



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA

**Estratégias analíticas para determinação de Cd e Hg empregando
espectrometria de fluorescência atômica com geração química de
vapor**

DANIEL LEVI FRANÇA DA SILVA

Salvador

2021

Daniel Levi França da Silva

Estratégias analíticas para determinação de Cd e Hg empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração química de vapor

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutor em química analítica. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador

2021



TERMO DE APROVAÇÃO

DANIEL LEVI FRANÇA DA SILVA

“ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Hg EMPREGANDO A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA COM GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos Walter Nei L. dos Santos
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. João Batista Pereira Junior João Batista Pereira Junior
Doutorado em Química pela Universidade Federal do Pará (UFPA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley César Ricardo Teixeira Tarley
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva Douglas Gonçalves da Silva
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz Antônio Fernando de Souza Queiroz
Doutorado em Geologia Geoquímica do Meio Ambiente, Université Louis Pasteur de Strasbourg, França
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 03 de setembro de 2021.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S586 Silva, Daniel Levi França da

Estratégias analíticas para determinação de Cd e Hg empregando a espectrometria de fluorescência atômica com geração química de vapor/ Daniel Levi França da Silva. – Salvador, 2021.

90 f.

Orientador: Prof^o. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2021.

1. Água do mar - análise. 2. Cádmio. 3. Mercúrio. 4. Espectrometria. I. Santos, Walter Ney Lopes dos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 504.4

**Dedico mais este sonho aos meus pais
Valdineide e Jair (in memoriam) por me
apoiarem durante toda a minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Céu, que me possibilitou a vida, saúde, nesses momentos tão difíceis, e pessoas incríveis em minha vida.

Agradeço a minha mãe e minha irmã, por sempre estarem ao meu lado, me dando força e muito amor.

Agradeço à família Oliveira (Gilmar, Dilma, Luíte e Luíse), por me adotarem aqui em Salvador, sempre me ajudando e me dando apoio para sempre ir além.

Agradeço muito ao meu orientador, o Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos, pela orientação, as palavras diárias de incentivo, por não desistir de mim em nenhum momento e pela grande amizade.

Agradeço ao meu coorientador, o Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira, por todo o ensinamento e ajuda durante o doutorado.

Agradeço ao GPDQA, Bárbara, Jamile, Jota, Isaac, Bruna, Celeste, Milene, Jéssica, Prof^a. Débora, Prof. Anibal, por momentos inesquecíveis no laboratório e fora dele.

Agradeço ao GRPQQ, Mario, Cheilane, Léo (agregado), Oscar (agregado), Adilson, João, Danilo, Adriano, Shirlei, Buga, Michael, Rodrigo, por todas as discussões, trabalhos, cafés e cervejas. Agradecimento especial ao Caio, por tudo isso e pela ajuda em vários momentos.

Agradeço a Geovani (Jowzinho), por toda amizade, conversa, canto, dança e ajuda no laboratório.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Laiana por todo ensinamento sobre geração química de vapor e por todo o carinho e amizade.

Agradeço aos amigos Laís e Luis Eduardo (Dudu), que desde 2009 me incentivam, motivam, ensinam e sempre estão ao meu lado, nos momentos bons e ruins.

Agradeço aos meus amigos Quatchaceiros, Bernardo e Igor, pela amizade de sempre e excelentes momentos com cerveja e churrasco.

Agradeço a Camila Macedo, por toda amizade, ajuda e incentivo durante a escrita da qualificação e da tese e por todas as conversas sobre temas aleatórios que me ajudam muito durante a quarentena.

Agradeço a Lilian Miguez, por toda conversa e apoio durante esse período de quarentena.

Agradeço aos amigos que fiz durante esses anos, Lídio, Ariana, Estéfane, Lenai, Luana, Márcio, que possibilitaram conversas e momentos fantásticos.

Agradeço aos irmãos da REB, pela companhia e excelentes momentos, especialmente a Nilda que foi uma grande amiga nesse último ano.

Agradeço a UNEB e a UFBA, pela estrutura oferecida para realização deste trabalho e a CAPES pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

“Nada pode parar quem sabe onde quer chegar.
Tudo que um sonho precisa para ser realizado
é de alguém que acredita que ele pode ser realizado.
O sacrifício? É o intervalo entre o objetivo e a glória.
Transforme a motivação em hábito, a dor é temporária,
mas a glória é permanente.”

VG Beats – Superação: Suor, Lutas e Glória

RESUMO

Neste trabalho foram aplicadas estratégias analíticas para a determinação de Cd e Hg em amostras de água do mar empregando a espectrometria de fluorescência Atômica com geração química de vapor (CVG AFS). Para o desenvolvimento do método uma adaptação no sistema de geração de vapor frio foi realizada, com a finalidade de diminuir o consumo de amostra/ reagente e melhorar a estabilidade do sinal analítico da técnica. Também foi empregada uma metodologia de otimização multivariada, para ambos os analitos. Primeiramente, um planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3), foi empregado para avaliar a tendência dos fatores: concentração de HCl, concentração de NaBH_4 e vazão do gás de arraste (VGA). Dentro do domínio experimental estabelecido todas os fatores foram significativos, assim como a interação entre eles. Após a etapa de triagem, foi aplicado um planejamento Box-Behnken com o intuito de otimizar as condições de geração de vapor frio. Os resultados da otimização foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA), demonstrando que os fatores são estatisticamente significativos e que o modelo gerado representa adequadamente o método proposto, obtendo como valores críticos 0,408 e 0,41 mol L⁻¹ de [HCl], 2,80 e 3,86 % (m v⁻¹) de [NaBH_4] e 0,27 e 0,19 mL min⁻¹ de VGA para Cd e Hg, respectivamente. Além disso, um estudo univariado para aferir a influência das concentrações de L-cisteína e cobalto II no processo de geração de vapor frio foi realizado. O método proposto permitiu a determinação de cádmio e mercúrio com limites de detecção de 0,16 e 0,20 ng L⁻¹, precisão a partir do desvio padrão relativo (RSD) do ERM CA713 de 4,3 e 3,4 %, para Cd e Hg, respectivamente. A exatidão do método foi confirmada mediante análise dos materiais de referência de água residual (CA713), tecido de ostra (NIST 1566b), folha de espinafre (NIST 1570a) e solode San Joaquin (SRM 2709a). Um estudo da calibração do método foi realizado para validar que o método proposto não sofre interferência da matriz água do mar. Após isso, o método foi satisfatoriamente aplicado em três amostras de água do mar coletadas na região de Salvador-BA, Brasil. As concentrações de Cd e Hg nas amostras estão de acordo com a literatura e apresentaram valores abaixo dos limites máximos permitidos pela resolução do CONAM 357/2005 para águas salinas classe II.

ABSTRACT

In this present work, analytical strategies for the determination of Cd and Hg in sea water samples using Atomic Fluorescence Spectrometry with Cold Vapor Generation (CV AFS) were applied. For the development of the method an adaptation in the cold vapor generation system was performed. To reduce the sample/reagent consumption and improving the stability of the analytical signal of the technique. The multivariate optimization methodology was also employed, for both analytes. Beginning with a complete two-level factor design (2^3), which was used to evaluate the trend of the variables: HCl concentration, NaBH₄ concentration and carrier gas flow (CGF). Within the established experimental domain all factors were statistically significant, as well as the interaction between them. After the screening stage, a Box-Behnken design was applied to optimize the cold steam generation conditions. The results of the optimization were evaluated through the Analysis of Variance (ANOVA), graphs of residues versus predicted values and predicted versus observed values, demonstrating that the factors are statistically significant and that the generated model adequately represents the proposed method, obtaining as critical values 0.408 and 0.41 mol L⁻¹ of [HCl], 2.80 and 3.86 % (m v⁻¹) of [NaBH₄] and 0.27 and 0.19 mL min⁻¹ of CGF for Cd and Hg, respectively. Furthermore, a univariate study to evaluate the influence of L-cysteine and cobalt II concentrations on the cold steam generation process was performed. The proposed method allowed the determination of cadmium and mercury with detection limits ($3\sigma/S$) of 0.16 and 0.20 ng L⁻¹, accuracy from the relative standard deviation (RSD) of ERM CA713 of 4.3 and 3.4 % for Cd and Hg, respectively. The accuracy of the method was confirmed by analysis of the residual water reference materials (CA713), oyster tissue (NIST 1566b), spinach leaf (NIST 1570a) and San Joaquin soil (SRM 2709a). A calibration study of the method was carried out to validate that the proposed method does not suffer interference from the sea water matrix. Moreover, the method was satisfactorily applied to three sea water samples collected in the region of Salvador-BA, Brazil. The concentrations of Cd and Hg in the samples are in accordance with those found in the literature and presented values below the maximum limits allowed by the resolution of CONAMA 357/2005 for saline waters class II.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biogeoquímico do mercúrio	19
Figura 2	Esquema do mecanismo de geração química de vapor em meio aquoso com THB (tetrahidroborato)	25
Figura 3	Espectrômetro de Fluorescência Atômica AFS 3300 Lumina para determinação de Cd e Hg por geração química de vapor	35
Figura 4	Sistema de geração de vapor frio adaptado para o desenvolvimento deste trabalho	37
Figura 5	Representação do sistema de geração química de vapor acoplado ao espectrômetro de fluorescência atômica.	38
Figura 6	Estudo da concentração e tipo de ácido para determinação de Cd por CV AFS	41
Figura 7	Estudo da concentração e tipo de ácido para determinação de Hg por CV AFS	42
Figura 8	Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo de dois níveis aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de cádmio	45
Figura 9	Gráfico das médias marginais para os fatores [HCl], [NaBH ₄] e VGA avaliados na geração de vapor frio de Cd	46
Figura 10	Superfícies de resposta geradas pelo ajuste de uma função quadrática aos sinais de fluorescência do Cd	49
Figura 11	Gráfico de resíduos versus valores preditos para os resultados do Box-Behnken aplicado para Cd	52
Figura 12	Gráfico de valores preditos versus valores observados para Box-Behnken para Cd	53
Figura 13	Avaliação do efeito das concentrações de tiourea e L-cisteína no processo de geração de vapor frio de Cd, na presença de diferentes catalisadores.	55
Figura 14	Estudo da influência da concentração de L-cisteína na geração de vapor frio de Cd, na presença de Co como catalisador	56

Figura 15	Estudo da concentração de Co(II) no enriquecimento de sinal de Cd	56
Figura 16	Curvas de calibração obtidas para avaliar o efeito da L-cisteína e do Cobalto II no enriquecimento do sinal de Cd(II) na geração de vapor frio.	57
Figura 17	Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo de dois níveis para três variáveis aplicado para investigar a geração de vapor frio de Hg.	60
Figura 18	Gráfico das médias marginais para os fatores [HCl], [NaBH ₄] e VGA avaliados na geração de vapor frio de Hg.	61
Figura 19	Superfícies de resposta geradas pela matriz Box-Benhken para Hg	64
Figura 20	Gráfico de resíduos versus valores preditos para os resultados do planejamento Box-Behnken para Hg	66
Figura 21	Gráfico de valores preditos versus valores observados para os resultados do planejamento Box-Behnken para Hg	67
Figura 22	Estudo da influência da tiouréia e da L-cisteína com diferentes catalisadores na geração de vapor frio de Hg.	68
Figura 23	Estudo do efeito da concentração de L-cisteína na geração de vapor frio de Hg, na presença de Co(II) como catalisador	69
Figura 24	Gráfico de estudo da concentração de Co(II) no enriquecimento de sinal de Hg.	70
Figura 25	Gráfico de efeito da L-cisteína e do Cobalto II no enriquecimento do sinal de Hg na geração de vapor frio.	71
Figura 26	Avaliação da linearidade para Cd	75
Figura 27	Avaliação da linearidade para Hg	75
Figura 28	Gráfico comparando as curvas analíticas obtidas usando a técnica de calibração externa e adição de analito na amostra, para Cd e Hg	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos propostos para a determinação de cádmio e mercúrio em amostras de águas	22
Tabela 2	Matriz de planejamento fatorial completo 2^3	29
Tabela 3	Matriz do planejamento Box-Behnken com valores codificados para 3 fatores	31
Tabela 4	Configurações do AFS para determinação de Cd e Hg.	35
Tabela 5	Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial completo 2^3 aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Cd	43
Tabela 6	Matriz do planejamento fatorial de dois níveis aplicado para avaliar os fatores envolvidos na geração de vapor frio de Cd	44
Tabela 7	Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento Box-Behnken aplicado para otimizar as condições de geração de vapor frio de cádmio	47
Tabela 8	Matriz do Planejamento Box-Benhken para três variáveis aplicado para otimizar as variáveis envolvidas na geração de vapor frio de Cd	48
Tabela 9	ANOVA para os resultados obtidos a partir do planejamento Box-Behnken aplicado para Cd	50
Tabela 10	Valores críticos gerados pelo planejamento Box-Benhken para Cd	53
Tabela 11	Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento fatorial completo 2^3 aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Hg	58
Tabela 12	Matriz do planejamento experimental de dois níveis para três variáveis usado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Hg	59
Tabela 13	Fatores e níveis estabelecidos para o domínio experimental para o planejamento Box-Behnken aplicado para geração de vapor frio de Hg	62
Tabela 14	Matriz do Planejamento Box-Benhken para três variáveis aplicado para geração de vapor frio de Hg	63
Tabela 15	ANOVA para os resultados obtidos a partir do planejamento Box-Behnken aplicado para otimização das condições de geração	65

	de vapor frio de Hg	
Tabela 16	Valores críticos após aplicação da metodologia de superfície de resposta (Box-Behnken) para Hg	67
Tabela 17	Valores de RSD % obtidos a partir de sete medidas de padrões de Cd e Hg de diferentes concentrações	76
Tabela 18	Resultados obtidos da análise de materiais de referência certificados para avaliação da exatidão do método.	77
Tabela 19	Concentração de alguns elementos contidos nos materiais de referência certificado.	79
Tabela 20	Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação de Cd em amostras de água do mar	79
Tabela 21	Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação de Hg em amostras de água do mar.	80
Tabela 22	Comparação dos valores do coeficiente angular das curvas diretas e na amostra de água do mar para Cd e Hg	81
Tabela 23	Concentração de Cd e Hg em amostras de água do mar (n = 3)	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i>)
AF	Fluorescência atômica (do inglês <i>Atomic fluorescence</i>)
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês <i>Atomic fluorescence spectrometry</i>)
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analyses of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CRM	Material de Referência Certificado (do inglês <i>Certified Reference Material</i>)
CV AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica por Vapor Frio (do inglês <i>Cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
CV	Vapor Frio (do inglês <i>Cold vapor</i>)
CVG AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica por Geração de Vapor Químico (do inglês <i>Chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry</i>)
CVG	Geração de Vapor Químico (do inglês <i>Chemical vapor generation</i>)
DPASV	Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (do inglês <i>Differential Pulse anodic stripping voltammetry</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and agriculture organization</i>)
FDA	Administração de Drogas e Alimentos (do inglês <i>Food e drugs administration</i>)
FI-CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio e Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry</i>)
HCL	Lâmpada de Catodo Oco (do inglês <i>Hollow cathode lamp</i>)
HG AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica por Geração de Hidretos (do inglês <i>Hydride Generation atomic fluorescence spectrometry</i>)
HG DC AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com duplo canal e gerador de hidreto (do inglês <i>Hydride generation dual channel atomic</i>)

spectrometry fluorescence)

HG	Geração de Hidretos (do inglês <i>Hydride generation</i>)
HPLC-ICP-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada com um Espectrometro de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês <i>High-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometer</i>)
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (do inglês <i>High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
IIP	Polímero impresso ionicamente (do inglês <i>Ion-imprinting polymers</i>)
In-Hg	Mercúrio inorgânico
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Atomic emission spectrometry</i>)
IF	Intensidade de Fluorescência
JECFA	Comitê de Especialistas em Aditivos e Contaminantes Alimentares (do inglês <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeHg	Metilmercúrio
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês <i>National Institute of Standards e Technology</i>)
PC	Ponto Central
PMT	Tubo Fotomultiplicador (do inglês <i>Photomultiplier tubes</i>)
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
SGL	Separador Gás-Líquido
VGA	Vazão do Gás de Arraste
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.	OS ELEMENTOS CÁDMIO E MERCÚRIO	18
3.1	ASPECTOS GERAIS E TOXICIDADE DO CÁDMIO	18
3.2	ASPECTOS GERAIS E TOXICIDADE DO MERCÚRIO	18
3.3	IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE Cd E Hg EM ÁGUAS	20
4.	ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA	23
4.1	GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO	24
4.2	AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO	26
5.	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA	27
5.1	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO EM DOIS NÍVEIS	28
5.2	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	30
5.3	PLANEJAMENTO BOX-BENKEN	30
6.	PARTE EXPERIMENTAL	32
6.1	REAGENTES, SOLUÇÕES PADRÃO E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS	32
6.2	PREPARO DE SOLUÇÕES	32
6.3	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	34
6.3.1	INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO EMPREGANDO CV AFS	34
6.3.2	MODIFICAÇÃO DO SISTEMA DE GERAÇÃO DE VAPOR	36
6.4	ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA	38

6.5	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR	38
6.6	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Hg	39
6.6.1	Procedimento para preparo das amostras e CRM de água do mar	39
6.6.2	Procedimento para extração de Cd e Hg em CRM de solo	39
6.6.3	Procedimento para digestão do CRM de ostra e folha de espinafre	39
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA	
7.1	GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO E DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO POR CV AFS	41
7.2	ESTUDO UNIVARIADO DO ENRIQUECIMENTO DE SINAL E CATALISADOR PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO DE Cd	51
	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA	
7.3	GERAÇÃO DE VAPOR FRIO E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR CV AFS	55
7.4	ESTUDO UNIVARIADO DO ENRIQUECIMENTO DE SINAL E CATALISADOR PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO DE Hg	64
7.5	PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO PROPOSTO	68
7.5.1	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	68
7.5.2	SENSIBILIDADE	69
7.5.3	LINEARIDADE E FAIXA DINÂMICA LINEAR	70
7.5.4	PRECISÃO	71
7.5.5	EXATIDÃO	73
7.5.6	ESTUDO DA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO	76
7.5.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR	77
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

A melhoria nas tecnologias, desenvolvimento da indústria e da agricultura, conduziram a uma maior geração de produtos que utilizam metais potencialmente tóxicos em sua composição, como cádmio e mercúrio. Como consequência, tem-se o impacto da contaminação de ambientes marinhos, o que leva a um dano em cadeia, impactando peixes, invertebrados e humanos. Esses metais são bioacumuláveis, provocam efeitos perigosos e contaminantes ao meio ambiente e aos seres humanos, mesmo em concentrações traço (CAROLIN et al., 2017; WU et al., 2008; YUAN et al., 2020).

O Cd é um elemento classificado como cancerígeno, podendo causar problemas renais e osteoporose. O principal contato do ser humano com esse elemento, por via ambiental é proveniente da alimentação. Outra fonte de emissão é o tabagismo, pois o cádmio é retido nas folhas de tabaco e eliminado na queima (HOSSNY et al., 2001; ZWOLAK, 2020).

O mercúrio é um elemento tóxico, sendo seus compostos orgânicos os que apresentam maior toxicidade para o ser humano. É um elemento traço, bioacumulativo e biomagnificante ao longo da cadeia trófica. Em água, é encontrado majoritariamente na forma de mercúrio bivalente e metilmercúrio. Os peixes carnívoros podem apresentar concentrações elevadas de mercúrio, devido à ingestão de pequenos peixes que também tiveram o contato prolongado com água contaminada, representando grande risco ao ser humano (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010; ZHENG et al., 2019)

A contaminação da água do mar pode ocorrer, devido à erosão, partículas provenientes do ar, rios, esgotos e principalmente por descarte de efluentes industriais (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010; SINGH et al., 2011). Alguns seres vivos podem acumular em sua estrutura grandes quantidades de cádmio e mercúrio, sendo os peixes um desses. Os peixes são organismos capazes de absorver metais que estejam contidos em águas ou em alimentos, seja esse metal essencial ou não-essencial, armazenando-os no tecido muscular. Um exemplo são os peixes predadores, que se alimentam de outros peixes e outros organismos marinhos, e apresentam grande habilidade para reter metais e não-metais em seus tecidos musculares. Mediante essa capacidade dos peixes, o estudo de metais, associados ao mesmo, torna-se cientificamente interessante e necessário, pois é um alimento muito consumido que

fornece vários nutrientes importantes para a dieta humana (LIMA et al., 2015; WEBB et al., 2015)

No intuito de determinar Cd e Hg em amostras de água do mar, o primeiro passo é armazenar adequadamente as amostras, para não haver perdas dos analitos. Após isso, deve-se utilizar ou desenvolver um método de análise capaz de detectar quantidades a nível traço e que não sofra interferência da elevada concentração de sais existentes nesse tipo de amostra.

A determinação de baixas quantidades de Cd e Hg em amostras de água do mar e outras matrizes é muitas vezes realizada por técnicas espectroanalíticas, como espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio ou forno de grafite (CV AAS, GF AAS) (KOJU et al., 2018; LUCENIR; ALMEIDA; MELO, 2012); espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (ALEX VIRGILIO, DANIELA SCHIAVO, 2016); espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (PANIZ et al., 2018) e a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV AFS) (WANG et al., 2018); que são técnicas que apresentam alta sensibilidade, seletividade, e alguns são de fácil operação e baixo custo.

A geração de vapor frio, acoplada com técnicas de espectrometria atômica (F AAS, GF AAS, ICP OES, ICP-MS, AFS), leva a uma etapa de preparo da amostra e atua na melhora da sensibilidade, pois possibilita a separação eficiente da matriz, aperfeiçoamento da seletividade e redução de interferentes (LEI et al., 2018). Os principais interferentes na geração química de vapor são os íons de metais de transição, que podem ser minimizadas utilizando agentes mascarantes/quelantes. Para Cd e Hg, reagentes contendo enxofre, como L-cisteína e tioureia, em combinação com cobalto, ferro ou níquel, em determinadas condições, mostraram grande enriquecimento na eficiência de geração de vapor, de acordo com alguns trabalhos relatados na literatura. Esses fatores apresentam melhor rendimento quando as condições de geração de vapor são otimizadas (ARSLAN; YILMAZ; ROSE, 2015; CHEN et al., 2015; GUO; GUO, 1995).

A fim de adequar as melhores condições de operação e gerar melhor resposta analítica para determinações analíticas, ferramentas quimiométricas podem ser

utilizadas para contribuir com o estudo do efeito das variáveis e suas interações sobre o sistema. A Quimiometria relaciona métodos matemáticos, estatísticos de informática para otimizar e avaliar dados fornecidos por experimentos químicos. Para este estudo, primeiramente realiza-se uma etapa de triagem aplicando-se planejamento fatorial de dois níveis com o intuito de verificar o comportamento dos fatores de acordo com os experimentos. Após essa etapa, a aplicação de metodologia de superfície de resposta é necessária para se obter as condições ótimas do sistema em estudo (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2018).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Desenvolver estratégias analíticas para determinação de cádmio e mercúrio empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar condições para geração de vapor frio e quantificação de Cd e Hg por CV AFS empregando-se estratégia de otimização multivariada;
- Estudar estratégias de enriquecimento do sinal para geração de vapor frio de Cd e Hg;
- Validar o método proposto através da determinação de uma série de parâmetros analíticos, como: limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão e faixa dinâmica linear da curva de calibração;
- Aplicar o método desenvolvido para análise de amostras de água do mar e avaliar os resultados obtidos de acordo com os limites máximos estipulados para Cd e Hg pela Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para águas salinas de classe II;
- Aplicar o método para a análise de amostras que apresentem características diferentes da água do mar, como: sedimento, amostras vegetais e animal, no intuito de avaliar a influência do efeito de matriz.

3. OS ELEMENTOS CÁDMIO E MERCÚRIO.

3.1 ASPECTOS GERAIS E TOXICIDADE DO CÁDMIO

Cádmio é um metal bivalente, que é proveniente de processo gradual de abrasão de rochas e solos e por eventos singulares, como incêndios florestais e erupções vulcânicas. Está presente em todos os lugares no ar, na água, nos solos e nos alimentos. Metal de grande preocupação, pois é não degradável na água e no solo, podendo ser absorvido por plantas, peixes e animais. A principal via antropogênica através da qual o cádmio entra no meio ambiente é através de resíduos de processos industriais como galvanoplastia, fundição, fabricação de ligas, pigmentos, plástico, baterias de cádmio-níquel, fertilizantes, pesticidas, mineração e corantes, operações e refino de tecidos (RAO et al., 2011; ZANG; BOLGER, 2014).

O cádmio não apresenta função biológica em humanos ou animais. O uso de tabaco e o consumo de água e alimentos contaminados podem gerar diversos efeitos tóxicos ao ser humano, incluindo problemas de disfunção renal, aumento da pressão arterial, danos nos rins, bronquite, distúrbio gastrointestinal, descalcificação óssea e câncer (SINGH et al., 2011; ZANG; BOLGER, 2014).

3.2 ASPECTOS GERAIS E TOXICIDADE DO MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico que impacta de maneira significativa a saúde humana e o meio ambiente. Além de ser encontrado naturalmente na crosta terrestre, o Hg é utilizado na indústria elétrica (interruptores, termostatos, baterias, lâmpadas), odontologia, catalisador da indústria de cloro, produção de soda cáustica, atividade de mineração, pigmentos de tintas, reatores nucleares, como agentes antifúngicos para o processamento de madeira e como conservante de vacinas, na forma de timerosal (CAROLIN et al., 2017; SANFELIU et al., 2003).

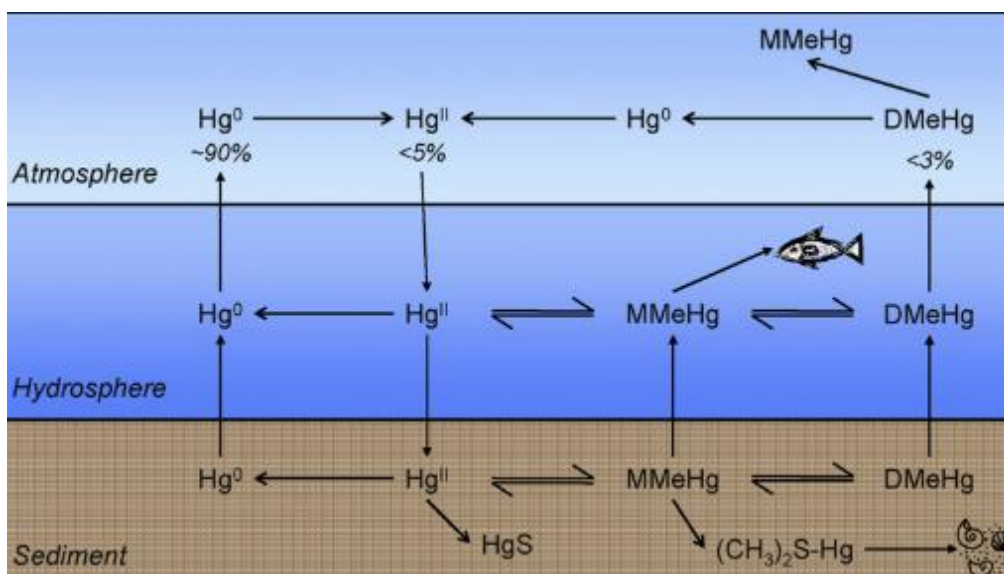
As características toxicológicas do mercúrio dependem da forma do elemento (elementar, inorgânica e compostos orgânicos). Compostos inorgânicos podem conter Hg em estados de oxidação +1 e +2. A absorção de compostos inorgânicos de alimentos

é menor que 7% no sistema gastrointestinal humano. Já o metilmercúrio (MeHg) é absorvido em uma faixa de 90-95%. Os rins retêm a maior concentração de Hg após a exposição de compostos inorgânicos ou vapor e o Hg orgânico tem maior afinidade pelo cérebro, mais especificamente pelo córtex posterior. O vapor de mercúrio tende a acumular no sistema nervoso central mais rapidamente que os compostos inorgânicos. Os maiores riscos para saúde humana surgem dos efeitos neurotóxicos em adultos e toxicidade para o feto se a mulher for exposta durante a gestação, pois todas as espécies de Hg são capazes de atravessar a placenta e atingir o feto, causando alterações cromossômicas (WHO, 2017).

Com o aumento da atividade industrial, o meio ambiente, principalmente os corpos aquáticos, sofrem grande impacto, decorrente do descarte dos resíduos produzidos.

O Hg entra na água como um processo natural de remoção da crosta terrestre e também através da poluição industrial. Em águas naturais, o Hg pode ser encontrado em três principais espécies: mercúrio inorgânico (Hg^{2+} e complexos), mercúrio orgânico (monometilmercúrio e dimetilmercúrio) e mercúrio elementar (Hg^0), todas tóxicas. Todas essas espécies apresentam grande mobilidade, como mostrado na Figura 1 que apresenta o ciclo biogeoquímico do mercúrio (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010)

Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio



Fonte: LEOPOLD et al. (2010).

A Figura 1 informa que aproximadamente 90% do mercúrio das águas da superfície são provenientes da deposição atmosférica. O mercúrio II (Hg II) sofre bioacumulação, podendo formar espécies de monometilmercúrio (MMeHg; CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio (DMeHg; $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Os microrganismos e processos de fotodecomposição podem reverter as reações de formação de espécies metiladas. O ciclo biogeoquímico do mercúrio mostra que todas as espécies apresentam alta mobilidade entre atmosfera, hidrosfera e sedimento (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010).

O aumento na quantidade de Hg presente em diferentes compartimentos do ambiente e a sua introdução na cadeia trófica pode gerar uma contaminação em alimentos marinhos que faz parte da dieta humana, conduzindo a uma futura intoxicação (RAMALHOSA e RÍO-SEGAGE, 2008). O monitoramento de Hg em águas e em peixes é muito importante devido à alta toxicidade, mesmo em concentrações minúsculas (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$), elevado fator de bioacumulação (acima de 10^6) e biomagnificação (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010).

Águas naturais apresentam composições diversificadas, tornando complexa a análise de mercúrio. Fatores da própria matriz e externos podem transformar as espécies e alterar a forma de transporte e fixação (KALLITHRAKAS-KONTOS; FOTEINIS, 2015).

3.3 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO EM ÁGUA DO MAR.

Há uma grande necessidade de se determinar e monitorar cádmio em água do mar, devido à sua elevada toxicidade, mesmo em concentrações traço, e fácil bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (JURADO-GONZÁLEZ; GALINDO-RIÑO; GARCÍA-VARGAS, 2003; SUN et al., 2018). Sendo assim, o CONAMA (2011) estabelece, em sua Resolução 357/2005, que a quantidade máxima de Cd permitida em ambientes de águas salinas de classe II, no qual se enquadra a água do mar do litoral de Salvador- Bahia, é de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. O JECFA, Comitê de Especialistas em aditivos e contaminantes alimentares da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização mundial da Saúde (OMS),

estabelece como tolerável para ingestão de Cd em peixes e crustáceos, a quantidade máxima mensal de 25 µg/ kg de peso corporal (ANVISA, 2019).

As concentrações extremamente baixas de Cd na água do mar, o pH, podendo influenciar na retenção da espécie em sedimentos, a concentração das matérias suspensas, o tamanho das partículas e a alta concentração de sal na matriz, trazem grandes dificuldades para análise (WANG et al., 2012; WU et al., 2008). Devido a isso, diversas técnicas de separação e pré-concentração são utilizadas como etapa de preparo da amostra para posterior análise com técnicas espectrométricas.

Mediante as diversas atividades antropogênicas, a deposição de mercúrio em solos e corpos aquáticos vem aumentando significativamente, de maneira a contaminar os peixes que fazem parte da dieta humana. O peixe é um alimento acessível a todas as classes sociais, sendo facilmente encontrado no comércio de Salvador-Bahia.

O mercúrio é um elemento muito tóxico em baixos níveis e é bioacumulativo. A resolução 357/2005 do CONAMA (2011) estabelece como limite máximo de Hg total em águas salinas classe II a concentração de 1,8 µg L⁻¹. A quantidade máxima tolerável que pode ser ingerida de mercúrio total que o JECFA indica é de 4 µg kg⁻¹ de peso corporal por semana, para ingestão de pescados (ANVISA, 2019).

Devido à necessidade de conhecer a qualidade da água do mar, que pode gerar contaminação de peixes, que compõem a dieta humana, pesquisas foram realizadas no intuito de determinar cádmio e mercúrio em amostras de diferentes classes de água. A Tabela 1 mostra o levantamento de alguns métodos analíticos propostos para essa determinação nos últimos dez anos.

Tabela 1 – Métodos propostos para a determinação de cádmio e mercúrio em amostras de águas

Amostras	Técnica analítica	Limite de detecção	Informações adicionais	Referências
Água do mar	CVC AFS	Cd (0,19 µg L ⁻¹)	Retenção do analito por coprecipitação com APDC	SUN et al., 2018
Águas de superfície e água do mar	HPLC-ICP-MS	In-Hg (0,78 ng L ⁻¹) Me-Hg (0,63 ng L ⁻¹)	Extração na fase sólida	JIA et al., 2019
Água do mar e água de poço	ICP OES	Cd (0,59 µg L ⁻¹) Hg (0,02 µg L ⁻¹)	Determinação simultânea de 14 elementos	GUERRERO et al., 2016
Águas naturais	CV AFS	Hg (0,02 µg L ⁻¹)	IIP para pré-concentração	LINS et al., 2019
Águas naturais	DPASV	Hg (0,322 µg L ⁻¹)	IIP para retenção	FRANCISCO; FEITEIRA, 2019
Águas naturais	FI-CV AAS	Cd (0,0021 µg L ⁻¹)	Extração na fase sólida	SERKAN S, AHAN, 2012
Água do mar	HR-CS GF AAS	Cd (0.1 µg L ⁻¹)	Extração na fase sólida	CADORIM et al., 2019

CVC AFS – Espectrometria de fluorescência atômica por geração de vapor frio

HPLC-ICP-MS – Cromatografia líquida de alto desempenho hifenado a um espectrometro de massa com plasma acoplado indutivamente

ICP OES – Espectrometria de emissão Atômica com plasma acoplado indutivamente

DPASV – Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

FI-CV AAS – Espectrometria de absorção atômica com vapor frio e injeção em fluxo

HR-CS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite

4. ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma técnica muito sensível e seletiva para determinação de um número importante de elementos que compõem amostras ambientais, como: mercúrio, arsênio, selênio, bismuto, telúrio, chumbo e cádmio, sendo alternativa para outras técnicas espectrométricas atômicas e de massas (SÁNCHEZ-RODAS et al., 2010).

O fenômeno da fluorescência atômica é um processo espectroscópico fundamentado na absorção da radiação de comprimento de onda específico por um vapor atômico com subsequente detecção da radiação coletada em uma direção normalmente ortogonal à fonte de excitação, no intuito de evitar que o detector capte a radiação emitida pela fonte de radiação. Existem alguns tipos de fluorescência atômica, sendo a forma mais predominantemente usada em Química Analítica a fluorescência ressonante, que ocorre quando o processo de excitação e de emissão apresentam o mesmo comprimento de onda (SÁNCHEZ-RODAS et al., 2010; SKOOG et al., 2002; SYCHRA; SVOBODA; RUBESKA, 1975).

A intensidade da radiação de fluorescência produzida em uma transição depende de alguns fatores, sendo que os mais importantes são: a intensidade da fonte de excitação, a concentração de átomos no caminho óptico, a eficiência energética do processo (a relação entre a energia emitida na fluorescência e a absorvida, por unidade de tempo) e a extensão de qualquer auto-absorção no atomizador (CAI, 2000).

As principais desvantagens da fluorescência atômica são: extinção, quando ocorre colisão entre átomos excitados e outras moléculas nas fontes de atomização e interferências (espectral e química). A interferência espectral ocorre quando linhas na fonte de radiação se sobrepõem sobre as linhas dos elementos, durante o processo de fluorescência. A interferência química, por sua vez, resulta de processos que ocorrem na etapa de atomização que podem diminuir a quantidade de átomos livres. Essas desvantagens tornam-se mínimas quando adicionados agentes protetores e agentes liberadores. O acoplamento de sistemas de geração de hidreto (HG) e vapor frio (CV) também reduzem esses problemas (CAI, 2000; SÁNCHEZ-RODAS et al., 2010)

As lâmpadas de cátodo oco (HCL), comumente utilizadas em AFS, são fontes de radiação não contínuas, de alta intensidade que alcançam uma boa sensibilidade (CAI, 2000). Elas consistem em um ânodo composto por tungstênio e de um cátodo produzido

com o metal do analito. Ambos estão envoltos em um tubo de vidro selado contendo gás argônio (SKOOG et al., 2002; SYCHRA; SVOBODA; RUBESKA, 1975).

É comum o uso de um sistema AFS acoplado a um gerador de vapor, que consiste de uma fonte de radiação primária, um caminho para geração e condução do vapor atômico e de um detector para medida da radiação de fluorescência. A posição da HCL deve estar em um ângulo onde a radiação não incida diretamente sobre o detector. Essa incidência faz com que a radiação da HCL seja interpretada como sinal analítico, podendo também causar dano ao detector. A utilização de filtros, que tem a função de barrar as radiações não desejadas e as lentes, que colimam o feixe de radiação evitando a dispersão, durante a detecção, pode evitar a dispersão espectral. As espécies voláteis obtidas de amostras líquidas após a geração do vapor são carregadas com um fluxo de argônio para um separador gás-líquido. Para os analitos Cd e Hg, a técnica de vapor frio é utilizada, não necessitando de etapas de atomização.

4.1 GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR

A geração química de vapor (CVG) é uma técnica que consiste na transformação de uma espécie metálica em um composto volátil por meio de reação química, o que facilita o transporte ao atomizador. Muito utilizada na determinação de analitos em quantidades traço e ultraço, elementos que apresentam concentração na faixa de ppm e ppb, respectivamente. Uma importante ferramenta de introdução de amostras nas análises por espectrometria atômica para aumentar sua sensibilidade e diminuir seu limite de detecção (TAKASE, 2002; PENG, 2010, GAO, 2013).

Apresenta como principais vantagens: separação do analito de alguns concomitantes da matriz que não formam espécies voláteis; sistemas mais eficientes do que os baseados em nebulização pneumática convencional; melhores limites de detecção, devido a um transporte mais eficiente e ao confinamento do vapor químico no volume estabelecido pela cela de quartzo, o que aumenta a concentração de átomos no caminho óptico (TAKASE, 2002). Como desvantagens, existem as limitações de poder ser aplicada somente para um número limitado de elementos que formam hidretos e/ou vapor frio; a necessidade da otimização do pH e da concentração dos reagentes; a

Onde: E corresponde ao analito, L é o ligante presente na matriz (H_2O , OH^- , Cl^- ...) e n é o número de oxidação do analito.

Segundo D'Ulivo (2016), as etapas para geração química de vapor baseiam-se na formação dos hidretos voláteis a partir da transferência direta de hidrogênio das espécies de borano, para o átomo de analito do substrato analítico. Depois, a transferência de hidrogênio ocorre através de um complexo analito-borano sendo que, essa etapa ocorre com a formação de complexos intermediários de metal-hidreto. E por fim, os hidretos finais são formados gradualmente. A formação do hidreto ou da espécie atômica depende da estabilidade do hidreto final. Caso o hidreto seja instável ele irá se decompor, podendo se agregar e formar nanopartículas e macroprecipitados.

A espectrometria de fluorescência atômica acoplada à geração de vapor frio (CV AFS) tem sido amplamente empregada como técnica para determinação de Cd e Hg e diversos trabalhos relatados na literatura têm apresentado excelentes limites de detecção para esse propósito.

Lei e colaboradores (2018), desenvolveram um método para determinação de Cd em fase não aquosa (suspensão), utilizando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CVG AFS). Um limite de detecção de $0,004 \mu g L^{-1}$ foi obtido e o método proposto foi comparado com a geração de hidreto (HG AFS) convencional, apresentando desempenho consideravelmente melhor.

Em um trabalho desenvolvido por Astolfi (2019), foi realizada a análise de amostras de cabelo humano para determinação de mercúrio, empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CVG AFS). O limite de detecção foi de $0,004 mg kg^{-1}$ para 20 mg de amostra de cabelo humano.

4.2 AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO

O processo de geração de vapor frio de espécies como Cd apresenta grandes dificuldades devido à interferências químicas, baixo rendimento, instabilidades das espécies geradas e baixas concentrações em amostras de água do mar (ARSLAN; YILMAZ; ROSE, 2015). As interferências químicas são provenientes de íons de metais de transição (GUO; GUO, 1995a; YANG et al., 2015). Para diminuir essas

interferências, agentes mascarantes são utilizados para enriquecer a sensibilidade do método proposto, sendo que alguns podem gerar efeito oposto, causando uma supressão do sinal analítico. Vários agentes mascarantes/quelantes são utilizados para a análise de Cd e Hg, incluindo tiourea e L-cisteína, que apresentam em sua estrutura grupos tiol (-SH) (CHEN et al., 2015; GUO; GUO, 1995). O enxofre interage fortemente com Cd e Hg, formando complexos mais estáveis que são solúveis em água. Devido a essa elevada estabilidade dos complexos com tiourea e L-cisteína, a interação dos mascarantes em conjunto com o NaBH_4 apresenta melhor contribuição para a geração de vapor (YANG et al., 2015). Segundo Kumar (2010), podem existir dois mecanismos que podem explicar o controle de interferentes por compostos contendo o grupo tiol: o primeiro seria a formação de um substrato do analito com melhor reatividade em relação aos intermediários de hidrobório formado; ou a formação do complexo mascarante- BH_4^- , que seria um melhor agente redutor devido as propriedades do doador de elétrons do grupo -SH, sendo a sequência de homogeneização grande influenciador da preferência do mecanismo.

Em um trabalho relatado por Yang e colaboradores (2015), o complexo L-cisteína-Cd apresentou maior estabilidade, dificultando a geração do vapor de Cd. Para superar essa dificuldade, foi utilizado um catalisador. Esse catalisador pode ser um íon metálico como cobalto, níquel ou ferro (ARSLAN; YILMAZ; ROSE, 2015; YANG et al., 2015), que ao reagir com o NaBH_4 será reduzido para um estado de oxidação mais baixo, formando precipitados finos que capturam e decompõem os intermediários formados em reação secundária (BAX et al., 1988).

5. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

Para avaliar as condições de máxima resposta analítica em um experimento, é necessário estudar quais e como os fatores (variáveis) influenciam esse sistema de modo a ajustar as condições para que a maior resposta seja obtida. Uma maneira é utilizando otimização univariada, que consiste no tratamento experimental no qual apenas um fator é variado enquanto os outros são mantidos constantes. Outra forma de buscar a melhor resposta analítica é através da otimização multivariada, que consiste em um tratamento experimental em que todos os fatores são variados simultaneamente em diferentes

combinações. A área da Química que envolve a otimização multivariada é a Quimiometria.

A Quimiometria fundamenta-se na aplicação de métodos matemáticos e estatísticos, associados à informática com a finalidade de otimizar e avaliar dados gerados de um experimento químico (FERREIRA, 2015). Devido ao menor número de experimentos, por consequência, menor consumo de reagentes, menor tempo de trabalho e a disponibilidade de softwares que auxiliam no tratamento dos dados, as ferramentas quimiométricas vêm sendo muito utilizadas nos últimos anos (FERREIRA et al., 2007).

5.1 PLANEJAMENTOS FATORIAIS COMPLETOS DE DOIS NÍVEIS

O planejamento fatorial é utilizado para avaliar a influência das diversas variáveis e interações que podem atuar sobre a resposta de um sistema. Um planejamento fatorial pode ser trabalhado em dois níveis, sendo um inferior, representado pelo caractere – (menos), e outro superior, representado pelo caractere + (mais). Ao estabelecer o nível inferior e superior para cada fator estudado, tem-se o domínio experimental do planejamento. Os resultados não serão válidos fora dessa região. Para obtenção do número de experimentos, é necessário conhecer o número de fatores que serão estudados, em que o número de fatores será representado pela letra K e o número de experimentos será calculado a partir de uma função exponencial no qual a base será o número de níveis e o expoente será o número de fatores (2^K). Uma maneira de estimar o erro experimental do planejamento sem replicar todos os experimentos e de identificar as relações não lineares, é adicionando replicatas do nível zero (0), ponto central, em que as variáveis estudadas serão trabalhadas em seu valor médio (FERREIRA, 2015; NETO, B. B.; SCAMINIO, I. S.; BRUNS, 2010).

A Tabela 2 apresenta uma matriz genérica para um planejamento fatorial completo (2^3) de três fatores (A, B e C). Neste planejamento, cada fator é estudado em dois níveis. A matriz contém 8 ensaios mais 3 réplicas referentes ao ponto central (PC).

Tabela 2 – Matriz de planejamento fatorial completo 2³

Experimentos	A	B	C
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9 (PC)	0	0	0
10 (PC)	0	0	0
11 (PC)	0	0	0

A aleatorização é um princípio que deve ser considerado em experimentos em que se busca obter condições ótimas. Através dela, pode-se diminuir o efeito de possíveis erros decorrentes de fatores indesejáveis. Quando os experimentos são realizados de maneira aleatória, a probabilidade de um fator externo e desconhecido influenciar uma resposta analítica é a mesma em todos os ensaios (NETO, B. B.; SCAMINIO, I. S.; BRUNS, 2010).

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são muito utilizados na triagem de variáveis, não objetivando determinar as condições ótimas do sistema em estudo. Uma maneira de representar o comportamento de um planejamento fatorial de dois níveis é através do gráfico de Pareto. É um gráfico de barras que mostra a significância ou não de um fator ou de uma interação, por meio de valores de efeito padronizados de todas as variáveis e suas interações (FERREIRA, 2015).

Através dos valores apresentados nos gráficos de Pareto ou do cálculo de efeitos e das interações dos fatores, é possível avaliar o comportamento das variáveis do sistema. Quando o valor apresenta sinal negativo (-) indica que o mesmo tem tendência a gerar maior resposta analítica quando varia do maior para o menor nível. Para o sinal

positivo (+) tem-se o inverso, a resposta analítica tende a aumentar quando varia do menor para o maior nível.

Existem programas estatísticos, como o Statistica, que facilitam o tratamento de dados gerados por otimização multivariada, já que apresentam cálculos complexos. Os efeitos para as variáveis principais e para as interações, tabela ANOVA (análise de variância) e geração de gráfico de Pareto e superfícies de resposta, são informações importantes para estimar efeitos significativos e erros experimentais, que podem ser obtidos através desses programas.

5.2 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após a triagem das variáveis utilizando o planejamento fatorial de dois níveis, uma nova etapa para otimização pode ser aplicada para determinar os pontos críticos do sistema em estudo.

Entre as técnicas de otimização multivariada mais aplicadas para otimização de métodos analíticos, encontra-se a metodologia de superfície de resposta (MSR). Ela é baseada em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas formuladas a partir de uma equação polinomial, que descreve o comportamento de um grupo de dados experimentais objetivando fazer previsões estatísticas. A MSR é bem aplicada quando uma ou um grupo de respostas de interesse são afetadas por vários fatores, objetivando a otimização simultânea das variáveis com a finalidade de obter o melhor rendimento do sistema (BEZERRA et al., 2008).

Dentre as MSR empregadas para determinar os pontos críticos de um experimento utilizando um modelo matemático quadrático, Box-Behnken, Composto central e Doehlert são as matrizes experimentais mais aplicadas.

5.3 PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

O planejamento Box-Behnken é um desenho de segunda ordem baseado em planejamento fatorial incompleto de três níveis. O número de experimentos (N)

necessários para desenvolver um planejamento Box-Behnken é estabelecido pela Equação 1.

$$N = 2K (K + 1) + CP \quad (1)$$

Onde K corresponde ao número de fatores e CP é o número de pontos centrais. Apresenta como principal vantagem o fato de não conter combinações em que todos os fatores estão, simultaneamente, em seus níveis mais altos ou mais baixos. Sendo assim, são úteis para evitar experimentos que seriam realizados sob condições extremas que podem gerar resultados insatisfatórios. Por outro lado, esses planejamentos são ineficazes para situações em que se busca conhecer as respostas extremas do sistema. (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA, 2015; FERREIRA et al., 2007; TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; DOS SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; DA SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, 2009).

A Tabela 3 apresenta a matriz experimental para um planejamento Box-Behnken de 3 fatores (A, B e C). A matriz Box-Behnken apresenta 15 experimentos, no qual três ensaios estão representando as réplicas do ponto central (PC).

Tabela 3 – Matriz do planejamento Box-Behnken com valores codificados para três fatores

Experimentos	Fator A	Fator B	Fator C
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13 (PC)	0	0	0
14 (PC)	0	0	0
15 (PC)	0	0	0

Para validar o modelo experimental, a análise de variância (ANOVA) deve ser contemplada com a finalidade de verificar se o modelo gerado está ajustado aos seus dados experimentais.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 REAGENTES, SOLUÇÕES PADRÃO E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

- I. Ácido clorídrico 37% (m/m) (Merck, Alemanha)
- II. Ácido nítrico 65% (m/m) (Merck)
- III. Tetrahidroborato de sódio (Merck)
- IV. Solução padrão 1000 mg L⁻¹ de mercúrio (II) (Specsol, Brasil)
- V. Solução padrão 1000 mg L⁻¹ de cádmio (II) (Specsol)
- VI. Solução padrão 1000 mg L⁻¹ de cobalto (II) (Specsol)
- VII. Solução padrão 1000 mg L⁻¹ de ferro (II) (Specsol)
- VIII. Solução padrão 1000 mg L⁻¹ de níquel (II) (Specsol)
- IX. Cloridrato de L-cisteína – Monohidratada (Synth, Brasil)
- X. Hidróxido de sódio (Merck)
- XI. Peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Merck, Alemanha)
- XII. Material de referência certificado de tecido de ostra 1566b (NIST, EUA)
- XIII. Material de referência certificado de folha de espinafre 1570a (NIST)
- XIV. Material de referência certificado de água residual Ca713 (IRMM, Bélgica)
- XV. Material de referência certificado de solo San Joaquim SRM 2709a (NIST)
- XVI. Tiourea (Merck)

6.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

As vidrarias e materiais foram lavadas e enxaguadas com água deionizada. Após essa etapa, foram mantidos em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por pelo menos 24 h, sendo, em seguida, lavados com água ultrapura, três vezes, e secos à temperatura ambiente em local protegido da luz. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, com resistividade de 18 MΩ cm, e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico para diminuir a contaminação por reagentes.

6.2.1 Solução de mercúrio

As soluções padrão de mercúrio (II) empregadas para a curva analítica e otimização das condições de medida foram preparadas diariamente na faixa de 0,01 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir de soluções intermediárias, as quais foram preparadas utilizando uma solução padrão de mercúrio (II) 1000 mg L^{-1} .

6.2.2 Solução de cádmio

As soluções de cádmio (II) utilizadas para curva analítica e otimização das condições de medida foram preparadas na faixa de 0,01 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir de soluções intermediárias, as quais foram preparadas utilizando uma solução padrão de cádmio (II) 1000 mg L^{-1} .

6.2.3 Solução ácido clorídrico

Foi preparada solução de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} como solução estoque a partir de HCl 37% (m/m), a qual foi utilizada no preparo das curvas de calibração.

6.2.4 Solução de ácido nítrico

Foi preparada solução de ácido nítrico 7 mol L^{-1} como solução estoque a partir de HNO_3 65% (m/m), a qual foi utilizada no preparo das curvas de calibração.

6.2.5 Solução de hidróxido de sódio 0,5% (m/v)

Para estabilizar a solução de tetrahidroborato de sódio, foi preparada uma solução estoque de hidróxido de sódio 0,5%, a partir da dissolução de 2,5 g de lentilhas de hidróxido de sódio em um balão volumétrico de 500 mL com água ultrapura.

6.2.6 Solução de tetrahidroborato de sódio % (m/v)

As soluções de tetrahidroborato de sódio foram preparadas diariamente a partir da dissolução do mesmo em solução de hidróxido de sódio 0,5% (m/v). Os volumes eram preparados a depender da necessidade do dia.

6.2.7 Solução de cloridrato de L-cisteína 2,5% (m/v)

A solução de cloridrato de L-cisteína 2,5% (m/v), utilizada para enriquecer o sinal analítico de Cd e Hg durante a geração do vapor frio, foi preparada a partir da dissolução em solução de HCl 0,01 mol L⁻¹.

6.2.8 Solução de tiourea 3% (m/v)

A solução de tiourea, utilizada para estudar o efeito enriquecedor do sinal analítica de Cd e Hg, foi preparada a partir da dissolução de 0,75 g de tiourea em água ultrapura em um balão volumétrico de 25 mL.

6.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Neste trabalho, os equipamentos e acessórios utilizados foram:

- Bloco digestor (Tecnal, Brasil)
- Sistema para purificação de água Master P&D (GEHAKA, Brasil)
- Balança analítica (Shimadzu, Japão)

6.3.1 INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO EMPREGANDO CV AFS

A determinação de Cd e Hg, separadamente, foi realizada utilizando o Espectrômetro de Fluorescência Atômica AFS 3300 Lumina (Aurora, Canadá) com gerador adaptado de vapor frio (Figura 3). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco para Cd com comprimento de onda 228,8 nm e para Hg com comprimento de onda de 253,6 nm (ambas linhas principais para cada elemento). A Tabela 4 indica as condições empregadas para determinação Cd e Hg por CV AFS.

Figura 3 – Espectrômetro de Fluorescência Atômica AFS 3300 Lumina para determinação de Cd e Hg por geração química de vapor



Fonte: Aurora instruments (2010)

Tabela 4 - Configurações do AFS para determinação de Cd e Hg

Condições	Cd	Hg
Corrente da lâmpada (mA)	60	70
PMT (V)	360	380
Gás de arraste (mL min⁻¹)	270	190
Gás de proteção (mL min⁻¹)	800	800
Vazão de introdução dos reagentes (mL min⁻¹)	1,0	1,0

O vapor frio foi gerado ao misturar a solução acidificada do analito do padrão ou da amostra com a solução redutora de NaBH_4 (nas concentrações otimizadas para cada analito) estabilizada em NaOH 0,5% (m/v). A amostra acidificada teve o incremento da L-cisteína e do cobalto II para obter um enriquecimento no sinal analítico e diminuir possíveis interferentes. Para gerar o vapor, a solução de NaBH_4 e a amostra foram transportadas por tubos Tygon® com auxílio de uma bomba peristáltica a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Ambas soluções se misturam em um frasco reacional onde ocorre a formação do vapor e a separação gás-líquido (SGL). O vapor frio formado é transportado com auxílio do gás argônio para o sistema de detecção.

6.3.2 MODIFICAÇÃO DO SISTEMA DE GERAÇÃO DE VAPOR FRIO

Em testes iniciais, foi observado grande oscilação do sinal analítico, afetando a precisão, além do elevado consumo de amostra e reagentes, devido principalmente a estrutura do separador gás-líquido fornecido pelo fabricante, já acoplado ao espectrômetro de fluorescência atômica. O separador gás-líquido é uma parte importante quando se trabalha com geração química de vapor, pois nele pode ocorrer interferências na fase gasosa (KUMAR; RIYAZUDDIN, 2010). Para melhorar a precisão, diminuir o consumo de amostra e diminuir as possíveis interferências nessa etapa, foi proposto modificações no sistema de geração de vapor. Essas modificações tiveram como função reduzir o volume morto, volume esse que é resultado da reação, podendo causar interferência por efeito de memória, melhorando a sensibilidade do método.

O sistema de geração química de vapor do fabricante (AURORA Instruments) apresenta dois separadores gás-líquido, no qual o primeiro necessita de grande volume para auxiliar na manutenção da pressão e para impedir a chegada do líquido ao detector. Devido ao seu tamanho, maior tempo é necessário para retirar o volume morto gerado pelo acúmulo de líquido. O segundo separador, com capacidade volumétrica abaixo de 2,0 mL, funciona apenas como frasco de segurança, impedindo que qualquer gotícula entre na zona de absorção de radiação.

As modificações consistiram na utilização de um reator (Figura 4a), seguido da adição de uma bobina de mistura de 15 cm (Figura 4b) e a retirada do primeiro SGL, mantendo apenas o segundo (Figura 4c), que comporta volume menor. Devido à baixa capacidade de retenção de líquido do SGL empregado, houve a necessidade de instalar uma bomba peristáltica com vazão elevada, apenas para o descarte. As alterações são mostradas na Figura 4.

Após as alterações, obteve-se melhora na estabilidade do sinal, melhorando a precisão e também proporcionando um menor consumo de amostra, saindo de uma vazão mínima de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ para $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Como desvantagens, tem-se a diminuição da frequência analítica e impossibilidade de trabalhar com vazões de introdução de amostra e de gás de arraste elevadas (acima de $2,4 \text{ mL}$). A figura 5 representa o esquema do sistema adaptado acoplado ao AFS, já nas condições para geração do vapor frio de Cd e Hg.

Figura 4 - Sistema de geração de vapor frio adaptado para o desenvolvimento deste trabalho. Figura 4a. célula de reação; Figura 4b. reator de teflon; 4c. separador gás-liquido

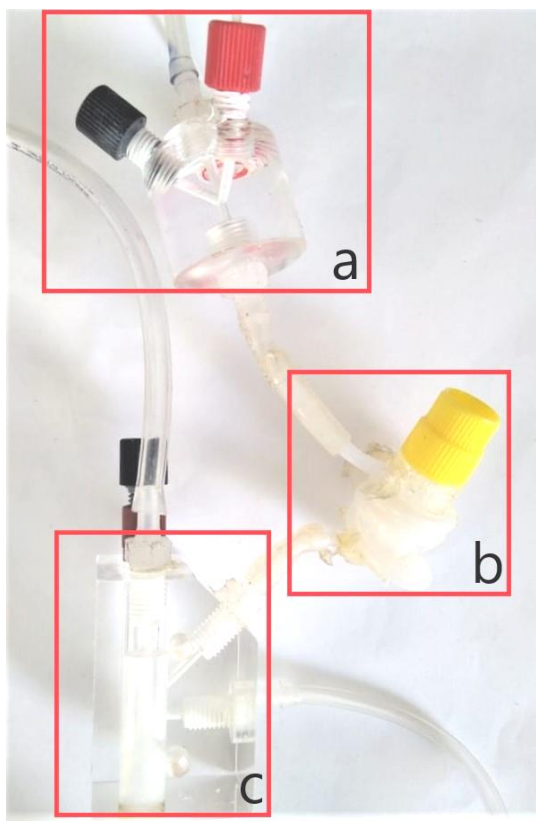
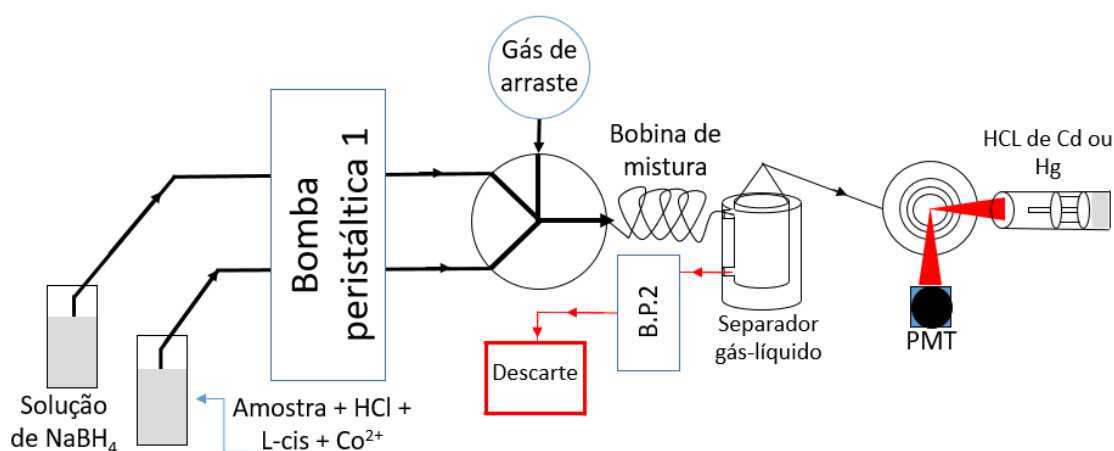


Figura 5 - Representação do sistema de geração química de vapor acoplado ao espectrômetro de fluorescência atômica



6.4 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA PARA GERAÇÃO DO VAPOR FRIO

Para a otimização do sistema, foi empregado um planejamento fatorial completo de dois níveis para cada analito, o qual serviu para fazer uma triagem das variáveis que influenciam o sistema de maneira significativa. Em seguida, foi aplicada como metodologia de superfície de resposta o planejamento Box-Behnken, para a determinação das condições ótimas. Foi utilizada como resposta analítica a média da intensidade de fluorescência de cada analito, as quais foram posteriormente tratadas. Os dados experimentais foram tratados com auxílio do software STATISTICA 7.0, aplicando um intervalo de confiança de 95%. Todos os ensaios foram realizados de maneira aleatória, para diminuir as chances de algum fator extra influenciar o sistema.

6.5 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR

As amostras de água do mar foram coletadas no litoral da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, seguindo a orientação do Guia nacional de coleta e preservação de amostras (2011). As amostras foram coletadas em frascos devidamente descontaminados e ambientados. Foi realizada uma amostragem de água superficial

6.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Hg por CV AFS

Para a análise das amostras de água do mar foi necessário realizar uma etapa de filtração (papel filtro quantitativo), devido a possível presença de resíduo sólido nas mesmas. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

6.6.1 Procedimento para preparo das amostras e CRM de água do mar

As amostras coletadas foram levadas para o laboratório, filtradas e preparadas para análise no mesmo dia. Inicialmente, 1 mL da amostra foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foram adicionados 680 e 683 μL de HCl 6 mol L^{-1} , 480 e 400 μL de L-cisteína 2,5% (m v^{-1}), 7 e 10 μL de padrão de Co(II) 1000 mg L^{-1} , para determinação de Cd e Hg, respectivamente, e água ultrapura para atingir um volume de 10 mL. As soluções foram conduzidas para medida no AFS. Um procedimento semelhante foi aplicado para o material de referência certificado de água residual (ERM Ca-713), utilizando um volume de CRM de 500 μL .

6.6.2 Procedimento para extração de Cd e Hg em CRM de solo

Para o material de referência certificado de solo de San Joaquin (SRM 2709a), foi necessário realizar um procedimento de extração, empregando uma massa do CRM de 100 mg, HCl 4,1 mol L^{-1} , banho ultrassônico por 20 minutos e centrifugação. Após essas etapas, foram retiradas alíquotas de 160 μL e 67 μL da fase líquida, e transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados, respectivamente, 570,7 μL e 637,6 μL de HCl 6 mol L^{-1} , 467 μL e 387 μL de L-cisteína 2,5% (m v^{-1}), 7 e 10 μL solução padrão de Co(II) 1000 mg L^{-1} para a determinação de Cd e Hg, respectivamente, e água ultrapura para alcançar um volume de 10 mL.

6.6.3 Procedimento para digestão do CRM de tecido de ostra e folha de espinafre

Para o preparo do material certificado de tecido de ostra (NIST 1566b), 100 mg de amostra foi decomposta empregando 2 mL de ácido nítrico 65% (m/m). As amostras foram mantidas sob aquecimento a 100°C por 1 hora em bloco digestor com dedo frio acoplado a cada tubo, usado como sistema de refluxo para evitar perda do analito por volatilização. Depois, os tubos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente por 30 minutos para adição de 1,5 mL de H₂O₂. Em seguida, os tubos foram recolocados no bloco à 100°C por mais 1 hora e 30 minutos, totalizando um tempo de digestão de 3 horas. Com o sistema à temperatura ambiente, o conteúdo dos tubos foi transferido cuidadosamente para balões volumétricos de 10 mL e avolumado usando água ultrapura. As soluções foram transferidas posteriormente para tubos de centrifuga. Por fim, para determinação de Cd, 20 µL de solução de cada tubo foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foram adicionados 671 µL de HCl 6 mol L⁻¹ (para manter a concentração de análise otimizada de 0,408 mol L⁻¹) e água ultrapura para alcançar um volume de 10 mL. Para determinação de Hg, 1,4 mL de cada solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, ao qual foram adicionados 30 µL de HCl 6 mol L⁻¹. A L-cisteína foi adicionada nos volumes de 480 e 400 µL de uma solução 2,5% (m v⁻¹) e 7 e 10 µL de padrão de Co(II) 1000 mg L⁻¹, respectivamente para Cd e Hg. Depois, a água ultrapura foi adicionada para alcançar um volume de 10 mL. As soluções foram conduzidas para determinação de Cd e Hg no AFS.

O CRM de folha de espinafre (NIST 1570a) foi preparado de maneira semelhante ao CRM de tecido de ostra, alterando a massa de digestão para 200 mg e as alíquotas retiradas de 10 e 1000 µL para Cd e Hg, respectivamente.

7. RESULTADOS

Os resultados estão parcialmente apresentados em duas partes. A primeira parte dos resultados é focada na apresentação dos dados obtidos na otimização da geração de vapor frio de Cd por AFS. Já a segunda na otimização da geração de vapor frio de Hg.

7.2 ESTUDO DO EFEITO DO TIPO DE ÁCIDO PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO DE Cd E Hg

Um estudo univariado foi realizado para avaliar a influência do ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃) e ácido acético (HAc) na geração de vapor frio de Cd e Hg. Para esse estudo foi fixada a concentração de Cd e Hg em 500 ng L⁻¹, a concentração de NaBH₄ em 2,5% (m v⁻¹) e a VGA em 0,4 mL min⁻¹. Os três ácidos foram estudados na mesma faixa de concentração, de 0,2 a 1,0 mol L⁻¹. As figuras 6 e 7 mostram os gráficos com o comportamento da intensidade de fluorescência nos três ácidos escolhidos e na faixa de concentração estabelecida.

Os ácidos clorídrico e nítrico foram elegidos para o estudo pois são os mais utilizados em sistemas de geração de hidreto e vapor frio (ARSLAN; YILMAZ; ROSE, 2015). O HNO₃, por ser um oxidante forte, é muito utilizado quando há a necessidade de digestão da amostra, como no caso do CRM de folha de espinafre usado na validação desde trabalho. O ácido acético, mesmo sendo um ácido fraco, é muito utilizado para enriquecer o sinal de Hg quando combinado em sistemas com radiação ultravioleta (ZHENG et al., 2010).

Figura 6 - Estudo da concentração e tipo de ácido para determinação de Cd por CV AFS

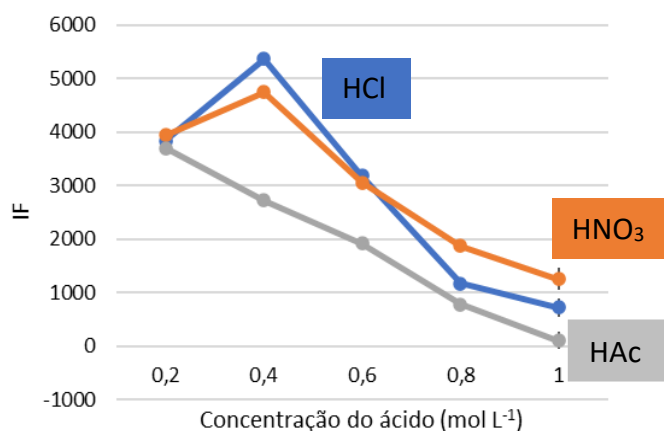
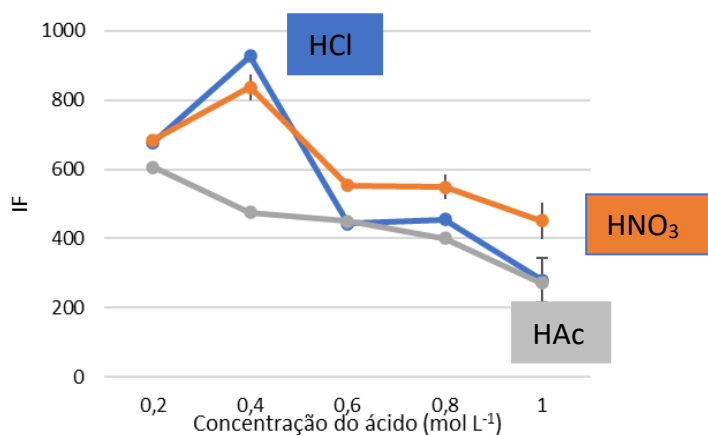


Figura 7 - Estudo da concentração e tipo de ácido para determinação de Hg por CV AFS



Os resultados mostraram que os três tipos de ácidos estudados influenciam na geração de vapor frio de Cd e Hg, entretanto, o que apresentou efeito mais significativo foi o HCl, na concentração de 0,4 mol L⁻¹, para ambos os analitos. A baixa efetividade do ácido acético deve-se ao tamanho da molécula, esse é um problema que a fotodegradação com radiação UV pode solucionar, convertendo em espécies voláteis ou mais simples (ZHENG et al., 2010). O HCl e o HNO₃ tiveram um comportamento parecido e isso foi levado em consideração ao trabalhar com amostras digeridas em HNO₃.

7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO E DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO POR CVG AFS

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial completo 2³ para investigar o comportamento de algumas variáveis e suas interações no sistema de geração de vapor químico no espectrômetro de fluorescência atômica (AFS). As variáveis estudadas nesse planejamento foram: concentração de ácido clorídrico ([HCl]), concentração de tetraidroborato de sódio ([NaBH₄]) e vazão do gás de arraste (VGA). Os experimentos iniciais foram realizados estabelecendo como base as condições recomendadas pelo fabricante para valores das correntes das lâmpadas de cátodo oco de cádmio e mercúrio, voltagem do detector (Photomultiplier tubes – PMT) e vazão do gás de proteção (os

valores utilizados estão contidos na Tabela 3). Para a otimização, foi utilizada uma solução padrão de Cd na concentração de 500 ng L⁻¹, em meio de ácido clorídrico, com a concentração variando de 0,05 a 0,55 mol L⁻¹.

Os domínios experimentais do planejamento fatorial completo de dois níveis para Cd estão expostos na Tabela 5. A matriz do planejamento apresenta 11 experimentos, sendo que 3 experimentos correspondem a triplicata do ponto central, que foi utilizado para avaliação do erro experimental.

Tabela 5 - Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial completo 2³ aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Cd

Fator	Níveis experimentais estabelecidos		
	-1	0	+1
[HCl] mol L ⁻¹	0,05	0,30	0,55
[NaBH ₄] (m/v)%	0,50	1,50	2,50
VGA L min ⁻¹	0,20	0,40	0,60

A matriz do planejamento fatorial de dois níveis apresenta as respostas obtidas (intensidade de fluorescência, IF) e os valores codificados e reais dos três fatores para cada um dos 11 experimentos. Todas essas informações estão contidas na Tabela 6.

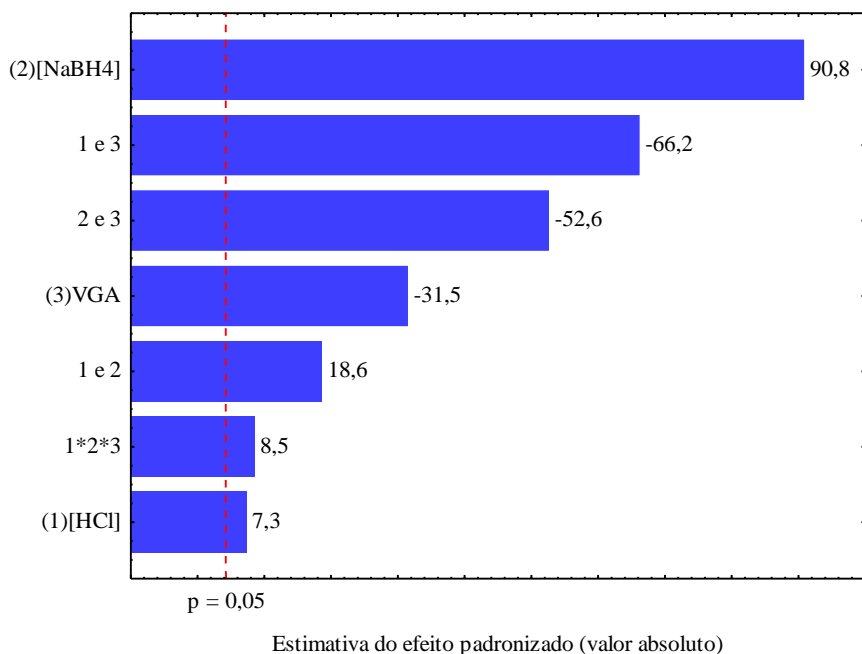
Tabela 6 - Matriz do planejamento fatorial de dois níveis aplicado para avaliar os fatores envolvidos na geração de vapor frio de Cd

Experimento	[HCl] (mol L⁻¹)	[NaBH₄] %(m v⁻¹)	VGA (L min⁻¹)	IF Cd
1	(-1) 0,05	(-1) 0,50	(-1) 0,20	212,30
2	(+1) 0,55	(-1) 0,50	(-1) 0,20	1839,00
3	(-1) 0,05	(+1) 2,50	(-1) 0,20	3635,00
4	(+1) 0,55	(+1) 2,50	(-1) 0,20	5781,30
5	(-1) 0,05	(-1) 0,50	(+1) 0,60	2671,67
6	(+1) 0,55	(-1) 0,50	(+1) 0,60	464,00
7	(-1) 0,05	(+1) 2,50	(+1) 0,60	2955,67
8	(+1) 0,55	(+1) 2,50	(+1) 0,60	2141,00
9	(0) 0,30	(0) 1,50	(0) 0,40	4023,00
10	(0) 0,30	(0) 1,50	(0) 0,40	4079,00
11	(0) 0,30	(0) 1,50	(0) 0,40	4011,00

Analisando a matriz do planejamento fatorial de dois níveis, observa-se que os sinais mais elevados foram obtidos para o experimento 4. Esse experimento utilizou o maior nível de HCl (0,55 mol L⁻¹), a maior concentração de NaBH₄ (2,50% m v⁻¹) e o menor nível para a VGA (0,20 L min⁻¹).

A partir dos resultados obtidos, foi possível gerar o gráfico de Pareto (Figura 6) e o gráfico das médias marginais (Figura 7).

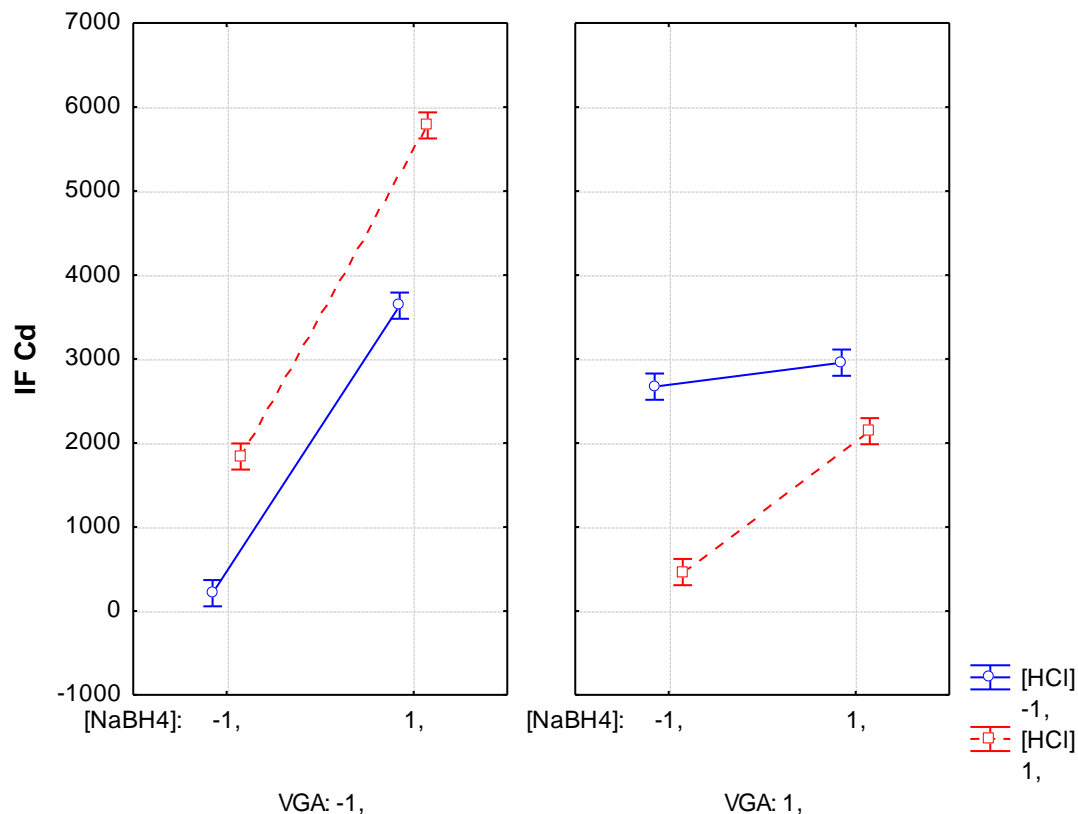
Figura 8 - Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo de dois níveis aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de cádmio



O gráfico de Pareto (Figura 8) apresenta os valores dos efeitos padronizados (efeito dividido pelo erro padrão) e permite avaliar a significância de todas as variáveis e interações estudadas. Como indicado nos resultados da Tabela 6, o gráfico apresenta as mesmas tendências do experimento 4. Todas as variáveis estudadas e suas interações foram estatisticamente significativas, em um intervalo de confiança de 95%. A concentração de NaBH₄ apresentou o efeito (2331,5 ± 25,7) mais significativo e positivo, indicando que o sinal analítico tende a aumentar quando se trabalha em níveis mais altos de concentração. A VGA teve um efeito (-808,8 ± 25,7) negativo, indicando uma tendência do sistema em aumentar a IF quando trabalha-se com os níveis mais baixos de vazão de gás de arraste. O HCl apresentou o menor efeito entre os fatores principais, com efeito (187,7 ± 25,7) positivo. A tendência observada do NaBH₄ deve-se ao fato do mesmo ser parte integrante da reação de formação da espécie ativa que conduz à formação de espécies voláteis do analito. A hidrólise ácida do NaBH₄ gera produtos intermediários que são responsáveis pela transferência do hidrogênio para o analito complexado. O HCl favorece a reação de substituição e favorece a formação do

gás hidrogênio, que auxilia no transporte e na dispersão do vapor frio de Cd juntamente com o gás de arraste (argônio) (D'ULIVO, 2010).

Figura 9 - Gráfico das médias marginais para os fatores [HCl], [NaBH₄] e VGA avaliados na geração de vapor frio de Cd



O gráfico das médias marginais (Figura 9) informa sobre a relação entre os efeitos principais e das interações, dentro dos níveis do domínio experimental definido para o planejamento. O gráfico permite visualizar dois cenários. À esquerda, para VGA no menor nível, tem-se que a intensidade de fluorescência aumenta quando a concentração de NaBH₄ varia do menor para o maior nível, tanto para as concentrações de HCl no menor quanto para o maior nível, sendo o efeito mais significativo no maior nível de HCl. À direita, analisando VGA no maior nível, tem-se um comportamento semelhante ao da esquerda da figura, porém com menor intensidade de fluorescência.

De acordo com o gráfico das médias marginais, a melhor condição é apresentada quando a VGA está no menor nível, e a concentração de NaBH₄ e de HCl estão no maior nível, confirmando as informações apresentadas no gráfico de Pareto.

Com o planejamento fatorial completo de dois níveis, foi possível verificar que todas os três fatores estudados, concentração de HCl, concentração de NaBH₄ e VGA foram significativos com grau de confiança de 95%. Para estabelecer as condições ótimas para a geração do vapor frio, foi aplicado um planejamento Box-Behnken para três fatores com 15 ensaios. Esse planejamento foi escolhido devido a simplicidade, grande eficiência, quando comparados com outras metodologias de superfície de resposta em três níveis, e por não apresentar combinações em que os fatores sejam trabalhados nos níveis mais alto ou baixo simultaneamente, evitando experimentos em condições extremas, o que poderia acarretar resultados insatisfatórios ao sistema adaptado utilizado para geração de vapor frio (FERREIRA et al., 2007). Para os experimentos, foi utilizado solução padrão de Cd na concentração de 500 ng L⁻¹ e mantendo as mesmas condições instrumentais empregadas no planejamento fatorial completo.

Na Tabela 7, encontram-se os níveis estabelecidos para o domínio experimental estabelecido para o planejamento Box-Behnken.

Tabela 7 - Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento Box-Behnken aplicado para otimizar as condições de geração de vapor frio de cádmio

Fator	Níveis estabelecidos		
	-1	0	+1
[HCl] mol L ⁻¹	0,2	0,4	0,6
[NaBH ₄] (m/v)%	1,5	2,5	3,5
VGA L min ⁻¹	0,2	0,4	0,6

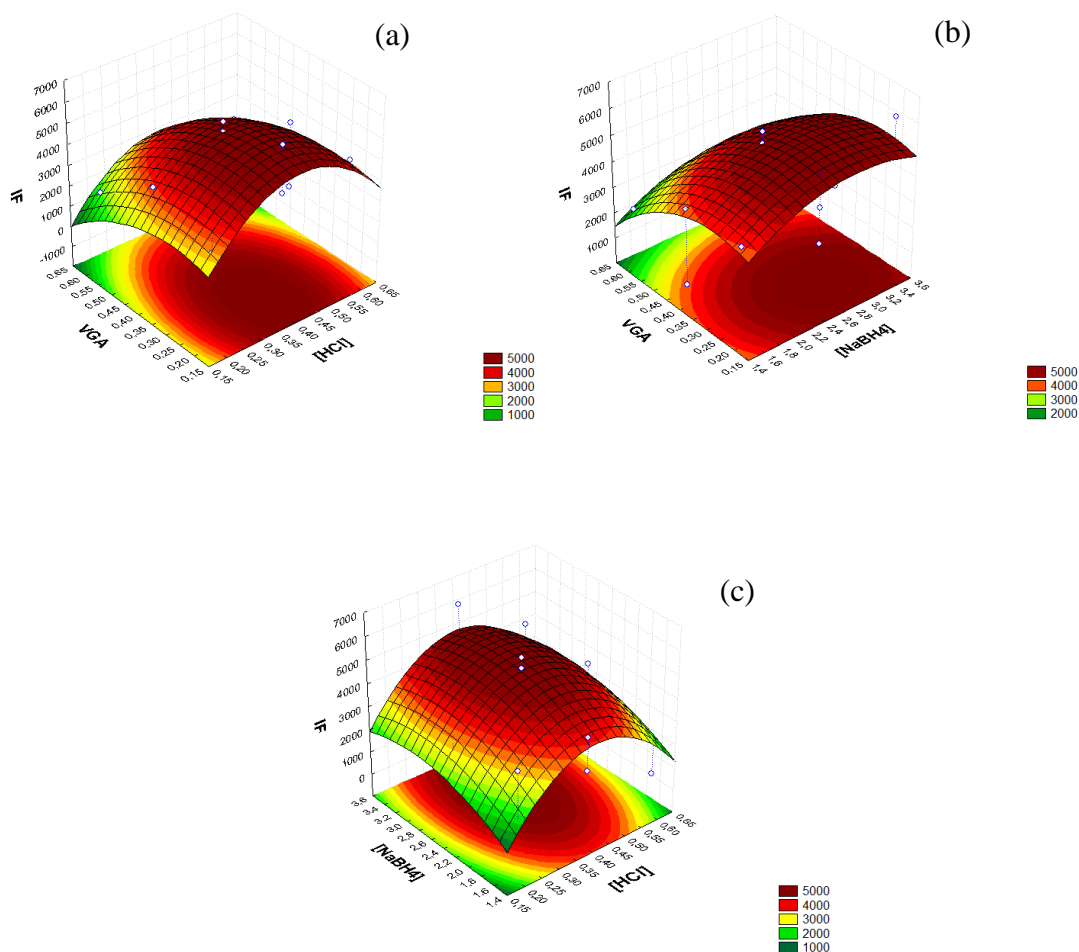
A matriz do planejamento é exibida na Tabela 8, na qual estão registrados os valores reais e codificados e os valores da intensidade de fluorescência.

Tabela 8 - Matriz do Planejamento Box-Benhken para três variáveis aplicado para otimizar as variáveis envolvidas na geração de vapor frio de Cd

Experimento	[HCl] (mol L⁻¹)	[NaBH₄] (% m v⁻¹)	VGA (mL min⁻¹)	IF
1	0,20	1,50	0,40	3781,75
2	0,60	1,50	0,40	872,50
3	0,20	3,50	0,40	2055,00
4	0,60	3,50	0,40	3991,75
5	0,20	2,50	0,20	2540,50
6	0,60	2,50	0,20	3919,25
7	0,20	2,50	0,60	1761,25
8	0,60	2,50	0,60	2510,75
9	0,40	1,50	0,20	3809,25
10	0,40	3,50	0,20	6055,75
11	0,40	1,50	0,60	2370,00
12	0,40	3,50	0,60	2391,75
13 (PC)	0,40	2,50	0,40	4819,00
14 (PC)	0,40	2,50	0,40	4979,00
15 (PC)	0,40	2,50	0,40	5434,00

A partir dos resultados obtidos para o planejamento Box-Behnken, foram geradas superfícies de resposta, em que é exibida a relação entre as variáveis, tendo como variável dependente a intensidade do sinal analítico. As superfícies de resposta são apresentadas na Figura 10.

Figuras 10 - Superfícies de resposta geradas pelo ajuste de uma função quadrática aos sinais de fluorescência do Cd



(a) = (IF x VGA x [HCl]); (b) = (IF x VGA x [NaBH₄]); (c) = (IF x [NaBH₄] x [HCl]).

Todas as superfícies apresentaram características de condição de máximo. Entretanto, uma avaliação realizada somente com base na inspeção visual das superfícies de resposta pode não ser suficiente para garantir ponto de máximo e obtenção das condições ótimas, e também, se modelo descreve satisfatoriamente os dados experimentais. Para verificar esses parâmetros, é necessário avaliar os valores críticos e aplicar a análise de variância, ANOVA, a qual avalia o termo falta de ajuste (lack of fit) (BEZERRA et al., 2008). De acordo com os resultados da ANOVA, o termo falta de ajuste não foi estatisticamente significativo, indicando que os dados experimentais são descritos adequadamente pelo modelo matemático estabelecido.

Todas as superfícies foram geradas pelo software STATISTICA 7.0. Os valores da falta de ajuste são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - ANOVA para os resultados obtidos a partir do planejamento Box-Behnken aplicado para Cd

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) [HCl] (L)	8482450	1	8482450	83.3178	0,011790
[HCl] (Q)	10519616	1	10519616	103.3277	0,009540
(2) [NaBH₄] (L)	1675136	1	1675136	16.4538	0,055743
[NaBH₄] (Q)	1883203	1	1883203	18.4975	0,050038
(3) VGA (L)	106061	1	106061	1.0418	0,414776
VGA (Q)	1842878	1	1842878	18.1014	0,051051
Falta de ajuste	9567512	6	1594585	15.6626	0,061222
Erro puro	203617	2	101808		
Total SS	31114065	14			

Os resultados da ANOVA apresentam a soma quadrática (SS), referindo-se ao desvio da média, o grau de liberdade (df), que é a quantidade de determinações avulsas menos o número de parâmetros estatísticos a serem avaliados no sistema, a média da soma quadrática (MS), que é a razão entre SS e o df. O teste F (a média quadrática da regressão dividido pela média quadrática do erro, resíduo), tem o intuito de testar de forma estatística a igualdade entre as médias e o p-valor, que se refere a rejeição ou não da hipótese nula. Para um nível de confiança de 95%, o p-valor deve ser menor que 0,05 para que o efeito seja estatisticamente significativo.

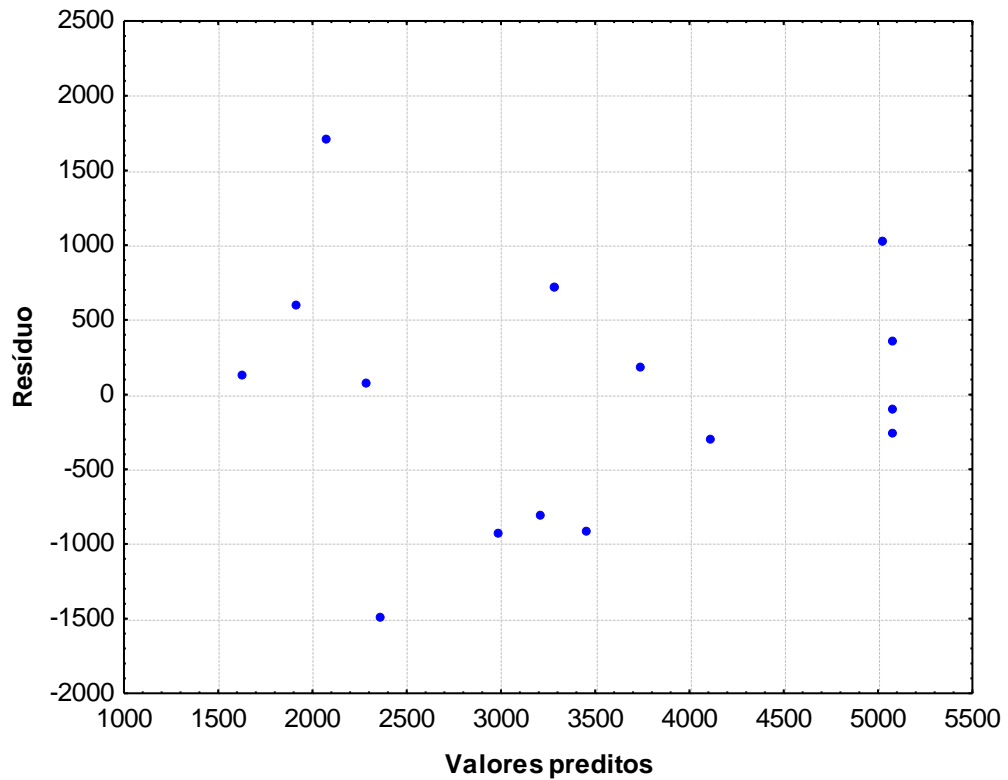
A forma de verificar o ajuste do modelo matemático é através do teste de falta de ajuste, que é a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQfaj) e a média quadrática do erro puro (MQep). O F calculado foi igual a 15.66. O valor do F tabelado com os graus de liberdade de 6 (MQfaj, numerador) e 2 (MQep, denominador) é igual a

19.33. Isso indica que MQ_{faj} e MQ_{ep} são estatisticamente iguais. Dessa forma, o modelo não apresenta falta de ajuste e a incapacidade em se ajustar aos valores reais se confunde com o erro intrínseco das réplicas autênticas do ponto central (FILHO, 2015).

Outra maneira de verificar a qualidade do modelo que foi gerado é através da significância estatística da regressão. A razão entre as médias quadráticas da regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática dos resíduos (MQ_{res}) fornece o F calculado. MQ_{reg} foi 21.342.932,96 e MQ_{res} teve o valor de 9.771.132,224, obtendo F calculado de 2,91. O F tabelado para os graus de liberdade de 6 para MQ_{reg} e 8 para MQ_{res} foi de 3,58. (NOVAES et al., 2017).

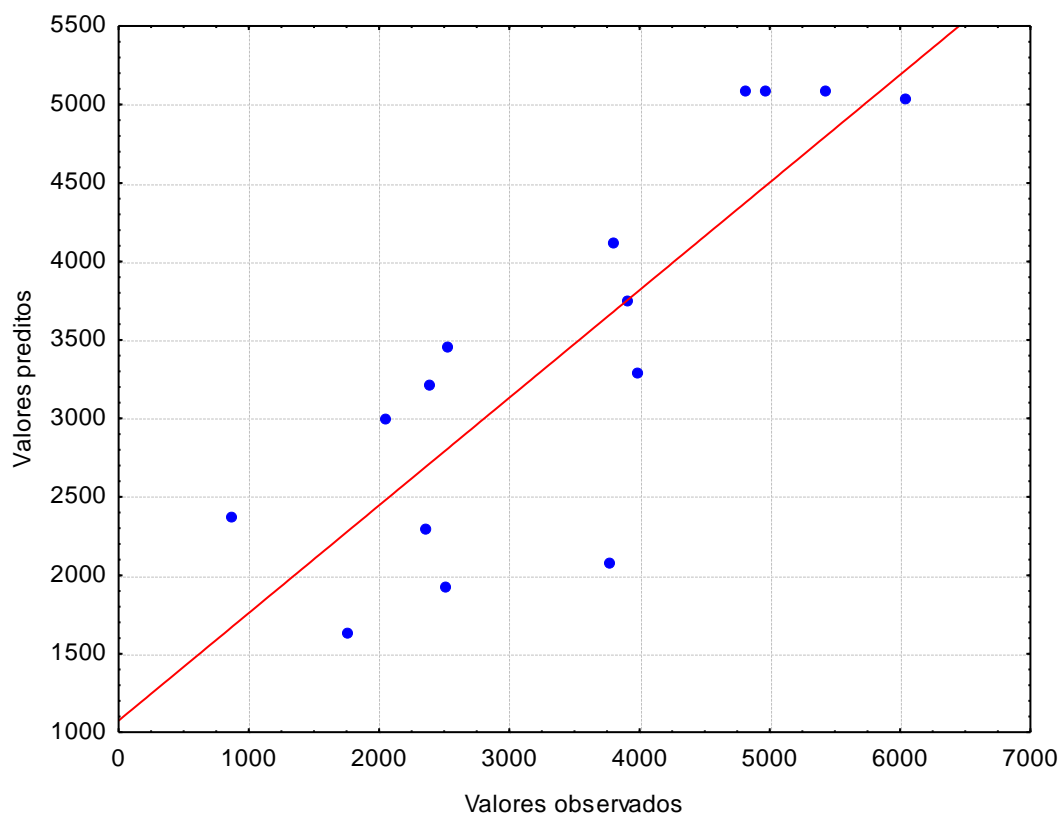
O gráfico contido na Figura 11 apresenta boa distribuição entre os pontos, indicando que há homocedasticidade (fenômeno estatístico que ocorre quando o modelo de hipótese matemático apresenta varâncias para Y e X não iguais para todas as observações). Existem 8 resíduos positivos e 7 resíduos negativos.

Figura 11 - Gráfico de resíduos versus valores preditos para os resultados do Box-Behnken aplicado para Cd



A Figura 12 apresenta o gráfico de valores preditos versus valores observados. A concordância entre os pontos não aparenta ser muito significativa ($R^2 = 0,69$). Entretanto, há uma tendência observada na Figura 10 entre os valores experimentais e os previstos.

Figura 12 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para o Box-Behnken para Cd



O modelo matemático obtido apresentou como solução uma região caracterizada como superfície de máximo com valores críticos dentro do domínio experimental, os quais estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores críticos gerados pelo planejamento Box-Benhken para Cádmi

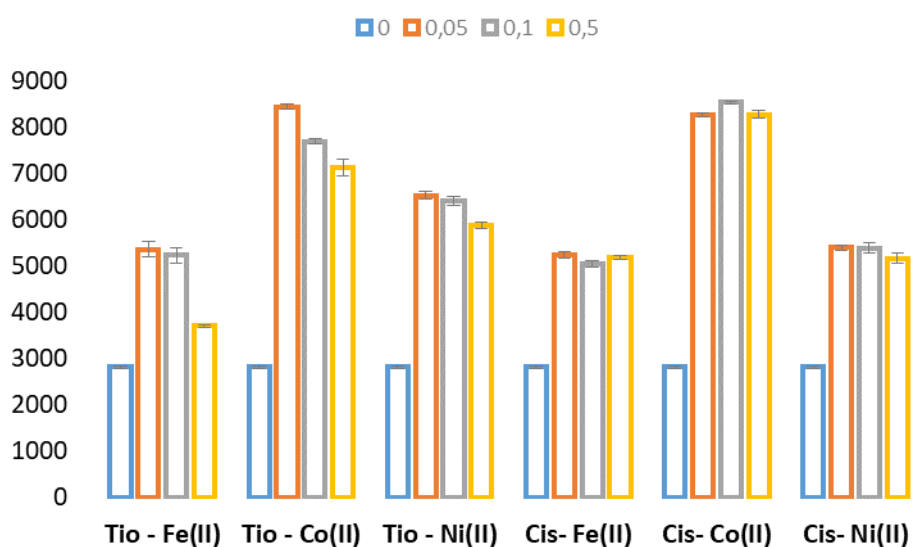
Fator	-1	Valor crítico	+1
[HCl] mol L ⁻¹	0,200	0,408	0,600
[NaBH ₄] (m v ⁻¹)%	1,500	2,820	3,500
VGA mL min ⁻¹	0,200	0,270	0,600

7.2 ESTUDO UNIVARIADO DO ENRIQUECEDOR DE SINAL E CATALISADOR PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO DE Cd.

Matrizes mais complexas como água do mar, podem conter, além da concentração elevada de sais, outros interferentes, como os metais de transição que atuam reduzindo a eficiência da geração de vapor, dependendo da concentração. No intuito de melhorar ainda mais a sensibilidade do método otimizado e diminuir os efeitos supressores de sinal, foi estudado o efeito de reagentes mascarantes (quelantes) e a atuação de íons como catalisador. Guo (1995) relatou um aumento significativo na eficiência de geração de espécies voláteis de Cd quando estudou a tioureia com o íon cobalto. Em estudos de Martin (1994), observou-se que a adição de L-cisteína melhorou a tolerância do sistema a elementos de transição. L-cisteína e tioureia reagem com NaBH_4 , formando espécies de hidroborano e cianoborato que geram maior eficiência na formação de espécies voláteis. Co(II), Ni(II) e Fe(II) são íons com atividade catalítica, eles são reduzidos preferencialmente para menor estado de oxidação. Esse processo gera precipitados finamente dispersos que capturam e decompõem o hidreto formado, devido a melhora na etapa de hidrólise do NaBH_4 (ARSLAN; YILMAZ; ROSE, 2015; BAX et al., 1988; YANG et al., 2015). Os metais de transição podem atuar na melhoria da eficiência da geração de vapor frio, dependendo da condição de concentração e do efeito sinérgico com agentes mascarantes e/ou com o redutor (NaBH_4). E também podem gerar interferências, sendo que algumas espécies podem gerar hidretos que atuam na desativação das partículas excitadas por colisão ou sofrendo redução, formando nanopartículas que diminuam a disponibilidade do analito.

Dentro desse contexto, o efeito das concentrações de tioureia e L-cisteína foram avaliadas na presença dos íons bivalentes de cobalto, ferro e níquel. Para esse estudo, as concentrações de tioureia e L-cisteína variaram de 0 a 0,5% (m v^{-1}), enquanto que a concentração dos íons metálicos foi fixada em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de Cd foi fixada em 500 ng L^{-1} e todos esses estudos foram realizados na amostra de água do mar. Os resultados desse estudo para Cd estão apresentados na Figura 13.

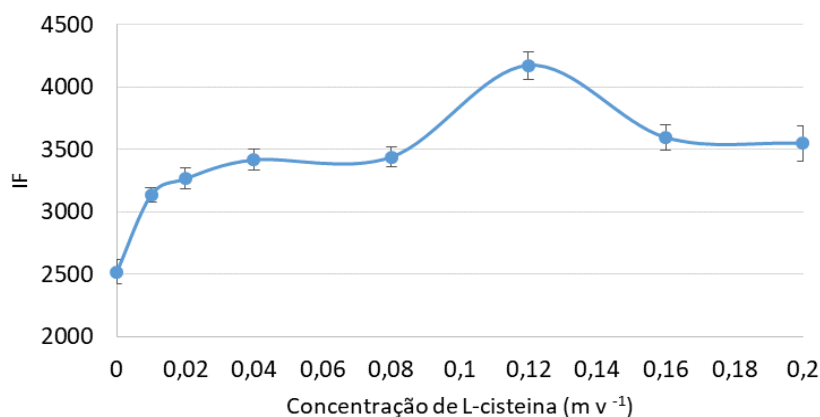
Figura 13 - Avaliação do efeito das concentrações de tiourea e L-cisteína no processo de geração de vapor frio de Cd, na presença de diferentes catalisadores



A partir do gráfico gerado, tem-se que todos os aditivos tiveram efeito positivo na geração química de vapor de Cd, estando de acordo com resultados obtidos em outros estudos reportados na literatura (GUO; GUO, 1995b; YANG et al., 2015). Entretanto, os que apresentaram efeito mais significativo foram as adições de tiourea 0,05% ($m v^{-1}$) mais Co(II) e L-cisteína com Co(II). Esse último, por mostrar aumento da eficiência de geração mesmo com concentrações diferentes de L-cisteína, foi considerado o mais efetivo e, por isso, foi escolhido para os próximos estudos.

Desse modo, um estudo univariado foi realizado como o intuito de avaliar ainda mais a influência da concentração de L-cisteína na presença do íon Co(II). Inicialmente, a concentração de L-cisteína foi variada de 0 a 0,2% ($m v^{-1}$) e a concentração de Co(II) fixada em $1,0 mg L^{-1}$. A concentração de Cd(II) foi fixada em $200 ng L^{-1}$. Os resultados desse estudo são apresentados na Figura 14.

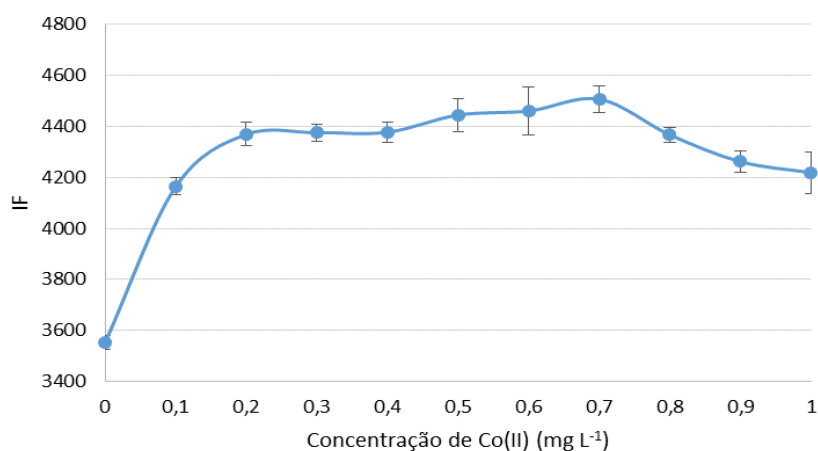
Figura 14 - Estudo da influência da concentração de L-cisteína na geração de vapor frio de Cd, na presença de Co como catalisado



De acordo com os resultados obtidos para esse estudo, a concentração de L-cisteína que promoveu maior eficiência para a geração de vapor frio de Cd foi de 0,12% (m v⁻¹).

Para completar o estudo, foi avaliada a concentração de Co(II), que variou de 0 a 1,0 mg L⁻¹ e a concentração de L-cisteína fixada em 0,12% (m v⁻¹). Esse valor foi estabelecido como máximo, pois a formação de precipitados finos (nanopartículas) podem influenciar na detecção do Cd quando a concentração de Co(II) é muito elevada (em torno de 2,0 mg L⁻¹). Em relação ao Cd (trabalhando na faixa de ng L⁻¹), observa-se um decréscimo no sinal. Os resultados são apresentados na Figura 15.

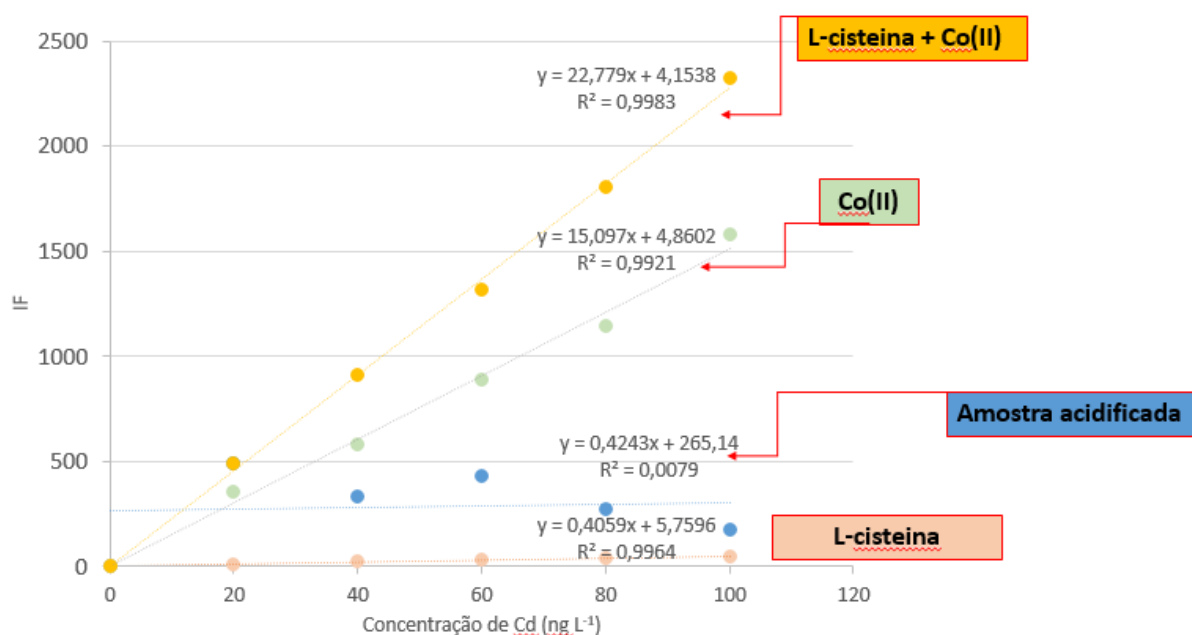
Figura 15 - Estudo da concentração de Co(II) no enriquecimento de sinal de Cd.



A partir desse estudo, foi possível definir a concentração de Co(II) em 0,7 mg L⁻¹. Com esse resultado, foram definidas as melhores condições para geração química de vapor de Cd.

Para melhor verificar a influência da L-cisteína e do cobalto na intensidade de fluorescência, foi realizado um experimento de comparação em que foram geradas curvas com a concentração de Cd variando de 0 a 100 ng L⁻¹. Essas curvas foram obtidas considerando-se quatro sistemas diferentes: uma sem adição de cis e Co(II), uma apenas com cis, outra apenas com Co(II) e a última na condição ótima. O intuito é avaliar o ganho de sensibilidade ao usar aditivos quando se trabalha com concentrações ultrabaixas de Cd. Os dados são apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Curvas de calibração obtidas para avaliar o efeito da L-cisteína e do Cobalto II no enriquecimento do sinal de Cd na geração de vapor frio



O gráfico comparativo mostra que o efeito sinérgico entre a cis-Co(II) favorece muito a sensibilidade do método, em relação as outras curvas. Destaque para curva apenas com adição de Co(II), que apresentou boa correlação e boa sensibilidade, isso indica que a função do Co(II) como catalisador independe da utilização de um outro componente para melhorar a eficiência do método. A amostra com cis obteve boa linearidade, porém com baixa sensibilidade. A amostra sem aditivos, apenas HCl e

NaBH₄, não gerou uma curva, apresentando péssima correlação entre os pontos, indicando não ser uma condição eficiente para se trabalhar com concentrações ultratraço de Cd, nesse tipo de matriz, empregando CV AFS.

7.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO E DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR CV AFS

Os fatores e níveis do domínio experimental do planejamento fatorial completo de dois níveis para Hg estão expostos na Tabela 11. A matriz do planejamento apresenta 11 experimentos, sendo que 3 experimentos correspondem a triplicata do ponto central, que foi utilizado para avaliação do erro experimental.

Tabela 11 - Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento fatorial completo 2³ aplicado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Hg

Fator	-1	0	+1
[HCl] (mol L⁻¹)	0,5	1,00	1,50
[NaBH₄] % (m v⁻¹)	0,50	2,00	3,50
VGA (L min⁻¹)	0,20	0,40	0,60

A matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis para 3 fatores está representada na Tabela 12. O intuito do planejamento é fazer uma triagem dos fatores mais significativos para geração do vapor frio de Hg. Os fatores selecionados para avaliação foram a concentração de HCl (mol L⁻¹), concentração do NaBH₄ (% m v⁻¹) e VGA (L min⁻¹). A concentração de Hg nos experimentos foi fixada em 500 ng L⁻¹.

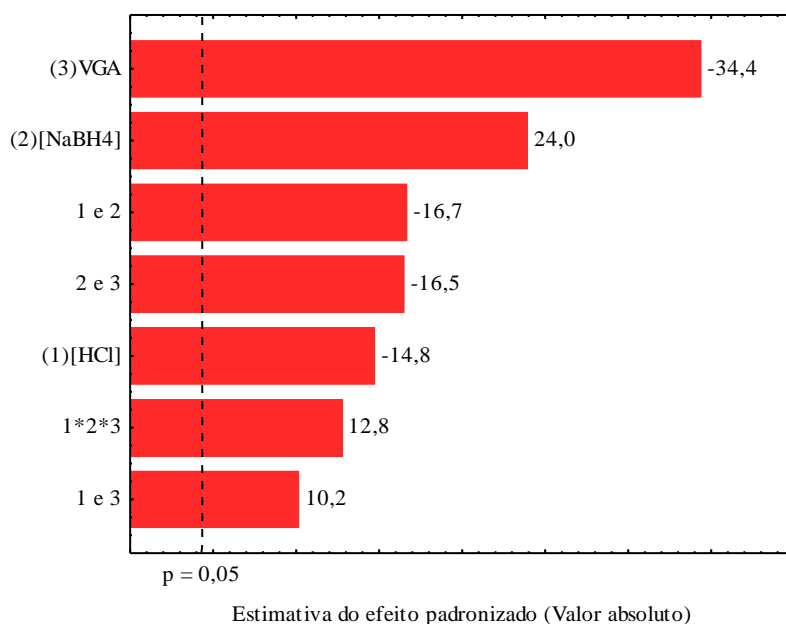
Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental de dois níveis para três variáveis usado para avaliar as condições de geração de vapor frio de Hg

Experimento	[HCl] (mol L⁻¹)	[NaBH₄] % (m v⁻¹)	VGA (mL min⁻¹)	IF Hg
1	(-1) 0,5	(-1) 0,50	(-1) 0,20	724,25
2	(+1) 1,5	(-1) 0,50	(-1) 0,20	748,00
3	(-1) 0,5	(+1) 3,50	(-1) 0,20	1091,20
4	(+1) 1,5	(+1) 3,50	(-1) 0,20	805,80
5	(-1) 0,5	(-1) 0,50	(+1) 0,60	644,00
6	(+1) 1,5	(-1) 0,50	(+1) 0,60	640,60
7	(-1) 0,5	(+1) 3,50	(+1) 0,60	703,60
8	(+1) 1,5	(+1) 3,50	(+1) 0,60	659,00
9	(0) 1,00	(0) 2,00	(0) 0,40	656,80
10	(0) 1,00	(0) 2,00	(0) 0,40	661,80
11	(0) 1,00	(0) 2,00	(0) 0,40	671,40

Analisando a matriz do planejamento fatorial 2^3 , observa-se que os sinais mais elevados foram para o experimento 3. Esse experimento utilizou o menor nível de HCl (0,5 mol L⁻¹), a maior concentração de NaBH₄ (3,50% m v⁻¹) e o menor nível para a VGA (0,20 L min⁻¹).

A partir dos resultados obtidos, foi possível gerar o gráfico de Pareto (Figura 17) e o gráfico das médias marginais (Figura 18).

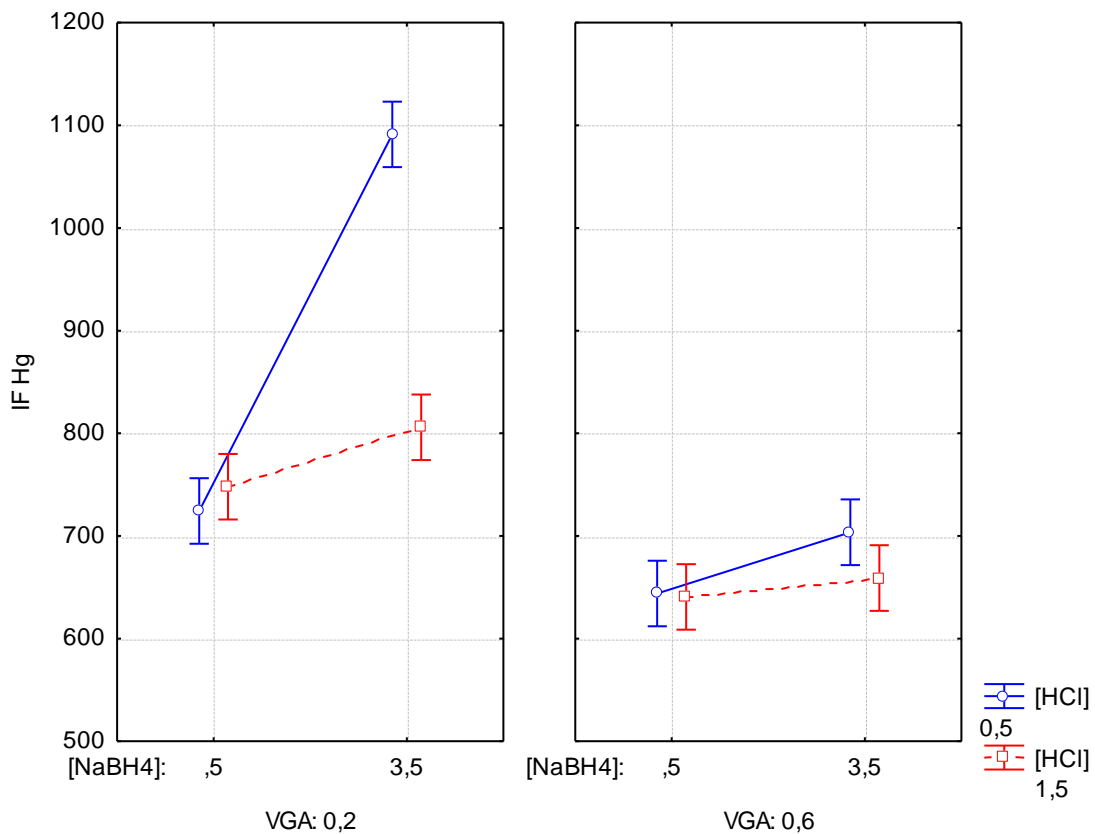
Figura 17 - Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo de dois níveis para três variáveis aplicado para investigar a geração de vapor frio de Hg



O gráfico de Pareto (Figura 17) dá um visão da significância dos fatores escolhidos dentro do domínio experimental estabelecido. No Pareto gerado para Hg, observa-se que todos os fatores principais e suas interações são estatisticamente significativos dentro do intervalo experimental estudado, em um intervalo de confiança de 95%. A VGA ($-180,51 \pm 5,25$) apresentou o efeito mais significativo e negativo, indicando que o sinal analítico tende a aumentar quando se utiliza níveis mais baixos de vazão. O HCl ($-77,41 \pm 5,25$) apresentou a mesma tendência da VGA, mas com efeito menos significativo. O NaBH₄ ($125,69 \pm 5,25$) apresentou um efeito positivo, indicando a tendência do sistema em ter melhor rendimento quando se trabalha em maiores níveis. O sistema de geração foi modificado (sessão 6.4.1) para utilizar volumes pequenos de amostra. Elevadas vazões do gás de arraste diminuí o tempo de interação entre NaBH₄ e o Hg(II), dispersando mais partículas e diminuindo o sinal de fluorescência. O borohidreto tem grande importância na formação das espécies voláteis, já que seus intermediários são responsáveis pela redução do mercúrio. O HCl favorece o meio reacional e a formação do gás hidrogênio. Com mais gás no meio, maior a dispersão das partículas e menor o sinal analítico.

O gráfico das médias marginais (Figura 18) permite avaliar o comportamento entre os fatores principais, dentro do domínio experimental estabelecido. A esquerda, para VGA no menor nível ($0,2 \text{ L min}^{-1}$), tem-se que, quando se trabalha com HCl no menor nível e se desloca do menor para o maior nível do NaBH_4 , há um aumento significativo da intensidade de fluorescência. A direita do gráfico, tem-se outro cenário, com a VGA em seu maior nível ($0,6 \text{ L min}^{-1}$). Nesse caso, uma avaliação semelhante ao cenário da esquerda também pode ser feita, entretanto com valores de intensidade de fluorescência mais baixos.

Figura 18 - Gráfico das médias marginais para os fatores $[\text{HCl}]$, $[\text{NaBH}_4]$ e VGA avaliados na geração de vapor frio de Hg



De acordo com o gráfico das médias marginais, a melhor condição é apresentada quando a VGA e o HCl estão no menor nível e a concentração de NaBH_4 no maior nível, confirmando as informações apresentadas no gráfico de Pareto.

O planejamento fatorial completo de dois níveis mostrou que os três fatores estudados são estatisticamente significativos, em um intervalo de confiança de 95%. Então, os mesmos devem ser melhor estudados e, para isso, aplicou-se um planejamento Box-Behnken para os três fatores estudados. Para os experimentos, foi utilizando solução padrão de Hg a uma concentração de 500 ng L⁻¹ e mantendo as mesmas condições instrumentais empregadas no planejamento fatorial completo.

Na Tabela 13, encontram-se os níveis estabelecidos para o domínio experimental estabelecido para o planejamento Box-Behnken.

Tabela 13 - Fatores e níveis estabelecidos para o domínio experimental para o planejamento Box-Behnken aplicado para geração de vapor frio de Hg

Fator	Níveis estabelecidos		
	-1	0	+1
[HCl] (mol L ⁻¹)	0,1	0,5	0,9
[NaBH ₄] % (m v ⁻¹)	2,00	3,50	5,00
VGA (L min ⁻¹)	0,10	0,20	0,30

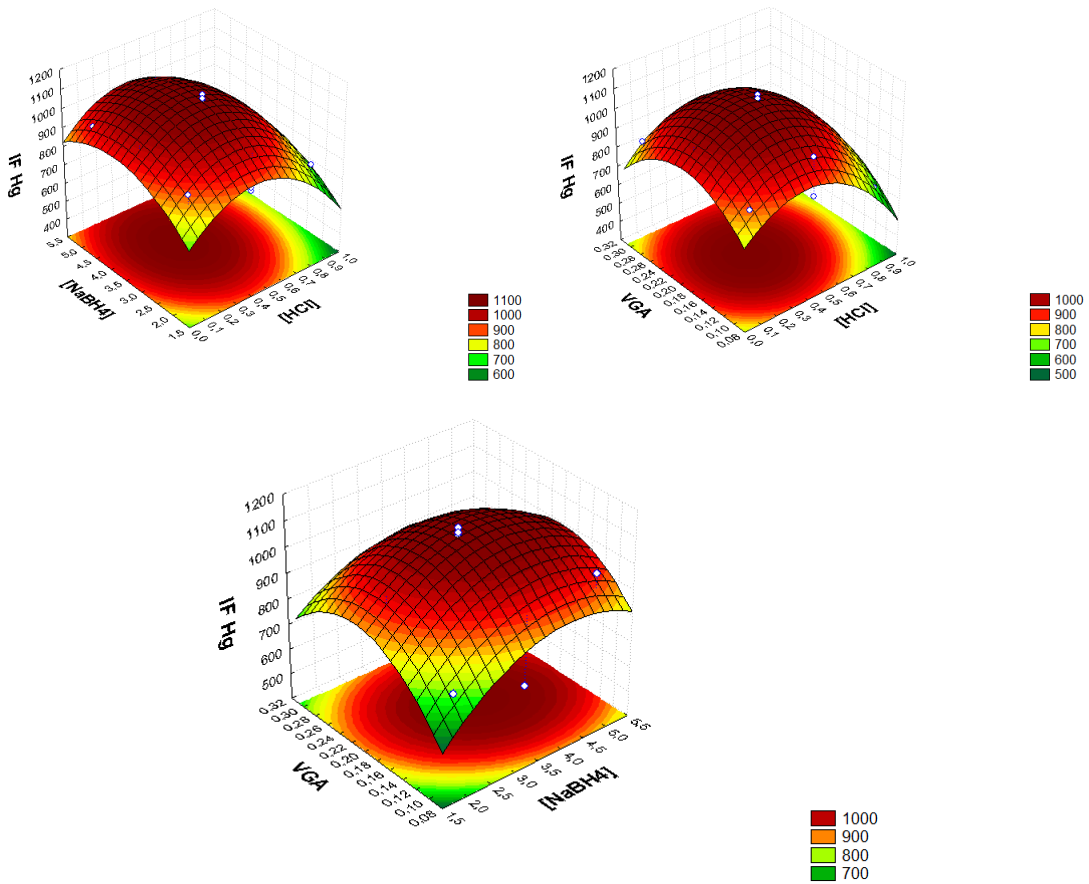
A matriz desse planejamento está apresentada na Tabela 14, na qual são exibidos os valores reais e codificados e os valores da intensidade de fluorescência. Todos os ensaios foram realizados de maneira aleatória para diminuir as chances de algum fator extra influenciar o sistema.

Tabela 14 - Matriz do Planejamento Box-Benhken para três variáveis aplicado para geração de vapor frio de Hg

Experimento	[HCl] (mol L⁻¹)	[NaBH₄] % (m v⁻¹)	VGA (mL min⁻¹)	IF Hg
1	0,1	2,0	0,2	900,00
2	0,9	2,0	0,2	756,00
3	0,1	5,0	0,2	919,40
4	0,9	5,0	0,2	765,60
5	0,1	3,5	0,1	850,20
6	0,9	3,5	0,1	659,00
7	0,1	3,5	0,3	828,00
8	0,9	3,5	0,3	730,20
9	0,5	2,0	0,1	764,60
10	0,5	5,0	0,1	968,00
11	0,5	2,0	0,3	784,80
12	0,5	5,0	0,3	869,40
13 (PC)	0,5	3,5	0,2	1105,50
14 (PC)	0,5	3,5	0,2	1075,00
15 (PC)	0,5	3,5	0,2	1083,67

Para melhor avaliar os efeitos do planejamento Box-Behnken, foram geradas superfícies de respostas, no qual é exposta a relação entre as variáveis, sendo a intensidade de fluorescência a variável dependente. A Figura 19 apresenta as superfícies de resposta.

Figuras 19 - Superfícies de resposta geradas a partir da matriz Box-Benhken para Hg



As superfícies são caracterizadas por apresentarem um ponto de máximo. Entretanto, essa não é a única avaliação para garantir que a condição ótima esteja dentro do domínio experimental estabelecido e se o modelo gerado está ajustado aos dados experimentais. Para verificar esse ajuste, é necessário avaliar os valores críticos e aplicar a análise de variância (ANOVA).

Todas as superfícies e tabela de ANOVA foram geradas pelo software STATISTICA 7.0. Os valores da falta de ajuste são exibidos na Tabela 15.

Tabela 15 - ANOVA para os resultados obtidos a partir do planejamento Box-Behnken aplicado para otimização das condições de geração de vapor frio de Hg

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) [HCl] (L)	43041,1	1	43041,1	174,2517	0,005690
[HCl] (Q)	102147,4	1	102147,4	413,5369	0,002409
(2) [NaBH₄] (L)	12561,1	1	12561,1	50,8529	0,019103
[NaBH₄] (Q)	27612,6	1	27612,6	111,7876	0,008827
(3) VGA (L)	57757,3	1	57757,3	233,8266	0,004249
VGA (Q)	88567,9	1	88567,9	358,5609	0,002777
1L e 3L	24,0	1	24,0	0,0972	0,784712
1L e 3L	2180,9	1	2180,9	8,8292	0,097053
2L e 3L	3528,4	1	3528,4	14,2843	0,063420
Falta de ajuste	10423,7	3	3474,6	14,0665	0,067100
Erro puro	494,0	2	247,0		
Total SS	264562,2	14			

A partir dos resultados da ANOVA, o termo falta de ajuste não foi estatisticamente significativo, indicando que os dados experimentais são descritos adequadamente pelo modelo matemático estabelecido.

Além disso, a falta de ajuste do modelo também foi verificada a partir do teste F, ao analisar se os valores do MQfaj e MQep são estatisticamente iguais, em um intervalo de confiança de 95%. O valor do F calculado é 14,07 e o F tabelado, considerando os graus de liberdade 3 para MQfaj e 2 para MQep é 19,16. O F calculado é menor que o tabelado, indicando que os valores são estatisticamente iguais, confirmando o ajuste do modelo.

A aleatoriedade apresentada no gráfico de resíduos versus os valores previstos (Figura 20), sugere que os valores são homocedásticos, mostrando a boa distribuição dos resíduos e boa qualidade de ajuste do modelo gerado.

Figura 20 - Gráfico de resíduos versus valores preditos para Box-Behnken para Hg

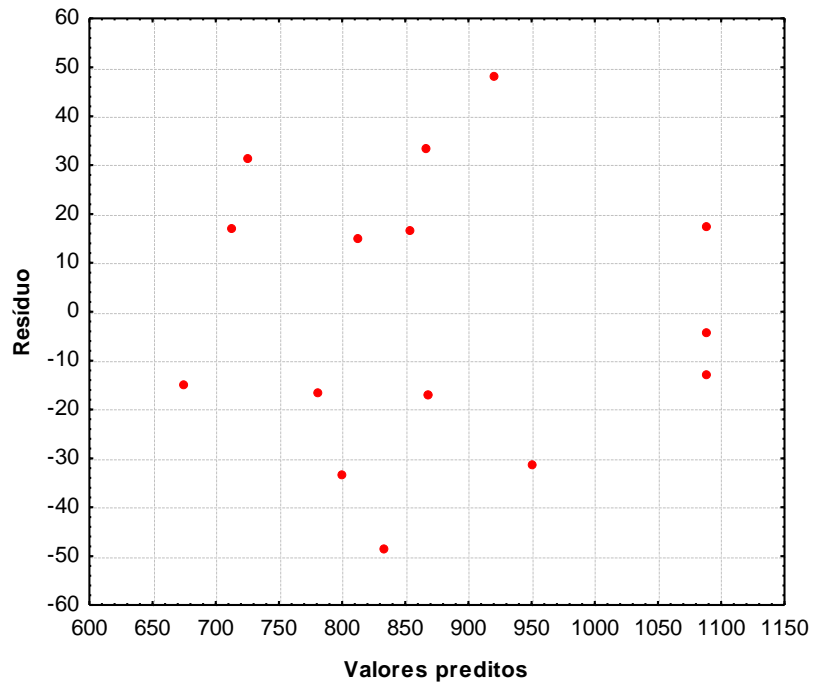
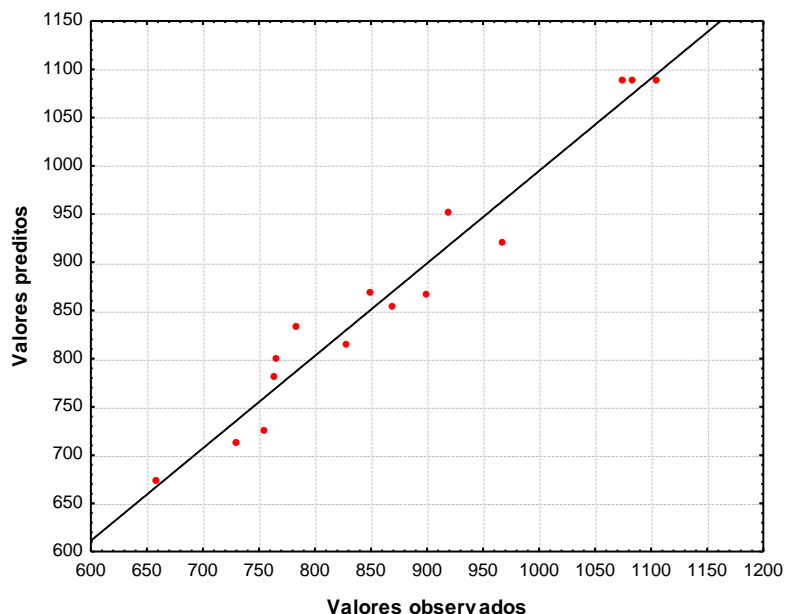


Figura 21 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para os resultados do planejamento Box-Behnken para Hg.



O gráfico (Figura 21) de valores preditos versus valores observados mostra que o modelo está ajustado aos dados experimentais, indicando que há uma boa concordância entre as respostas, apresentando um valor de R-quadrado igual a 0,95.

O modelo matemático obtido apresentou como solução uma região de máximo com valores críticos dentro do domínio experimental, os quais estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores críticos após aplicação da metodologia de superfície de resposta (Box-Behnken) para Hg (II)

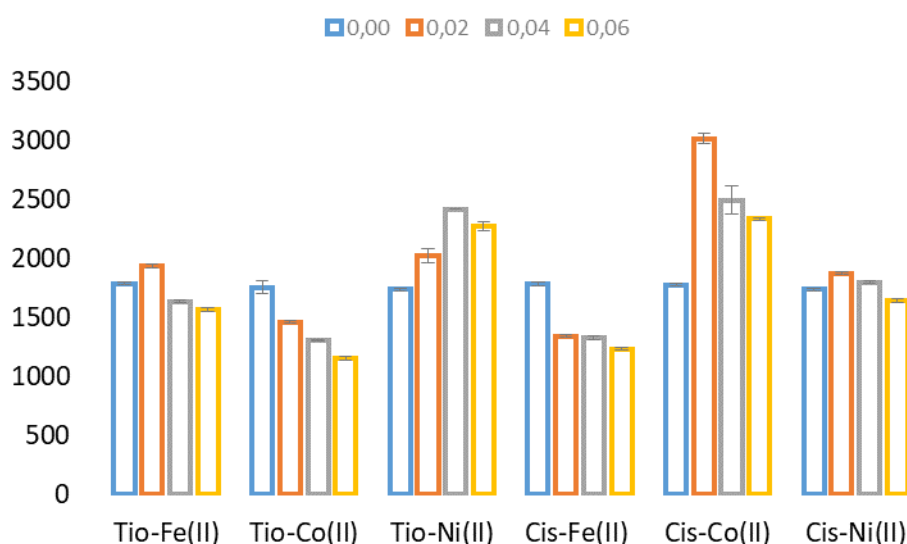
Fator	Mínimo observado	Valores críticos	Máximo observado
[HCl] (mol L⁻¹)	0,10	0,41	0,90
[NaBH₄] % (m v⁻¹)	2,00	3,86	5,00
VGA (L min⁻¹)	0,10	0,19	0,30

7.4. ESTUDO UNIVARIADO DO ENRIQUECEDOR DE SINAL E CATALISADOR PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO DE Hg.

Devido a possibilidade de interferências por metais de transição na análise de mercúrio em amostras de águas salinas, um estudo utilizando tioureia e L-cisteína foi realizado, no intuito de diminuir essas possíveis interferências. Outro estudo foi a utilização de cátions bivalentes funcionando como catalisadores no processo de formação das espécies voláteis de mercúrio. Neste caso, foram utilizados os íons Co(II), Fe(II) e Ni(II). Os mesmos reagentes utilizados para a melhora do sinal de Cd, isso devido a semelhança das características das duas espécies, tanto por gerarem vapor frio e por terem comportamentos parecidos nas condições ótimas de geração química de vapor.

Foram estudados o efeito das concentrações de tioureia e L-cisteína com e sem adição dos íons Co(II), Fe(II) e Ni(II). Para esse estudo, as concentrações de tioureia e L-cisteína variaram de 0 a 0,06 % (m v⁻¹). A concentração dos íons bivalentes foi fixada em 1,0 mg L⁻¹. A concentração de Hg foi fixada em 500 ng L⁻¹. Os resultados desse estudo estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Estudo da influência da tiouréia e da L-cisteína com diferentes catalisadores na geração de vapor frio de Hg

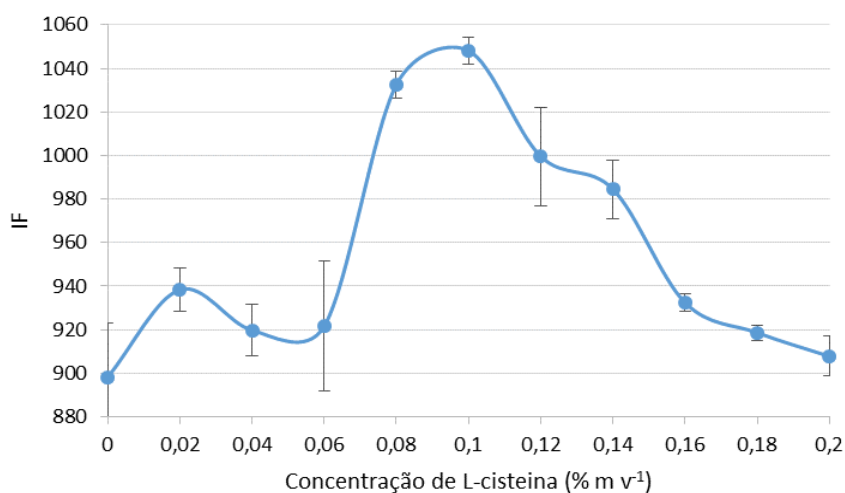


O gráfico apresenta cenários distintos, onde o sistema L-cisteína com cobalto II tiveram um efeito mais significativo na intensidade do sinal de Hg. A partir disso, como

no caso do Cd, o sistema Cis-Co(II) foi definido para um estudo univariado mais aprofundado, no intuito de se obter uma maior sensibilidade para o método.

Com isso, foi realizado um estudo univariado com o objetivo de avaliar mais profundamente a influência da concentração de L-cisteína na presença do íon Co(II). A partir disso, a concentração de L-cisteína foi variada de 0 a 0,2% (m v^{-1}) e a concentração de Co(II) fixada em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de Hg foi fixada em 100 ng L^{-1}

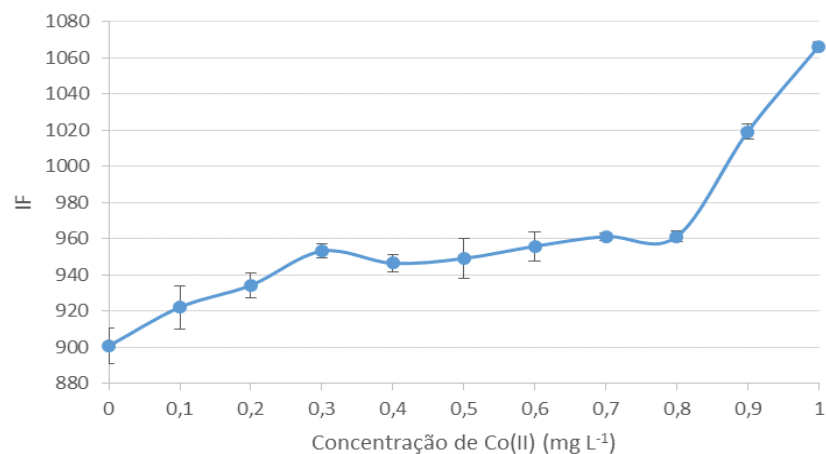
Figura 23 - Estudo do efeito da concentração de L-cisteína na geração de vapor frio de Hg, na presença de Co(II) como catalisador



A partir dos resultados obtidos para esse estudo, com a variação de L-cisteína mostraram que para as condições otimizadas de geração de vapor frio de Hg, a concentração com maior eficiência foi de 0,10% (m v^{-1}).

Para completar o estudo, foi avaliada a concentração de Co(II), Figura 22, que variou de 0 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e a concentração de L-cisteína fixada em 0,10% (m v^{-1}). Esse valor foi estabelecido como máximo devido a formação de precipitados finos, quando em concentrações acima de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, que podem influenciar suprimindo o sinal analítico na detecção do Hg.

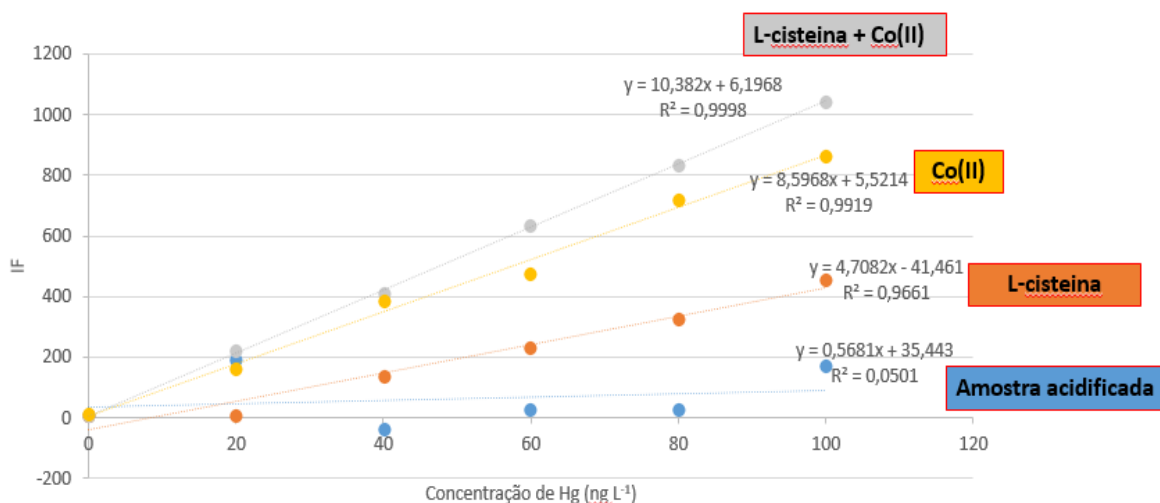
Figura 24 - Gráfico de estudo da concentração de Co(II) no enriquecimento de sinal de Hg



A partir desse estudo e análise dos resultados, verificou-se que a concentração de Co(II) que obteve melhor resposta foi de 1,0 mg L⁻¹. Com esse resultado, foram definidas as melhores condições para geração química de vapor de Hg.

Após encontrar as condições ótimas para ter uma maior eficiência na geração do vapor frio de Hg, foi aplicado um estudo comparativo para avaliar a real influência da L-cisteína e do cobalto na intensidade do sinal analítico. Curvas com concentração de Hg variando de 0 a 100 ng L⁻¹. Alterando apenas as condições do sistema. As curvas são apresentadas na Figura 25.

Figura 25 - Gráfico de efeito da L-cisteína e do Cobalto II no enriquecimento do sinal de Hg na geração de vapor frio



Semelhante ao comportamento do cádmio, o gráfico comparativo das curvas de mercúrio em diferentes condições, mostra o efeito significativo na ascensão da sensibilidade, quando há a combinação da cis-Co(II)(CHEN et al., 2015). As curvas obtidas apenas com adição de Co(II) e apenas L-cisteína apresentaram boa correlação e boa sensibilidade, principalmente em relação a curva sem adições.

Essa avaliação torna evidente os benefícios da L-cisteína e do Co(II) na geração de vapor frio de Hg e Cd quando se trabalha na faixa de concentração de 0 a 100 ng L⁻¹ e quando se aplica metodologia de otimização multivariada para as condições de geração química de vapor.

7.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO PROPOSTO

Após as etapas de otimização das condições de geração de vapor frio de Cd e Hg, houve a necessidade de verificar a eficiência do método por meio da dos parâmetros analíticos.

7.4.1 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Para a seleção de um método para análise de quantidades traços e ultratraços é importante avaliar os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), que são fatores críticos do método.

O limite de detecção pode ser definido como a concentração que dá um sinal instrumental significativamente diferente do sinal do branco (MILLER, 2010). Outra definição, segundo a ANVISA (2010), diz que o LD é a menor quantidade que pode ser detectada de um analito em uma amostra. Entretanto, mantendo as mesmas condições de realização do experimento, não quer dizer que possa ser quantificado. Para métodos instrumentais, o LD pode ser estimado pela relação de três vezes o desvio padrão dos brancos dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (Equação 2).

$$LD = 3 \times \frac{s}{b} \quad (2)$$

Onde, s é o desvio padrão relacionado aos sinais dos brancos analíticos e b é o coeficiente angular da curva de calibração (inclinação da reta).

Para determinar o limite de detecção do método proposto, foram realizadas medidas de 10 brancos analíticos. Desse modo, foram estabelecidos os valores de LD para Cd e Hg de 0,16 ng L⁻¹ e 0,20 ng L⁻¹, respectivamente.

O limite de quantificação está relacionado com a menor quantidade do analito que o método é capaz de quantificar. A equação para calcular o LQ é: o produto de 10 vezes o desvio padrão do branco analítico, representado pela letra s , dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração, representado pela letra b (Equação 3).

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (3)$$

Os LQ estabelecidos para esse método foram de 0,53 ng L⁻¹ e 0,66 ng L⁻¹ para Cd e Hg, respectivamente. Os valores dos termos *s* e *b* foram os mesmos aplicados para determinação do LD.

Outra maneira de calcular o LD e LQ, é considerando os parâmetros da curva analítica. Esses parâmetros trazem mais confiabilidade estatística, pois considera o intervalo de confiança de regressão. Nesse caso, é definida como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada usando-se um nível de confiança de 95% (RIBEIRO et al., 2008). Para esses cálculos, foram utilizadas as planilhas de excel com as equações definidas e geradas por Ferreira (2008). Os limites de detecção para o método de determinação de Cd e Hg foram 7,1 ng L⁻¹ e 2,7 ng L⁻¹, respectivamente. Por outro lado, os limites de quantificação foram 10,4 ng L⁻¹ e 4,0 ng L⁻¹ para Cd e Hg.

7.5.2 SENSIBILIDADE

A sensibilidade, segundo o INMETRO (2007), é o parâmetro que relaciona a razão entre variação da resposta analítica com a concentração do analito. Esse parâmetro pode ser observado de duas maneiras.

A primeira é a sensibilidade de calibração, que é calculada pela inclinação da curva de calibração (coeficiente angular da reta), utilizando a Equação 4. É uma medida limitada pela inclinação da curva de calibração e a precisão.

$$m = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (4)$$

Onde: ΔY é a variação da resposta analítica e ΔX é a variação da concentração.

A outra maneira é a sensibilidade analítica, que é estabelecida pela razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do sinal analítico, Equação 5. É uma característica que considera o ruído presente nas respostas.

$$\gamma = \frac{m}{S_s} \quad (5)$$

Onde: m é a inclinação da curva analítica e S_s é o desvio padrão do sinal analítico.

A sensibilidade, em termos da inclinação da curva de calibração, obtida por este método para Cd foi $(22,78 \pm 1,31) \text{ L ng}^{-1}$ e para Hg foi $(10,38 \pm 0,22) \text{ L ng}^{-1}$. Já a sensibilidade analítica é 17,39 e 47,18 L ng^{-1} para Cd e Hg, respectivamente.

7.5.3 LINEARIDADE E FAIXA DINÂMICA LINEAR

A linearidade está associada a correlação linear que o método é capaz de gerar quando relaciona as concentrações do analito em uma faixa de averiguação específica. Essa correlação linear pode ser observada analisando o coeficiente de correlação de Pearson (r), que quanto mais próximo de 1, menor o erro existente devido a dispersão entre os pontos estudados (GUILHEN et al., 2010). Outro fator para inferir a linearidade é o coeficiente de determinação, R^2 . Neste trabalho, as curvas analíticas apresentaram valores de R^2 de 0,9983 e 0,9998 para cádmio e mercúrio, respectivamente.

A faixa dinâmica linear para este trabalho foi avaliada através da curva analítica, sendo que essa faixa compreende o intervalo de concentração no qual as curvas analíticas mantem-se lineares (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Essa faixa tem como mínimo o limite de quantificação e máximo a concentração em que a linearidade é mantida. Para o cádmio, a curva analítica foi linear até a concentração de 180 ng L^{-1} , enquanto que, para mercúrio, a curva analítica manteve a linearidade até 100 ng L^{-1} , como pode ser observado nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 - Avaliação da linearidade para Cd.

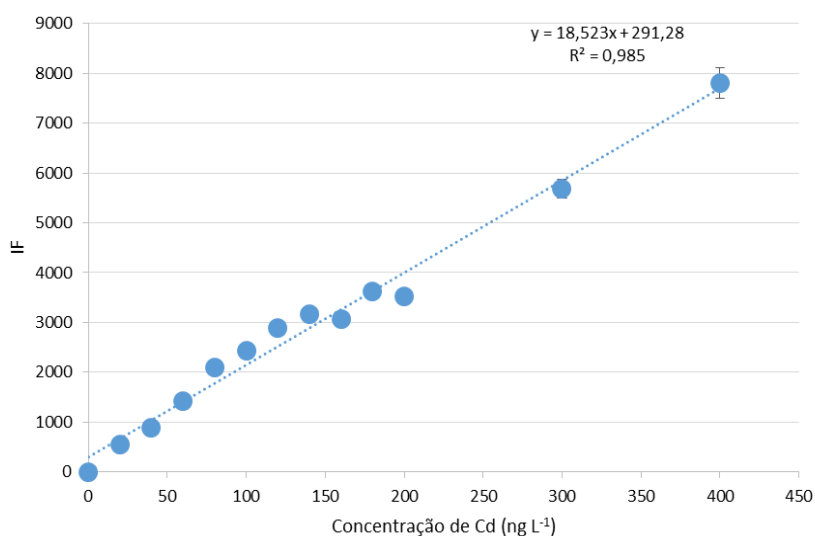
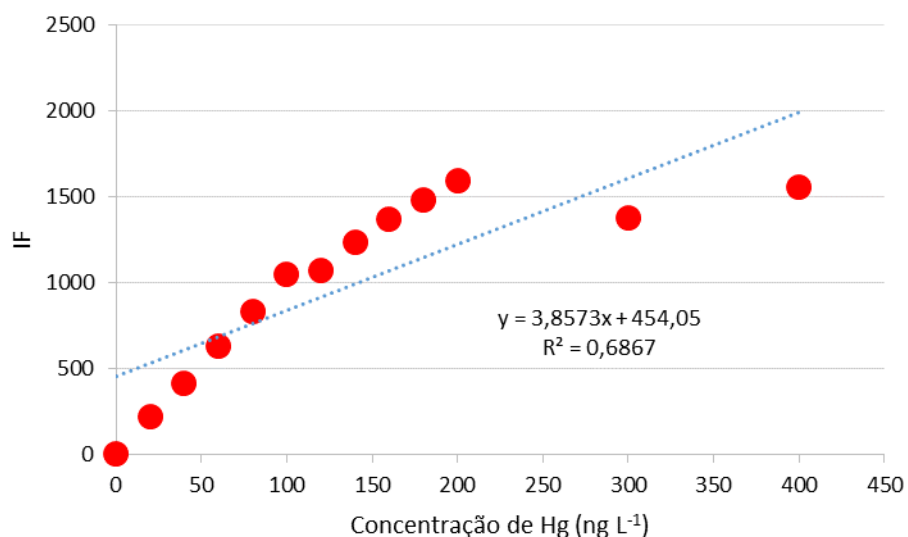


Figura 27 - Avaliação da linearidade para Hg



7.5.4 PRECISÃO

A precisão avalia o grau de dispersão existente entre experimentos independentes, sendo essa dispersão proveniente de réplicas de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de padrões em condições definidas (INMETRO, 2007).

Uma das maneiras de expressar a precisão é através do desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação). O desvio padrão relativo (RSD) é calculado dividindo o desvio

padrão da média de uma mesma concentração pelo valor da média da concentração determinada, de acordo a Equação 6. O RSD geralmente é expresso em porcentagem. Para isso, a razão entre desvio padrão e média é multiplicada por 100.

$$RSD \% = 100. \left(\frac{s}{X_m} \right) \quad (6)$$

Onde: s = desvio padrão da média

X_m = valor da média

A precisão pode sofrer variação quando se altera os níveis da concentração avaliada, quando as réplicas são realizadas em diferentes laboratórios ou no mesmo laboratório. A avaliação da precisão pode ser realizada pela repetitividade e pela reprodutibilidade. A precisão relacionada a concordância entre os réplicas intra-ensaios, avalia a repetitividade. Quando se avalia a concordância de resultados individuais inter-ensaios, avalia-se a reprodutibilidade.

Dessa maneira, a precisão foi estabelecida por meio do cálculo do desvio padrão relativo dos resultados gerados da medida de sete padrões aquosos de diferentes concentrações de cádmio e mercúrio. As concentrações utilizadas e os %RSD respectivos encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de RSD % obtidos a partir de sete medidas de padrões de Cd e Hg de diferentes concentrações

Analito	Concentração (ng L⁻¹)	RSD (%)
Cd	20,0	0,97
	40,0	1,33
	60,0	3,34
Hg	20,0	0,91
	40,0	1,81
	60,0	0,44

A precisão do método também foi avaliada pelo material de referência certificado de

água residuais (ERM CA-713). A precisão em termos de RSD, trabalhando em quadruplicata, foi equivalente a 4,34% para Cd, a uma concentração de 5,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, e 3,39% para concentração de Hg de 1,86 $\mu\text{g L}^{-1}$.

7.5.5 EXATIDÃO

Para verificar o quanto o valor obtido nos experimentos está próximo do valor real, é necessário estudar a exatidão do método. A exatidão pode ser conceituada como a diferença entre do valor obtido experimentalmente e o valor real do analito em uma determinada matriz (MILLER e MILLER, 2010).

A exatidão do método proposto para determinação de Cd e Hg empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio foi estudada, aplicando mediante análises de materiais de referência certificado (CRM).

Foram utilizados, na avaliação da exatidão do método, material de referência certificado (CRM) de água de resíduo (ERM CA-713), solo de San Joaquin (SRM 2709a), tecido de ostra (NIST 1566b) e folha de espinafre (NIST 1570a). Os resultados obtidos e os valores certificados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados obtidos da análise de materiais de referência certificados para avaliação da exatidão do método

CRM	Analito	Valor certificado	Valor obtido	Teste t calculado
ERM Ca713 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd	5,09 \pm 0,20	5,06 \pm 0,32	0,20 (N = 4)
	Hg	1,84 \pm 0,11	1,86 \pm 0,45	0,074
SRM 2709a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd	0,37 \pm 0,02	0,34 \pm 0,08	0,74 (N=4)
	Hg	0,90 \pm 0,20	0,93 \pm 0,11	0,61
NIST 1566b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd	2,48 \pm 0,08	2,43 \pm 0,52	0,30 (N=3)
	Hg	0,0371 \pm 0,0013	0,0372 \pm 0,0013	0,1154
NIST 1570a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd	2,88 \pm 0,06	3,17 \pm 0,02	2,53 (N=3)
	Hg	0,0297 \pm 0,0021	0,0339 \pm 0,0034	2,47

Fonte: certificação de cada material citado na tabela.

Para analisar se há diferenças significativas entre os resultados obtidos e os valores certificados, após a aplicação do método proposto, foi realizado um teste de comparação de médias para um intervalo de confiança de 95%. O teste estatístico aplicado foi o teste t (Equação 7)

$$|t| = |(x - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s}| \quad (7)$$

Onde: x é a média dos valores experimentais, μ é o valor real, n é o número de réplicas e s corresponde ao desvio padrão das médias.

Só existirá diferença significativa entre os valores experimentais e os valores de referência (certificados) se o t calculado for maior que o t tabelado para o grau de liberdade correspondente. O que não ocorreu para nenhuma das amostras estudadas, indicando, dessa forma, que não há diferença significativa entre os valores obtidos experimentalmente e os valores de referência, o que confere por sua vez exatidão ao método. Ademais, é possível demonstrar a eficiência dos métodos desenvolvidos em trabalhar com vários tipos de amostras para determinação de Cd e Hg em concentrações traço e ultratraço.

A avaliação da exatidão do método utilizando CRMs (água de resíduo, sedimento, tecido de ostra e folha de espinafre) permitiu inferir que não ocorre interferência de alguns elementos na determinação de cádmio e mercúrio quando estão nas concentrações listadas na Tabela 19. Foram destacados os elementos que podem interferir na geração química de vapor e espécies que poderiam reagir formando hidretos.

Tabela 19 – Concentração de alguns elementos contidos nos materiais de referência certificados

Elemento	ERM Ca713	SRM 2709a	CRM 1570a	NIST 1566b
Na	-	1,25 %	1,844 %	0,3350 %
Ni	50,3 µg L ⁻¹	87 mg Kg ⁻¹	2,2 mg Kg ⁻¹	1,13 mg Kg ⁻¹
Mn	95 µg L ⁻¹	547 mg Kg ⁻¹	77,2 mg Kg ⁻¹	18,7 mg Kg ⁻¹
Fe	445 µg L ⁻¹	3,43 %	-	212,6 mg Kg ⁻¹
Co	-	13,0 mg Kg ⁻¹	0,423 mg Kg ⁻¹	-
Cu	101 µg L ⁻¹	34,4 mg Kg ⁻¹	13,08 mg Kg ⁻¹	73,2 mg Kg ⁻¹
Pb	-	17,4 mg Kg ⁻¹	-	0,317 mg Kg ⁻¹
Se	4,9 µg L ⁻¹	1,5 mg Kg ⁻¹	0,1195 mg Kg ⁻¹	2,21 mg Kg ⁻¹
As	10,8 µg L ⁻¹	10,8 mg Kg ⁻¹	0,080 mg Kg ⁻¹	8,30 mg Kg ⁻¹
Zn	78 µg L ⁻¹	107 mg Kg ⁻¹	86,2 mg Kg ⁻¹	1470 mg Kg ⁻¹

Por meio do teste de adição e recuperação, também foi possível avaliar a exatidão dos métodos propostos.

O teste foi realizado em amostras de água do mar diluídas com água ultrapura na proporção 1:10 (proporção escolhida após testes preliminares), no intuito de avaliar a recuperação das espécies de Cd(II) e Hg(II). A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos no teste de adição e recuperação.

Tabela 20 - Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação de Cd em amostras de água do mar

Amostra	Concentração adicionada (Cd) (ng L ⁻¹)	Valor encontrado (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)
SWC	0	23,8 ± 0,1	-
	20	46,1 ± 0,5	111
	60	81,9 ± 0,1	97
SWI	0	17,8 ± 0,0	-
	20	40,6 ± 1,7	114
	60	80,2 ± 0,3	104
SWR	0	18,3 ± 0,1	-
	20	34,8 ± 1,2	83
	60	76,2 ± 0,4	96

Todos os valores de recuperação obtidos para Cd form na faixa de 83% a 114%.

Os valores de adição e recuperação de Hg estão registrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação de Hg em amostras de água do mar

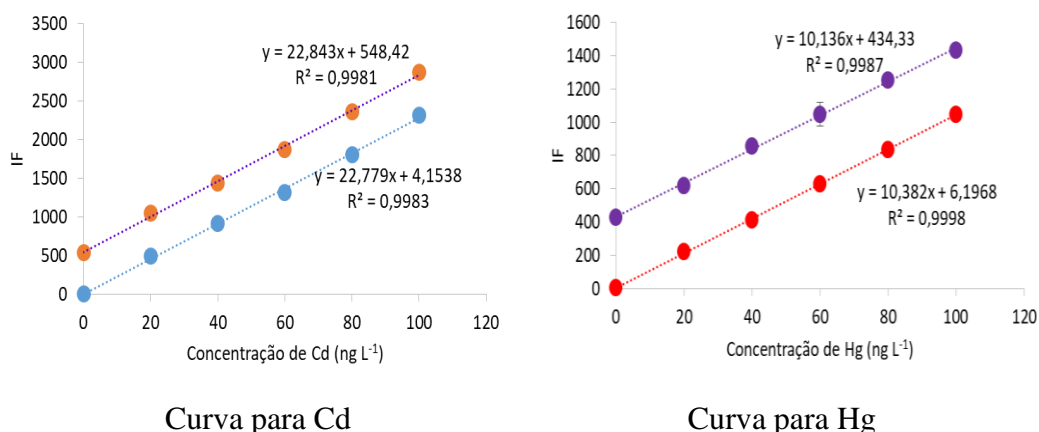
Amostra	Concentração adicionada (Hg) (ng L⁻¹)	Valor encontrado (ng L⁻¹)	Recuperação (%)
SWC	0	41,9 ± 1,3	-
	20	59,3 ± 1,6	92
	60	109,9 ± 0,2	100
SWI	0	0,1 ± 0,0	-
	20	19,4 ± 0,6	97
	60	55,7 ± 0,7	93
SWR	0	0,04 ± 0,02	-
	20	19,5 ± 0,7	98
	60	61,2 ± 0,9	102

Para Hg, os valores ficaram na faixa de recuperação de 92% a 102%.

7.5.6 ESTUDO DA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO

As recuperações de Cd e Hg validaram que o método proposto não sofre interferência da matriz água do mar. Os gráficos abaixo relacionam as curvas direta (padrão aquoso) com a curva na matriz água do mar, com o intuito de averiguar se há interferência quando trabalha-se em toda a extensão da faixa de trabalho. Para isso, foi realizada uma comparação entre as inclinações de curvas analíticas usando a técnica de calibração externa com padrões aquosos e a técnica de adição de analito na amostra.

Figura 28 - Gráfico comparando as curvas analíticas obtidas usando a técnica de calibração externa e adição de analito na amostra, para Cd e Hg



A análise e comparação entre as curvas apresentadas na Figura 26 confirmaram que a água do mar não apresenta efeito de matriz na determinação de Cd e Hg por CV AFS quando se trabalha na razão amostra/solução 1/10. Na Tabela 22, são apresentados os valores do coeficiente angular das retas com seus respectivos intervalos de confiança. Não há diferenças significativas entre as inclinações demonstrando que a determinação pode ser feita empregando-se a técnica de calibração externa com padrões aquosos.

Tabela 22 - Comparação dos valores do coeficiente angular das curvas diretas e na amostra de água do mar para Cd e Hg

Analito	Inclinação da curva analítica (L ng ⁻¹)	
	Padrão aquoso	Água do mar
Cd	22,78 ± 1,31	22,84 ± 1,37
Hg	10,38 ± 0,22	10,14 ± 0,51

7.5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR

O método proposto foi aplicado para a determinação de Cd e Hg em amostras de água do mar, as quais foram coletadas na orla de Salvador e Ilha de Itaparica. As amostras foram codificadas e analisadas. A seguir, são apresentados os resultados da análise de onze amostras de água do mar (Tabela 23).

Tabela 23 - Concentração de Cd e Hg em amostras de água do mar (n = 3)

Amostra	Concentração de Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração de Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SWC	0,238 \pm 0,095	0,447 \pm 0,013
SWI	0,178 \pm 0,010	0,090 \pm 0,004
SWR	0,113 \pm 0,085	0,041 \pm 0,023
SWGB	0,14 \pm 0,01	0,65 \pm 0,11
SWB	0,26 \pm 0,02	0,07 \pm 0,11
SWO	0,40 \pm 0,02	<LD
SWRV	0,23 \pm 0,03	0,17 \pm 0,04
SWA	0,32 \pm 0,04	0,52 \pm 0,13
SWPT	0,16 \pm 0,02	0,47 \pm 0,03
SWAR	0,29 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04
SWPÇ	0,23 \pm 0,03	0,50 \pm 0,01

As concentrações de Cd nas amostras variaram entre 0,11 a 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valor média de 0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essas concentrações estão abaixo do limite máximo de tolerância permitido para águas salinas de classe II (40 $\mu\text{g L}^{-1}$), definido pela resolução 357/2005 do CONAMA. Para Hg, as concentrações variaram entre 0,04 a 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando como valor médio a concentração de 0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos valores encontram-se abaixo dos limites máximos toleráveis (1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$) pela resolução 357/2005 do CONAMA. O trabalho reportado na literatura de Pinheiro et al. (2018) encontrou em matrizes salinas, na Praia de Caraguatatuba (Estado de São Paulo, Brazil) concentrações de 0,50 e 0,64 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e Hg. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os dados reportados na literatura.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos analíticos propostos e desenvolvidos para determinação de Cd e Hg em amostras de água do mar empregando CV AFS, apresentaram-se como uma estratégia eficaz para a determinação desses analitos em amostras diluídas na razão de 1:10. Apresentaram excelentes níveis de LD e LQ, adequados às baixas concentrações dos analitos normalmente existentes nas amostras, além de precisão e exatidão satisfatórios, quando aplicado a quatro CRMs de diferentes matrizes.

As ferramentas quimiométricas, planejamento fatorial completo de dois níveis e metodologia de superfície de resposta (Box-Behnken), foram eficientes no estudo e otimização das condições de geração do vapor frio para quantificação de Cd e Hg empregando CV AFS.

Os estudos univariados para enriquecimento do sinal analítico e melhora da eficiência da geração química de vapor, envolvendo L-cisteína e Co(II), foi de extrema importância para melhora da sensibilidade das estratégias desenvolvidos.

A exatidão do método foi avaliada mediante análise de materiais de referência certificado ERM CA713 (água de resíduo), SRM 2709a (solo de San Joaquin), NIST 1566b (tecido de ostra) e CRM 1570a (folha de espinafre), o que confirmou a eficiência da geração de vapor e da utilização de agentes mascarantes/quelantes e catalisador para determinação de Cd e Hg.

As concentrações de Cd e Hg nas amostras de água do mar estão concordantes com os dados reportados na literatura e abaixo dos limites de máximos permitidos pela resolução do CONAMA 357/2005 ($\text{Cd} = 40 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{Hg} = 1,8 \mu\text{g L}^{-1}$) para águas salinas classe II.

9. REFERÊNCIAS

ALEX VIRGILIO, DANIELA SCHIAVO, J. A. N. AND G. L. D. Evaluation of standard dilution analysis (SDA) of beverages and foodstuffs by ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1216, 2016.

ANVISA. Nota técnica nº 8/2019/sei/geare/ggali/dire2/anvisa. v. 53, n. 25351.918291/2019-53, p. 1-14, 2019.

AQU, COMUNIDADES, AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUA; CETESB; **Guia Nacional De Coleta E Preservação De Amostras**, p. 325, 2011.

ARSLAN, Z.; YILMAZ, V.; ROSE, L. K. Efficient generation of volatile cadmium species using Ti(III) and Ti(IV) and application to determination of cadmium by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). **Microchemical Journal**, v. 123, p. 170-178, 2015.

ASTOLFI, M. L. et al. Simple and rapid method for the determination of mercury in human hair by cold vapour generation atomic fluorescence spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 150, n. 104186, p. 1-10, 2019.

BAX, D. et al. The mechanism of transition metal interference in hydride generation atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 43, n. 9-11, p. 1349-1354, 1988.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

CADORIM, H. R. et al. Effective and High-Throughput Analytical Methodology for the Determination of Lead and Cadmium in Water Samples by Disposable Pipette Extraction Coupled with High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS GF AAS). **Analytical Letters**, v. 52, n. 13, p. 2133-2149, 2019.

CAI, Y. Atomic Fluorescence in Environmental Analysis. p. 2270-2292, 2000.

CAROLIN, C. F. et al. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.

5, n. 3, p. 2782–2799, 2017.

CHEN, W. N. et al. Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace Ge, As, Cd, Sb, Hg and Bi in cosmetic lotions. **Analytica Chimica Acta**, v. 860, p. 8–14, 2015.

CONAMA, C. N. D. M. A.-. RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005
Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. 2011.

D'ULIVO, A. Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 360–375, 2010.

D'ULIVO, A. Mechanisms of chemical vapor generation by aqueous tetrahydridoborate. Recent developments toward the definition of a more general reaction model. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 119, p. 91–107, 2016.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1. ed. SALVADOR-BAHIA: VENTO LESTE, 2015.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

FILHO, E. R. P. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. 1. ed. São Carlos, p. 88, 2015.

FRANCISCO, J. E.; FEITEIRA, F. N. Synthesis and application of ion-imprinted polymer for the determination of mercury II in water samples. p. 19588–19597, 2019.

GUERRERO, M. M. L. et al. Simultaneous determination of chemical vapour generation forming elements (As, Bi, Sb, Se, Sn, Cd, Pt, Pd, Hg) and non-chemical vapour forming elements (Cu, Cr, Mn, Zn, Co) by ICP-OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 2016.

GUO, X.; GUO, X. Determination of Cadmium at Ultratrace Levels by Cold Vapour

Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, n. November, p. 987–991, 1995a.

GUO, X.; GUO, X. Studies on the reaction between cadmium and potassium tetrahydroborate in aqueous solution and its application in atomic fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 310, n. 2, p. 377–385, 1995b.

HOSSNY, E. et al. Environmental exposure of the pediatric age groups in Cairo City and its suburbs to cadmium pollution. **Science of the Total Environment**, v. 273, n. 1–3, p. 135–146, 2001.

JIA, X. et al. Zwitterion-functionalized polymer microspheres-based solid phase extraction method on-line combined with HPLC – ICP-MS for mercury speciation. **Talanta**, v. 196, n. December 2018, p. 592–599, 2019.

JURADO-GONZÁLEZ, J. A.; GALINDO-RIAÑO, M. D.; GARCÍA-VARGAS, M. Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, n. 2, p. 229–241, 2003.

KALLITHRAKAS-KONTOS, N.; FOTEINIS, S. Recent Advances in the Analysis of Mercury in Water - Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 22–36, 2015.

KOJU, N. K. et al. Cadmium removal from simulated groundwater using alumina nanoparticles: behaviors and mechanisms. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 255–266, 2018.

KUMAR, A. R.; RIYAZUDDIN, P. Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 166–176, 2010.

LEI, Z. et al. Non-aqueous phase cold vapor generation and determination of trace cadmium by atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 203, p. 522–527, 2018.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n.

2, p. 127–138, 2010.

LIMA, D. P. DE et al. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé , Estado do Amapá , Brasil. v. 45, n. 4, p. 405–414, 2015.

LINS, S. et al. On-line solid phase extraction system using an ion imprinted polymer based on dithizone chelating for selective preconcentration and determination of mercury (II) in natural waters by CV AFS. **Microchemical Journal**, v. 150, n. July, p. 104075, 2019.

LUCENIR, I.; ALMEIDA, S.; MELO, M. Direct Determination of Inorganic Mercury in Ethanol Fuel by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. **energy & fuels**, 2012.

MARTIN, F. M.; DONARD, O. F. X. Interference mechanisms and reduction during the speciation of organotin compounds by hydride generation, cryoseparation and detection by atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 9, n. 10, p. 1143–1151, 1994.

NETO, B. B.; SCAMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. PORTO ALEGRE: BOOKMAN, 2010.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

PANIZ, F. P. et al. Effective procedures for the determination of As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Th, Zn, U and rare earth elements in plants and foodstuffs. **Analytical Methods**, v. 10, n. 33, p. 4094–4103, 2018.

PINHEIRO, F. C. et al. Fit-for-purpose ICP-MS procedure supporting brazilian regulations on inorganic constituents in fresh and saline waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 7, p. 1570–1578, 2018.

RAO, K. et al. Review on cadmium removal from aqueous solutions. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 2, n. 7, p. 81–103, 2011.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha De Validação: Uma Nova Ferramenta Para Estimar Figuras De Mérito Na Validação De Métodos Analíticos Univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

SÁNCHEZ-RODAS, D. et al. Atomic Fluorescence Spectrometry: A suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 933–946, 2010.

SANFELIU, C. et al. Neurotoxicity of organomercurial compounds. **Neurotoxicity Research**, v. 5, n. 4, p. 283–305, 2003.

SERKAN S, AHAN, U. S. AHIN. An automated on-line minicolumn preconcentration cold vapour atomic absorption spectrometer : Application to determination of cadmium in water samples. v. 88, p. 701–706, 2012.

SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: An overview. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 246–253, 2011.

SKOOG, D. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2002.

SUN, R. et al. Determination of cadmium in seawater by chelate vapor generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 141, p. 22–27, 2018.

SYCHRA, V.; SVOBODA, V.; RUBESKA, I. **atomic fluorescence spectroscopy**. 1. ed. [s.l.] Van Nostrand Reinhold Company LTD, 1975.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; DOS SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; DA SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Review article – Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58–67, 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

WANG, B. et al. Direct determination of trace mercury and cadmium in food by sequential electrothermal vaporization atomic fluorescence spectrometry using tungsten

and gold coil traps. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 7, p. 1209–1216, 2018.

WANG, J. et al. Study on the Pollution Characteristics of Heavy Metals in Seawater of Jinzhou Bay. **Procedia Environmental Sciences**, v. 13, n. 2011, p. 1507–1516, 2012.

WEBB, J. et al. Mercury Contamination in an Indicator Fish Species from Andean Amazonian Rivers Affected by Petroleum Extraction. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2015.

WU, H. et al. Flow injection on-line preconcentration coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for ultra-trace amounts of cadmium determination in seawater. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 1–2, p. 173–178, 2008.

YANG, X. AN et al. Efficient generation of volatile species for cadmium analysis in seafood and rice samples by a modified chemical vapor generation system coupled with atomic fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 869, p. 11–20, 2015.

YUAN, Y. et al. Bioaccumulation and health risk assessment of heavy metals to bivalve species in Daya Bay (South China Sea): Consumption advisory. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, n. October 2019, p. 110717, 2020.

ZANG, Y.; BOLGER, P. M. Toxic Metals: Cadmium. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 2, p. 346–348, 2014.

ZHENG, C. et al. UV photochemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 1, p. 32–37, 2010.

ZHENG, N. et al. The Toxicological Effects of Mercury Exposure in Marine Fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 5, p. 714–720, 2019.

ZWOLAK, I. The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 1, p. 44–63, 2020.