

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Determinação sequencial rápida de As e Sb, Bi e Pb por
espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos**

Érica Ferreira Batista*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*bolsista CNPq

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B333ds

Batista, Érica Ferreira.

Determinação sequencial rápida de As e Sb, Bi e Pb por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos / Érica Ferreira Batista. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

116 f.

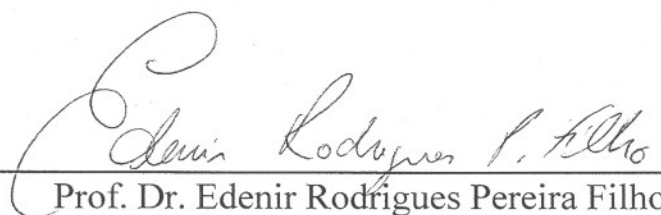
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

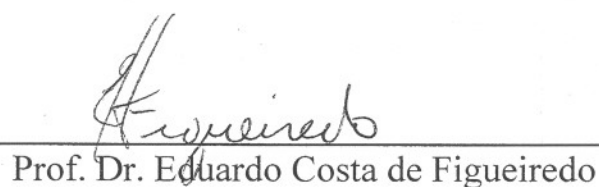
1. Química analítica. 2. Espectrometria de absorção atômica. 3. Geração de hidretos. 4. Determinação sequencial rápida. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Érica Ferreira Batista**, realizada em 22 de março de 2012:*


Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho


Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo


Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

**"Porque o Senhor dá a
sabedoria, e da sua boca
vem a inteligência e o
entendimento."
Provérbios 2:6**

**Aos meus amados pais
Eliseu e Mara pelos
ensinamentos, amor e
por sempre estarem
presentes me apoiando e
a minha irmã Érima, pelo
amor e amizade.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder graça, força e sabedoria para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela orientação e amizade.

À Prof. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira e ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pelos ensinamentos concedidos nas reuniões de grupo.

A todos os companheiros de trabalho, amigos do GAIA e as “alunas do Edenir”: Poliana, Amanda, Natália, Luciana e Paula pela ótima convivência.

A Amália pela amizade, pelo apoio e ajuda na realização do trabalho.

Ao professor Pedro Fadini (UFSCar) por conceder as amostras de água do rio Tietê e a Luciana Fontes de Oliveira por conceder as amostras de água do mar – Praia Grande – Ubatuba.

Aos meus amigos Nízia e Gabriel pelos bons momentos de risadas e descontração que passamos juntos e a Dani pela amizade e por tornar minhas viagens para Limeira mais fáceis e agradáveis.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo concedida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito Obrigada.

LISTA DE ACRÔNIMOS

ANOVA	Análise de Variância, do inglês, <i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CF-HGAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos com fluxo contínuo, do inglês, <i>Continuous Flow Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM	Material de referência certificado, do inglês, <i>Certified Reference Material</i>
DMA	Ácido dimetilarsínico
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FFAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama com forno, do inglês, <i>Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
FS FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama sequencial rápida, do inglês, <i>Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, do inglês, <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GLS	Separador gás – líquido, do inglês, <i>Gas–Liquid Separator</i>
HCL	Lâmpada de catodo oco, do inglês, <i>Hollow Cathod Lamps</i>
HGAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês, <i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>
HHPN	Nebulização hidráulica sob alta pressão, do inglês, <i>Hydraulic High-Pressure Nebulization</i>

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i>
IUPAC	União internacional da Química Pura e Aplicada, do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MIBK	Metil-isobutil-cetona
MMA	Ácido monometilarsônico
PFA	Perfluoroalcoialcanos
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>
STAT	Tubo de aprisionamento de átomos, do inglês, <i>Slotted Tube Atom Trap</i>
TS-FF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico, do inglês, <i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
USN	Nebulização ultrassônica, do inglês, <i>Ultrasonic Nebulization</i>
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, do inglês, <i>United States Environmental Protection Agency</i>
XAD-DHB	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
WHO	Organização mundial da saúde, do inglês, <i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Valores máximos de As, Sb e Pb estabelecidos pelo CONAMA em águas doces e salinas.....	27
TABELA 3.2	Valores máximos de As, Sb e Pb estabelecidos pela USEPA em água potável.....	28
TABELA 3.3	Limites máximos de As e Pb em alimentos, estabelecidos pela ANVISA.....	29
TABELA 5.1	Programa de aquecimento utilizado no forno de radiação micro-ondas (Milestone ETHOS 1600) com frascos fechados de PFA.....	36
TABELA 5.2	Parâmetros físicos utilizados para determinação de As e Sb por CF-HGAAS.....	38
TABELA 5.3	Planejamento Doehlert para otimização dos parâmetros químicos na determinação sequencial de As e Sb.....	39
TABELA 5.4	Planejamento Doehlert para otimização dos parâmetros químicos na determinação sequencial de Bi e Pb.....	42
TABELA 5.5	Condições utilizadas no teste da vazão do gás carregador.....	43
TABELA 5.6	Condições utilizadas no teste da vazão das soluções.....	44
TABELA 6.1	Tabela de análise de variância (ANOVA) para As.....	49
TABELA 6.2	Tabela de análise de variância (ANOVA) para Sb.....	49
TABELA 6.3	Valores de F calculados e tabelados para As e Sb.....	50
TABELA 6.4	Tabela de análise de variância (ANOVA) para As, considerando os coeficientes significativos.....	53
TABELA 6.5	Tabela de análise de variância (ANOVA) para Sb, considerando os coeficientes significativos.....	53
TABELA 6.6	Valores de F calculados e tabelados para As e Sb, considerando somente os coeficientes significativos.....	54
TABELA 6.7	Condições otimizadas utilizadas no método de determinação sequencial de As e Sb.....	57
TABELA 6.8	Resultados da influência dos possíveis interferentes no sinal analítico do As e Sb.....	58

TABELA 6.9	Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de As e Sb, após a otimização do método.....	62
TABELA 6.10	Determinação de As e Sb em dois diferentes materiais de referência certificados empregando o método proposto.....	63
TABELA 6.11	Concentrações de As e Sb encontrados nas amostras.....	64
TABELA 6.12	Condições iniciais dos parâmetros físicos utilizadas para determinação de Bi e Pb por CF-HGAAS.....	67
TABELA 6.13	Tabela de análise de variância (ANOVA) para Bi.....	67
TABELA 6.14	Tabela de análise de variância (ANOVA) para Pb.....	68
TABELA 6.15	Valores de F calculados e tabelados para Bi e Pb.....	68
TABELA 6.16	Condições utilizadas no método de determinação sequencial de Bi e Pb.....	70
TABELA 6.17	Resultados da influência dos possíveis interferentes no sinal analítico do Bi e Pb.....	73
TABELA 6.18	Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de Bi e Pb, após a otimização do método.....	77
TABELA 6.19	Determinação de Bi e Pb em dois diferentes materiais de referência certificados empregando o método proposto.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Reator separador gás-líquido utilizado no sistema automatizado de geração de hidretos.....	16
FIGURA 3.2	Diagrama esquemático do reator separador gás-líquido utilizado no sistema para a geração de hidreto. A: Bloco central; B: Tampa superior; C: Tampa inferior; 1: Anel de borracha; 2: Vidro sinterizado; 3: Entrada da amostra; 4: Saída do gás; 5: Entrada do gás; 6: Resíduo.....	17
FIGURA 4.1	Configuração do sistema CF-HGAAS para a determinação sequencial de Bi, As e Sb e Pb. Para As e Sb: (a) NaBH ₄ , (b) HCl e (c) amostra. Para Bi e Pb: (a) NaBH ₄ , (b) K ₃ Fe(CN) ₆ e (c) amostra.....	33
FIGURA 5.1	Entradas utilizadas para a introdução do gás de arraste.....	43
FIGURA 6.1	Coeficientes obtidos para As.....	51
FIGURA 6.2	Coeficientes obtidos para Sb.....	52
FIGURA 6.3	Gráficos de contorno para os modelos de As (a - f) e Sb (g - l).....	55
FIGURA 6.4	Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o As.....	59
FIGURA 6.5	Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Sb.....	59
FIGURA 6.6	Influência da concentração de HNO ₃ na determinação de As e Sb.....	60
FIGURA 6.7	Curva de calibração para As, obtida nas condições otimizadas do método.....	61
FIGURA 6.8	Curva de calibração para Sb, obtida nas condições otimizadas do método.....	62
FIGURA 6.9	Perfil do sinal de Bi (linha preta) e Pb (linha cinza) para avaliação do tempo de estabilização.....	65
FIGURA 6.10	Valores de R.S.D. (%) obtidos para 10 medidas de uma solução contendo Bi e Pb (ambos 10 µg L ⁻¹) para avaliar o tempo de leitura.....	66

FIGURA 6.11	Coeficientes obtidos para Bi.....	69
FIGURA 6.12	Coeficientes obtidos para Pb.....	69
FIGURA 6.13	Efeito da vazão do gás de arraste (Ar) na eficiência da geração de hidretos para determinação de Bi e Pb (ambos 10 µg L ⁻¹).....	70
FIGURA 6.14	Efeito das vazões da amostra e dos reagentes na curva analítica para Bi.....	72
FIGURA 6.15	Efeito das vazões da amostra e dos reagentes na curva analítica para Pb.....	72
FIGURA 6.16	Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Bi.....	74
FIGURA 6.17	Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Pb.....	74
FIGURA 6.18	Influência da concentração de HNO ₃ na determinação de Bi e Pb.....	75
FIGURA 6.19	Curva de calibração para Bi, obtida nas condições otimizadas do método.....	76
FIGURA 6.20	Curva de calibração para Pb, obtida nas condições otimizadas do método.....	77

RESUMO

DETERMINAÇÃO SEQUENCIAL RÁPIDA DE As E Sb, Bi E Pb POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM GERAÇÃO DE HIDRETOS

Neste trabalho foram desenvolvidos dois sistemas, um para a determinação sequencial rápida de As e Sb, e outro para a determinação sequencial rápida de Bi e Pb utilizando a espectrometria de absorção atômica com chama com geração de hidretos. Na otimização do sistema para a determinação de As (193,7 nm) e Sb (217,6 nm) foram estudadas variáveis como: concentrações (em mol L⁻¹) de HCl da amostra e do carregador, concentrações (em % m v⁻¹) de KI e de NaBH₄. Para o sistema utilizado na determinação de Bi (223,1 nm) e Pb (217,0 nm) foram estudadas as variáveis: concentração (em mol L⁻¹) de HCl da amostra, concentrações (em % m v⁻¹) de K₃Fe(CN)₆ e do NaBH₄. Para esses estudos fez-se uso de um planejamento Doehlert, com o intuito de identificar os melhores parâmetros e extrair uma maior quantidade de informações dos métodos propostos. Alguns parâmetros analíticos foram obtidos, respectivamente para As, Sb, Bi e Pb: Limite de detecção (LD) (0,15; 0,16; 0,60 e 0,77 µg L⁻¹), repetibilidade (RSD) (1,5; 2,0; 5,9; 6,0 %) e coeficiente de regressão (r) (0,999; 0,999; 0,998 e 0,997). Com o intuito de identificar os interferentes em potencial na determinação dos analitos, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴ com os possíveis elementos interferentes encontrados em amostras de águas do rio e do mar e em ração de frango: Al(III), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), e Zn(II). Foi realizado também um estudo para averiguar a influência da concentração de HNO₃ nas determinações de As e Sb, Bi e Pb. Através dos estudos com possíveis interferentes, pôde-se observar que não houve nenhuma tendência significativa para As, Sb e Bi, sendo a porcentagem de interferência inferior a 21 % (contrastes de -4 a 5 %). No caso do Pb houve alteração no sinal causados pelo Co (II), Cu (II), Fe (III) e Ni (II) com contrastes de -62 % a 29 %. O efeito da concentração do HNO₃ não se mostrou relevante quando inferior a 10 % v v⁻¹ para As e Sb e 20 % v v⁻¹ para Bi. Entretanto, uma forte supressão no sinal analítico do Pb foi observada para concentrações de HNO₃ superiores a 0,25 % v v⁻¹. Os sistemas desenvolvidos foram aplicados na determinação de As e Sb, Bi e Pb em água do rio Tietê, água do mar da Praia Grande- Ubatuba, ração de frango e para validar os métodos foram utilizados dois materiais de referência certificados: Nist 1643e (Trace elements in water) e TMDW-HPS (Trace metals in drinking water).

ABSTRACT

FAST SEQUENTIAL DETERMINATION OF As AND Sb, Bi AND Pb BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY WITH HYDRIDE GENERATION

In this study it was developed two systems, one for the fast sequential determination of As and Sb and other for Bi and Pb using flame atomic absorption spectrometry with hydride generation. To optimize the system for the determination of As (193.7 nm) and Sb (217.6 nm) some variables were evaluated: concentration (in mol L⁻¹) of HCl in the sample and carrier, concentrations (in % w v⁻¹) of KI and NaBH₄. For the system used in the determination of Bi (223.1 nm) and Pb (217.0 nm) the following variables were studied: concentration (in mol L⁻¹) of HCl in the sample, concentrations (in % w v⁻¹) of K₃Fe(CN)₆ and NaBH₄. For these studies it was employed Doehlert design to select the best work conditions and obtain more information of the proposed methods. Some analytical parameters were obtained, respectively, for As, Sb, Bi and Pb: Limits of detection (LOD) (0.15; 0.16; 0.60 e 0.77 µg L⁻¹), repeatability (RSD) (1.5; 2.0; 5.9; 6.0 %) and correlation coefficients (r) (0.999; 0.999; 0.998 e 0.997). In order to identify species that could interfere in the determination of As and Sb, Bi and Pb, a study was carried out considering the constituents commonly found in natural waters and chicken feed including Al(III), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II) and Zn(II). It was also carried out a study to investigate the influence of the concentration of HNO₃ in the As and Sb, Bi and Pb determinations. Through studies with possible interferences, can be observed that there were no significant trend for As, Sb and Bi, the percentage of interference was lower than 21% (contrasts from -4 to 5% for both analytes). In the case of Pb it was noted a strong signal interference by Co (II), Cu (II), Fe (III) and Ni (II) with contrasts varying from -62 % to 29%. The effect of HNO₃ concentration was not relevant if it is lower than 10 % v v⁻¹ for As, Sb and 20 % v v⁻¹ for Bi. However, it was noted a strong Pb signal suppression for HNO₃ concentrations higher than 0.25 % v v⁻¹. The systems developed were applied in the determination of As and Sb, Bi and Pd in Tietê river water, sea water of Praia Grande – Ubatuba, chicken feed and to validate the methods were used two certificate reference materials: Nist 1643e (Trace elements in water) e TMDW-HPS (Trace metals in drinking water).

SUMÁRIO

1 – Introdução.....	1
2 – Objetivos.....	4
3 – Revisão Bibliográfica.....	6
3.1. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)..	7
3.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HGAAS).....	11
3.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama Sequencial Rápida (FS FAAS).....	21
3.4. A importância da determinação de As, Sb, Bi e Pb.....	24
4 – Material e Métodos.....	30
4.1. Reagentes e Soluções.....	31
4.2. Equipamentos e acessórios.....	31
4.3. Sistema CF-HGAAS.....	32
4.4. Descontaminação dos materiais.....	33
4.5. Amostras.....	33
4.6. Tratamento de dados.....	34
5 – Procedimento Experimental.....	35
5.1. Preparo de Amostra.....	36
5.1.1. Amostra de ração de frango.....	36
5.1.2. Amostra de água.....	37
5.2. Determinação sequencial de As, Bi, Pb e Sb.....	37
5.3. Determinação sequencial de As e Sb.....	37
5.3.1. Otimização dos parâmetros.....	37
5.3.2. Estudo dos possíveis interferentes.....	39
5.3.3. Estudo do efeito da concentração do HNO ₃	40

5.3.4. Curva Analítica de Calibração.....	40
5.3.5. Determinação de As e Sb nas amostras de água do rio, água do mar e ração de frango.....	41
5.4. Determinação sequencial de Bi e Pb.....	41
5.4.1. Otimização dos parâmetros.....	41
5.4.2. Estudo dos possíveis interferentes.....	44
5.4.3. Estudo do efeito da concentração do HNO ₃	44
5.4.4. Curva Analítica de Calibração.....	44
5.4.5. Determinação de Bi e Pb nas amostras de água do rio, água do mar e ração de frango.....	45
6 – Resultados e Discussão.....	46
6.1. Estudos Preliminares.....	47
6.2. Sistema CF-HGAAS.....	47
6.3. Determinação sequencial de As e Sb.....	48
6.3.1 Otimização da concentração dos reagentes.....	48
6.3.2. Estudo dos possíveis interferentes.....	57
6.3.3. Estudo do efeito da concentração do HNO ₃	59
6.3.4. Desempenho Analítico.....	60
6.3.5. Teste de exatidão.....	63
6.3.6. Aplicação.....	63
6.4. Determinação sequencial de Bi e Pb.....	64
6.4.1 Avaliação do tempo de estabilização e tempo de leitura.....	64
6.4.2. Otimização da concentração dos reagentes.....	66
6.4.3. Otimização das vazões do gás de arraste e das soluções.....	70
6.4.4. Estudo dos possíveis interferentes.....	72
6.4.5. Estudo do efeito da concentração do HNO ₃	75

6.4.6. Desempenho Analítico.....	76
6.4.7. Teste de exatidão.....	77
6.4.8. Aplicação.....	78
7 – Conclusões.....	80
8 – Referências Bibliográficas.....	83
Apêndice.....	89

Capítulo 1

Introdução

1 – Introdução

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é uma técnica muito utilizada para a determinação de elementos em concentrações da ordem de mg L^{-1} , e tem como características a simplicidade e o baixo custo de operação¹.

O princípio fundamental utilizado pela técnica baseia-se no fato de que átomos gasosos no estado fundamental, gerados no atomizador (chama), são capazes de absorver radiação de frequência específica, proveniente de uma fonte de radiação primária².

No entanto a FAAS possui algumas limitações quanto ao sistema de nebulização, no qual apenas 5 a 15% da amostra nebulizada efetivamente alcançam a chama. Além disso, soluções muito viscosas necessitam ser diluídas com um solvente adequado para uma eficiente nebulização. Outras limitações são relativas à quantidade de amostra requerida para que a leitura do sinal analítico seja confiável e ao pequeno tempo de residência dos átomos no compartimento de atomização^{2,3}.

Com o intuito de melhorar as características da FAAS, uma alternativa apresentada é o uso da técnica de geração de hidretos (HG – *Hydride Generation*), que tem como princípio básico o fato de que alguns elementos (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te) podem gerar hidretos voláteis à temperatura ambiente, sendo posteriormente transportados para uma célula de atomização³.

Algumas vantagens encontradas no uso da técnica de HG estão na possibilidade de separação do analito da matriz, melhorando a precisão, favorecendo a seletividade devido à redução significativa dos interferentes, e melhorando o transporte do analito para o atomizador^{3,4}. O uso do tubo de quartzo na chama de ar/acetileno soluciona o problema quanto ao tempo de residência dos átomos no volume de absorção, resultando em uma alta sensibilidade, com baixos ruídos e sinal de fundo, e bons limites de detecção⁵. Todas essas características satisfazem os interesses para estudos de elementos traço.

Apesar dessas vantagens, a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS – *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) é utilizada para a determinação de um único elemento, o que aumenta drasticamente o tempo da análise e o consumo de reagentes⁶. Dessa forma, houve

um grande interesse para realizar determinações multielementares utilizando a técnica. Assim, atualmente, é possível realizar determinações multielementares sequenciais (FS FAAS - *Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry*) acoplada com geração de hidretos.

A espectrometria de absorção atômica sequencial rápida permite medir uma sequência de analito em ordem decrescente de comprimento de onda pelo sistema do monocromador, reduzindo o tempo de análise e o consumo de reagentes, mantendo as vantagens da FAAS convencional, como a facilidade do uso⁷.

Desta forma, neste trabalho foram desenvolvidos dois sistemas, utilizando a espectrometria de absorção atômica com chama sequencial rápida acoplado à técnica de geração de hidretos, para a determinação sequencial de As e Sb, Bi e Pb em amostras de água do rio Tietê, água do mar da Praia Grande – Ubatuba e ração de frango.

Capítulo 2

Objetivos

2 – Objetivos

As propostas desse trabalho de mestrado foram:

- Desenvolver dois sistemas, um para determinação sequencial rápida de As e Sb e outro para a determinação sequencial rápida de Bi e Pb, acoplado-se a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS);
- Identificar as melhores condições de trabalho para determinar sequencialmente As e Sb, Bi e Pb;
- Aplicar os métodos propostos na análise de amostras de água do rio Tietê, água do mar da Praia Grande - Ubatuba e ração de frango.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3 – Revisão Bibliográfica

3.1. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A espectrometria de absorção atômica com chama foi desenvolvida e proposta no início dos anos 50 pelo físico australiano Alan Walsh, que montou o primeiro protótipo e utilizou como técnica analítica para a determinação de diversos metais⁸.

No princípio, a comunidade científica apresentou certa descrença, pois até então, só utilizavam o espectro de emissão atômica para as análises químicas. Entretanto, a utilização do espectro de absorção atômica atraiu a atenção do russo Boris V. L'vov, que dois anos depois propôs um espectrômetro de absorção atômica que utilizava um forno de grafite como atomizador eletrotérmico (GFAAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)⁹.

A outra grande contribuição de Alan Walsh para a espectrometria de absorção atômica com chama, foi o desenvolvimento das lâmpadas de catodo oco (HCL – *Hollow Cathod Lamps*), confeccionadas em tubos selados de vidro com janela de quartzo, dispensando assim, o emprego de monocromadores de alta resolução que eram inviáveis na época, exigidos para a utilização de fonte contínua¹⁰. Desde então, grandes avanços foram ocorrendo a passos largos, o que contribuiu para que a FAAS fosse uma das técnicas espectroanalíticas mais utilizadas, pois é uma das principais ferramentas empregadas em laboratório de análise de rotina e indústrias devido à sua simplicidade, robustez, seletividade, ampla faixa linear e baixo custo⁹.

Na FAAS, a amostra é introduzida por um sistema de nebulização. Na maioria dos espectrômetros de chama utiliza-se um queimador de pré-mistura no qual combustível, oxidante e a amostra são misturados antes da introdução na chama. A amostra líquida é aspirada para dentro da câmara de nebulização por um nebulizador pneumático concêntrico, originando um aerossol com partículas líquidas da solução da amostra dispersa nos gases que originarão a chama (aerossol primário). Esse aerossol primário é direcionado em alta velocidade contra uma

superfície de impacto, gerando um aerossol secundário constituído de gotículas com diâmetro entre 0,8 a 50 μm . O aerossol secundário disperso na mistura oxidante/combustível dirige-se então para os defletores onde ocorre uma mistura adicional e o bloqueio das gotículas maiores. Assim, apenas o aerossol terciário (cerca de 5% da amostra), com gotículas de diâmetro entre 0,8 e 4,5 μm , atinge o queimador. Quando o aerossol atinge a chama ocorre a dessolvatação, ou seja, ocorre a evaporação do solvente. Nessa etapa há também a formação de óxidos e hidróxidos metálicos. Pouco acima, onde a temperatura da chama é maior, ocorre a formação da nuvem atômica e os átomos gerados no estado gasoso absorvem energia radiante, no comprimento de onda específico de cada elemento, e passam de um estado de menor energia para um de maior energia¹¹.

Na espectrometria de absorção atômica, como ocorre na absorção molecular, a absorbância A é dada pela razão logarítmica entre a intensidade da luz incidente, I_0 , e a luz transmitida, I_t , e se relaciona com a concentração dos átomos de um determinado elemento na amostra (Lei de Lambert- Beer). Esta lei pode ser expressa através da Equação 1, em que K é a constante relacionada ao coeficiente de absorção, N_0 a concentração de átomos na chama e L o caminho ótico na chama²:

$$A = \log I_0/I_t = K L N_0 \quad \text{Equação 1}$$

Apesar da FAAS ser um dos métodos espectroanalíticos mais empregados, a técnica possui algumas limitações que impedem a determinação de analitos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentre as principais limitações estão a rápida passagem dos átomos pela zona de atomização e a baixa eficiência de nebulização, pois apenas 5 a 15 % do volume original da amostra alcançam a chama^{2,3}. Sendo assim, com o intuito de reduzir as limitações e aumentar a sensibilidade da FAAS, muitas propostas têm sido levantadas, dentre elas, o uso de atomizadores na forma de tubo e diferentes sistemas de nebulização e introdução da amostra^{12,13}.

O primeiro trabalho a empregar o conceito de célula de atomização foi o de ROBINSON¹⁴, na década de 1960, que utilizou um tubo de quartzo com formato de T e sobrepôs em um espectrômetro de absorção atômica com chama. A sua

proposta apresentou um ganho de 10 vezes na sensibilidade para a determinação de platina. Em 1963, FUWA e VALLEE¹⁵ utilizaram outro método, no qual eles empregaram um tubo de quartzo de 91 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro interno e inseriram em um tubo de vidro borossilicato de 99 cm de comprimento. Eles posicionaram a chama de um queimador na extremidade de um dos lados do tubo e em um ângulo de 15° com o caminho óptico. Com isso, eles obtiveram um aumento da sensibilidade na determinação de alguns elementos como Cd, Cu e Zn. Entretanto observaram severas interferências devido à absorção molecular, ao espalhamento de radiação pelas espécies presentes na chama e outras formadas por recombinação devido à diminuição da temperatura ao longo do tubo¹².

Em 1970, DELVES¹⁶ propôs o uso de um recipiente de Ni com 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura, o qual colocava pequenos volumes da amostra, e um tubo de Ni de 100 mm de comprimento e 12,5 mm de diâmetro interno com abertura na parte inferior, o qual era posicionado a 20 mm de um queimador de um espectrômetro de absorção atômica com chama. A amostra que foi introduzida no recipiente era vaporizada na chama do queimador abaixo do tubo de Ni. Os vapores atingiam o interior do tubo de Ni aquecido, onde ocorria a formação e a concentração da nuvem atômica. O método foi empregado para a determinação direta de Pb em sangue e, uma melhora em termos de limite de detecção (LD = 11,9 µg L⁻¹) da FAAS foi alcançada. Entretanto, a técnica apresentou baixa precisão, possivelmente, devido à dificuldade do posicionamento exato do recipiente de Ni em cada medida e problemas com a combustão da amostra durante a vaporização¹².

WATLING¹⁷, em 1977, utilizou um arranjo, em que um tubo de quartzo posicionado sob o queimador de um espectrômetro com chama, possuía duas aberturas, uma acima e outra abaixo com um ângulo de 120° entre elas. A amostra era introduzida através de um sistema de nebulização pneumática convencional. Nesse método, conhecido como *slotted tube atom trap* (STAT), o tubo de quartzo funcionava como uma célula de atomização, aumentando o tempo disponível para a atomização e concentrando a nuvem atômica. A técnica mostrou-se efetiva para a determinação de elementos voláteis (Ag, As, Bi, Cd, Sb, Sn), no entanto, para elementos mais refratários, o método não se apresentou adequado, provavelmente

devido ao sistema de nebulização utilizado e à baixa temperatura no interior do tubo¹¹.

O sistema de nebulização pneumático convencional é um dos responsáveis pelas limitações da FAAS, que impedem a determinação de analitos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. Uma alternativa a esse sistema é a nebulização hidráulica sob alta pressão (HHPN - *Hydraulic High-Pressure Nebulization*). Nesse método, a solução da amostra é forçada por uma bomba de HPLC, ou bomba de pistão, através de um capilar de Pt/Ir com orifício (*nozzle*) de 10 a 30 μm de diâmetro, a uma pressão de 100 a 400 bar. Há então, a formação de um jato de líquido a alta velocidade que colide com uma esfera de vidro posicionada a alguns centímetros da saída do *nozzle*, gerando um aerossol. Esse aerossol, gerado no interior da câmara de pré-mistura de gases de um sistema de nebulização pneumático convencional, é arrastado até o queimador, onde ocorre a atomização do analito. Em HHPN, a quantidade de amostra que é convertida em aerossol e atinge a chama chega a 50%, aumentando a sensibilidade da FAAS em até uma ordem de grandeza¹⁸.

BERNDT e YAÑES¹⁹, em 1996, propuseram uma modificação da HHPN, em que a amostra é forçada por um capilar de Pt/Ir aquecido eletricamente a 300° C e sai por um *nozzle* de 20 μm de diâmetro. O efeito de nebulização é baseado em ondas de choque causadas pela alta pressão hidráulica e da vaporização espontânea de parte do líquido devido à alta temperatura. Neste caso, utilizando a FAAS para a determinação de vários elementos, o rendimento do aerossol foi cerca de 80 % em comparação com a nebulização pneumática convencional, resultando em uma melhora de 10 vezes do limite de detecção.

Outro sistema de introdução de amostra apresentado é a nebulização ultrassônica (USN - *Ultrasonic Nebulization*). RIBEIRO et al.²⁰ propuseram a utilização de um dispositivo de USN com sistema de dessolvatação, acoplado a um FAAS e a um espectrômetro de absorção atômica em chama com forno (FFAAS - *Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) utilizando para isso, um tubo de Ni. Na USN, um aerossol é gerado quando a amostra líquida entra em contato com um transdutor piezométrico alimentado por uma fonte de rádio frequência, e neste caso, o processo de nebulização não depende da vazão dos gases na chama, possibilitando a otimização do processo de formação do aerossol. Os sistemas foram utilizados

para a determinação de elementos traços (Ag, Bi, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Se, Tl e Zn) em materiais de referência certificado (CRM - *Certified Reference Material*) e os resultados demonstraram um ganho de sensibilidade de até 39 vezes para FFAAS, principalmente devido ao aumento do tempo de residência dos átomos na zona de atomização e à ausência de diluição do analito pelos gases da chama. Entretanto, elementos que requerem altas temperaturas de atomização, como o Cr e Mn, foram determinados mais eficientemente utilizando a FAAS. Apesar de aumentar o sinal analítico, é necessário retomar a atenção aos processos de interferência, pois a maior eficiência na introdução da amostra pode também causar aumento da concentração dos interferentes no caminho óptico.

3.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HGAAS)

Uma alternativa apresentada para melhorar a sensibilidade da FAAS é o acoplamento do sistema de espectrometria de absorção com a técnica de geração de hidretos, para a quantificação de alguns elementos (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Sn, Se, Te) que podem gerar hidretos à temperatura ambiente³.

Os hidretos são formados através da mistura de uma amostra acidificada com um forte agente redutor. As principais vantagens do emprego da técnica de geração de hidretos, além do aumento da eficiência do transporte para o atomizador, são: a separação do analito da matriz, resultando em uma melhora da precisão; a redução de interferentes, melhorando a seletividade; melhora significativa dos limites de detecção, satisfazendo os interesses para estudos de elementos traço; além da automação dos sistemas^{3, 21}.

Um trabalho considerado um marco na geração de hidretos é o de HOLAK²², que reduziu As à arsina pela adição de Zn metálico à amostra ácida, sendo que a espécie volátil formada era transportada, com o auxílio do gás Ar, para a chama de um aparelho de absorção atômica.

O sistema de geração de hidretos com a determinação das espécies de interesse por FAAS, consiste em 4 etapas: a geração do hidreto propriamente dita, a

coleta, quando necessária; a transferência para o atomizador e por fim a decomposição para posterior detecção das espécies de interesse²³.

Os hidretos podem ser gerados através do uso de diferentes redutores, que podem ser classificados, de maneira geral como: redutores metálicos em meio ácido, tais como Zn/HCl, SnCl₂/HCl-KI e MgHCl-TiCl₃, e tetrahidroborato de sódio estabilizado (NaBH₄) em meio básico. Entretanto, o uso de redutores metálicos leva à formação de apenas poucos hidretos voláteis (basicamente AsH₃ e SeH₂), ao mesmo tempo que apresenta um elevado tempo para a reação se completar, restringindo a aplicação da técnica e dificultando a automação^{3, 23}.

Em 1972, BRAMAN et al.²⁴, relataram o uso de soluções redutoras de NaBH₄ estabilizada em meio alcalino para a determinação de As e Sb. As espécies voláteis geradas eram transportadas com o auxílio do gás Ar, passavam por um tubo dessecante com CaSO₄, e a emissão era medida através de um detector de descarga de corrente contínua. Através do uso de NaBH₄ como agente redutor, ampliou-se o número de elementos determináveis por geração de hidretos, além de diminuir o tempo necessário para ocorrer a reação.

A reação para a formação do hidreto envolve o hidrogênio proveniente da hidrólise ácida do NaBH₄, que reduz o analito (X) à hidreto, de acordo com as Reações 2 e 3^{3,23}:



THOMPSON E THOMERSON²⁵, em 1974, demonstraram através de seus experimentos uma melhora significativa da sensibilidade com o uso de uma solução de 1 % m v⁻¹ de tetrahidroborato de sódio, como agente redutor. Além de observar a melhora da sensibilidade, eles determinaram pela primeira vez o Pb, através da geração de hidreto de Pb.

Após a geração do hidreto de interesse, esses podem ser coletados ou transportados até o caminho óptico do equipamento. A coleta, geralmente ocorre quando se utiliza agentes redutores metálicos, que necessitam de mais tempo para

que a reação ocorra, ou quando se realiza uma etapa de pré-redução. Neste caso, ocorre o aprisionamento do hidreto formado em um coletor (*trap*) de nitrogênio líquido para posteriormente ser atomizado em uma chama de um espectrômetro de absorção atômica^{22, 26}. No segundo modo, o hidreto formado é transportado com o auxílio de um gás inerte, geralmente o argônio, diretamente para o caminho óptico do equipamento²³.

O uso de NaBH_4 , como agente redutor, possibilitou a automatização do sistema, uma vez que a reação ocorre de forma rápida, comparado aos redutores metálicos. Dentre as vantagens apresentadas pelo sistema automatizado destacam-se: diminuição do consumo de reagentes e amostras, melhora da sensibilidade, pois o hidreto formado é conduzido rapidamente até o atomizador, elevada frequência analítica e diminuição do risco de contaminação.

Na literatura existem diversos trabalhos que utilizam sistemas automatizados empregando a geração de hidretos acoplado a AAS, como o trabalho proposto por SCHMIDT et al.²⁷, que em 1975, determinaram As, Bi, Se, Sb e Sn, utilizando como agente redutor uma solução de NaBH_4 . Os autores relatam que o método automatizado foi superior ao método manual em termos de reprodutibilidade e facilidade de operação.

Em 2001, QUINÁIA e ROLLEMBERG²⁸, determinaram seletivamente As total, As(III), As(V) e ácido dimetilarsínico (DMA) em águas naturais, através de diferentes meios de redução, empregando um sistema automatizado com HG-AAS. O método proposto apresentou boa exatidão e precisão, fácil preparo da amostra e baixo tempo de análise.

Outro fator importante para melhorar a sensibilidade da FAAS, e relatado anteriormente, é o uso de células de atomização. No entanto, nos primeiros trabalhos utilizando HGAAS, a espécie volátil formada era transportada diretamente para a chama de um espectrômetro de absorção atômica, resultando em uma baixa sensibilidade, diluição do hidreto nos gases da chama e elevada absorção de fundo³.

Em 1972, CHU et al.²⁹ propuseram o uso de um atomizador de quartzo na forma de T, aquecido eletricamente e colocado ao longo do caminho óptico do equipamento de absorção atômica. Neste caso, os hidretos voláteis eram transportados, com o auxílio do gás argônio, não mais para chama e sim para o tubo

de quartzo. Com isso, obteve-se uma melhora significativa do limite de detecção, não só devido ao maior tempo de residência dos átomos na zona de absorção, mas também por evitar que parte da radiação de fonte primária fosse absorvida pela chama, aumentando a intensidade da radiação que alcançava o detector

Em 1974, THOMPSON e THOMERSON²⁵, utilizaram um tubo atomizador de sílica, em uma chama de ar-acetileno, para a determinação de As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te. Eles obtiveram como vantagem, em relação à introdução direta em uma chama, a diminuição do sinal de fundo para os elementos As e Se, bem como a melhora dos limites de detecção. No mesmo ano, GOULDEN e BROKSBANK³⁰ aplicaram o atomizador de sílica, aquecido por meio de uma resistência, para determinar As, Sb e Se em águas naturais, de forma automática e simultânea, utilizando a espectrometria de absorção atômica.

FIGUEIREDO et al.³¹, em 2007, empregaram um tubo atomizador Inconel 600[®] (composto aproximadamente de 72% m m⁻¹ de Ni, 14 a 17% m m⁻¹ de Cr e 6 a 10% m m⁻¹ de Fe), para determinação de Sb, em amostras de sedimentos de rios e lagos e em amostras farmacêuticas, utilizando a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos. O método proposto apresentou boa sensibilidade, com limite de detecção de 0,23 µg L⁻¹.

Atualmente o atomizador mais empregado na geração de hidretos é o tubo de quartzo na forma de T, podendo ser de dois tipos: aquecido externamente ou com chama interna. O tubo de quartzo pode ser aquecido externamente por uma resistência elétrica ou uma chama de ar – acetileno, e sua temperatura varia de 700° C a 1100° C. Por outro lado, o tubo de quartzo aquecido por uma chama interna necessita de um tubo de junção, ou seja, um tubo especial para a entrada de uma chama de oxigênio ou hidrogênio, no atomizador, para sustentar uma chama rica em oxigênio – hidrogênio³².

O tubo de quartzo apresenta como vantagens a elevada sensibilidade, baixo ruído e sinal de fundo, e bons limites de detecção. Entretanto algumas desvantagens são: pouca resistência a interferências durante a etapa de atomização e a linearidade insatisfatória da curva de calibração. Outro fator, é que as reações de atomização ocorrem preferencialmente na superfície do quartzo e, dessa maneira, a

sensibilidade é diretamente controlada pela qualidade da superfície interna do atomizador^{32, 33}.

Na tentativa de melhorar o desempenho do tubo de quartzo, MATOUŠEK et al.³², empregaram o tubo de quartzo com múltiplas micro-chamas, no qual eles utilizaram hidreto de Se como analito e hidreto de As como interferente. Os resultados mostraram melhora da sensibilidade, aumento da faixa linear de calibração, além de maior resistência aos interferentes.

Um dos fatores que afetam o processo de atomização da espécie de interesse é a eficiência da separação do hidreto. Em sistemas automatizados, deve ser utilizado um separador gás-líquido que separa o hidreto gasoso do meio reacional e permite a sua transferência para o atomizador. Existem vários separadores gás-líquido descritos na literatura, empregando um funil de Buchner³⁴, um tubo em forma de U³⁵ e um reator gás líquido do tipo varredura³⁶.

Em 1997, CADORE E BACCAN³⁶ descreveram o uso de um separador gás líquido, do tipo varredura, de acrílico. Este separador contém dois orifícios na mesma altura, um para a entrada da mistura (hidreto gasoso + fração líquida) e um para a saída de resíduos, que pode ser visto na Figura 3.1. O gás de arraste (N_2) é introduzido por um orifício na parte inferior, que contém vidro sinterizado. Segundo os autores, com o uso deste separador houve uma melhora na separação e transporte de BiH_3 para a célula de atomização, refletindo em uma maior sensibilidade e reprodutibilidade.

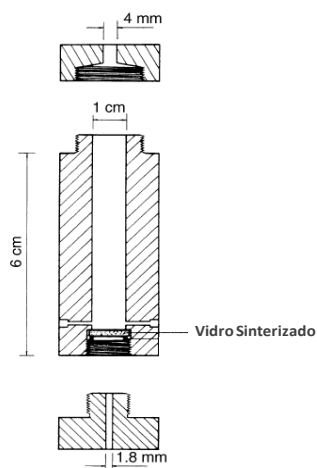


FIGURA 3.1 – Reator separador gás-líquido utilizado no sistema automatizado de geração de hidretos.

Em 2002, RIBEIRO et al.⁵ utilizaram um separador de câmara para a determinação de As e Bi, que fornece três compartimentos, conforme pode ser visualizado na Figura 3.2. No primeiro compartimento, a solução em reação ao entrar no separador gás-líquido (GLS – *gas-liquid separator*) é borbulhada pelo gás carregador, que separa o hidreto da fase líquida para a fase gasosa. Em seguida as bolhas formadas entram no segundo compartimento que possui um diâmetro maior, perdem aderência com a parede e rompem, fazendo com que o líquido sedimente com maior facilidade para o último compartimento que é o de drenagem. Este sistema mostrou-se eficiente com pequena perda de gás na drenagem⁵.

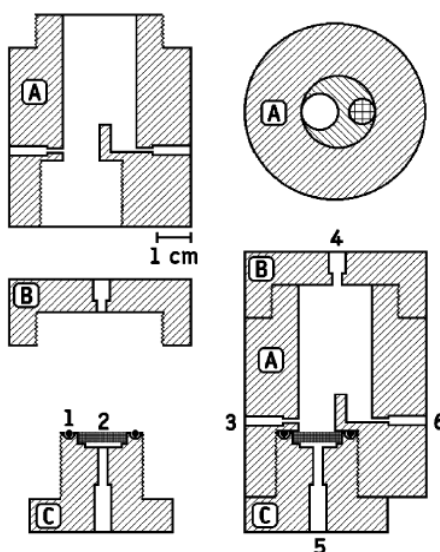
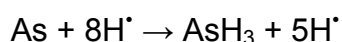


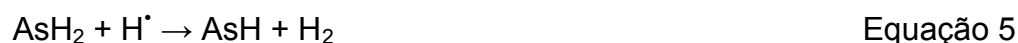
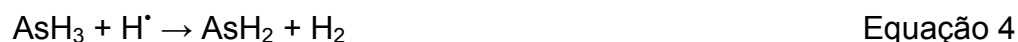
FIGURA 3.2 – Diagrama esquemático do reator separador gás-líquido utilizado no sistema para a geração de hidreto. A: Bloco central; B: Tampa superior; C: Tampa inferior; 1: Anel de borracha; 2: Vidro sinterizado; 3: Entrada da amostra; 4: Saída do gás; 5: Entrada do gás; 6: Resíduo.

Com relação ao mecanismo de atomização, estudos termodinâmicos demonstram que os hidretos sofrem decomposição a baixas temperaturas formando moléculas diméricas e não ocorrendo a formação de átomos³⁷. DĚDINA e RUBESKA³⁷, estudaram a atomização de SeH_2 em um tubo de quartzo aquecido com uma chama de hidrogênio-oxigênio e concluíram que a atomização do hidreto é causada pela presença de radicais livres e que o oxigênio aumenta a sensibilidade da medida. Segundo WELZ e MELCHER³⁸, o mecanismo de atomização do hidreto de As, utilizando um tubo de quartzo eletricamente aquecido, é decorrente das colisões entre as moléculas de hidreto e radicais hidrogênio gerados, e o oxigênio é necessário para que os processos ocorram à baixas temperaturas. A reação dos radicais com o arsênio está representada na Equação 3:

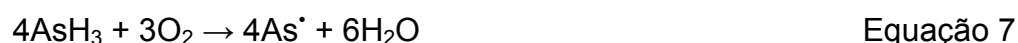


Equação 3

O hidreto de As gerado é transportado para o atomizador, juntamente com o excesso de radicais hidrogênio. A formação de átomos de As é proporcional ao número de colisões dos radicais livres com o hidreto, em um processo que ocorre de acordo com as Equações 4, 5 e 6:



Segundo BAX et al.³⁹ e AGTENDERBOS e BAX⁴⁰, o mecanismo de atomização ocorre por meio da oxidação do hidreto, de acordo com a Equação 7.



O oxigênio, presente em baixas concentrações, oxida o hidreto e a presença de radicais hidrogênio, catalisa a reação de atomização. Segundo os autores, os radicais hidrogênios devem estar presentes em excesso em relação ao oxigênio, a fim de evitar a oxidação dos átomos de As.

A principal vantagem apresentada pela separação das espécies de interesse na forma de hidreto gasoso da matriz é a minimização das interferências comparada à técnica AAS convencional. Entretanto, podem ocorrer interferências como absorção de fundo, presença de organo-compostos, diferentes estados de oxidação de um mesmo elemento presente na amostra e efeitos devido a outros elementos que geram hidretos^{3, 23}.

As interferências na técnica de geração de hidretos podem ser divididas em dois grupos: interferência na fase líquida e interferência na fase gasosa, porém essas interferências geralmente ocorrem quando o interferente está em excesso em relação ao analito. Sendo assim, a interferência pode ser controlada por meio da razão analito: interferente^{3, 23, 41}.

A interferência na fase líquida ocorre durante a formação ou transferência do hidreto do meio reacional líquido para o atomizador e devido à

mudanças na velocidade (interferência cinética). Elementos como As, Sb, Se e Te podem existir, em solução, em dois estados de oxidação, sendo que os estados de oxidação mais altos apresentam velocidade de redução mais lenta. Neste caso, é necessário a realização de uma redução prévia ao estado de oxidação menor (como no caso do As e Sb), ou uma oxidação prévia ao estado de oxidação maior (como no caso do Pb)⁴¹.

Entretanto, existem alguns trabalhos na literatura que utilizam os diferentes estados de oxidação dos elementos formadores de hidretos para realizar análises de especiação^{42, 43}. BORBA et al.⁴³ realizaram um estudo da especiação de arsênio inorgânico em águas subterrâneas. O método permite a quantificação de As(III), As(V) e As total através de duas determinações. Primeiramente foi quantificado o As(III), espécie mais tóxica, e em uma segunda determinação foi obtida a concentração de As(III) + As(V) com um erro embutido. Este erro foi corrigido por uma equação empregada para descrever as absorvâncias obtidas para soluções contendo as duas espécies em concentração conhecida. Após a correção algébrica, foi possível determinar As total e As(V) por diferença.

Além da possibilidade de diferentes números de oxidação, os elementos formadores de hidretos podem existir ligados a diferentes radicais orgânicos, seja em amostras ambientais ou biológicas²³. Neste caso, é preciso destruir completamente todo o material orgânico na etapa de pré-tratamento da amostra antes da determinação da espécie de interesse. No entanto, a escolha do ácido utilizado na mineralização da amostra é um fator importante, uma vez que, alguns ácidos minerais oxidantes, como o HNO₃ e H₂SO₄, interferem na geração do hidreto por converter os elementos formadores de hidreto em seus estados de oxidação mais elevados, e por consumir o agente redutor. No caso do HNO₃, durante a etapa de HG, pode ocorrer a produção de NO₂, que interfere severamente durante a atomização^{3, 41}.

Em 1975, SMITH⁴⁴ investigou a influência de 48 elementos na determinação de As, Bi, Ge, Se, Sn e Te por HGAAS, empregando uma chama de hidrogênio. O autor sugeriu que a interferência é dada pela redução preferencial do íon metálico interferente, presente na solução, para a forma elementar coloidal, causando a co-precipitação do analito, adsorvendo o hidreto formado, decompondo-

o cataliticamente ou retardando a sua geração. Neste mesmo trabalho, o autor verificou que metais alcalinos e alcalinos terrosos apresentaram menos de 10% de interferência na determinação desses seis elementos, nos níveis estudados, ao contrário de íons como Co(II), Ni(II) e Cu(II), que podem ser facilmente reduzidos pelo NaBH₄.

PIERCE e BROWM⁴⁵, em 1976, verificaram que a ordem de adição dos reagentes é um fator importante na determinação de As e Se. Quando NaBH₄ foi adicionado antes do ácido clorídrico, observou-se a formação de um precipitado e uma diminuição do sinal analítico, o que sugere uma competição entre o analito e o íon interferente pelo redutor. No entanto, ao inverter a ordem de adição, a interferência não foi observada. WELZ e SCHUBERT-JACOBS⁴⁶, observaram que o aumento da concentração do ácido clorídrico também diminui o efeito interferente na determinação de As e Se, na presença de Ni, Co e Cu, e que a diminuição da concentração do redutor permite maiores razões interferente/analito, com exceção para interferência do Cu no sinal do Se, onde o efeito é menos pronunciado em concentrações maiores do redutor.

Outra maneira de minimizar a ação de interferentes é a adição de agentes mascarantes, que deve produzir uma modificação química apropriada na etapa da geração do hidreto, reduzindo a ação dos interferentes e mantendo a sensibilidade analítica da técnica. Entre os agentes mascarantes, os mais utilizados são: L-cisteína, Tiouréia, KI e KCN^{41, 47}. TAKASE et al.⁴⁸ investigaram a interferência dos metais Cu e Ni na determinação de Bi, em amostras de liga, por HGAAS. Eles observaram uma tolerância a Cu e Ni estando a um excesso de 5.000 e 10.000 vezes, respectivamente. No entanto, com o emprego do agente mascarante 2-2-tiazolilazo-*p*-cresol, a tolerância a Ni e Cu passou para 160.000 e 16.000 vezes, respectivamente.

Por outro lado, as interferências que ocorrem na fase gasosa, são devido a espécies voláteis, que na maioria das vezes são outros elementos formadores de hidretos. Elas podem ocorrer durante o transporte do hidreto, no qual o interferente ocupa o lugar do hidreto de interesse durante a passagem até o atomizador, retardando a coleta do sinal analítico; ou durante a atomização, que acarreta em dois tipos de efeitos: a diminuição da concentração dos radicais

hidrogênio no interior do atomizador e o decaimento dos átomos livres do analito, devido às suas reações com os interferentes na fase gasosa^{3, 23, 41}.

A presença de interferentes depende da matriz, das condições experimentais, do sistema de geração do hidreto e do atomizador utilizado e a eliminação ou minimização da interferência depende da identificação dos íons interferentes.

3.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama Sequencial Rápida (FS FAAS)

Conhecendo-se as diversas qualidades da técnica de Espectrometria de absorção atômica com chama, como a simplicidade, o baixo custo de operação e a baixa possibilidade de interferências espectrais, houve um grande interesse para realizar determinações multielementares utilizando a técnica. No entanto, durante todo o desenvolvimento histórico, as determinações multielementares por AAS foram realizadas unicamente de forma simultânea. Embora seja de grande interesse realizar as medidas de forma simultânea, ainda é crítica a limitação devido ao comportamento termoquímico bastante distinto entre os diversos elementos⁹.

Apenas 50 anos após a implementação da técnica por Alan Walsh, determinações multielementares vieram a ser realizadas de forma sequencial. Além do comprimento de onda desejado, que é selecionado de forma rápida pelo sistema do monocromador, outras condições de operação, como a estequiometria da chama e a altura do queimador, podem ser selecionadas de forma independente para cada elemento⁹.

Em 2004, PROJAHN et al.⁷, utilizaram um espectrômetro de absorção atômica com atomizador de chama SpectrAA 220 FS da Varian, para estudar o uso do método de elemento de referência para determinação sequencial de alguns metais. Com este equipamento, que possui um monocromador com velocidade de varredura de 33 nm s^{-1} , lâmpadas de catodo oco que são operadas simultaneamente e selecionadas utilizando um espelho motorizado e, chama que é ajustada por meio de controle automático programável do fluxo do gás, os autores obtiveram uma

frequência analítica superior ao da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES- *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*)

Em 2005, NIEDZIELSKI⁴⁹ desenvolveu um sistema analítico para a especiação de As e Se inorgânicos, acoplando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HPLC – HG – AAS - *High Performance Liquid Chromatography – Hydride Generation – Atomic Absorption Spectrometry*). Este método foi aplicado na determinação sequencial de As(III), As(V) e Se(IV), Se(VI) em amostra de água mineral e a atomização foi realizada em um tubo de quartzo aquecido eletricamente à uma temperatura de 900°C. No mesmo ano, AMORIM e FERREIRA⁵⁰ utilizando FS FAAS, determinaram Cd e Pb em amostra de sal de cozinha para consumo humano, após a separação e pré-concentração destes metais por meio da extração líquido-líquido dos complexos metal-ditizona com metil-isobutil-cetona (MIBK), aspirando a fase orgânica diretamente para a chama. Através da pré-concentração dos analitos, os autores conseguiram aumentar a sensibilidade da técnica, obtendo-se limites de 0,3 ng g⁻¹ para Cd e 4,2 ng g⁻¹ para Pb.

Em 2006, da SILVA et al.⁵¹ determinaram sequencialmente Zn e Mn em amostras de chocolate em pó, utilizando amostragem em suspensão. Com esse método, pode-se realizar a análise direta, sem a necessidade da etapa de digestão, considerada a mais crítica, na qual são inseridos mais erros, possui maior custo e consome-se mais tempo. Os limites de detecção obtidos foram de 52 e 61 ng g⁻¹, para Mn e Zn, respectivamente.

Em 2008, a FS FAAS foi utilizada para realizar determinações multielementares em procedimentos analíticos que envolvem calibração com elemento de referência. Este trabalho foi desenvolvido por FERREIRA et al.⁵², que aplicaram essa metodologia para a determinação sequencial de ferro e manganês em vinho, utilizando análise direta. Para isso, eles testaram Ag, Co, In e Ni como elementos de referência, para a correção do efeito da matriz. Os resultados demonstraram que o Co e o In foram os mais eficientes e como vantagem eles obtiveram redução no tempo e no custo da análise, uma vez que foi eliminada a etapa de digestão da amostra. Outra aplicação do método de calibração com

elemento de referência foi em 2010, no qual, MIRANDA et al.⁵³ determinaram cobre em cachaça, utilizando FS FAAS. Os autores avaliaram o uso de Ag, Bi, Co e Ni como padrão interno, para minimizar interferências de transporte. Os resultados demonstraram que o uso de Ag, em uma concentração de 2 mg L⁻¹, foi mais efetivo.

FERREIRA et al.⁵⁴, em 2008, utilizaram a FS FAAS para realizar determinações de Cu e Zn em amostras de alimentos (aveia, chocolate em pó, farinha de milho e farinha de trigo). Para melhorar a sensibilidade do método eles utilizaram a pré-concentração com extração em ponto nuvem, empregando como ligante o reagente 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) e para conseguir a fase micelar, o surfactante não iônico Triton X-114. Os limites de detecção obtidos foram de 0,10 µg L⁻¹ para o Cu e 0,15 µg L⁻¹ para Zn.

Em 2009, MIRANDA e PEREIRA-FILHO⁵⁵ desenvolveram um estudo combinando Espectrometria de Absorção Atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS, *Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) e FS-FAAS para a determinação sequencial de Cd, Cu, Pb e Zn em amostras biológicas. Neste trabalho os autores realizaram um estudo de diferentes configurações de tubos de Ni utilizados como atomizador e compararam as determinações com TS-FF-AAS multi-elementar com TS-FF-AAS no modo monoelementar, obtendo-se valores muito próximos de limite de detecção, porém encontraram como vantagem a frequência de amostragem, sendo que no modo sequencial determinaram quatro elementos em 72 s e no modo monoelementar determinaram os mesmos elementos em 320 s.

SANTOS et al.⁵⁶, em 2011, determinaram Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de gasolina, utilizando FS FAAS. Os autores fizeram uso da pré-concentração dos metais empregando uma resina modificada com o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (XAD-DHB), seguida da dessorção com solução ácida. As amostras de gasolina foram preparadas como microemulsões misturando-se 80 mL de amostra com 17 mL de propan-1-ol e 3 mL de solução tampão (pH 10). Bons limites de detecção foram obtidos através do método desenvolvido, possibilitando a determinação dos analitos em níveis de µg L⁻¹ em amostras de gasolinas coletadas em postos revendedores de Salvador, BA, Brasil.

No mesmo ano, GUERRA et al.⁶ desenvolveram um estudo combinando a FS FAAS com a técnica de geração de hidretos. Os autores determinaram sequencialmente As e Sb em águas minerais. Além dos bons limites de detecção, eles obtiveram uma redução substancial do tempo de análise em comparação com o modo de monoelementar, redução do consumo de reagentes e amostra, e a minimização da produção de resíduos. Esse foi o primeiro trabalho a realizar determinação sequencial utilizando espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos com fluxo contínuo (CF HGAAS - *Continuous Flow Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*), empregando um tubo de quartzo aquecido por uma chama de ar-acetileno.

3.4. A importância da determinação de As, Sb, Bi e Pb

A poluição ambiental é uma das grandes preocupações da sociedade moderna. Os resíduos gerados por atividades industriais são inevitáveis, mas a forma como são descartados na natureza deve ser cuidadosamente avaliada⁵⁷. Os elementos como As, Sb, Bi e Pb são comumente empregados em processos industriais, no entanto o descarte inadequado dos resíduos gerados causam prejuízos à natureza e à saúde humana, prejudicando o ambiente e o bem-estar da população.

O As, na crosta terrestre, é pouco abundante, mas é naturalmente encontrado em águas e alimentos. Está presente em muitas formas químicas na natureza e ocorre em quatro estados de oxidação: arsenato (5+), arsenito (3+), arsina (3-) e na forma elementar (0). Contudo, as espécies solúveis geralmente ocorrem nos estados de oxidação 3+ e 5+⁵⁸. As fontes antropogênicas incluem atividades relacionadas à utilização de praguicidas, aos rejeitos provenientes da mineração, ricos em As, efluentes industriais da manufatura de vidros e cerâmicas e efluentes derivados do refino de petróleo⁵⁹.

Uma aplicação, de compostos contendo As, que merece destaque é como estimulante para a alimentação das aves visando garantir uma melhor pigmentação da carne, promover uma aceleração do crescimento, aumentar o peso dos animais e eliminar parasitas. Esse estimulante é denominado roxarsone (ácido

3-nitro-4-hidroxifenilarsênico), considerado relativamente benigno, mas pode ser facilmente convertido nas formas mais tóxicas desse elemento⁵⁶.

O grau de toxicidade do As depende de sua forma química, estado de oxidação, estado físico do elemento, velocidade de absorção nas células, velocidade de eliminação, natureza do substituinte, entre outros, não dependendo exclusivamente da sua concentração no meio. A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de As é dada pela seguinte maneira: arsenito (As(III)) > arsenato (As(V)) > ácido monometilarsônico (MMA) > ácido dimetilarsínico (DMA) > arsenobetáina (AsB). Para o ser humano, o As trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente (arsenato). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA)⁶⁰.

A maior parte do As absorvido pelo corpo humano é convertida no fígado para a sua forma menos tóxica (espécie orgânica) sendo eliminado pela urina. Sendo assim, o As não possui o comportamento de se acumular no corpo humano, salvo em casos de exposição aguda. A ingestão de água rica neste elemento tem sido a principal causa de contaminação humana, e os principais efeitos, devido a essa contaminação, são: disfunções cardiovasculares, desordens neurológicas, desordens hematológicas, distúrbios gastrointestinais, câncer em diferentes órgãos (fígado, pele e rins), entre outros problemas^{28, 61}.

O antimônio pode ser encontrado no meio ambiente em dois estados de oxidação: III e V. Em ambientes aquáticos, a forma pentavalente (Sb(V)) é a predominante, devido ao desgaste de rochas. A forma trivalente é resultante, principalmente, das atividades antropogênicas e em menor parcela, de processos biológicos de redução⁶².

Compostos contendo Sb são muito utilizados na fabricação de vidros e cerâmicas, como pigmentos em plásticos e também como fármacos, para o tratamento de Leishmaniose^{62, 63}.

A toxicidade do Sb depende principalmente do seu estado de oxidação e do modo de transporte e assimilação pelos organismos vivos. Compostos contendo Sb pentavalente são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos compostos contendo Sb na forma trivalente⁶¹.

O Sb geralmente acumula-se em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins, fígados e baço, pois possui grande afinidade pelo sangue⁶³.

Outro elemento importante, do ponto de vista da saúde humana é o Bi, que possui uso medicinal há mais de 200 anos para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, devido a suas propriedades demulcente. Os compostos de Bi também são empregados em semicondutores, produtos cosméticos, ligas e aditivos metalúrgicos⁶⁴.

Entretanto, uma série de efeitos tóxicos tem sido atribuída ao Bi, como: danos ao rim, efeitos neurotóxicos e hepatite⁶⁴.

Com relação ao Pb, as maiores fontes naturais são devido a emissões vulcânicas e intemperismo geoquímico⁶⁵. Esse elemento ocorre em uma variedade de minérios, sendo que a principal é a galena, pois é considerada a mais importante fonte primária de Pb⁶⁶.

As atividades de mineração e fundição de Pb primário (proveniente do minério) e secundário (proveniente da recuperação de sucatas ou baterias), constituem importantes fontes de emissão de Pb, causando impactos que podem persistir por anos⁶⁷.

Outra fonte de emissão de Pb, era proveniente de veículos que utilizavam gasolinas que continha o tetraetil de chumbo como antidetonante, mas felizmente o seu uso foi banido na maior parte do mundo. No Brasil, o emprego de Pb na gasolina tornou-se dispensável em 1993, quando ficou estabelecido a obrigatoriedade da introdução de etanol como aditivo⁶⁸.

O Pb é um metal não essencial ao organismo e pode ser acumulado primeiramente em tecidos moles, e posteriormente nos ossos. Quando a exposição ao Pb é crônica, efeitos a longo prazo no organismo podem atingir os ossos, os rins, os sistemas nervoso central, cardiovascular, reprodutivo, endócrino e a formação do feto. O envenenamento agudo por Pb, tem como sintoma mais comum a cólica gastrointestinal⁶⁸.

A solubilidade das diferentes espécies de Pb depende do pH do meio. Em pH ácido (~1,5), como o encontrado no estômago humano, muitas espécies de Pb são solúveis, e por isto a principal via de contaminação é a ingestão de alimentos ou poeiras contaminados⁶⁸.

Devido a todos os riscos causados pela exposição a esses elementos, a necessidade de monitorar a presença e o comportamento desses compostos é de extrema importância.

No Brasil, existe um órgão oficial, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) que estabelece as normas de qualidade do meio ambiente, principalmente dos recursos hídricos no Brasil. Em 2005, o CONAMA apresentou a resolução nº. 357 que trata da classificação dos corpos de água e do tratamento de efluentes e comparando-se com a resolução anterior, nº. 20 de 1986, constata-se que os limites estabelecidos são ainda mais rígidos⁶⁹.

Segundo a resolução CONAMA as águas são classificadas como doces, salobras e salinas e seus níveis de qualidade devem ser assegurados de acordo com o uso específico para atender as necessidades da comunidade⁶⁹.

A Tabela 3.1 apresenta os valores máximos permitidos para As, Sb e Pb determinados pela resolução para águas doces, destinadas ao consumo humano, após tratamento simplificado, e águas salinas, destinadas à recreação de contato primário.

TABELA 3.1 – Valores máximos de As, Sb e Pb estabelecidos pelo CONAMA em águas doces e salinas

Concentração	Água doce	Água salina
As _{total} / $\mu\text{g L}^{-1}$	10	10
Sb/ $\mu\text{g L}^{-1}$	5	-
Pb _{total} / $\mu\text{g L}^{-1}$	10	10

O CONAMA não estabelece valores máximos permitidos para o Bi, tanto para águas doces quanto para as salinas e no caso do Sb, não há valores estabelecidos para águas salinas. Para As, Pb e Sb, os valores estabelecidos não são para suas espécies, mas para as concentrações totais.

Em vários outros países existem agências que estabelecem normas de qualidade do meio ambiente, como os Estados Unidos, que possui a agência de proteção ambiental (USEPA – *United States Environmental Protection Agency*). A

Tabela 3.2 apresenta os valores máximos permitidos para As, Sb e Pb em água potável⁷⁰.

TABELA 3.2 – Valores máximos de As, Sb e Pb estabelecidos pela USEPA em água potável

Concentração	Água potável
As _{total} / $\mu\text{g L}^{-1}$	10
Sb/ $\mu\text{g L}^{-1}$	6
Pb _{total} / $\mu\text{g L}^{-1}$	15

A USEPA também não estabelece valores para Bi em água potável, e os valores de As, Pb e Sb são para as concentrações totais. Neste caso, os valores máximos permitidos para Sb e Pb são menos rigorosos que o estabelecido pelo CONAMA.

Quanto a Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*), os valores máximos permitidos para As e Pb em água potável, são os mesmos estabelecidos pelo CONAMA para águas doces, porém para o Sb, o limite estabelecido é menos rígido (Sb = 20 $\mu\text{g L}^{-1}$). Assim como o CONAMA e a USEPA, a WHO não estabelece valores máximos permitidos para Bi⁷¹.

Com relação às normas de qualidade dos alimentos, no Brasil existe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que através da Portaria n°685 de 27 de agosto de 1998, estabelece limites máximos de alguns elementos presentes em alimentos. A Tabela 3.3 apresenta os valores máximos permitidos para As e Pb em alguns alimentos, uma vez que a ANVISA não estabelece limites para Bi e Sb⁷².

TABELA 3.3 - Limites máximos de As e Pb em alimentos, estabelecidos pela ANVISA

Alimentos	As / mg Kg⁻¹	Pb / mg Kg⁻¹
Gorduras vegetais	0,1	0,1
Bebidas alcoólicas	0,1	-
Cereais e derivados	1,0	-
Ovos e derivados	1,0	-
Leite e derivados	0,1	0,05
Peixes e derivados	1,0	2,0
Mel	1,0	-
Chá, Mate, Café e derivados	1,0	-
Açúcares e balas	1,0	2,0

Devido aos baixos valores estabelecidos pelos órgãos oficiais, as técnicas instrumentais empregadas na análise de amostras ambientais e alimentos devem proporcionar elevada detectabilidade para a maioria dos elementos químicos, além de viabilizar medidas rápidas e confiáveis.

Capítulo 4

Material e Métodos

4 – Material e Métodos

4.1. Reagentes e Soluções

Em todos os experimentos foram empregados reagentes de grau analítico e água deionizada para o preparo das soluções. As soluções de calibração foram preparadas após sucessivas diluições das soluções padrão de As, Sb, Bi e Pb, de concentração 1000 mg L^{-1} (Qhemis). Tetrahidroborato de sódio (Sigma-Aldrich), utilizado como reagente redutor, foi preparado diariamente em $0,5 \%$ (m v^{-1}) de NaOH (Qhemis). Para a determinação de As e Sb, foi utilizado uma solução pré-redutora 12% (m v^{-1}) de KI (Mallinckrodt); e para a determinação de Bi e Pb foi utilizado $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (J. T. Baker) como solução oxidante.

Para a digestão da amostra de ração de frango, utilizou-se HNO_3 (Qhemis) e HCl (J. T. Baker) previamente purificados utilizando um sistema sub-boiling (Marconi, Piracicaba, Brasil) e H_2O_2 (30% m m^{-1}) (J. T. Baker).

As soluções, utilizadas para o estudo dos possíveis interferentes, foram preparadas a partir das soluções padrão de Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn de concentração 1000 mg L^{-1} (Qhemis).

Para validar os métodos foram utilizados dois materiais de referência certificado: Nist 1643e (Trace elements in water) e TMDW-HPS (Trace metals in drinking water).

4.2. Equipamentos e acessórios

Todos os experimentos foram realizados em um espectrômetro de absorção atômica com chama sequencial rápido, modelo AA240FS (Varian, Mulgrave, Austrália), com correção da radiação de fundo feita por lâmpada de deutério. Lâmpadas de catodo oco de As ($193,7 \text{ nm}$), Sb ($217,6 \text{ nm}$), Bi ($223,1 \text{ nm}$) e Pb ($217,0 \text{ nm}$) (Varian) foram utilizadas como fonte de radiação. Os parâmetros de operação do instrumento (resolução espectral, corrente das lâmpadas de catodo oco) foram aquelas recomendadas pelo fabricante. Em todos os experimentos utilizou-se uma chama de ar/acetileno ($13,5 \text{ L min}^{-1}/2,0 \text{ L min}^{-1}$). Os experimentos

foram feitos com o espectrômetro trabalhando no modo sequencial rápido e todas as medidas foram baseadas nos valores de absorvância (*integrated absorbance*).

Na etapa de pré-redução, para a determinação de As e Sb, utilizou-se um banho de aquecimento Aqua wave 9376 (Barnstead Lab-Line, Alemanha).

A decomposição da amostra de ração de frango foi feita em forno de micro-ondas Milestone modelo ETHOS 1600 (Soriso, Itália) equipado com frascos de perfluoroalcoialcanos (PFA).

4.3. Sistema CF-HGAAS

Os hidretos de interesse foram gerados por meio de um sistema CF-HG acoplado ao espectrômetro de absorção atômica com chama sequencial rápido. A configuração do sistema proposto está ilustrada na Figura 4.1. Para isso, foram utilizados um separador gás-líquido e uma célula atomizadora de quartzo (acessórios do sistema VGA-77), um suporte de aço inoxidável (construído no Departamento de Química) para a adaptação do tubo de quartzo sobre o queimador, uma bomba peristáltica de 8 canais (Ismatec, modelo MCP, Suíça), tubos de Tygon de diferentes diâmetros e um controlador de fluxo de massa (ASA, Sesto San Giovanni, Itália) para controlar a taxa de fluxo do gás de arraste (Argônio, White Martins, Sertãozinho-SP).

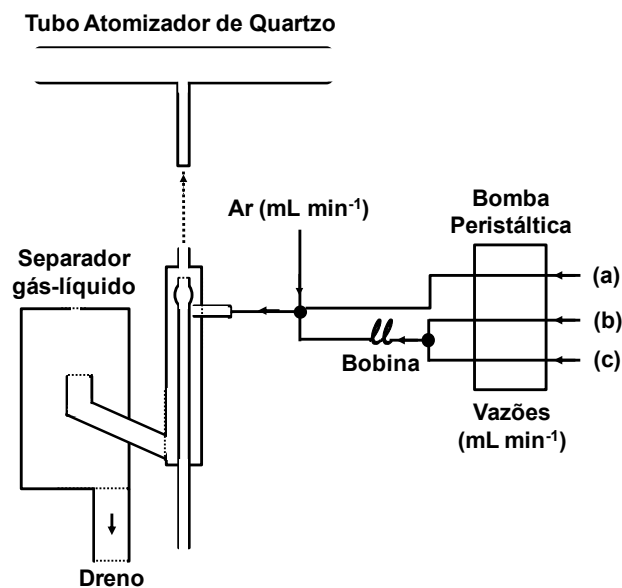


FIGURA 4.1 - Configuração do sistema CF-HGAAS para a determinação sequencial de As e Sb e Bi e Pb. Para As e Sb: (a) NaBH₄, (b) HCl e (c) amostra. Para Bi e Pb: (a) NaBH₄, (b) K₃Fe(CN)₆ e (c) amostra.

4.4. Descontaminação dos materiais

Os materiais empregados nesse trabalho foram descontaminados em banho de HNO₃ 10 % (v v⁻¹) por um período de 24 h e posteriormente enxaguados com água deionizada, obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA). Para a secagem, o material foi deixado em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil).

4.5. Amostras

As amostras de água de rio, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Pedro Sérgio Fadini, foram coletadas do rio Tietê (São Paulo) e as amostras de água do mar, gentilmente cedidas pela BSc. Luciana Fontes de Oliveira, foram coletadas na Praia Grande – Ubatuba – São Paulo. As amostras de ração de frango foram obtidas no comércio local de São Carlos – São Paulo.

4.6. Tratamento de dados

Para realizar cálculos dos planejamentos fatoriais utilizou-se o software Matlab[®] versão 7.11.0 e para a construção dos gráficos e superfícies de contorno o software OriginPro 8.

Capítulo 5

Procedimiento Experimental

5 – Procedimento Experimental

5.1. Preparo de Amostra

5.1.1. Amostra de ração de frango

A amostra de ração de frango foi previamente liofilizada e homogeneizada⁵⁸. Pesou-se uma massa de 100 mg e, em seguida, adicionou-se 2,0 mL de HCl 12 mol L⁻¹, 0,5 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹, 3,0 mL de H₂O₂ 30% m m⁻¹ e 2,5 mL de água deionizada. O programa de aquecimento do forno micro-ondas foi realizado em seis etapas e está descrito na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Programa de aquecimento utilizado no forno de radiação micro-ondas (Milestone ETHOS 1600) com frascos fechados de PFA

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	250	2
2	0	1
3	250	5
4	400	5
5	550	5
6	650	3

Depois de finalizado o programa de decomposição, era aguardado um tempo de aproximadamente 12 horas para a abertura dos frascos. Após a abertura, a amostra era transferida quantitativamente para um tubo de polietileno e armazenada sob refrigeração até o momento da determinação.

5.1.2. Amostra de água

As amostras de água do rio Tietê e água do mar da Praia Grande-Ubatuba foram acidificadas a 1% v v⁻¹ com HCl e mantidas sob refrigeração.

5.2. Determinação sequencial de As, Bi, Pb e Sb

A intenção inicial desta dissertação de mestrado era efetuar a determinação sequencial rápida dos quatro analitos em estudo. Assim, alguns testes foram realizados utilizando uma única solução oxidante 0,5 % m v⁻¹ de K₃Fe(CN)₆. Para avaliar esta possibilidade foi preparada uma solução multielementar de 10 µg L⁻¹, a partir das soluções padrão de referência dos respectivos analitos, em meio de HCl 0,09 mol L⁻¹.

5.3. Determinação sequencial de As e Sb

5.3.1. Otimização dos parâmetros

Com o intuito de melhorar a eficiência da geração de hidretos, realizou-se a otimização dos parâmetros químicos, uma vez que os parâmetros físicos do sistema CF-HG foram os mesmos utilizados por GUERRA et al.⁶ e podem ser visualizados na Tabela 5.2.

TABELA 5.2 - Parâmetros físicos utilizados para determinação de As e Sb por CF-HGAAS

Parâmetros	
Vazão do carregador e da solução de NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	1,2
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	6,8
Comprimento da bobina (cm)	60
Vazão do gás de arraste (L min ⁻¹)	140
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de leitura (s)	3

Para a otimização dos parâmetros químicos foi realizado um planejamento fatorial do tipo Doehlert⁷³, considerando as seguintes variáveis: concentração de HCl da amostra (0,2 a 1,0 mol L⁻¹), concentração de NaBH₄ (0,3 a 0,9 % m v⁻¹), concentração de HCl da solução carregadora (2,0 a 8,0 mol L⁻¹) e concentração de KI (0,2 a 1,0 % m v⁻¹). Essas variáveis foram testadas em 5, 7, 7 e 3 níveis, respectivamente. Em todos os experimentos foi utilizada uma solução multielementar de 10 µg L⁻¹ de As e Sb. Antes das determinações, essas soluções foram submetidas a um aquecimento de 80 °C em banho-maria durante 10 min (etapa de pré-redução). A Tabela 5.3 mostra as características dos 23 experimentos que foram feitos de forma aleatória para evitar erro sistemático. Três experimentos foram realizados no ponto central (variáveis normalizadas em zero), a fim de calcular a soma quadrática do erro puro.

TABELA 5.3 – Planejamento do tipo Doehlert para otimização dos parâmetros químicos na determinação sequencial de As e Sb

Experimentos	HCl amostra		NaBH ₄		HCl carregador		KI	
	Real (mol L ⁻¹)	Norm.*	Real (%)	Norm.*	Real (mol L ⁻¹)	Norm.*	Real (%)	Norm.*
1 **	0,6	0	0,6	0	5,0	0	0,6	0
2 **	0,6	0	0,6	0	5,0	0	0,6	0
3 **	0,6	0	0,6	0	5,0	0	0,6	0
4	1,0	1	0,6	0	5,0	0	0,6	0
5	0,8	0,5	0,9	0,866	5,0	0	0,6	0
6	0,8	0,5	0,7	0,289	8,0	0,817	0,6	0
7	0,8	0,5	0,7	0,289	6,0	0,204	1,0	0,791
8	0,2	-1	0,6	0	5,0	0	0,6	0
9	0,4	-0,5	0,3	-0,866	5,0	0	0,6	0
10	0,4	-0,5	0,5	-0,289	2,0	-0,817	0,6	0
11	0,4	-0,5	0,5	-0,289	4,0	-0,204	0,2	-0,791
12	0,8	0,5	0,3	-0,866	5,0	0	0,6	0
13	0,8	0,5	0,5	-0,289	2,0	-0,817	0,6	0
14	0,8	0,5	0,5	-0,289	4,0	-0,204	0,2	-0,791
15	0,4	-0,5	0,9	0,866	5,0	0,000	0,6	0
16	0,6	0	0,8	0,577	2,0	-0,817	0,6	0
17	0,6	0	0,8	0,577	4,0	-0,204	0,2	-0,791
18	0,4	-0,5	0,7	0,289	8,0	0,817	0,6	0
19	0,6	0	0,4	-0,577	8,0	0,817	0,6	0
20	0,6	0	0,6	0	7,0	0,613	0,2	-0,791
21	0,4	-0,5	0,7	0,289	6,0	0,204	1,0	0,791
22	0,6	0	0,4	-0,577	6,0	0,204	1,0	0,791
23	0,6	0	0,6	0	3,0	-0,617	1,0	0,791

*Valores normalizados

**Experimentos no ponto central

5.3.2. Estudo dos possíveis interferentes

Com o intuito de identificar as espécies interferentes na determinação de As e Sb, um estudo foi realizado considerando os constituintes comumente encontrados em amostras de águas do rio e do mar e em ração de frango, incluindo Al (III), Co (II), Cr (III), Cu (II), Fe (III), Mn (II), Ni (II) e Zn (II). Para isso, fez-se uso de

um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} ⁷⁴. Os níveis de concentração escolhidos para os possíveis interferentes foram baseados nos materiais de referência certificados (NIST 1643e e TMDW-HPS) e na análise qualitativa realizada em ICP OES (Vista AX, Varian, Melbourne, Austrália) para a ração de frango. Os maiores níveis de concentração (normalizado como +1) para Co, Cu e Fe foram 40, 300 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Al, Cr, Mn, Ni e Zn. O nível de concentração mais baixo (normalizado como -1) foi de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos. Um experimento contendo apenas os analitos foi realizado a fim de calcular a porcentagem de interferência. As concentrações dos analitos de interesse (As e Sb) foram fixados em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em todos os experimentos, foram adicionados 4,17 mL de HCl 6 mol L^{-1} , 2,08 mL de KI 12% m v^{-1} e o volume final foi ajustado com água deionizada para 25 mL. Todas as soluções foram submetidas a um aquecimento de 80 °C em banho-maria durante 10 min.

5.3.3. Estudo do efeito da concentração do HNO_3

Alguns estudos foram feitos a fim de verificar o efeito da concentração do HNO_3 na determinação de As e Sb. Para isso, foram preparadas soluções com concentrações variando de 0,25 a 20 % v v^{-1} de HNO_3 14 mol L^{-1} . Em todas as soluções, as concentrações de As e Sb foram fixadas em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram adicionados 4,17 mL de HCl 6 mol L^{-1} , 2,08 mL de KI 12% m v^{-1} e o volume final era ajustado com água deionizada para 25 mL. Antes das análises, as soluções foram submetidas a um aquecimento de 80 °C em banho-maria durante 10 min.

5.3.4. Curva Analítica de Calibração

Para a construção da curva analítica de calibração, foram utilizadas soluções com valores de concentração de 0,52 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As e Sb. Essas soluções foram preparadas diluindo-se as soluções padrão dos respectivos elementos de interesse e adicionando 4,17 mL de HCl 6 mol L^{-1} e 2,08 mL de KI 12% m v^{-1} . O volume final foi ajustado com água deionizada para 25 mL. Antes das determinações, essas soluções foram submetidas a um aquecimento a 80 °C em banho-maria durante 10 min.

5.3.5. Determinação de As e Sb nas amostras de água do rio, água do mar e ração de frango

Para a determinação de As e Sb nas amostras de água do rio e água do mar, transferiu-se 22,5 mL da amostra para um frasco graduado e adicionou-se 2,5 mL de KI 12 % m v⁻¹ e 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e ajustou-se o volume final com água deionizada até 30 mL. Para a amostra de ração de frango, transferiu-se quantitativamente a amostra digerida para um frasco graduado e adicionou-se 2,5 mL de KI 12 % m v⁻¹ e 1 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e ajustou-se o volume final com água deionizada até 30 mL.

Antes das determinações, as soluções eram submetidas a um aquecimento de 80 °C em banho-maria durante 10 min.

Os materiais de referência certificados (Nist 1643e e TMDW-HPS) foram preparados da mesma forma que as amostras correspondentes para ambos os analitos.

5.4. Determinação sequencial de Bi e Pb

5.4.1. Otimização dos parâmetros

Para a determinação sequencial de Bi e Pb, realizou-se a otimização dos parâmetros físicos e químicos. Os primeiros parâmetros otimizados foram os tempos de estabilização e de aquisição dos sinais.

O tempo necessário para a estabilização do sinal foi otimizado individualmente para cada elemento. Para isso foi preparado uma solução contendo 50 µg L⁻¹ em 0,09 mol L⁻¹ de HCl, para cada analito.

Para determinar o melhor tempo de medida, preparou-se uma solução multielementar contendo 10 µg L⁻¹ de Bi e Pb em 0,09 mol L⁻¹ de HCl e realizou-se 10 medidas para cada tempo estudado (0,5 a 4 s).

Para a otimização dos parâmetros químicos foi realizado um planejamento do tipo Doehlert, considerando três variáveis: concentração de K₃Fe(CN)₆ em 7 níveis (0,25 a 1,75 % m v⁻¹), concentração de HCl da amostra em 5 níveis (0,03 a 0,15 mol L⁻¹) e concentração de NaBH₄ em três níveis diferentes (0,25

a 1,75 % m v⁻¹). Em todos os experimentos foi utilizada uma solução multielementar de 10 µg L⁻¹ de Bi e Pb. A Tabela 5.4 mostra as características dos 15 experimentos que foram feitos de forma aleatória para evitar erro sistemático. Três experimentos foram realizados no ponto central, a fim de calcular a soma quadrática do erro puro.

TABELA 5.4 - Planejamento do tipo Doehlert para otimização dos parâmetros químicos na determinação sequencial de Bi e Pb

Experimentos	K ₃ Fe(CN) ₆		HCl amostra		NaBH ₄	
	Real (%)	Norm.*	Real (mol L ⁻¹)	Norm.	Real (%)	Norm.
1 **	1,00	0	0,09	0	1,00	0
2 **	1,00	0	0,09	0	1,00	0
3 **	1,00	0	0,09	0	1,00	0
4	1,00	0	0,15	1	1,00	0
5	1,75	0,866	0,12	0,500	1,00	0
6	1,25	0,289	0,12	0,500	1,75	0,817
7	1,00	0	0,03	-1	1,00	0
8	0,25	-0,866	0,06	-0,500	1,00	0
9	0,75	-0,289	0,06	-0,500	0,25	-0,817
10	0,25	-0,866	0,12	0,500	1,00	0
11	0,75	-0,289	0,12	0,500	0,25	-0,817
12	1,75	0,866	0,06	-0,500	1,00	0
13	1,50	0,577	0,09	0	0,25	-0,817
14	1,25	0,289	0,06	-0,500	1,75	0,817
15	0,50	-0,577	0,09	0	1,75	0,817

*Valores normalizados

**Experimentos no ponto central

Os parâmetros físicos, vazão do gás de arraste e vazão da amostra e reagentes, foram otimizados de forma univariada.

Para selecionar a melhor vazão do gás de arraste, preparou-se uma solução multielementar contendo 10 µg L⁻¹ de Bi e Pb em 0,09 mol L⁻¹ de HCl. Como agente oxidante foi utilizado uma solução de K₃Fe(CN)₆ 0,5 % m v⁻¹ e como agente redutor uma solução de NaBH₄ 1,0 % m v⁻¹. As vazões do gás de arraste foram estudadas em duas entradas distintas, como pode ser visualizado na Figura 5.1. Os três primeiros experimentos foram feitos considerando apenas a entrada de Ar 1, ou

seja, a entrada de Ar 2 estava fechada. As condições utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 5.5.

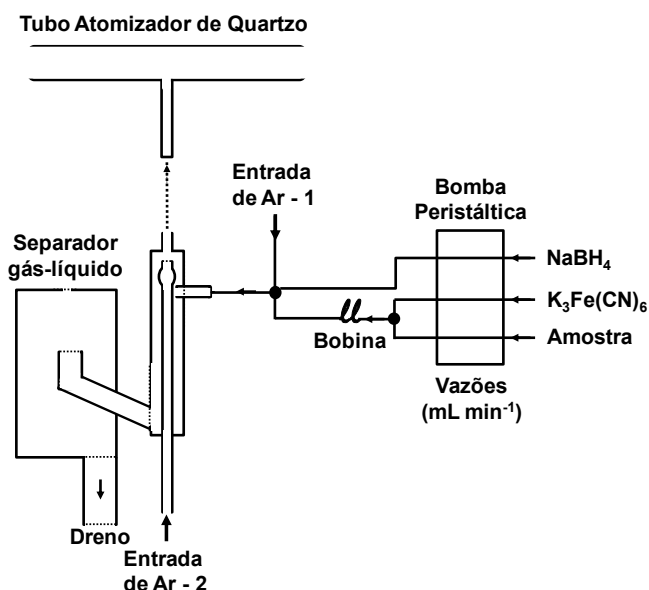


FIGURA 5.1 - Entradas utilizadas para a introdução do gás de arraste.

TABELA 5.5 - Condições utilizadas no teste da vazão do gás carregador

Experimento	Entradas	Vazão (mL min ⁻¹)
1	1	200
2	1	150
3	1	100
4	1 e 2	200
5	1 e 2	150
6	1 e 2	100

Para a otimização da vazão da amostra e dos reagentes, preparou-se soluções com concentrações variando de 2,5 a 25 µg L⁻¹ para Bi e Pb. Todas as soluções foram preparadas em 0,09 mol L⁻¹ de HCl. Como agente oxidante e agente redutor foram utilizadas as mesmas soluções empregadas para a otimização da vazão do gás de arraste. As vazões avaliadas podem ser visualizadas na Tabela 5.6.

TABELA 5.6 - Condições utilizadas no teste da vazão das soluções

Experimento	Amostra (mL min ⁻¹)	K ₃ Fe(CN) ₆ (mL min ⁻¹)	NaBH ₄ (mL min ⁻¹)
1	5,00	2,0	2,0
2	3,75	1,5	1,5
3	2,50	1,0	1,0

5.4.2. Estudo dos possíveis interferentes

Para identificar as espécies interferentes na determinação de Bi e Pb, foi realizado também um planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴ considerando os mesmos constituintes e as mesmas concentrações do planejamento utilizado para o estudo de interferentes na determinação sequencial de As e Sb (ver item 5.3.1.). As concentrações dos analitos de interesse (Bi e Pb) foram fixados em 10 µg L⁻¹ e em todos os experimentos, foram adicionados 0,375 mL de HCl 6 mol L⁻¹, e o volume final foi ajustado com água deionizada para 25 mL.

5.4.3. Estudo do efeito da concentração do HNO₃

Para verificar o efeito da concentração do HNO₃ na determinação de Bi e Pb foram preparadas soluções com concentrações variando de 0,25 a 20 % v v⁻¹ de HNO₃ 14 mol L⁻¹. Em todas as soluções foram adicionados 0,375 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e o volume final foi ajustado com água deionizada para 25 mL. A concentração de Bi e Pb foi fixada em 10 µg L⁻¹.

5.4.4. Curva Analítica de Calibração

Para a construção da curva analítica de calibração, foram utilizadas soluções com valores de concentração de 2,5 a 20 µg L⁻¹ de Bi e Pb. Essas soluções foram preparadas diluindo-se as soluções padrão dos respectivos elementos de interesse e adicionando-se 0,375 mL de HCl 6 mol L⁻¹. O volume final foi ajustado com água deionizada para 25 mL.

5.4.5. Determinação de Bi e Pb nas amostras de água do rio, água do mar e ração de frango

Para a determinação de Bi e Pb nas amostras de água do rio e água do mar, transferiu-se 22 mL da amostra para um frasco graduado e adicionou-se 0,45 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e ajustou-se o volume final com água deionizada até 30 mL. Para a amostra de ração de frango, transferiu-se 0,75 mL da amostra digerida para um frasco graduado e ajustou-se o volume final com água deionizada até 25 mL.

Os materiais de referência certificados (Nist 1643e e TMDW-HPS) foram preparados da mesma forma que as amostras correspondentes para ambos os analitos.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6.1. Estudos Preliminares

Como relatado anteriormente, a intenção inicial deste trabalho era o desenvolvimento de um método para a determinação sequencial de As, Bi, Pb e Sb. No entanto, as espécies de cada elemento estudado devem estar no mesmo estado de oxidação. Para isso, realiza-se uma etapa de pré-redução ou pré-oxidação.

De acordo com o manual do usuário dos acessórios de geração de vapor (VGA-77, Varian, Austrália), traços de KI (utilizado como agente redutor) interferem severamente nas determinações de Bi. No caso do Pb, a geração de hidretos é muito mais eficiente no estado de oxidação tetravalente⁷⁵. Dessa forma, optou-se por realizar a oxidação dos elementos de interesse, utilizando uma solução 0,5 % m v⁻¹ de K₃Fe(CN)₆.

No entanto, os valores de absorvância obtidos para As e Sb nesses testes foram muito baixos. Os estados mais altos de oxidação para As e Sb formam hidretos mais lentamente e leva a sinais menores que o estado 3+^{3, 75}.

Uma boa condição de compromisso para todos os elementos é difícil de ser alcançada utilizando o mesmo meio pré-redutor ou oxidante devido às diferenças intrínsecas de cada elemento. Assim, dois métodos foram desenvolvidos para a determinação sequencial dos elementos com propriedades de formação de hidretos semelhantes: As e Sb, Bi e Pb.

6.2. Sistema CF-HGAAS

Para a geração dos hidretos de interesse, foi proposto um sistema (Figura 4.1), no qual se utilizou apenas alguns acessórios (separador gás-líquido e uma célula atomizadora de quartzo) do sistema comercialmente disponível (VGA-77), pois de acordo com GUERRA et al.⁶ o sistema não fornece o controle de velocidade da bomba e do fluxo do gás de arraste. A principal vantagem em utilizar uma bomba e uma bobina de reação separada, é a obtenção de bons limites de detecção e frequência analítica.

6.3. Determinação sequencial de As e Sb

6.3.1 Otimização da concentração dos reagentes

Foram estudadas algumas variáveis (concentrações de HCl na amostra, HCl do carregador, NaBH₄ e KI) com o intuito de verificar se esses parâmetros químicos podem afetar o sinal de absorvância e quais as melhores condições a serem utilizadas.

Para avaliar esses parâmetros, utilizou-se um planejamento do tipo Doehlert (ver item 5.3.1). Este planejamento possui como principal característica o fato de que as diferentes variáveis podem ser testadas em diferentes números de níveis. Desta forma, as variáveis mais importantes para um dado sistema podem ser verificadas em um maior número de níveis⁷⁶.

Obtidos os valores de absorvância para cada experimento, calculou-se seus respectivos modelos e realizou-se a análise da variância para os dois elementos.

Os coeficientes de regressão (β) foram calculados através do método dos quadrados mínimos^{74, 76}, definido pela Equação 8, em que \mathbf{X}^t indica a matriz transposta de \mathbf{X} e \mathbf{y} o vetor de respostas (Absorvância).

$$\beta = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y} \quad \text{Equação 8}$$

Com os experimentos descritos no item 5.3.1 é possível efetuar o cálculo de 15 coeficientes: b0 (intercepto), 4 coeficientes lineares (b1, b2, b3 e b4), 4 coeficientes quadráticos (b11, b22, b33 e b44) e 6 coeficientes de interação (b12, b13, b14, b23, b24 e b34).

Inicialmente, os cálculos da análise de variância (ANOVA - *Analysis of Variance*) foram realizados, levando em consideração todos os 15 coeficientes (calculados utilizando o software Matlab[®] versão 7.11.0), podendo ser visualizados nas Tabelas 6.1 e 6.2.

TABELA 6.1 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para As

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,0204	14	$1,46 \times 10^{-3}$
Resíduo	$6,45 \times 10^{-4}$	8	$8,06 \times 10^{-5}$
Total	0,0211	22	$9,58 \times 10^{-4}$
Erro puro	$2,97 \times 10^{-4}$	2	$1,48 \times 10^{-4}$
Falta de ajuste	$3,48 \times 10^{-4}$	6	$5,80 \times 10^{-5}$

TABELA 6.2 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para Sb

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,0470	14	$3,36 \times 10^{-3}$
Resíduo	$1,51 \times 10^{-3}$	8	$1,88 \times 10^{-4}$
Total	0,0485	22	$2,20 \times 10^{-3}$
Erro puro	$6,70 \times 10^{-5}$	2	$3,35 \times 10^{-5}$
Falta de ajuste	$1,44 \times 10^{-3}$	6	$2,40 \times 10^{-4}$

A divisão da soma quadrática de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de grau de liberdade fornece a média quadrática (MQ). A razão entre a média quadrática da regressão (MQ_R) pela média quadrática dos resíduos (MQ_r), que nada mais é do que a razão entre duas variâncias, pode ser usada para comparar tais fontes de variação através do teste F (distribuição de Fisher), levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade⁷⁶. O mesmo pode ser feito para a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) pela média quadrática do erro puro (MQ_{ep}), conforme visualizado nas Equações 9 e 10:

$$F_{1 \text{ calculado}} = MQ_R / MQ_r \quad \text{Equação 9}$$

$$F_{2 \text{ calculado}} = MQ_{faj} / MQ_{ep} \quad \text{Equação 10}$$

Estes dois testes F têm como finalidade mostrar a qualidade do modelo gerado. Assim, é esperado que os testes F_1 e F_2 apresentem valores altos e baixos,

respectivamente, quando comparados com os valores de F tabelados com 95% de confiança (nível de probabilidade geralmente utilizado).

Assim, ao analisarmos os valores de $F_{\text{calculado}}$, temos que:

Se $F_{1 \text{ calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, o modelo de regressão é estatisticamente significativo;

Se $F_{2 \text{ calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, há uma falta de ajuste significativa ao nível de probabilidade utilizado.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 6.3.

TABELA 6.3 – Valores de F calculados e tabelados para A_s e S_b

	A_s		S_b	
	$F_{\text{calculado}}$	$*F_{\text{tabelado}}$	$F_{\text{calculado}}$	$*F_{\text{tabelado}}$
MQ_R / MQ_r	18,1	3,24	17,8	3,24
MQ_{faj} / MQ_{ep}	0,390	19,3	7,18	19,3

*Valores de F para um nível de 95 % de confiança.

Para este caso, o valor de $F_{1 \text{ calculado}}$ é maior que o valor de F_{tabelado} , e $F_{2 \text{ calculado}}$ é menor que o valor de F_{tabelado} , tanto para A_s quanto para S_b , o que indica que o modelo não possui falta de ajuste e a equação de regressão é estatisticamente significativa. No entanto, quando uma regressão é dada como significativa pelo teste F , nem sempre será útil para realizar previsões. Pode acontecer que a faixa de variação coberta pelos fatores estudados seja pequena demais, fazendo com que o efeito sobre a resposta fique mascarado pela extensão do erro experimental. Uma regra prática que pode ser empregada, é considerar regressão como útil para fins de previsão se o valor de $F_{1 \text{ calculado}}$ for, pelo menos, cerca de dez vezes maior que o valor de F_{tabelado} , no nível de confiança escolhido⁷⁴.

Sendo assim, a regressão tanto para A_s quanto para S_b , não é útil para previsão, uma vez que os valores de $F_{1 \text{ calculado}}$ são cerca de cinco vezes maiores que o valor de F_{tabelado} . Entretanto, ainda é preciso determinar quais são os coeficientes significativos, uma vez que todos os coeficientes estão sendo levados em consideração. Para isso, é necessário determinar o valor da variância para calcular os erros dos coeficientes.

Como o valor de F_2 calculado $< F$ tabelado, o valor da variância dos erros será igual a Média Quadrática dos resíduos, pois esta apresenta mais graus de liberdade que as MQ_{ep} e MQ_{faj} . Assim, o valor de t tabelado foi igual a 2,36 (Grau de liberdade dos resíduos $- 1 = 7$).

Estabelecidos os valores da variância dos erros (s^2) e de t , pode-se calcular os erros dos coeficientes e então obter os intervalos de confiança, conforme as Equações 11 e 12:

$$\text{Erros dos coeficientes} = [s^2 \times \text{Diagonal principal de } (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1}]^{0,5} \quad \text{Equação 11}$$

$$\text{Intervalo de confiança} = b \pm [t_{n-1} \times (\text{erro do coeficiente})] \quad \text{Equação 12}$$

Através dos intervalos de confiança, podemos analisar quais serão os coeficientes significativos, para um nível de 95 % de confiança. Na prática, só devemos considerar estatisticamente significativos os coeficientes, cujos valores do intervalo, não incluam o zero⁷⁴.

As Figuras 6.1 e 6.2 mostram os coeficientes significativos para As e Sb, respectivamente.

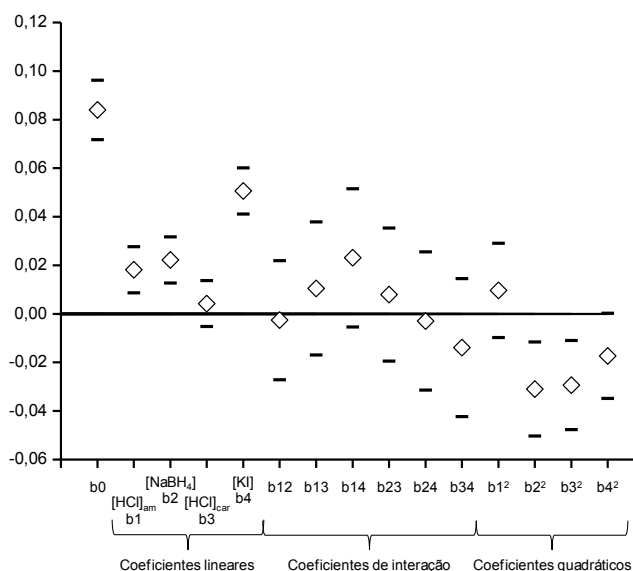


FIGURA 6.1 – Coeficientes obtidos para As.

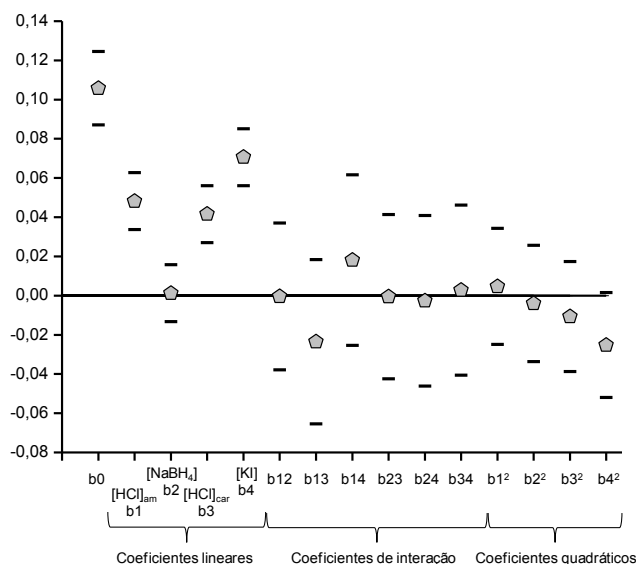


FIGURA 6.2 – Coeficientes obtidos para Sb.

Sendo assim, considerando somente os coeficientes significativos para As e Sb, temos os seguintes modelos:

$$\text{Absorbância do As} = 0,084 + 0,018 [\text{HCl}_{\text{amostra}}] + 0,022 [\text{NaBH}_4] + 0,051 [\text{KI}] - 0,031 [\text{NaBH}_4]^2 - 0,029 [\text{HCl}_{\text{carregador}}]^2$$

$$\text{Absorbância do Sb} = 0,106 + 0,048 [\text{HCl}_{\text{amostra}}] + 0,042 [\text{HCl}_{\text{carregador}}] + 0,071 [\text{KI}]$$

Em resumo, um bom modelo necessita ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Evidentemente, a maior parte da variação total das observações em torno da média deve ser descrita pela equação de regressão e o restante pelos resíduos. Da variação atribuída aos resíduos é esperado que a maior parte seja devido ao erro puro, que é o erro experimental (não modelado), e não à falta de ajuste, que está diretamente relacionada com o modelo⁷⁶.

Outro parâmetro, para observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão, é o valor do coeficiente de determinação do modelo (R^2), que pode ser obtido por meio da razão entre a soma quadrática da regressão (SQ_R) pela soma quadrática total (SQ_T) (Equação 13). O valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver resíduo e portanto, toda variação em torno da média for

explicada pela regressão. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor do coeficiente, melhor estará o ajuste do modelo às respostas observadas.

$$R^2 = \text{SQ}_R / \text{SQ}_T \quad \text{Equação 13}$$

Os valores de R^2 obtidos para As e Sb foram 0,967 e 0,969, respectivamente.

No entanto, uma nova análise de variância foi realizada para verificar se o novo modelo obtido, ou seja, o modelo considerando apenas os coeficientes válidos está bem ajustado.

Desta forma, uma nova Tabela ANOVA foi obtida para ambos os elementos e os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 6.4 e 6.5.

TABELA 6.4 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para As, considerando os coeficientes significativos

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,0189	5	$3,78 \times 10^{-3}$
Resíduo	$2,23 \times 10^{-3}$	17	$1,31 \times 10^{-4}$
Total	0,0211	22	$9,60 \times 10^{-4}$
Erro puro	$2,97 \times 10^{-4}$	2	$1,48 \times 10^{-4}$
Falta de ajuste	$1,93 \times 10^{-3}$	15	$1,29 \times 10^{-4}$

TABELA 6.5 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para Sb, considerando os coeficientes significativos

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,0452	3	0,0151
Resíduo	$3,35 \times 10^{-3}$	19	$1,76 \times 10^{-4}$
Total	0,0485	22	$2,21 \times 10^{-3}$
Erro puro	$6,70 \times 10^{-5}$	2	$3,35 \times 10^{-5}$
Falta de ajuste	$3,29 \times 10^{-3}$	17	$1,93 \times 10^{-4}$

Considerando apenas os coeficientes significativos, podemos observar que o grau de liberdade para regressão diminui e aumentam para o resíduo e a falta de ajuste, conseqüentemente, os valores da média quadrática aumentam para a regressão e diminuem para os resíduos e a falta de ajuste.

Como ocorreu alteração dos valores das médias quadráticas, os valores de F calculados também mudarão. Podemos visualizar os novos valores na Tabela 6.6.

TABELA 6.6 – Valores de F calculados e tabelados para As e Sb, considerando somente os coeficientes significativos

	As		Sb	
	F calculado	F tabelado	F calculado	F tabelado
MQ_R / MQ_r	28,8	3,24	85,4	3,24
MQ_{faj} / MQ_{ep}	0,867	19,3	5,77	19,3

*Valores de F para um nível de 95 % de confiança.

Com essa nova análise, vemos que o valor de $F_{1 \text{ calculado}}$ é maior que o valor de F_{tabelado} , e $F_{2 \text{ calculado}}$ é menor que o valor de F_{tabelado} , tanto para As quanto para Sb, indicando também que o modelo não possui falta de ajuste e a equação de regressão é estatisticamente significativa. Neste caso, a regressão também é útil para fins de previsão, já que o valor de $F_{1 \text{ calculado}}$, tanto para As quanto para Sb, é cerca de dez vezes maior que o valor tabelado.

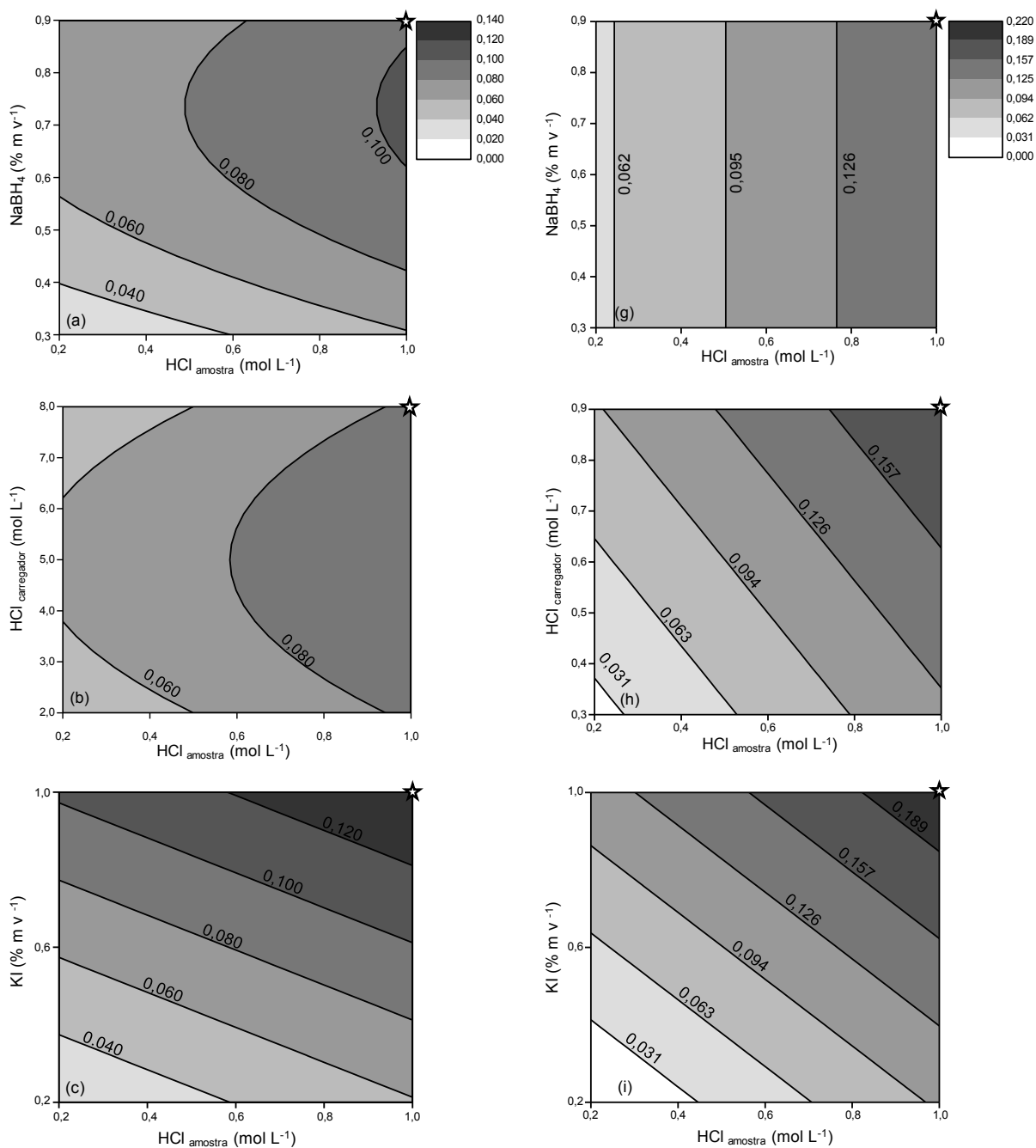
Os valores de R^2 obtidos com essa nova análise diminuíram (0,896 para As e 0,932 para Sb), mas ainda trata-se de um bom modelo, onde 89,6 % e 93,2 % da variação total em torno da média, para As e Sb respectivamente, é explicada pela regressão.

Os valores dos coeficientes, calculados pela Equação 1 sofreram poucas alterações e os modelos finais obtidos foram:

$$\text{Absorbância do As} = 0,081 + 0,018 [\text{HCl}_{\text{amostra}}] + 0,022 [\text{NaBH}_4] + 0,051 [\text{KI}] - 0,028 [\text{NaBH}_4]^2 - 0,024 [\text{HCl}_{\text{carregador}}]^2$$

$$\text{Absorbância do Sb} = 0,098 + 0,048 [\text{HCl}_{\text{amostra}}] + 0,042 [\text{HCl}_{\text{carregador}}] + 0,071 [\text{KI}]$$

Através desses modelos, foi possível obter os gráficos de contorno, que podem ser visualizados na Figura 6.3. O objetivo foi selecionar uma boa condição de trabalho para ambos os analitos, com o intuito de realizar as determinações sequencialmente.



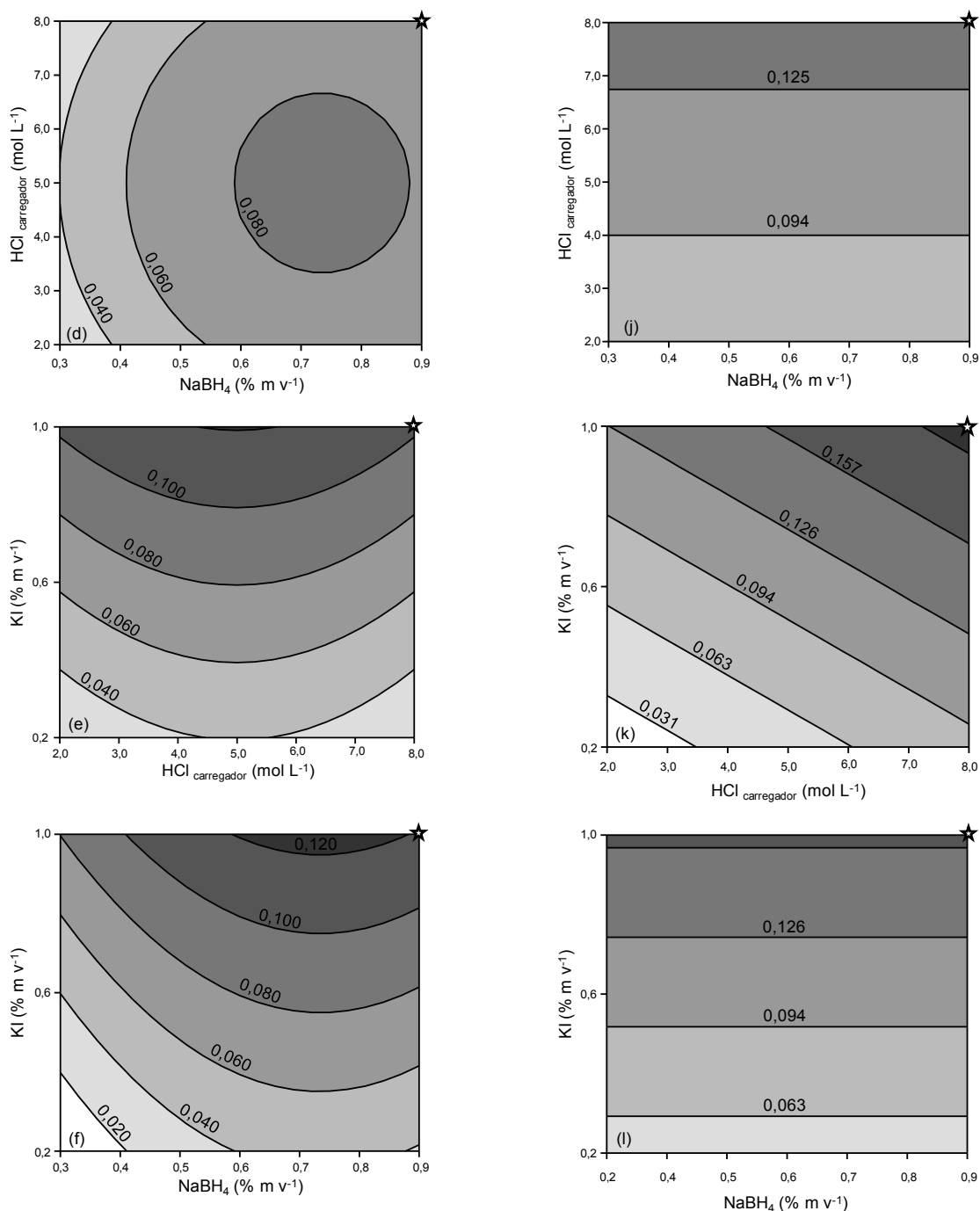


FIGURA 6.3 – Gráficos de contorno para os modelos de As (a - f) e Sb (g - l).

Com a ajuda da Figura 6.3, é possível identificar que, quando as quatro variáveis estão no nível mais alto (ver as estrelas) é possível determinar As e Sb sequencialmente na mesma amostra e obter sinais analíticos satisfatórios para ambos os analitos. Neste caso, estas condições foram fixadas para a realização dos demais experimentos.

A Tabela 6.7 resume as condições de trabalho otimizadas para o método de determinação sequencial de As e Sb.

TABELA 6.7 – Condições otimizadas utilizadas no método de determinação sequencial de As e Sb

Parâmetros químicos	Condições otimizadas
HCl _{amostra}	1,0 mol L ⁻¹
NaBH ₄	0,9 %
HCl _{carregador}	8,0 mol L ⁻¹
KI	1,0 %

6.3.2. Estudo dos possíveis interferentes

As interferências na técnica de geração de hidretos podem ocorrer na fase da reação química, durante a formação dos hidretos, na separação das espécies voláteis da fase líquida e durante atomização. Essas diferentes fontes de interferências podem ser classificadas em fase líquida (presença de oxidantes fortes e efeito de matriz) e fase gasosa (geração de vapor de concomitantes)^{23, 41}.

Entretanto, a magnitude das interferências depende de fatores como: o tipo do sistema HG, as concentrações do ácido e do agente redutor, a ordem de mistura dos reagentes e o tipo de atomizador utilizado⁴¹. Baseado nestes fatos e nos possíveis elementos presentes na amostra, um planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴ foi realizado com o intuito de identificar os possíveis interferentes na determinação de As e Sb.

A Tabela 6.8 mostra os sinais analíticos dos 16 experimentos com os valores das absorbâncias normalizadas em relação ao experimento efetuado na ausência dos concomitantes (fixado em 100%).

TABELA 6.8 – Resultados da influência dos possíveis interferentes no sinal analítico do As e Sb

Experimentos	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Cr	Al	Absorbância normalizada (%) para As	Absorbância normalizada (%) para Sb
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	111	105
2	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	109	101
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	111	102
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	106	110
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	102	102
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	113	103
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	110	101
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	111	110
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	110	101
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	113	110
11	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	103	98
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	103	102
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	107	96
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	107	98
15	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	112	101
16	1	1	1	1	1	1	1	1	115	104

Apesar de sistemas que utilizam a geração de hidretos apresentarem problemas de interferência, a presença de concomitantes, nas concentrações estudadas, empregando o método proposto, não afetou significativamente o sinal analítico do As e Sb, visto que as variações ficaram geralmente abaixo de 15 % para As e 5 % para Sb, e os contrastes variaram de -2 % a 5 %, como pode ser visto nas Figuras 6.4 e 6.5.

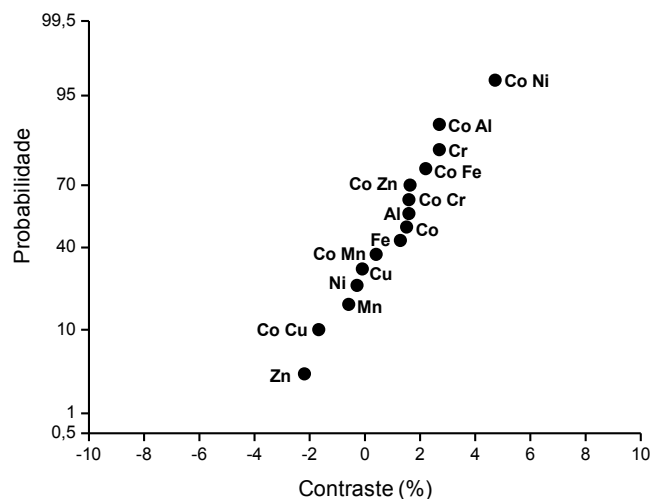


FIGURA 6.4 – Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o As.

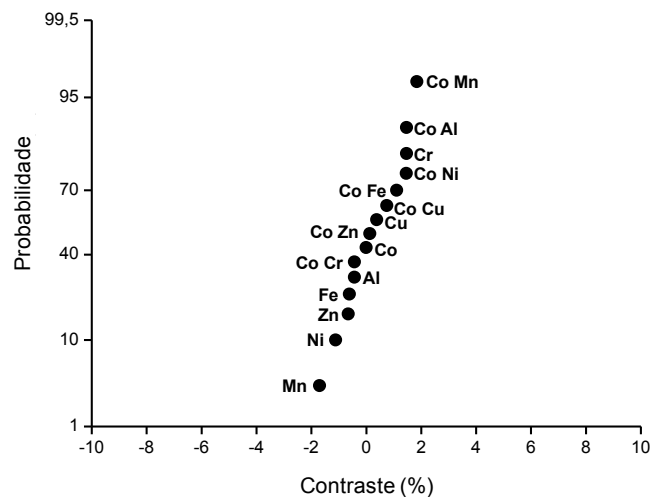


FIGURA 6.5 – Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Sb.

6.3.3. Estudo do efeito da concentração do HNO_3

Como já descrito anteriormente, na geração de hidretos, a presença de ácidos oxidantes, como o HNO_3 e H_2SO_4 , são fontes potenciais de interferência.

Devido o HNO_3 ser um ácido muito utilizado para a decomposição da amostra, realizou-se um estudo para verificar a partir de qual concentração ocorre, de forma mais pronunciada, o efeito supressor na absorvância. A Figura 6.6 ilustra os resultados obtidos.

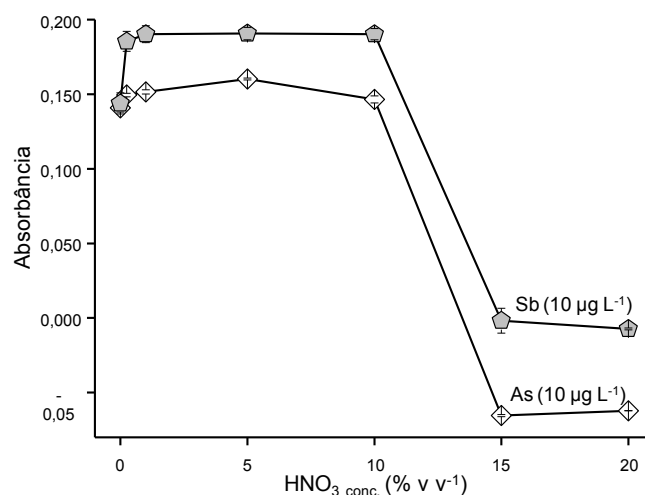


FIGURA 6.6 - Influência da concentração de HNO₃ na determinação de As e Sb.

Os resultados mostram que, se a concentração de HNO₃ nas amostras for inferior a 10 % v v⁻¹, não haverá redução no sinal analítico para as determinações de As e Sb. Dessa forma, se alguma amostra for decomposta utilizando HNO₃, deve-se utilizar uma concentração reduzida, de maneira que a concentração final de HNO₃ na amostra não ultrapasse 10 % v v⁻¹, minimizando a possibilidade de ocorrer algum tipo de interferência por ácidos residuais.

Devido a essas condições, a amostra de ração de frango decomposta em meio ácido, possuía uma concentração de HNO₃ inferior em relação à concentração de HCl (razão 1:4). No final, quando a solução digerida era diluída para 30 mL (ver item 5.3.5), a concentração final de HNO₃ na solução era de 1,7 % v v⁻¹.

6.3.4. Desempenho Analítico

Após realizar todas as otimizações, uma curva de calibração foi obtida para cada elemento estudado (As e Sb), as quais podem ser visualizadas nas Figuras 6.7 e 6.8. Alguns parâmetros analíticos também foram determinados e estão apresentados na Tabela 6.9. Os Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ou seja, utilizando 10 leituras do branco analítico,

bem como a sensibilidade do método, como apresentado pelas Equações 14 e 15, respectivamente:

$$LD (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \times \sigma_{\text{branco}} / s^* \quad \text{Equação 14}$$

$$LQ (\mu\text{g L}^{-1}) = 10 \times \sigma_{\text{branco}} / s^* \quad \text{Equação 15}$$

s^* = coeficiente angular da curva de calibração

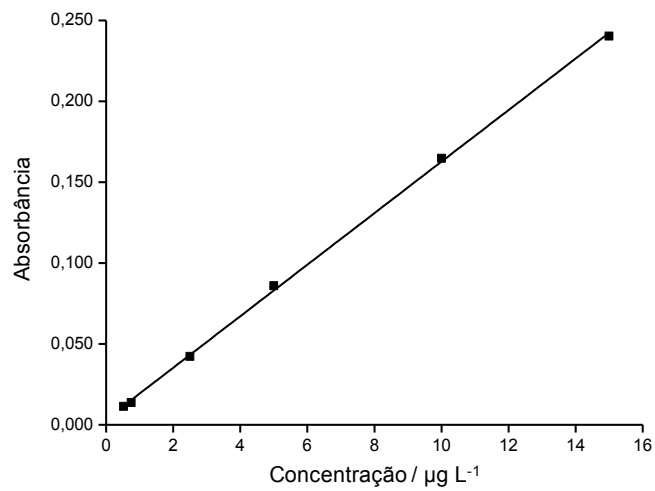


FIGURA 6.7 – Curva de calibração para As, obtida nas condições otimizadas do método.

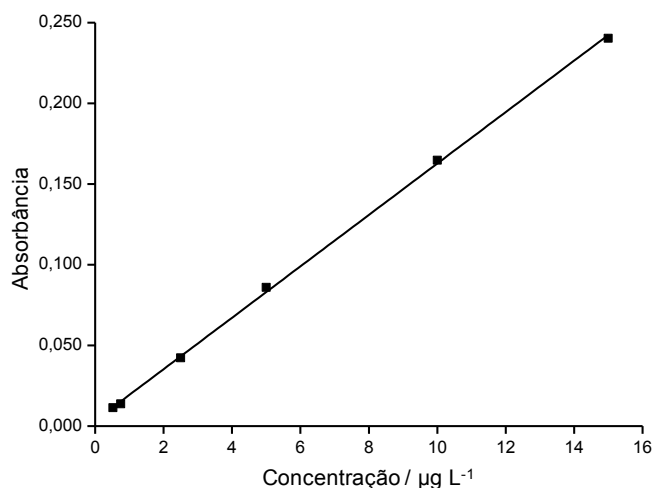


FIGURA 6.8 – Curva de calibração para Sb, obtida nas condições otimizadas do método.

TABELA 6.9 – Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de As e Sb, após a otimização do método

Parâmetros	As	Sb
Equação da reta	$y = 0,0151 x + 0,0043$	$y = 0,0159 x + 0,0034$
Coefficiente de regressão (r)	0,999	0,999
Faixa linear / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,52 – 15	0,52 – 15
Limite de detecção / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,15	0,16
Limite de Quantificação / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,49	0,52
Reprodutibilidade / %	1,5 %	2,0 %
Frequência analítica teórica (determinações por hora)	275	275

Para o cálculo da precisão (reprodutibilidade), foi determinado o desvio padrão relativo (RSD - *Relative Standard Deviation*) de 10 medidas de uma solução multielementar contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e Sb.

O método apresentou bons resultados, demonstrando ser reprodutivo, com RSD's menores que 10 % e com bons limites de detecção ($0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ para As e Sb, respectivamente). Sendo assim, o método apresenta sensibilidade adequada para atender as exigências do CONAMA⁶⁹, para a determinação de As e Sb.

6.3.5. Teste de exatidão

Uma das maneiras empregadas para avaliar a exatidão do método proposto é a utilização de materiais de referência certificados. Dessa forma, dois CRMs foram selecionados (Nist 1643e (Trace elements in water) e TMDW-HPS (Trace metals in drinking water)) para avaliar a exatidão do método proposto na determinação de As e Sb.

Os resultados da Tabela 6.10, mostram os valores encontrados utilizando o método proposto e os valores certificados. As recuperações obtidas estão na faixa de 88 - 92 % e 99 % para As e Sb, respectivamente. No caso do Sb, os valores encontrados, ao nível de confiança de 95%, estão de acordo com aqueles certificados (verificado através de um teste *t* não pareado), mas no caso do As, segundo os testes estatísticos há diferenças entre os valores encontrados e os valores certificados, entretanto, obteve-se boas recuperações, considerando que as concentrações dos analitos estão muito baixas.

TABELA 6.10 - Determinação de As e Sb em dois diferentes materiais de referência certificados empregando o método proposto

Material de referência certificado	Elemento	Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n = 3)	Recuperação (%)
Nist 1643e	As	60,45 \pm 0,72	55,68 \pm 1,34	92
TMDW-HPS	As	80	70,7 \pm 0,4	88
Nist 1643e	Sb	58,30 \pm 0,61	57,79 \pm 0,49	99
TMDW-HPS	Sb	10	9,9 \pm 0,1	99

6.3.6. Aplicação

O método proposto foi empregado na determinação sequencial de As e Sb em amostras de água do rio Tietê, água do mar da Praia Grande – Ubatuba e em amostra de ração de frango. A Tabela 6.11 contém os valores encontrados para As e Sb nas amostras estudadas.

TABELA 6.11 – Concentrações de As e Sb encontrados nas amostras

Amostra	As	Sb
Água do rio Tietê	0,38 ± 0,05 µg L ^{-1*}	1,20 ± 0,03 µg L ⁻¹
Água do mar	1,36 ± 0,04 µg L ⁻¹	0,24 ± 0,08 µg L ^{-1*}
Ração de frango	2,02 ± 0,04 mg kg ⁻¹	< 0,16 (LD)

*Valores entre LD e LQ

No caso da amostra de ração de frango, o valor encontrado de As, foi comparado com o valor informado, para a mesma amostra, no trabalho de DINÍSIO et al.⁵⁸ utilizando a GFAAS. O objetivo foi analisar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos e de acordo com o teste *t* pareado (com 95 % de confiança), o valor determinado para As utilizando o método proposto (2,02 ± 0,04 mg kg⁻¹) apresentou concordância com o valor obtido de As na mesma amostra, utilizando a técnica comparativa (2,74 ± 0,18 mg kg⁻¹).

Os valores obtidos de As e Sb, nas amostras de água do rio e água do mar, estão abaixo das concentrações máximas recomendadas pelo CONAMA, que estabelece, na resolução 357, uma concentração máxima de 10 µg L⁻¹ para As e 5 µg L⁻¹ para Sb⁶⁹.

6.4. Determinação sequencial de Bi e Pb

6.4.1 Avaliação do tempo de estabilização e tempo de leitura

O primeiro parâmetro considerado neste estudo foi o tempo necessário para o sinal de absorvância atingir a estabilidade. Quando utiliza-se como modo de introdução o fluxo contínuo, tem-se uma situação em que o volume do atomizador é preenchido com as espécies de hidretos e atinge-se o equilíbrio de entrada de amostra e saída de átomos no estado fundamental. Nesta fase o sinal de absorvância é constante e é neste momento que torna-se possível determinar os analitos no modo sequencial rápido.

Para a otimização desse parâmetro, também foi considerado o tempo necessário para a linha de base retornar ao zero, a fim de evitar efeitos de memória. A Figura 6.9 mostra o perfil do sinal, obtido separadamente para cada analito.

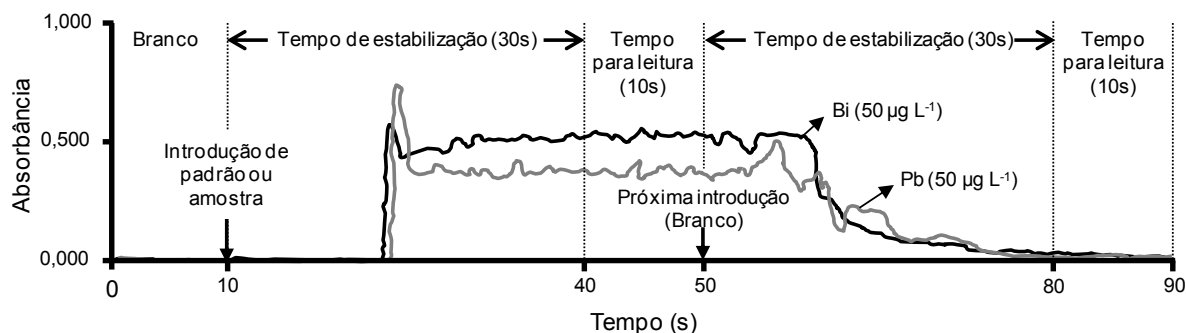


FIGURA 6.9 – Perfil do sinal de Bi (linha preta) e Pb (linha cinza) para avaliação do tempo de estabilização.

A Figura 6.9 mostra os sinais de Bi (linha preta) e Pb (linha cinza) quando a solução multielementar foi introduzida após 10 s de medição do branco analítico. É possível observar que após 30 s de tempo de estabilização, os sinais dos analitos estão estáveis e podem ser obtidos em uma janela de tempo de 10s (tempo para leitura). Logo após, a fim de verificar se 30 s era realmente suficiente para a estabilização do sinal, introduziu-se imediatamente água deionizada (branco) e observou-se que o tempo foi suficiente para a linha de base retornar ao zero (como no início).

Após selecionar o tempo de estabilização para a determinação de Bi e Pb, foi realizado um estudo para verificar o tempo necessário para a aquisição dos sinais. Para isso, diferentes tempos de integração, de 0,5 a 4 segundos, foram avaliados através da determinação do desvio padrão relativo (RSD) obtido para 10 medições. A Figura 6.10 ilustra os resultados obtidos.

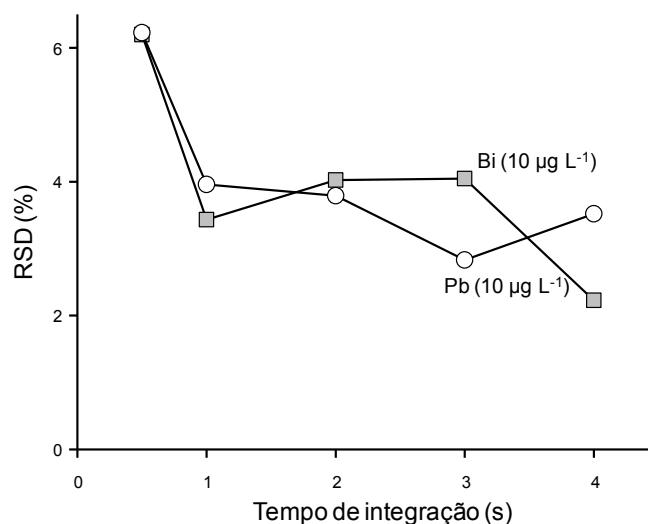


FIGURA 6.10 – Valores de RSD (%) obtidos para 10 medidas de uma solução contendo Bi e Pb (ambos $10 \mu\text{g L}^{-1}$) para avaliar o tempo de leitura.

Como pode ser observado na Figura 6.10, os valores de RSD foram cerca de 6% (os valores mais elevados), utilizando um tempo de integração de 0,5 s. Não houve diferenças significativas nos valores de RSD para os tempos de integração de 1 a 4 segundos. Neste caso, foi selecionada uma condição intermediária: 3 segundos de tempo de medição para cada elemento com valores de RSD normalmente aceitos em análises de rotina (4,5% Bi e Pb 3,1%). Portanto, após 30 s de tempo de estabilização, Bi e Pb podem ser determinados em 6 segundos, resultando em uma frequência analítica teórica de 200 determinações por hora.

6.4.2. Otimização da concentração dos reagentes

Primeiramente, realizou-se a otimização dos parâmetros químicos, utilizando um planejamento do tipo Doehlert para três variáveis (ver item 5.4.1). No entanto, as condições iniciais dos parâmetros físicos utilizados para realizar esse planejamento foram baseadas no trabalho de AFONSO et al.⁷⁷, que montaram um sistema para determinação simultânea de Bi, Pb e Sn, utilizando a técnica de geração de hidretos acoplada à ICP-OES. As condições iniciais utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 6.12.

TABELA 6.12 – Condições iniciais dos parâmetros físicos utilizadas para determinação de Bi e Pb por CF-HGAAS

Parâmetros	
Vazão do carregador e da solução de NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	2,0
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	5,0
Comprimento da bobina (cm)	80
Vazão do gás de arraste (L min ⁻¹)	140

A princípio, foi realizado um planejamento fatorial do tipo Doehlert considerando três variáveis: concentração de NaBH₄ em 7 níveis (0,4 a 2,2 % m v⁻¹), concentração de HCl da amostra em 5 níveis (0,03 a 0,15 mol L⁻¹) e concentração de K₃Fe(CN)₆ em três níveis diferentes (2,0 a 4,0 % m v⁻¹). No entanto, após o tratamento dos dados, nenhuma variável foi considerada significativa, nos intervalos de concentração estudados. Dessa forma, foi feito um novo planejamento Doehlert, atribuindo diferentes níveis e diferentes concentrações para as variáveis NaBH₄ e K₃Fe(CN)₆, (conforme descrito no item 5.4.1). Neste caso, optou-se por analisar um intervalo com concentrações mais baixas, para as duas variáveis, com o intuito de evitar a rápida deteriorização da superfície do tubo de quartzo.

Obtidos os valores de absorvância para esse novo planejamento Doehlert, realizou-se a análise da variância para os dois elementos, considerando todos os coeficientes (10 ao todo). Os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 6.13 e 6.14.

TABELA 6.13 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para Bi

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	1,44 x 10 ⁻³	9	1,61 x 10 ⁻⁴
Resíduo	8,37 x 10 ⁻⁴	5	1,67 x 10 ⁻⁴
Total	2,28 x 10 ⁻³	14	1,63 x 10 ⁻⁴
Erro puro	5,42 x 10 ⁻⁶	2	2,71 x 10 ⁻⁶
Falta de ajuste	8,32 x 10 ⁻⁴	3	2,77 x 10 ⁻⁴

TABELA 6.14 – Tabela de análise de variância (ANOVA) para Pb

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de Grau de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,0724	9	$8,04 \times 10^{-3}$
Resíduo	0,0142	5	$2,84 \times 10^{-3}$
Total	0,0866	14	$6,18 \times 10^{-3}$
Erro puro	$1,12 \times 10^{-4}$	2	$5,59 \times 10^{-5}$
Falta de ajuste	0,0141	3	$4,69 \times 10^{-3}$

Para este caso, o valor de $F_{1 \text{ calculado}}$ é menor que o valor de F_{tabelado} , e $F_{2 \text{ calculado}}$ é maior que o valor de F_{tabelado} , tanto para Bi quanto para Pb, conforme podemos ver na Tabela 6.15. Isso indica que o modelo possui falta de ajuste e a equação de regressão não é estatisticamente significativa.

TABELA 6.15 – Valores de F calculados e tabelados para Bi e Pb

	Bi		Pb	
	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
MQ_R / MQ_r	0,959	4,77	2,84	4,77
$MQ_{\text{faj}} / MQ_{\text{ep}}$	102	19,2	83,9	19,2

*Valores de F para um nível de 95 % de confiança.

Entretanto, ainda é preciso determinar quais são os coeficientes significativos, uma vez que todos os coeficientes estão sendo levados em consideração. Para isso, é necessário determinar o valor da variância para calcular os erros dos coeficientes.

Como o valor de $F_{2 \text{ calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, o valor da variância dos erros será igual a Média Quadrática da falta de ajuste e o valor de t de 4,30 (Grau de liberdade da falta de ajuste – 1 = 2).

Estabelecidos os valores da variância dos erros e de t, pode-se calcular os erros dos coeficientes, obter os intervalos de confiança e então analisar quais são os coeficientes significativos. As Figuras 6.11 e 6.12 mostram os coeficientes para Bi e Pb, respectivamente.

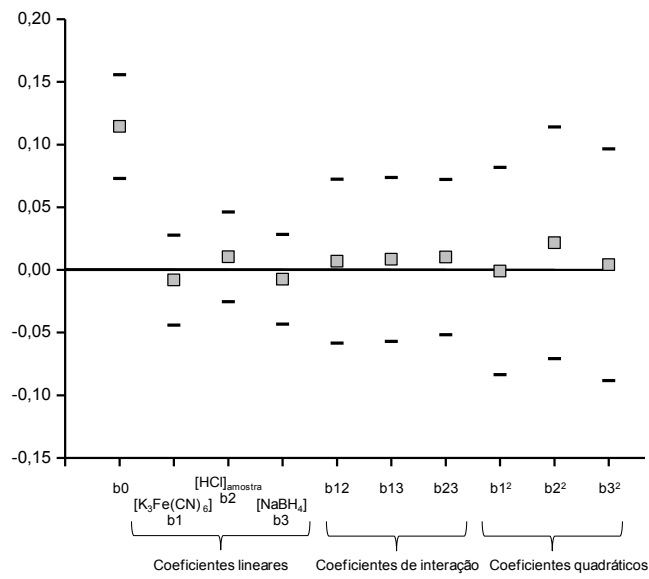


FIGURA 6.11 – Coeficientes obtidos para Bi.

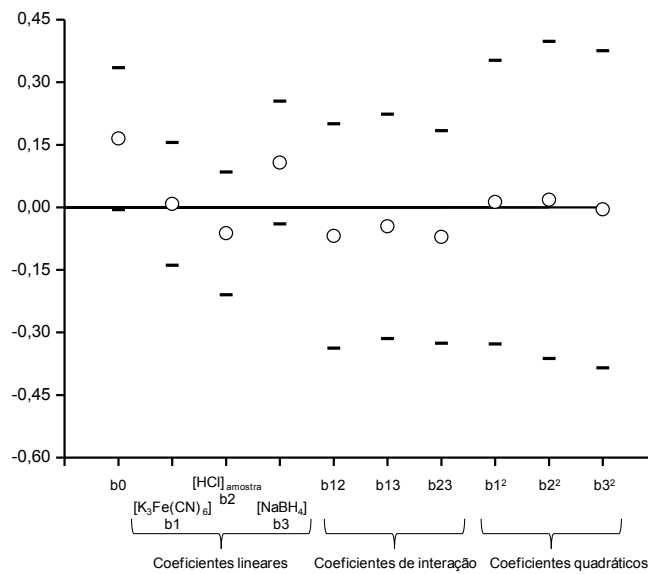


FIGURA 6.12 – Coeficientes obtidos para Pb.

Ao analisarmos as Figuras 6.11 e 6.12, vemos que apenas o modelo para o Bi apresenta um coeficiente válido, o intercepto (b_0):

Absorbância do Bi = 0,114

Neste caso, como apenas o intercepto (b_0) foi o coeficiente válido para o modelo do Bi e nenhum coeficiente foi válido para o modelo do Pb, qualquer condição de análise descrita na Tabela 5.4 pode ser utilizada. Sendo assim, optou-se por trabalhar em condições intermediárias, conforme mostra a Tabela 6.16.

TABELA 6.16 – Condições utilizadas no método de determinação sequencial de Bi e Pb

Parâmetros químicos	Condições
$K_3Fe(CN)_6$	0,5 % m v ⁻¹
HCl amostra	0,09 mol L ⁻¹
NaBH ₄	1,0 % m v ⁻¹

6.4.3. Otimização das vazões do gás de arraste e das soluções

O argônio é frequentemente utilizado como gás de arraste, e trata-se de uma variável importante, uma vez que é o gás responsável por transportar os hidretos até o atomizador. Foi realizado um estudo, considerando três diferentes vazões (100, 150 e 200 mL min⁻¹). A Figura 6.13 ilustra os resultados obtidos.

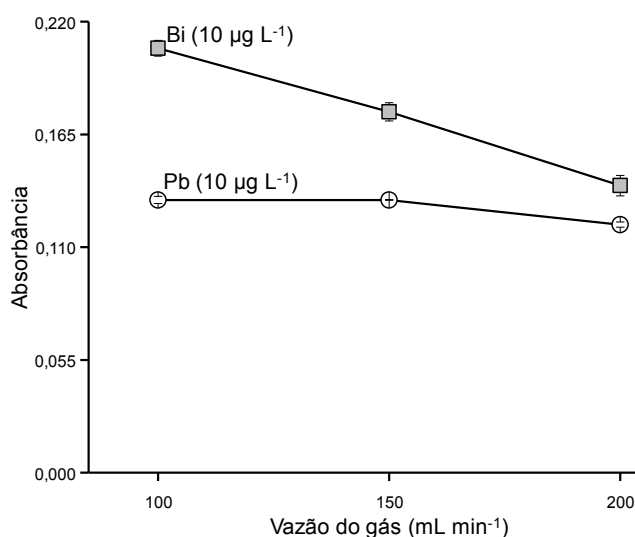


FIGURA 6.13 - Efeito da vazão do gás de arraste (Ar) na eficiência da geração de hidretos para determinação de Bi e Pb (ambos 10 µg L⁻¹).

A melhor vazão foi selecionada considerando-se o mínimo de ruído e o máximo de sensibilidade. Como podemos visualizar na Figura 6.13, a melhor condição obtida foi em 100 mL min^{-1} . No caso do Pb, a variação da vazão não produziu grande influência no sinal analítico e a absorbância variou de 0,133 (100 mL min^{-1}) a 0,121 (200 mL min^{-1}). No entanto, o sinal analítico para Bi foi 68 % menor em 200 mL min^{-1} comparado com 100 mL min^{-1} .

Apesar dos hidretos estarem sendo formados continuamente, resultando em um sinal estacionário, a estabilidade deste sinal depende da relação dos fluxos da amostra e das soluções de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e NaBH_4 . Vazões baixas, além de deixar o sistema com baixa frequência analítica, não oferecem bons sinais de absorbância, entretanto, a intensidade do sinal de absorbância tende a crescer até um valor limite, pois altas vazões podem fornecer um tempo curto para a completa reação de formação do hidreto.

Com o intuito de avaliar esse efeito da vazão sobre a curva analítica, um estudo foi realizado variando-se as vazões da amostra (5,0; 3,75 e $2,5 \text{ mL min}^{-1}$) e das soluções de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e NaBH_4 (2,0; 1,5 e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$).

As Figuras 6.14 e 6.15 mostram os efeitos resultantes nas curvas analíticas ($2,5\text{-}25 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidas para Bi e Pb. Como pode ser observado, um aumento na vazão dos reagentes, na faixa estudada, leva a um aumento da inclinação da curva analítica. Assim, as vazões 5 mL min^{-1} para a amostra e $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ para $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e NaBH_4 foram consideradas as mais adequadas para o sistema estudado, uma vez que foram obtidos os melhores valores de LD ($0,60 \mu\text{g L}^{-1}$ para Bi e $0,77 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb) comparando-se com as demais vazões.

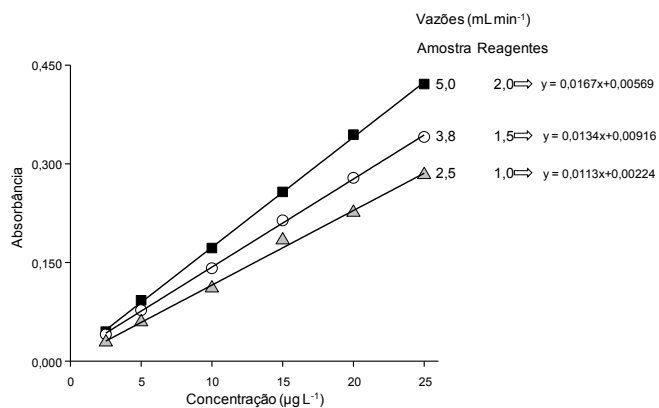


FIGURA 6.14 – Efeito das vazões da amostra e dos reagentes na curva analítica para Bi.

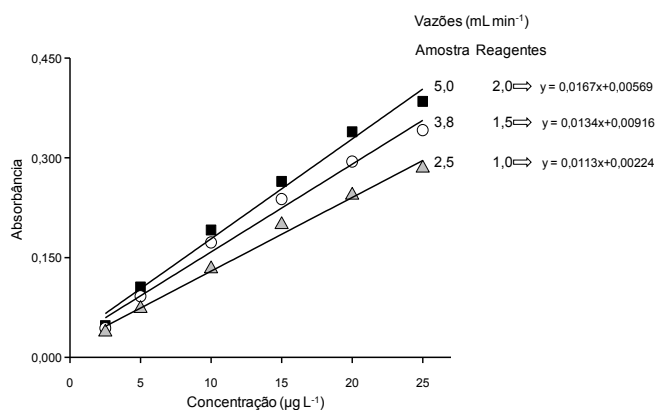


FIGURA 6.15 – Efeito das vazões da amostra e dos reagentes na curva analítica para Pb.

6.4.4. Estudo dos possíveis interferentes

O mesmo estudo utilizado para a identificação dos interferentes na determinação sequencial de As e Sb, foi realizado para a determinação de Bi e Pb.

A Tabela 6.17 mostra os resultados dos sinais analíticos dos 16 experimentos com os valores das absorbâncias normalizadas em relação ao experimento efetuado na ausência de concomitantes (fixado em 100%).

TABELA 6.17 – Resultados da influência dos possíveis interferentes no sinal analítico do Bi e Pb

Experimentos	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Cr	Al	Absorbância normalizada (%) para Bi	Absorbância normalizada (%) para Pb
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	99	147
2	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	116	74
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	114	2
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	113	0
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	113	32
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	118	35
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	121	-1
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	119	-2
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	119	100
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	106	52
11	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	106	7
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	116	1
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	112	25
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	114	29
15	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	113	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	117	-6

Ao analisarmos a Tabela 6.17, podemos observar que as variações para o Bi estão entre -1 % a 21 %. No entanto ao analisarmos a Figura 6.16, que ilustra os contrastes obtidos para cada concomitante estudado e suas devidas interações, vemos que as variações ficaram entre -4 a 5 %. Sendo assim, podemos considerar que o efeito individual desses concomitantes não afetou significativamente o sinal analítico do Bi.

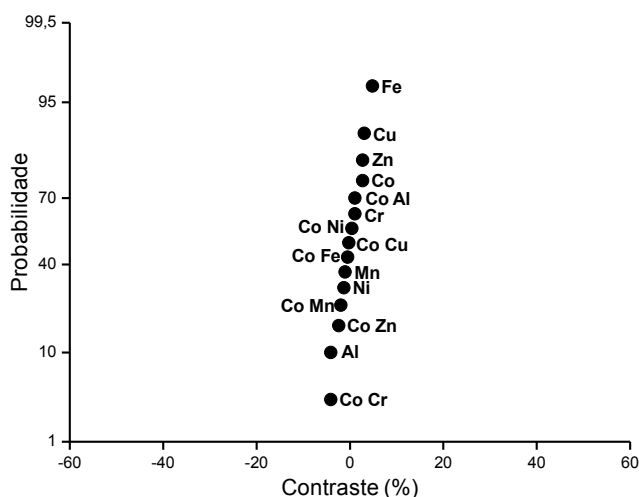


FIGURA 6.16 – Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Bi.

No caso do Pb, observa-se uma forte alteração do sinal de absorvância, uma vez que as variações ficaram entre -106 a 47 %. Ao analisarmos a Figura 6.17, vemos através dos contrastes que as principais alterações são causadas pelo Co, Cu, Fe e Ni.

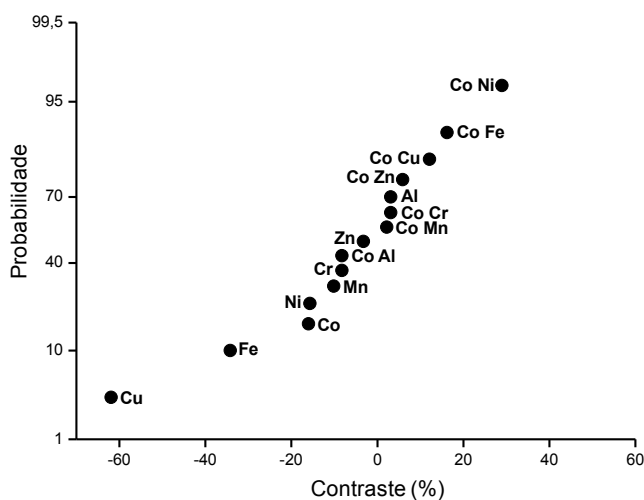


FIGURA 6.17 – Gráfico de probabilidades com os valores de contraste para o Pb.

De acordo com KUMAR et al.⁴¹, a faixa livre de interferências pode ser estendida aumentando a concentração de HCl na solução, pois assim, aumenta-se a solubilidade dos íons metálicos, impedindo a redução e precipitação. No entanto, se a concentração de HCl for maior que $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, uma forte supressão do sinal de

absorbância do Pb é observada. Dessa forma, optou-se em utilizar agentes mascarantes, como a tiouréia, que são agentes complexantes utilizados para mascarar interferências causadas por íons metálicos presentes nas amostras.

6.4.5. Estudo do efeito da concentração do HNO_3

O mesmo estudo realizado na determinação de As e Sb, para verificar a partir de qual concentração ocorre de forma mais pronunciada o efeito supressor do HNO_3 no sinal de absorbância, foi realizado na determinação de Bi e Pb. A Figura 6.18 ilustra os resultados obtidos.

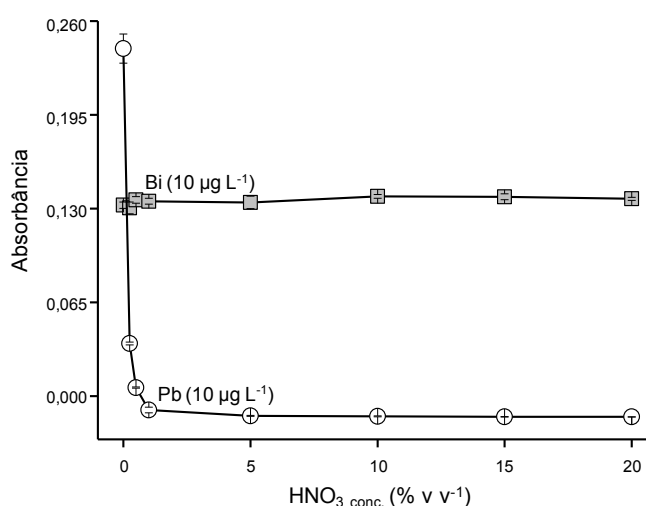


FIGURA 6.18 - Influência da concentração de HNO_3 na determinação de Bi e Pb.

Podemos observar que no caso do Bi, não houve mudança significativa no sinal de absorbância, para as concentrações de HNO_3 estudada. No entanto, no caso do Pb, uma forte supressão do sinal de absorbância é observada, a partir de 0,25 % v v⁻¹ de HNO_3 14 mol L⁻¹ em solução.

Devido a essas condições, a amostra de ração de frango decomposta em meio ácido (HNO_3 :HCl - 1:4), no final, foi diluída aproximadamente 33 vezes (ver item 5.4.5), de modo que a concentração final de HNO_3 na solução era de 0,188 % v v⁻¹.

6.4.6. Desempenho Analítico

Realizadas todas as otimizações, uma curva de calibração foi obtida para Bi e outra Pb, as quais podem ser visualizadas nas Figuras 6.19 e 6.20. Alguns parâmetros analíticos também foram determinados e estão apresentados na Tabela 6.18. Os Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e a reprodutibilidade foram calculados da mesma maneira que para determinação de As e Sb (ver item 6.3.4).

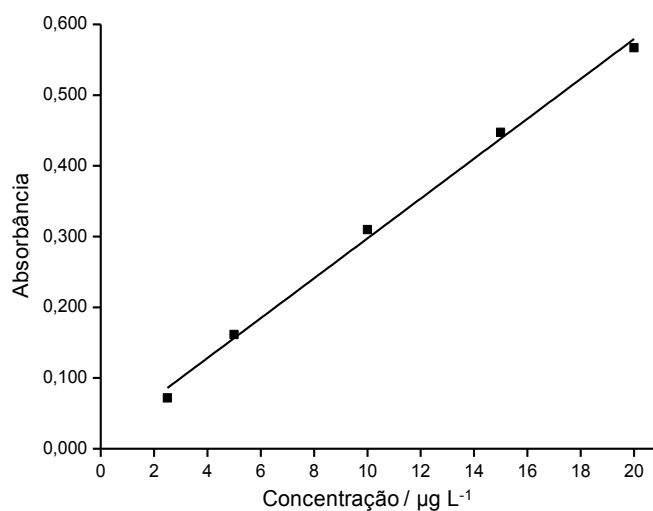


FIGURA 6.19 – Curva de calibração para Bi, obtida nas condições otimizadas do método.

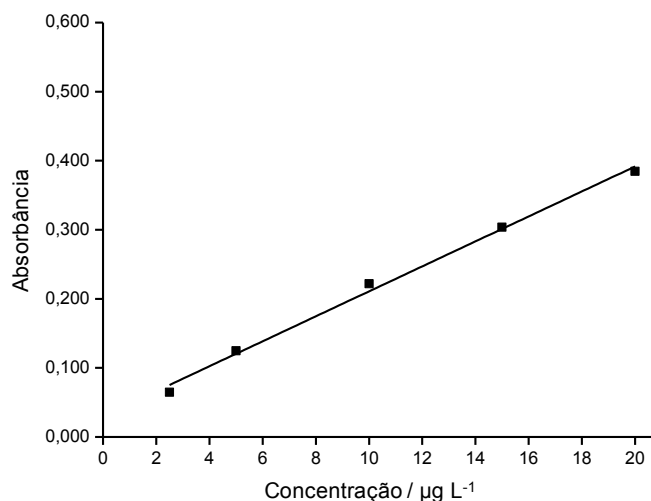


FIGURA 6.20 – Curva de calibração para Pb, obtida nas condições otimizadas do método.

TABELA 6.18 – Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de Bi e Pb, após a otimização do método

Parâmetros	Bi	Pb
Equação da reta	$y = 0,028x + 0,015$	$y = 0,018x + 0,031$
Coefficiente de regressão (r)	0,998	0,997
Faixa linear / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,5 – 20	2,5 – 20
Limite de Detecção / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,60	0,77
Limite de Quantificação / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,0	2,5
Reprodutibilidade / %	5,9 %	6,0 %
Frequência analítica teórica (determinações por hora)	200	200

O método apresentou bons resultados, demonstrando ser reprodutivo, com desvios padrão relativos (RSD) menores que 10 % e com bons limites de detecção, atendendo as exigências do CONAMA⁶⁹, para a determinação de Bi e Pb.

6.4.7. Teste de exatidão

Os dois materiais de referência certificados selecionados ((Nist 1643e (Trace elements in water) e TMDW-HPS (Trace metals in drinking water)) para

avaliar a exatidão do método proposto na determinação de As e Sb, foram também utilizados para Bi e Pb. A Tabela 6.19 contém os resultados obtidos.

TABELA 6.19 - Determinação de Bi e Pb em dois diferentes materiais de referência certificados empregando o método proposto

Material de referência certificado	Elemento	Certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n = 3)	Recuperação (%)
Nist 1643e	Bi	14,09 \pm 0,15	14,54 \pm 1,34	107
TMDW-HPS	Bi	10	11,6 \pm 1,7	116
Nist 1643e	Pb	19,63 \pm 0,21	< LD	-
TMDW-HPS	Pb	40	< LD	-

Os valores encontrados nos diferentes CRMs, para o Bi, apresentaram boa concordância com os valores certificados (verificado através de um teste *t* não pareado) e as recuperações estão na faixa de 116-107 %.

No caso do Pb, não foram observados sinais de absorbância. Isto pode ser devido à alta concentração de HNO₃ e à interferência de metais presentes na composição de ambos os CRMs. A concentração de HNO₃, nos materiais de referência certificados, variam de 2 (TMDW-HPS) a 6 % v v⁻¹ (NIST 1643e) e a soma das concentrações de Co, Cu, Fe e Ni é de 210 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos CRMs.

Com o intuito de minimizar a interferência, foi feito um estudo adicionando-se diferentes concentrações de tiouréia (2,5; 5 e 10 % m v⁻¹) nos materiais de referência certificados, no entanto, não foi observada qualquer melhoria do sinal de absorbância.

6.4.8. Aplicação

O método proposto foi empregado na determinação sequencial de Bi e Pb em amostras de água do rio Tietê, água do mar da Praia Grande – Ubatuba e em amostra de ração de frango. Entretanto, em todas as amostras testadas, as concentrações de Bi e Pb ficaram abaixo dos limites de detecção.

O CONAMA estabelece, na resolução 357, uma concentração máxima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb, mas neste caso, todos os valores encontrados, para ambos os analitos, estão abaixo do limite de detecção⁶⁹.

Com o intuito de verificar se o sinal analítico do Pb estava sofrendo supressão devido aos interferentes presente na amostra, realizou-se sua determinação utilizando TS-FF-AAS⁵⁵, que possui limite de detecção de $4,4 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb. No entanto, nenhum sinal de absorbância foi observado, indicando que a concentração desses elementos presentes nas amostras de água do rio e do mar é muito baixa, não sendo possível quantificá-las através desses métodos.

Capítulo 7

Conclusões

7 – Conclusões

Os métodos desenvolvidos apresentam-se como uma boa alternativa aos principais métodos espectroanalíticos já consolidados, para a determinação sequencial rápida de elementos formadores de hidretos presentes em baixas concentrações nas amostras. Através do acoplamento da técnica de geração de hidretos, é possível obter um método com boa sensibilidade, mas que mantém as características de simplicidade e baixo custo da FAAS.

Com a otimização dos parâmetros químicos, foi possível encontrar uma condição de compromisso entre As e Sb, Pb e Bi, que possibilitou a determinação sequencial rápida, com uma frequência analítica teórica de 275 e 200 determinações por hora para As e Sb, e para Bi e Pb, respectivamente.

Os resultados demonstraram uma melhor sensibilidade com relação à FAAS convencional, devido a uma maior eficiência no processo de introdução da amostra e pelo uso do tubo atomizador de quartzo. Os limites de quantificação foram aproximadamente 6000, 750, 250 e 40 vezes inferiores para As, Sb, Bi e Pb, respectivamente. Sendo assim, os métodos possuem sensibilidade adequada para atender as exigências do CONAMA, para a determinação dos elementos estudados.

Apesar do tempo de vida útil do tubo de quartzo ser inferior a outros tubos metálicos como os de Ni, foi possível obtê-lo de forma mais acessível através da aquisição de material de quartzo no comércio local e posterior confecção dos tubos pelo hialotécnico do Departamento de Química da UFSCar.

Os métodos apresentaram uma boa faixa de linearidade, com estabilidade ao longo do tempo de operação, com valores de reprodutibilidade (1,5; 2,0; 5,9 e 6,0 % para As, Sb, Bi e Pb, respectivamente) aceitáveis para métodos de rotina.

A exatidão dos métodos, analisada por meio de materiais de referência certificado, mostrou-se adequada para As, Sb e Bi. No caso do Pb, os concomitantes presentes em alta concentração interferiram de forma significativa no seu sinal analítico. Um estudo, utilizando tiouréia como agente mascarante, foi realizado com o intuito de contornar o problema, no entanto, nenhuma melhora foi observada no sinal analítico. Sendo assim, mais estudos são necessários para

tentar solucionar os problemas relacionados aos efeitos desses concomitantes presentes em altas concentrações.

Os valores encontrados para As, Sb nas amostras de águas do rio e do mar estão abaixo da concentração máxima estabelecida pelo CONAMA. Para Bi e Pb, os valores encontrados estão abaixo do limite de detecção. No entanto, os resultados obtidos para o Pb foram comparados com aqueles obtidos por TS-FF-AAS, que indicaram que o baixo sinal analítico é realmente devido a uma concentração muito baixa desse elemento na amostra, não sendo possível quantificá-lo. Para a amostra de ração de frango, o valor encontrado para As não difere do valor encontrado utilizando a técnica GFAAS, em um nível de 95 % de confiança. Já Sb, Bi e Pb não foi possível quantificar devido aos baixos valores presentes na amostra.

Através desse trabalho foi possível desenvolver dois métodos que permitem a determinação rápida de As e Sb, Bi e Pb, com uma redução substancial do tempo de análise em comparação com o modo monoelementar, com a vantagem da redução do consumo de reagentes e amostras, e a minimização da geração de resíduos. Além disso, abre perspectiva de seu uso na determinação desses elementos em outros tipos de amostras.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8 – Referências Bibliográficas

1. WU, P.; HE, S.; LUO, B.; HOU, X. "Flame furnace atomic absorption spectrometry: A Review". *Appl. Spectrosc.*, **44**: 411, 2009.
2. VOGEL, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed. Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, 2002, pp.325-328.
3. TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, S. A.; GRINBERG, P.; DE CAMPOS, R. C. "A geração química de vapor em espectrometria atômica". *Quim. Nova*, **25** (6B): 1132, 2002.
4. KLASSEN, A.; FIGUEIREDO, E. C.; BACCAN, N.; ARRUDA, M. A. Z. "Metallic tube as atomizer in the hydride generation atomic absorption spectrometry technique for arsenic determination". *Br. J. Anal. Chem.*, **1**: 110, 2010.
5. RIBEIRO, A. S.; ARRUDA, M. A. Z.; CADORE, S. "A quartz tube atomizer with tungsten coil: A new system for vapor atomization in atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1516, 2002.
6. GUERRA, M. B. B.; CARAPPELLI, R.; MIRANDA, K.; NOGUEIRA, A. R. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. "Determination of As and Sb in mineral waters by fast sequential continuous flow hydride generation atomic absorption spectrometry". *Anal. Methods*, **3**: 599, 2011.
7. PROJAHN, H. D.; STEEG, U.; SANDERS, J.; VANCLAY, E. "Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry". *Anal Bioanal Chem.*, **378**: 1083, 2004.
8. LAJUNEN, L. H. J.; *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1992, p.2.
9. AMORIM, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. "Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares". *Quím. Nova*, **31**(7):1784, 2008.
10. LOWE, R. M.; SULLIVAN, J. V. "Developments in light sources and detectors for atomic absorption spectroscopy". *Spectrochim. Acta, Part B*, **54**:2031, 1999.
11. HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*, 7ª ed., Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, 2008, pp. 503-514.
12. SOGOR, C.; GASPAR, A.; POSTA, J. "Flame atomic absorption spectrometric determination of total chromium and Cr(VI) in cigarette ash and smoke using flow injection/hydraulic high-pressure sample introduction". *Microchem. J.*, **58**(3):251, 1998.
13. KLASSEN, A.; KIM, M. L.; TUDINO, M. B.; BACCAN, N.; ARRUDA, M. A. Z. "A metallic furnace atomizer in hydride generation atomic absorption spectrometry: Determination of bismuth and selenium" *Spectrochim. Acta, Part B*, **63**:850, 2008.
14. ROBINSON, J. V. "Observations in atomic absorption spectroscopy". *Anal. Chim. Acta*, **27**:465, 1962.
15. FUWA, K.; VALLEE, B. L. "The physical basis absorption spectrometry of analytical atomic". *Anal. Chem.*, **35**(8):942, 1963.
16. DELVES, H. T. "Micro-sampling method for the rapid determination of lead in blood by atomic-absorption spectrophotometry". *Analyst*, **95**:431, 1970.
17. WATLING, R. J. "The use of a slotted quartz tube for the determination of arsenic, antimony, selenium and mercury". *Anal. Chim. Acta*, **94**:181 1977.

18. BERNDT, H. "High pressure: a new way of sample introduction for atomic spectrometry". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **331**:321, 1998.
19. BERNDT, H.; YAREZ, J. "High - temperature hydraulic high-pressure nebulization: a recent nebulization principle for sample introduction" *J. Anal. At. Spectrom.*, **11** :703, 1996.
20. RIBEIRO, A. S.; BORGES, D. L. G.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. "Coupling of ultrasonic nebulization to flame furnace atomic absorption spectrometry - new possibilities for trace element determination". *Microchem. J.*, **85**: 341, 2007.
21. VIEIRA, M. A.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. "Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube". *Spectrochim. Acta, Part B*, **57**:2057, 2002.
22. HOLAK, W. "Gas-Sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry". *Anal. Chem.*, **41**:1712, 1969.
23. DĚDINA, J; TSALEV, D. L. Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. Nova York, John Wiley & Sons, 1995, pp.18-117.
24. BRAMAN, R. S.; JUSTEN, L. L.; FOREBACK, C. C. "Direct volatilization-spectral emission type detection system for nanogram amounts of arsenic and antimony". *Anal. Chem.*, **44**(13):2195, 1972.
25. THOMPSON, K. C.; THOMERSON, D. R. "Atomic-absorption studies on the determination of antimony, arsenic, bismuth, germanium, lead, selenium, tellurium and tin by utilizing the generation of covalent hydrides" *Analyst*, **99**:595, 1974.
26. SMICHOWSKI, P.; FARÍAS, S. "Advantages and analytical applications of chloride generation. A review on vapor generation methods in atomic spectrometry" *Microchem. J.*, **67**:147, 2000.
27. SCHIMDT, F. J.; ROYER, J. L.; MUIR, S. M. "Automated determination of arsenic, selenium, antimony, bismuth and tin by atomic absorption utilizing sodium borohydride reduction" *Anal. Lett.*, **8**:123, 1975.
28. QUINÁIA, S. P.; ROLLEMBERG, M. C. E. "Selective reduction of arsenic species by hydride generation – atomic absorption spectrometry. part 2 – sample storage and arsenic determination in natural waters" *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**(1): 37, 2001.
29. CHU, R. C., BARRON, G. P., BAUMGARNER, P. A. W. "Arsenic determination at sub-microgram levels by arsine evolution and flameless atomic absorption spectrophotometric technique" *Anal. Chem.*, **44**(8):1476, 1972
30. GOULDEN, P. D.; BROOKSBANK, P.; "Automated atomic absorption determination of arsenic, antimony, and selenium in natural waters" *Anal. Chem.*, **46**(11):1431, 1974.
31. FIGUEIREDO, E. C.; DĚDINA, J.; ARRUDA, M. A. Z. "Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectrometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples". *Talanta*, **73**:621, 2007.
32. MATOUŠEK, T.; DĚDINA, J.; SELECKÁ, A. "Multiple microflame quartz tube atomizer -further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B*, **57**:451, 2002.
33. GRINBERG, P.; TAKASE, I.; CAMPOS R. C. "Characterization and vapour phase interference studies of a flame heated holed quartz T-tube as

- atomization cell for hydride generation atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**:827, 1999.
34. SCHIMDT, F. J.; ROYER, J. L. "Sub-microgram determination of arsenic, selenium, antimony and bismuth by atomic absorption utilizing sodium borohydride reduction" *Anal. Lett.*, **6**:17, 1973.
 35. VIJAN, P. N.; WOOD, G. R. "Semi-automated determination of lead by hydride generation and atomic absorption spectrometry". *Analyst*, **101**:966, 1976.
 36. CADORE, S.; BACCAN, N. "Continuous hydride generation system for the determination of trace amounts of bismuth in metallurgical materials by atomic absorption spectrometry using an on-line stripping-type generator/gas-liquid separator". *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**:637, 1997.
 37. DĚDINA, J.; RUBEŠKA, I. "Hydride atomization in a cool hydrogen-oxygen flame burning in a quartz tube atomizer". *Spectrochim. Acta, Part B*, **35**:119, 1980.
 38. WELZ, B.; MELCHER, M. "Investigations on atomization mechanisms of volatile hydride-forming elements in a heated quartz cell". *Analyst*, **108**:213, 1983.
 39. BAX, D.; VAN ELTEREN, J. T.; AGTERDENBOS, J. "The determination of arsenic with hydride generation AAS. A study of the factors influencing the reactions in the absorption cuvette". *Spectrochim. Acta, Part B*, **41**(9):1007, 1986.
 40. AGTERDENBOS, J.; BAX, D. "Mechanisms in hydride generation AAS" *Fresenius J. Anal. Chem.*, **323**(7):783, 1986.
 41. KUMAR, A. R.; RIYAZUDDIN, P. "Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry" *Trends Anal. Chem.*; **29**: 166, 2010.
 42. ANAWAR, H. M. "Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry" *Talanta*, **88**, 30, 2012.
 43. BORBA, R. P.; COSCIONE, A. R.; FIGUEIREDO, B. R.; ZAMBELLO, F. "Estudo da especiação de arsênio inorgânico e determinação de arsênio total no monitoramento ambiental da qualidade de águas subterrâneas" *Quim. Nova*, **32**:4, 970, 2009.
 44. SMITH, A. E. "Interferences in the determination of elements that form volatile hydrides with sodium borohydride using atomic-absorption spectrophotometry and the argon - hydrogen flame" *Analyst*, **100**:300, 1975.
 45. PIERCE, F. D.; BROWN, H. R.; "Inorganic interference study of automated arsenic and selenium determination with atomic absorption spectrometry". *Anal. Chem.*, **48**(4):693, 1976.
 46. WELZ, B.; SCHUBERT, J. M. "Mechanisms of transition metal interferences in hydride generation atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectroc.*, **1**:23, 1986.
 47. D'ULIVO, A.; GIANFRANCESCHI, L.; LAMPUGNANI, L.; ZAMBONI, R. "Masking agents in the determination of selenium by hydride generation technique" *Spectrochim. Acta, Part B*, **57**:2081, 2002.
 48. TAKASE, I.; LUNA, A. S.; CAMPOS, R. C. "The use of 2-2-thiazolylazo-p-cresol to minimize the interference of Ni and Cu for the bismuth determination in alloys by hydride generation atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **61**:597, 2003.
 49. NIEDZIELSKI, P. "The new concept of hyphenated analytical system: Simultaneous determination of inorganic arsenic(III), arsenic(V), selenium(IV)

- and selenium(VI) by high performance liquid chromatography–hydride generation–(fast sequential) atomic absorption spectrometry during single analysis” *Anal. Chim. Acta*, **551**:199, 2005.
50. AMORIM, F. A. C.; FERREIRA, S. L. C. “Determination of cadmium and lead in table salt by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry” *Talanta*, **65**: 960, 2005.
51. DA SILVA, E. G. P.; SANTOS, A. C. N.; COSTA, A. C. S.; FORTUNATO, D. M. N.; JOSÉ, N. M.; KORN, M. G. A.; DOS SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. “Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry” *Microchem. J.*, **82**:159, 2006.
52. FERREIRA, S. L. C.; SOUZA, A. S.; BRANDAO, G. C.; FERREIRA, H. S.; DOS SANTOS, W. N. L.; PIMENTEL, M. F.; VALE, M. G. R. “Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry”. *Talanta*, **74**:699, 2008.
53. MIRANDA, K.; DIONÍSIO, A. G. G.; PEREIRA-FILHO, E. R. “Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization” *Microchem. J.*, **96**:99, 2010.
54. FERREIRA, H. S.; SANTOS, A. C. N.; PORTUGAL, L. A.; COSTA, A. C. S.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. “Pre-concentration procedure for determination of copper and zinc in food samples by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry”. *Talanta*, **77**:73, 2008.
55. MIRANDA, K.; PEREIRA-FILHO, E. R. “Potentialities of thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) in the fast sequential determination of Cd, Cu, Pb and Zn” *Anal. Methods*; **1**: 215, 2009.
56. SANTOS, D. S. S.; KORN, M. G. A.; GUIDA, M. A. B.; DOS SANTOS, G. L.; LEMOS, V. A.; TEIXEIRA, L. S. G. “Determination of copper, iron, lead and zinc in gasoline by sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry after solid phase extraction”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**(3):552, 2011.
57. ROSINI, F.; MATOS, W. O.; SANTOS, M. C.; NÓBREGA, J. A. “Resolução CONAMA nº 357 e técnicas espectroanalíticas: meios adequados aos fins?” *Analytica*, **22**:74, 2006.
58. DIONÍSIO, A. G. G.; GONZALEZ, M. H.; NÓBREGA, J. A. “Determinação de arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite”. *Quim. Nova*, **34** (1): 49, 2011.
59. ANIRUDHAN, T. S.; UNNITHAN, M. R. “Arsenic(V) removal from aqueous solutions using an anion exchanger derived from coconut coir pith and its recovery” *Chemosphere*, **66**:60, 2007.
60. CARRERO, P.; MALAVÉ, A.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDÓN, C. “Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines” *Anal. Chim. Acta*, **438**:195, 2001.
61. MANDAL, B. K.; OGRA, Y.; ANZAI, K.; SUZUKI, K. T. “Speciation of arsenic in biological samples” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **198**:307, 2004.
62. GARCÍA, M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; URIA, J. E. S.; SANS-MEDEL, A. “Sb(III) and Sb(V) separation and analytical speciation by a continuous tandem on-line separation device in connection with inductively coupled

- plasma atomic emission spectrometry". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **353**:128, 1995.
63. RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; DE ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. "Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte" *Quim. Nova*, **26**(4):550, 2003.
64. AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T.; SIAMPOUR, H. "Cloud point extraction spectrophotometric determination of trace quantities of bismuth in urine" *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**(4): 797, 2006.
65. ZANIN, C. I. C. B.; FIGUEIREDO, F. C. A.; CARVALHO, W. A. "Remoção de chumbo(ii) em sistemas contínuos por carvão ativado com vapor". *Quim. Nova*, **32**(9):2318, 2009.
66. SILVÉRIO, P. F.; FONSECA, A. L.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; MOZETO, A. A. "Release, bioavailability and toxicity of metals in lacustrine sediments: a case study of reservoirs and lakes in southeast Brazil" *Aquat. Ecosys. Health and Mang.*, **8**(3):313, 2005.
67. BAIRD, C. *Química Ambiental*. 2ª ed., Porto Alegre, Bookman, 2002, 557 p.
68. BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. "Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: Revisão" *Quim. Nova*, **31**(2):394, 2008.
69. CONAMA. <http://www.mma.gov.br/port/conama>.
70. USEPA. <http://water.epa.gov/drink/contaminants>.
71. WHO. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf.
72. ANVISA. www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm
73. FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. "Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - Review" *Talanta*, **63**:1061, 2004.
74. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos*. 2ª ed., Campinas, Editora da UNICAMP, 2003. pp.201-240.
75. D'ULIVO, A.; ONOR, M.; SPINIELLO, R.; PITZALIS, E. "Mechanisms involved in chemical vapor generation by aqueous tetrahydroborate (III) derivatization role of hexacyanoferrate (III) in plumbane generation" *Spectrochim. Acta Part B*, **63**: 835, 2008.
76. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. "Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial". *Quim. Nova*, **29** (2): 338, 2006.
77. AFONSO, D. D.; BAYTAK, S.; ARSLAN, Z. "Simultaneous generation of hydrides of bismuth, lead and tin in the presence of ferricyanide and application to determination in biominerals by ICP-AES" *J. Anal. At. Spectrom.*; **25**: 726, 2010.

Fast Sequential Determination of As and Sb, Bi and Pb by Continuous Flow Hydride
Generation Atomic Absorption Spectrometry

Érica Ferreira Batista, Amália Geiza Gama Pessoa, Marcelo Braga Bueno Guerra, Kelber dos Anjos de Miranda and Edenír Rodrigues Pereira-Filho*

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - CCET, Departamento de Química - DQ, Grupo de Análise Instrumental Aplicada - GAIA, Rodovia Washington Luiz, km 235, P.O. Box 676, CEP 13565-905, São Carlos – SP, Brazil

Phone: +55 16 3351-8092

Fax: +55 16 3351-8350

*Corresponding author: erpf@ufscar.br

Abstract

In this study, two methods were developed for the sequential determination of As and Sb, Bi and Pb using fast sequential continuous flow hydride generation atomic absorption spectrometry. Limits of detection obtained for As and Sb were 0.15 and 0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$ and for Bi and Pb were 0.60 and 0.77 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Arsenic, Sb and Bi were free from the influence of possible interferents in the levels evaluated, but Pb analytical signals presented a huge decrease in the presence of Co, Cu, Fe, Ni and HNO_3 . The methods were applied to the analysis of water from the Tietê River, sea water from Praia Grande - Ubatuba, chicken feed, trace elements in water (NIST 1643e) and trace metals in drinking water (HPS TMDW). The obtained recoveries varied from 88 (for As) to 116% (for Bi).

Keywords: Hydride generation, Flame atomic absorption spectrometry, Fast sequential determination, River water, Sea water, Chicken feed

Fast Sequential Determination of As and Sb, Bi and Pb by Continuous Flow
Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry

1. Introduction

Several elements are observed at trace levels in environmental and food samples, requiring analytical methods that combine sensitive techniques and operational steps for extraction or pre-concentration¹⁻³. The techniques commonly employed for elements determination at trace levels are ICP-MS⁴⁻⁶ (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), GFAAS⁷⁻⁹ (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry), those combining Hydride Generation with Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (HG-ICP-OES)¹⁰⁻¹² and HG-ICP-MS¹³⁻¹⁵. Nevertheless, those techniques require strong analytical skills and expensive equipment with high running costs.

Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) is a simple technique with low cost of operation, versatile and commonly applied for element determinations in several types of samples¹⁶. However, it suffers from poor sensitivity due to the low efficiency of the nebulization system where only from 5 to 15 % of the sample spray effectively reaches the flame. In addition, highly viscous solutions need to be diluted with an appropriate solvent for efficient transport and nebulization. The short residence time of free atoms in the flame is another limitation to obtain lower limits of detection^{17,18}.

The power of detection in FAAS can be improved with hydride generation. The main advantages of this technique are adequate sensitivity and selectivity derived from the elimination of matrix interferences and the complete sample introduction into the atomizer^{18,19}. The use of quartz tube atomizer above air/acetylene flames circumvents the drawback related to lower residence time of atoms in the atomizer, which results in high

sensitivity, low noise and background signal, and adequate limits of detection for several matrices²⁰. All these features meet the interest for studies of trace elements.

Despite these advantages, HGAAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry) is applied mainly for single element measurements, which dramatically increases time and reagent consumption of analysis²¹, therefore, there was a great interest to perform multi-element determinations using the FAAS. Nowadays, the analytical throughput can be improved with fast sequential flame atomic absorption spectrometry coupled with hydride generation.

Fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) permits to measure a sequence of analytes in decreasing order of wavelengths in one monochromator scan, reducing the analysis time, the reagents consumption and retains the advantages of conventional FAAS, for example ease of use²².

Niedzielski²³ proposed a hyphenation between High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and hydride generation with an electrothermal heated QTA (Quartz Tube Atomizer) for speciation of As and Se in ground water. The atomic absorption spectrometry used as a detector, allowed the development of a method for rapid determination of these elements in 220 s of analysis. In 2011, Guerra *et al.*²¹ proposed a combination between FS-FAAS with Continuous Flow Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (CF-HGAAS) for the sequential determination of As and Sb in bottled mineral waters. The analytical frequency of this method was around 300 determinations per hour. As far we know these are the only two studies published using HGAAS coupled with FS FAAS.

The aim of the presented study is to develop two separate systems for the sequential determination of As and Sb, Bi and Pb using fast sequential continuous flow hydride generations atomic absorption spectrometry in water and chicken feed samples.

2. Experimental

2.1. Reagents, solutions and samples

All reagents were of analytical grade and deionized water ($18 \text{ } \Omega\text{M cm}^{-1}$ resistivity) obtained from a Milli-Q[®] Plus Total Water System (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used to prepare all solutions. Prior to use, all glassware and polypropylene flasks were washed with soap, soaked in 10 % (v v⁻¹) HNO₃ for 24 h, rinsed with deionized water and dried in such a manner to ensure that no contamination occurred. Nitric and hydrochloric acids were previously purified using a sub-boiling system (Marconi, Piracicaba Brazil). Two multielement standard solutions, As and Sb in 1 mol L^{-1} HCl, Bi and Pb in 0.09 mol L^{-1} HCl were prepared after successive dilutions from a single element standard stock solutions (1000 mg L^{-1}). Sodium borohydride (Sigma-Aldrich), used as reducing solution, was prepared daily in 0.5 % w v⁻¹ NaOH (Qhemis). For As and Sb determination, a solution containing 12 % w v⁻¹ KI (Mallinckrodt) was used as pre-reducing solution. In the case of Bi and Pb, K₃Fe(CN)₆ (J. T. Baker), was used as oxidant solution, and it was prepared by dissolving an appropriate amount of salt in deionized water. For the evaluation of potential interferents, working solutions of Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn 1000 mg L^{-1} were used. Water samples were collected on the Tietê River (São Paulo State, Brazil) and sea water samples from Praia Grande – Ubatuba (São Paulo State, Brazil). Chicken feed samples were purchased at the local market in São Carlos (São Paulo State, Brazil).

2.2. Sample Preparation

Hydrogen peroxide (30 % w w⁻¹) (J. T. Baker), HNO₃ and HCl were used for chicken feed sample mineralization. A microwave oven system equipped with perfluoroalcoxi (PFA) vessels, Milestone – Ethos 1600 (Sorisolet, Italy) was employed for the digestion. Chicken feed samples were previously lyophilized and homogenized. Then, sample masses of 100 mg

were digested using , 2.0 mL of HCl 12 mol L⁻¹, 0.5 mL of HNO₃ 14 mol L⁻¹, 3.0 mL of H₂O₂ 30 % w w⁻¹ and 2.5 mL of deionized water in a closed vessel. The microwave oven heating program was performed in six steps: (1) 2 min at 250 W; (2) 1 min at 0 W; (3) 5 min at 250 W; (4) 5 min at 400 W; (5) 5 min at 550 W, and (6) 5 min at 650 W. For As and Sb determination in river and sea water samples, 22.5 mL of sample, 2.5 mL 12 % KI w v⁻¹ and 5 mL of 6 mol L⁻¹ HCl were pipetted in a volumetric flask and the final volume was adjusted with deionized water up to 30 mL. The pre-reduction step was accomplished by heating the samples solutions in a water bath (Aqua wave 9376, Barnstead Lab-Line, Germany) for 10 min at 80 °C. To evaluate the accuracy of the proposed method, two certified reference materials (CRMs) were analyzed: Trace elements in water (NIST 1643e) and Trace metals in drinking water (HPS TMDW).

For the determination of Bi and Pb in river and sea water samples, 22 mL of sample and 0.45 mL of 6 mol L⁻¹ HCl were pipetted in a volumetric flask and diluted to 30 mL with deionized water. The same CRMs (NIST 1643e and HPS TMDW) were used to estimate the proposed method accuracy for Bi and Pb. Calibration solutions and certified reference materials were prepared in the same way as the corresponding samples for all analytes.

2.3. Instrumentation

All measurements were performed with a Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometer (AA240FS; Varian, Mulgrave, Australia). This instrument is fitted with a deuterium lamp for background radiation correction and As (193.7 nm), Sb (217.6 nm), Bi (223.1 nm) and Pb (217.0 nm) hollow cathode lamps were used as primary radiation sources. The operating parameters of the instrument (spectral resolution, hollow cathode lamp current) were those recommended by the manufacturer. In all experiments an air/acetylene (13.5 L min⁻¹/2.0 L min⁻¹) flame was used. Multielement CF-HGAAS experiments were performed

with the spectrometer working in fast sequential mode and all measurements were based on integrated absorbance. The system configuration CF-HGAAS employed can be seen in Figure 1. A gas/liquid separator and a T-shaped quartz cell atomizer (accessories of the VGA-77 system) were used. The commercially available system for hydride generation (VGA-77) was not used because, according to Guerra *et al.*²¹, the system does not provide pump speed and Ar flow rate controls. The main advantage of using a separate pump and reaction coil is the fact that good limits of detection and analytical throughput can be obtained. Therefore, the same system was used for the determination of As and Sb.

The system used for Bi and Pb determinations was composed by Tygon tubes that provide flow rates of 5.0 mL min⁻¹ for the sample and 2.0 mL min⁻¹ for NaBH₄ and K₃Fe(CN)₆, and a 80 cm length Teflon reaction coil (i.d. = 0.89 mm). A peristaltic pump with 8 channels (MCP model, Ismatec, Switzerland) was employed in both systems and the flow rate of the carrier gas (Argon, White Martins, Sertãozinho, São Paulo State) was controlled using a mass flow controller (ASA, Sesto San Giovanni, Italy).

Figure 1

3. Results and Discussion

Initially, some tests were performed to measure sequentially the four elements (As, Sb, Bi and Pb) using oxidant solution, but were observed low absorbance signals. A good condition for all elements is hard to be achieved using the same pre-reduction or oxidant medium due to the intrinsic differences of each element. For As and Sb, the higher oxidation states form hydrides more slowly²⁴. For Pb, the hydride generation is much more efficient from the tetravalent oxidation state²⁵. Thus, two methods were developed for sequential determination of elements with similar HG properties: As and Sb, Bi and Pb.

3.1. Evaluation of stabilization time and time of reading

The first parameter considered in this study was the necessary time for the analytes absorbance signals reaches the stationary stage, due to the fact that at that moment it is possible to determine the analytes by the spectrometer in the fast sequential mode. The stabilization time must be optimized also considering the elimination of memory effects, so deionized water was introduced after stabilized absorbance signal to check if the baseline for each analyte returns to zero before measuring another sample. These studies have been performed previously for the determination of As and Sb²¹, but for the determination of Bi and Pb a multi-element solution containing 50 µg L⁻¹ was used and the signal profile of each analyte was obtained separately. The best condition observed was obtained when the solution was continuously introduced and the absorbance was measured over a period of 40 s. Figure 2 shows the signals for Bi (black line) and Pb (gray line) when the multi-element standard solution was introduced after 10 s of baseline signal measurement. It is possible to see that after 30 s of stabilization time, the analytes signal are stable and can be recorded in a time window of 10 s (time for readings, see Figure 2). After that, in order to see if 30 s is really enough for signal stabilization, deionized water (Blank) was immediately introduced and the signal profile was recorded again. As can be observed in Figure 2 after additional 30 s the signals for the Blank solution were in the baseline (as in the beginning).

Figure 2

After selecting the stabilization time for the determination of Bi and Pb, different integration times, from 0.5 to 4 seconds, were evaluated by determining the relative standard deviation (RSD) obtained for 10 measurements of a multi-element solution containing Bi and Pb 10 µg L⁻¹. As can be seen in Figure 3, the RSD values were around 6% (the highest values) using an integration time of 0.5 s. There were no significant differences in RSD values for

integration time from 1 to 4 seconds. In this case, it was selected the intermediate condition: 3 seconds measurement time for each element with RSD values normally accepted in routine analysis (Bi 4.5 % and Pb 3.1 %). Therefore, after 30 s of stabilization time, Bi and Pb could be determined in 6 seconds resulting in a theoretical analytical frequency of 200 determinations per hour.

Figure 3

3.2. Optimization of reagents concentrations

The reagents concentrations were optimized with the help of two factorial design experiments. The first one was conducted for As and Sb sequential determination and a Doehlert design was performed²⁶. Four variables were taken into consideration: HCl concentrations in the sample solution ($\text{HCl}_{\text{sample}}$, from 0.2 to 1.0 mol L⁻¹), NaBH₄ concentration (0.3 to 0.9 % w v⁻¹), HCl as carrier solution ($\text{HCl}_{\text{carrier}}$, 2.0 to 8.0 mol L⁻¹) and KI concentration (0.2 to 1.0 % w v⁻¹). These variables were tested in 5, 7, 7 and 3 levels, respectively and Table 1 shows the experiments characteristics and the obtained absorbances for As and Sb. Three experiments in the central point were performed in order to calculate the pure error sum of square and all of them were done randomly to avoid systematic error.

Table 1

The two calculated models did not present lack of fit²⁷. The obtained models for As and Sb were:

$$\text{As absorbance} = 0.084 + 0.018 [\text{HCl}_{\text{sample}}] + 0.022 [\text{NaBH}_4] + 0.051 [\text{KI}] - 0.031 [\text{NaBH}_4]^2 - 0.029 [\text{HCl}_{\text{carrier}}]^2$$

$$\text{Sb absorbance} = 0.106 + 0.048 [\text{HCl}_{\text{sample}}] + 0.042 [\text{HCl}_{\text{carrier}}] + 0.071 [\text{KI}]$$

According to Guerra *et al.*, two variables can affect considerably the absorbance signal: reducing agent and carrier acid concentrations. However, this study sought to investigate two other variables: HCl in the sample and KI concentrations.

Through the calculated models, it is possible observed that these two variables also influence the absorbance signal, once they were considered significant.

Figure 4 shows some contour plots for As and Sb models and our objective was to obtain a compromise that enables good working condition for both analytes in order to perform sequential determinations. With the help of Figure 4 it is possible to identify that when all four variables are in the highest level (see the stars) it is possible to determine As and Sb sequentially in the same sample. In this case, these conditions were fixed for further experiments.

Figure 4

These selected conditions were compared with conditions used by Guerra *et al.*²¹, that optimized concentrations of reducing agent and carrier acid using $2^2 + \text{star}$ central composite design. The conditions used for the two variables were similar, proving that this method is robust, ideal for routine analysis.

Another Doehlert design was conducted for Bi and Pb sequential determination. Table 2 shows the experiments performed and the analytical signals obtained. At this time three variables were considered: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ concentration in 7 levels (0.25 to 1.75 % w v⁻¹), HCl concentration in the sample solution in 5 levels ($\text{HCl}_{\text{sample}}$, 0.03 to 0.15 mol L⁻¹) and NaBH_4 concentration in 3 different levels (from 0.25 to 1.75 % w v⁻¹).

Table 2

Both obtained models presented lack of fit and only for Bi a coefficient was valid:

Bi Absorbance = 0.114

The Bi model presented only the intercept (β_0) as a valid coefficient and in this case any analytical condition described at Table 2 can be used. This observation is confirmed by the absorbance values obtained for Bi, where its variation was very small (from 0.100 for experiment 14 to 0.155 for experiment 11). Since no variable was significant for Pb, intermediary conditions were selected for further experiments: $K_3Fe(CN)_6$, HCl_{sample} and $NaBH_4$ at 0.5 % w v⁻¹, 0.09 mol L⁻¹ and 1.0 % w v⁻¹, respectively.

3.3. Evaluation of carrier gas and reagents flow rate

Argon is frequently used for transporting the hydride species to the atomizer. The effect of the carrier gas flow rate in the system used for the determination of As and Sb has already been evaluated by Guerra *et al.*²¹ and the best condition (140 mL min⁻¹) was selected as a compromise between minimum noise and maximum sensitivity. For the determination of Bi and Pb, complementary studies were carried out and the flow rates of carrier gas tested were: 100, 150 and 200 mL min⁻¹. The best condition was achieved at 100 mL min⁻¹, as can be seen in Figure 5. In the case of Pb (line with circles in Figure 5), the flow rate variation did not produce a huge modification in the analytical signal and the absorbance varied from 0.133 at 100 mL min⁻¹ to 0.121 at 200 mL min⁻¹. On the other hand, Bi analytical signal (line with squares) was 68% smaller at 200 mL min⁻¹ than compared with 100 mL min⁻¹.

Figure 5

Taking into account the fact that the reagents flow rate may affect the absorbance signal, the influence of sample, $K_3Fe(CN)_6$ and $NaBH_4$ flow rates on Bi and Pb signals were also evaluated (see Figure 1). The absorbance was measured using sample flow rates of 5.0, 3.75 and 2.5 mL min⁻¹ and $K_3Fe(CN)_6$ and $NaBH_4$ flow rates of 2.0, 1.5 and 1.0 mL min⁻¹.

Figure 6 shows the resulting effects on the analytical curves from 2.5 to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtained for Bi and Pb. As can be seen, an increase in the reagents flow rate leads to an increment of the slope of the analytical curve. Hence, sample flow rate of 5 mL min^{-1} and $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ and NaBH_4 flow rates of 2.0 mL min^{-1} were considered the most appropriate for the system studied, since it provided the best LOD values (0.60 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Bi and 0.77 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb) when compared with the others flow rates.

Figure 6

3.4. Studies with potential interferents

In order to identify species that could interfere in the determination of As and Sb, Bi and Pb, a study was carried out considering the constituents commonly found in natural waters and chicken feed including Al(III), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II) and Zn(II). For this study, two 2^{8-4} fractional factorial designs²⁷ were performed, the first one aiming the sequential determination of As and Sb and the second the determination of Bi and Pb. The concentration levels chosen for the potential interferents were based on those presented in certified reference materials (Trace elements in water (NIST 1643e) and Trace metals in drinking water (HPS TMDW)) and the qualitative analysis performed in ICP-OES (Vista AX, Varian, Melbourne, Australia) for feed chicken. In all the experiments the concentrations of the analytes (As and Sb, Bi and Pb) were fixed at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. In both fractional factorial designs, the highest concentration levels (normalized as +1) for Co, Cu and Fe were 40, 300 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Al, Cr, Mn, Ni and Zn. The lowest concentration level (normalized as -1) was 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all analytes and the analytes/concomitants ratios varied from 1:4 for Co and 1:50 for Al, Cr, Mn, Ni, and Zn. An experiment containing only the analytes was performed in order to calculate the percentage of interference.

Experimental results showed no remarkable problems for As and Sb determination and the percentage of interference was lower than 5 % (contrasts varied from -2 to 5 % for As and Sb). For Bi determination, no significant interferences were observed (the calculated contrasts varied from -4 to 5%). Nevertheless it was noted a strong Pb signal interference by Co (II), Cu (II), Fe (III) and Ni (II) with contrasts varying from -62 % to 29 %.

Concomitant mutual hydride-forming, transition elements and acids (e.g., HNO₃ and HF) used for sample digestion are potential sources of interferences²⁴, so the effect of HNO₃ was also evaluated. Therefore, it was prepared solutions with 0.25, 1, 5, 10, 15 and 20 % v v⁻¹ HNO₃ and the concentrations of the analytes (As and Sb, Bi and Pb) were fixed at 10 µg L⁻¹. In the determination of As and Sb, the test showed that if the HNO₃ concentration in the samples was lower than 10% v v⁻¹ adversely affects were not observed during the determinations (Figure 7).

Figure 7

In the case of Bi and Pb determinations, no problems were observed for Bi if the HNO₃ concentration was lower than 20 % v v⁻¹. On the other hand in the Pb determination, HNO₃ effects were evident and its concentration must be lower than 0.25 % v v⁻¹, as can be seen in Figure 8. Often, digestion of samples with HNO₃ converts the hydride forming elements to their higher oxidation states, resulting in low HG efficiency. Moreover, during the HG step, HNO₃ could produce volatile NO₂ that interferes severely during atomization²⁴. Therefore, a small volume of HNO₃ was used for sample digestion, enabling that the final concentration of HNO₃ was lower than 0.25 % v v⁻¹ after dilution.

Figure 8

3.5. Figures of merit and application

Limits of detection (LOD), repeatability, linear ranges, first order regression equations and correlation coefficients (r) were determined for both methods and they are presented in the Table 3. The LOD's varied from $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ (As) to $0.77 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pb).

Table 3

The accuracy of the method was verified by determining As and Sb, Bi and Pb, in two certified reference materials: trace elements in water (NIST 1643e) and trace metals in drinking water (HPS TMDW). The results obtained are presented in Table 4. The found values are in agreement with the certified ones (verified using an unpaired t test) and the recoveries fall in the range of 88-92%, 99% and 107-116% for As, Sb and Bi, respectively. In the case of Pb, it was not observed absorbance signals. This could be due to high HNO_3 concentration and metals interferences present in the composition of both CRMs. The HNO_3 concentration in the CRMs varied from 2 (TMDW-HPS) to $6\% \text{ v v}^{-1}$ (NIST 1643e) and the sum of Cr, Co, Fe and Ni concentrations from $265 \mu\text{g L}^{-1}$ (TMDW-HPS) to 287 (NIST 1643e). These values are, respectively for Fe and Co, around 3 and 7 times higher than those tested in section 3.4. Studies with potential interferents. Kumar *et al.*²⁴ found that interference caused by metals could be eliminated using masking agents, such as thiourea, so studies were performed by adding this reagent (2.5, 5 and 10% w v^{-1}) into the certified reference materials in order to minimize interference, but there wasn't observed any improvement at the absorbance signal.

Table 4

Arsenic and Sb, Bi and Pb were determined in river and sea water and chicken feed samples using the proposed methods. Standard solutions containing $0.52\text{-}15 \mu\text{g L}^{-1}$ were used

for calibration in the determination of As and Sb and 2.5-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the determination of Bi and Pb (see linear ranges in Table 3). The results obtained are presented in Table 5, and the values found are below the CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) maximum allowed concentrations (Resolution number 357) for As (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), Sb (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) and Pb (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) in drinking water and As (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) and Pb (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) in sea water²⁸. The results obtained for chicken feed presented a good agreement (at 95% confidence level) with those obtained using a comparative GFAAS method²⁹. Bismuth and Pb were also determined in water using Fast Sequential TS-FF-AAS (Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry)³⁰, as a comparative technique, but no signals were observed.

Table 5

4. Conclusions

The determination of As and Sb, Pb and Bi using fast sequential continuous flow hydride generation atomic absorption spectrometry is shown to be an alternative to the traditional mono-element continuous flow hydride generation atomic absorption spectrometry, with higher theoretical analytical frequency and reduction in the consumption of reagents and sample.

The method for the determination of As and Sb is robust, sensitivity and permitted to determine these elements sequentially in complex matrices, as chicken feed, river water and sea water.

Lead determination was not possible due to a huge matrix effect such as interference caused by the presence of Co, Cu, Fe, Ni and HNO_3 , but with the optimized conditions is possible to determine Bi in different samples.

5. Acknowledgment

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (process 308834/2006-2 and 578259/2008-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (processes 2007/04515-4, 2008/08260-3 and 2009/01447-3). The authors are also grateful to Prof. Dr. Pedro S. Fadini and BSc Luciana F. Oliveira for providing the samples of river and sea water, respectively.

6. References

1. Howard, A.G.; Statham, P.J.; *Inorganic Trace Analysis: Philosophy and Practice*. John Wiley & Sons, 1993, pp. 1-5.
2. Rocha, F. R. P.; Pereira-Filho, E. R.; Nóbrega, J. A.; *J. Braz. Chem. Soc.*; 20 (2009) 1759-1781.
3. Dionísio, A. G. G.; Dantas de Jesus, A. M.; Amais, R. S.; Donati, G. L.; Miranda, K. A.; Guerra, M. B. B.; Nóbrega, J. A.; Pereira-Filho, E. R.; *Int. J. Spectrosc.*, (2011) 1-30.
4. Becker, J. S.; *Trends Anal. Chem.*; 24 (2005) 243-254.
5. Yang, K. X.; Swami, K.; *Spectrochim. Acta Part B*; 62 (2007) 1177-1181.
6. Bazzi, A.; Nriagu, J. O.; Linder, A. M.; *J. Environ. Monit.*, 10 (2008) 1226-1232.
7. Bakkali, K.; Martos, N. R.; Souhail, B.; Ballesteros, E.; *Food Chem.*; 116 (2009) 590-594.
8. Ajtony, Z.; Szoboszlai, N.; Suskó, E. K.; Mezei, P.; Gyorgyc, K.; Bencs, L.; *Talanta*; 76 (2008) 627-634.
9. Rebouças, M.V.; Domingos, D.; Santos, A. S. O.; Sampaio, L.; *Fuel Process. Technol*; 91 (2010) 1702-1709.
10. Afonso, D. D.; Baytak, S.; Arslan, Z.; *J. Anal. At. Spectrom.*; 25 (2010) 726-729.
11. Ilander, A.; Väisänen, A.; *Anal. Chim. Acta*; 689 (2011) 178-183.
12. Welna, M.; Zyrnicki, W.; *Anal. Lett.*; 44 (2011) 942-953.
13. Chen, S.; Zhang, Z.; Yu, H.; Liu, W.; Sun, M.; *Anal. Chim. Acta*; 463 (2002) 177-188.
14. Xie, R.; Johnson, W.; Spayd, S.; Hall, G. S.; Buckley, B.; *J. Anal. At. Spectrom.*; 22 (2007) 553-560.
15. Anderson, S. L.; Pergantis, S.A.; *Talanta*; 60 (2003) 821-830.
16. Wu, P.; He, S.; Luo, B.; Hou, X.; *Appl. Spectrosc.*; 44 (2009) 411-437.

17. Dedina, J.; *Spectrochim. Acta Part B*; 62 (2007) 846-872.
18. Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, S. A.; Grinberg, P.; de Campos, R. C.; *Quim. Nova*; 25 (2002) 1132-1144.
19. Klassen, A.; Figueiredo, E. C.; Baccan, N.; Arruda, M. A. Z.; *Br. J. Anal. Chem.*; 1 (2010) 110-114
20. Ribeiro, A. S.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S.; *J. Anal. At. Spectrom.*; 17 (2002) 1516-1522.
21. Guerra, M. B. B.; Carapelli, R.; Miranda, K.; Nogueira, A. R. A.; Pereira-Filho, E. R.; *Anal. Methods*; 3 (2011) 599-605.
22. Projahn, H. D.; Steeg, U.; Sanders, J.; Vanclay, E.; *Anal Bioanal Chem*; 378 (2004) 1083-1087.
23. Niedzielski, P.; *Anal. Chim. Acta*; 551 (2005) 199-206.
24. Kumar, A. R.; Riyazuddin, P.; *Trends Anal. Chem.*; 29 (2010) 166-176.
25. D'Ulivo, A.; Onor, M.; Spiniello, R.; Pitzalis, E.; *Spectrochim. Acta Part B*, 63 (2008) 835-842.
26. Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta*; 63, (2004) 1061-1067.
27. Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Barros Neto, B. de.; *Statistical Design - Chemometrics*; 25, Amsterdam, 2006, pp. 201-248.
28. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, accessed September 2011.
29. Dionísio, A. G. G, Gonzalez, M. H.; Nóbrega, J. A.; *Quím. Nova*; 34 (2011) 49-52.
30. Miranda, K.; Pereira-Filho, E. R.; *Anal. Methods*; 1, (2009) 215-219.

Captions for Figures

Figure 1: Schematic set-up of the HGAAS system for the sequential determination of As and Sb, Bi and Pb. For As and Sb: (a) NaBH_4 (1.2 mL min^{-1}), (b) HCl (1.2 mL min^{-1}) and (c) Sample (6.8 mL min^{-1}). For Bi and Pb: (a) NaBH_4 (2 mL min^{-1}), (b) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (2 mL min^{-1}) and (c) Sample (5 mL min^{-1}).

Figure 2: Signal profiles of Bi (black line) and Pb (gray line) to evaluate stabilization time.

Figure 3: R.S.D. (%) values obtained for 10 measurements of a solution containing Bi and Pb (both $10 \mu\text{g L}^{-1}$) to evaluate the reading times.

Figure 4: Contour graphics for As (a-c) and Sb (d-f) models.

Figure 5: Effect of Ar carrier gas flow rates on the efficiency of hydride generation for Bi and Pb (both $10 \mu\text{g L}^{-1}$) determination.

Figure 6: Effect of reagents and sample flow rates on the analytical curve for Bi and Pb.

Figure 7: Influence of HNO_3 concentration in the determination of As and Sb (both $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Figure 8: Influence of HNO_3 concentration in the determination of Bi and Pb (both $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Table 1: Doehlert design for As and Sb optimization

Experiments	HCl _{sample}		NaBH ₄		HCl _{carrier}		KI		Analytical signals (Absorbance)	
	Real (mol L ⁻¹)	Norm.*	Real (%)	Norm.	Real (mol L ⁻¹)	Norm.	Real (%)	Norm.	As	Sb
1 **	0.6	0	0.6	0	5.0	0	0.6	0	0.086	0.102
2 **	0.6	0	0.6	0	5.0	0	0.6	0	0.095	0.112
3 **	0.6	0	0.6	0	5.0	0	0.6	0	0.071	0.103
4	1.0	1	0.6	0	5.0	0	0.6	0	0.107	0.164
5	0.8	0.5	0.9	0.866	5.0	0	0.6	0	0.098	0.141
6	0.8	0.5	0.7	0.289	8.0	0.817	0.6	0	0.089	0.147
7	0.8	0.5	0.7	0.289	6.0	0.204	1.0	0.791	0.133	0.167
8	0.2	-1	0.6	0	5.0	0	0.6	0	0.081	0.057
9	0.4	-0.5	0.3	-0.866	5.0	0	0.6	0	0.026	0.067
10	0.4	-0.5	0.5	-0.289	2.0	-0.817	0.6	0	0.051	0.032
11	0.4	-0.5	0.5	-0.289	4.0	-0.204	0.2	-0.791	0.026	0.023
12	0.8	0.5	0.3	-0.866	5.0	0	0.6	0	0.059	0.134
13	0.8	0.5	0.5	-0.289	2.0	-0.817	0.6	0	0.061	0.096
14	0.8	0.5	0.5	-0.289	4.0	-0.204	0.2	-0.791	0.022	0.036
15	0.4	-0.5	0.9	0.866	5.0	0.000	0.6	0	0.070	0.074
16	0.6	0	0.8	0.577	2.0	-0.817	0.6	0	0.055	0.057
17	0.6	0	0.8	0.577	4.0	-0.204	0.2	-0.791	0.033	0.028
18	0.4	-0.5	0.7	0.289	8.0	0.817	0.6	0	0.063	0.123
19	0.6	0	0.4	-0.577	8.0	0.817	0.6	0	0.046	0.138
20	0.6	0	0.6	0	7.0	0.613	0.2	-0.791	0.026	0.045
21	0.4	-0.5	0.7	0.289	6.0	0.204	1.0	0.791	0.097	0.135
22	0.6	0	0.4	-0.577	6.0	0.204	1.0	0.791	0.086	0.152
23	0.6	0	0.6	0	3.0	-0.617	1.0	0.791	0.112	0.124

*Normalized values

**Experiments in the central point

Table 2: Doehlert design for Bi and Pb optimization

Experiments	$K_3Fe(CN)_6$		HCl _{sample}		NaBH ₄		Analytical signals (Absorbance)	
	Real (%)	Norm.*	Real (mol L ⁻¹)	Norm.	Real (%)	Norm.	Bi	Pb
1 **	1.00	0	0.09	0	1.00	0	0.116	0.156
2 **	1.00	0	0.09	0	1.00	0	0.114	0.169
3 **	1.00	0	0.09	0	1.00	0	0.113	0.169
4	1.00	0	0.15	1	1.00	0	0.125	0.052
5	1.75	0.866	0.12	0.500	1.00	0	0.123	0.048
6	1.25	0.289	0.12	0.500	1.75	0.817	0.132	0.204
7	1.00	0	0.03	-1	1.00	0	0.121	0.186
8	0.25	-0.866	0.06	-0.500	1.00	0	0.120	0.167
9	0.75	-0.289	0.06	-0.500	0.25	-0.817	0.129	0.005
10	0.25	-0.866	0.12	0.500	1.00	0	0.129	0.016
11	0.75	-0.289	0.12	0.500	0.25	-0.817	0.155	0.031
12	1.75	0.866	0.06	-0.500	1.00	0	0.115	0.177
13	1.50	0.577	0.09	0	0.25	-0.817	0.106	-0.004
14	1.25	0.289	0.06	-0.500	1.75	0.817	0.100	0.179
15	0.50	-0.577	0.09	0	1.75	0.817	0.121	0.176

*Normalized values

**Experiments in the central point

Table 3: Analytical figures of merit for As and Sb, Bi and Pb determinations by Fast Sequential Continuous Flow Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry

Parameter	As	Sb	Bi	Pb
First order regression equation	$y = 0.0151 x + 0.0043$	$y = 0.0159 x + 0.0034$	$y = 0.028 x + 0.015$	$y = 0.018 x + 0.031$
Correlation coefficient (r)	0.999	0.999	0.998	0.997
Linear range / $\mu\text{g L}^{-1}$	0.52 – 15	0.52 – 15	2.5 - 20	2.5 - 20
^a Limit of detection / $\mu\text{g L}^{-1}$	0.15	0.16	0.60	0.77
^b Repeatability / %	1.5 %	2.0 %	5.9 %	6.0 %

^a LOD: limit of detection (3 s blank/slope, n = 10).
^b R.S.D. (%): relative standard deviation, n = 10 ([As, Sb, Bi and Pb] = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Table 4: Determination of As and Sb, Bi and Pb in two different certified reference materials by Fast Sequential Continuous Flow Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry

Certified reference material	Element	Certified ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n = 3)	Recovery (%)
Nist 1643e	As	60.45 ± 0.72	55.68 ± 1.34	92
TMDW-HPS	As	80	70.7 ± 0.4	88
Nist 1643e	Sb	58.30 ± 0.61	57.79 ± 0.49	99
TMDW-HPS	Sb	10	9.9 ± 0.1	99
Nist 1643e	Bi	14.09 ± 0.15	14.54 ± 1.34	107
TMDW-HPS	Bi	10	11.6 ± 1.7	116
Nist 1643e	Pb	19.63 ± 0.21	< LOD	-
TMDW-HPS	Pb	40	< LOD	-

Table 5: Concentrations of As and Sb, Bi and Pb found in samples (water and chicken feed)

Sample	As	Sb	Bi	Pb
Tietê river water	$0.38 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1**}$	$1.20 \pm 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$	< 0.60 (LOD)	< 0.77 (LOD)
Sea water	$1.36 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.24 \pm 0.08 \mu\text{g L}^{-1**}$	< 0.60 (LOD)	< 0.77 (LOD)
*Chicken feed	$2.02 \pm 0.04 \text{ mg kg}^{-1}$	< 0.16 (LOD)	< 0.60 (LOD)	< 0.77 (LOD)

*As: $2.74 \pm 0.18 \text{ mg kg}^{-1}$ (GFAAS)
**Values between LOD and LOQ

Figure 1

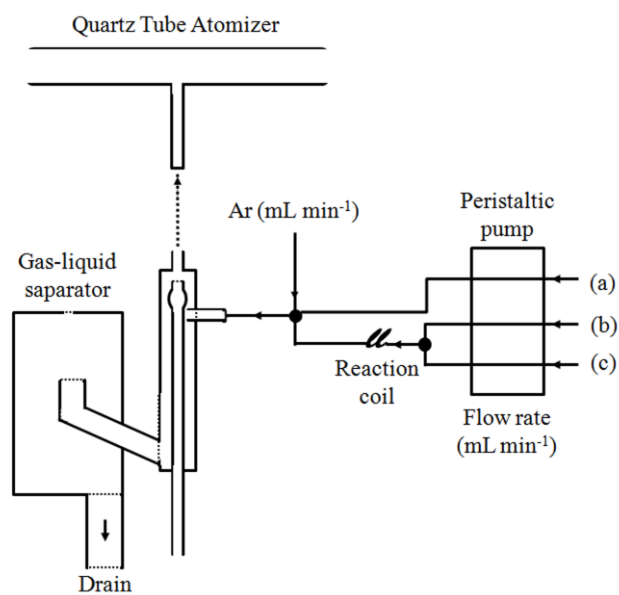


Figure 2

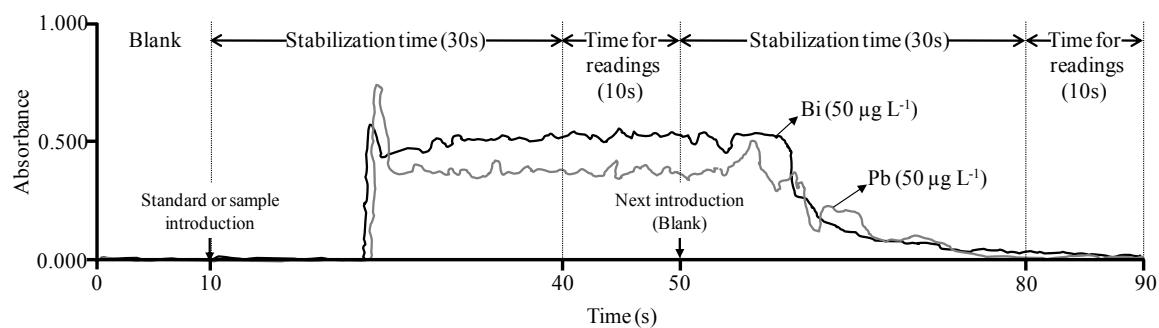


Figure 3

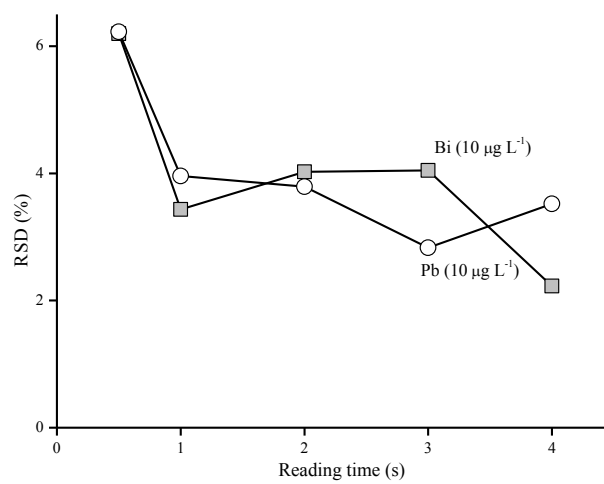


Figure 4

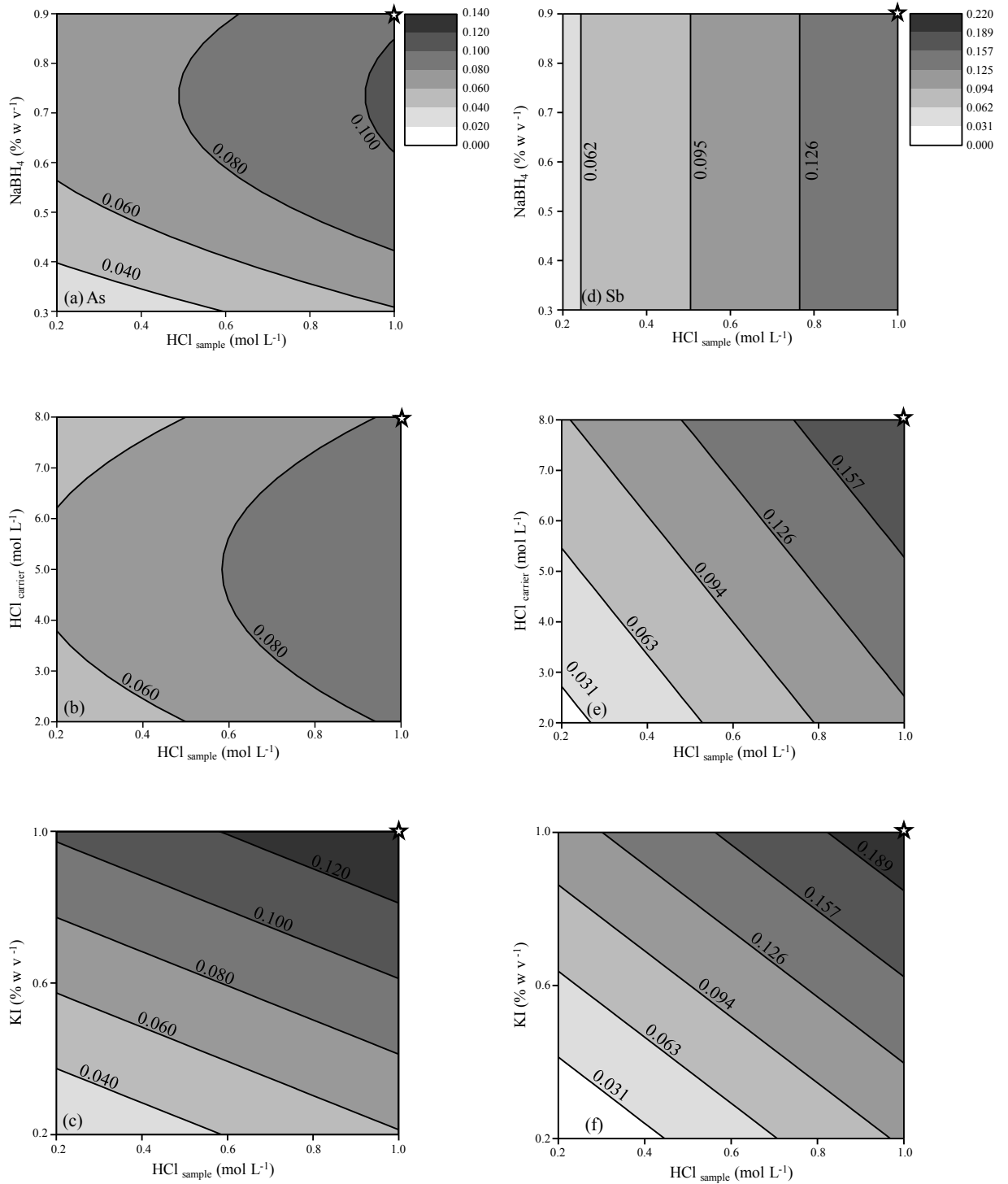


Figure 5

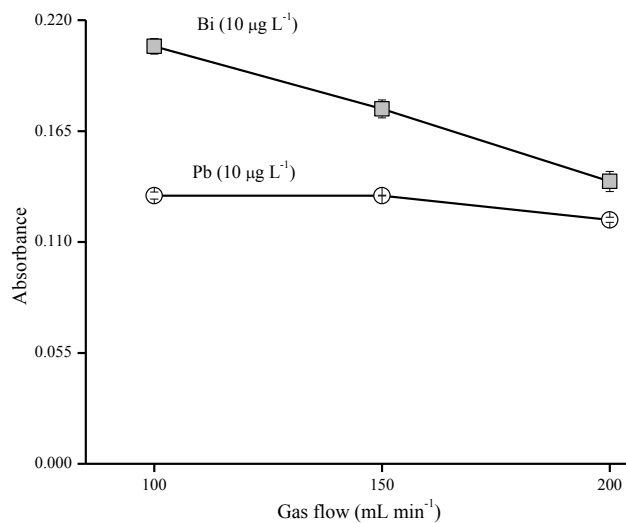


Figure 6

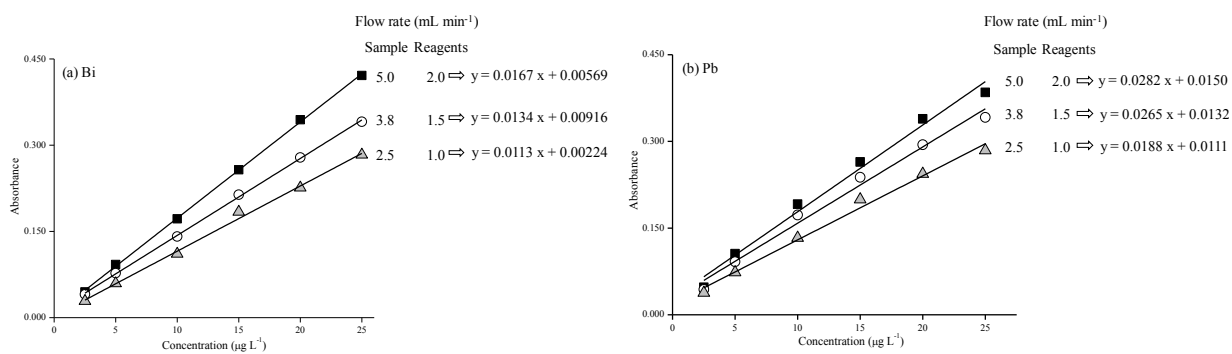


Figure 7

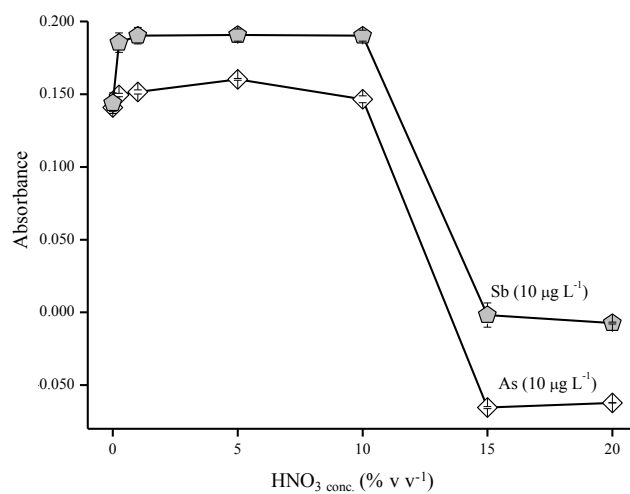


Figure 8

