



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

“Determinação de Co, Mo, Ni e V em material vegetal e solo por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução em forno de grafite empregando amostragem direta de sólidos.”

Diêgo Victor de Babos

Araraquara - SP
2016

Diêgo Victor de Babos

“Determinação de Co, Mo, Ni e V em material vegetal e solo por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com fonte contínua e de alta resolução empregando amostragem direta de sólidos.”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

**Araraquara - SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

B112d Babos, Diêgo Victor de
Determinação de Co, Mo, Ni e V em material vegetal e solo por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução em forno de grafite empregando amostragem direta de sólidos / Diêgo Victor de Babos. – Araraquara : [s.n.], 2016
118 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: José Anchieta Gomes Neto

1. Espectroscopia de absorção atômica. 2. Solos - Análise. 3. Nutrientes inorgânicos. 4. Solos - Fertilidade. 5. Biomassa vegetal. I. Título.

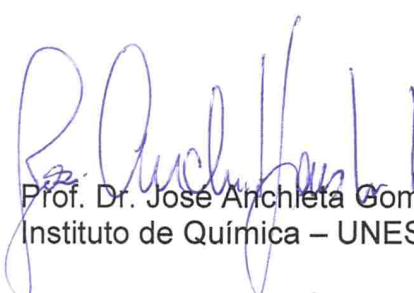
Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

DIÊGO VICTOR DE BABOS

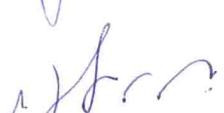
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 18 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pedro Henrique de Cerqueira Luz
Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

1.1 Nascimento: 14 de Dezembro de 1990

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Rio Paranaíba – Minas Gerais

1.4 Filiação: Iracy José de Babos

Nízia Maria da Silva Babos

1.5 Profissão: Químico

2. Formação Acadêmica

2.1 Bacharel em Química

Universidade Federal de Viçosa

Campus Rio Paranaíba

Período: 08/2009 á 09/2013

3. Produção Bibliográfica

3.1. Artigo publicado

BABOS, D. V.; BECHLIN, M. A.; BARROS, A. I.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A.; OLIVEIRA, S. R.; Cobalt internal standard for Ni to assist the simultaneous determination of Mo and Ni in plant materials by high-resolution continuum source grafite furnace atomic absorption spectrometry employing direct solid sample analysis. Talanta, v. 152, p. 457-462, 2016.

4. Resumos e participações em eventos científicos:

4.1. Nacionais: 2

II Workshop sobre Laser em Química Analítica, 27 a 31/07/2015, São Carlos – SP.

4º Congresso Analítica Latin America, 22 a 31/09/2015, São Paulo – SP.

Dedico este trabalho....

Àqueles que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, que fizeram os meus sonhos seus próprios objetivos e dos meus objetivos sua própria luta: meus pais Iracy Babos e Nízia Babos e meu irmão Jeferson Babos.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por saber que sempre está presente em minha vida. A Deus toda honra, glória e louvor eternamente.

Ao professor Dr. José Anchieta Gomes Neto, pela orientação durante esses dois anos de convívio. Obrigado pelas orientações e ensinamentos, pelo apoio e confiança. Obrigado por auxiliar no meu crescimento pessoal e profissional, pois com o seu exemplo pude observar que com muito trabalho e dedicação podemos evoluir cada dia mais.

A professora Edilene C. Ferreira, pela sua forma atenciosa e pelas valiosas contribuições neste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Espectroanalítica e Automação (GEA): Alan Vieira, Ana Carolina, Carla Moraes, Felipe Manfroí, Maísa Lazáro, Thaila Cruz, Tiago Varão, pela amizade construída, os conhecimentos compartilhados e pelas festas promovidas. Especiais aos amigos Ariane Barros e Marcos Bechlin, por suas amizades, obrigado pela prestatividade, além de suas valiosas contribuições em muitas discussões científicas, sou muito grato por tudo!

Aos amigos de república Alan Lima, Rodrigo Moraes e Rosembergue Gonçalves.

Aos meus pais, Iracy e Nízia e meu irmão Jeferson Babos que mesmo distantes torcem por mim. Saibam que vocês são exemplos de vida, simplicidade e alegria.

A todos os familiares e amigos que sempre me incentivaram e torceram por mim. Em especial aos avós Murila Ribeiro, Ilda Rocha e João Mariano, vocês são exemplos de vida!

Aos professores do Departamento de Química Analítica, pelos ensinamentos constantes.

Aos funcionários do Instituto de Química, a todos da seção de pós-graduação e da biblioteca pela atenção dada em todos os momentos.

Ao Instituto de Química por todo suporte oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida, na qual agradeço também aos brasileiros que com seus trabalhos e impostos patrocinaram essa bolsa.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, pensava como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.”

RESUMO

Avaliou-se a amostragem direta de sólidos como base de métodos analíticos simples, rápidos e mais limpos para determinar Co, Mo, Ni e V em tecido vegetal e solo empregando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Esta técnica foi escolhida devido as suas características peculiares, especialmente a elevada capacidade de correção de fundo. Na determinação de cobalto em material vegetal, a sobreposição espectral de $\text{SiO}_{(g)}$ na linha 240,725 nm do Co foi corrigida pelo método dos mínimos quadrados. Curvas de calibração (0–540 pg) com bons coeficientes de correlação lineares ($R \geq 0,9993$) foram obtidas com padrões sólidos. O limite de detecção (LOD) foi 3 pg Co. Na determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal, empregou-se Co como padrão interno para Ni. Curvas de calibração (0,8-50 ng Ni; 0-0,33 ng Mo) lineares ($R \geq 0,9937$) foram obtidas com padrões aquosos sem modificador químico. Os LODs foram 0,018 ng Mo e 0,025 ng Ni. A padronização interna aumentou a precisão das medidas para Ni de 62-135% para 94-105%. Vanádio e Co foram determinados em solos empregando NH_4F como modificador. As calibrações, com padrões aquosos para V (0-40 ng), e por compatibilização de matriz para Co (0-5,0 ng), forneceram $R \geq 0,9979$. Os LODs foram 0,044 ng Co e 0,43 ng V. Na determinação de Mo e Ni em solo, o modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi utilizado apenas para Ni. As curvas de calibração aquosas (0-500 ng Ni; 0-0,54 ng Mo) forneceram $R \geq 0,9953$. Na determinação do Ni foi monitorado o tripleto em 341,377 nm, 341,347 nm e 341,394 nm, permitindo determinar Ni em ampla faixa de concentração. Os LODs foram 0,0082 ng Mo (313,259 nm), 0,021 ng Ni (341,477 nm), 1,8 ng Ni (341,347 nm). A exatidão dos métodos foi avaliada via análise de materiais de referência certificados de solos e plantas. De uma forma geral, os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Material vegetal. Solos. Micronutrientes. Amostragem direta de sólidos. SS HR-CS GFAAS.

ABSTRACT

High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry with direct solid sampling was employed for the development of simple, fast and clean analytical methods for Co, Mo, Ni and V determination in soil and plant materials. The technique has as main advantages the efficiency to correct background absorption. For cobalt determination in plant material, a spectral overlap of SiO molecular absorption in Co line was corrected by using least squares background correction method. Calibration curves (0-540 pg) with correlation coefficients higher of 0.9993 were obtained with solid standards. The limit of detection was of 3 pg Co. For simultaneous determination of Mo and Ni in plant material Co was employed as internal standard for Ni. Calibration curves (0.8-50 ng Ni; 0-0.33 ng Mo) with correlation coefficients higher of 0.9937 were obtained with aqueous standards without chemical modifier. The LODs were 0.025 and 0.018 ng for Mo and Ni, respectively. The internal standardization increased the accuracy of Ni determinations from 62-135% to 94-105%. For V and Co determinations in soils the NH_4F was used as chemical modifier. The calibration with aqueous standards for V (0-40 ng), and compatibility matrix for Co (0-5.0 ng), provided linear correlation coefficients better of 0.9979. The LODs were 0.044 and 0.43 ng for Co and V, respectively. For Mo and Ni determination in soil the $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ was used as chemical modifier for Ni. The aqueous calibration curves (0-500 ng Ni; 0-0.54 ng Mo) provided linear correlation coefficients higher of 0.9953. For Ni determination were used the triplet lines at 341.377 nm, 341.347 nm and 341.394 nm, allowing the determination of Ni in wide concentration range. The calculated LODs were 0.0082 ng Mo (313.259 nm), 0.021 ng Ni (341.477 nm), 1.8 ng Ni (341.347 nm). The accuracy of the proposed methods was assessed by analysis of certified reference materials of soils and plants. In general, the results were in agreement with the certified values at 95% confidence level (*t*-test).

Keywords: Plant material. Soil. Micronutrients. Direct sampling of solids. SS HR-CS GFAAS.

Lista de Figuras

- Figura 1-** Representação esquemática da HR-CS AAS. 1- lâmpada de arco curto de xenônio, 2- espelhos elipsoidais, 3 ou 4- atomizador (chama ou forno de grafite), 5- fenda de entrada do monocromador, 6- espelhos parabólicos, 7- prisma *Littrow*, 8- espelhos de deflexão e fenda intermediária variável, 9 rede *Echelle*, 10- detector CCD.....28
- Figura 2-** Espectros tridimensionais para Co no CRM 1570a *Spinach Leaves* obtidos na ausência de modificador químico e sem correção de fundo (a) e após correção por LSBC (b) utilizando o espectro de referência (c) obtido a partir de SiO₂.....51
- Figura 3-** Espectro de absorção atômica (pixels) do Co no material de referência 1570a *Spinach Leaves* sem modificador químico e sem correção (a), e após correção com LSBC.....52
- Figura 4-** Curvas de temperatura de pirólise referentes a 150 pg de Co em meio aquoso (a) e 150-239 pg Co no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (b) na presença (●) e na ausência (■) do modificador químico Pd/Mg.....53
- Figura 5-** Curvas de pirólise (■) e atomização (●) referentes a 150 pg Co em meio aquoso (a) e 150-239 pg Co no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (b).....54
- Figura 6-** Curvas de calibração para Co em meio aquoso (●) e no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (■).....56
- Figura 7-** Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Co em INCT-OBTL-5 *Tobacco Leaves* contendo $0,981 \pm 0,067$ mg kg⁻¹. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.....58
- Figura 8.** Homogeneidade do Co obtido na amostra INCT-OBTL-5 *Tobacco Leaves*59
- Figura 9-** Espectro de absorção atômica referente a 0,33 ng Mo; 6,8 ng Ni e 1000 ng Co. Temperatura de pirólise em 1600°C e a temperatura de atomização em 2600°C.....62
- Figura 10-** Gráficos de Pareto gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2³, para Mo (a), Ni (b) e Co (c).....65
- Figura 11-** Gráfico de contorno sobreposto para Mo (linha azul), Ni (linha rosa) e Co (linha vermelha) obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.....66
- Figura 12-** Curvas de calibração para Mo (313,259 nm) empregando padrão aquoso (●) e CRM INCT-OBTL-5 *Oriental Basma Tobacco Leaves* (■).....68
- Figura 13-** Curvas de calibração para Ni (313,410 nm) empregando padrão aquoso (●) e CRM INCT-OBTL-5 *Oriental Basma Tobacco Leaves* (■).....68
- Figura 14-** Curvas analíticas para Ni empregando padrões aquoso (●) e sólido (■) utilizando Co como padrão interno.....71

Figura 15- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Mo e Ni em <i>INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves</i> contendo $414 \pm 62 \text{ pg mg}^{-1}$ Mo (a) e $8500 \pm 490 \text{ pg mg}^{-1}$ Ni (b). A linha contínua e a tracejada correspondem a média e desvio padrão (1σ), respectivamente.....	73
Figura 16- Homogeneidade do Mo (a) e do Ni (b) obtido na amostra <i>INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves</i>	74
Figura 17- Correlação das medidas de absorbância obtidas para Ni (A^{Ni} - ●), Co (A^{Co} - ●) e para a razão desses sinais ($A^{\text{Ni}}/A^{\text{Co}}$ - ●) em meio aquoso (a) e em meio sólido (b) por HR-CS GFAAS.....	77
Figura 18- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 0,33 ng Mo em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (<i>GBW07104 Rock-Constituents</i>) (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.....	79
Figura 19- Gráfico de Pareto para Mo, gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^2	81
Figura 20- Gráfico de contorno sobreposto para Mo obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.....	82
Figura 21- Curvas de calibração para Mo empregando padrão aquoso (■) e CRM <i>GBW07104 Rock-Constituents</i> (●).....	83
Figura 22- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Mo em <i>GBW07104 Rock-Constituents</i> contendo $0,54 \pm 0,14 \text{ ng mg}^{-1}$ Mo. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.....	85
Figura 23- Homogeneidade do Mo obtido na amostra <i>GBW07104 Rock-Constituents</i>	86
Figura 24- Espectro de absorbância para Ni (50 ng Ni), na janela espectral em $341,477 \pm 0,2 \text{ nm}$ (temperatura de pirólise em $1500 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de atomização em $2650 \text{ }^\circ\text{C}$).....	88
Figura 25- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 2 ng Ni em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (<i>2711a Montana Soil II</i>) na ausência de modificador (linha azul) e em meio sólido na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.....	90
Figura 26- Gráfico de Pareto para Ni, gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^2	91
Figura 27- Gráfico de contorno sobreposto para Ni obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.....	92
Figura 28- Curvas de calibração para Ni empregando padrão aquoso (■) e <i>2711a Montana Soil II</i> (●).....	93

Figura 29- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Ni em <i>2711a Montana Soil II</i> contendo $21 \pm 0,7 \text{ ng mg}^{-1}$ Ni. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.....	95
Figura 30- Homogeneidade do Ni obtido na amostra <i>2711a Montana Soil II</i>	96
Figura 31- Espectro de absorbância para Co e V (2 ng Co e 16 ng V), na janela espectral em $304,400 \pm 0,2 \text{ nm}$ (temperatura de pirólise em 1500°C e temperatura de atomização em 2650°C).....	98
Figura 32- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 2 ng Co (a) e 16 ng V (b) em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (<i>2709a San Joaquim Soil</i>) na ausência de modificador (linha azul) e em meio sólido na presença de NH_4F (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.....	100
Figura 33- Gráficos de Pareto gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^2 , para Co (a) e V (b).....	102
Figura 34- Gráfico de contorno sobreposto para Co (linha azul) e V (linha vermelha) obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.....	103
Figura 35- Curvas de calibração para Co empregando padrão aquoso (■) e CRM <i>2711a Montana Soil II</i> (●).....	104
Figura 36- Curvas de calibração para V (304,355 nm) empregando padrão aquoso (■) e CRM <i>2711a Montana Soil II</i> (●).....	105
Figura 37- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Co e V em <i>2711a Montana Soil II</i> contendo $9,89 \pm 0,18 \text{ ng mg}^{-1}$ Co (a) e $80,7 \pm 5,7 \text{ ng mg}^{-1}$ V (b). A linha contínua e a tracejada correspondem a média e desvio padrão (1σ), respectivamente.....	107
Figura 38- Homogeneidade do Co (a) e do V (b) obtido na amostra <i>2711a Montana Soil II</i>	108

Lista de Tabelas

Tabela 1- Programa utilizado para a moagem criogênica das amostras de material vegetal e de solos.....	39
Tabela 2- Matriz experimental para avaliar o efeito da temperatura de pirólise, temperatura de atomização e uso de modificador químico $Mg(NO_3)_2$ na determinação de Mo, Ni e Co.....	42
Tabela 3- Programa de aquecimento do atomizador utilizado para no planejamento fatorial 2^3 detalhado na Tabela 2.....	43
Tabela 4- Matriz experimental planejada para avaliar o efeito da temperatura de pirólise e da temperatura de atomização de Mo, Ni, Co e V em solos.....	45
Tabela 5- Programa de aquecimento utilizando para executar os experimentos do planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mo, Ni, Co e V.....	46
Tabela 6- Programa de aquecimento do atomizador para a determinação de Co em amostras de materiais vegetais.....	55
Tabela 7- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Co em material vegetal por DSS HR-CS GFAAS.....	57
Tabela 8- Resultados ($mg\ Kg^{-1}$) da determinação ($n=3$) de Co nos CRMs, utilizando calibração com o CRM 1570a <i>Spinach Leaves</i>	59
Tabela 9- Resultados da determinação ($n=3$) de Co ($mg\ Kg^{-1}$) em material vegetal pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como média $\pm$ SD.....	60
Tabela 10- Respostas dos experimentos realizados para Mo, Ni e Co.....	64
Tabela 11- Programa de aquecimento para a determinação simultânea de Mo, Ni e Co pelo método proposto.....	67
Tabela 12- Coeficientes de correlação linear, coeficientes angular e massas características dos analitos em meio aquoso e sólido.....	69
Tabela 13- Propriedades físico-químicas do Mo, Ni e Co e seus óxidos (52).....	70
Tabela 14- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Co em material vegetal por DSS HR-CS GFAAS.....	72
Tabela 15- Resultados da determinação ($n=3$) de Mo ($mg\ Kg^{-1}$) nos CRMs, utilizando calibração aquosa.....	75
Tabela 16- Resultados da determinação ($n=3$) de Ni ($mg\ Kg^{-1}$) nos CRMs, utilizando calibração aquosa.....	76
Tabela 17- Resultados da determinação ($n=3$) de Mo e Ni em material vegetal pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como $mg\ Kg^{-1} \pm$ SD.....	78

Tabela 18- Respostas dos experimentos realizados para Mo.....	80
Tabela 19- Programa de aquecimento para a determinação de Mo em solo pelo método proposto.....	82
Tabela 20- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Mo em solo por DSS HR-CS GFAAS.....	84
Tabela 21- Resultados da determinação (n=3) de Mo (mg Kg ⁻¹) nos CRMs de solos, utilizando calibração aquosa.....	86
Tabela 22- Resultados da determinação (n=3) de Mo (mg Kg ⁻¹) em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como média ± SD...	87
Tabela 23- Respostas dos experimentos realizados para Ni.....	91
Tabela 24- Programa de aquecimento para a determinação de Ni em solo pelo método proposto.....	93
Tabela 25- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Ni em solo por DSS HR-CS GFAAS.....	94
Tabela 26- Resultados da determinação (n=3) de Ni (mg Kg ⁻¹) nos CRMs de solos, utilizando calibração aquosa.....	96
Tabela 27- Resultados da determinação (n=3) de Ni (mg Kg ⁻¹) em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GF AAS. Valores expressos como média ± SD..	97
Tabela 28- Respostas dos experimentos realizados para Co e V.....	101
Tabela 29- Programa de aquecimento para a determinação conjunta de Co e V pelo método proposto.....	103
Tabela 30- Parâmetros de desempenho analítico para determinação conjunta de Co e V em solo por DSS HR-CS GFAAS.....	106
Tabela 31- Resultados da determinação conjunta (n=3) de Co e V (mg Kg ⁻¹) nos CRMs de solos.....	109
Tabela 32- Resultados da determinação (n=3) de Co e V em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como mg Kg ⁻¹ ± SD.....	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês Atomic Absorption Spectrometry
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada, do inglês Charge coupled device
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês Certified Reference Material
CS	Fonte Contínua, do inglês Continuum Source
CVAAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Vapor Frio, do Inglês Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry
DEMOM	Monocromador Duplo-Echelle, do inglês Double-echelle Monochromator
DSS	Análise direta de sólidos, do inglês direct solid sample
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry
H_e	Fator de Homogeneidade
HR-CS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução e Fonte Contínua, do inglês High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry
HR-CS GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite de Alta Resolução e Fonte Contínua, do inglês High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
IAC	Instituto Agrônomo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry
LS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Fonte de Linhas, do inglês Line Source Atomic Absorption Spectrometry

LSBC	Correção de Fundo pelo Algoritmo dos Mínimos Quadrados, do inglês Least-Squares Background Correction
m₀	massa característica
PIB	Produto Interno Bruto
S_H	Erro de amostragem
SiS	Amostragem de suspensão, do inglês Slurry Sampling
SS HR-CS GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite de Alta Resolução e Fonte Contínua com amostragem de sólidos, do inglês Solid Sampling High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês United States Environmental Protection Agency
UV-VIS	Ultravioleta- Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 A agricultura brasileira.....	20
2.2 Análises químicas na agricultura.....	21
2.3 A importância dos nutrientes em solos e materiais vegetais.....	23
2.4 Métodos de determinação elementar em solos e materiais vegetais.....	25
2.5 Espectrometria de absorção atômica de fonte contínua e alta resolução...	27
2.6 Amostragem direta de sólidos em espectrometria atômica.....	30
2.7 Aplicações da SS HR-CS GFAAS em materiais vegetais e solos.....	32
3 OBJETIVOS.....	35
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Instrumentação.....	36
4.2 Reagentes, soluções analíticas, amostras e materiais de referência certificados.....	37
4.3 Preparo das amostras.....	38
4.4 Procedimentos.....	39
4.4.1 Determinação de Co em material vegetal.....	39
4.4.2 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal empregando Co como padrão interno.....	41
4.4.3 Determinação de Mo, Ni, Co e V em solo.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1 Determinação de Co em material vegetal.....	49
5.1.1 Comportamento térmico do Co.....	49
5.1.2 Avaliação de possíveis efeitos de matriz.....	55
5.1.3 Parâmetros de desempenho analítico.....	56
5.1.4 Massa mínima e fator de homogeneidade.....	57
5.1.5 Avaliação da precisão e exatidão do método.....	59
5.1.6 Determinação de Co em amostras de material vegetal.....	60

5.2 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal empregando Co como padrão interno.....	61
5.2.1 Potencial de medidas simultâneas de absorbância de Mo, Ni e Co.....	61
5.2.2 Comportamento térmico do Mo, Ni e Co.....	62
5.2.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz.....	67
5.2.4 Parâmetros de desempenho analítico.....	72
5.2.5 Massa mínima e fator de homogeneidade.....	72
5.2.6 Avaliação da precisão e exatidão do método.....	75
5.2.7 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal.....	78
5.3 Determinação de Mo em solo.....	79
5.3.1 Comportamento térmico do Mo.....	79
5.3.2 Avaliação de possíveis efeitos de matriz.....	83
5.3.3 Parâmetros de desempenho analítico.....	84
5.3.4 Massa mínima e fator de homogeneidade.....	84
5.3.5 Avaliação da precisão e exatidão do método.....	86
5.3.6 Determinação de Mo em amostras de solos.....	87
5.4 Determinação de Ni em solo.....	88
5.4.1 Avaliação de medidas do triplo do Ni.....	88
5.4.2 Comportamento térmico do Ni.....	89
5.4.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz.....	93
5.4.4 Parâmetros de desempenho analítico.....	94
5.4.5 Massa mínima e fator de homogeneidade.....	94
5.4.6 Avaliação da precisão e exatidão do método.....	96
5.4.7. Determinação de Ni em amostras de solos.....	97
5.5 Determinação conjunta de Co e V em solo.....	98
5.5.1 Avaliação de medidas simultâneas de Co e V.....	98
5.5.2 Comportamento térmico do Co e V.....	99
5.5.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz.....	104
5.5.4 Parâmetros de desempenho analítico.....	106
5.5.5 Massa mínima e fator de homogeneidade.....	106

5.5.6 Avaliação da precisão e exatidão do método.....	108
5.5.7 Determinação conjunta de Co e V em amostras de solos.....	109
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112
ANEXO 1.....	117

1 INTRODUÇÃO

A atividade agrícola, enquanto produção de plantas e animais num local determinado, visando à alimentação de uma comunidade, remonta há pelo menos 10 000 anos antes de Cristo. Na pré-história algumas das práticas que permitiram a formação dos primeiros aglomerados humanos, mais ou menos fixos foram os usos do fogo para limpeza de áreas, de algumas ferramentas para cultivo da terra e de plantios sem preparo do solo. Muitas mudanças ocorreram ao longo do tempo. A agricultura se disseminou pelo mundo e aumentou a diversidade de produtos obtidos por meio da atividade agrícola. O avanço do conhecimento sobre o funcionamento dos diferentes sistemas que compõem o sistema solo-planta como, práticas de manejo de solo e melhoramento genético de culturas; permitiu aumento da produtividade e oferta de alimentos. Mas duas coisas não mudaram, para produzir alimentos que atendam às necessidades da população humana é necessário fazer agricultura e praticá-la causa impactos no ambiente. (1)

O setor agrícola é o responsável pelo suprimento da crescente demanda por alimentos e biomassa, mas o seu desenvolvimento precisa vir acompanhado na eficiência do uso do solo. Cada vez mais se torna necessário produzir mais em uma determinada área, para que não haja a necessidade de expandir novas áreas agricultáveis, e consequentemente aumento dos impactos ao meio ambiente advindos dessa atividade. Aumentar a produtividade das lavouras é um desafio e também a solução de maior alcance para melhorar a eficiência econômica da cadeia produtiva agrícola.

O desenvolvimento satisfatório das plantas somente pode ser obtido com o suprimento adequado de nutrientes. (2) Dessa maneira a utilização de algumas ferramentas como, análise química de solo, análise de materiais vegetais (análise foliar), utilização de fertilizantes e de técnicas modernas de manejos de solos e nutrientes, podem proporcionar aumento na produtividade, e ao mesmo tempo melhorar a fertilidade de solos e a nutrição vegetal. O nitrogênio é um nutriente que faz parte da composição de muitos compostos estruturais das plantas (como aminoácidos e proteínas) e é o elemento essencial que as plantas necessitam em maior quantidade. (3) Os fertilizantes nitrogenados constituem um importante fator

de produção, mas o seu uso indiscriminado pode contribuir com o acúmulo de nutrientes nos ecossistemas terrestres e aquáticos, podendo alterar a biodiversidade. Limitar a aplicação de fertilizantes numa cultura, com base em análise regular do solo, está entre as ações da Diretriz de Nitratos da União Européia de combate à poluição por excesso de nutrientes. (4) Os micronutrientes Mo, Co e Ni apresentam funções primordiais no ciclo biogênico do nitrogênio. (5-9) Dessa maneira, monitorar esses elementos em solos e tecidos vegetais pode auxiliar na utilização mais eficiente de fertilizantes nitrogenados, sendo então ecologicamente e economicamente atraente.

Assim, a química analítica tendo como sua essência o desenvolvimento de métodos analíticos para obter informações sobre a composição e natureza da matéria, deve auxiliar a agricultura, no que se refere ao desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e eficientes, no acesso de informações na determinação desses nutrientes em amostras de solos e materiais vegetais. Contribuindo assim para aumentar as informações e auxiliar na tomada de decisões eficientes que possam contribuir para maior produtividade agrícola.

A espectrometria de absorção atômica é considerada uma técnica analítica consolidada e disseminada em laboratórios de rotina que lidam com análise elementar em amostras de solos e de material vegetal. Porém, o emprego dessa técnica requer na maioria das vezes que as amostras sejam convertidas em soluções. E este procedimento de decomposição envolve longas etapas de preparo, além de ser passível de contaminação e/ou perda de um ou mais analitos durante o seu procedimento. A análise por amostragem direta de amostras sólidas, associada à espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua, surge como opção atrativa, devido ao mínimo preparo das mesmas reduzindo os riscos de contaminação, minimizando a geração de resíduos e diminuindo significativamente o tempo de análise. (10)

Assim, a avaliação da amostragem de sólidos associada à espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua apresenta-se como alternativa atraente e que deve ser explorada para a determinação de Co, Mo e Ni em amostras de solos e material vegetal

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A agricultura brasileira

A grande transformação da agricultura brasileira ocorreu com o processo de modernização, nos anos 60 e 70, com o intuito de aumentar a produção e a produtividade das culturas mediante a inserção de inovações tecnológicas no processo produtivo. Dois são os momentos históricos distintos da modernização da agricultura brasileira: observa-se primeiramente um aumento do número de tratores no campo e do consumo de fertilizantes de origem industrial; o segundo momento refere-se à industrialização da produção agrícola com o surgimento das indústrias de bens de produção e insumos. (11)

Atualmente a agricultura e o agronegócio brasileiro são modernos, eficientes e competitivos. O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. É o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, etanol de cana-de-açúcar e suco de laranja. Além disso, lidera o ranking das vendas externas do complexo soja (farelo, óleo e grão). (12) A agropecuária tem contribuição relevante no produto interno bruto (PIB) brasileiro. O PIB de 2015 ficou em R\$ 5,9 trilhões. E entre os setores da economia analisados para o cálculo deste, apenas a agropecuária cresceu em 2015. A alta foi de 1,8% em relação ao ano anterior, sob influência das culturas de soja e do milho. (13)

Segundo informações do IBGE, a quarta estimativa de 2016 para a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 205,4 milhões de toneladas. A estimativa da área a ser colhida é de 58,5 milhões de hectares, apresentando acréscimo de 1,6% frente à área colhida em 2015 (57,6 milhões de hectares). (13)

Nesse contexto, um dos grandes desafios da agricultura brasileira atual é o aumento da eficiência do uso do solo, ou seja produzir mais em uma determinada área, para que não haja a necessidade de expansão de novas áreas agrícolas. Busca-se desta forma aumentar a eficiência econômica da cadeia produtiva e contribuir com o desenvolvimento da agricultura de forma sustentável. Altas produtividades e qualidade das culturas agrícolas podem ser alcançadas através da

utilização de fertilizantes e do emprego de análises química de solo e material vegetal. (14)

2.2 Análises químicas na agricultura

O manejo do solo e das culturas é parte integrante de um sistema de agricultura de precisão, o qual envolve conceitos de uso de informações sobre a variabilidade de propriedades locais e climáticas de uma área, visando ao aumento da produtividade, otimização no uso dos recursos e redução do impacto da agricultura ao meio ambiente. A produção na atividade agrícola, pelas suas particularidades, exige escolhas racionais e utilização eficiente dos fatores produtivos. A utilização de algumas ferramentas tais como análise de solo e material vegetal podem contribuir para a otimização da produção agrícola. (15)

A análise química de solos é uma ferramenta útil que permite, antes do plantio, conhecer a capacidade de um determinado solo suprir nutrientes às plantas. É a forma mais simples, econômica e eficiente de diagnosticar a fertilidade dos solos. E constitui base imprescindível para a recomendação de quantidades adequadas de corretivos e fertilizantes para aumentar a produtividade das culturas e, como consequência a produção e a lucratividade das lavouras. Destacam-se ainda como aspectos favoráveis à sua utilização i- baixo custo e rapidez na obtenção dos resultados, ii- o adequado planejamento na compra de corretivos e fertilizantes, iii- evita gastos desnecessários com insumos e mão-de-obra, iv- evita desequilíbrios nutricionais, e v- minimiza danos ao meio ambiente, notadamente a contaminação das águas por excesso de fertilizantes. (16)

O custo de uma análise de solos é expressivamente baixo diante dos benefícios que ela proporciona, principalmente tendo em vista o elevado custo dos corretivos e fertilizantes, os quais consomem parcela significativa dos recursos destinados aos sistemas de produção agrícola. (16)

Há vários tipos de análises de solos disponíveis no mercado, sendo que a escolha dependerá do objetivo a ser alcançado. As análises conhecidas como “rotina” dão subsídios aos profissionais para definir as doses de calcário e adubos a ser aplicadas no solo para determinado cultivo. Uma análise de rotina completa

contempla fertilidade (pH, H+Al, P, K, Ca, Mg, Al e S), inclusive micronutrientes, matéria orgânica e granulometria ou textura. (17)

Outra ferramenta bastante utilizada é a análise foliar (material vegetal). A análise foliar é uma das técnicas utilizadas para a avaliação do estado nutricional das plantas, e sua interpretação possibilita verificar a ocorrência de deficiências, toxidez ou desequilíbrio de nutrientes. Assim, a análise foliar permite o acompanhamento e a avaliação de um programa de adubação e, caso necessário, auxilia no seu ajuste para a próxima safra de culturas anuais, complementando as informações fornecidas pela análise de solo. A utilização da análise foliar como critério diagnóstico baseia-se na premissa de existir relação entre o suprimento de nutrientes no solo e os teores dos mesmos nas plantas, e que aumentos ou decréscimos nos teores se relacionam com maiores ou menores produções. (18)

Além disso, a diagnose nutricional, através da análise de tecidos vegetais, permite i- diagnosticar um problema nutricional não identificado visualmente, ii- identificar a causa de sintomas visuais observados no campo, iii- mapear áreas que apresentam suprimento não adequado de nutrientes, vi- avaliar se um determinado nutriente aplicado foi absorvido pela planta, v- identificar interações entre nutrientes, vi- caracterizar a causa específica de um problema nutricional, vii- juntamente com a análise de solo, orientar um programa racional de adubação e correção do mesmo. (19)

As principais análises realizadas em material vegetal são para os elementos N, P, K, Ca, Mg, S, B, Co, Cu, Fe, Na, Mn, Ni, Mo e Zn, constituindo um dos parâmetros mais eficientes para avaliar o estado nutricional das plantas. (19)

Para ilustrar a importância do segmento de análises químicas na agricultura, o Instituto Agrônomo (IAC) de Campinas, um dos órgãos que realiza o programa de qualidade de laboratórios de análises de solos no Brasil, reporta que no ano de 2014 foram feitas 1 milhão e 200 mil análises de solo, por 60% dos laboratórios participantes do ensaio de proficiência do IAC, sendo que metade desses laboratórios estão localizados em São Paulo. Dessas análises 358 mil foram de micronutrientes e 310 mil de granulometria. (20) Esses números evidenciam a importância da análise de solos como uma ferramenta na agricultura de precisão,

visando à alta produtividade, e um seguimento econômico vigoroso de prestação de serviços.

2.3 A importância dos nutrientes em solos e material vegetal

O nitrogênio faz parte da composição de muitos compostos estruturais das plantas como aminoácidos e proteínas. É o elemento essencial que as plantas necessitam em maior quantidade. (3) As principais fontes de nitrogênio para a cultura são o solo, por meio da decomposição da matéria orgânica, da aplicação de adubos nitrogenados e da fixação biológica de N_2 atmosférico assistida por bactérias do grupo dos rizóbio. (21)

Além do elevado custo econômico, o uso de adubos nitrogenados em solos tropicais tem ainda um custo ecológico adicional. Considera-se que as perdas de adubos nitrogenados aplicados estão em torno de 50%, sendo ocasionadas principalmente por lixiviação, na forma de nitrato e deslocamento superficial, provocado pela água das chuvas e, ou, irrigação. O nitrogênio perdido nesse processo é altamente poluente e, uma vez carregado para o lençol freático, provoca a contaminação dos aquíferos subterrâneos, rios e lagos. Outras perdas de nitrogênio aplicado ocorrem nas formas gasosas, que retornam à atmosfera, sobretudo pelos processos de desnitrificação e volatilização. (21)

Os micronutrientes Mo, Co e Ni apresentam funções primordiais no ciclo biogênico do nitrogênio. Os micronutrientes são elementos químicos essenciais para os vegetais, porém em pequenas quantidades, quando comparados com os macronutrientes. São divididos em dois grupos, de acordo com a forma de absorção: catiônicos – Zn, Cu, Fe, Mn, Co e Ni – e aniônicos – B, Cl e Mo. (17)

O Mo é absorvido pelas plantas predominantemente como MoO_4^{2-} . Esse participa do metabolismo do nitrogênio em baixas concentrações, estando associado a enzimas envolvidas na redução de NO_3^- a NO_2^- , e de N_2 a NH_4^+ . A sua presença no solo ou na planta pode aumentar sensivelmente a produtividade de uma cultura. (5-6) A participação do Mo como cofator nas enzimas nitrogenase, redutase do nitrato e oxidase do sulfeto, está intimamente relacionada com o transporte de elétrons durante as reações bioquímicas. A redução do nitrato a nitrito é catalisada

pela enzima adaptativa redutase do nitrato, que requer a presença de flavina (NAD) e Mo, durante a reação. A nitrogenase também contém Mo (cofator de Fe-Mo e em alguns casos cofator de Fe-V) e é a enzima necessária para a fixação simbiótica do N_2 da atmosfera. (22)

Os sintomas de desequilíbrio nutricional em plantas cultivadas em solos deficientes de Mo caracterizam-se por plantas amareladas e folhas jovens retorcidas, com manchas necróticas nas margens dos folíolos. Apresenta, ainda, sintomas semelhantes à deficiência de nitrogênio, induzida pela deficiência de Mo, que causam a clorose total das folhas mais velhas, seguida de necrose, como consequência da inibição da atividade da redutase do nitrato e subsequente acúmulo de nitrato. (22)

Já o Co é absorvido pelas raízes das plantas como Co^{2+} . O Co é essencial para a fixação do $N_{2(g)}$, pois participa da cobalamina - um componente de várias enzimas em microrganismos fixadores de nitrogênio, e a sua deficiência pode dificultar a absorção de $N_{2(g)}$ da atmosfera. (7, 22-23)

A primeira constatação da essencialidade do Ni foi em 1975, quando Dixon e colaboradores, demonstraram que a enzima urease apresentava dois átomos de Ni na sua composição estrutural. (24) O Ni é absorvido pelas plantas preferencialmente como cátion Ni^{2+} , também sendo absorvido na forma de quelatos. (25)

Como constituinte da metaloenzima urease, o Ni auxilia a conversão da uréia $[CO(NH_2)_2]$ a amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). A uréia se origina da amida arginina sob a ação da enzima arginase. A deficiência de Ni, impedindo a ação da urease, leva ao acúmulo de uréia, o que causa manchas necróticas nas folhas. O Ni também participa da fixação simbiótica de $N_{2(g)}$, visto que aumenta a atividade da hidrogenase em bacterióides isolados dos nódulos. (8-9, 26)

Justifica-se assim a importância do monitoramento de Mo, Co e Ni em solos e tecidos vegetais, uma vez que esses elementos estão intimamente relacionados com a utilização mais eficiente de fertilizantes nitrogenados, o que é ecológica e economicamente atraente para a atividade agrícola.

2.4 Métodos de determinação elementar em solos e materiais vegetais

Solos constituem amostras desafiadoras em análises químicas por serem consideradas complexas, refratárias e por requererem condições vigorosas para solubilizá-los ou decompô-los.

As técnicas espectrométricas mais empregadas em análise elementar em amostras de solos e material vegetal utilizam sistemas de introdução de amostras líquidas. Nesses casos, as amostras sólidas precisam ser convertidas em soluções. Os procedimentos convencionais de preparo de amostras de solo e materiais vegetais por via úmida ou seca são considerados, na maioria das vezes, morosos, trabalhosos, passíveis de contaminação, vulneráveis à perda de analito(s), além de demandar uma grande quantidade de reagentes e de energia, e gerar um volume significativo de resíduos tóxicos.

Segundo a resolução CONAMA nº 420/2009 (27), o método oficial USEPA 3052 (28), deve ser empregado para determinar Mo, Ni e Co em solos agrícolas, residenciais e industriais. O método recomenda utilizar massas de solo da ordem de 0,5 – 1,0 g, e a combinação de ácidos nítrico e fluorídrico concentrados (cerca 9 mL de HNO_3 e 3 mL de HF) para solubilizar a amostra, e de ácido bórico para consumir o excesso de HF. É notório o grande volume de resíduos que são gerados por este método. Esse método também pode ser aplicado para outros elementos como Na, Fe, Zn, Al, Ca, Mn, Sb, Cr, Hg, Sr, As, Tl, Ba, Cu, V, Ce, K, B, Pb, Se, Cd, Mg e Ag.

Além da decomposição por via úmida descrita acima, o método oficial USEPA 3052 recomenda determinar Mo, Ni, Co e os demais elementos, por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e/ou espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). (28)

Para a análise de materiais vegetais, a Embrapa, recomenda a utilização de alguns procedimentos analíticos específicos para a determinação dos principais nutrientes essenciais às plantas (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Mo e Zn) e para

outros elementos benéficos utilizando a decomposição do material vegetal por via úmida ou via seca. (17)

A decomposição nítrico-perclórica é recomendada no preparo das amostras para a determinação de P, K, Na, Ca, Mg, S, V, Ni, Co, Cu, Fe, Mn, Zn dentre outros. Neste procedimento recomenda-se utilizar massas de tecido vegetal da ordem de 0,5 g, e a combinação de ácidos nítrico e perclórico concentrados (cerca 4 mL de HNO_3 e 2 mL de HClO_4) para decompor a amostra; com uma etapa prévia de decomposição de 12 horas e seguida por decomposição assistida por aquecimento condutivo em bloco digestor aberto. Para o N, é utilizada a decomposição ácida sulfúrica, e posterior determinação deste pelo método Kjeldhal. Há também a possibilidade de utilizar a decomposição ácida ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$) assistida por radiação microondas em frascos de alta pressão ou com radiação focalizada.

A decomposição por via seca é recomendada para a determinação de B e Mo. Neste procedimento recomenda-se utilizar massas de tecido vegetal da ordem de 0,5 g, sendo incinerada em mufla a 550°C por 2 a 4 horas. Obtem-se cinzas após esse processo de incineração, que são solubilizadas em 25 mL de ácido nítrico diluído. (17)

Estes métodos recomendam empregar as seguintes técnicas de determinação, espectrofotometria UV-VIS, fotometria de chama, espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

Nesse contexto a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua (HR-CS GFAAS) combinada com amostragem direta de amostras sólidas (DSS), apresenta uma excelente alternativa aos métodos oficiais para determinar micronutrientes em solos e materiais vegetais. Além do pré-tratamento mínimo da amostra, há a possibilidade da introdução direta da amostra no forno de grafite, o que possibilita o aumento da sensibilidade e da frequência analítica.

2.5 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

Na primeira metade do século XX, Robert Bunsen e Gustav Kirchhof investigaram os processos de absorção da luz através de experimentos sobre o princípio de reversão de linhas. Utilizando uma fonte contínua de radiação eles realizaram um estudo sistemático com metais alcalinos e alcalinos terrosos no qual os espectros de emissão obtidos pelos elementos eram comparados com as linhas negras do espectro solar. Neste estudo, eles concluíram que havia uma relação entre a emissão e absorção da radiação de forma que o espectro de luz poderia se empregado para caracterizar elementos químicos. (29)

Inicialmente foram poucos os pesquisadores que utilizaram os princípios descritos por Busen e Kirchoff para fins analíticos. Os primeiros equipamentos utilizavam fontes contínuas como fonte de radiação, pois eram as únicas disponíveis na época. No entanto, o arranjo instrumental limitado dificultava a identificação dos espectros atômicos para determinações quantitativas, tornando a técnica restrita a medidas de emissão. (30)

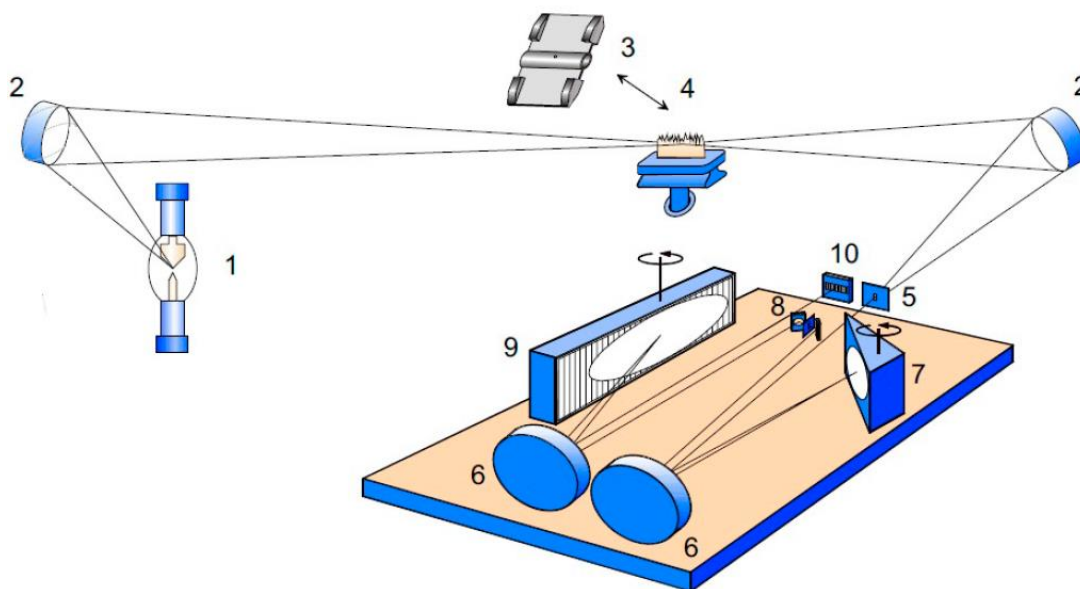
Em 1952, Alan Walsh concluiu que fontes de emissão de linhas (LS) seriam necessárias para realizar medidas em espectrometria de absorção atômica (AAS). Isso porque uma fonte contínua exigiria uma resolução de aproximadamente 2 pm, o não poderia ser atingida nem mesmo com os melhores monocromadores da época. Dessa maneira, surgiram os instrumentos de AAS com fontes de linhas (LS AAS). Esses utilizavam lâmpadas especialmente desenvolvidas para emitir apenas radiação com pequena largura (alguns picômetros), específica para cada elemento, tornando assim a técnica altamente seletiva e dispensando o uso de monocromadores de alta resolução. (31)

Resumidamente, a LS AAS apresenta algumas vantagens como i- o desenho relativamente simples e barato, uma vez que não há necessidade de monocromadores de alta resolução, ii- a alta seletividade e especificidade devidas ao uso de uma fonte de linha específica para determinado elemento, iii- reduzidas interferências espectrais ocasionadas por sobreposição de linhas de outros elementos, uma vez que há um número significativamente menor de linhas de absorção que de emissão, e iv- a robustez relativamente alta da chama e de

atomizadores eletrotérmicos com forno de grafite frente a constituintes da matriz . Entre as limitações inerentes à LS AAS, a mais frequentemente mencionada é o fato de ser uma técnica limitada à determinação monoelementar, o que torna o procedimento moroso se um grande número de elementos deve ser determinado em um conjunto de amostras. Além disto, esta técnica requer uma coleção grande de lâmpadas, as quais possuem vida útil limitada. (31)

Contudo a ideia de utilizar uma fonte contínua (CS) para AAS, nunca foi completamente esquecida. Em 1996 Heitmann e colaboradores propuseram o primeiro instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) cuja configuração é a mais próxima da atualmente utilizada. A Figura 1 ilustra uma representação esquemática da HR-CS AAS.

Figura 1- Representação esquemática da HR-CS AAS. 1- lâmpada de arco curto de xenônio, 2- espelhos elipsóides, 3 ou 4- atomizador (chama ou forno de grafite), 5- fenda de entrada do monocromador, 6- espelhos parabólicos, 7- prisma *Littrow*, 8- espelhos de deflexão e fenda intermediária variável, 9 rede *Echelle*, 10- detector CCD.



Fonte: Adaptado de Welz. (32)

O equipamento é constituído com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão (15 bar, quando fria), operando em modo “*hot spot*” cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 a 900 nm. A lâmpada é operada a uma potência de 300 W, e é constituída por dois eletrodos de tungstênio com uma

distância de 1 mm entre eles. A intensidade de emissão, desta forma, excede a de uma lâmpada de cátodo oco ou de descarga de eletrodo, em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude. (31-32)

A radiação incidente, após passagem pelo volume de absorção, é dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), onde incidirá em um prisma e em uma rede de difração Echelle, em arranjo Littrow. O prisma desempenha o papel de pré-dispersor, selecionando a parte do espectro de interesse, ao passo que o monocromador Echelle fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, na ordem de 2 pm por pixel (unidade fotossensível do detector) a 200 nm. O comprimento de onda de interesse é, desta forma, selecionado pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas, através de motores de passos sobre os quais estes componentes estão fixados. (32)

Por fim, a radiação transmitida após o processo de separação atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) sensível na região do UV. Esse dispositivo possui 512 x 58 *pixels*. Cada pixel é equipado com um amplificador individual, de maneira que o instrumento opera com 512 detectores independentes, 200 dos quais são normalmente utilizados para propósitos analíticos. Isto significa que todo o ambiente espectral a ± 200 pm ao redor da linha analítica torna-se “visível”, fornecendo uma série de informações indisponíveis em instrumentos convencionais. Dessa maneira é possível avaliar uma terceira dimensão do fenômeno que ocorre no atomizador, de maneira que há três diferentes possibilidades de visualizar a absorbância em HR-CS AAS: i- absorbância transiente (absorbância versus tempo), ii- absorbância integrada versus comprimento de onda, o que permite visualizar qualquer absorção de radiação que tenha ocorrido no intervalo espectral em análise, e iii- a imagem tridimensional, absorbância como função do tempo e do comprimento de onda, que certamente é o modo visualmente mais interessante de representação do potencial do HR-CS AAS no que diz respeito à visualização do ambiente espectral. (31-33)

Existem basicamente quatro maneiras de corrigir o fundo em instrumentos de HR-CS AAS: i- automaticamente via software para eventos contínuos; ii- separando temporalmente o sinal atômico do sinal de fundo, através do ajuste do

intervalo de integração do sinal (obviamente requer o surgimento do sinal atômico e do sinal de fundo em períodos diferentes durante a atomização); iii- separando espectralmente o sinal atômico do sinal de fundo (requer que o fundo não absorva radiação no mesmo comprimento de onda do analito), e iv- subtraindo o espectro do fundo do espectro de determinada amostra através de um algoritmo de mínimos quadrados, no caso em que haja sobreposição espectral e temporal do sinal do analito e do fundo. A última alternativa é particularmente interessante. (31)

Quando observa-se que há sobreposição espectral, a correção deste fundo pode ser feita em HR-CS AAS, utilizando o algoritmo de correção de fundo por mínimos quadrados (*Least Square Background Correction* – LSBC). Identificada a espécie responsável pela interferência espectral, a correção é feita pela subtração do espectro da amostra por um espectro referência obtido a partir de um composto que gere o fundo interferente. O procedimento matemático emprega um ajuste linear do espectro de referência para o espectro da amostra pela multiplicação de um fator de magnificação. As diferenças entre o espectro da amostra e o espectro de referência são calculadas pixel a pixel. A soma dos quadrados dos valores será adicionada após o fator de magnificação ter sido variado, para calcular os mínimos quadrados. Caso seja desejado é possível selecionar pixels específicos onde a correção deve ser efetuada. A aplicação do procedimento possibilita eliminar ou minimizar sobreposições espectrais (32), principalmente em amostragem direta de sólidos, uma vez que a introdução da totalidade da amostra no atomizador aumenta a probabilidade de ocorrer tais interferências.

2.6 Amostragem direta de sólidos em espectrometria atômica

Um dos pioneiros a realizar experimentos envolvendo a amostragem direta de sólidos em espectrometria de absorção atômica data de 1957, foi Boris L'vov introduzindo pequenas massas de cloreto de sódio para realizar análise elementar. (34)

O termo análise de sólidos consiste na introdução de pequenas massas do material a ser analisado diretamente no instrumento a ser realizado a medida. Essa

introdução pode ser feita através de suspensões (SiS) ou por meio de amostragem direta de amostra pulverizada (DSS) com o tamanho de partícula controlado. (35)

Atualmente o emprego da amostragem direta de sólidos associada à HR-CS AAS, tem proporcionado um aumento significativo no número de aplicações. Os espectrômetros de absorção atômica equipados com atomizadores eletrotérmicos de forno de grafite possuem características apropriadas para o emprego da amostragem direta de sólido. Dentre as principais características estão i- a possibilidade de eliminação da matriz da amostra durante a etapa de pirólise, ii- a configuração dos fornos de grafite projetados com aquecimento transversal que proporcionam ambiente isotérmico dentro do tubo de grafite durante a atomização, iii- pequenas quantidades de amostras podem ser analisadas, podendo variar de 0,01 a 10 mg, v- os problemas relacionados ao sistema de transporte são praticamente inexistentes em DSS GFAAS, uma vez que o transporte das suspensões é feito por amostragem discreta, e os sólidos são pesados diretamente nas plataformas de grafite que são, posteriormente, introduzidas no atomizador, iv- a adequada otimização do programa de aquecimento, aliada ao uso de modificadores químicos, possibilita, na maioria das vezes, a calibração do equipamento com soluções aquosas. (10,35)

Os dois modos de introdução da amostra, apresentam todas as vantagens da análise direta de sólidos, como já mencionados. A grande vantagem dos métodos que empregam o preparo das suspensões é que os mesmos combinam a amostragem sólida com a líquida, ou seja, as amostras podem ser introduzidas no equipamento utilizando o sistema de amostragem de soluções, como através de um nebulizador pneumático. Apesar de reunir diversas vantagens, o procedimento não está isento de algumas dificuldades. Entre elas, destaca-se como fator crítico, a estabilidade da suspensão que pode comprometer a reprodutibilidade da amostragem e, conseqüentemente a precisão dos resultados. Outro fator que deve ser rigorosamente controlado é a distribuição do tamanho das partículas, pois esta pode prejudicar a eficiência no transporte ou causar entupimento dos nebulizadores. (36)

No caso da amostragem direta de sólidos é necessário um sistema especial para a introdução da amostra. A Analytica Jena® desenvolveu uma plataforma móvel

modelo “boat” ou “barco” fabricada de grafite pirolítico, para a introdução das amostras (líquidas ou sólidas) no tubo de grafite. O processo de amostragem (pesagem e introdução de amostra no atomizador) é conduzido pelo braço mecânico robotizado que possui um par de pinças projetadas especificamente para encaixar a plataforma e realizar todas as operações de amostragem. (37)

A homogeneização é um importante processo da etapa de preparo de amostra para análise direta de sólidos e é facilmente alcançada por procedimentos de moagem. Em geral, quanto mais estreita a faixa de distribuição do tamanho de partícula e menor o seu diâmetro ($< 10 \mu\text{m}$) melhor será a homogeneidade da amostra. (35) A homogeneidade é uma característica particular do tipo de amostra e depende da quantidade de analito presente, bem como de sua distribuição no material sólido. É necessário estabelecer as menores massas representativas que podem ser analisadas sem comprometer a precisão e exatidão dos resultados. (35, 38)

As informações relativas aos erros de amostragem, por consequência da baixa homogeneidade de uma pequena massa de amostra, podem ser estabelecidas através da constante de Homogeneidade (H_e), $H_e = S_H \times m^{1/2}$, proposta por Kurfürst. A incerteza da amostragem S_H de uma determinada massa de amostra m (em mg) pode ser estimada a partir dos valores do RSD das medidas, considerando as incertezas do procedimento analítico. Como a massa m normalmente empregada é em torno de 1 mg, H_e representa a imprecisão devida à amostragem para 1 mg de amostra. Quando o fator de homogeneidade for menor que 10 ($H_e < 10$), o material pode ser considerado suficientemente homogêneo. (10,35)

2.7 Aplicações da SS HR-CS GFAAS em materiais vegetais e solos

A literatura relata algumas aplicações empregando a amostragem direta de sólidos para vários analitos e matrizes. A seguir, será discutida brevemente, a aplicação da SS HR-CS GFAAS em materiais vegetais e solos.

Duarte et al. (39), propuseram um método de determinação de Pb em amostras de biomassa vegetal e produtos de pirólise das mesmas empregando SS. Não necessitou utilizar modificador químico e a calibração pôde ser feita utilizando

padrões aquosos. Os limites de quantificação foram $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Pb - 217,001 nm) e $19 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Pb – 283,306 nm). Os valores de RSD foram entre 3 a 10%.

A determinação simultânea de Ni e Fe em plantas e líquens foi proposto por Gómes-Nieto et al. (40), monitorando a linha principal para Ni (232,003 nm) e a linha secundária para Fe (232,036 nm). Foi observada interferência espectral provocada por estruturas rotacionais finas de moléculas de SiO, sendo corrigida aplicando o algoritmo LSBC. Os limites de quantificação foram $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ Ni e $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe. Os valores de RSD obtidos estiveram entre 7 a 12%.

Rêgo et al. (41), determinaram Pb em plantas medicinais por DSS HR-CS GFAAS, neste trabalho quatro diferentes modificadores forma estudados. O uso de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico e a pirólise assistida com ar foram as condições que obteve-se os melhores resultados e pode-se utilizar a calibração com padrões aquosos. O limite de quantificação do método foi de $0,024 \mu\text{g g}^{-1}$, e o RSD foi 10%.

Há apenas um trabalho na literatura que avaliou a SS HR-CS GFAAS para determinação de metais em solos. Boschetti et al. propuseram a determinação sequencial e simultânea de Cd, Cr, Fe e Al (via molécula AlH) em diferentes solos. Primeiramente, Cd (228,802 nm) foi determinado utilizando as temperaturas de compromisso em 800°C e 1700°C . Posteriormente, depois de alterar o comprimento de onda, Cr (425,433 nm), Fe (425,076 nm) e Al (425,315 nm) foram determinados simultaneamente a partir da mesma alíquota de amostra utilizando 2600°C como a temperatura de atomização para Cr e Fe, e como temperatura de vaporização para AlH. A interferência causada por Al na determinação Cd foi minimizada por meio da adição de 10 mL de uma solução 10% v/v H_2SO_4 . Soluções padrão aquosas foram utilizados para a calibração e os limites de detecção obtidos foram de $7,3 \text{ pg mg}^{-1}$ Cd, $0,13 \text{ ng mg}^{-1}$ Cr, $0,07 \text{ ng mg}^{-1}$ Fe e $0,42 \mu\text{g mg}^{-1}$ Al. Valores de RSD foram menores que 10%. (42)

Há outros dois trabalhos na literatura (43-44) que avaliaram a SS HR-CS GFAAS para determinação elementar em sedimentos. Orani et al. (43) determinaram As, Cd, Cu, Ni, Co e Cr em amostras de sedimentos marinhos. Nesse trabalho não necessitou adicionar modificadores químicos para os analitos. Devido a efeitos significativos de matriz a calibração para todos os analitos foi realizada com padrões

sólidos (CRMs). Os limites de quantificação para As, Cd, Co, Cr, Cu e Ni foram 0,03; 0,02; 0,027; 0,018; 0,026 ng, respectivamente. A linha ressonante do Sb em 231,147 nm foi escolhida para determinação de Sb em sedimentos. Foi utilizado Ir como modificador químico permanente, e nessa situação as interferências espectrais oriundas de moléculas diatômicas SiO e PO foram corrigidas utilizando o algoritmo LSBC. Limite de detecção foi de 0,02 $\mu\text{g mg}^{-1}$ e o RSD variou de 7 a 17%. (44)

Nesse contexto, demonstra-se a carência na literatura e de estudos envolvendo a amostragem direta de sólidos associada à HR-CS GFAAS no desenvolvimento de métodos para amostras complexas, de difícil solubilização, e desafiadoras como solos e plantas. Apresenta-se ainda como alternativa rápida simples e que contribua substancialmente com os princípios “química verde” devido a pouca quantidade de resíduos produzidos.

3 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi desenvolver métodos analíticos de análise de amostras complexas de difícil solubilização como material vegetal e solo para determinar Co, Mo e Ni por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução e fonte continua empregando amostragem direta de sólidos.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- i- Determinação de Co, Mo e Ni em material vegetal;
- ii- Identificação de possíveis interferências espectrais e aplicação do algoritmo matemático de correção de fundo por mínimos quadrados;
- iii- Determinação de Mo e Ni em solo
- iv- Determinação conjunta de Co e V em solo;
- v- Utilização de ferramentas quimiométricas no estabelecimento dos programas de aquecimentos do atomizador;
- vi- Avaliação da amostragem direta de sólidos em HR-CS GFAAS no desenvolvimento de métodos analíticos para laboratórios de rotina dedicados a análises de material vegetal e de fertilidade de solos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

As determinações por HR-CS GFAAS foram feitas utilizando espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua AnalytikJena® ContrAA 700 (Jena, Alemanha), equipado com lâmpada de arco curto de xenônio de 300 W (XBO 301, GLE®, Alemanha) operando em modo "*hot spot*" com emissão de radiação de 190 a 900 nm, um monocromador DEMON (*double-echellemonocromator*), constituído de um prisma e uma rede de difração Echelle, em arranjo Littrow, que permite alta resolução (~2,0 pm por pixel), um detector CCD e um auto amostrador de sólidos SSA 600.

As medidas de absorbância integrada no comprimento de onda foram feitas em 3 pixels ($CP \pm 1$; CP: pixel central correspondente ao centro da linha) nos comprimentos de onda: 240,725 nm, 304,400 nm, 313,221 nm (Co); 313,259 nm (Mo); 313,410 nm, 341,347 nm, 341,394 nm, 341,312 nm (Ni); 304,312 nm, 304,355 nm, 304,494 nm (V). Para as medidas em amostragem de sólidos foram utilizados tubos de grafites com recobrimento pirolítico sem o orifício de injeção.

As amostras sólidas foram transferidas manualmente até a plataforma de grafite via espátula, e pesadas automaticamente em uma micro balança Sartorius WZ2PW (Göttingen, Alemanha) com precisão de 0,001 mg. Os padrões aquosos de calibração e soluções dos modificadores químicos foram pipetados manualmente com o auxílio de micropipetas Eppendorf® (0,5 - 10µL).

Como gás de purga e proteção, utilizou-se argônio com pureza de 99,996 % (White Martins, São Paulo).

As amostras de material vegetal e solo foram secas em uma estufa com circulação e renovação de ar Tecnal TE-394/2 (Piracicaba, Brasil). As amostras secas de material vegetal foram posteriormente submetidas a moagem em moinhos de facas tipo Willey Tecnal 648 (Piracicaba, Brasil), utilizando peneiras de 10, 20 e 30 *mesh*. Todas as amostras de material vegetal e solos foram moídas em moinho criogênico SPEX 6800 (Metuchen, USA).

4.2 Reagentes, soluções analíticas, amostras e materiais de referência certificados

Todas as soluções foram preparadas utilizando água de elevada pureza (resistividade 18.2 M Ω .cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Rios 5[®] e deionizador Milli-Q[™] Academic[®] (Millipore, Bedford, EUA).

Ácido nítrico 65% (m/m) HNO₃ Suprapur[®] Merck (Darmstadt, Alemanha), foi utilizado para o preparo de todas as soluções padrão.

Triton X-100 (Mallinckrodt, Paris, USA) foi utilizado como surfactante no preparo das soluções de modificadores.

Soluções padrão de Co, Mo, Ni e V foram preparadas por meio de diluições apropriadas de soluções estoque monoelementares de 100 mg L⁻¹ Mo e 1000 mg L⁻¹ Co, Ni e V (Specsol, São Paulo, Brasil).

Solução de modificador químicos contendo 1000 mg L⁻¹ Pd + 500 mg L⁻¹ Mg na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100, foi preparada pela diluição de 1 mL de solução estoque Pd(NO₃)₂ 10 g L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e por dissolução de 52,74 mg Mg(NO₃)₂.6H₂O (Suprapur[®] Merck, Darmstadt, Alemanha), com posterior diluição para 10 mL com água deionizada.

Solução de modificador químico de 2000 mg L⁻¹ Mg(NO₃)₂ na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100, foi preparada pela dissolução de 210,96 mg Mg(NO₃)₂.6H₂O, com posterior diluição para 10 mL com água deionizada.

Solução de modificador químico de 30% (m/v) NH₄F na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100, foi preparada pela dissolução de 3 g NH₄F, com posterior diluição para 10 mL com água deionizada.

Foram coletadas diferentes amostras de materiais vegetais em diferentes localidades: fibra de bananeira (Ribeira - SP), palhada de soja (Rio Paranaíba - MG e São Gotardo - MG), palhada de milho (São Gotardo - MG), casca de café (Rio Paranaíba - MG), casca de amendoim (Araraquara - SP e Monte Alto - SP), bagaço de cana-de-açúcar (Araraquara - SP e Rio Paranaíba - MG), capim napiê (Rio Paranaíba - MG) e folhas de cana-de-açúcar (Araraquara - SP).

Seis amostras de diferentes solos foram cedidas por um laboratório de análise de fertilidade de solos da cidade de São Gotardo (Minas Gerais, Brasil). Algumas propriedades físico-químicas dos solos utilizados estão no Anexo 1.

Os materiais de referência de vegetais (1573a *Tomato Leaves*, 1515 *Apple Leaves*, 1572 *Citrus Leaves*, 1547 *Peach Leaves*, 1575a *Trace Elements in Pine Needles*, todos do National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA; INCT-OBTL-5 *Oriental Basma Tobacco Leaves* do Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, Polônia); e os de referência de solos (2709a *San Joaquin Soil*, 2711a *Montana Soil II*, ambos do National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EUA, IAEA-SOIL-7 *Trace Elements in Soil*, da International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria; GBW07104 *Rock-Constituents* do China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing, China; RTC-CRM031-040- *Sewage sludge3 – Metals* da Resource Technology Corporation, Loramie, USA) foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos propostos.

Todas as vidrarias e frascos para armazenamento de soluções ou amostras foram lavados com solução 10% (v/v) de detergente neutro Extran[®], deixados em 10% (v/v) HNO₃ durante 24 h e em seguida enxaguados abundantemente com água deionizada antes da sua utilização.

4.3 Preparo das amostras

Apesar de dispensar os morosos pré-tratamentos convencionais de amostras, na análise direta de sólidos por GFAAS é recomendável que as amostras secas sejam finamente moídas, bem homogêneas, de tal forma que qualquer porção represente o todo. As amostras de materiais vegetais foram inicialmente lavadas com água deionizada e secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 48 horas. As amostras secas foram moídas em moinhos de facas com peneira de 10, 20 e 30 *mesh*, sequencialmente, e posteriormente submetidas a moagem em moinho criogênico. As amostras de solos foram secas em estufa de circulação forçada de ar aquecido a 65°C por 48 horas, e submetidas apenas a moagem criogênica.

Os programas das moagens criogênicas de material vegetal e de solos compreenderam etapas de pré-congelamento e de moagem e estão apresentados na Tabela 1. Todas as amostras foram posteriormente armazenadas em dessecador.

Tabela 1- Programa utilizado para a moagem criogênica das amostras de material vegetal e de solos.

Etapa	Tempo (minutos)
Pré-congelamento	2
Moagem ^{a,b}	3
Congelamento entre as moagens	2

a= 2 ciclos por moagem para material vegetal

b= 3 ciclos por moagem para solo

Fonte: Autor, 2016.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Determinação de Co em material vegetal

As medidas de absorção atômica de Co nas amostras foram feitas na linha 240,725 nm (100% de sensibilidade relativa). As absorbâncias integradas foram normalizadas para 1,0 mg de amostra. As medidas foram feitas em triplicata (n=3) com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 *pixels*.

O comportamento térmico do Co foi avaliado por meio da otimização do programa de aquecimento do forno de grafite em meio aquoso e meio sólido, pela construção de curvas de temperatura de pirólise e de atomização. Esse estudo empregou 3 µL de uma solução padrão 50 µg L⁻¹ Co em 0,1% (v/v) HNO₃ (150 pg Co) e massas entre 0,4 – 0,6 mg do material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (150 - 239 pg Co).

As curvas de pirólise foram construídas no intervalo de 400 a 1800°C, com temperatura de atomização fixada preliminarmente em 2500°C, na ausência e na presença de 5 µL do modificador químico Pd/Mg (5 µg Pd(NO₃)₂ + 2,5 µg Mg(NO₃)₂). As temperaturas de atomização foram avaliadas entre 2000 e 2800°C, fixando a temperatura de pirólise em 1400°C, na ausência de modificador químico.

Com o programa de aquecimento estabelecido, a influência da matriz de material vegetal na sensibilidade foi avaliada por meio da construção de curvas de calibração para Co em meio aquoso e meio sólido no intervalo de 0 - 360 pg Co. Esse intervalo foi obtido por meio da adição de diferentes alíquotas (0 - 18 µL) da solução padrão 20 µg L⁻¹ Co (meio aquoso) e diferentes massas (meio sólido) do CRM 1570a *Spinach Leaves* (0 - 0,95 mg). O primeiro ponto das curvas de calibração correspondendo a concentração zero (0 pg) foi obtido utilizando o conceito de massa zero, ou seja, com a plataforma “vazia”. Cada ponto da curva corresponde a média de uma triplicata. Aplicando o teste estatístico teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança, verificou se os coeficientes angulares dessas curvas se diferem significativamente.

O estudo de massa mínima para a determinação de Co foi investigado utilizando dez intervalos de massa que cobrem a faixa de massa 0,05 – 1,0 mg de *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*. As leituras de absorbância nesses intervalos foram realizadas em incrementos de 0,1 mg. Cada incremento corresponde a média de três repetições.

Foi construída a curva analítica para Co com CRM 1570a *Spinach Leaves*, no intervalo de 10 - 540 pg Co para a análise das amostras de materiais vegetais.

A exatidão do método proposto foi avaliada pela análise de três CRMs de materiais vegetais: *INCT-OBTL-5- Oriental Basma Tobacco Leaves*, *1573a Tomato Leaves* e *1515 Apple Leaves*.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com a recomendação da IUPAC (45): $3.SD^{\text{branco}}/b$ (LOD) e $10.SD^{\text{branco}}/b$, sendo SD o desvio padrão correspondente a 10 medidas do branco (plataforma vazia) e b o coeficiente angular da curva de calibração.

Para análise por DSS HR-CS GFAAS, massas de material vegetal entre 0,4 – 0,5 mg foram transferidas manualmente para a plataforma de amostragem de sólidos, pesadas e introduzidas automaticamente na câmara de atomização. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.4.2 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal empregando Co como padrão interno

As medidas de absorção atômica foram feitas nas linhas 313,221 nm (Co), 313,259 nm (Mo) e 313,410 nm (Ni). As medidas foram feitas em triplicata (n=3) com absorbância integrada equivalente a 3 pixels.

A avaliação dos comportamentos térmicos de Co, Mo e Ni e a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite foram realizadas utilizando um planejamento fatorial completo do tipo 2^n , sendo n o número de variáveis envolvidas.

Estas variáveis foram avaliadas em dois níveis denominados nível máximo (+) e nível mínimo (-). As variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise, temperatura de atomização e presença de modificador químico. Níveis máximo e mínimo de cada fator foram 1400 e 1600°C (temperatura de pirólise), 2400 e 2600°C (temperatura de atomização) e 0 e 5 $\mu\text{g Mg(NO}_3)_2$ (modificador químico), respectivamente.

Posteriormente foi criada uma matriz experimental para a execução dos experimentos (Tabela 2).

Tabela 2- Matriz experimental para avaliar o efeito da temperatura de pirólise, temperatura de atomização e uso de modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ na determinação de Mo, Ni e Co.

Experimento *	Variáveis		
	Temperatura de Pirólise (°C)	Temperatura de Atomização (°C)	Uso do Modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (µg)
1	1400	2400	0
2	1600	2400	0
3	1400	2600	0
4	1600	2600	0
5	1400	2400	5
6	1600	2400	5
7	1400	2600	5
8	1600	2600	5

*n=3.

Fonte: Autor, 2016.

Os experimentos foram feitos utilizando-se 5 µL de uma solução padrão 100 mg L⁻¹ Co em 0,1% (v/v) HNO_3 (500 ng Co) e aproximadamente 0,5 mg do material de referência certificado *INCT-OBTL-5- Oriental Basma Tobacco Leaves* (0,21 ng Mo e 4,25 ng Ni), e o programa de aquecimento do atomizador descrito na Tabela 3.

Tabela 3- Programa de aquecimento do atomizador utilizado para no planejamento fatorial 2³ detalhado na Tabela 2.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	110	6	10	2,0
Secagem 2	130	5	10	2,0
Pirólise	Tp [*]	50	10	2,0
Auto-zero ^a	Tp [*]	0	5	0
Atomização	Ta [*]	3000	12	0
Limpeza	2650	500	4	2,0

^aEtapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

* Tp = temperatura de pirólise e Ta = temperatura de atomização que foram avaliadas.

Fonte: Autor, 2016.

Absorbância integrada, medida em triplicata (n=3), foi normalizada e utilizada como resposta analítica. É importante ressaltar que estes experimentos foram executados em ordem aleatória para evitarem erros sistemáticos.

Os dados experimentais foram processados utilizando o software Statgraphics Centurion XVI, a versão 16.1.15. disponível em <http://statgraphics.softonic.com.br/download>. Este software permitiu gerar os gráficos de Pareto e de contorno sobrepostos, pelos quais foram selecionadas as temperaturas de compromisso para medida simultânea de Mo, Ni e Co.

Os valores otimizados, obtidos pelo planejamento fatorial, foram usados no programa de aquecimento do forno de grafite para as medidas subsequentes.

Depois de estabelecido o programa de aquecimento, foi construída curva de resposta no intervalo de 50 a 1200 ng Co a fim de verificar o intervalo de resposta linear, uma vez que a massa de Co a ser adicionada como padrão interno, aos brancos, soluções analíticas e amostras deve estar situada nesse intervalo.

Utilizando soluções padrão, foram construídas curvas de calibração para Mo e Ni no intervalo de 0 - 0,33 ng e 0 - 8,50 ng, respectivamente. Esses intervalos foram obtidos por meio da adição de diferentes alíquotas das soluções padrão 0,021

mg L⁻¹ Mo e 0,425 mg L⁻¹ Ni. A influência de possíveis efeitos de matriz de material vegetal na sensibilidade foi avaliada por meio da construção de curvas de calibração em meio aquoso e sólido empregando diferentes alíquotas (0 - 20 µL) das soluções padrão e diferentes massas (0 - 1,0 mg) do CRM *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*. Aplicando o teste estatístico teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança, verificou-se se os coeficientes angulares dessas curvas se diferem significativamente.

Nas determinações de Ni, os brancos, padrões aquosos e sólidos, e amostras foram enriquecidos com 1000 ng Co como padrão interno.

O estudo de massa mínima na determinação simultânea de Mo e Ni foi investigado no intervalo de massa de 0,05 - 1,0 mg utilizando *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*. As medidas de absorbância nesses intervalos foram feitas em triplicata após incrementos de 0,1 mg a partir de 0,05 mg do CRM.

A exatidão do método proposto foi avaliada pela análise de seis CRMs de material vegetal: *1573a Tomato Leaves*, *1515 Apple Leaves*, *1572 Citrus Leaves*, *1547 Peach Leaves*, *1575a Trace Elements in Pine Needles* e *INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves*.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com a recomendação da IUPAC (45).

Para a análise simultânea por DSS HR-CS GFAAS, massas de material vegetal entre 0,35 - 0,45 mg foram transferidas manualmente para a plataforma de amostragem de sólidos, que foram pesadas, e posteriormente adicionou-se 5 µL de uma solução padrão 200 mg L⁻¹ Co em 0,1% (v/v) HNO₃ (1000 ng Co) e finalmente introduzidas automaticamente no forno de grafite. Todas as medidas foram feitas em triplicata (n=3).

4.4.3 Determinação de Mo, Ni, Co e V em solo

As linhas selecionadas para as medidas de absorbância foram 313,259 nm (Mo), 341,347 nm e 341,477 nm (Ni), 304,400 nm (Co), 304,355 nm e 304,494 nm (V). As medidas foram feitas em triplicata (n=3) com absorbância integrada equivalente a 3 pixels.

A avaliação dos comportamentos térmicos do Mo, Ni, Co e V usando a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite foi feita por meio de um planejamento fatorial completo em dois níveis (2^n , sendo n o número de variáveis avaliadas). As variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise e temperatura de atomização. Essas variáveis foram avaliadas em nível máximo (+) e nível mínimo (-), conforme a matriz experimental descrita na Tabela 4. Esta tabela mostra também os níveis mínimo e máximo de cada variável para Mo, Ni, Co e V.

Tabela 4- Matriz experimental planejada para avaliar o efeito da temperatura de pirólise e da temperatura de atomização de Mo, Ni, Co e V em solos.

Experimento*	Variáveis							
	Temperatura de Pirólise (°C)				Temperatura de Atomização (°C)			
	Nível	Mo	Ni	Co e V	Nível	Mo	Ni	Co e V
1	-	1400	1300	1300	-	2550	2550	2500
2	+	1600	1500	1500	-	2550	2550	2500
3	-	1400	1300	1300	+	2650	2650	2650
4	+	1600	1500	1500	+	2650	2650	2650

*n=3

Fonte: Autor, 2016.

Esses experimentos foram conduzidos com uma amostra de solo em ordem aleatória utilizando massas de amostra no intervalo de 0,150 a 0,200 mg para Mo, e no intervalo de 0,100 a 0,150 mg para Ni, Co e V. Os experimentos para Ni, foram acrescentados 2 µL de uma solução 2000 mg L⁻¹ Mg(NO₃)₂ contendo 0,05% (m/v) de Triton X-100, como modificador químico. E nos experimentos para Co e V empregou-se 5 µL de uma solução 30% (m/v) NH₄F contendo 0,05% (m/v) de Triton X-100 como modificador químico. A absorbância integrada, medida em triplicata, foi normalizada e utilizada como resposta analítica. Aplicou-se o programa de aquecimento da Tabela 5 para executar os experimentos do planejamento fatorial.

Tabela 5- Programa de aquecimento utilizando para executar os experimentos do planejamento fatorial 2^2 para a determinação de Mo, Ni, Co e V.

Etapa	Mo			Ni			Co e V			Fluxo de Ar (L min ⁻¹)
	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	
Secagem 1	130	15	20	110	10	20	100	6	10	2
Secagem 2	300	20	20	250	15	10	250	10	35	2
Pirólise	Tp*	50	15	Tp*	100	10	Tp*	150	10	2
Auto-zero ^a	Tp*	0	5	Tp*	0	5	Tp*	0	5	0
Atomização	Ta*	3000	12	Ta*	3000	10	Ta*	3000	10	0
Limpeza	2650	0	4	2650	0	5	2650	0	5	2

^aEtapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

* Tp = temperatura de pirólise e Ta* = temperatura de atomização que foram avaliadas.

Fonte: Autor, 2016

Os dados experimentais foram processados utilizando o software Statgraphics Centurion XVI, versão 16.1.15. Este software gerou o gráfico de Pareto e o gráfico de contorno sobreposto, pelos quais foram estabelecidas as temperaturas de compromisso para cada analito ou para o monitoramento simultâneo de Co e V. Os valores otimizados pelo planejamento fatorial foram utilizados no programa de aquecimento do forno de grafite nos experimentos subsequentes.

Estabelecido o programa de aquecimento, foram construídas curvas de calibração nos seguintes intervalos: 0 - 0,54 ng Mo; 0 - 500 ng Ni; 0 - 5,0 ng Co e 0 - 40 ng V. Esses intervalos foram obtidos por meio da adição de diferentes alíquotas das soluções padrão: 0,062 mg L⁻¹ Mo, 2,2 mg L⁻¹ Ni, 100 mg L⁻¹ Ni, 0,50 mg L⁻¹ Co e 4,0 mg L⁻¹ V.

A influência da matriz de solo na sensibilidade foi avaliada por meio da construção de curvas de calibração (0 - 0,54 ng Mo; 0 - 500 ng Ni; 0 - 4,0 ng Co e 0 - 33 ng V) a partir de diferentes alíquotas (meio aquoso) das soluções padrão ou diferentes massas (meio sólido) do *GBW07104 Rock-Constituents* (Mo: 0 - 1,0 mg) e do *2711a Montana Soil II* (Ni, Co e V: 0 - 0,5 mg). Cada ponto da curva corresponde à média de uma triplicata. Aplicando o teste estatístico teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança, verificou-se se os coeficientes angulares dessas curvas se diferem significativamente.

O estudo de massa mínima para a determinação de Mo foi investigado no intervalo de massa de 0,05 - 1,0 mg utilizando *GBW07104 Rock - Constituents* e para Ni, Co e V investigou-se no intervalo de 0,05 - 0,5 mg utilizando o *2711a Montana Soil II*. As medidas de absorvância nesses intervalos foram feitas em incrementos de 0,1 mg. Cada incremento corresponde à média de três repetições.

A exatidão do método proposto foi avaliada pela análise de quatro CRMs de solos: *2709a San Joaquim Soil*, *2711a Montana Soil II*, *IAEA-SOIL-7 Trace Elements in Soil* e *GBW07104 Rock - Constituents*, *RTC-CRM031-040- Sewage sludge3 - Metals*.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com a recomendação da IUPAC (45): $3.SD^{\text{branco}}/b$ (LOD) e $10.SD^{\text{branco}}/b$,

sendo SD o desvio padrão correspondente a 10 medidas do branco (plataforma vazia) e b o coeficiente angular da curva de calibração.

Para a determinação de Mo, Ni, Co e V por DSS HR-CS GFAAS, massas de solos entre 0,150 - 0,250 mg foram transferidas para a plataforma, pesadas e introduzidas automaticamente no forno de grafite. Para a determinação de Ni, adicionou-se 2 µL de uma solução 2000 mg L⁻¹ Mg(NO₃)₂ na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100 (20 µg Mg(NO₃)₂) como modificador químico; na determinação conjunta de Co e V adicionou-se 5 µL de uma solução 30% (m/v) NH₄F na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100 (1.5 mg NH₄F). Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação de Co em material vegetal

5.1.1 Comportamento térmico do Co

A otimização do programa de aquecimento é uma das etapas mais importantes em GFAAS, em especial quando se emprega amostragem direta de sólidos porque a matriz da amostra está integralmente presente no atomizador em elevada quantidade, podendo influenciar na formação da nuvem atômica e consequentemente no sinal analítico. Desse modo a otimização das temperaturas do programa de aquecimento do forno de grafite requer cuidado especial quando se pretende calibrar com padrões aquosos os métodos envolvendo análise direta de sólidos.

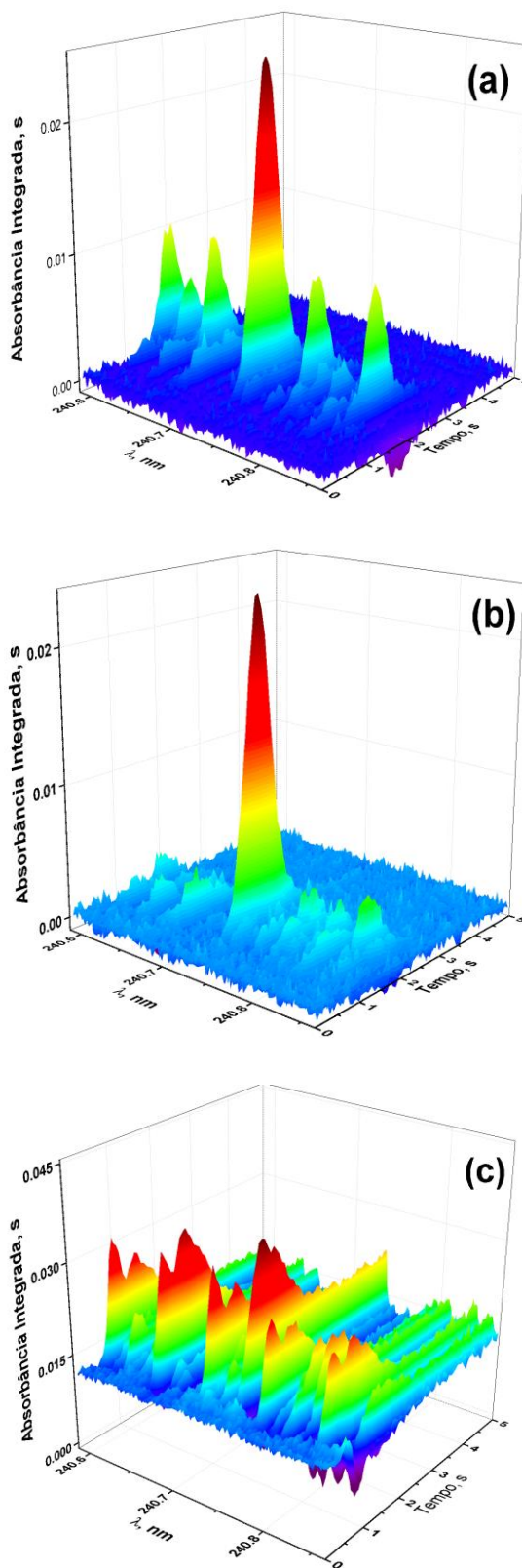
A temperatura de pirólise deve ser otimizada de modo que os concomitantes da amostra sejam eliminados eficientemente e sem perdas significativas do sinal analítico, já a temperatura de atomização conforme o perfil do sinal transiente obtido, a repetibilidade e dos desvios obtidos.

Estudos preliminares avaliaram a linha ressonante do Co em 240,725 nm. Esta linha demonstrou ser adequada às concentrações de Co normalmente encontradas em materiais vegetais (não excedem 1 mg kg^{-1}), embora sejam relatadas concentrações de 0,05 a 10 mg kg^{-1} . (47) Nesse estudo, foram observadas interferências espectrais na região espectral da linha atômica do Co que compreende o intervalo de 240,586 nm a 240,863 nm (Figura 2a). Essa interferência foi atribuída às estruturas rotacionais finas de moléculas diatômicas SiO. As moléculas SiO apresentam a mesma transição eletrônica de $A^1\Pi - X^1\Sigma^+$, e diferentes transições vibracionais que podem ocorrer no intervalo espectral entre 216 nm a 260 nm. (32)

Esse fundo estruturado pode provocar interferência espectral e, portanto deve ser corrigido. Fundo estruturado não é corrigido automaticamente em HR-CS AAS, mas após as medidas serem obtidas a correção do fundo é feita através do reprocessamento dos dados. A HR-CS AAS possui um algoritmo matemático para correção de fundo por mínimo quadrados – *Least-Square Background Correction*

(LSBC). O software do espectrometro armazena um espectro de referência gerado a partir de um reagente ou mistura de reagentes que contenha o interferente e subtrai os espectros registrados das amostras por meio de um algoritmo de mínimos quadrados. Para a geração desse espectro de referência utilizou-se dióxido de silício (SiO_2) para corrigir sinais de SiO, Figura 2b. Como as interferências espectrais de SiO não são separadas temporalmente, estas foram corrigidas por LSBC (Figura 2c).

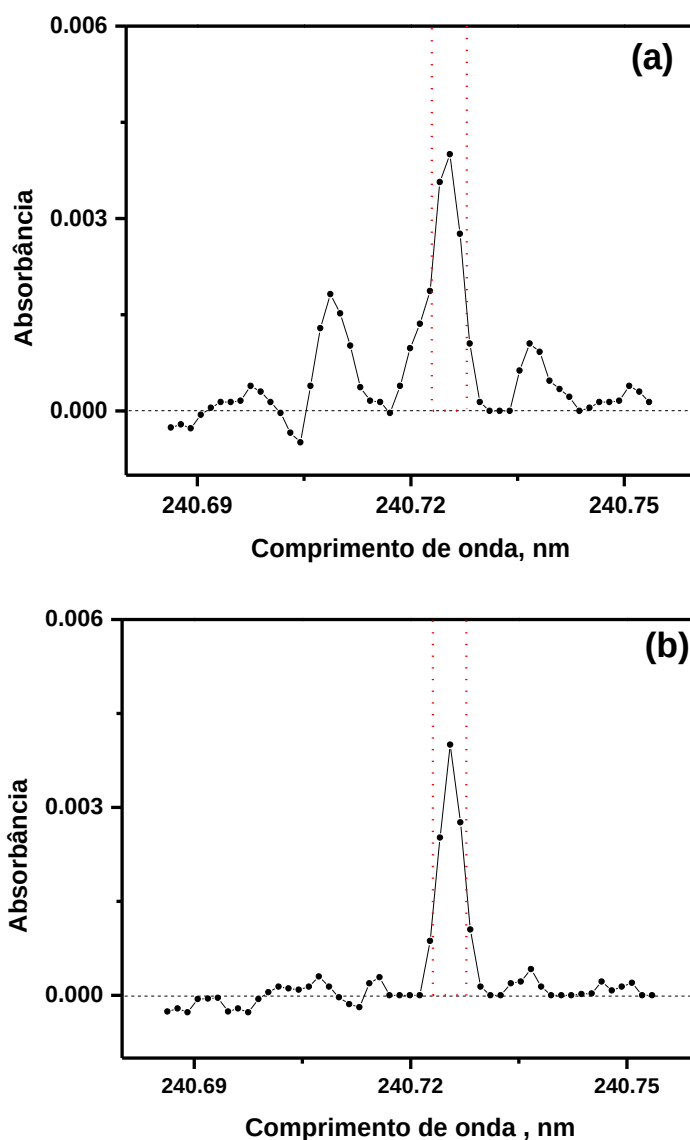
Figura 2- Espectros tridimensionais para Co no CRM 1570a *Spinach Leaves* obtidos na ausência de modificador químico e sem correção de fundo (a) e após correção por LSBC (b) utilizando o espectro de referência (c) obtido a partir de SiO_2 .



Fonte: Autor, 2016.

Após a aplicação do LSBC (Figura 2b), observa-se a presença de alguns sinais de fundo de baixa intensidade adjacentes ao sinal transiente de Co. No entanto, apesar de estarem no mesmo espaço temporal não há sobreposição nos pixels utilizados na medida do sinal do Co e assim não interferem (Figura 3). Deve-se enfatizar que a eficiência da correção por LSBC deve ser suficiente para eliminar ou minimizar as interferências espectrais nos pixels referentes ao sinal do analito. Dessa maneira, todos os espectros obtidos para Co no meio sólido posteriormente foram corrigidos por LSBC com o espectro de referência de SiO.

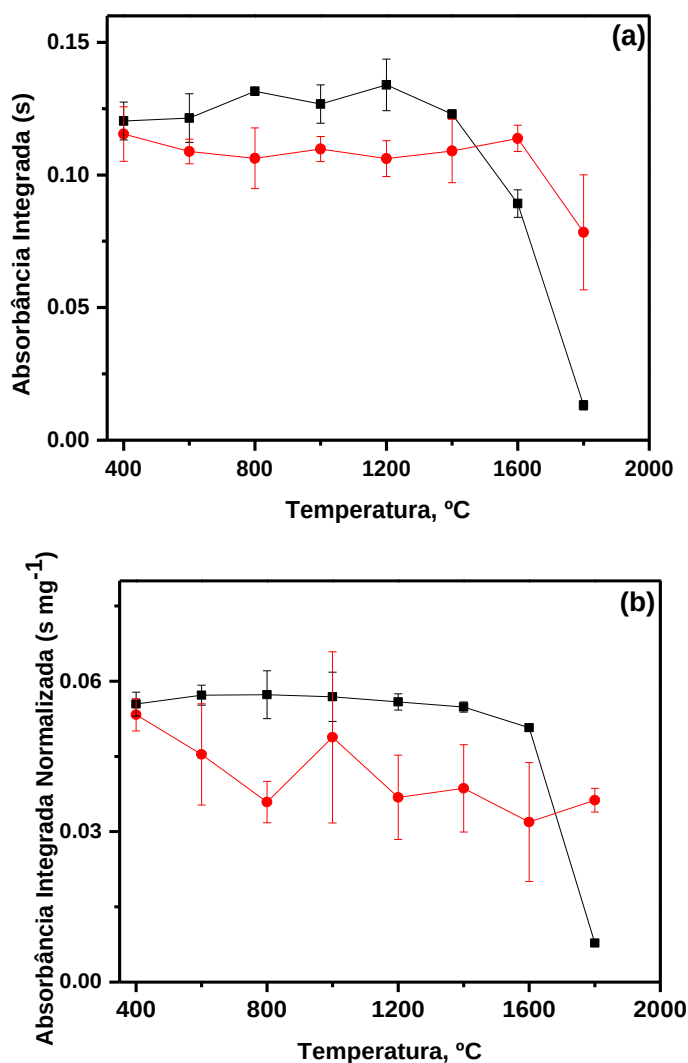
Figura 3- Espectro de absorção atômica (pixels) do Co no material de referência 1570a *Spinach Leaves* sem modificador químico e sem correção (a), e após correção com LSBC (b).



Fonte: Autor, 2016.

As curvas de pirólise foram construídas no intervalo de 400 – 1800°C com temperatura de atomização fixada em 2500°C, tanto na ausência como na presença de 5 µg Pd(NO₃)₂ + 2,5 µg Mg(NO₃)₂ como modificadores químicos. Como pode ser observado nas curvas de pirólise da Figura 4, o Co demonstrou estabilidade térmica na ausência de modificador químico até cerca de 1400°C em meio aquoso e 1600°C em meio sólido. Com o uso do modificador, o Co permaneceu estável até cerca de 1600°C em meio aquoso e 1800°C em meio sólido.

Figura 4- Curvas de temperatura de pirólise referentes a 150 pg Co em meio aquoso (a) e 150-239 pg Co no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (b) na presença (●) e na ausência (■) do modificador químico Pd/Mg.



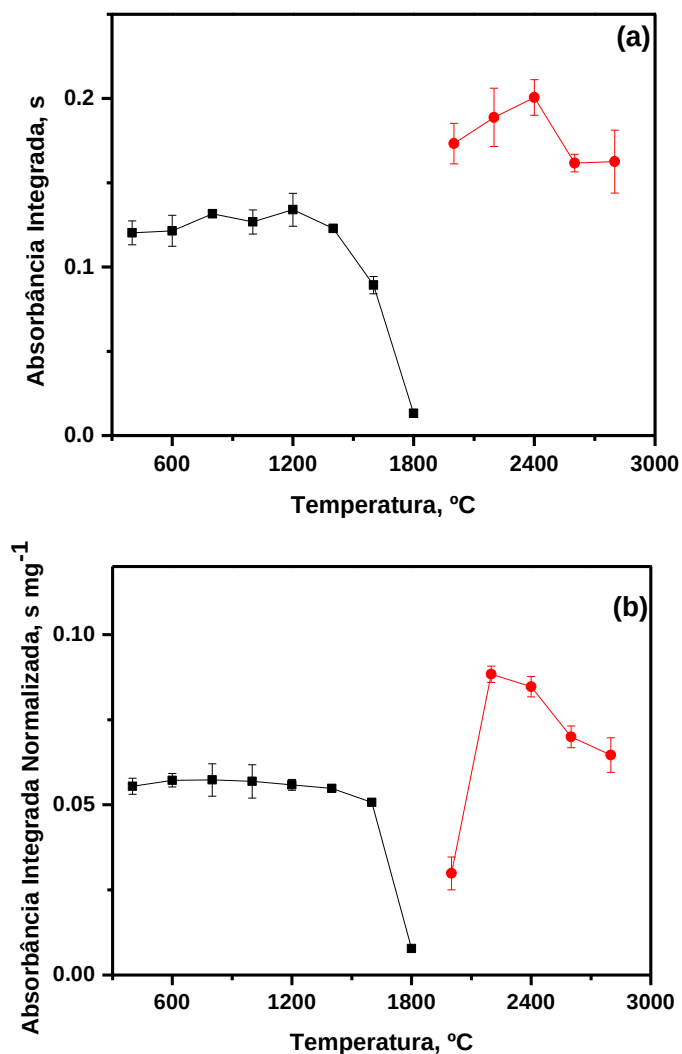
Fonte: Autor, 2016.

A maior sensibilidade e menores desvios foram observados na temperatura de pirólise de 1400°C. Dessa maneira, esta foi a temperatura selecionada para os

estudos seguintes. Observa-se também que maior sensibilidade foi observada na ausência do modificador químico.

As temperaturas de atomização foram avaliadas em meio aquoso e meio sólido no intervalo de 2000 a 2800°C, fixando-se a temperatura de pirólise em 1400°C (Figura 5). O melhor perfil do sinal transiente, a maior sensibilidade e os menores desvios foram observados na temperatura de 2400°C. Assim, nos estudos subsequentes as temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 1400°C e 2400°C, respectivamente, e na ausência de modificador químico.

Figura 5- Curvas de pirólise (■) e atomização (●) referentes a 150 pg Co em meio aquoso (a) e 150-239 pg Co no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (b).



Fonte: Autor, 2016.

O programa de aquecimento otimizado para a determinação de Co em material vegetal está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Programa de aquecimento do atomizador para a determinação de Co em amostras de materiais vegetais.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	110	5	20	2,0
Secagem 2	130	5	10	2,0
Pirólise	1400	10	30	2,0
Auto-zero*	1400	0	5	0
Atomização	2400	2400	5	0
Limpeza	2550	500	5	2,0

*Etapa necessária para garantir que a atomização comece sem o fluxo de argônio.

Fonte: Autor, 2016.

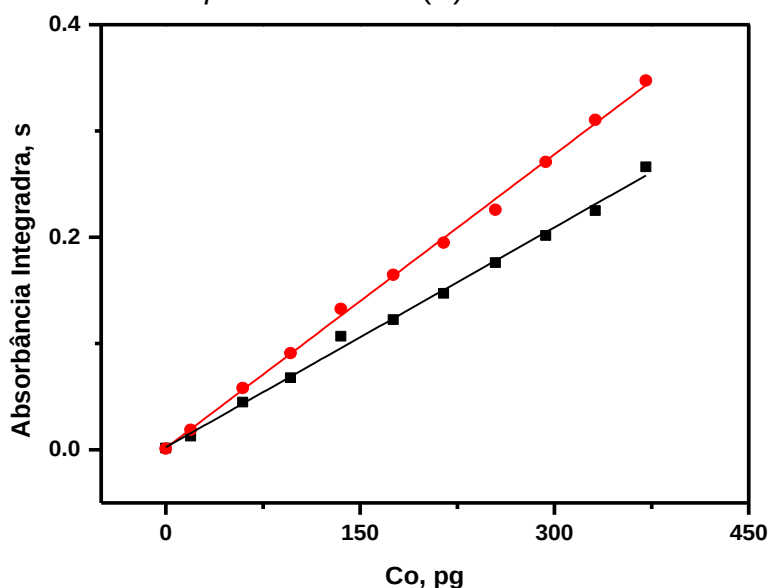
5.1.2 Avaliação de possíveis efeitos de matriz

As calibrações mais usuais em amostragem direta de sólidos empregam: i) materiais de referência certificados sólidos, ii) amostras sintéticas sólidas, iii) método de adição de analito e iv) padrões aquosos. (10) A possibilidade de usar da calibração aquosa na análise direta de material vegetal para determinar Co foi avaliada por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas (e das massas características, m_0) obtidas através das curvas de resposta em meio aquoso e em meio sólido (*1570a Spinach Leaves*) no intervalo de massa 0 – 360 pg Co.

Massa característica é a menor massa do analito que resulta um sinal de absorvância de 0,0044 s. A utilização da massa característica como parâmetro de avaliação da influência de matriz é interessante, pois como o valor da massa característica está diretamente relacionado com à população de átomos livres na nuvem atômica formada durante a atomização, valores numéricos próximos sugerem eficiência de atomização semelhantes para os meios aquoso e sólido. E também sugerem que quando o efeito de matriz é mínima, melhor será a eficácia dos padrões aquosos de calibração para a análise de amostras sólidas.

Análise da Figura 6 revela que bons coeficientes de correlação lineares (r) foram obtidos para as curvas de calibração do Co em meio aquoso ($r=0,9991$) e em meio sólido ($r=0,9980$). As massas características (m_0) e os coeficientes angulares (s) calculadas para o analito em meio aquoso e sólido (aquoso: $m_0=4,7$ pg, $s=9,21 \times 10^{-4}$ s pg⁻¹; sólido: $m_0=6,2$ pg, $s=6,89 \times 10^{-4}$ s pg⁻¹) foram distintas (aplicando o teste estatístico teste t de *Student* ao nível de 95% de confiança), demonstrando influência significativa da matriz da amostra no mecanismo de atomização do analito, e impossibilitando assim o uso da calibração com padrões aquosos na determinação de Co por amostragem direta de sólidos.

Figura 6. Curvas de calibração para Co em meio aquoso (●) e no material de referência certificado 1570a *Spinach Leaves* (■).



Fonte: Autor, 2016.

Para a determinação de Co em material vegetal, optou-se por calibrar por compatibilização de matriz utilizando o CRM 1570a *Spinach Leaves* no intervalo de 0 - 540 pg Co ($r=0,9993$). Quando o padrão sólido apresenta matriz com composição química próxima à das amostras, o efeito de matriz será semelhante para todos os padrões e amostras.

5.1.3 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analítico como faixa de resposta linear, coeficiente de correlação linear (r), LOD, LOQ, massa característica (m_0) e precisão

(RSD) calculados por meio da curva analítica construída com padrões sólidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Co em material vegetal por DSS HR-CS GFAAS.

Parâmetro	Co
Faixa de resposta linear (pg)	0 – 540
R	0,9993
m ₀ (pg)	6,2
LOD (pg)	3,0
LOQ (pg)	9,1
RSD (%)	0,32 - 7,8

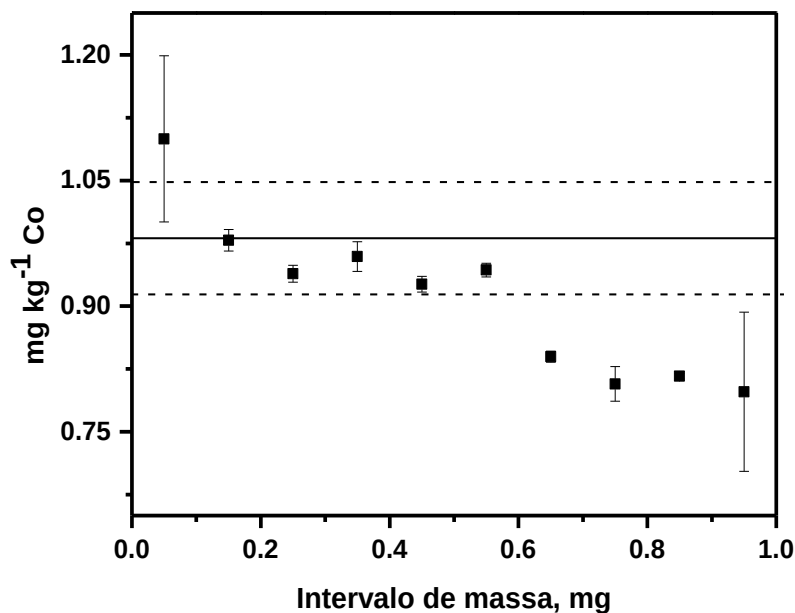
Fonte: Autor, 2016.

5.1.4 Massa mínima e fator de homogeneidade

Em DSS HR-CS GF AAS, exatidão e precisão podem ser influenciadas pelo tamanho e homogeneidade da amostra: maior quantidade de amostra pode prejudicar a liberação do analito da matriz e/ou dificultar a vaporização do analito; e se o analito não está homogeneamente distribuído na matriz, o tamanho reduzido da amostra pode não representar o todo. Com isso, o estudo da massa mínima para Co em material vegetal, foi avaliado por meio da análise de diferentes massas (0,05 - 1,0 mg) de *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*.

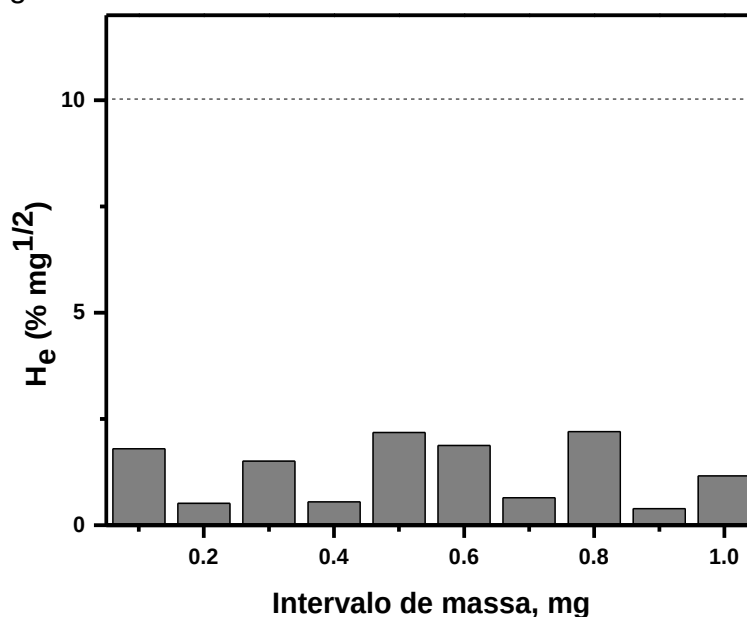
Como observado na Figura 7, o estudo de massa mínima revelam que boa precisão e exatidão na determinação de Co em material vegetal podem ser obtidas quando massas entre 0,1 e 0,5 mg são utilizadas. Concentrações abaixo do valor esperado ($0,981 \pm 0,067 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Co}$) foram encontradas para massas > 0,6 mg. Uma maior quantidade de massa pode alterar a eficácia do processo de atomização, por oclusão do analito no interior da matriz.

Figura 7- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Co em *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves* contendo $0,981 \pm 0,067 \text{ mg kg}^{-1}$. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Associado ao estudo de massa mínima calculou-se o fator de homogeneidade (H_e) para o analito. Para um material ser considerado homogêneo, o fator H_e deve ser < 10 . (10,35) Dessa maneira pode-se concluir que o Co se encontra uniformemente distribuído na amostra, uma vez que o $H_e < 2,5$ (Figura 8). Portanto o intervalo de massa de 0,4 - 0,5 mg foi o escolhido para as determinações de Co em amostras de material vegetal.

Figura 8- Homogeneidade do Co obtido na amostra *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*.

Fonte: Autor, 2016.

5.1.5 Avaliação da precisão e exatidão do método

A exatidão do método proposto para quantificação de Co foi avaliada por meio da determinação de Co em amostras de CRMs de materiais vegetais, utilizando calibração com compatibilização de matriz, e aplicando o teste estatístico teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança. A precisão dos métodos foi avaliada por meio dos RSDs, sendo considerado preciso RSD inferior a 10%. (46) Os resultados obtidos demonstraram concordância com as concentrações de Co certificadas nos CRMs, e os valores de RSD ficaram inferiores a 5%, Tabela 8.

Tabela 8- Resultados (mg Kg⁻¹) da determinação (n=3) de Co nos CRMs, utilizando calibração com o CRM 1570a *Spinach Leaves*.

CRM	Valor certificado	Co	RSD %
<i>INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves</i>	0,981 ± 0,067	0,943 ± 0,041	4,3
<i>1573a Tomato Leaves</i>	0,570 ± 0,020	0,571 ± 0,024	4,3
<i>1515 Apple Leaves</i>	0,090*	0,093 ± 0,003	3,8

* Valor informativo (não certificado)

Fonte: Autor, 2016.

5.1.6 Determinação de Co em material vegetal

O método desenvolvido e otimizado para a determinação de Co por DSS HR-CS GFAAS foi aplicado na análise de treze amostras de materiais vegetais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultados da determinação (n=3) de Co (mg Kg⁻¹) em material vegetal pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como média ± SD.

Amostra	[Co]
Folha de cana 1	0,058 ± 0,002
Folha de cana 2	0,059 ± 0,003
Folha de cana 3	0,044 ± 0,001
Casca de café	0,183 ± 0,007
Palhada de milho	0,029 ± 0,002
Casca de Amendoim 1	0,074 ± 0,004
Casca de Amendoim 2	0,354 ± 0,001
Capim Napiê 1	0,075 ± 0,001
Capim Napiê 2	0,075 ± 0,008
Bagaço de Cana	0,071 ± 0,003
Fibra de Bananeira	0,243 ± 0,001
Palhada de soja 1	0,149 ± 0,012
Palhada de soja 2	0,061 ± 0,002

Fonte: Autor, 2016.

As concentrações de Co nos materiais vegetais variaram de 0,029 – 0,354 mg Kg⁻¹. Essas concentrações estão compatíveis com as normalmente encontradas em materiais vegetais e relatadas na literatura. (47)

A amostragem direta de sólidos por HR-CS GFAAS mostrou ser um método preciso (RSD entre 0,3 a 7,8%) e exato para determinação de Co em amostras de material vegetal.

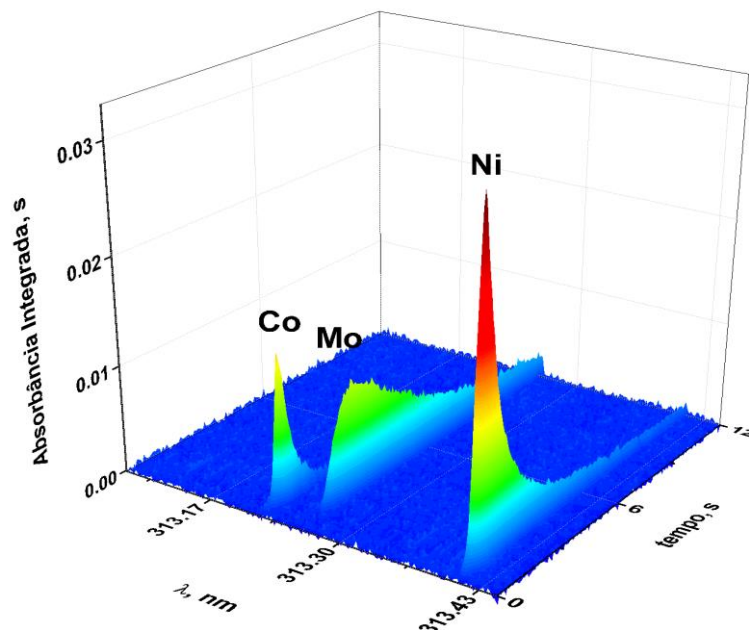
5.2 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal empregando Co como padrão interno

5.2.1 Potencial de medidas simultâneas de absorbância de Mo, Ni e Co

A HR-CS GFAAS utiliza um detector constituído por arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) com 512 pixels, 200 pixels deste dispositivo são usados analiticamente. Isso significa que o equipamento trabalha com 200 detectores independentes que são iluminados e lidos simultaneamente. A visibilidade do ambiente espectral é de aproximadamente $\pm 0,25$ nm em ambos os lados da linha analítica. Os pixels que não são utilizados para a medida da absorção atômica podem ser usados para corrigir qualquer flutuação no fluxo de radiação que atua continuamente no intervalo espectral coberto pelo detector, como o ruído da lâmpada ou o fundo contínuo. (32)

Entre as várias janelas espectrais que podem ser utilizadas, há uma que permite monitorar simultaneamente os comprimentos de onda dos elementos Mo, Ni e Co (Figura 9). Apesar da possibilidade de realizar medidas simultâneas desses elementos por HR-CS GFAAS, esta combinação de elementos não foi ainda reportado na literatura.

Figura 9- Espectro de absorção atômica referente a 0,33 ng Mo; 6,8 ng Ni e 1000 ng Co. Temperatura de pirólise em 1600°C e a temperatura de atomização em 2600°C.



Fonte: Autor, 2016.

O Mo foi monitorado na sua linha principal (100% de sensibilidade) em 313,259 nm. Apesar da baixa sensibilidade relativa da linha do Ni (sensibilidade de 4,8%) em 313,410 nm, essa ainda é adequada para determinar concentrações de Ni em tecidos vegetais que normalmente variam de 0,05 a 5 mg Kg⁻¹ (matéria seca). (26, 47) A linha atômica em 313,221 nm (sensibilidade de 0,0083%) é inadequada para determinar Co em quantidades vestigiais nos tecidos vegetais. No entanto, esta linha é útil na padronização interna, uma vez que a absorbância relativa ao Co naturalmente presente na amostra pode ser considerada desprezível quando comparado a absorbância associada às concentrações de Co adicionadas (aos brancos, padrões e amostras) como padrão interno. O Cobalto foi escolhido como possível padrão interno para Ni, devido às semelhanças entre as suas propriedades físico-químicas.

5.2.2 Comportamento térmico do Mo, Ni e Co

Em GFAAS rotineiramente predomina-se a análise monoelementar, que emprega um programa de aquecimento do atomizador específico a um analito.

Quando vários analitos estão envolvidos, o programa de aquecimento numa determinação simultânea é comum a todos os analitos.

Procurando praticidade e rapidez na otimização das temperaturas de compromisso na determinação simultânea, o comportamento termoquímico de Co, Ni e Mo foram avaliados utilizando um planejamento fatorial 2^3 . O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, porém, pouco explorada em espectrometria atômica. Quando é empregada uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas. Na otimização das temperaturas de compromisso em GFAAS, é comum, inicialmente, fixarmos a temperatura de pirólise, variando-se somente a temperatura de atomização. Em seguida, depois de encontrar a melhor temperatura de pirólise, a temperatura de atomização é variada. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer, devido ao fato de que os efeitos de interação entre as variáveis não são explorados. Além disso, o número de experimentos executados é geralmente maior se comparado com aqueles obtidos em um planejamento fatorial. (48) Em geral, a otimização multivariada de métodos analíticos implica em dois passos: primeiro, uma investigação preliminar, usando planejamento fatorial, é realizada para saber quais os fatores têm influência significativa na resposta analítica e, depois, uma função matemática entre a resposta analítica e os fatores significantes do processo deve ser obtida, e então os valores ótimos são calculados. Para obtenção da função resposta, planejamentos tais como a metodologia de superfície de resposta, ou softwares apropriados podem ser aplicados. (49)

Neste planejamento, as variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise, temperatura de atomização e a utilização de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico nos seguintes níveis mínimos e máximos: 1400 e 1600°C, 2400 e 2600°C, e modificador de 0 e 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, respectivamente. A escolha desses níveis para estudo foi tomada a partir da revisão na literatura (29) e pelas recomendações do fabricante do equipamento, como sendo as temperaturas e modificador químico, normalmente empregados na determinação desses elementos por GFAAS.

Ao executar a matriz experimental da Tabela 2, utilizando o CRM *INCT-OBTL-5-Oriental Basma Tobacco Leaves*, visando avaliar o efeito das variáveis

avaliadas na determinação das temperaturas de compromisso, obteve-se as respostas dos experimentos para Mo, Ni e Co (Tabela 10).

Tabela 10- Respostas dos experimentos realizados para Mo, Ni e Co.

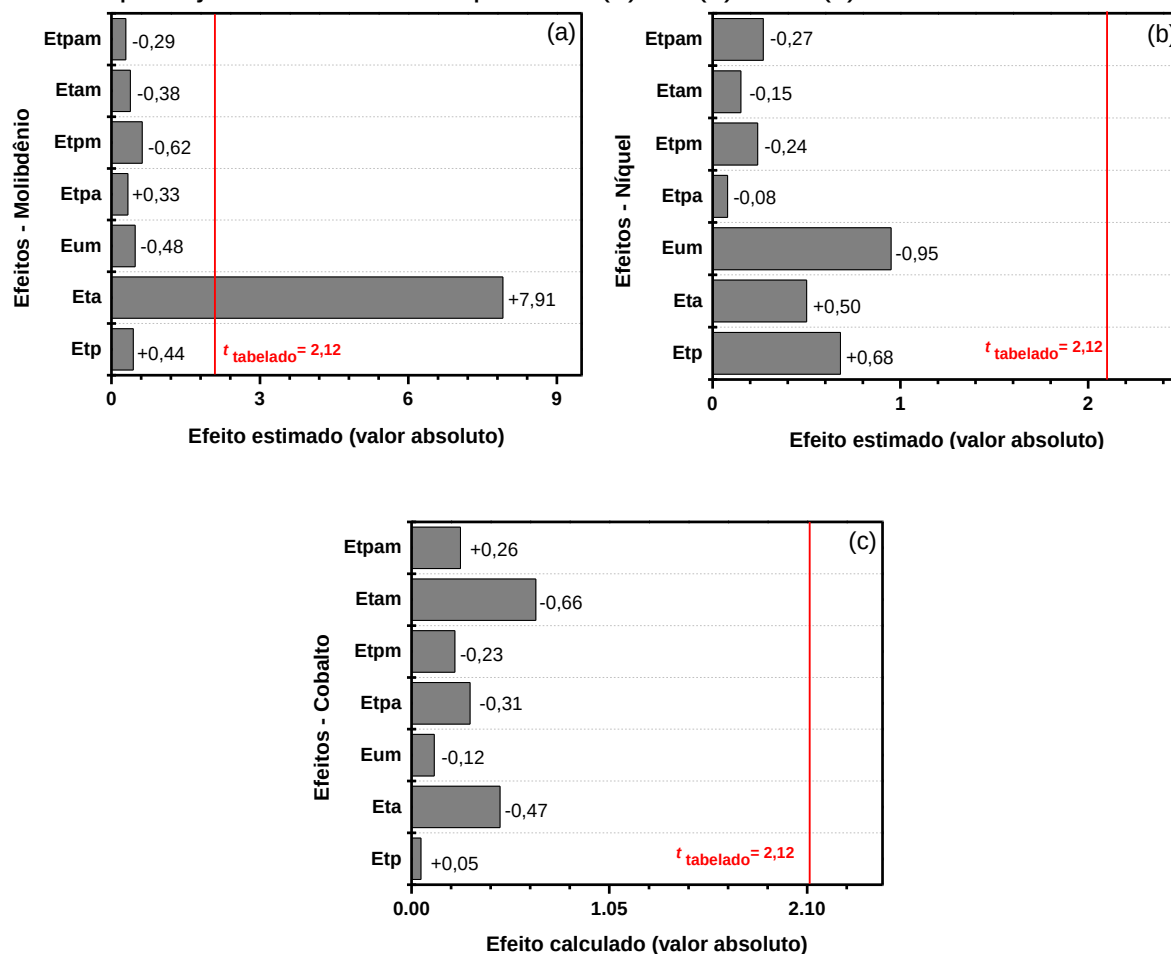
Experimento	Resposta		
	Absorbância Integrada Normalizada (s mg ⁻¹)		
	Mo	Ni	Co
1	0,0584 ± 0,0032	0,2179 ± 0,0156	0,0358 ± 0,0022
2	0,0644 ± 0,0074	0,2338 ± 0,0008	0,0376 ± 0,0023
3	0,1650 ± 0,0068	0,2279 ± 0,0281	0,0374 ± 0,0014
4	0,1882 ± 0,0325	0,2519 ± 0,0440	0,0368 ± 0,0019
5	0,0616 ± 0,0029	0,1999 ± 0,0081	0,0380 ± 0,0014
6	0,0585 ± 0,0038	0,2170 ± 0,0053	0,0377 ± 0,0015
7	0,1656 ± 0,0124	0,2151 ± 0,0130	0,0357 ± 0,0037
8	0,1637 ± 0,0144	0,2170 ± 0,0228	0,0352 ± 0,0017

Fonte: Autor, 2016.

Essas respostas foram então inseridas no software Statgraphics Centurion XVI (versão 16.1.15), gerando assim o gráfico de Pareto (Figura 10) e o gráfico de contorno sobreposto (Figura 11).

A partir da absorbância integrada normalizada obtida nos experimentos para os analitos individualmente, o software calculou os efeitos principais: temperatura de pirólise (Etp), temperatura de atomização (Eta) e uso do modificador Mg(NO₃)₂ (Eum) e os efeitos combinados das variáveis: temperatura de pirólise + temperatura de atomização (Etpa), temperatura de pirólise + uso do modificador Mg(NO₃)₂ (Etpm), temperatura de atomização + uso do modificador Mg(NO₃)₂ (Eam), e temperatura de pirólise + temperatura de atomização + uso do modificador Mg(NO₃)₂ (Etpam); e gerou o gráfico de Pareto individual para os elementos de estudo (Figura 10).

Figura 10- Gráficos de Pareto gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^3 , para Mo (a), Ni (b) e Co (c).



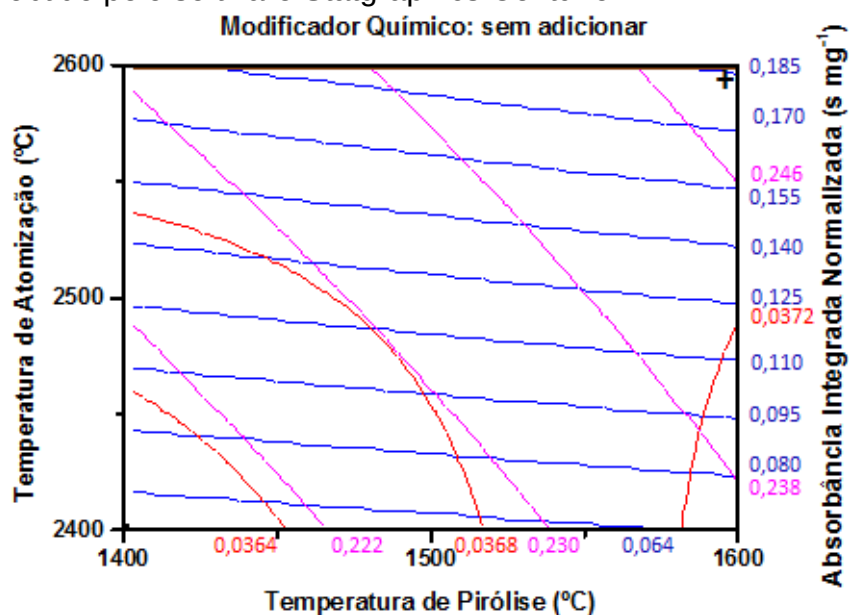
Fonte: Autor, 2016.

A partir do gráfico de Pareto foi possível visualizar as variáveis e as interações entre variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de confiança de 95% (teste $t - t_{\text{tabelado}} = 2,12$). Com relação ao planejamento fatorial empregado observa-se através do gráfico de Pareto para o analito Mo (Figura 10a), que apenas a variável principal temperatura de atomização (Eta) apresentou efeito significativo e positivo, indicando que a temperatura de atomização no seu nível máximo maximiza significativamente a resposta analítica (absorbância integrada normalizada). Isso possivelmente ocorre uma vez que o $\text{MoC}_{(s)}$, precursor do $\text{Mo}_{(g)}$, (50), por apresentar caráter refratário, requer temperaturas mais elevadas para a sua dissociação durante a etapa de atomização. No entanto para Ni e Co não foi observado nenhum efeito significativo na resposta analítica (Figura 10b e Figura 10c).

Observa-se também, para Mo, Ni e Co, que os efeitos da variável temperatura de pirólise (Etp) não foram significativos, porém os efeitos são positivos. Indicando assim que maior eficiência da pirólise do material vegetal, sobre a resposta analítica, é atingida utilizando-se a temperatura de pirólise em seu nível máximo, apesar de não serem efeitos significativos. Verificou-se também que para todos os elementos, que os efeitos da variável modificador químico $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Eum) não foram significativos, mas os efeitos são negativos, indicando que não se faz necessário utilizar o modificador químico proposto.

A partir das condições experimentais e respostas analíticas, gerou-se um modelo matemático através do qual se obteve o gráfico de contorno sobreposto para os três elementos (Figura 11), sendo consideradas as interações entre as variáveis que apresentaram efeitos significativos para a definição das temperaturas de compromisso entre os elementos Mo, Ni e Co.

Figura 11- Gráfico de contorno sobreposto para Mo (linha azul), Ni (linha rosa) e Co (linha vermelha) obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.



Fonte: Autor, 2016.

A região indicada por “+”, no gráfico de contorno sobreposto, indica a condição de compromisso entre as temperaturas de pirólise e atomização, resultando no melhor valor de absorbância integrada para Mo, Ni e Co simultaneamente. As melhores condições analíticas apontadas foram temperatura de pirólise em 1576°C; temperatura de atomização em 2600°C; sem adição de

modificador químico. Dessa maneira o programa de aquecimento elaborado está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11- Programa de aquecimento para a determinação simultânea de Mo, Ni e Co pelo método proposto.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	110	6	10	2,0
Secagem 2	130	5	10	2,0
Pirólise	1600	50	10	2,0
Auto-zero*	1600	0	5	0
Atomização	2600	3000	12	0
Limpeza	2650	500	4	2,0

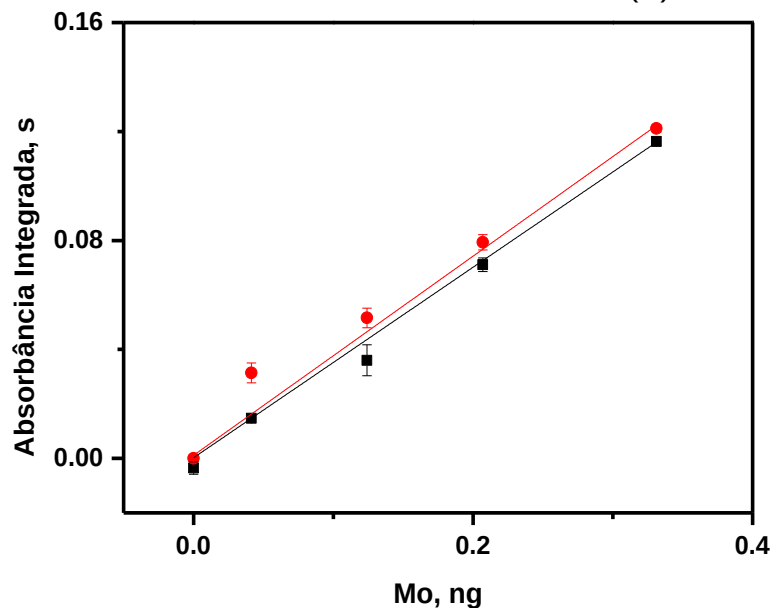
* Etapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

Fonte: Autor, 2016.

5.2.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz

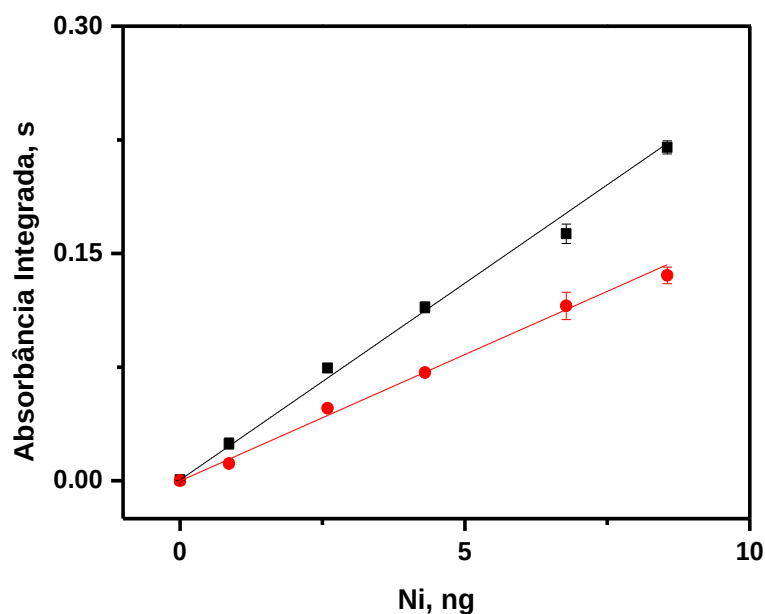
Utilizar padrões aquosos na análise de sólidos é o modo mais fácil e simples de calibração, e esta possibilidade foi então avaliada. A influência da matriz sobre a absorvância de Mo e Ni foi avaliada comparando os coeficientes angulares e massas características (m_0) obtidas através das curvas de calibração em meio aquoso e em meio sólido (*INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves*) no intervalo de massa de 0 - 0,33 ng Mo, e 0 - 8,50 ng Ni (Figuras 12 e 13).

Figura 12- Curvas de calibração para Mo (313,259 nm) empregando padrão aquoso (●) e CRM INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves (■).



Fonte: Autor, 2016.

Figura 13- Curvas de calibração para Ni (313,410 nm) empregando padrão aquoso (●) e CRM INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves (■).



Fonte: Autor, 2016.

Massas características (m_0) e os coeficientes angulares das curvas de calibração foram então calculadas e utilizadas para avaliar a ocorrência de efeitos de matriz e verificar a eficácia do programa de aquecimento otimizado.

Observando as Figuras 12 e 13, nota-se boa correlação entre absorvância e massa dos analitos, confirmada pelos coeficientes de correlação lineares (r) obtidos para ambos os meios aquoso e sólido (Tabela 12).

Tabela 12. Coeficientes de correlação linear, coeficientes angular e massas características dos analitos em meio aquoso e sólido.

Parâmetro	Mo	
	Solução	Sólido
r	0,9950	0,9991
Coeficiente angular ($s\ ng^{-1}$)	0,35	0,34
m_0 (ng)	0,012	0,013
	Ni	
	Solução	Sólido
r	0,9988	0,9982
Coeficiente angular ($s\ ng^{-1}$)	0,017	0,026
m_0 (ng)	0,26	0,17

Fonte: Autor, 2016.

Os coeficientes angulares das curvas analíticas e as massas características nos meios aquoso e sólido foram semelhantes para o Mo (aplicando o teste estatístico teste t de *Student* ao nível de 95% de confiança) (Tabela 12), indicando que não há efeitos significativos de matriz para este analito, e que a calibração externa com padrões aquosos pode ser empregada. Para o Ni, as inclinações e massas características foram distintas, sugerindo efeitos significativos de matriz da amostra no mecanismo de atomização do Ni, inviabilizando a calibração externa com padrões aquosos na determinação de Ni em material vegetal empregando a amostragem de sólidos. Utilizando Co como padrão interno, a padronização interna foi investigada na tentativa de minimizar esses efeitos de matriz sobre as medidas de absorvância para Ni. Apesar das vantagens apresentadas pela DSS HR-CS GFAAS, os efeitos da matriz causada pela amostra são frequentemente observados, o que dificulta o uso de calibração aquosa convencional. O método de calibração com padronização interna (IS), rotineiramente é utilizada em técnicas de espectrometria atômica e de massa (51), sendo útil para minimizar as incertezas inerentes a análise de traço. Os principais pré-requisitos para a seleção de um

padrão interno são: propriedades físico-químicas similares entre analito e padrão interno, medições simultâneas ou sequenciais e ausência de interferência espectral causada pelo padrão interno. Não é tarefa fácil a escolha de um padrão interno em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, uma vez que o pré-requisito propriedades físico-químicas similares entre analito e padrão interno é um requisito fundamental para que se garantam a correção dos efeitos interferentes provocados pela matriz, pelos erros de amostragem e flutuações nas condições de operação instrumental. Dessa maneira analito e padrão interno devem se comportar da mesma maneira frente às variações instrumentais e das condições experimentais.

O Co foi escolhido como possível padrão interno para Ni devido à semelhança entre suas propriedades físico-químicas, tais como: número atômico, massa atômica, pontos de fusão, pontos de ebulição, as entalpias de fusão e formação de átomos gasosos e energia de dissociação de óxidos (Tabela 13).

Tabela 13- Propriedades físico-químicas do Mo, Ni e Co e seus óxidos. (52)

Propriedade	Elemento		
	Co	Ni	Mo
Massa atômica	58,933	58,693	95,94
Raio atômico (pm)	125	125	136
Ponto de fusão (°C)	1495	1455	2623
Ponto de ebulição (°C)	2927	2913	4639
Entalpia de fusão (kJ mol ⁻¹)	16,20	17,48	37,48
Entalpia de formação de átomos gasosos (kJ mol ⁻¹)	426,7	430,1 ± 8,4	658,9 ± 3,8
Energia de dissociação de MO _(g) (kJ mol ⁻¹)	384,5 ± 13,4	366 ± 30	502
Óxido			
	CoO	NiO	MoO ₂
Ponto de fusão (°C)	1933	1955	1100

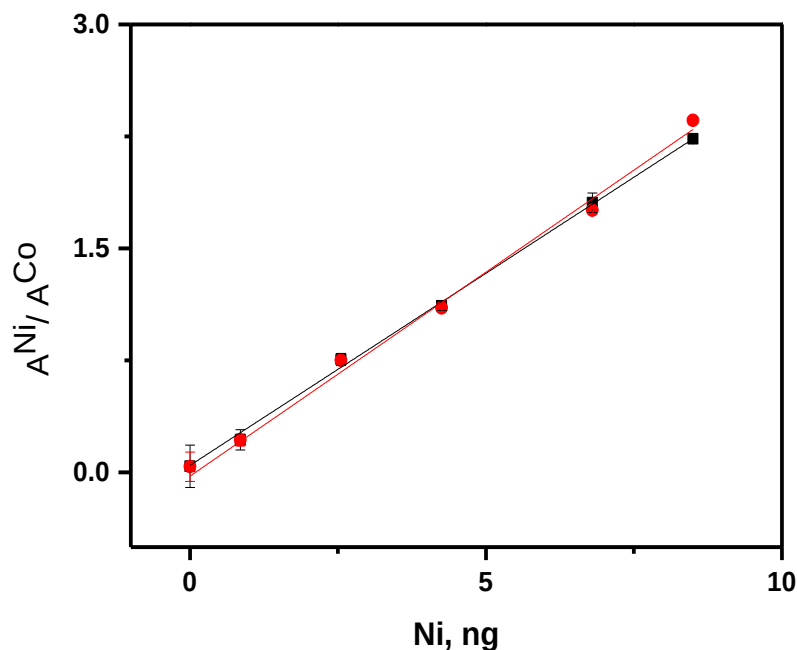
Fonte: Autor, 2016.

A influência do Co como padrão interno para o Ni foi investigada por meio da construção de curvas de calibração com padrões aquosos e sólidos, no intervalo de

massa 0 - 8,50 ng Ni, e enriquecida com 1 µg Co. A faixa linear de calibração para Co na linha de 313,221 nm se apresenta no intervalo de 0,05 – 1,2 µg Co, com coeficiente de correlação linear de 0,9998. Assim, 1 µg de Co foi adicionado aos brancos, padrões e amostras, a fim de proporcionar uma melhor relação sinal-ruído, e também tornar insignificante a absorbância oriunda do Co naturalmente presente nas amostras de material vegetal. Dessa maneira, a medida da absorbância integrada para Co refere-se, aproximadamente, apenas a absorbância proveniente da quantidade de Co adicionado como padrão interno, pois essa é muito maior do que a absorbância oriunda do Co presente naturalmente na amostra vegetal.

Bons coeficientes de correlação linear entre $A^{\text{Ni}}/A^{\text{Co}}$ versus massa de Ni (Figura 14) foram obtidos para ambos os meios: aquoso (0,9942) e sólido (0,9993).

Figura 14- Curvas analíticas para Ni empregando padrões aquoso (●) e sólido (■) utilizando Co como padrão interno.



Fonte: Autor, 2016.

Os coeficientes angular obtidos para os meios aquoso e sólido foram 0,299 ng s⁻¹ e 0,286 ng s⁻¹, respectivamente. Usando a padronização interna, as massas características para Ni em meios aquoso e sólido foram 0,0170 ng e 0,0167 ng, respectivamente. E os erros utilizando a curva de calibração gerada por padronização interna foram ≤ 5%, sendo erros aceitáveis para diagnose foliar.

Dessa maneira, foi possível empregar a calibração com padrões aquosos para realizar a determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal.

5.2.4 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros analíticos como faixa de resposta linear, coeficiente de correlação linear (r), LOD, LOQ, massa característica (m_0) e precisão (RSD), foram obtidos para Mo e Ni. Os parâmetros de desempenho analítico foram calculados por meio das curva analíticas e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Co em material vegetal por DSS HR-CS GFAAS.

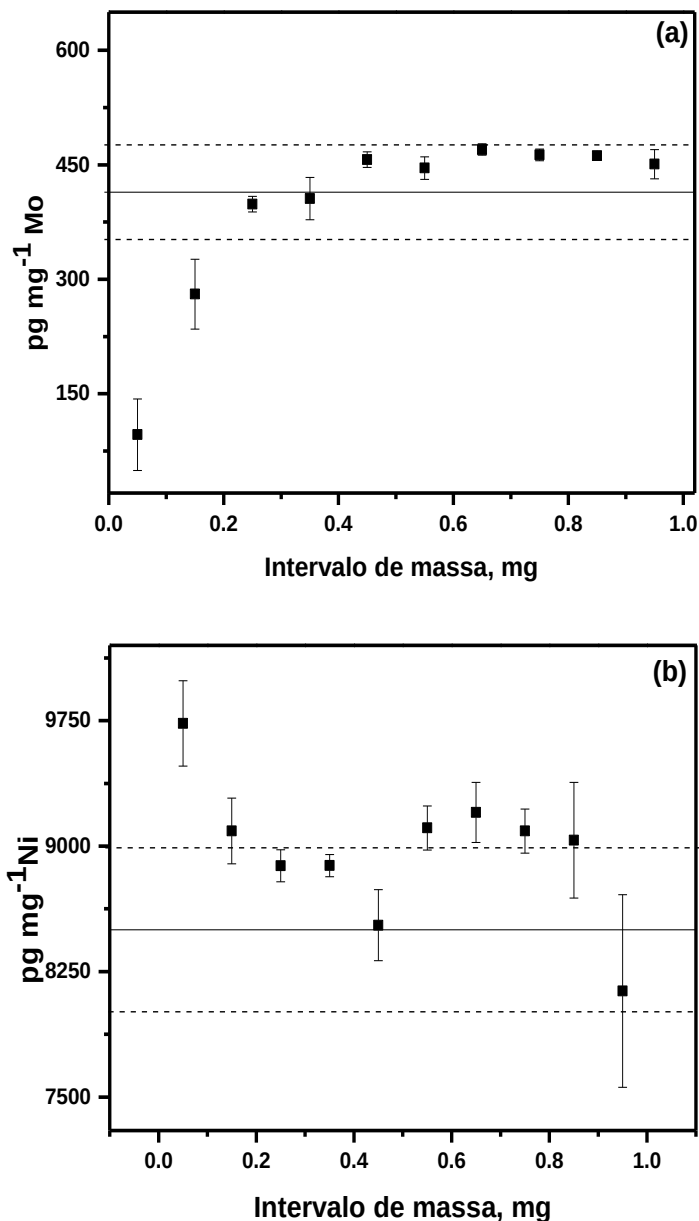
Parâmetro	Mo	Ni
Faixa de resposta linear (ng)	0 - 0,33	0 – 8,5
r	0,9950	0,9942
m_0 (ng)	0,12	0,017
LOD (ng)	0,018	0,025
LOQ (ng)	0,055	0,074
RSD (%)	2,1 - 11	3,7 - 10

Fonte: Autor, 2016.

5.2.5 Massa mínima e fator de homogeneidade

O estudo da influência da massa mínima para a determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal, foi avaliado utilizando diferentes massas (0,05 - 1,0 mg) do CRM *INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves*. Pode-se observar, a partir do estudo de massa mínima, boa precisão e exatidão para a determinação simultânea de Mo e Ni, quando massas no intervalo de 0,2 a 0,5 mg foram utilizadas (Figura 15).

Figura 15- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Mo e Ni em *INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves* contendo $414 \pm 62 \text{ pg mg}^{-1} \text{ Mo}$ (a) e $8500 \pm 490 \text{ pg mg}^{-1} \text{ Ni}$ (b). A linha contínua e a tracejada correspondem a média e desvio padrão (1σ), respectivamente.

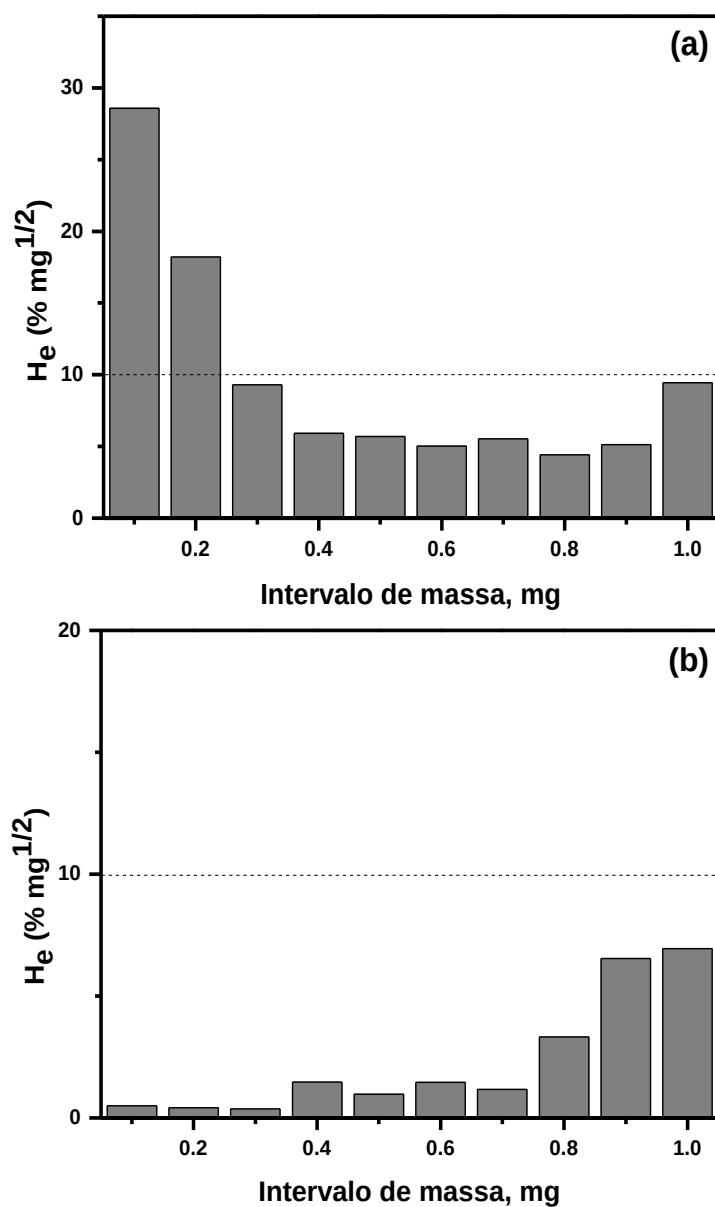


Fonte: Autor, 2016.

Associado ao estudo de massa mínima calculou-se o fator de homogeneidade (H_e) para os analitos (Figura 16). Considerando o intervalo de massas de 0,2 a 0,5 mg, pode-se observar que Mo e Ni encontram-se uniformemente distribuídos na amostra, uma vez que o $H_e < 10$. Portanto, para a determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal por SS HR-CS GFAAS, massas de amostras entre 0,35 - 0,45 mg foram transferidas manualmente para a

plataforma de amostragem de sólidos, foram pesadas e introduzidas automaticamente no forno de grafite.

Figura 16- Homogeneidade do Mo (a) e do Ni (b) obtido na amostra *INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*.



Fonte: Autor, 2016.

5.2.6 Avaliação da precisão e exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação simultânea de Mo e Ni em amostras de CRMs de materiais vegetais, e da avaliação estatística aplicando o teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança. A precisão do método foi avaliada por meio dos desvios padrões relativos, sendo considerado preciso RSD inferior a 10%. Para Mo, os resultados obtidos demonstraram concordância com as concentrações de Mo certificadas nos CRMs, e os valores de RSD ficaram inferiores a 8,6%, Tabela 15.

Tabela 15- Resultados da determinação (n=3) de Mo (mg Kg⁻¹) nos CRMs, utilizando calibração aquosa.

CRM	Valor certificado	Mo	RSD %
1572 <i>Citrus Leaves</i>	0,17 ± 0,09	0,14 ± 0,007	5,5
1547 <i>Peach Leaves</i>	0,060 ± 0,008	0,055 ± 0,004	8,6
1515 <i>Apple Leaves</i>	0,094 ± 0,013	0,094 ± 0,006	6,7
INCT-OBTL-5 <i>Tobacco Leaves</i>	0,414 ± 0,062	0,418 ± 0,022	5,3
1573a <i>Tomato Leaves</i>	0,46*	0,49 ± 0,04	7,5

* valor informativo (não certificado)

Fonte: Autor, 2016.

Os resultados obtidos para o Ni, utilizando Co como padrão interno, Tabela 16, demonstraram concordância com os valores certificados, aplicando teste *t* de *Student* no nível de 95% de confiança. As concentrações de Ni determinadas nos CRMs foram melhoradas de 62-135% (sem PI) para 94-105% (com PI), mostrando que o Co foi eficiente como padrão interno para as determinações de Ni.

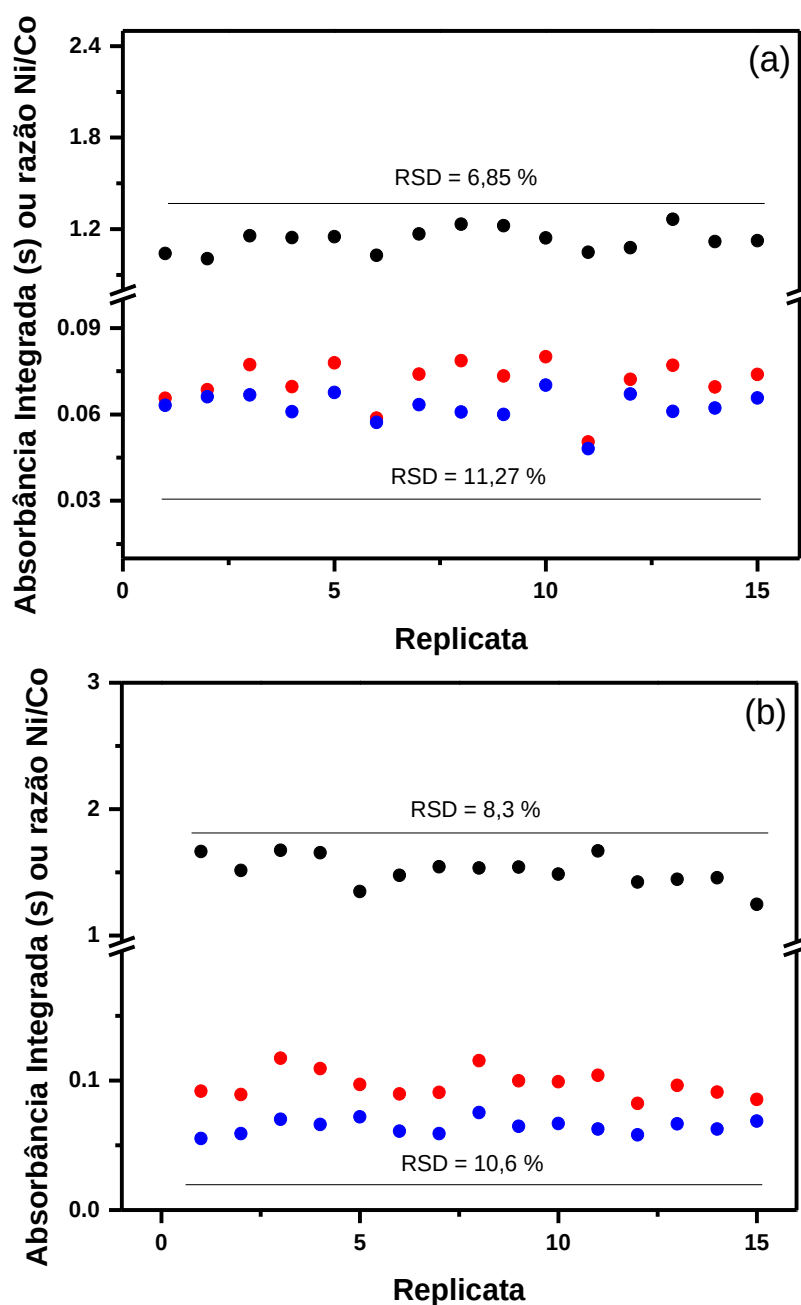
Tabela 16- Resultados da determinação (n=3) de Ni (mg Kg⁻¹) nos CRMs, utilizando calibração aquosa.

CRM	Valor	Ni	RSD	Ni	RSD
	Certificado		%		%
	Com PI			Sem PI	
1572 <i>Citrus Leaves</i>	0,60 ± 0,30	0,63 ± 0,03	3,9	0,79 ± 0,08	13
1547 <i>Peach Leaves</i>	0,69 ± 0,09	0,65 ± 0,06	9,2	0,43 ± 0,06	14
1515 <i>Apple Leaves</i> .	0,91 ± 0,12	0,88 ± 0,04	4,2	1,23 ± 0,05	4,3
1573a <i>Tomato Leaves</i>	1,59 ± 0,07	1,60 ± 0,08	5,2	2,07 ± 0,04	1,8
1575a <i>Pine Needles</i>	1,47 ± 0,10	1,40 ± 0,12	5,7	1,32 ± 0,08	8,2
INCT-OBTL-5 <i>Tobacco Leaves</i>	8,5 ± 0,49	8,5 ± 0,21	2,5	10,7 ± 0,97	9,1

Fonte: Autor, 2016.

Para a avaliação da repetibilidade das medidas de absorbância para Ni, foram realizadas a medida de 15 réplicas com 3,4 ng Ni, em meio aquoso e em meio sólido (*INCT-OBTL-5 Tobacco Leaves*), empregando o programa de aquecimento otimizado. As medidas para Ni, na ausência de Co como padrão interno, foram caracterizadas por valores de RSD entre 11,3% (meio aquoso) e 10,6% (meio sólido), Figura 17.

Figura 17- Correlação das medidas de absorvância obtidas para Ni (A^{Ni} - ●), Co (A^{Co} - ●) e para a razão desses sinais ($A^{\text{Ni}}/A^{\text{Co}}$ - ●) em meio aquoso (a) e em meio sólido (b) por HR-CS GFAAS.



Fonte: Autor, 2016.

No entanto, quando o Co foi utilizado como padrão interno os valores de RSD melhorou: 6,8% (meio aquoso) e 8,3% (meio sólido). Esses resultados explicitam que a precisão das medidas foi melhorada quando se utiliza Co como padrão interno para Ni.

5.2.7 Determinação simultânea de Mo e Ni em material vegetal

O método desenvolvido foi então aplicado na determinação simultânea de Mo e Ni em diferentes amostras de materiais vegetais empregando a amostragem de sólidos. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 17.

Tabela 17- Resultados da determinação (n=3) de Mo e Ni em material vegetal pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como mg Kg⁻¹ ± SD.

Amostra	[Mo]	[Ni]
Fibra de Bananeira	0,19 ± 0,02	< 0,074
Palhada de Soja 1	0,38 ± 0,03	5,62 ± 0,51
Palhada de Soja 2	0,63 ± 0,03	1,04 ± 0,04
Casca de café	0,40 ± 0,01	6,27 ± 0,23
Bagaço de Laranja	0,17 ± 0,01	< 0,074
Casca de amendoim 1	0,15 ± 0,01	0,96 ± 0,04
Casca de amendoim 2	0,48 ± 0,01	6,92 ± 0,68
Bagaço de Cana 1	0,08 ± 0,003	< 0,074
Bagaço de Cana 2	0,18 ± 0,02	2,56 ± 0,27
Folha de Cana	0,54 ± 0,02	0,41 ± 0,04

Fonte: Autor, 2016.

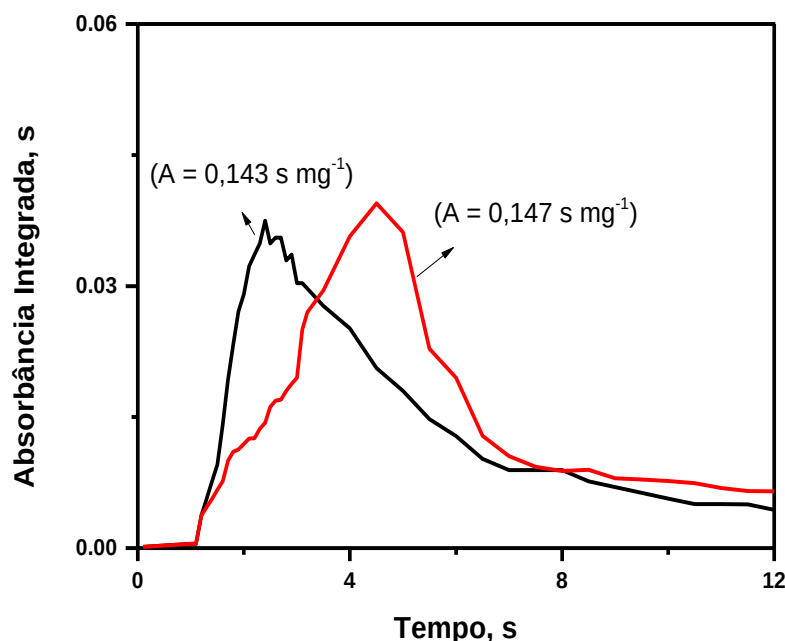
As concentrações de Mo e Ni encontradas nas amostras foram de 0,08 a 0,63 mg Kg⁻¹ e de 0,41 para 6,92 mg Kg⁻¹, respectivamente. A precisão das medidas (RSD) variou de 2,1 a 11% para Mo e 3,7 a 10% para Ni. As concentrações de Mo e Ni estão entre os valores normalmente encontrados em materiais vegetais (26,47), excetos as amostras palhada de soja 1, casca de café e casca de amendoim 2 que apresentaram valores para Ni acima dos normalmente relatados.

5.3 Determinação de Mo em solo

5.3.1 Comportamento térmico do Mo

A linha principal do Mo (313,259 nm) foi escolhida para monitorar este analito em amostras de solo levando-se em consideração as baixas concentrações de Mo ($0,1 - 5,0 \text{ mg Kg}^{-1}$) usualmente presentes em solos. (53) Investigações preliminares foram realizadas para avaliar a necessidade de utilização de modificador químico na determinação de Mo. Pode-se observar que o perfil dos sinais transientes de absorção atômica de Mo em meio aquoso e em solo foram semelhantes (Figura 18). Isso sugere semelhança na liberação do analito para a fase vapor em ambos os meios. Desta forma, optou-se por não utilizar modificador químico nas determinações de Mo.

Figura 18- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 0,33 ng Mo em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (*GBW07104 Rock-Constituents*) (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.



Fonte: Autor, 2016.

A amostra solo é de natureza complexa e refratária, assim para obter bons resultados na formação e intensidade do sinal analítico em amostragem direta de solo por GFAAS, o programa de aquecimento deve atuar de maneira eficiente na eliminação de matriz, durante a etapa de pirólise, e na vaporização do analito na

etapa de atomização. Assim a temperatura de pirólise e a temperatura de atomização do programa de aquecimento do forno de grafite para a determinação de Mo em solos, foram otimizadas utilizando um planejamento fatorial 2^2 .

As variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise e temperatura de atomização nos seguintes níveis mínimos e máximos: 1400 e 1600°C, 2550 e 2650 °C, respectivamente. Na execução da matriz experimental, utilizou-se uma amostra de solo para avaliar o efeito das variáveis estudadas na determinação das temperaturas de compromisso, obtendo-se as respostas mostradas na Tabela 18.

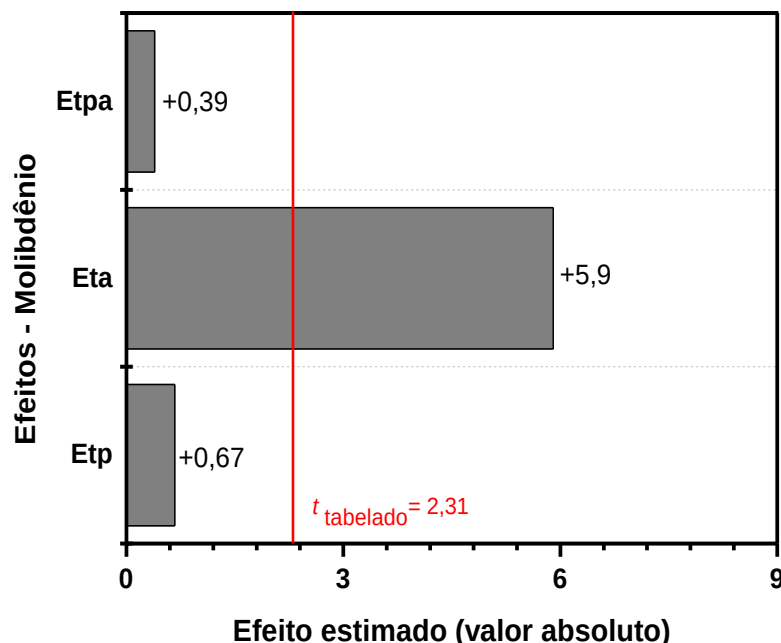
Tabela 18- Respostas dos experimentos realizados para Mo.

Experimento	Resposta
	Absorbância Integrada Normalizada (s mg ⁻¹)
1	0,236 ± 0,036
2	0,286 ± 0,038
3	0,716 ± 0,103
4	0,805 ± 0,118

Fonte: Autor, 2016.

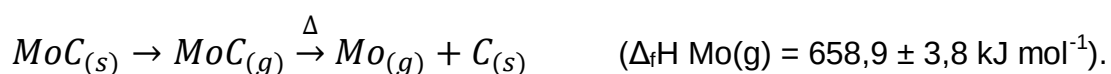
As respostas dos experimentos foram inseridas no software Statgraphics Centurion XVI, gerando o gráfico de Pareto (Figura 19). A partir do Gráfico de Pareto foi possível observar as variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de 95%.

Figura 19- Gráfico de Pareto para Mo, gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^2 .



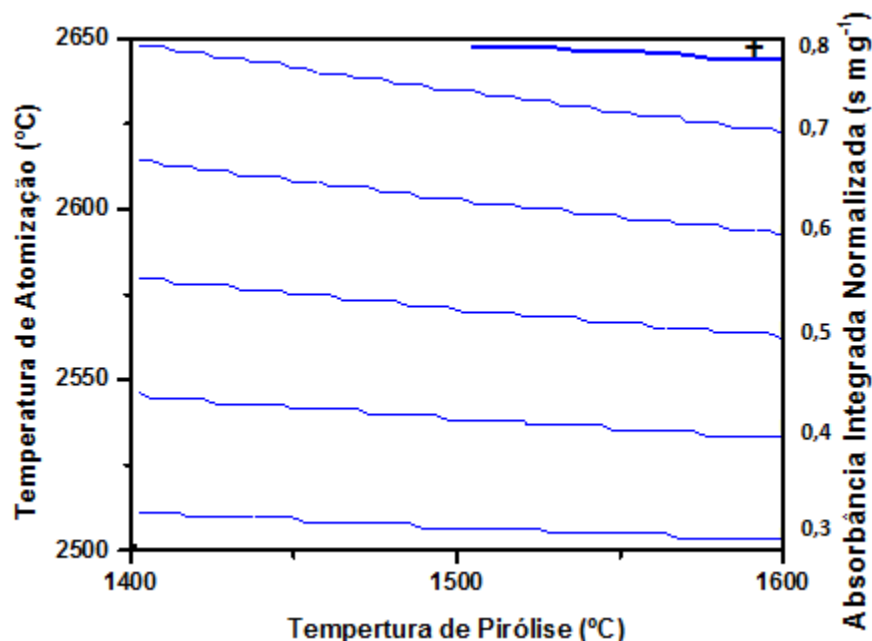
Fonte: Autor, 2016.

Pode-se observar que apenas a temperatura de atomização (Eta) apresentou efeito significativo e positivo, indicando que a temperatura de atomização no seu nível máximo (2650°C) maximiza a resposta analítica. Isso possivelmente ocorre devido a atomização do Mo se proceder a partir do precursor carbeto de molibdênio. Assim, como relatado na literatura, a entalpia de formação de átomos gasosos ($\Delta_f H$) de Mo requer altas temperaturas e energia justificando assim esse efeito significativo (29, 52)



A partir das respostas analíticas obtidas na execução dos experimentos, gerou-se um modelo matemático através do qual se obteve o gráfico de contorno sobreposto para Mo (Figura 20).

Figura 20- Gráfico de contorno sobreposto para Mo obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.



Fonte: Autor, 2016.

A região indicada por “+”, no gráfico de contorno sobreposto, indica a condição de compromisso entre as temperaturas de pirólise e atomização, resultando no melhor valor de absorbância integrada para Mo. As melhores condições analíticas apontadas foram temperatura de pirólise em 1600°C e temperatura de atomização em 2650°C. Dessa maneira o programa de aquecimento elaborado está apresentado na Tabela 19.

Tabela 19- Programa de aquecimento para a determinação de Mo em solo pelo método proposto.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	130	15	20	2
Secagem 2	300	20	20	2
Pirólise	1600	50	15	2
Auto-zero*	1600	0	5	0
Atomização	2650	3000	12	0
Limpeza	2650	0	4	2

* Etapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

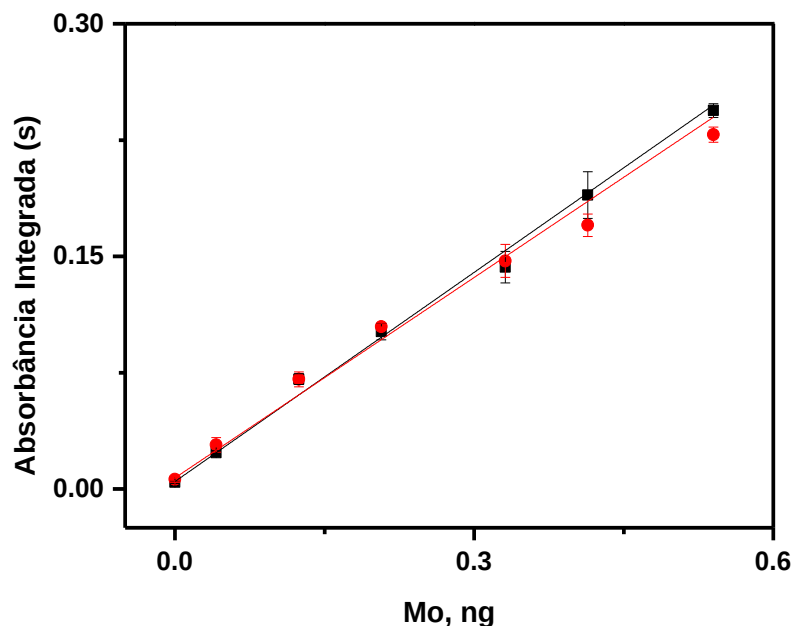
Fonte: Autor, 2016.

5.3.2 Avaliação de possíveis efeitos de matriz

Em análise direta de sólidos, a calibração é uma etapa muito importante, principalmente devido aos possíveis efeitos provocados pela matriz que podem influenciar diretamente na precisão e exatidão dos resultados.

A utilização de padrões aquosos na análise direta de solos, para a determinação de Mo, foi avaliada construindo curvas de calibração em meio aquoso e em meio sólido (*GBW07104 Rock-Constituents*) no intervalo de 0 - 0,54 ng Mo, Figura 21, e comparando os valores obtidos para os coeficientes angulares e massas características (m_0).

Figura 21- Curvas de calibração para Mo empregando padrão aquoso (■) e CRM *GBW07104 Rock-Constituents* (●).



Fonte: Autor, 2016.

Observou-se bons coeficientes de correlação linear (r) para as curvas de calibração para ambos os meios aquoso ($r=0,9985$) e sólido ($r=0,9964$). Em relação aos coeficientes angulares (s) dessas curvas e as massas características (m_0) calculadas para o meio aquoso ($s=0,449 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,0090 \text{ ng}$) e o meio sólido ($s=0,431 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,0089 \text{ ng}$), não foram observados efeitos significativos de matriz da amostra no mecanismo de atomização do Mo. Esses resultados indicam que a determinação de Mo envolvendo a amostragem de solos permite a calibração externa com padrões aquosos para a construção de curvas analíticas.

5.3.3 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analíticos como faixa de resposta linear, coeficiente de correlação linear (r), LOD, LOQ, massa característica (m_0) e precisão (RSD) estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Mo em solo por DSS HR-CS GFAAS.

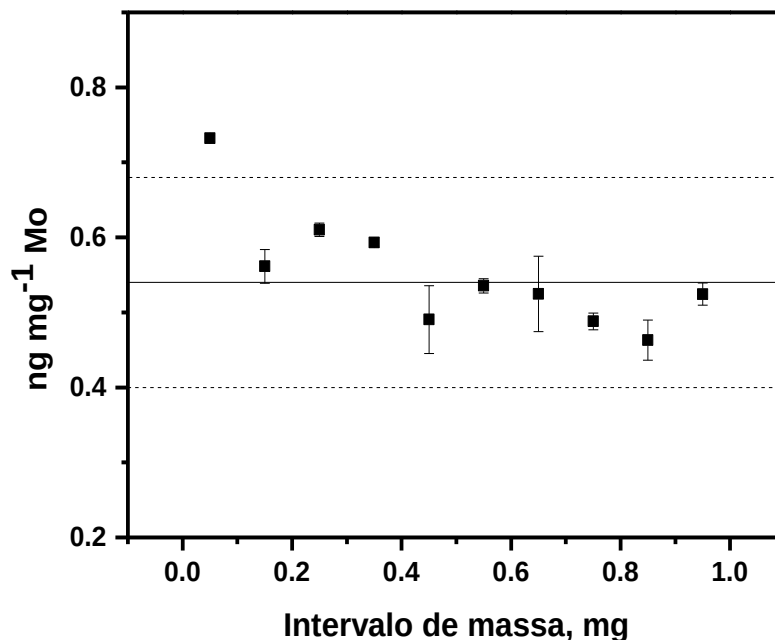
Parâmetro	Mo
Faixa de resposta linear (ng)	0 – 0,54
R	0,9985
m_0 (ng)	0,009
LOD (ng)	0,0082
LOQ (ng)	0,027
RSD (%)	3,0 – 10

Fonte: Autor, 2016.

5.3.4 Massa mínima e fator de homogeneidade

A influência da massa mínima na determinação de Mo foi avaliada utilizando diferentes massas (0,05 - 1,0 mg) do CRM *GBW07104 Rock-Constituents*. Pode-se observar, a partir do estudo de massa mínima, boa precisão e exatidão para a determinação de Mo, quando massas no intervalo de 0,15 a 1,0 mg foram utilizadas (Figura 22). Para massas menores que 0,10 mg, a relação sinal – ruído é desfavorável pois a linha de base é somada ao sinal analítico o que acarreta a inexatidão na concentração do Mo.

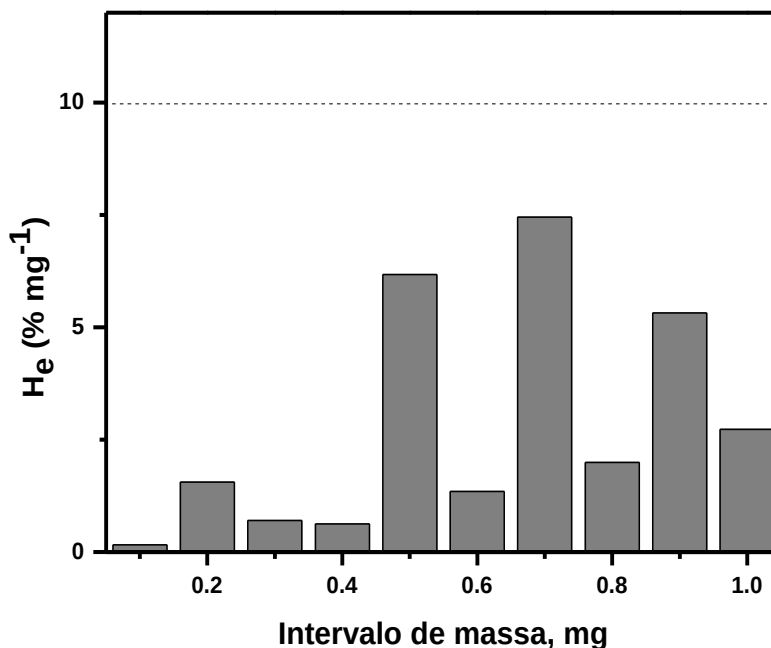
Figura 22- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Mo em *GBW07104 Rock-Constituents* contendo $0,54 \pm 0,14 \text{ ng mg}^{-1} \text{ Mo}$. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Associado ao estudo de massa mínima calculou-se o fator de homogeneidade (H_e) para o analito. É possível observar que o Mo encontra-se uniformemente distribuído na amostra uma vez que, valores de $H_e < 7,5$ foram obtidos no intervalo de massa avaliado (Figura 23). Portanto, para a determinação de Mo em solos por SS HR-CS GFAAS, massas de amostras entre 0,15 – 0,2 mg foram pesadas e utilizadas nas determinações.

Figura 23- Homogeneidade do Mo obtido na amostra *GBW07104 Rock-Constituents*.



Fonte: Autor, 2016.

5.3.5 Avaliação da precisão e exatidão do método

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio da determinação de Mo em amostras de CRMs de solos, e aplicando o teste *t* de *Student* ao nível de 95% de confiança. A precisão do método foi avaliada por meio dos desvios padrões relativos, sendo considerado preciso RSD inferior a 10%. Os resultados obtidos (Tabela 21), demonstraram concordância com as concentrações de Mo certificadas nos CRMs; e os valores de RSD ficaram inferiores a 3,6% demonstrando a precisão do método.

Tabela 21- Resultados da determinação (n=3) de Mo (mg Kg⁻¹) nos CRMs de solos, utilizando calibração aquosa.

CRM	Valor certificado	Mo	RSD %
<i>GBW07104 Rock-Constituents</i>	0,54 ± 0,14	0,56 ± 0,02	3,6
<i>IAEA-SOIL-7 Trace Elements in Soil*</i>	0,5 – 5,1	1,64 ± 0,01	0,61

* valor informativo (não certificado), intervalo de confiança ao nível de 95%.

Fonte: Autor, 2016.

5.3.6 Determinação de Mo em solos

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Mo em diferentes solos brasileiros empregando a amostragem de sólidos, e os resultados mostrados na (Tabela 22).

Tabela 22- Resultados da determinação (n=3) de Mo (mg Kg⁻¹) em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como média ± SD.

Amostra	[Mo]
Solo 1	1,84 ± 0,18
Solo 2	0,66 ± 0,07
Solo 3	0,49 ± 0,05
Solo 4	0,73 ± 0,05
Solo 5	0,63 ± 0,02
Solo 6	0,19 ± 0,01

Fonte: Autor, 2016.

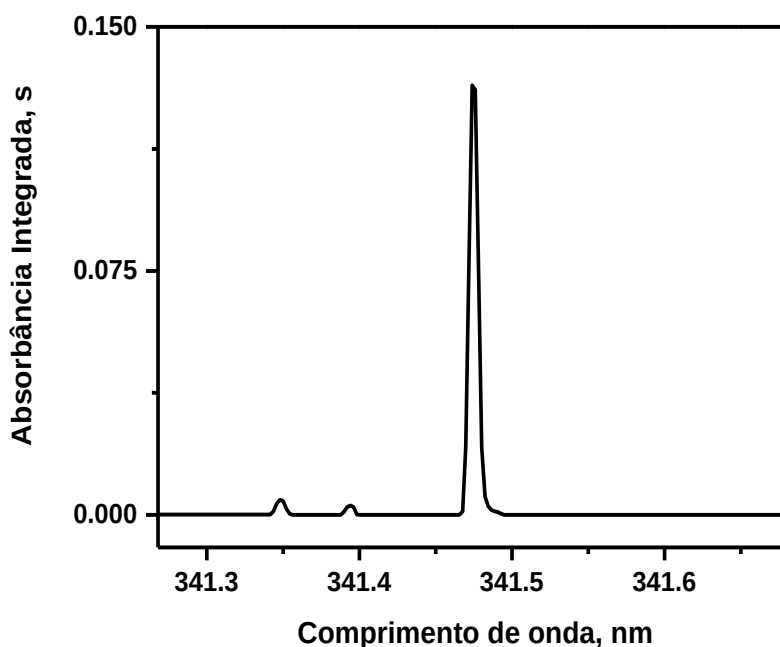
As concentrações obtidas para Mo se encontram no intervalo de 0,19 a 1,84 mg Kg⁻¹. A precisão das medidas (RSD) variou de 3,2 a 10% para Mo. A legislação brasileira através da Resolução CONAMA nº 460/2013 estabelece a máxima concentração de Mo em solos agrícolas como sendo 50 mg Kg⁻¹. Já a CETESB estabelece a concentração máxima permitida sendo 5 mg Kg⁻¹. (53) Desta forma, os teores totais do analito atendem ambas as legislações. Além disso, a maioria das concentrações determinadas para Mo, no conjunto de solos analisados, estão entre os valores 0,01 a 0,70 mg Kg⁻¹ Mo (54), que são requeridos normalmente para bom desenvolvimento das culturas. Assim o método proposto apresenta grande capacidade como ferramenta de avaliação dos níveis de fertilidade de solos.

5.4 Determinação de Ni em solo

5.4.1 Avaliação de medidas do tripleto do Ni

Considerando a ampla faixa de teores de Ni, 4 a 2000 mg kg⁻¹, que podem ser encontrados em diferentes tipos de solos (55), optou-se por monitorar o tripleto desse elemento em 341,347 nm, 341,394 nm e 341,477 nm. Como os tripletos apresentam diferentes sensibilidades (Figura 24), é possível ampliar a faixa linear de trabalho simplesmente pela medida simultânea das linhas associadas aos tripletos.

Figura 24- Espectro de absorbância para Ni (50 ng Ni), na janela espectral em 341,477± 0,2 nm (temperatura de pirólise em 1500°C e temperatura de atomização em 2650°C).



Fonte: Autor, 2016.

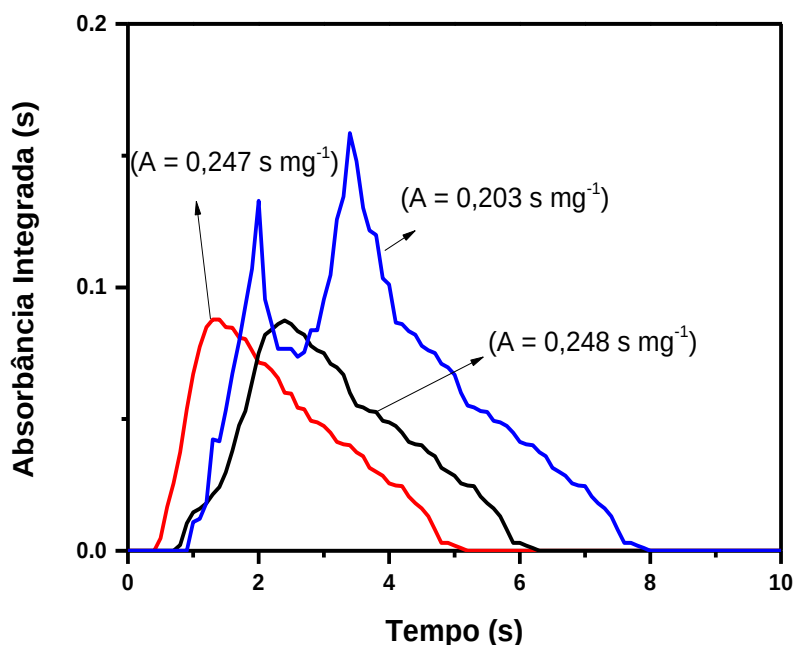
Monitorar esse tripleto por HR-CS GFAAS é possível devido ao arranjo instrumental característico desta técnica. (56) Nessa situação, como todas as medidas são realizadas simultaneamente, utiliza-se a linha mais adequada para determinar Ni sem a necessidade de reprocessar a amostra em outras condições instrumentais. Apesar da baixa sensibilidade relativa da linha do Ni em 341,347 nm (0,42%), essa linha também foi útil para determinar esse analito em algumas amostras.

5.4.2 Comportamento térmico do Ni

Em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite o uso de modificadores químicos pode auxiliar na minimização dos efeitos de matriz de três formas: aumentando a estabilidade térmica do analito através da formação de compostos intermetálicos durante as etapas iniciais do programa de aquecimento, permitindo assim o emprego de temperaturas de pirólise mais elevadas para decomposição da matriz; favorecendo as reações de redução para espécies formadoras de óxidos, causando diminuição da temperatura de atomização e por consequência do fundo gerado pela volatilização dos constituintes de matriz; e promovendo a extração do analito para superfície da matriz facilitando assim sua vaporização. (57-58)

Investigações preliminares foram realizadas para avaliar a necessidade de utilização de modificador químico na determinação de Ni. A escolha de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como possível modificador químico foi baseada na literatura. O nitrato de magnésio é reconhecidamente um modificador que auxilia a extração e transferência do analito do seio para a superfície da matriz. O perfil do sinal transiente de absorção atômica do Ni (Figura 25), obtido em meio de amostra de solo e sem a adição de modificador químico apresenta-se na forma de pico duplo e alargado, demonstrando que componentes da matriz atuam em uma liberação mais lenta do analito para a fase vapor em dois momentos distintos.

Figura 25- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 2 ng Ni em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (*2711a Montana Soil II*) na ausência de modificador (linha azul) e em meio sólido na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.



Fonte: Autor, 2016.

A adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ melhorou significativamente tanto a rápida aparição do transiente como o seu retorno à linha base. E esse perfil foi semelhante ao perfil do transiente do Ni obtido em meio aquoso. Isso ocorre muito provavelmente devido a eficiência de atuação do modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ na extração do Ni do interior da matriz de solo para a superfície da matriz, facilitando a vaporização do $\text{Ni}_{(g)}$. Utilizou-se então 2 μL de uma solução 2000 mg L^{-1} $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100 como modificador químico nos estudos subsequentes envolvendo as medidas de Ni.

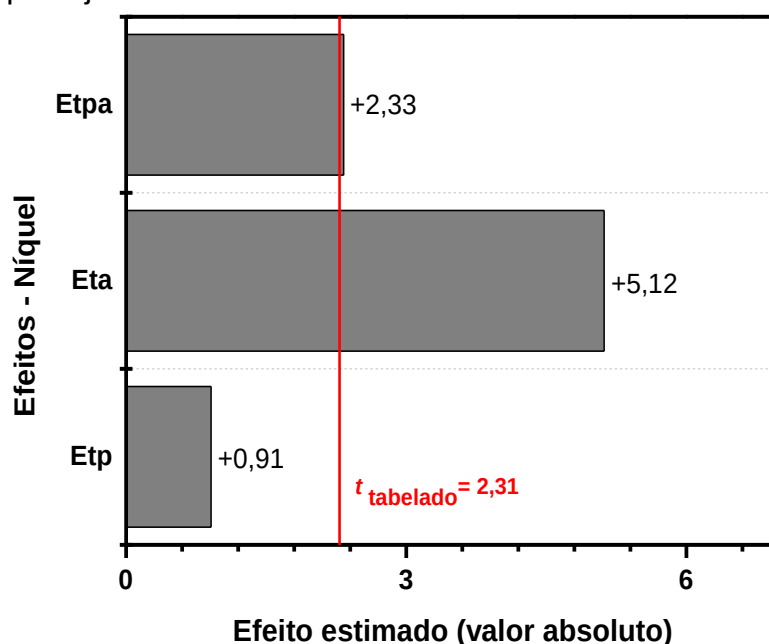
O programa de aquecimento do forno de grafite foi otimizado para a determinação de Ni em solos, utilizando um planejamento fatorial 2^2 . As variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise e temperatura de atomização nos seguintes níveis mínimos e máximos: 1300 e 1500°C, 2450 e 2650°C, respectivamente. Na execução da matriz experimental, utilizando uma amostra de solo, para avaliar o efeito das variáveis estudadas na determinação das temperaturas de compromisso, obteve-se as respostas mostradas na Tabela 23.

Tabela 23- Respostas dos experimentos realizados para Ni.

Experimento	Resposta	
	Absorbância Integrada Normalizada (s mg ⁻¹)	
1	1,308 ± 0,137	
2	1,089 ± 0,197	
3	1,743 ± 0,149	
4	2,244 ± 0,125	

Fonte: Autor, 2016.

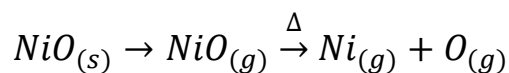
As respostas dos experimentos foram inseridas no software Statgraphics Centurion XVI, gerando o gráfico de Pareto descrito na Figura 26. A partir do Gráfico de Pareto é possível observar as variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de 95%.

Figura 26- Gráfico de Pareto para Ni, gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2².

Fonte: Autor, 2016.

Para Ni, a variável principal temperatura de atomização (Eta) e a interação entre temperatura de pirólise e atomização (Etpa) apresentaram efeitos significativos e positivos, indicando que a temperatura de atomização no seu nível máximo (2650 °C) maximiza a resposta analítica. Isso possivelmente ocorre devido o mecanismo de atomização do Ni se proceder a partir do precursor NiO_(s). (29,52) A dissociação

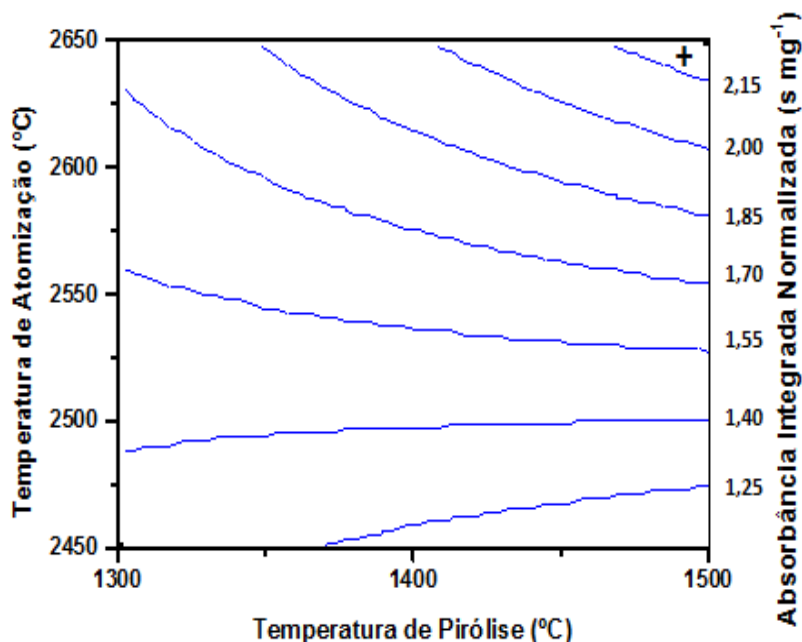
atômica desse precursor requer temperaturas elevadas, justificando assim esse efeito significativo,



(ΔE dissociação $\text{NiO}_{(g)} = 336 \pm 30 \text{ kJ mol}^{-1}$).

A partir das respostas analíticas obtidas na execução dos experimentos, gerou-se um modelo matemático através do qual se obteve o gráfico de contorno sobreposto para Ni ilustrado na Figura 27.

Figura 27- Gráfico de contorno sobreposto para Ni obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.



Fonte: Autor, 2016.

A região indicada por “+”, no gráfico de contorno sobreposto, indica a condição de compromisso entre as temperaturas de pirólise e atomização, resultando no melhor valor de absorbância integrada para Ni, sendo temperatura de pirólise em 1500°C e temperatura de atomização em 2650°C. Dessa maneira o programa de aquecimento elaborado está apresentado na Tabela 24.

Tabela 24- Programa de aquecimento para a determinação de Ni em solo pelo método proposto.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	110	10	20	2
Secagem 2	250	15	10	2
Pirólise	1500	100	10	2
Auto-zero*	1500	0	5	0
Atomização	2650	3000	10	0
Limpeza	2650	0	5	2

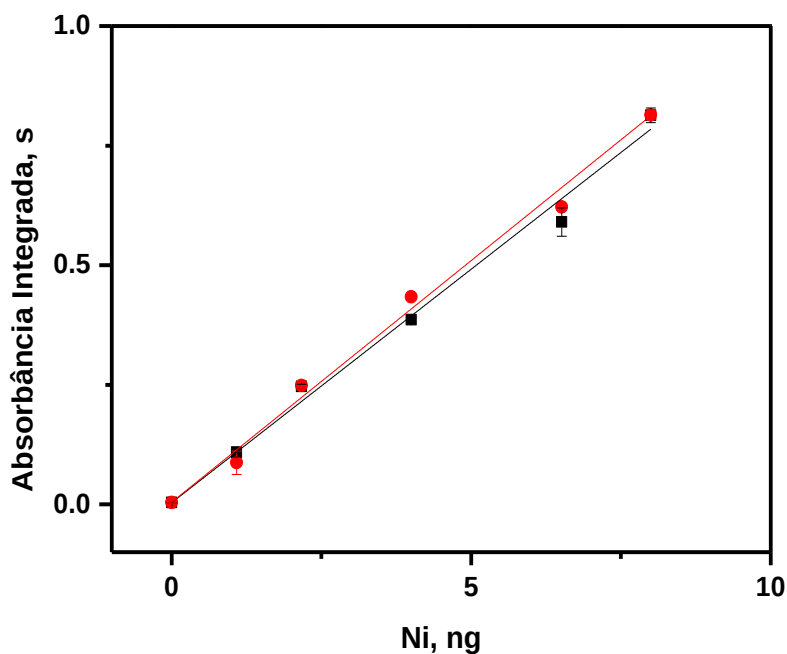
* Etapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

Fonte: Autor, 2016.

5.4.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz

A possibilidade de uso da calibração aquosa, na análise direta de solo para determinar Ni, foi avaliada por meio da comparação dos coeficientes angulares e massas características (m_0) obtidas através das curvas de calibração em meio aquoso e em meio sólido (*2711a Montana Soil II*) no intervalo de 0 – 8 ng Ni, Figura 28.

Figura 28- Curvas de calibração para Ni empregando padrão aquoso (■) e *2711a Montana Soil II* (●).



Fonte: Autor, 2016.

Observaram-se bons coeficientes de correlação linear (r) para as curvas de calibração para ambos os meios aquoso ($r=0,9975$) e sólido ($r=0,9963$). Em relação aos coeficientes angulares (s) dessas curvas e as massas características (m_0) calculadas para o meio aquoso ($s=0,095 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,045 \text{ ng}$) e o meio sólido ($s=0,096 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,044 \text{ ng}$), não foram observados efeitos significativos de matriz na atomização do Ni. Dessa maneira é possível utilizar a calibração com padrões aquosos para determinar Ni em solos empregando a amostragem de sólidos.

5.4.4 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analítico como faixa de resposta linear, coeficiente de correlação linear (r), LOD, LOQ, massa característica (m_0) e precisão (RSD), foram obtidos para as linhas do Ni em 341,477nm e 341,347nm, e estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25- Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Ni em solo por DSS HR-CS GFAAS.

Parâmetro	Ni	
λ (nm)	341,477	341,347
Faixa de resposta linear (ng)	0 – 8,0	0 – 500
R	0,9975	0,9953
m_0 (ng)	0,045	2,45
LOD (ng)	0,021	1,8
LOQ (ng)	0,071	5,8
RSD (%)	2,8 – 9,8	1,4 – 4,3

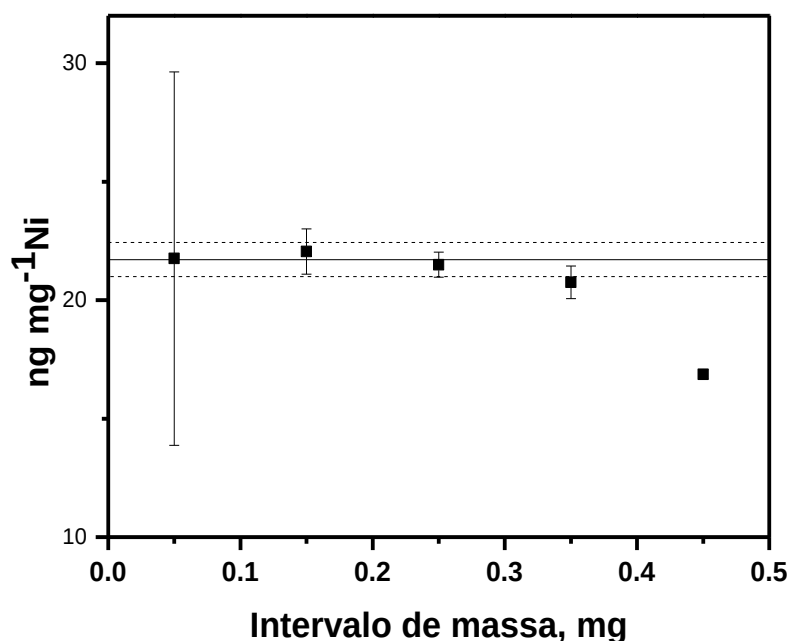
Fonte: Autor, 2016.

5.4.5 Massa mínima e fator de homogeneidade

A precisão e a exatidão da microanálise de amostras sólidas por HR-CS GFAAS podem depender do tamanho da amostra. Uma quantidade muito pequena de amostra pode comprometer a homogeneidade e, conseqüentemente, a representatividade, já que os elementos traço podem não estar homogeneamente distribuídos pelo material (35); por outro lado, grandes massas podem não ser compatíveis ao programa de aquecimento otimizado, gerando resultados insatisfatórios.

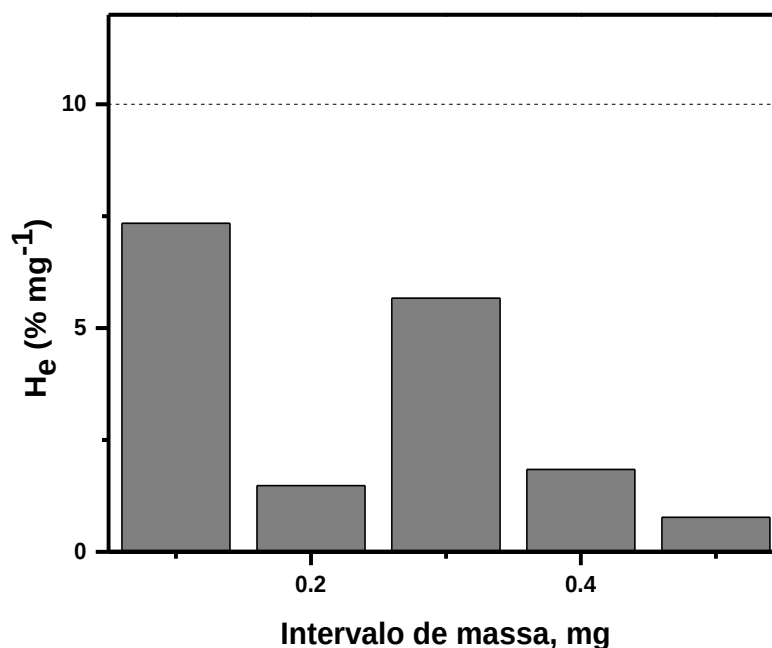
A influência da massa mínima na exatidão na determinação de Ni foi avaliada utilizando diferentes massas (0,05 – 0,5 mg) do *2711a Montana Soil II*. Pode-se observar a partir do estudo de massa mínima, boa precisão e exatidão para a determinação de Ni, quando massas no intervalo de 0,10 a 0,3 mg foram utilizadas (Figura 29). Para massas menores que 0,10 mg, a relação sinal – ruído é desfavorável pois a linha de base é somada ao sinal analítico e isso faz aumentar o desvio da medida gerando incerteza na concentração determinada para Ni. Para massas maiores 0,3 mg, os resultados não foram exatos provavelmente devido a dificuldade de atomização do analito frente a grande quantidade de matriz (oclusão do analito no seio da matriz).

Figura 29- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Ni em *2711a Montana Soil II* contendo $21 \pm 0,7 \text{ ng mg}^{-1} \text{ Ni}$. A linha contínua e a tracejada correspondem à média e desvio padrão (1σ), respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Associado ao estudo de massa mínima calculou-se o fator de homogeneidade (H_e) para o analito (Figura 30). Podemos observar que o Ni encontra-se uniformemente distribuído na amostra uma vez que, valores de $H_e < 8$ foram observados no intervalo de massa avaliado. Portanto, para a determinação de Ni em solos por SS HR-CS GFAAS, massas de amostras entre 0,10 – 0,15 mg foram pesadas e utilizadas nas determinações.

Figura 30- Homogeneidade do Ni obtido na amostra 2711a Montana Soil II.

Fonte: Autor, 2016.

5.4.6 Avaliação da precisão e exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação de Ni em cinco CRMs de solos. Os resultados obtidos na determinação de Ni, Tabela 26, estão em concordância com os valores certificados dos CRMs ao nível de 95% de confiança, aplicando o teste *t* de *Student*. Os valores de RSD ficaram inferiores a 7,2%, demonstrando a precisão do método.

Tabela 26- Resultados da determinação (n=3) de Ni (mg Kg⁻¹) nos CRMs de solos, utilizando calibração aquosa.

CRM	Valor certificado	Ni	RSD %
GBW07104 Rock – Constituents	17 ± 2	18,2 ± 1,3	7,2
2711a Montana Soil II	21,7 ± 0,7	22,6 ± 0,9	3,9
2709a San Joaquim Soil	85 ± 2	85,7 ± 1,2	1,4
IAEA-SOIL-7 Trace Elements in Soil*	26	25,8 ± 1,1	4,1
RTC-CRM031-040- Sewage sludge3 – Metals	136 ± 8,76	139 ± 5,9	4,3

* valor informativo (não certificado)

Fonte: Autor, 2016.

Vale ressaltar que a determinação de Ni em dois materiais de referência (2709a San Joaquim Soil e RTC-CRM031-040- Sewage sludge3 – Metals) só foi

possível utilizando a curva de calibração obtida na linha do tripleto do Ni em 341, 347 nm. Demonstrando assim a possibilidade de determinar Ni em ampla faixa de concentração nos solos via seus tripletos.

5.4.7 Determinação de Ni em amostras de solos

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Ni em diferentes solos brasileiros empregando a amostragem de sólidos, e os resultados estão mostrados na Tabela 27.

Tabela 27- Resultados da determinação (n=3) de Ni (mg Kg^{-1}) em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como média $\pm$ SD.

Amostra	[Ni]
Solo 1	$9,3 \pm 0,8$
Solo 2	$17,5 \pm 1,3$
Solo 3	$22,7 \pm 0,6$
Solo 4	$9,2 \pm 0,6$
Solo 5	$16,3 \pm 1,6$
Solo 6	$14,0 \pm 0,4$

Fonte: Autor, 2016.

As concentrações obtidas para Ni se encontraram no intervalo de 9,2 a 22,7 mg Kg^{-1} . A precisão das medidas (RSD) variou de 2,8 a 9,8%. A Resolução CONAMA nº 460/2013 estabelece a máxima concentração de Ni em solos agrícolas como sendo 70 mg Kg^{-1} . Já a CETESB estabelece como valor orientador máximo permitido sendo 30 mg Kg^{-1} Ni. Desta forma, os valores dos teores totais de Ni determinados nos solos do estudo, atendem a legislação CONAMA e a CETESB.

Teores de Ni adequados para suplementar as plantas variam de 0,01 a 10 mg Kg^{-1} Ni no solo. Observa-se grande amplitude de variação desses teores, pois a toxicidade de Ni é função da espécie vegetal (55) Assim a maioria das concentrações determinadas para Ni nos solos do estudo está acima dos valores normalmente adequados para as plantas, exceto nos solos #1 e #4.

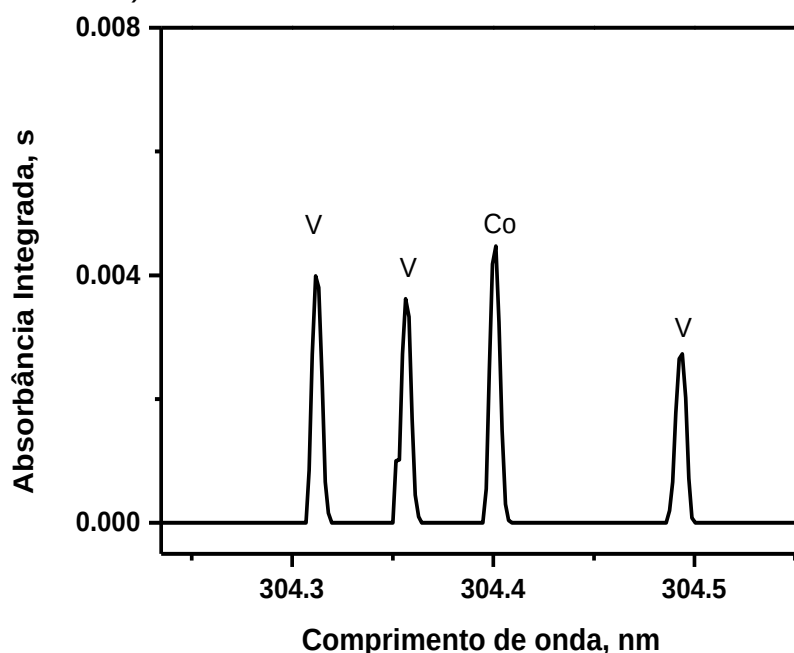
5.5 Determinação conjunta de Co e V em solo

5.5.1 Avaliação de medidas simultânea de Co e V

A linha escolhida para o monitoramento do Co em 304,400 nm apresenta baixa sensibilidade relativa (6,3%), mas apresenta-se adequada para determinar Co em solos uma vez que as concentrações usualmente encontradas são da ordem de 1 - 40 mg kg⁻¹ Co. (18) Nessa janela espectral da linha do Co utilizada, encontra-se o tripleto do V em 304, 312 nm (3,4% sensibilidade relativa), 304,355 nm (2,8% sensibilidade relativa) e 304,494 nm (2,2% sensibilidade relativa), Figura 31. Demonstrando assim a possibilidade de realizar medidas de absorbância para Co e V simultaneamente.

Há enzimas específicas em bactérias que utilizam o cofator Fe-V na fixação de nitrogênio da atmosfera no solo. Além disso, teores muito elevados de V em solos podem ser um indicativo de poluição originada por combustíveis fósseis (59). Dessa maneira o monitoramento do V em solos pode auxiliar na utilização de fertilizantes nitrogenados, além de ser uma ferramenta de avaliação de poluição ambiental.

Figura 31- Espectro de absorbância para Co e V (2 ng Co e 16 ng V), na janela espectral em 304,400 ± 0,2 nm (temperatura de pirólise em 1500°C e temperatura de atomização em 2650°C).



Fonte: Autor, 2016.

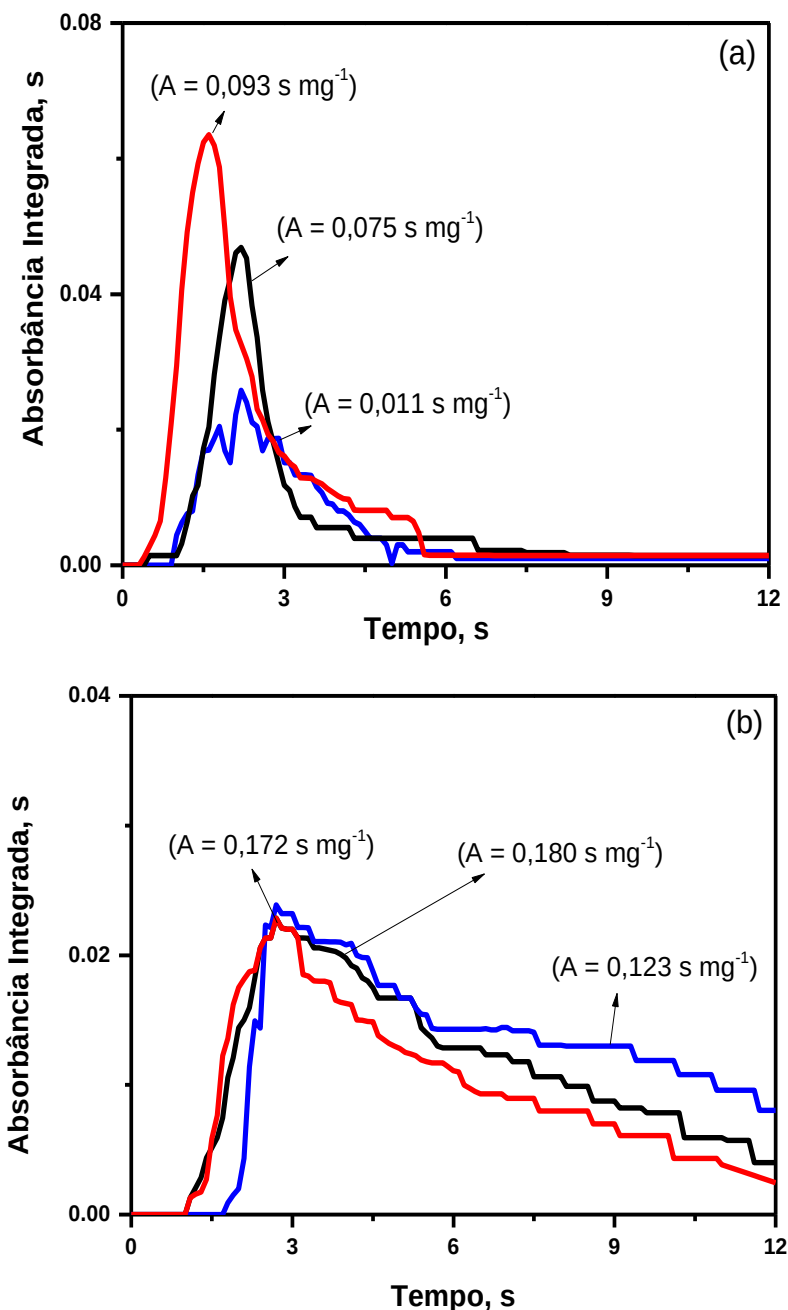
Considerando a ampla faixa de teores de V, 3 a 310 mg kg⁻¹, que podem ser encontrados em diferentes tipos de solos (59) monitorar o tripleto desse elemento pode ser uma excelente alternativa para ampliar a faixa linear de trabalho, e assim possibilitar a análise de diferentes solos contendo diversos teores de V.

5.5.2. Comportamento térmico do Co e V

Estudos preliminares foram realizados para avaliar a necessidade e a atuação de modificador químico nas determinações dos analitos. A escolha do NH₄F como possível modificador químico foi baseada em trabalhos na literatura. É reportado na literatura, indícios de formação de compostos voláteis (haletos metálicos) envolvendo elementos refratários como o V (ex.: VF₅), quando se utiliza HF ou NH₄ como modificadores químicos. Estudos também demonstraram sucesso quando NH₄F foi utilizado como modificador químico em amostras silicatadas. (60) As características desse modificador poderiam ser úteis no processo de atomização de Co e V presentes em amostras complexas e silicatadas como solo.

A influência do NH₄F como modificador químico nas absorbâncias referentes a 2 ng Co e 16 ng V foi avaliada variando-se a massa do modificador de 0 a 3 mg. O sinal transiente de absorção atômica do Co obtido em solo, na ausência de modificador químico, apresentou picos múltiplos e o seu retorno à linha base foi longo, o que indica efeitos significativos de matriz na vaporização do Co. A presença de modificador químico melhorou a atomização e o perfil do transiente, sendo a melhor condição observada para massas acima de 1,5 mg NH₄F. Deve-se destacar que a absorbância medida na presença do NH₄F foi cerca de 90% maior quando comparada com a medida sem modificador químico. Os perfis dos sinais transientes de Co obtidos em meio aquoso e sólido foram semelhantes, embora tenham apresentado diferentes sensibilidades nos dois meios (Figura 32a).

Figura 32- Perfil dos sinais transientes de absorbância atômica obtidos para 2 ng Co (a) e 16 ng V (b) em meio aquoso (linha vermelha) e em meio sólido (2709a San Joaquim Soil) na ausência de modificador (linha azul) e em meio sólido na presença de NH_4F (linha preta). O sinal de absorbância foi normalizado para facilitar a comparação dos sinais.



Fonte: Autor, 2016.

Em relação às medidas de V em meio sólido, na ausência do modificador observou-se que a cinética de liberação do analito é mais lenta se comparada com os perfis dos transientes de absorção atômica obtidos em meio aquoso. A presença

de 1,5 mg NH_4F foi suficiente e eficiente na atuação na matriz da amostra, pois o perfil do sinal de absorção atômica no meio sólido foi semelhante ao observado para o meio aquoso (Figura 32b). Desta forma, a presença de NH_4F foi importante, assim adicionou 5 μL de uma solução 30% (m/v) NH_4F na presença de 0,05% (m/v) de Triton X-100 nos estudos subsequentes envolvendo a determinação de Co e V em solos.

O programa de aquecimento do forno de grafite foi otimizado para a determinação simultânea de Co e V em solos, utilizando um planejamento fatorial 2^2 . As variáveis avaliadas foram temperatura de pirólise e temperatura de atomização nos seguintes níveis mínimos e máximos: 1300 e 1500°C, 2500 e 2650°C, respectivamente. Na execução da matriz experimental, utilizando uma amostra de solo, para avaliar o efeito das variáveis estudadas na determinação das temperaturas de compromisso, obteve-se as respostas para Co e V mostradas na Tabela 28.

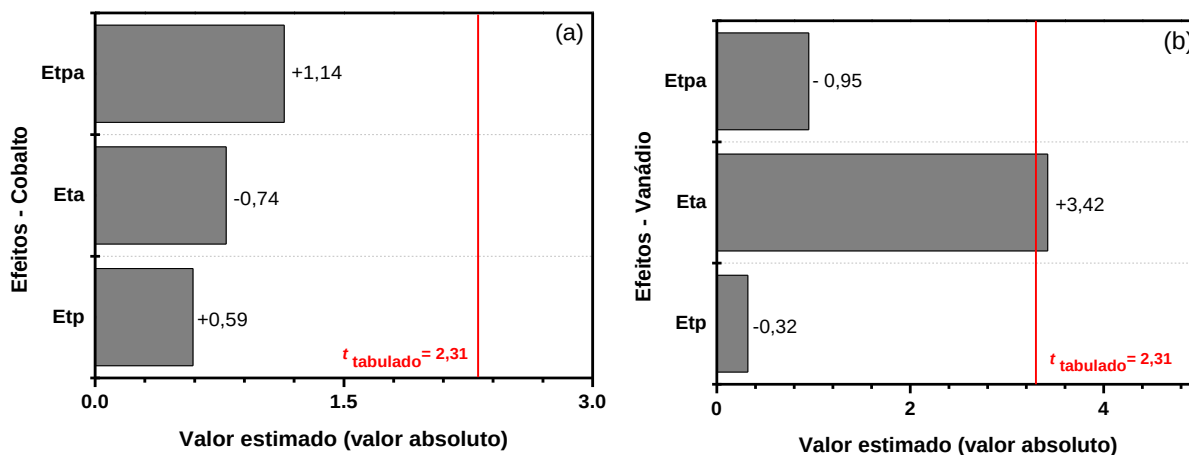
Tabela 28- Respostas dos experimentos realizados para Co e V.

Experimento	Resposta	
	Absorbância Integrada Normalizada (s mg^{-1})	
	Co	V
1	0,509 $\pm$ 0,108	1,987 $\pm$ 0,545
2	0,556 $\pm$ 0,043	2,374 $\pm$ 0,435
3	0,472 $\pm$ 0,043	4,615 $\pm$ 0,803
4	0,582 $\pm$ 0,026	3,846 $\pm$ 0,555

Fonte: Autor, 2016.

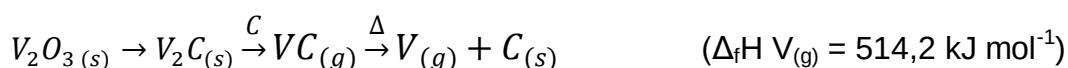
As respostas dos experimentos foram inseridas no software Statgraphics Centurion XVI, e gerou o gráfico de Pareto individual para os elementos de estudo descrito na Figura 33. A partir do Gráfico de Pareto é possível observar as variáveis que apresentaram efeitos significativos ao nível de 95%.

Figura 33- Gráficos de Pareto gerado pelo Software Statgraphics Centurion XVI a partir do planejamento fatorial 2^2 , para Co (a) e V (b).



Fonte: Autor, 2016.

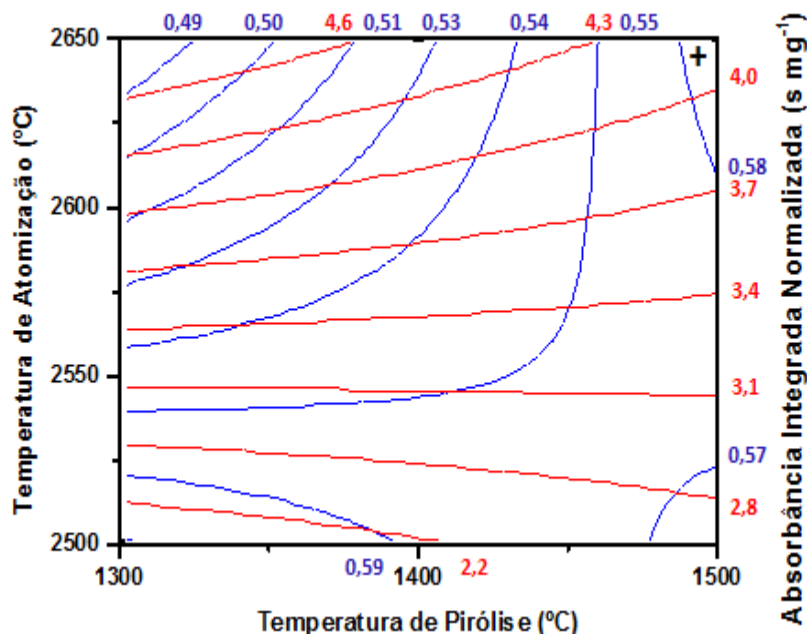
Para Co nenhum efeito significativo foi observado, para as variáveis estudadas, na resposta analítica (Figura 33a). Para V apenas a temperatura de atomização (Eta) apresentou efeito significativo e positivo. Esse efeito significativo indica que a temperatura de atomização no seu nível máximo (2650°C) maximiza a resposta analítica. Isso possivelmente ocorre devido o mecanismo de atomização do V se proceder a partir do precursor carbeto de vanádio. Como relatado na literatura, a entalpia de formação de átomos gasosos ($\Delta_f H$) de V requer altas temperaturas e energia,



justificando assim esse efeito significativo. (29,52)

A partir das condições experimentais e respostas analíticas, gerou-se um modelo matemático através do qual se obteve o gráfico de contorno sobreposto para Co e V, ilustrado na Figura 34. As interações entre as variáveis que apresentaram efeitos significativos foram consideradas para a definição das temperaturas de compromisso entre os elementos de interesse.

Figura 34- Gráfico de contorno sobreposto para Co (linha azul) e V (linha vermelha) obtido pelo software Statgraphics Centurion XVI.



Fonte: Autor, 2016.

A região indicada por “+”, no gráfico de contorno sobreposto, indica a condição de compromisso entre as temperaturas de pirólise e atomização, resultando no melhor valor de absorbância integrada para Co e V simultaneamente. As melhores condições analíticas apontadas foram temperatura de pirólise em 1500°C e temperatura de atomização em 2650°C. Dessa maneira o programa de aquecimento elaborado está apresentado na Tabela 29.

Tabela 29- Programa de aquecimento para a determinação conjunta de Co e V pelo método proposto.

Etapa	Temperatura	Rampa	Tempo	Taxa de fluxo do gás Ar
	(°C)	(°C s ⁻¹)	(s)	(L min ⁻¹)
Secagem 1	100	6	10	2
Secagem 2	250	10	35	2
Pirólise	1500	150	10	2
Auto-zero*	1500	0	5	0
Atomização	2650	3000	10	0
Limpeza	2650	0	5	2

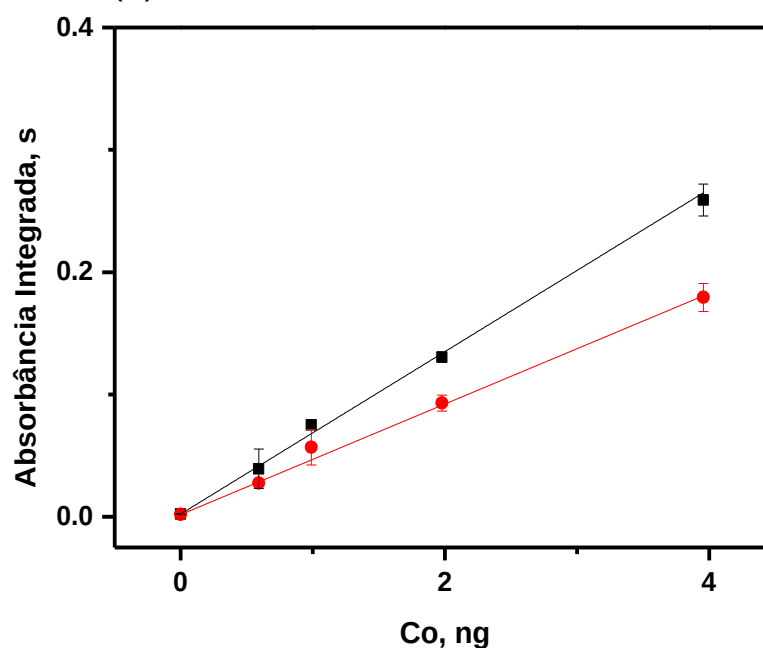
* Etapa para garantir que a atomização comece sem a presença de argônio.

Fonte: Autor, 2016.

5.5.3 Avaliação de possíveis efeitos de matriz

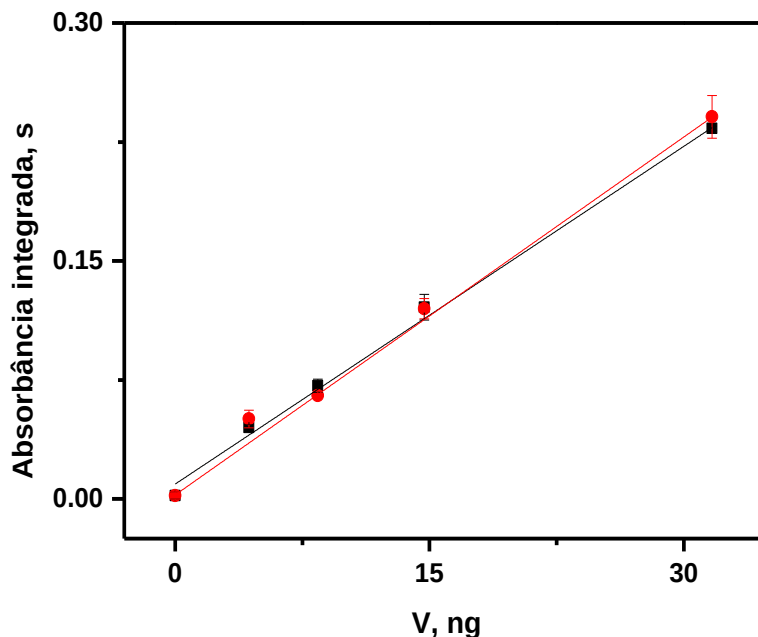
O estudo de possíveis efeitos de matriz na absorbância do Co e V, foi conduzido por meio da comparação das massas características (m_0) e dos coeficientes angulares de curvas de calibração, construídas nos intervalos de massa 0 – 4,0 ng Co e 0 - 33 ng V, utilizando i- padrões aquosos e ii- padrões sólidos (2711a Montana Soil II) (Figuras 35 e 36).

Figura 35- Curvas de calibração para Co empregando padrão aquoso (■) e CRM 2711a Montana Soil II (●).



Fonte: Autor, 2016.

Figura 36- Curvas de calibração para V (304,355 nm) empregando padrão aquoso (■) e CRM 2711a Montana Soil II (●).



Fonte: Autor, 2016.

Observaram-se bons coeficientes de correlação lineares (r) para as curvas de resposta do Co (aquoso: $r=0,9979$; sólido: $r=0,9987$) e do V (aquoso: $r=0,9992$; sólido: $r=0,9953$). Em relação aos coeficientes angulares (s) dessas curvas e as massas características (m_0) calculadas para os meios aquoso e sólido e aplicando o teste estatístico teste t de *Student* ao nível de 95% de confiança, não foram observados efeitos significativos de matriz para V (aquoso: $s=0,0073 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,43 \text{ ng}$; sólido: $s=0,0075 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,41 \text{ ng}$). Para o Co, houve um efeito de matriz da amostra significativo no mecanismo de atomização, observado nas diferenças de valores dos coeficientes angulares das curvas e das m_0 calculadas para os meios aquoso ($s=0,066 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,057 \text{ ng}$) e sólido ($s=0,045 \text{ s ng}^{-1}$, $m_0=0,093 \text{ ng}$).

Os resultados apresentados indicam que na determinação dos analitos empregando a amostragem de solos, é possível utilizar a calibração com padrões aquosos apenas para o V. No caso do Co, a calibração requer compatibilização de matriz. Nesse caso, optou-se por utilizar o CRM 2711a Montana Soil II. Como as linhas analíticas do Co (304,400 nm) e do V (304,355 nm) se encontram na mesma janela espectral da linha principal do Co ($304,400 \pm 0,2 \text{ nm}$), as medidas de absorbâncias desses dois elementos nas amostras de solos foram obtidas

simultaneamente; contudo, as concentrações de Co e V foram calculadas empregando-se as respectivas calibrações em meio ou aquoso (V) ou sólido (Co).

5.5.4 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analítico como faixa de resposta linear, coeficiente de correlação linear (r), LOD, LOQ, massa característica (m_0) e precisão (RSD), foram obtidos para Co e V. Os parâmetros de desempenho analítico foram calculados por meio das curvas de calibração, monitorando a linha para Co em 304,400 nm e para V o duplete em 304,355 nm e 304,497 nm; e estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30- Parâmetros de desempenho analítico para determinação conjunta de Co e V em solo por DSS HR-CS GFAAS.

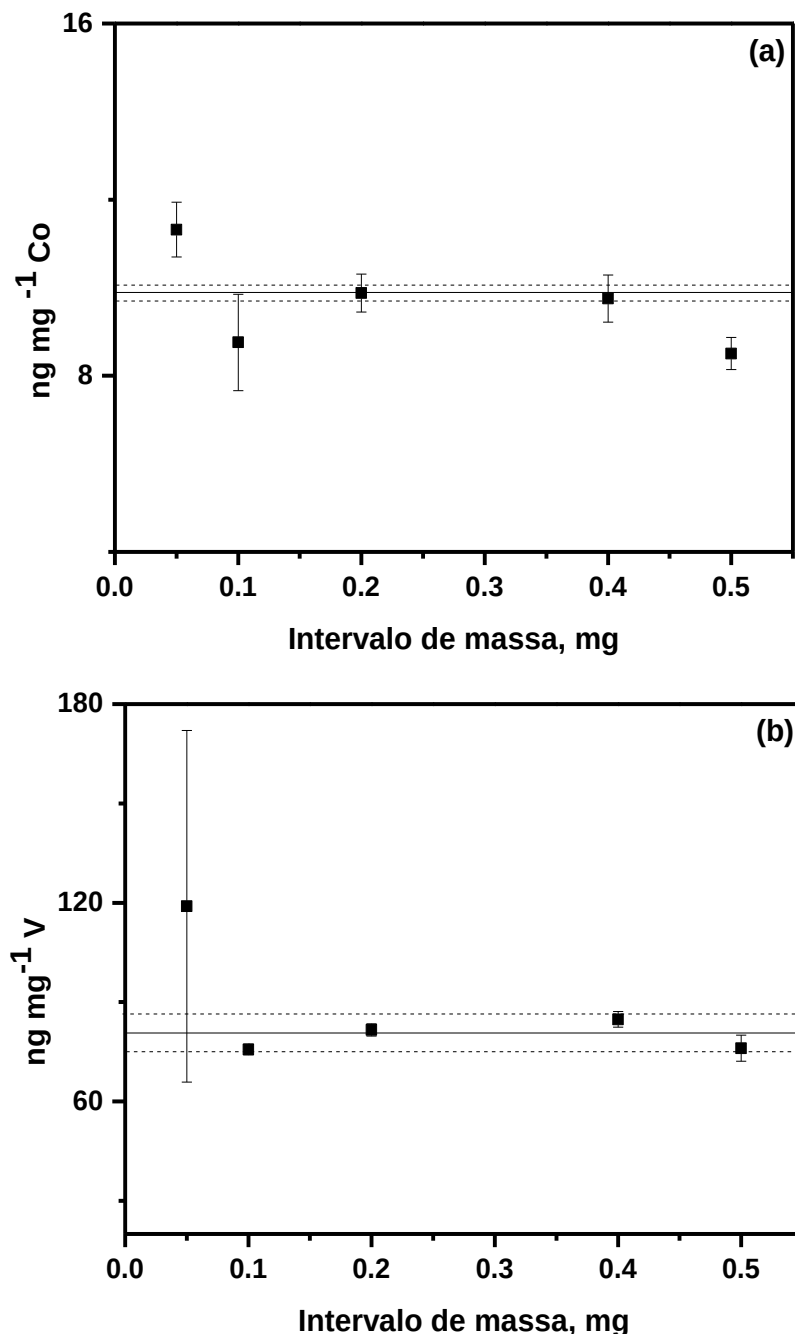
Parâmetro	Co	V	
λ (nm)	304,400	304,355	304,494
Faixa de resposta linear (ng)	0 – 5,0	0 – 33	0 – 40
R	0,9979	0,9992	0,9981
m_0 (ng)	0,093	0,43	0,64
LOD (ng)	0,044	0,43	0,59
LOQ (ng)	0,15	1,43	1,96
RSD (%)	4,0 – 9,2	1,2 – 8,0	1,3 – 5,3

Fonte: Autor, 2016.

5.5.5 Massa mínima e fator de homogeneidade

O estudo da influência da massa mínima para a determinação conjunta de Co e V em solos, foi avaliado utilizando diferentes massas (0,05 – 0,5 mg) do CRM *2711a Montana Soil II*. Pode-se observar a partir do estudo de massa mínima, boa precisão e exatidão para a determinação conjunta de Co e V, quando massas no intervalo de 0,15 a 0,35 mg foram utilizadas (Figura 37).

Figura 37- Influência da massa da amostra sobre a precisão e exatidão na determinação do Co e V em 2711a Montana Soil II contendo $9,89 \pm 18 \text{ ng mg}^{-1} \text{ Co}$ (a) e $80,7 \pm 5,7 \text{ ng mg}^{-1} \text{ V}$ (b). A linha contínua e a tracejada correspondem a média e desvio padrão (1σ), respectivamente.

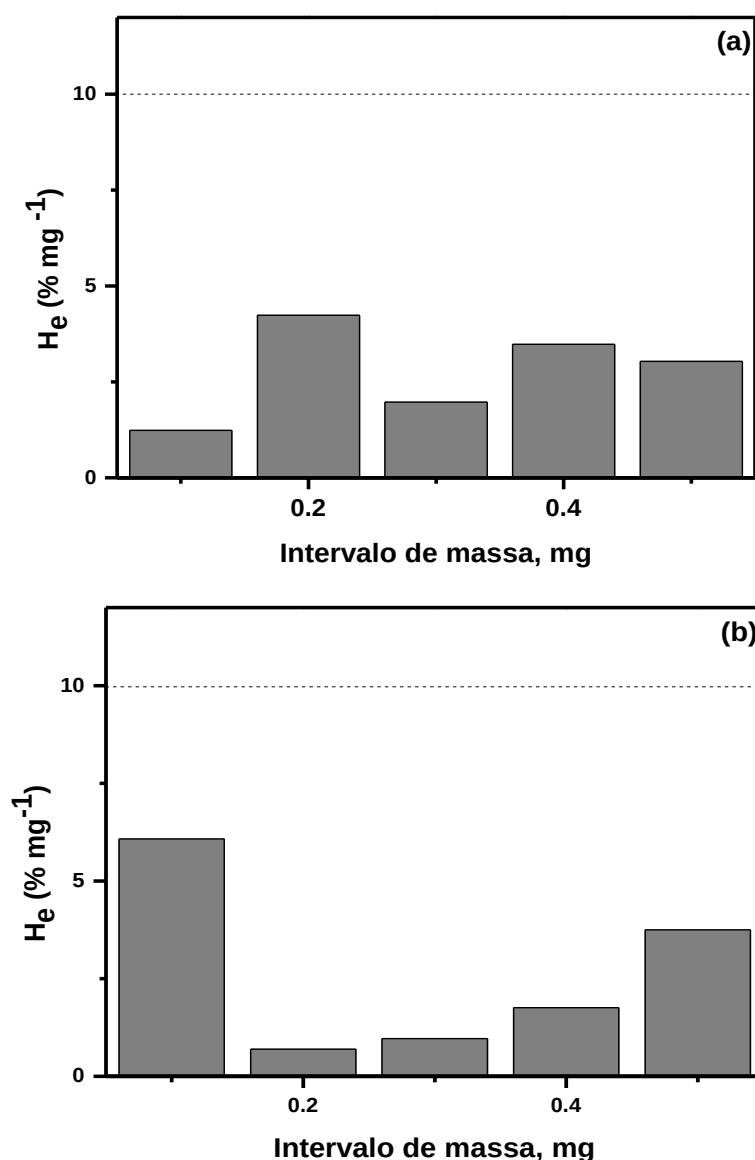


Fonte: Autor, 2016.

Associado ao estudo de massa mínima calculou-se o fator de homogeneidade (H_e) para os analitos (Figura 38). Considerando o intervalo de massa de 0,15 a 0,35 mg, pode-se observar que Co e V encontram-se

uniformemente distribuídos na amostra, uma vez que o $H_e < 10$. Portanto, para a determinação conjunta de Co e V em solo por SS HR-CS GFAAS, massas de amostras entre 0,15 - 0,20 mg foram transferidas manualmente para a plataforma de amostragem de sólidos, foram pesadas e introduzidas automaticamente no forno de grafite.

Figura 38- Homogeneidade do Co (a) e do V (b) obtido na amostra 2711a Montana Soil II.



Fonte: Autor, 2016.

5.5.6 Avaliação da precisão e exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação conjunta de Co e V em amostras de CRMs de solos, e da avaliação estatística (teste t de Student)

ao nível de 95% de confiança. A precisão do método foi avaliada por meio dos desvios padrões relativos, sendo considerado preciso RSD inferior a 10%. Os resultados obtidos na determinação conjunta de Co e V (Tabela 31) estão de acordo com os valores certificados dos CRMs ao nível de 95% de confiança.

Tabela 31- Resultados da determinação conjunta (n=3) de Co e V (mg Kg^{-1}) nos CRMs de solos.

CRM	Co		V	
	Valor	RSD	Valor	RSD
	determinado	%	determinado	%
2711a Montana Soil II ^a	$9,9 \pm 0,7$	6,9	$79,6 \pm 3,8$	4,8
2709a San Joaquim Soil ^b	$12,6 \pm 0,8$	6,5	$110,1 \pm 3,3$	3,0
GBW07104 Rock – Constituents ^c	$13,0 \pm 0,2$	1,3	$90,6 \pm 8,6$	9,5
IAEA-SOIL-7 Trace Elements in Soil ^d	$10,8 \pm 0,6$	5,9	$66,0 \pm 3,3$	5,0

^avalor certificado: $9,89 \pm 0,18 \text{ mg Kg}^{-1}$ Co; $80,7 \pm 5,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ V

^bvalor certificado: $12,8 \pm 0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ Co; $110 \pm 11 \text{ mg Kg}^{-1}$ V

^cvalor certificado: $13,2 \pm 1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ Co; $94 \pm 6 \text{ mg Kg}^{-1}$ V

^dvalor informativo (não certificado): $8,9 \text{ mg Kg}^{-1}$ Co; 66 mg Kg^{-1} V

Fonte: Autor, 2016.

5.5.7 Determinação conjunta de Co e V em amostras de solos

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Co e V em diferentes amostras de solos brasileiros, empregando a amostragem de sólidos. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 32.

Tabela 32- Resultados da determinação (n=3) de Co e V em solo pelo método proposto envolvendo DSS HR-CS GFAAS. Valores expressos como $\text{mg Kg}^{-1} \pm \text{SD}$.

Amostra	[Co]	[V]
Solo 1	<1,0	$35,6 \pm 0,9$
Solo 2	$5,2 \pm 0,3$	$152,2 \pm 11,3$
Solo 3	$10,7 \pm 0,9$	$426,1 \pm 22,6$
Solo 4	$1,1 \pm 0,1$	$35,6 \pm 2,6$
Solo 5	$4,7 \pm 0,4$	$81,1 \pm 6,5$
Solo 6	$1,7 \pm 0,1$	$108,0 \pm 1,3$

Fonte: Autor, 2016.

As concentrações de Co e V determinadas nas amostras foram de 1,1 a 10,7 mg Kg⁻¹, e de 35,6 a 426,1 mg Kg⁻¹, respectivamente. Concentrações estas que estão compatíveis com os teores usualmente encontrados em solos agrícolas (Co: 0,5 – 3,0 mg Kg⁻¹; V: 6,6 a 785 mg Kg⁻¹- latossolo; V: 4,6 a 432 mg Kg⁻¹- argissolo, V: 130 – 150 mg Kg⁻¹ em solos agricultáveis). (53-54,59) A precisão das medidas (RSD) variou de 4,0 a 9,2% (Co) e 1,2 a 8,0% (V). A amostra de solo # 3 forneceu absorvância para V (λ = 304,355 nm) acima do limite superior de resposta linear. Como o tripleto do V é medido simultaneamente, a absorvância medida na linha menos sensível do em V 304,494 nm foi utilizada para ampliar a faixa linear de trabalho de maneira simples, sem a necessidade de modificar as condições instrumentais otimizadas para reprocessar a medida.

A Resolução CONAMA nº 460/2013 estabelece a máxima concentração permitida do elemento Co em solos agrícolas como sendo 35 mg Kg⁻¹ e a CETESB em 39,6 mg Kg⁻¹. A resolução CONAMA e a CETESB não contemplam valor orientador para V em solos agrícolas, no entanto para solos de áreas industriais a resolução CONAMA estabelece a concentração máxima permitida sendo 1000 mg Kg⁻¹.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da HR-CS GFAAS aliada a amostragem direta de sólidos possibilitou trabalhar com amostras complexas e de difícil solubilização tais como materiais vegetais e solos. Os métodos desenvolvidos revelaram ser uma alternativa simples, rápida e de baixo consumo de reagentes, e diminuíram substancialmente a quantidade de resíduos gerados, e os riscos de contaminação da amostra.

Na amostragem direta de sólidos, como a amostra é introduzida integralmente no forno de grafite, há aumento de problemas relacionados a interferências espectrais, como os observados na determinação de Co em material vegetal. No entanto, a HR-CS GFAAS permitiu identificar e corrigir interferências espectrais provocadas por estruturas rotacionais finas de moléculas de SiO empregando a correção de fundo pelo algoritmo de mínimos quadrados (LSBC).

O arranjo instrumental da técnica também possibilitou determinar simultaneamente Mo e Ni em material vegetal utilizando Co como padrão interno, e determinar conjuntamente Co e V em solos. Ainda o monitoramento de tripletos possibilitou ampliar a faixa linear de trabalho em 63 vezes para Ni, monitorando o duplete deste elemento que se encontra na janela espectral em $341,477 \pm 0,2$ nm.

O planejamento fatorial possibilitou de maneira rápida, eficiente e econômica o estabelecimento das temperaturas de compromisso utilizadas nos programas de aquecimento do tubo de grafite.

Os métodos propostos para determinar Mo, Ni e Co em materiais vegetais e os métodos para determinar Mo, Ni, Co e V em solos, empregando DSS HR-CS GFAAS, são adequados, apresentando resultados precisos e exatos e constituem ferramentas úteis para laboratórios que lidam com diagnose foliar, bem como na avaliação dos níveis de fertilidade e interpretação das análises de solos.

REFERÊNCIAS

- 1 ASSAD, M. L. L.; ALMEIDA, J. Agricultura e sustentabilidade. **Ciência & Ambiente**, n. 29, p. 15-30, 2004.
- 2 PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos Avançados**, v. 15, n. 45, p. 303-326, 2001.
- 3 MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995.
- 4 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção da diversidade biológica**. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica>>. Acesso em: 20 maio 2016.
- 5 TEJADA-JIMENEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. Molybdenum metabolism in plants. **Metallomics**, v. 5, p. 1191-1203, 2013.
- 6 ZIMMER, W.; MENDEL, R. Molybdenum metabolism in plants. **Plant Biology**, v. 1, p. 160-168, 1999.
- 7 WENDLING, L. A.; KIRBY, J. K.; McLAUGHLIN, M. J. Aging effects on cobalt availability in soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 1609-1617, 2009.
- 8 POLLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. **Plant Science**, v. 199, p. 79-90, 2013.
- 9 SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal Plant Physiology**, v. 53, p. 257-277, 2006.
- 10 KURFÜRST, U. **Solid sample analysis: direct and slurry sampling using GFAAS and ETV-ICP**. Berlin: Springer-Verlag, 1998.
- 11 MATOS, P. F.; PESSÔA, V. L. S. A modernização da agricultura no Brasil e os novos usos do território. **Geo UERJ**, n. 22, v. 2, p. 290-322, 2011.
- 12 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 21 maio 2016.
- 13 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf)>. Acesso em: 21 maio 2016.
- 14 MENGEL, K.; ERNEST, K. A. **Principles of plant nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

- 15 CORÁ, J. E.; ARAÚJO, A. V.; PERREIRA, G. T.; BERALDO, J. M. G. Variabilidade espacial de atributos do solo para adoção do sistema de precisão na cultura de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 1013-1021, 2004.
- 16 CARDOSO, E. L.; FERNANDES, A. H. B. M.; FERNANDES, F. A. Análises de solos: finalidade e procedimento de amostragem. **Comunicado Técnico/Embrapa Pantanal**, n. 79, dez. 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/807342/1/COT79.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2016.
- 17 NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. (Ed.). **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- 18 KURIHARA, C. H.; MAEDA, S.; V. ALVAREZ, V. H. Interpretação de resultados de análise foliar. **Documentos/Embrapa Agropecuária Oeste**, n. 74, nov. 2005. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38088/1/DOC200574.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2016.
- 19 CARMO, C. A. F. S.; ARAÚJO, W. S.; BERNARDI, A. C. C.; SALDANHA, M. F. C. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. **Circular Técnica/Embrapa Solos**, n. 6, dez. 2000. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/62212/1/Metodo-de-analise-de-tecido.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2016.
- 20 CANTARELLA, H.; ABREU, M. F.; COSCIONE, A.; ZAMBROZI, F. C. B.; ABRAMISE, P. **Ensaio de proficiência IAC para laboratórios de análise de solo par fins agrícolas: relatório anual 2015**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2015. Disponível em: <http://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/Relatorio_Anual_Prog_Lab_2015_NET.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2016.
- 21 PELEGRININ, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.
- 22 SFREDO, G. F.; OLIVEIRA, M. C. N. Soja: molibdênio e cobalto. **Documentos/Embrapa Soja**, n. 322, jul. 2010. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc_322_online.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- 23 LI, H.; GRAY, C.; MICO, C.; ZHAO, F.; McGRATH, S. P. Phytotoxicity and bioavailability of cobalto to plants in a range of soil. **Chemosphere**, v. 75, p. 979-986, 2009.
- 24 DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean uréase (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme: simple biological role for nickel. **Journal of the Americam Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, 1975.

25 REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agronômicas**, n. 147, p. 10-24, 2014.

26 MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Níquel - de tóxico a essencial. **Informações Agronômicas**, n. 118, p. 1-3, 2007.

27 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2009. n. 249, p. 81-84. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

28 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3052**: microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Whashington, DC, 1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2016.

29 WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

30 WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High resolution continuum-source atomic absorption spectrometry – what can we expect? **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220-229, 2003.

31 BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, n. 18, p. 58-67, 2005.

32 WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-resolution continuum-source AAS**: the better way to do atomic absorption spectrometry. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

33 SCHUETZ, M.; MURPHY, J.; FIELDS, R. E.; HARNLY, J. M. Continuum source-atomic absorption spectrometry using a two-dimensional charge coupled device. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, n. 12, p. 1895-1912, 2000.

34 L'VOV, B. The analytical use atomic absorption spectra. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 17, n. 1, p. 761-770, 1961.

35 NOMURA, C. S.; SILVA, S. C.; VITORIANO, P. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, v. 31, p. 104-113, 2008.

36 KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: F. J. Krug, 2008.

- 37 WELZ, B.; VALE, M. G. R.; BORGES, D. L. G.; HEITMANN, U. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 2085-2095, 2007.
- 38 PAUWELS, J.; HOFMANN, C.; VANDECASTEELE, C. On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 348, n. 7, p. 418-421, 1994.
- 39 DUARTE, A. T.; BORGES, A. R.; ZMOZINSKI, A. V.; DESSUY, M. B.; WELZ, B.; ANDRADE, J. B.; VALE, M. G. R. Determination of lead in biomass and products of the pyrolysis process by direct solid sample analysis using HR-CS GFAAS. **Talanta**, v. 146, p. 166-174, 2016.
- 40 GÓMEZ-NIETO, B.; GISMERA, M. J.; SEVILLA, M. T.; PROCOPIO, J. R. Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 860-865, 2013.
- 41 RÊGO, J. F.; VIRGILIO, A.; NÓBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling. **Talanta**, v. 100, p. 21-26, 2012.
- 42 BOSCHETTI, W.; ORLANDO, M.; DULLIUS, M.; DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; WELZ, B.; ANDRADE, J. B. Sequential and simultaneous determination of four elements in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic and molecular absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 1269-1277, 2016.
- 43 ORANI, A. M.; HAN, E.; MANDJUKOV, P.; VASSILEVA, E. Marine sediments monitoring studies for trace elements with the application of fast temperatures programs in solid sampling high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 103, p. 131-143, 2015.
- 44 ARAÚJO, R. G. O.; WELZ, B.; VIGNOLA, F.; BECKER-ROSS, H. Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry – Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling. **Talanta**, v. 80, p. 846-852, 2009.
- 45 INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Analytical Chemistry Division**. Durham, c2016. Disponível em: <http://iupac.org/who-we-are/divisions/division-details/?body_code=500>. Acesso em: 6 fev. 2016.
- 46 VERREPT, P.; DAMS, R.; KURFÜRST, U. Electrothermal vaporization inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry for the analysis of solid samples- contribution to instrumentation and methodology. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 346, n. 12, p. 1035-1041, 1993.
- 47 EPSTEIN, E.; BLOMM, A. **Mineral nutrition of plants**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.

- 48 PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.
- 49 FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; BARROS NETO, B. de; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.
- 50 WU, S.; CHAKRABARTI, C. L.; MARCANTONIO, F.; HEADRICK, K. L. Mechanisms of atomization of molybdenum in graphite furnace absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 41, p. 651-667, 1986.
- 51 BECHLIN, M. A.; FORTUNATO, F. M.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L.; JONES, B. T. Bismuth as a general internal standard for lead in atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 831, p. 24-30, 2014.
- 52 LIDE, D. R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- 53 COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Valores orientadores para solo e água subterrânea no estado de São Paulo - 2014**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/solo/wpcontent/uploads/sites/34/2013/12/VO-2014.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2016.
- 54 DAS, A. K.; CHAKRABARTY, R.; CERVERA, M. L.; GUARDIA, M. de la. A review on molybdenum determination in solid geological samples. **Talanta**, v. 71, p. 987-1000, 2007.
- 55 KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements from soil and plant**. 4th ed. New York: CRC Press, 2011.
- 56 RESANO, M.; RELLO, L.; FLÓREZ, M.; BELARRA, M. A. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 321-328, 2011.
- 57 VOLYNSKY, A. B. Chemical modifiers in modern electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, p. 905-921, 2002.
- 58 VOLYNSKY, A. B.; WENNRICH, R. Mechanisms of the action of platinum metals modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry: aims and existing approaches. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 1301-1316, 2002.
- 59 HUANG, J.-H.; HUANG, F.; EVANS, L.; GLASAUER, S. Vanadium: global (bio) geochemistry. **Chemical Geology**, v. 417, p. 68-89, 2015.
- 60 RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; QUERALT, I.; MARGUÍ, E. Determination of palladium, platinum and rhodium in used automobile catalyst and active pharmaceutical ingredients using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 105, p. 38-46, 2015.

Anexo 1

Resultados das análises, química e física, das amostras de solos utilizadas nesse trabalho.

Amostra	P	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	Al	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na*	Si*
	resina		CaCl ₂													
	mg/dm ³	g/dm ³	--	----- mmol _c /dm ³ -----					----- mg/dm ³ -----					mmol _c /dm ³ mg/dm ³		
Solo 1	5	21	4,4	1	12	8	29	3	3	0,26	0,3	41	8,7	0,9	0,2	3
Solo 2	316	26	5,4	6,4	44	14	29	0	3	0,29	2,3	46	6,3	7,6	0,3	10
Solo 3	12	47	4,6	1,8	17	8	59	3	13	0,26	2,8	39	9,4	1,7	0,1	6
Solo 4	6	21	4,4	1	12	7	30	3	3	0,25	0,3	41	8,1	0,9	0,2	3
Solo 5	310	26	5,4	6,6	43	14	29	0	4	0,27	2,3	45	6,2	7,4	0,2	10
Solo 6	31	32	6,4	4,7	50	26	13	0	5	0,36	1,7	17	9,8	6,4	0,1	11

*resultados são baseados em baixo número de observações e devem ser considerados com reserva.

Amostra	Argila	Silte	Areias		
			total	grossa	fina
			----- g/kg -----		
Solo 1	117	44	838	367	482
Solo 2	361	113	523	361	160
Solo 3	451	178	371	164	206
Solo 4	114	47	838	358	481
Solo 5	364	113	521	352	165
Solo 6	270	88	642	398	242

Fonte: Ensaio de Proficiência para laboratórios de análises de solo para fins agrícolas – programa de Laboratório IAC 2014.