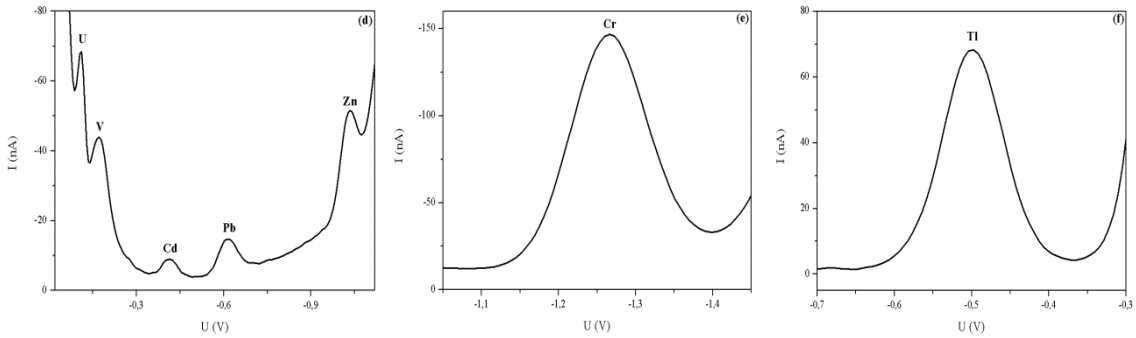


Figura 12: Voltamogramas obtidos pelo método 2 (d) U 60 µg.L^{-1}, V 60 µg.L^{-1}; Pb 60 µg.L^{-1}, Cd 60 µg.L^{-1}, Zn 150 µg.L^{-1} na presença de CA 1.10^{-4}mol.L^{-1} (e) Cr 150 µg.L^{-1} na presença de DTPA 0,075mol.L^{-1} (f) Tl 100 µg.L^{-1} na presença de tampão amônio pH 9,5.

5.1.3 Determinação sequencial de elementos empregando misturas de ligantes

Através do uso destes ligantes orgânicos, além da possibilidade de determinação de elementos que possuem baixa solubilidade no mercúrio, espécies que possuam altos potenciais de redução no HMDE, também poderão ser estudadas. Dentre estas vantagens, a utilização destas substâncias, cria uma nova área de estudo. A possibilidade de análises simultânea e sequencial em uma mesma célula de trabalho que, em se tratando de métodos eletroanalíticos, é muito pouco investigada, principalmente em se tratando de interferências.

Para realização de uma análise sequencial, uma das etapas essenciais a serem abordadas, é a familiarização com as *constantes de formação* (ou constantes de estabilidade) que envolvem o ligante e a espécie a ser determinada (complexo ou também chamado de composto de coordenação). Esta constante, representada pela letra grega β ou também como *Kf*, indica o quão forte é a interação entre a espécie e o ligante e o quanto o meio em que estão

inseridos (temperatura, pH, concentração) pode influenciar, podendo ser representada, de uma forma genérica, da seguinte forma:

$$M^{y+} + xL \leftrightarrow [ML_x]^{y+}$$

sendo M, o cátion metálico, ou espécie catiônica, L o grupamento neutro doador e M + L é o íon do complexo formado.

Algumas destas constantes são conhecidas para alguns metais x ligantes mais comuns. Desta forma é possível estimar, para complexos "desconhecidos", as suas constantes e desta forma, prever a ordem em que podem ser utilizados na célula voltamétrica. Para isso, um levantamento acerca deste dado foi realizado, para estimar a ordem em que os ligantes seriam adicionados à célula. Os valores encontrados podem ser observados na tabela a seguir (SANT'ANA, 2011; GARMATZ, 2007; RAMENSKAYA, KRAEVA, 2006).

Tabela 12: Constantes de formação (β) conhecidas para alguns elementos.

Constantes de Formação (β)					
Espécie	SVRS	DMG	Oxina	CA	DTPA
Al^{3+}	$10^{12,78}$	-	-	$10^{5,8}$	$10^{18,6}$
Fe^{3+}	-	-	-	-	$10^{27,8}$
Zn^{2+}	$10^{-7,18}$	-	$10^{9,3}$	-	$10^{18,2}$
Cd^{2+}	$10^{10,5}$	-	-	-	$10^{19,0}$
Pb^{2+}	$10^{-8,12}$	-	-	-	$10^{18,8}$
Cu^{2+}	$10^{1,1}$	$10^{8,75}$	-	-	$10^{21,2}$
Ni^{2+}	$10^{-4,8}$	$10^{17,24}$	-	$10^{4,3}$	$10^{20,1}$
U^{4+}	-	-	-	-	$10^{28,8}$
V^{2+}	-	-	-	-	$10^{16,31}$
Cr^{3+}	-	-	-	-	$10^{15,36}$
Tl^{+}	-	-	-	-	$10^{5,97}$
Mn^{2+}	-	-	$1,1.10^{8}$	-	-
Mg^{2+}	-	-	$3,8.10^{5}$	-	-
Zr^{4+}	-	-	-	$10^{5,76}$	$10^{36,9}$
Sb^{3+}	-	-	-	-	$10^{9,82}$

Para o ligante SVRS, pode-se observar que as constantes de formação são bastante variadas, se para Al^{3+} esta é $10^{12,78}$, para Cu^{2+} fica em $10^{1,1}$. Como este ligante é o primeiro a ser utilizado na sequencial (Método 1 – Etapa 1 – AdCSV para Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+}), estas variações não proporcionaram influência. Quando a segunda etapa é executada (Método 1 – Etapa 2 – ASV para Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}), o SVRS que esta presente na célula não impede a determinação de nenhum dos elementos, pois se pode observar que as constantes para estas espécies são relativamente baixas, ou seja, os complexos são mais fracos, lábeis. Observa-se

que para o Cd, a constante possui um valor significativo com o SVRS ($\beta=10^{10,5}$). É bastante provável que este complexo se forme, porém, quando o potencial esta favorável na gota, o Cd "desprenda-se" do ligante, formando amálgama com o Hg. Isso também comprova-se pelo fato de não haver alteração no potencial de determinação desta espécie.

Na terceira etapa desta sequencial, onde é adicionado DMG e oxina à célula e são determinados Ni^{2+} e Co^{2+} por AdCSV (Método 1 – Etapa 3), a constante de estabilidade do complexo Ni-DMG, mais forte em relação à constante do complexo Ni-SVRS, mostra na teoria que é possível realizar na prática a determinação de Ni mesmo com a presença do violeta de solocromo na célula.

Constantes de estabilidade entre vanádio, DMG e oxina não foram encontradas na literatura e comparando-se com as existentes para outros elementos, não é possível fazer uma estimativa, já que os valores de β para as duas substâncias são semelhantes. Entretanto, com base nos ensaios realizados envolvendo vanádio e cobalto, na presença e ausência de dimetilglioxima e oxina, pode-se dizer que é muito provável que o complexo V-Oxina seja mais estável do que o complexo V-DMG (Item 4.1.1).

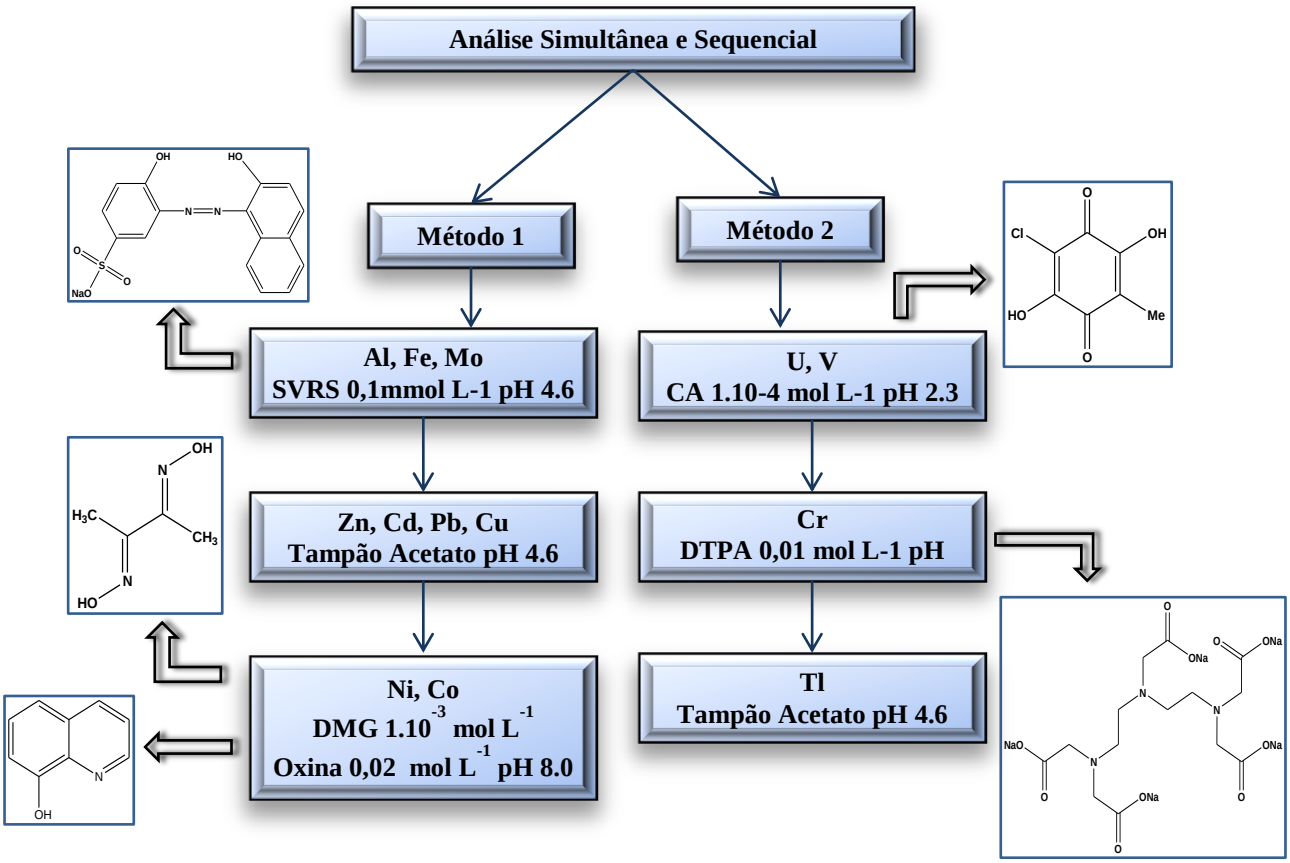
Nesta mesma sequencial é possível fazer a determinação de Tl em uma quarta etapa, adicionando-se DTPA à célula. Este complexante não interage intensamente com o Tl, mas precisa ser utilizado para complexar outras espécies que estão presentes na solução proveniente das outras etapas, que ao contrário, impediriam a determinação de Tl^{+} por ASV, como por exemplo, Pb^{2+} e Cd^{2+}. O DTPA possui constantes de formação elevadas para a maioria dos elementos, o que pode ser atribuído à sua estrutura, desta forma conseguindo captar a partir dos outros complexantes, a maioria das espécies.

Seguindo esta mesma linha, na segunda sequencial, verificou-se que para algumas espécies o ácido cloranílico (Método 2 – Etapa 1 – U^{6+}, V^{5+}, Pb^{2+}, Cd^{2+} e Zn^{2+} por AdCSV) possui valores de constantes de formação baixos em relação aos outros complexantes. Logo, previu-se que a utilização do mesmo deveria ser mantida como etapa inicial do trabalho, o que acabou por se confirmar na prática.

Após esta etapa, foi adicionado à célula o DTPA para determinação de Cr^{6+} (Método 2 – Etapa 2), que sabe-se, possui uma constante de estabilidade alta e portanto, pode ser executada após o uso de CA. Neste caso, também os outros elementos estão complexados no DTPA (Pb, Cd, Zn etc), porém, não são interferentes na determinação de Cr. Por fim, é possível, da mesma forma que já foi descrita, a análise de Tl na presença de DTPA (Método 2 – Etapa 3).

Assim, pode ser executada a análise sequencial descrita no Fluxograma 1, totalizando 13 elementos: Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, U^{6+}, V^{5+}, Cr^{6+} e Tl^{+}, em dois métodos, que podem ser melhor elucidados a seguir e que podem ser justificados pelas constantes de formação elemento-ligante. Mesmo assim, diferentes ordens de adição dos complexantes foram testados, o que confirmou tal teoria. Por exemplo, quando CA (Sequencial 1) foi adicionado à célula, após a etapa 1 do método 1 que utiliza SVRS, não foi observado nenhum sinal que pudesse ser aproveitado. Isso é explicado pois o CA é o ligante que possui as constantes de formação mais baixas, ou seja, sua energia de ligação com a espécie é muito baixa, em relação ao demais, que complexam vários elementos, com maior energia.

Fluxograma 1: Condições da célula Voltamétrica para execução das duas análises sequenciais.



5.2 Validação de Metodologia da Análise Sequencial

Para assegurar a confiabilidade de um método, é necessário avaliar-se uma série de parâmetros analíticos. Segundo a ANVISA (2003), a validação "deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados". Ainda, "deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise".

Para o método proposto, alguns parâmetros foram avaliados e estão mais detalhados a seguir.

5.2.1 Seletividade

Em todas as técnicas analíticas existentes, absorção ou emissão atômica, cromatografia a líquido ou gás, espectrofotometria, métodos eletroquímicos, existem espécies que podem interferir na análise, detecção e quantificação do analito de interesse. Essas interferências, na maioria das vezes, fazem parte da natureza da amostra (matriz) sendo difícil a sua separação. Frequentemente, a concentração do analito é demasiadamente baixa em relação aos componentes majoritários da matriz (CALDAS, et al. 2011).

Em se tratando de voltametria sequencial, um estudo detalhado de espécies que possam interferir, alterar ou mesmo impedir a quantificação e a identificação do sinal do analito, deve ser realizado para assegurar a qualidade dos resultados obtidos. Na maioria das vezes, esse estudo não é adequadamente executado ou mesmo, não existe, o que confere um grande problema principalmente quando a amostra é complexa.

Neste contexto, foram realizados vários testes para verificação da existência ou não, de elementos interferentes, interferências mútuas, nas duas análises sequenciais propostas. As seguintes espécies foram adicionadas à célula voltamétrica, em concentrações elevadas (faixa de 150µg.L^{-1}) e executou-se a varredura nas suas exatas condições: Al^{3+}, Fe^{3+}, Mo^{6+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Tl^{1+}, $Mn^{1+,}$ Sn^{4+}, U^{6+}, V^{5+} e Cr^{6+}. Ao total, três interferências foram encontradas.

►**Interferência 1** (Figura 13): Detecção de Níquel, muito próximo ao sinal de Ferro (-0,58V). Quando ambos estão em baixas concentrações, é possível observar dois picos muito próximos, não havendo possibilidade de quantificar nenhum destes. Já em concentrações mais altas, também de ambas as espécies, não há como discriminar os dois sinais, que ficam sobrepostos. Foi observado que existe então, um limite tolerável em que o Ni influencia na determinação de Fe. Um ensaio de recuperação foi realizado para inferir até que ponto esta influência persiste entre as espécies (Tabela 13) que pode ser visualizada na sequência.

Tabela 13: Ensaio para determinação da influência do interferente Ni na análise de Fe.

Proporção Ni:Fe ($\mu g.L^{-1}$)	% Recuperação Fe
1:1	83,31
2:1	97,62
3:1	112,2
4:1	127,0
5:1	188,84

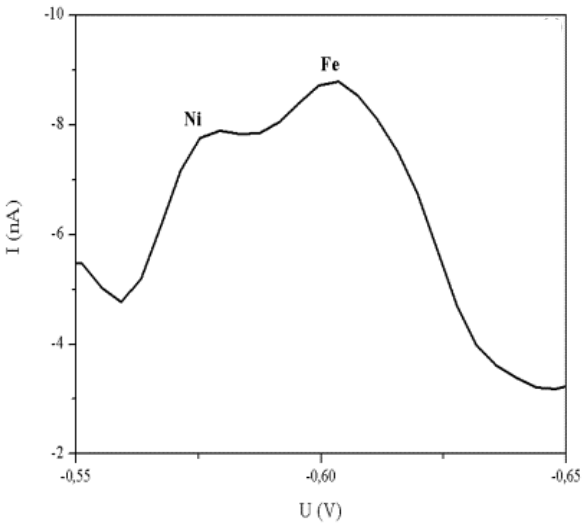


Figura 13: Voltamograma com os elementos Ni 40 $\mu g.L^{-1}$ Fe 20 $\mu g.L^{-1}$ na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1}.

Com base no ensaio proposto, é possível dizer que até a proporção de 3:1 Ni:Fe, é possível tolerar a presença de níquel, pois a percentagem de recuperação está dentro da faixa de variação aceita para amostras de matriz complexa (80-120%). Além destes valores, a

determinação do Fe torna-se inviável pois, a recuperação fica acima do valor real, ou seja, o Ni começa a influenciar na quantificação do Fe, dimensionando um falso positivo na varredura.

►Interferência 2 (Figura 14): Detecção de U entre os sinais de Al e Fe, na primeira etapa da sequencial 1 (na presença de SVRS). Urânio foi adicionado à célula na concentração de 100µg.L^{-1} e apresentou um sinal bem definido no potencial de -0,45V. Como o potencial para Al^{3+} é definido em -0,4V e o Fe^{3+} em -0,58V, um estudo sobre a influência na concentração não foi realizado, pois o sinal para U^{6+} surge "entre" e não "sobreposto" aos demais e quando presente em altas concentrações. Ainda, este não é um analito comum de ser encontrado em altas concentrações.

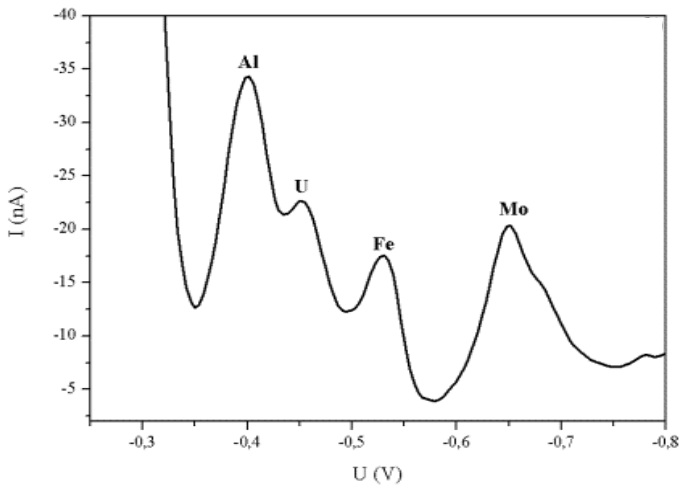


Figura 14: Voltamograma com os elementos U 100 µg.L^{-1}, Al 50 µg.L^{-1}, Fe 50 µg.L^{-1} e Mo 50 µg.L^{-1}; na presença de SVRS 0,1mmol.L^{-1}.

►Interferência 3 (Figura 15): Detecção de Molibdênio no mesmo potencial (-0,6V) correspondente a Cádmio na primeira etapa da sequencial 2. Esta interferência mútua impede a determinação de ambos os elementos nesta sequencial. Este também é um dos motivos por ter-se determinado que Cd seria analisado na sequencial 1.

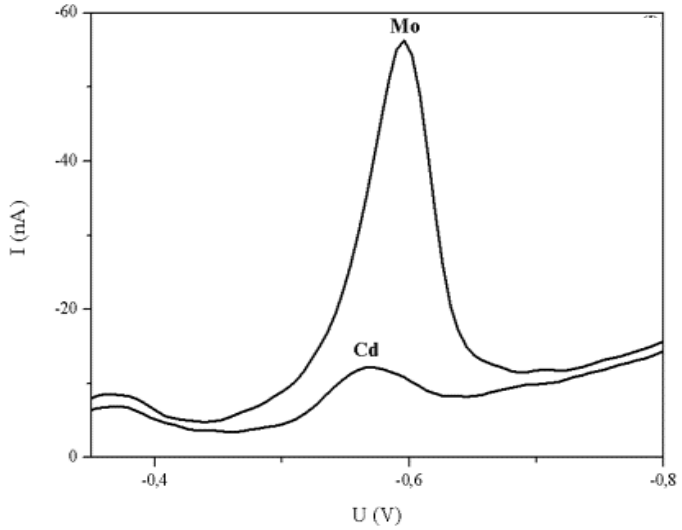


Figura 15: Voltamogramas para os elementos Cd 60 µg.L^{-1}, Mo 50 µg.L^{-1}; na presença de CA 1.10^{-3} mol.L^{-1}.

A influência de Vanádio (Figura 16) na determinação de Cobalto, quando não faz-se uso de oxina associado à DMG (tratada no item 4.1.1) , também pode ser considerada como uma interferência. A partir de baixas concentrações (10 µg.L^{-1}) o vanádio apresenta sinal na presença de DMG, não sendo possível a determinação de Co^{2+} já que o potencial em que encontra-se o sinal é o mesmo. A seguir pode ser visualizado o voltamograma com a respectiva interferência. A Tabela 14 resume as interferências existentes em ambas as sequenciais que podem ser visualizadas em termos de tolerância.

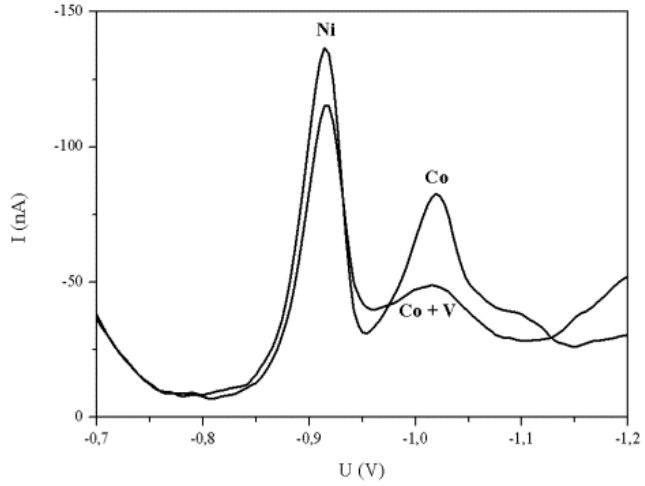


Figura 16: Voltamograma para os elementos: Varredura 1: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} , Varredura 2: Ni 50µg.L^{-1}, Co 50µg.L^{-1} V 10 µg.L^{-1}; na presença de DMG 1.10^{-3}mol.L^{-1}.

Tabela 14: Influência dos interferentes detectados em analitos nos métodos 1 e 2.

Método	Analito	Interferência	Influência
1	Fe	Ni	Tolerável < Ni 3:1 Fe
1	Fe	U	Não influencia
1	Al	U	Não influencia
2	Cd	Mo	Não tolerável
1	Co (ausência de Oxina)	V	Não tolerável
1	Co (presença de Oxina)	V	Não influencia

5.2.2 Linearidade

A linearidade para cada elemento nos dois métodos sequenciais foi avaliada fazendo-se a construção de três curvas padrão (n=3) desenvolvidas no mesmo dia e contendo seis níveis de concentração (6 pontos) em cada uma delas. A curva de calibração foi construída a partir da média das três curvas padrão. A seguir, podem ser visualizados os dados para a precisão (repetitividade) em termos de desvio padrão e coeficiente de variância. A precisão intermediária também foi avaliada e está mais bem discutida no item 5.2.4. Os resultados para a linearidade de cada elemento podem ser visualizados nas Tabelas e gráficos a seguir.

Tabela 15: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Al através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
5	2,02	2,11	2,24	2,12	0,11	5,27
20	10,65	10,95	10,48	10,69	0,24	2,23
40	17,78	18,51	18	18,10	0,37	2,07
60	29,06	29,06	28,41	28,84	0,38	1,30
80	37,66	39,19	37,91	38,26	0,82	2,15
120	54,05	54,84	54,09	54,33	0,45	0,82

R - Replicata

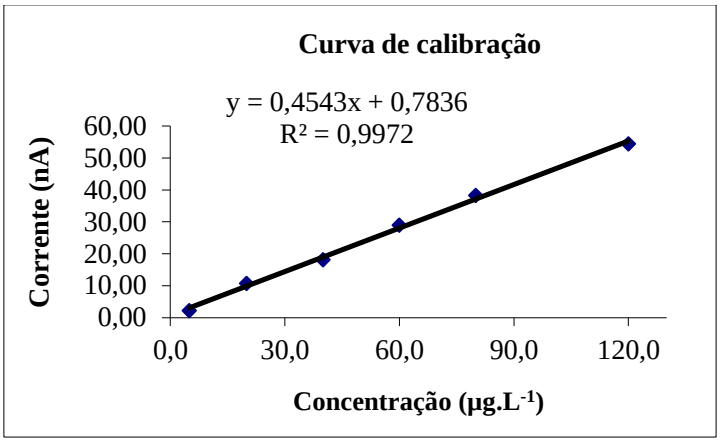


Gráfico 1: Representação gráfica da curva padrão de Al obtida através da Sequencial 1.

Tabela 16: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Al através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	5 – 120 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,998
Inclinação ± desvio padrão	0,45 ± 0,011
Intercepto ± desvio padrão	-0,78 ± 0,664
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	61587,20 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 17: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Fe através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
10	2,82	2,85	3,06	2,91	0,13	4,50
20	5,05	5,56	5,15	5,25	0,27	5,24
60	13,09	13,78	13,43	13,44	0,35	2,57
80	18,77	17,84	18,82	18,48	0,55	2,99
120	28,08	28,78	26,43	27,77	1,21	4,35
150	37,54	36,46	37,99	37,33	0,79	2,11

R - Replicata

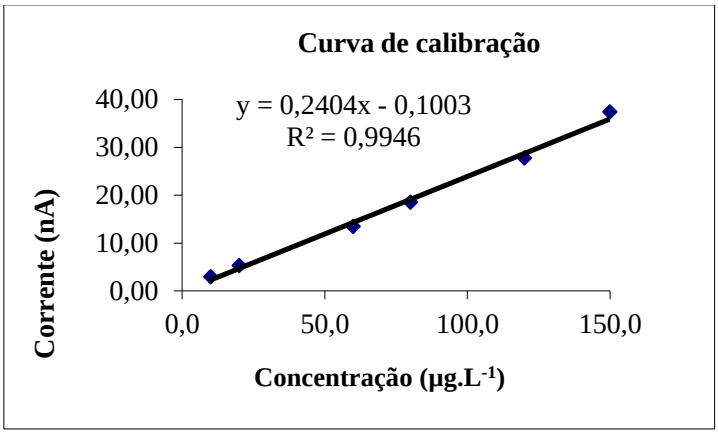


Gráfico 2: Representação gráfica da curva padrão de Fe obtida através da Sequencial 1.

Tabela 18: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Fe através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	10 – 150 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,997
Inclinação ± desvio padrão	0,240 ± 0,008
Intercepto ± desvio padrão	-0,100 ± 0,650
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	13915,40 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 19: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Mo através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
40	13,73	14,31	14,69	14,25	0,48	3,39
60	20,90	19,77	20,74	20,47	0,61	2,99
80	27,30	25,81	24,63	25,92	1,34	5,16
120	37,57	34,55	37,01	36,38	1,61	4,42
150	46,93	46,73	47,93	47,20	0,64	1,36
200	67,23	68,02	67,50	67,60	0,40	0,59

R - Replicata

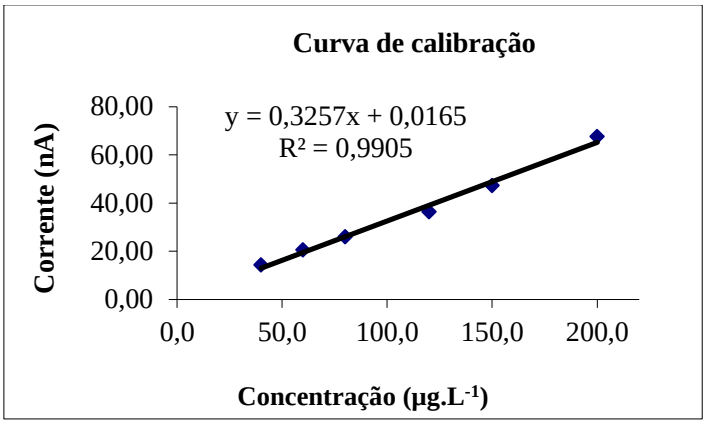


Gráfico 3: Representação gráfica da curva padrão de Mo obtida através da Sequencial 1.

Tabela 20: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Mo através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	40 – 200 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,995
Inclinação ± desvio padrão	0,33 ± 0,015
Intercepto ± desvio padrão	0,01 ± 1,604
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	13841,53 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 21: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Zn através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
10	44,27	42,39	43,00	43,22	0,96	2,22
20	69,08	73,16	67,90	70,05	2,76	3,94
40	129,40	130,20	123,50	127,70	3,66	2,87
100	290,50	271,40	279,20	280,37	9,60	3,43
200	516,40	526,00	522,70	521,70	4,88	0,93
250	682,00	641,70	631,20	651,64	26,82	4,12

R - Replicata

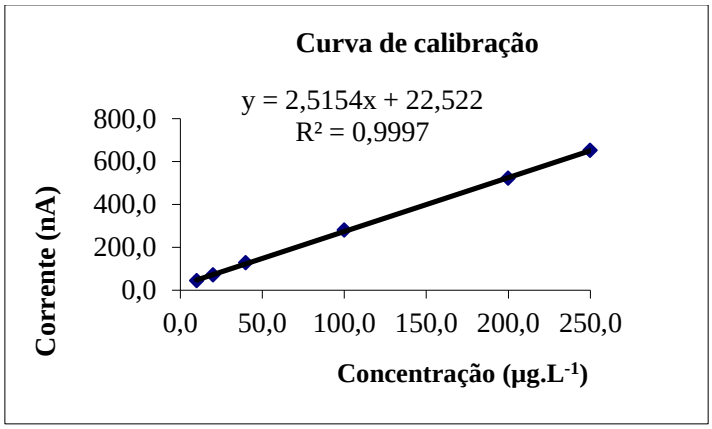


Gráfico 4: Representação gráfica da curva padrão de Zn obtida através da Sequencial 1.

Tabela 22: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Zn através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	10 – 250 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,999
Inclinação ± desvio padrão	2,51 ± 0,020
Intercepto ± desvio padrão	22,52 ± 6,654
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	13841,53 (4,41)

*Limite de confiança 95%

**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P°* (0,05).

Tabela 23: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cd através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
10	14,78	16,18	15,66	15,54	0,71	4,55
20	30,36	29,33	30,26	29,99	0,57	1,89
40	59,33	59,67	58,49	59,17	0,61	1,03
60	81,68	86,91	89,88	86,16	4,15	4,82
80	112,30	111,90	110,00	111,40	1,23	1,10
120	160,00	157,30	157,50	158,27	1,50	0,95

R - Replicata

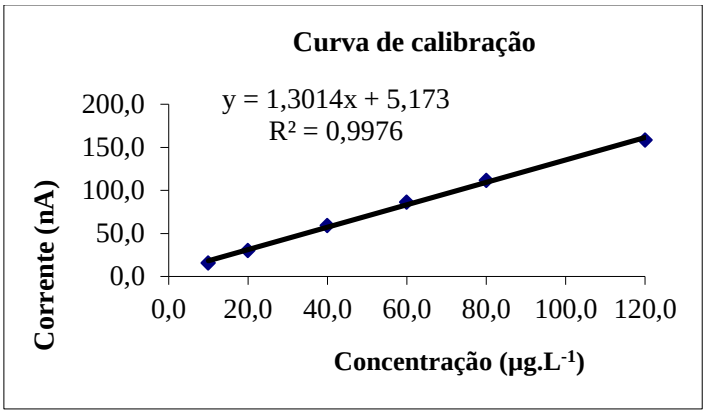


Gráfico 5: Representação gráfica da curva padrão de Cd obtida através da Sequencial 1.

Tabela 24: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cd através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	10 – 120 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,998
Inclinação ± desvio padrão	1,30 ± 0,029
Intercepto ± desvio padrão	5,17 ± 1,170
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	27945,53 (4,41)

*Limite de confiança 95%

**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 25: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Pb através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
10	4,22	4,34	4,12	4,22	0,11	2,63
20	11,17	11,21	11,25	11,21	0,04	0,36
40	24,75	23,85	24,31	24,31	0,45	1,85
60	38,79	37,34	37,89	38,01	0,73	1,93
80	49,78	49,81	48,42	49,31	0,79	1,61
120	70,87	71,20	71,06	71,04	0,17	0,23

R - Replicata

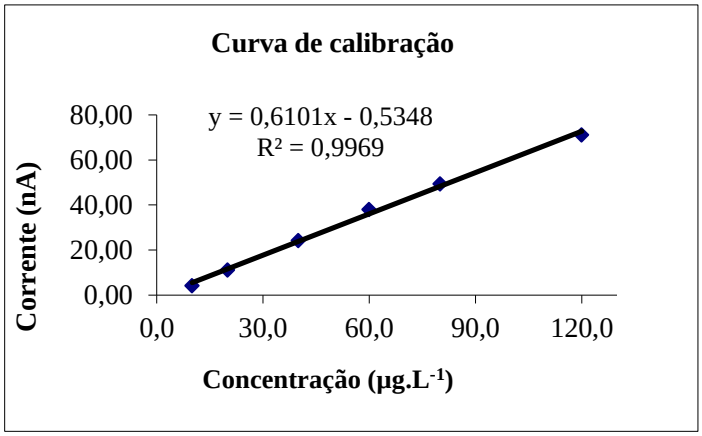


Gráfico 6: Representação gráfica da curva padrão de Pb obtida através da Sequencial 1.

Tabela 26: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Pb através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	10 – 120 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,998
Inclinação ± desvio padrão	0,61 ± 0,015
Intercepto ± desvio padrão	-0,53 ± 0,940
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	90824,24 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 27: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cu através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
5	8,83	8,73	8,59	8,72	0,12	1,39
10	18,41	18,14	18,33	18,30	0,14	0,76
20	33,45	35,23	35,44	34,71	1,09	3,15
30	55,05	55,04	55,72	55,27	0,39	0,71
40	72,99	72,25	73,17	72,81	0,49	0,67
60	112,80	110,70	110,90	111,47	1,16	1,04

R - Replicata

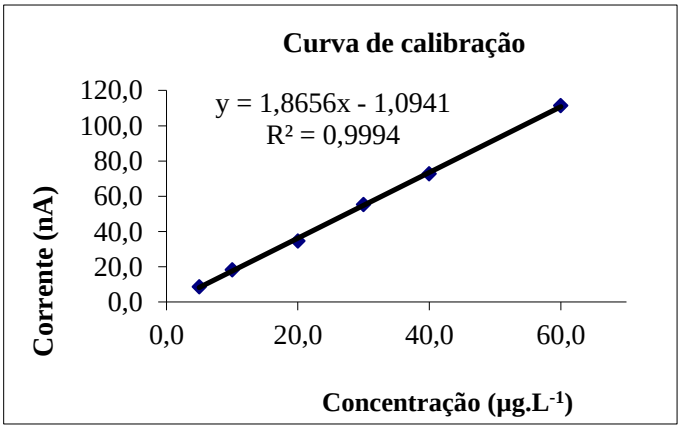


Gráfico 7: Representação gráfica da curva padrão de Cu obtida através da Sequencial 1.

Tabela 28: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cu através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	5 – 60 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,999
Inclinação ± desvio padrão	1,87 ± 0,020
Intercepto ± desvio padrão	-1,09 ± 0,612
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	100684,16 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 29: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Ni através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
5	10,25	10,34	10,70	10,43	0,24	2,28
10	20,55	20,28	20,94	20,59	0,33	1,61
20	45,90	45,13	43,72	44,92	1,11	2,46
40	92,06	92,99	92,70	92,59	0,48	0,51
60	130,30	130,40	129,50	130,07	0,49	0,38
80	159,70	157,50	156,80	158,00	1,51	0,96

R - Replicata

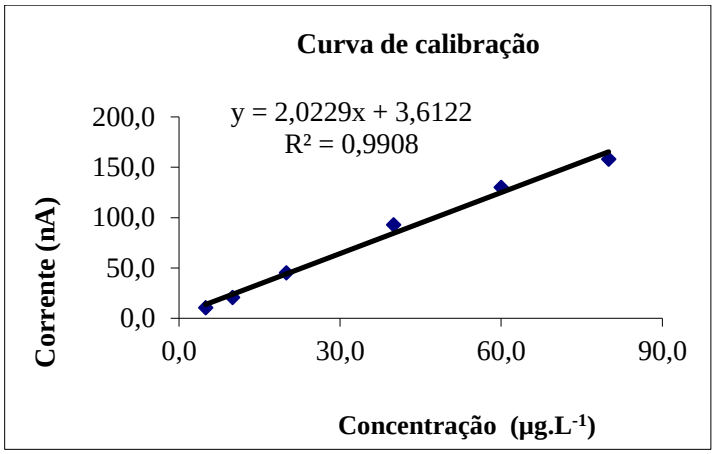


Gráfico 8: Representação gráfica da curva padrão de Ni obtida através da Sequencial 1.

Tabela 30: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Ni através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	5 – 80 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,995
Inclinação ± desvio padrão	2,02 ± 0,087
Intercepto ± desvio padrão	3,61 ± 0,182
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	174256,08 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 31: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Co através da Sequencial 1.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
20	5,48	5,96	5,66	5,70	0,24	4,26
40	10,72	10,19	10,82	10,58	0,34	3,20
80	25,47	25,93	26,33	25,91	0,43	1,66
120	42,98	42,48	42,92	42,80	0,27	0,64
160	59,07	59,87	58,59	59,18	0,65	1,09
200	74,59	74,95	75,73	75,09	0,58	0,78

R - Replicata

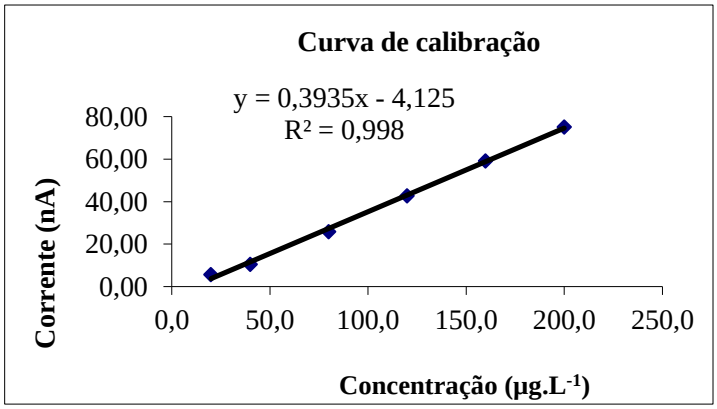


Gráfico 9: Representação gráfica da curva padrão de Co obtida através da Sequencial 1.

Tabela 32: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Co através da Sequencial 1.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	20 – 200 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,999
Inclinação ± desvio padrão	0,394 ± 0,008
Intercepto ± desvio padrão	-4,12 ± 0,879
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	130848,38 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 33: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para U através da Sequencial 2.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)					
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**	**Média**	**DP**	**CV%**
10	18,86	18,47	17,20	18,18	0,87	4,78
15	26,61	28,81	28,35	27,93	1,16	4,16
20	37,02	38,73	38,15	37,97	0,87	2,29
30	55,92	56,28	55,81	56,01	0,25	0,44
60	103,10	99,44	101,00	101,18	1,84	1,82
70	107,20	106,20	1111,60	108,34	2,87	2,65

R - Replicata

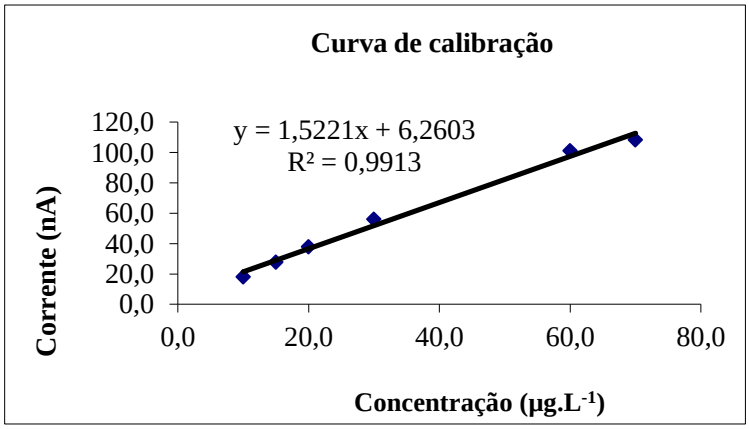


Gráfico 10: Representação gráfica da curva padrão de U obtida através da Sequencial 2.

Tabela 34: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de U através da Sequencial 2.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	10 – 70 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,996
Inclinação ± desvio padrão	1,52 ± 0,064
Intercepto ± desvio padrão	6,26 ± 2,425
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	22876,17 (4,41)

*Limite de confiança 95%

**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 35: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para V através da Sequencial 2.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
20	4,91	4,95	4,43	4,76	0,29	6,10
30	7,53	7,42	7,65	7,53	0,12	1,57
50	11,77	11,10	10,79	11,22	0,50	4,46
60	13,09	13,59	12,30	13,00	0,65	5,01
70	14,40	14,59	15,60	14,87	0,65	4,34
80	15,94	15,87	16,77	16,20	0,50	3,09

R - Replicata

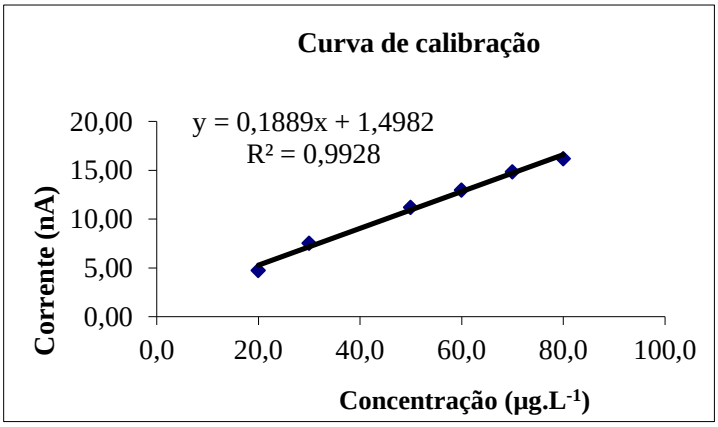


Gráfico 11: Representação gráfica da curva padrão de V obtida através da Sequencial 2.

Tabela 36: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de V através da Sequencial 2.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	20 – 80 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,996
Inclinação ± desvio padrão	0,19 ± 0,007
Intercepto ± desvio padrão	1,50 ± 0,373
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	5366,32 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

Tabela 37: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Cr através da Sequencial 2.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
20	160,10	164,50	144,90	156,50	10,28	6,57
40	192,40	193,40	189,10	191,64	2,25	1,17
80	247,80	254,20	250,40	250,80	3,22	1,28
150	319,50	331,20	340,60	330,44	10,57	3,20
200	400,10	417,70	420,10	412,64	10,92	2,65
250	459,70	461,60	452,30	457,87	4,91	1,07

R - Replicata

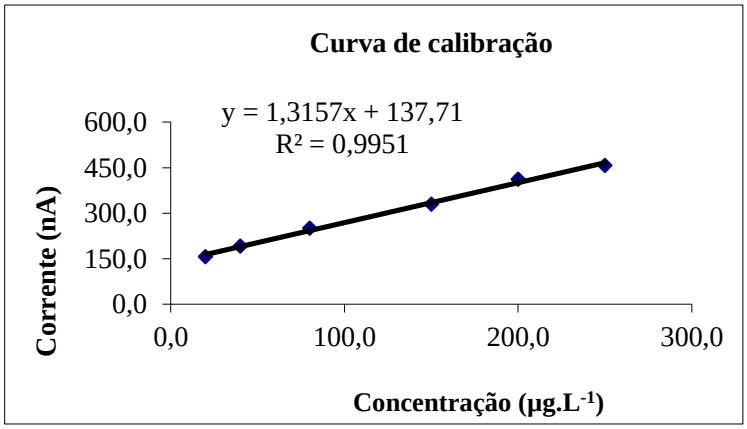


Gráfico 12: Representação gráfica da curva padrão de Cr obtida através da Sequencial 2.

Tabela 38: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Cr através da Sequencial 2.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	20 – 250 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,997
Inclinação ± desvio padrão	0,32 ± 0,041
Intercepto ± desvio padrão	137,71 ± 5,682
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	14917,15 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P°* (0,05).

Tabela 39: Correntes obtidas na determinação da curva padrão para Tl através da Sequencial 2.

Concentração ($\mu g.L^{-1}$)	**Correntes** (nA)			**Média**	**DP**	**CV%**
	Curva Padrão 1	**Curva Padrão 2**	**Curva Padrão 3**			
5	4,85	5,27	4,89	5,00	0,23	4,67
10	8,27	8,10	7,47	7,95	0,42	5,29
20	14,25	14,84	14,23	14,44	0,35	2,40
30	18,93	18,56	18,30	18,60	0,32	1,70
40	26,23	25,27	27,30	26,27	1,02	3,87
50	31,36	32,04	32,39	31,93	0,52	1,64

R - Replicata

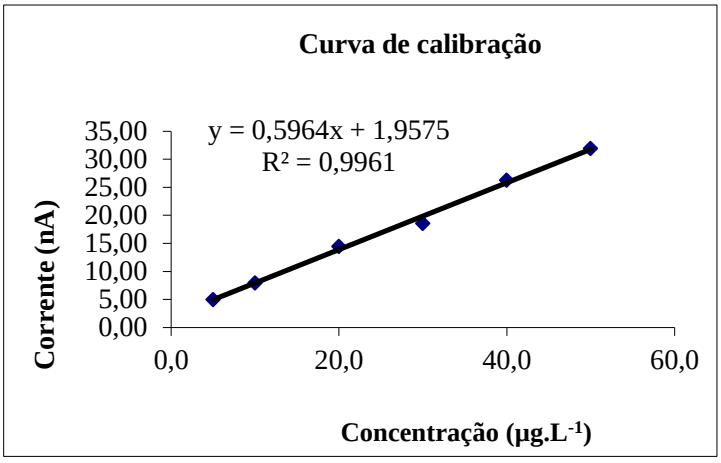


Gráfico 13: Representação gráfica da curva padrão de Tl obtida através da Sequencial 2.

Tabela 40: Análise de regressão dos dados para a curva padrão de Tl através da Sequencial 2.

Parâmetros	**Resultados**
Faixa de Concentração Linear	5 – 50 $\mu g.L^{-1}$
Coeficiente de Correlação (r)	0,998
Inclinação ± desvio padrão	0,60 ± 0,017
Intercepto ± desvio padrão	1,96 ± 0,468
Análise de Variância	**Resultados**
Regressão linear	15262,56 (4,41)

*Limite de confiança 95%
**Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P*° (0,05).

5.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites do método foram obtidos pela relação do desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão, descritos no item 4.6 e podem ser observados na Tabela a seguir:

Tabela 41: Limites de detecção e quantificação para os elementos na análise sequencial.

Elemento	**LD**	**LQ**
Al	2,05	6,85
Fe	1,11	3,70
Mo	0,61	2,03
Zn	2,91	9,72
Cd	2,21	7,35
Pb	1,95	6,49
Cu	9,15	30,50
Ni	1,67	5,57
Co	1,34	4,48
U	1,88	6,28
V	1,52	5,07
Cr	0,69	2,32
Tl	3,82	12,74

5.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de reprodutibilidade (DP e CV% mostrados no item 5.2.2 Linearidade) e precisão intermediária para alguns elementos.

O método eletroquímico desenvolvido foi aplicado em diferentes amostras reais de origem vegetal que foram descritas no item 4.3. Para Pb, Ni e Cr foi realizada análise comparativa por absorção atômica com atomizador eletrotérmico (GF AAS). A Tabela 42 mostra os elementos para os quais se tem valores por ambas as técnicas AAS e SV. Bons

resultados fora obtidos quando comparadas as duas técnicas, levando-se em consideração diferentes sensibilidades e princípios de determinação distintos.

Tabela 42: Comparativo AAS x VA para Pb, Ni e Cr.

	Chumbo (mg.kg^{-1})		**Níquel (mg.kg^{-1})**		**Cromo (mg.kg^{-1})**	
Amostra	AAS	SV	AAS	SV	AAS	SV
RS 16	0,198	nd	0,821	nd	0,363	nd
RS 41	0,512	nd	2,578	2,11	1,529	1,8
RS 98	75,396	103,5	1,625	1,723	22, 049	17,2
BR 49	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
BR 80	nd	nd	0,785	nd	12,607	10,510
BR 83	0,384	nd	2,897	2,775	480,614	490, 10

5.2.5 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, foram utilizadas amostras certificadas a partir do NIST. De uma forma sistemática, tentou-se abranger várias matrizes em que as espécies possam estar presentes devido a interações através do meio em que estão inseridas, no caso de análises de amostras reais. Os seguintes materiais certificados (detalhados no item 4.3), após passarem pelo processo de decomposição da matéria orgânica, foram estudados:

►SRM 695 (fertilizante);

►SRM 1570a (folhas de espinafre);

►SRM 8415 (ovo em pó);

►SRM 2384 (chocolate).

Os resultados obtidos para estas amostras estão dispostos na Tabela 43.

Tabela 43: Resultados obtidos para elementos presentes em amostras de referência certificadas (SRMs).

Amostra	*Elemento*	*Valor Certificado* $mg.kg^{-1}$	*Valor Determinado* $mg.kg^{-1}$	*%Rec.*	*CV%*
Folhas de	Al	310,00±11,00	-	-	-
Espinafre	Cd	2,89±0,07	3,44±0,29	119,00	8,27
(SRM 695)	Co	0,39±0,05	< 1,38	-	-
	Cu	12,20±0,60	16,29 ± 1,01	133,55	6,17
	Ni	2,14±0,10	2,38 ± 0,14	111,14	5,94
	V	0,57±0,03	< 5,00	-	-
	Zn	82,00±3,00	92,54 ± 5,24	112,85	5,67
Fertilizante	Cd	16,90 ± 0,20	19,26	113,96	2,67
(SRM 1570a)	Cr	244,00 ± 6,00	235,83 ± 7,75	96,65	3,28
	Cu	1225,00 ± 9,00	1345,23 ± 217,43	109,82	16,16
	Mo	20,00 ± 0,30	22,86 ± 0,87	114,30	3,79
	Ni	135,00 ± 2,00	110,87 ± 4,99	82,12	4,44
	Pb	273,00 ± 17,00	277,83 ± 8,41	101,77	3,05
	V	122,00 ± 3,00	135,6 ± 11,40	111,00	8,41
Chocolate	Fe	132,00 ± 11,00	-	-	-
(SRM 2384)	Cu	23,20 ± 1,20	24,23 ± 4,46	104,43	18,39
	Zn	36,60 ± 1,70	36,62 ± 0,67	100,05	1,82
Ovo	Al	540,00 ± 86,00	-	-	-
(SRM 8415)	Fe	112,00 ± 16,00	-	-	-
	Zn	67,50 ± 7,60	65,58	97,16	4,02
	V	0,46 ± 0,08	< 5,00	-	-
	Cr	0,37 ± 0,18	< 1,38	-	-
	Co	0,01 ± 0,01	< 2,68	-	-

Observa-se que alguns dos elementos (Al e Fe) presentes nas amostras, não foram determinados em nenhuma das amostras certificadas, mesmo a concentração estando acima do limite de quantificação do método. Provavelmente devido ao tipo de preparo de amostra (decomposição da matéria orgânica com HNO_3/H_2O_2) ocorreu alguma interferência desconhecida no eletrodo, que impediu a determinação. Uma larga faixa de potenciais é

"sobreposta" por um intenso sinal, que impediu a análise dos analitos desta etapa. É possível atribuir ainda esta impossibilidade, a natureza do método (complexante, pH) pois estes elementos estão ambos presentes na etapa 1 do método 1, com SVRS.

Como uma próxima etapa deste trabalho está previsto o estudo de novas formas de mineralização das amostras, de forma a serem adequadas para a análise sequencial proposta, englobando assim, todos os elementos deste método.

5.3 Aplicação dos métodos sequenciais em amostras de origem vegetal

A seguir são apresentados os valores obtidos para todos os 13 elementos determinados nos dois métodos sequenciais.

Tabela 44: Elementos determinados pelos métodos 1 e 2, em amostras de origem vegetal.

Amostras de Origem Vegetal (mg.kg^{-1})						
Elemento	RS 16	RS 41	RS 98	BR 49	BR 80	BR 83
Al	nd	686,8	1300,0	224,2	471,0	581,1
Fe	nd	555,6	382,2	nd	nd	110,9
Mo	nd	32,5	46,3	nd	nd	nd
Zn	101,2	1269,0	167,1	69,76	610,9	523,7
Cd	nd	196,2	50,1	nd	168,1	82,9
Pb	nd	nd	103,5	nd	nd	nd
Cu	nd	622,2	60,8	nd	476,4	132,6
Ni	nd	2,1	1,7	nd	nd	2,8
Co	nd	nd	nd	nd	nd	nd
U	3,6	nd	nd	nd	nd	30,9
V	127,9	541,1	46,5	50,44	1719,0	49,0
Cr	nd	1,8	17,2	nd	10,5	490,1
Tl	27,9	nd	24,4	14,53	21,4	nd

Analisando-se os resultados obtidos, é possível dizer que o novo método (Sequencial 1 e 2) desenvolvido é confiável por atender os principais parâmetros de validação e além disso, mostrou-se comparável com AAS, técnica consagrada da análise destes elementos.

Os métodos voltamétricos sequenciais empregando mistura de ligantes apresentam como vantagem, a rapidez na obtenção dos resultados, a sensibilidade, seletividade da metodologia e baixo custo de manutenção do equipamento. Em se tratando do eletrodo de mercúrio, bastante criticado por sua toxicidade a alguns anos, pode-se afirmar que é o único que oferece a possibilidade de análises sequencias/simultâneas desta magnitude. Como o eletrodo de Hg é renovado a cada gota, não há efeito de memória, o que nos eletrodos sólidos, acontece com frequência. Estes requerem sucessivos polimentos para renovação da sua superfície para viabilizar a varredura.

Ainda, relacionando-se SV com as 2 técnicas mais comuns para determinações elementares, AAS e AES (*Absorption Emission Spectrometry*), onde AAS é monoelementar, AES com uso de plasmas muito energéticos pode realizar determinações multielementares, porém com alto custo, vê-se uma gama de aplicação para os métodos voltamétricos.

Uma boa relação de tempo para obtenção de resultados pode ser observada na Tabela 45, onde se observa, além de resultados sensíveis e confiabilidade na obtenção dos mesmos, uma grande rapidez no processamento da amostra.

Por fim, os resultados mostram a real presença de elementos tóxicos em plantas, como cromo por exemplo. Esse elemento poderia estar presente na forma de picolinato de cromo (inibidor de apetite) nos compostos emagrecedores. Porém, não foi encontrada indicação do referido composto na embalagem do mesmo, indicando uma possível adulteração. Ainda, existe a possibilidade de através de processos de absorção e acúmulo ou contaminação, estes elementos acabaram por manterem-se presentes na matriz da amostra, no composto processado, sendo então detectados. Este fator preocupante ressalta a importância de estudos neste sentido, para assegurar-se a qualidade do produto e desta forma, a saúde dos usuários.

Tabela 45: Relação Tempo x Obtenção de resultados para 13 elementos pelo método SV proposto.

Método 1			***Método 2***		
Etapa	Elementos	Tempo (s)	Etapa	Elementos	Tempo (s)
Preparo da célula	Al, Fe, Mo	120	Preparo da célula	U, V	120
Desaeração		300	Desaeração		300
Pré-Conc.		30 (x4)	Pré-Conc.		30 (x4)
Repouso		10 (x4)	Repouso		10 (x4)
Varredura		60 (x4)	Varredura		80 (x4)
Preparo da célula	Zn, Cd, Pb, Cu	10	Preparo da célula	Cr	120
Desaeração		-	Desaeração		300
Pré-Conc.		60 (x4)	Pré-Conc.		10 (x4)
Repouso		10 (x4)	Repouso		10 (x4)
Varredura		60 (x4)	Varredura		30 (x4)
Preparo da célula	Ni, Co	120	Preparo da célula	Tl	10
Desaeração		300	Desaeração		-
Pré-Conc.		60 (x4)	Pré-Conc.		180 (x4)
Repouso		10 (x4)	Repouso		10 (x4)
Varredura		60 (x4)	Varredura		30 (x4)
Tempo Análise		38,1 min	Tempo Análise		40,2 min
Tempo Total de Análise: 1h e 30min					

6 CONCLUSÃO

A voltametria possui muitos atrativos em termos de sensibilidade, facilidade de operação e rapidez nas determinações, visto que muitas vezes os métodos são ajustados para fazer varreduras de vários elementos ao mesmo tempo. Neste contexto e de acordo com os objetivo principal proposto neste trabalho, o método desenvolvido mostrou-se adequado para determinação de 13 elementos em 2 métodos analíticos sequenciais empregando uma mistura de ligantes em diferentes matrizes de natureza complexa.

Através das figuras de mérito estudadas é possível assegurar a qualidade dos resultados obtidos quando o mesmo é aplicado em amostras reais. No caso das amostras certificadas para verificação da exatidão do método, os resultados se mostraram excelentes, visto a complexidade das matrizes trabalhadas.

O estudo de interferências mútuas também é de extrema importância para não haver obtenção de falsos positivos/negativos durante a análise voltamétrica. No caso deste trabalho, 4 interferências foram detectadas devido a este estudo minucioso, mostrando o quanto este cuidado é importante.

A análise de amostras de origem vegetal indicou a presença de vários metais determinados nas duas sequenciais propostas neste trabalho, tais como, Pb, Cd, Cr, U e entre outros, que são elementos potencialmente tóxicos a saúde humana. Esse fator torna-se bastante interessante, pois estes contaminantes muitas vezes “não-declarados” podem interferir na ação do composto positiva ou negativamente, podendo vir a causar sérios danos. Adicionalmente, a utilização da espectrometria de absorção atômica como comparativo e verificação do item precisão, mostrou resultados também adequados, enriquecendo os dados obtidos, pois a AAS é uma técnica já consolidada.

O método aqui proposto é rápido, sensível e barato se comparado com outras técnicas analíticas mais sofisticadas, e sendo assim, uma importante ferramenta para análise de contaminantes inorgânicos, que pode ser facilmente incluído na rotina de controle de qualidade em diversos tipos de matrizes de características complexa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de substâncias de natureza tóxica encontradas nas amostras trabalhadas de compostos vegetais, indica que deve-se ter um cuidado ao utilizar-se estes compostos para fins farmacêuticos. A inexistência de legislação específica para esta classe contribui para que haja aumento da atenção, principalmente quanto ao controle de qualidade, visto o crescente uso destes produtos no cotidiano e também devido a facilidade de obtenção.

Por outro lado, os métodos voltamétricos de redissolução mostram-se atrativos para este tipo de análise. Proporcionam ótima sensibilidade, seletividade e rapidez, sendo uma boa opção frente às técnicas mais usadas e que na maioria das vezes são mais onerosas e demandam mais tempo de trabalho.

Devido a isso, os métodos desenvolvidos são considerados adequados para a determinação dos 13 elementos propostos neste trabalho. A versatilidade da técnica proporciona a possibilidade de análises em larga escala viabilizando desta forma, a garantia da qualidade dos diversos tipos de produtos desta natureza.

REFERÊNCIAS

ABOU-ARAB, A. A. K.; et al.. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, Cairo, n. 67, p. 357-363, 1999.

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962 **D.O.U. - Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". **D.O.U. - Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de RE n° 899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **D.O.U. - Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

ARANCIBIA, V.; NAGLES, E.; GÓMES, M.; ROJAS, C.. Speciation of Cr(VI) and Cr(III) in Water Samples by Adsorptive Stripping Voltammetry in the Presence of Pyrogallol Red Applying a Selective Accumulation Potential. **International Journal of Electrochemical science**, n. 7, p. 11444 – 11455, 2012.

ARPADJAN, S. et al.. Arsenic, cadmium, and lead in medicinal herbs and their fractionation. **Food and Chemical Toxicology**, Sofia, n. 46, p. 2871-2875, 2008.

AZEREDO, L. da C.; AZEREDO, M. A. A.. Utilização da 8-hidroxiquinolina em técnicas de pré-concentração de íons metálicos em colunas. **Química Nova**, n. 19, p. 383 – 387, 1996.

CALDAS, E. D.; MACHADO, L. L.. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Brasilia, n. 42, p. 599-603, 2004.

CALDAS, S. S., et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMELO, L. G. L., MIGUEZ, S. R., MARBÁN, L.. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. **The Science of the Total Environment**, Buenos Aires, n. 204, p. 245-250, 1997.

CARVALHO, L. M. de; NASCIMENTO, P. C. do; KOSCHINSKY, A.; BAU, M.; STEFANELLO, R. F.; SPENGLER, C.; BOHRER, D.; JOST, C.. Simultaneous

Determination of Cadmium, Lead, Copper, and Thallium in Highly Saline Samples by Anodic Stripping Voltammetry (ASV) Using Mercury-Film and Bismuth-Film Electrodes. **Electroanalysis**, Santa Maria, n. 19, p. 1719-1726, 2007.

COLOMBO, C.; VAN DEN BERG, C. M. G.. Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. **Analytica Chimica Acta**, Liverpool, n. 337, p. 29-40, 1997.

DANTAS, A. F.; COSTA, A. C. S.; FERREIRA, S. L. C.. Uso do violeta de alizarina N (AVN) como reagente espectrofotométrico na determinação de alumínio. **Química Nova**, n. 2, p. 155 – 160, 2000.

EPA 3050B. United States Environmental Protection Agency. Disponível em http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf

FU, F.; WANG, Q.. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, Ghangzhou, n. 92, p. 407-418, 2011.

GIMENO-GARCÍA, E., ANDREU V., BOLUDA, R.. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, Valencia, n. 1, p. 19-25, 1996.
GARMATZ, J.. Determinação de metais como contaminantes em formulações de eritropoetina empregando métodos voltamétricos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2007.

GHONEIM, M. M.; HASSANEIM, A. M.; HAMMAM, E.; BELTAG, A. M.. Simulaneous determination of Cd,Pb, Cr, Sb, Bi, Se, Zn, Mn, Ni, Co and Fe in water samples by differential pulse stripping voltametry at a hanging mercury drop electrode. **Fresenius Journal of Analytical Chemstry**, n. 367, p. 378 – 383, 2000.

GOLIMOWSKI, J.; VALENTA, P.; NÜRNBERG, H. W.. Trace Determination of Chromium in Various Water Types by Adsorption Differential Pulse Voltammetry. **Frezenius Journal of Analytical Chemistry**, p 315 – 322, 1985.

HAGUE, D. N.; EIGEN, M.. Inorganic Reactions Mechanisms – Volume 1. **Specialist Periodical Reports**, 1966.

HARRIS, D. C.. Análise química quantitativa 8ª edição: tradução e revisão Oswaldo Esteves Barcia, Júlio Carlos Afonso. Rio de Janeiro, 2012.

HENZE, G.. Polarographie Voltammetrie. Grundlagen und analytische Praxis – Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer, 2001.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos;** DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, Fevereiro, 2010.

KOROLCZUK, M.. How faster and cheaper to determine chromium by adsorptive cathodic

stripping voltammetry in the presence of DTPA and nitrate. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, n. 367, p. 761 – 762, 2000.

KRASNODĘBSKA-OSTRĘGA, B.; STRYJEWSKA, E.; GOLIMOWSKI, J.. Voltammetic determination of thallium and lead in sediment samples. **Chemia Analityczena**, n. 50, p. 807 – 810, 2005.

KRUG, F. J. NÓBREGA, J. A. OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção Atômica. Parte 1. Fundamentos e Atomização com Chama. Disponível em http://apostilas.cena.usp.br/Krug/AAS%20geral%20parte%201%20revisada.pdf, 2004.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos analíticos de análise. São Carlos: **RiMa** (2004)

LOCATELLI, C.. Voltametric methods for the simultaneous determination of trace metals in foods, plant tissues and soils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Bologna, n. 87, p. 305-312, 2007.

LOCATELLI, C.. Simultaneous Determination of Aluminum and Iron in High Salt Content Matrices by Adsorptive Stripping Voltammetry. Application to Dialysis Fluids. **Electroanalysis**, n. 15, p. 1397 – 1402, 2003.

MANSOUR, S. A.; GAD, M. F.. Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: A novel bioassay method using Daphnia magna Straus. **Food and Chemical Toxicology**, Cairo, n. 48, p. 377-389, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento. Instrução Normativa n° 14, de 15 de dezembro de 2004. Definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos substratos para plantas. **D.O.U., Diário Oficial da União** em 17/12/2004.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento. Instrução Normativa n° 27, de 25 de junho de 2006. Limites máximos de metais pesados tóxicos admitidos em fertilizantes minerais que contenham o nutriente fósforo, micronutrientes ou com fósforo e micronutrientes em mistura com os demais nutrientes. **D.O.U., Diário Oficial da União** em 09/06/2006 - Seção 2.

MELUCCI, D.; LOCATELLI, C.. Sequential voltammetric determinations of trace metals in meals. **Microchemical Journal**, Bologna, n. 85, p. 321-328, 2007.

METROHM. Voltammetric determination of zinc, cadmium, lead, copper, thallium, nickel, and cobalt in water samples according to DIN 38406 Part 16. **Application Bulletin**. Disponível em: http://www.metrohm.com/com/Applications/literature/Application_Bulletins.html?identifier=AB-231&language=en&name=AB-231 acessado em 23/07/13.

MEYER, A.; NEEB, R.. Bestimmung des Cobalts (und Nickels) durch Adsorptions voltammetrie in Grundliisungen mit Triethanolamin und Dimethylglyoxim. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, n. 315, p. 118 – 120, 1983.

MUHAMMAD, S.; TAHIR SHAH, M.; KHAN, S.. Heavy metal concentrations in soil and wild plants growing around Pb–Zn sulfide terrain in the Kohistan region, northern Pakistan. **Microchemical Journal**, n. 99, p. 67-75, 2011.

NASCIMENTO, P. C. do; SCHNEIDER, A. B.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M. de; JOST, C. L.. Sequential Voltammetric Determination of Chromium, Thallium, Cadmium, Lead, Copper and Antimony in Saline Hemodialysis Concentrates using Electrolyte pH Gradient. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 5, p. 820 – 827, 2011.

NAVA, I. A.; GONÇALVES, A. C. Jr.; NACKE, H.; GUERINI, V. L.; SCHWANTES, D.. Disponibilidade dos metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo no solo e tecido foliar da soja adubada com diferentes fontes de NPK+ZN. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 5, p. 884 – 892, 2011.

PERALTA-VIDEA J. R., et al.. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, El Paso, n. 41, p. 1665-1677, 2009.

PHATTANAWASIN, P., et al.. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method. **Forensic Science International**, Nakhon Pathom, n. 219, p. 96-100, 2012.

RAMENSKAYA, L. M.; KRAEVA, O. V.. Dissociation constants for the Zinc(II)–8-hydroxyquinoline complexes in aqueous and sodium dodecyl sulfate micellar solutions. **Russian Journal of Physical chemistry**, n. 01, p. 90 – 94, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, No 5, Set./Out. 2004.

SANTANA, C.. Determinação sequencial de contaminantes inorgânicos em formulações minerais e fitoterápicas empregando métodos voltamétricos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2011.

SANDER, S.. Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of molybdenum(VI), uranium(VI), vanadium(V), and antimony(III). **Analytica Chimica Acta**, n. 394, p. 81 – 89, 1999.

SANDER, S.; NAVRÁTIL, T.; NOVOTNÝ, L.. Study of the Complexation, Adsorption and Electrode Reaction Mechanisms of Chromium(VI) and (III) with DTPA Under Adsorptive Stripping Voltammetric Conditions. **Electroanalysis**, n. 19, p. 1513 – 1521, 2003.

SILVA, A. L. O. da; BARROCAS, P. R. G.; JACOB, S. do C.; MOREIRA, J. C.. Dietary intake and health effects of selected toxic elements. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, n. 1, p. 79 – 93, 2005.

SILVEIRA, N. G. A. da; VARGAS, P. N.; ROSA, C. S. da. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. **Alimentos e Nutrição**, n. 4, p. 365 – 370, 2007.

SKOOG, D., et al.. Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 8ª edição norte americana. Thomsom, 2005.

SOBRAL, M. F.; NASCIMENTO, C. W. A. do; CUNHA, K. P. V. da; FERREIRA, H. A.; SILVA, A. J.; SILVA, F. B. V.. Escória de siderurgia e seus efeitos nos teores de nutrientes e metais pesados em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 8, p. 867 – 872, 2011.

SUSSA, F. V., et al.. Radioactive and stable elements' concentration in medicinal plants form Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, n. 281, p. 165-170, 2009.

WAGNER, W.; SANDER, S.; HENZE, G.. Trace analysis of antimony (III) and antimony (V) by adsorptive stripping voltammetry**. Fresenius Journal Analytical Chemistry**, n. 354, p. 11 -15, 1996.

WILLARD, H. H.; DEAN, J. A. Polarographic Determination of Aluminum. **Analytical Chemistry**, n. 10, p. 1264 – 1267, 1950.

APÊNDICES

Apêndice 1: Elementos determinados por AAS em fitoterápicos como contaminantes.

Contaminantes Amostras de Fitoterápicos					
Concentração $mg.Kg^{-1}$ - Amostras Outros Estados Brasil					
Amostra	**[As]**	**[Hg]**	**[Pb]**	**[Cr]**	**[Ni]**
42	nd	0,008	0,783	0,804	1,001
43	nd	0,003	nd	0,467	0,689
44	nd	0,009	0,237	1,033	1,737
45	0,169	0,021	nd	1,134	1,007
46	nd	0,019	nd	0,408	0,140
47	20,176	0,027	0,163	0,798	0,714
48	18,965	0,023	0,290	0,864	0,638
49	nd	0,009	nd	nd	nd
50	nd	0,005	0,313	0,194	0,759
51	nd	0,008	0,793	0,382	0,347
52	nd	0,022	7,651	3,247	4,862
69	nd	0,019	0,521	1,894	2,118
70	0,220	0,020	0,609	1,265	0,987
71	nd	0,012	0,005	0,208	0,071
72	nd	0,017	0,072	0,164	0,986
73	0,400	0,040	1,325	2,301	1,749
74	0,037	0,022	0,358	1,862	1,234
78	0,343	0,041	1,710	2,902	1,924
79	0,225	0,024	0,043	0,959	1,285
80	0,025	0,011	nd	12,607	0,785
81	0,220	0,026	0,070	0,355	0,621
82	nd	0,006	nd	0,032	0,312
83	nd	0,006	0,384	480,614	2,897
84	nd	0,006	nd	0,227	0,328

85	0,001	0,032	0,291	0,904	1,920
86	0,034	0,032	0,527	0,576	0,572
87	0,000	0,008	0,023	78,999	0,959
88	nd	0,013	0,364	0,048	0,634
91	nd	0,013	0,149	0,216	0,791
92	0,417	0,040	0,200	0,639	0,864
93	nd	0,036	0,228	0,571	0,455
94	nd	0,023	0,285	0,483	0,833
101	nd	0,020	0,036	1088,624	0,374
103	nd	0,015	0,024	0,152	0,536
104	nd	0,030	0,023	0,058	0,062
105	nd	0,029	0,696	1,570	0,802
106	0,069	0,017	0,047	0,707	1,561
107	nd	0,022	nd	nd	0,812
109	nd	0,030	0,581	4,514	2,852
110	0,187	0,007	0,081	793,793	0,460
111	0,178	0,008	0,105	674,830	1,022
112	0,179	0,012	0,100	447,137	0,944
113	0,121	0,010	0,085	565,358	1,071
114	-	0,014	0,310	-	-
116	0,101	0,014	-	-	-

Contaminantes Amostras de Fitoterápicos					
Concentração $mg.Kg^{-1}$ - Amostras Rio Grande do Sul					
Amostra	**[As]**	**[Hg]**	**[Pb]**	**[Cr]**	**[Ni]**
14	0,016	nd	-	0,006	nd
15	0,480	0,006	0,333	0,907	1,478
16	0,265	nd	0,198	0,363	0,821
17	0,157	nd	0,244	156,697	2,761
18	16,554	0,019	0,782	1,529	1,723
19	0,086	0,010	0,038	0,158	0,933
20	nd	0,002	nd	0,483	0,177
21	0,074	0,001	0,006	0,228	0,372
22	0,284	nd	0,240	0,942	0,670
23	0,245	0,014	0,279	0,062	1,104
24	0,061	0,003	nd	0,406	0,096
25	nd	0,002	0,241	0,459	0,328
26	nd	0,016	0,111	0,581	0,327
27	nd	0,007	0,105	0,283	0,423
28	0,552	0,017	0,525	0,268	1,226
30	0,364	nd	0,815	1,877	1,315
31	0,163	0,018	0,399	2,246	1,023
32	0,008	0,011	nd	0,910	0,237
33	0,255	0,029	0,335	3,322	1,316
34	0,094	0,052	0,005	0,770	0,345
35	0,798	nd	0,321	0,930	0,405
36	15,291	0,056	1,982	3,370	2,141
37	0,044	nd	nd	0,497	0,817
38	0,126	0,029	0,681	0,328	0,131
39	0,011	0,077	nd	0,802	0,211
40	0,097	0,056	nd	1,407	1,918
41	0,209	0,056	0,512	21,226	2,578
53	0,031	0,093	0,070	0,869	0,449

54	nd	0,053	0,919	3,194	0,837
55	0,106	nd	nd	0,152	1,421
56	0,078	0,117	nd	0,785	0,148
57	1,664	0,062	0,251	2,267	1,485
58	0,147	0,052	nd	1,096	0,193
59	9,744	0,058	1,641	4,075	1,955
60	0,388	nd	0,166	0,400	1,413
61	nd	0,008	0,419	0,365	2,191
62	9,593	0,067	0,909	2,029	1,278
63	0,246	0,050	0,270	0,541	0,552
64	0,434	nd	0,034	0,260	0,376
65	nd	nd	0,027	0,159	0,978
66	nd	nd	nd	0,321	0,713
67	0,099	0,041	0,362	1,051	0,220
68	0,121	0,054	0,429	256,117	1,543
75	0,043	0,051	0,004	0,926	0,253
76	0,761	0,087	1,023	6,502	1,736
77	0,088	0,050	1,029	0,416	1,687
95	0,076	nd	0,229	89,635	0,918
96	0,103	0,069	0,437	4,218	1,273
97	0,404	0,060	0,390	1,204	0,601
98	0,091	0,054	75,396	22,049	1,625
99	0,240	0,055	-	-	-
100	-	nd	0,294	0,499	0,911
117	0,220	0,079	0,592	2,411	1,258
118	0,216	0,055	0,551	1,368	1,100