

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Tese

**Avaliação de métodos analíticos para a
determinação de metais em amostras de
difícil decomposição**

Camila Mizette Oliz

Julho de 2016

Camila Mizette Oliz

**Avaliação de métodos analíticos para a
determinação de metais em amostras de difícil
decomposição.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Química (ênfase em Química Analítica)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Pelotas, Julho de 2016.

A banca examinadora, abaixo assinada, a Tese de Doutorado intitulada **“Avaliação de métodos analíticos para a determinação de metais em amostras de difícil decomposição”**, de autoria de Camila Mizette Oliz.

Banca examinadora:

.....
Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora)

.....
Prof^a Dr^a. Solange Cadore

.....
Prof^a Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

.....
Prof^a Dr^a. Mariana Antunes Vieira

“O maior líder é aquele que reconhece sua pequenez, extrai força de sua humildade e experiência da sua fragilidade.”

Augusto Cury

Dedico esse trabalho aos meus pais José Fernando e Maria Amélia (in memorian), meus irmãos Diego e Carolina, meus sobrinhos Alice, Bernardo e Davi, minha avó Nair (in memorian). E ao meu esposo Leandro e meu filho Pedro. Amo demais vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por todas as suas bênçãos e proteção.

Agradeço à minha família, que são meu porto seguro e por me apoiar em todas as decisões a seguir na vida, acreditando sempre no meu potencial. Amo demais vocês.

Ao meu esposo, amigo, incentivador Leandro, pelo apoio incondicional, dedicação, amor e por me dar o melhor presente que poderia receber nosso filho Pedro, o qual já é minha inspiração e me impulsiona a querer crescer cada vez mais. Amo-te Pedro, razão da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, pelo acolhimento e possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Adriane Medeiros Nunes, que além de exercer esse papel fundamental em minha formação, considero uma grande amiga, que tive o prazer de conhecer e conviver. Obrigada pela confiança em mim depositada e pelos outros mais variados ensinamentos que me acrescentaram experiências, tanto para o lado profissional quanto pessoal. Serei eternamente grata por tudo, principalmente pela paciência, por sempre tentar me entender e por me ensinar a ser otimista sempre, independente dos obstáculos.

Ao Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, meu co-orientador, obrigada por disponibilizar as condições necessárias para realização deste trabalho, bem como pelas sugestões referentes a todos os trabalhos desenvolvidos durante todos esses anos de pós-graduação. Agradeço também pelo incentivo à realizar o doutorado, pela paciência e confiança em mim depositada, e pelas inúmeras contribuições para meu crescimento profissional. Muito Obrigada!

As professoras: Dr^a. Solange Cadore, Dr^a. Daniela Bianchini e a Dr^a. Mariana Antunes Vieira que participaram da banca de qualificação deste trabalho e contribuíram para o aprimoramento do mesmo.

Agradeço de antemão as professoras Dr^a. Solange Cadore, Dr^a. Angelita Moreira e a Dr^a. Mariana Vieira por aceitar o convite para compor a banca de defesa desta tese de doutorado.

Aos meus colegas de laboratório: Eliézer, Camila Pereira, Alexander, Richard, Ana Clara, Daísa, Débora, Patrícia, Thaiane, Paulo, Marília, Natiele, Tatiane e Sérgio, pela convivência e pela troca de conhecimento.

Aos amigos que o PPGQ e o Labmequi me presentearam: Meibel, Eliete, Marcelo, Leila, Aline Medina, Ane Martiele, Emanoelli, Janaína, Caroline Clasen e Lara, pois além de colegas nos tornamos amigos para a vida inteira. Obrigada a todos vocês que além de transformar o ambiente de trabalho em um lugar de muita alegria, de companheirismo, também foram meus grandes amigos, compartilhando de momentos felizes e me consolando nos momentos difíceis da vida. Adoro vocês!

À Djanira por toda amizade e sempre estar disposta a ajudar e esclarecer dúvidas.

Às minhas amigas de longa data e eterna amizade: Amanda Figueiredo, Aline Duarte, Raquel Costa, Roberta Martins, Márcia Castro, Mariana Padilha, Paula Alquati, Melise Laner e Raquel Laner. Obrigada pela amizade de sempre e pelo conforto em momentos difíceis. Amo vocês!!

E agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Título: Avaliação de métodos analíticos para a determinação de metais em amostras de difícil decomposição

Autora: Camila Mizette Oliz

Orientadora: Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Nas últimas décadas o aumento do interesse público tanto pela proteção ambiental como pela qualidade de vida e saúde da população vem cada vez mais impulsionando estudos referentes à presença de metais em amostras de alimentos, bem como o controle de poluentes tóxicos no meio ambiente (ex.: amostras ambientais). Sendo assim, um novo método de preparo de amostras em microescala, para determinação de metais em amostras de alimentos certificadas por técnicas espectrométricas foi desenvolvida. Neste estudo, foram utilizados minifrascos para as digestões, produzidos com material inerte a base de PTFE apresentando uma boa resistência à ação de reagentes oxidantes fortes, sendo adequados ao objetivo que se propõe. Subsequentemente, as amostras, foram levadas a análise por técnicas espectrométricas, para a determinação de Cd, K, Mg e Na. De acordo com os resultados foi possível verificar uma boa concordância entre os valores obtidos e os valores certificados para os analitos em estudo, o que comprova a exatidão do método proposto. Valores de RSDs abaixo de 8,0% para todos os analitos foram obtidos, mostrando também uma boa precisão. Outros dois métodos foram desenvolvidos e aplicados em amostras de carvão e cinzas para a determinação de metais totais por técnicas espectrométricas. Estes estudos de preparo das amostras foram realizados em um sistema de decomposição ácida com refluxo. Para os estudos, foi utilizado um programa estatístico (Statistica 6.0), o qual busca relacionar as influências de cada parâmetro estudado em relação ao sinal analítico de cada elemento, o que possibilita uma melhor otimização do método, buscando uma condição compromisso para as variáveis em estudo. O primeiro método desenvolvido foi

realizado através de uma decomposição parcial das amostras, e as determinações de Fe, Cu, e Zn foram feitas por FAAS e Na por FAES. Testes para avaliar a exatidão através da adição e recuperação de analito foram realizados, e os resultados variaram entre 93 a 105% de recuperação para o carvão e 99 a 115% para as cinzas, comprovando a exatidão do método proposto para a determinação dos respectivos analitos. Outro método ainda em desenvolvimento para as amostras de carvão e cinzas, visando uma total decomposição dessas amostras apresentou bons resultados preliminares. Na utilização de H_2SO_4 e HNO_3 a altas temperaturas foi possível obter uma eficiente decomposição, resultando em uma amostra límpida e sem resíduos no final do processo. A exatidão deste método foi comprovada pela determinação dos metais estudados (Al, Cu, Cr, Fe e Mn) por MIP OES no CRM de carvão mineral. Os resultados obtidos comprovaram uma boa exatidão do método, tendo em vista a equivalência dos resultados com os valores certificados do CRM, bem como a aplicação do teste t student. Os métodos propostos se apresentaram como sendo procedimentos simples, rápidos e seguros, adequados ao preparo das amostras biológicas bem como de carvão e cinzas para posterior determinação dos respectivos elementos por técnicas de espectrometria atômica.

Palavras-chave: amostras de alimentos, carvão e cinzas, microdigestão, decomposição ácida com sistema de refluxo, metais, espectrometria atômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado em Química

Pelotas, Julho, 2016.

ABSTRACT

Title: Evaluation of analytical methods for the determination of metals on samples difficult to decompose

Autora: Camila Mizette Oliz

Orientadora: Prof^a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

In recent decades the increase in public interest in both environmental protection and the quality of life and health of the population is increasingly driving studies on the presence of metals in food samples and the control of toxic pollutants in environment (ex.: environmental samples). Thus, a new sample preparation method microscale, for the determination of metals in certified food samples by spectrometric techniques have been developed. In this study, we used to minivials digestions produced with inert material base PTFE that have good resistance to the action of strong oxidizing reagents, and suitable for the purpose it proposes. Subsequently, samples were taken analysis by spectrometric techniques for the determination of Cd, Mg and Na. According to the results we observed good agreement between the values obtained and the certified values for the analytes under study, which proves the correctness of the proposed method. RSD values lower than 8.0% for all analytes were also obtained showing good accuracy. Two other methods were developed and applied in coal and ash samples for the determination of total metals spectrometric techniques. These studies of sample preparation were performed on a system that works under reflux. For the study, a statistical program was used (Statistica 6.0), which seeks to relate the influence of each parameter studied in relation to the analytical signal of each element, allowing better optimization of the method, seeking a compromise condition for the variables in study. The first method developed was carried out a partial decomposition of the samples and the determination of Fe, Cu, and Zn were determined by F AAS and Na by F AES. Tests for accuracy by adding and analyte recovery were performed and the results ranged from 93 to 105% recovery for coal and 99 to 115% for ashes, confirming the accuracy of the proposed method for determination of the respective analytes. Another method

under development for coal samples and ashes, targeting a full breakdown of these samples showed good preliminary results. When using H_2SO_4 and HNO_3 at high temperatures it was possible to achieve efficient decomposition, resulting in a clear sample without waste at the end of the process. The accuracy of this method was confirmed by the determination of the studied metals (Al, Cu, Cr, Fe and Mn) for MIP-OES in coal CRM. The results indicated a good accuracy of the method, in view of the equivalence of results with CRM certified values as well as the application of the Student t test. The proposed methods are presented as simple procedures, fast and safe, suitable for the preparation of biological samples as well as coal and ash for later determination of the respective elements by atomic spectrometry techniques.

Keywords: food samples, coal and ash, microdigestion, acid decomposition with reflux system, metals, atomic spectrometry.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Doctoral Thesis in Chemistry

Pelotas, July, 2016.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Minifrascos confeccionados em PTFE.....	20
Figura 2	A) Diagrama esquemático do dedo frio acoplado ao tubo digestor de vidro. 1: entrada água; 2: saída de água; 3: Tampa de PTFE; 4: saída para gás; 5: tubo de reação. B) Imagem do sistema de dedo frio.....	21
Figura 3	Curvas de pirólise e atomização da solução de amostra (CRM 1577c) e padrão ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de $5 \mu\text{g}$ de Pd. Pirólise: amostra (-■-) e padrão (-▲-); Atomização: amostra (-●-) e padrão (-▼-).	31
Figura 4	Curvas de pirólise e atomização da solução de amostra (CRM 1577c) e padrão ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de $50 \mu\text{g}$ de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Pirólise: amostra (-■-) e padrão (-▲-); Atomização: amostra (-●-) e padrão (-▼-).	32
Figura 5	Gráficos de pareto para Cu, Fe, Na e Zn.....	37
Figura 6	Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Cu (Txtd).....	39
Figura 7	Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Fe (Txtd).....	39
Figura 8	Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Zn (TxVac).....	40
Figura 9	Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Na (Txtd).....	40
Figura 10	Amostra de carvão no processo final da decomposição ácida parcial.....	45
Figura 11	Triplicata do CRM 1632d no processo final.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de Cd após as microdigestões dos CRMs.....	18
Tabela 2	Parâmetros operacionais para a determinação de Al, Cu, Cr, Fe e Mn em amostras de carvão por MIP OES.....	23
Tabela 3	Estudo do tempo necessário para obter a completa decomposição do CRM DOLT-4 (NRC) no forno de micro-ondas.....	30
Tabela 4	Estudo da potência necessária para obter a completa decomposição do CRM DOLT-4 (NRC) no forno de micro-ondas.....	30
Tabela 5	Resultados analíticos obtidos para a determinação de Cd, K, Mg e Na por técnicas de Espectrometria Atômica em diferentes CRMs.....	33
Tabela 6	Parâmetros de Mérito para K, Na, Mg e Cd.....	34
Tabela 7	Variáveis e valores utilizados no DCCR.....	35
Tabela 8	Matriz do DCCR para o processo de preparo de amostras de carvão mineral com o sistema de refluxo proposto (decomposição parcial).....	36
Tabela 9	Análise de variância (ANOVA) para a determinação de Cu, Fe, Na e Zn em amostra de carvão mineral.....	38
Tabela 10	Concentrações obtidas de Cu, Fe, Zn e Na, média \pm desvio (RSD) e % de recuperação.....	40
Tabela 11	Comparação dos resultados obtidos de Cu, Fe, Na e Zn em carvão por FAAS entre o método proposto e o método oficial recomendado.....	43
Tabela 12	Parâmetros de mérito para Cu, Fe, Zn e Na.....	44
Tabela 13	Variáveis e valores utilizados no DCCR.....	46

	Matriz do DCCR para o processo de preparo de amostras de carvão mineral com o sistema de refluxo proposto (decomposição total).....	46
Tabela 14		
Tabela 15	Parâmetros de mérito para Al, Cu, Cr, Fe e Mn.....	48
	Concentração dos analitos Al, Cu, Cr, Fe e Mn no CRM 1632d – trace elements in coal (betuminous)/NIST (média ± desvio padrão para n=3) por MIP OES.....	48
Tabela 16		
Tabela 17	Concentrações dos analitos encontrados (média ± desvio padrão para n=3) em amostras reais de carvão e cinzas por MIP OES.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
ASTM	American Society for Testing e Materials
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês <i>Certified Reference Material</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> .
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GLP	Gás liquefeito de petróleo
HG AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i> .
ICP MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LCO	Lâmpada de cátodo oco, do inglês <i>hollow cathode lamp (HCL)</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>

MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas, do inglês <i>Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
PP	Polipropileno
PPM	Partes por milhão
PPB	Partes por bilhão
PTFE	Politetrafluoretileno
R	Coeficiente de correlação linear
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>Standart Deviation</i>
TMAH	Hidróxido de Tetrametil Amônio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Preparo de amostras: Finalidade e Importância desta etapa	4
3.2 Amostras de difícil decomposição	5
3.2.1 Amostras de alimentos – Métodos convencionais e alternativos de abertura de amostras	5
3.2.2 Amostras ricas em sílica (carvão e cinzas) – Métodos convencionais e alternativos de abertura de amostras	11
3.3 Técnicas de Espectrometria Atômica	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Instrumental	18
4.1.1 Instrumentação utilizada no desenvolvimento do método em microescala para amostras biológicas	18
4.1.2 Instrumentação utilizada no desenvolvimento dos métodos com sistema de refluxo para amostras de carvão e cinzas	20
4.2 Reagentes, materiais e amostras	23
4.3 Estudos prévios (otimizações) e procedimentos de preparo das amostras	24
4.3.1 Otimizações e preparo de amostras biológicas	24
4.3.1.1 Otimizações realizadas para o método em microescala	24
4.3.1.2 Preparo de amostras biológicas em microescala	25
4.3.2 Estudos prévios e preparo de amostras de carvão e cinzas	25
4.3.2.1 Estudos prévios realizados para a decomposição ácida sob refluxo	25
4.3.2.2 Preparo de amostras de carvão (Decomposição ácida parcial sob refluxo)	27
4.3.2.3 Preparo de amostras de carvão (Decomposição ácida total sob refluxo)	28

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1 Método em microescala para amostras biológicas	29
5.1.1 Estudo das condições (tempo e potência) no forno de micro-ondas	29
5.1.2 Otimizações do programa de temperatura do GF AAS para determinação de Cd.....	31
5.1.3 Concentrações de Cd, K, Mg e Na em amostras de CRMs pelo método de microdigestão proposto.....	33
5.1.4 Parâmetros de Mérito.....	34
5.2 Método de decomposição ácida com sistema de refluxo para amostras de carvão	35
5.2.1 Umidade e teor de cinzas das amostras de carvão	35
5.2.2 Método de decomposição ácida parcial (extração) em carvão	35
5.2.2.1 Otimizações (Delineamento estatístico experimental)	35
5.2.2.2 Aplicação das condições otimizadas e verificação da exatidão	41
5.2.2.3 Parâmetros de Mérito	44
5.2.3 Método de decomposição ácida total em carvão.....	45
5.2.3.1 Otimizações (Delineamento estatístico experimental)	45
5.2.3.2 Parâmetros de Mérito	47
5.2.3.3 Avaliação da exatidão do método proposto	48
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO 1	58
ANEXO 2	59
ANEXO 3	60
ANEXO 4	61

1. INTRODUÇÃO

A busca por métodos alternativos de preparo de amostras vem sendo o foco de muitos trabalhos, os quais têm como principal objetivo à minimização de possíveis inconvenientes relacionados a esta etapa (OLIVEIRA, 2003; KRUG, 2010). Sendo assim, a química analítica tem como uma das principais missões a busca incessante da evolução e do desenvolvimento de novos métodos de análise química com o intuito de diminuir os inconvenientes relacionados aos métodos convencionais de análise, bem como resolver os problemas que surgem a cada dia.

No entanto, considerando a complexidade da composição de matrizes de alimentos, carvão e cinzas, as quais apresentam um elevado teor de matéria orgânica, a etapa de preparo das amostras para posterior análise sempre foi considerada um grande desafio (ANTES et al., 2010). Isto se dá, principalmente, pela dificuldade de usar e garantir um método que seja eficiente para decompor as diferentes matérias que as constituem (MAIA et al., 2003). Desta maneira, a busca constante por métodos alternativos de preparo de amostras é o foco de muitos trabalhos, os quais têm como principal objetivo a minimização de possíveis inconvenientes relacionados a esta etapa.

Sendo assim é de fundamental importância o conhecimento da composição dos alimentos, tanto para avaliar uma possível presença de contaminantes inorgânicos, bem como realizar um controle nutricional dos mesmos. Tendo em vista que, a maioria dos métodos convencionais utilizados para decompor essas matrizes, apresentam muitas desvantagens, as quais incluem a utilização de quantidades excessivas de reagentes, maior consumo de tempo e elevados riscos de contaminação e perdas de analitos por volatilização. Desta forma, para amostras de alimentos, muitas pesquisas voltadas a essa área vêm apresentando o desenvolvimento de métodos que visam à utilização de quantidades reduzidas de reagentes e de amostras, o que consequentemente acaba diminuindo os custos da análise, bem como uma menor geração de resíduos (KORN et al., 2008).

Embora, tenham-se obtidos até o presente momento muitos avanços em termos de informações a respeito do teor de metais e elementos traço em

amostras de carvão e seus derivados, ainda existe uma grande necessidade, do ponto de vista ambiental, de uma melhor caracterização e de um controle contínuo dessas matrizes, já que o uso do carvão como fonte de energia pode causar sérios impactos ambientais, resultando na contaminação do solo, da água e do ar. Sendo assim, estudos referentes ao meio ambiente, através da utilização de matrizes ambientais, devem ser realizados usando métodos confiáveis com elevado controle de qualidade analítico, gerando uma base de dados consistente para o adequado gerenciamento ambiental do uso do carvão (ZJUSZ-ZUBEK e KONIECZYSKI, 2003).

Geralmente, os métodos clássicos de análise de carvão, empregam processos de decomposição que necessitam primeiramente da sua redução às cinzas, pelo método de calcinação, o que está de acordo com os diferentes métodos oficiais propostos pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 2000). Porém, estes métodos apresentam muitas limitações, pois consomem tempo e estão aliados a longos períodos de aquecimento. Estes processos normalmente envolvem o uso de misturas corrosivas e ácidos oxidantes fortes os quais apresentam propriedades explosivas, oferecendo riscos à segurança (RODUSHKIN et al., 2000; XU, 2005).

Dentro deste contexto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento e da validação de novos métodos analíticos, alternativos aos métodos já existentes, para a determinação de metais tanto em amostras de alimentos quanto em amostras de carvão e cinzas, focados principalmente a etapa de preparo de amostras, visando um método mais rápido, simples e de baixo custo para a decomposição destas matrizes.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos para a determinação de metais por técnicas de Espectrometria Atômica em amostras de difícil decomposição: alimentos e amostras ricas em sílica (carvão e cinzas). Com este intuito, foi investigada principalmente a etapa de preparo das amostras, visando uma condição ideal para a determinação específica de cada elemento.

2.1 Objetivos Específicos

- Para as amostras de alimentos foi desenvolvido um sistema em microescala, utilizando pequenas quantidades de amostras e reagentes para a quantificação de Cd, K, Mg e Na por técnicas de Espectrometria Atômica;
- Para as amostras de carvão e cinzas foi desenvolvido dois métodos de preparo amostras, ambos através de uma decomposição ácida em um sistema em refluxo;
- Para os estudos em amostras de carvão foi utilizado um planejamento estatístico visando a otimização das variáveis relacionadas ao método proposto objetivando uma condição compromisso para os respectivos analitos;
- Ao fim de cada método desenvolvido, o mesmo foi validado através da comparação de diferentes procedimentos de preparo de amostras, testes de adição e recuperação de analito e utilização de materiais de referência certificados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Preparo de amostras: Finalidade e Importância desta etapa

De uma forma geral, uma análise química exige um tratamento adequado da amostra visando sua preparação para a forma mais apropriada de inserção no instrumento de medida. No entanto, esse tratamento pode variar, desde um simples polimento da superfície da amostra, até sua completa transformação da forma sólida para uma solução, sendo esta compatível com o método de determinação. Deste modo, muitos fatores precisam ser avaliados quando se vai decompor uma amostra, entre eles, a natureza dessa matriz, bem como o elemento e a concentração do mesmo na amostra, além do método a ser utilizado, associados à precisão e exatidão requeridas (KRUG, 2010).

A etapa de tratamento de uma amostra em um processo analítico também é, na maioria das vezes, a etapa mais cara e que demanda maiores habilidades do analista. O preparo de amostras sólidas implica, muitas vezes, em métodos de decomposição/dissolução e/ou extração dos analitos antes da determinação de suas concentrações. De acordo com Oliveira (2003), um procedimento de decomposição pode consumir até 61% do tempo total gasto do processo analítico, podendo acarretar até 30% do erro total de uma análise.

A transformação de uma amostra sólida em uma solução, tendo em vista que a maioria das técnicas analíticas requer a dissolução completa das amostras, pode ser realizada através de diferentes formas, sendo que os processos mais conhecidos são a decomposição por via úmida, por via seca e por fusão (KRUG, 2010; OLIVEIRA, 2003). Além dessas possibilidades para a decomposição de amostras sólidas (amostras biológicas e amostras de carvão e cinzas), existem alternativas que também apresentaram bons resultados, como aquelas que utilizam o preparo de suspensões (MAIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004; MARTINS et al., 2002; GHISI et al., 2007), as extrações ácidas assistidas por ultrassom ou micro-ondas (MUJURU et al., 2012; MEERAVALI et al., 2013), bem como a determinação direta por amostragem sólida (DAMIN et al., 2007; MIOR et al., 2013).

De acordo com a literatura, são nítidas as dificuldades envolvidas na etapa de preparo de amostras, tanto para amostras biológicas (por conter alto teor orgânico) quanto para amostras de carvão e cinzas, que apresentam elevado teor de sílica nas suas composições, tornando-se interessante estudar meios de preparar estas amostras, visando o desenvolvimento de métodos mais simples, quando comparados aos métodos convencionais já aplicados a estas matrizes.

3.2 Amostras de difícil decomposição

3.2.1 Amostras de alimentos – Métodos convencionais e alternativos de abertura de amostras

Informações da composição elementar em amostras biológicas, como por exemplo, os alimentos, são de suma importância tanto para os consumidores, como para os profissionais de saúde. Além disso, recente legislação sobre rotulagem de alimentos vem limitando a presença de alguns compostos. Desta forma, a determinação de elementos-traço e contaminantes inorgânicos, bem como um controle nutricional em matrizes de alimentos vem ganhando destaque, já que normalmente esta análise requer uma ampla preparação das amostras e/ou procedimentos de extração antes da análise instrumental (KORN et al., 2008).

Entre os métodos convencionais mais usados, pode-se citar os que normalmente envolvem a decomposição da amostra na presença de ácidos que possuem propriedades oxidantes, auxiliados por aquecimento, utilizando um bloco digestor, ultrassom ou radiação micro-ondas. No entanto, estes procedimentos convencionais apresentam algumas desvantagens, tais como: o alto consumo de tempo, o aumento do risco de contaminação e/ou perda de analito por volatilização e o elevado consumo de reagentes corrosivos e perigosos (KORN et al., 2008).

É necessário considerar alguns fatores a fim de diminuir a incerteza na etapa de preparo das amostras. Em nível estatístico, o grau de incerteza em um método está diretamente relacionado com o número de etapas envolvidas, ao passo que uma diminuição do número de etapas deve reduzir a incerteza de

forma proporcional. A automação e mecanização dos processos também levam a uma redução da incerteza, tendo em vista que procedimentos automáticos são geralmente mais reproduutíveis do que os métodos manuais de análise, o que também irá diminuir o tempo gasto com o treinamento do analista para realizar a preparação de amostras, que muitas vezes é o grande problema em laboratórios analíticos (KORN et al., 2008).

Vários métodos alternativos estão em desenvolvimento com o intuito de evitar ou minimizar esses possíveis inconvenientes. Entre as alternativas que possibilita facilitar o tratamento das amostras, envolvendo etapas de decomposição, extração e a solubilização dos analitos antes da análise estão as técnicas de análise direta de sólidos. Estes métodos são muito interessantes, visto que há pouca manipulação das amostras apresentando muitas vantagens frente aos métodos convencionais, como o aumento da frequência analítica, pela retirada da etapa de tratamento, pela redução dos riscos de contaminação, além da minimização de possíveis perdas de analito por volatilização (NOMURA e OLIVEIRA, 2006). A literatura descreve também métodos alternativos de amostragem por suspensão, os quais envolvem a solubilização parcial ou completa da matriz da amostra, utilizando tanto reagentes ácidos como alcalinos (MARTINS et al, 2002; GHISI et al, 2007; NÓBREGA et al., 2006).

A amostragem direta de sólidos foi realizada em um trabalho de Nomura e Oliveira (2006). Neste trabalho é descrito um estudo sistemático para preparação de amostras de fígado bovino para a determinação de Cd e Pb por Espectrometria de Absorção Atômica com atomização Eletrotérmica e amostragem sólida (SS-ET AAS). As amostras foram preparadas utilizando procedimentos diferentes: Primeiramente, uma secagem em um forno micro-ondas doméstico seguido por secagem na estufa a 60 °C até massa constante, e segundamente, uma secagem por liofilização. Moinho de bolas e moinho criogênico foram utilizados para a moagem. O tamanho das partículas, o tamanho da amostra e micro homogeneidade da amostra foi investigado. Todas as amostras preparadas apresentaram boa homogeneidade, mesmo para massa pequenas de amostras, no entanto as amostras de fígado secas em forno de micro-ondas, combinado com a estufa e moídos em moinho de

bolas apresentou melhor homogeneidade. O estudo de micro homogeneidade mostrou que todos os procedimentos utilizados geraram resultados precisos e exatos para Cd e Pb.

O uso de suspensões em amostras biológicas também é encontrado na literatura. Um método para preparar leite em pó, fígado bovino e amostras de músculo bovino para análise por Espectrometria de Absorção Atômica com atomização Eletrotérmica (ET AAS) foi proposto por Martins e colaboradores (2002). As amostras foram misturadas com uma pequena quantidade de hidróxido de tetrametilâmônio (TMAH) e uma suspensão estável e homogênea foi obtida após 2 h com aquecimento a 60-70 °C. Após a preparação das amostras e os estudos das melhores condições de temperaturas de pirólise e atomização realizados, os analitos Cd, Pb, Ni, Cr, Cu e Ag foram quantificados por ET AAS. Os limites de detecção, precisão e exatidão são relatados com bons resultados, bem como quando comparados com os obtidos após decomposição ácida convencional. As principais vantagens do método proposto são a simplicidade da preparação da amostra e uma vida mais longa do tubo de grafite.

Outro trabalho citado na literatura com o uso de suspensão em amostra biológica é descrito por Ghisi e colaboradores (2007), comparando diferentes formas de introdução da amostra em espectrometria de absorção atômica para a determinação de Cd, Cu e Zn em amostras biológicas após serem tratadas com hidróxido de tetrametilâmônio. As suspensões foram preparadas pela mistura de aproximadamente 250 mg da amostra biológica certificada em pó com 2,5 mL de água desionizada. Após aproximadamente 30 min, uma solução de 25% m/v de TMAH foi adicionada, usando a proporção de 5 µL de TMAH para cada 1 mg de amostra. Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por um tempo mínimo de 2 h com eventual agitação manual. A nebulização pneumática convencional foi usada nas três formas. A solução da amostra foi introduzida por aspiração através do tubo capilar do nebulizador, por microinjeção manual e por microinjeção através de um sistema de injeção em fluxo. Todas as três formas levaram à boa exatidão e precisão. As melhores sensibilidades e limites de detecção foram obtidos usando-se o sistema de injeção em fluxo. Simplicidade, baixo custo e o

consumo reduzido de amostras e reagentes destacam-se como qualidades da microinjeção manual.

Recentemente, procedimentos de decomposição de amostras biológicas com o uso de sistemas de refluxo vêm se apresentando como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de decomposição ácida. O sistema consiste de um tubo de vidro (dedo frio) acoplado aos tubos comerciais de digestão durante o procedimento de decomposição ácida sob aquecimento. Nesse tubo, a água circula continuamente com temperatura controlada através de um banho termostatizado, o que promove o resfriamento da parte superior do tubo digestor, permitindo o refluxo da solução. O dedo frio promove a condensação dos ácidos para a solução da amostra, evitando a necessidade de reposição destes reagentes durante o processo de decomposição, o que normalmente ocorre em sistemas de decomposição convencionais. Por conseguinte, menores quantidades de reagentes são consumidas, o que reduz consideravelmente o risco de contaminação e também diminui os custos relacionados à análise (FERREIRA et al., 2013; ORESTE et al., 2013^a; ORESTE et al., 2013^b).

De acordo com Oreste e colaboradores (2013)^b, o trabalho teve como objetivo apresentar três métodos de preparação de amostras para a determinação de Cd, Pb e Sn em carnes por GFAAS: decomposição ácida, solubilização com TMAH e solubilização com ácido fórmico. Para a decomposição com HNO_3 , foi utilizado um sistema aberto convencional, com um dedo frio. Este sistema ajudou a evitar perdas de analitos e reagentes por volatilização, permitindo operar na presença das altas temperaturas aplicadas em um bloco digestor, reduzindo o tempo de decomposição por aproximadamente 1 hora. As solubilizações foram realizadas à temperatura ambiente por 12 horas. O programa de temperatura do forno de grafite foi otimizado para cada elemento nos diferentes meios de amostras de preparação utilizando uma mistura de Pd-Mg como modificador químico. Os parâmetros de mérito foram semelhantes para todos os métodos de preparação de amostras avaliados. Bons LDs (limites de detecção) foram obtidos para os três analitos estudados. Testes de recuperação para quatro amostras de carnes foram

realizados e as recuperações variaram de 93,7 a 109%, avaliando a precisão dos resultados obtidos pelos métodos de preparação de três amostras. Além disso, diferentes materiais de referência certificados de carne foram analisados e os resultados obtidos estão de acordo com o valor certificado com 95% de confiança (teste *t*). Os melhores resultados foram obtidos pelo processo de decomposição ácida com o sistema de dedo frio. Este procedimento quando comparado com os demais, apresentou-se mais rápido, com menos probabilidade de contaminação e ou perdas de analito por volatilização, já que trata-se de um sistema semifechado. De acordo com os autores, o uso deste sistema também proporcionou uma melhora na razão sinal/ruído.

Os processos de microdigestão também são uma forma alternativa de preparo de amostras, já que utilizam quantidades reduzidas de ácidos e de amostras, contornando o problema principal dos métodos convencionais de decomposição, os quais utilizam quantidades consideráveis tanto de amostra quanto de reagentes (ARAÚJO et al., 2000; FLORES et al., 2001; MORTARI et al., 2004; CAMPOS et al., 2009; OLIZ et al., 2013).

Araujo e colaboradores (2000), desenvolveram um suporte confeccionado em Teflon, equipado com até 4 minifrascos para colocação das amostras o qual foi adaptado ao frasco de vidro do forno com radiação micro-ondas focalizada. A decomposição das amostras foi feita através da decomposição ácida em fase vapor utilizando 30 mg de amostra biológica e 150 μ L de água ou H_2O_2 . A determinação de Fe e Co por GF AAS foram realizadas nas amostras biológicas e boa exatidão, bem como um aumento na frequência analítica foram relatados.

Outro trabalho envolvendo microdigestão de amostras, citado na literatura por Flores e colaboradores (2001), apresenta o desenvolvimento de um procedimento empregando minifrascos de polipropileno (PP) fechados para decomposição de amostras de cabelo para posterior determinação de As por Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS). Seis procedimentos diferentes de preparo de amostras (misturas ácidas e aquecimento) foram testados. Aproximadamente 10 a 200 mg de amostras eram pesadas e adicionados misturas de ($HNO_3+H_2O_2$ ou $H_2SO_4+HNO_3$), e

levadas a aquecimento em um micro-ondas doméstico. Os autores relatam que o método desenvolvido apresentou ser um procedimento simples e rápido, com um menor consumo de reagentes e mínima diluição, bem como carecendo de mínima manipulação das amostras, minimizando os riscos de contaminação e tornando o método atrativo para análise de rotina.

Campos e colaboradores (2009) desenvolveram um sistema para realizar microdigestões de amostras biológicas para determinação de Cd e Cu por GF AAS. Este sistema visa diminuir os erros relacionados à transferência das amostras de um recipiente para outro durante a etapa de preparo, bem como minimizar efeitos de contaminações pelo contato direto da amostra com a superfície externa. Massas de até 5 mg foram pesadas diretamente em copos de amostrador (autosampler) e 100 μ L de mistura ácida (HNO_3 concentrado ou $\text{H}_2\text{SO}_4+\text{HNO}_3$) foram adicionados. Posteriormente, foram colocadas no minibloco digestor, pressionadas e levadas a uma estufa com 60 °C, por 12 horas. O método proposto mostrou ser viável para a decomposição de diferentes tipos de amostras biológicas e observou-se que a mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4+\text{HNO}_3$ foi a melhor condição para as microdigestões na determinação de Cd nos CRMs investigados. Boa concordância entre os valores encontrados e certificados usando 1:1 v/v da mistura foi verificado. O processo de microdigestão proposto é simples, realizado em um ambiente fechado e, utiliza apenas um frasco de pesagem até à medição instrumental, minimizando os riscos de contaminação ou de perdas de analito durante o processo.

Desta forma, como o controle de metais em alimentos é de suma importância, tanto para garantir a qualidade nutricional como toxicológica destes produtos, o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos (rápidos, sensíveis e confiáveis), que visem principalmente à etapa de abertura da amostra, se faz necessário, já que os métodos convencionais de análise são em sua maioria lentos, e mais propensos a contaminações. Além disso, devido à necessidade de grande quantidade de reagentes e do uso de reagentes de alta pureza, estes procedimentos se tornam também dispendiosos.

3.2.2 Amostras ricas em sílica (carvão e cinzas) – Métodos convencionais e alternativos de abertura de amostras

O carvão é constituído por uma mistura complexa de alto teor orgânico, associado a componentes inorgânicos (minerais), como os silicatos, sulfetos, carbonatos, óxidos, entre outros (FINKELMAN e GROSS, 1999). Esta matriz associa vários elementos traço em sua composição e o conhecimento deste conteúdo pode fornecer informações preciosas para avaliar o risco ambiental embutido, desde o processamento do carvão até o uso deste mineral nas mais diversas atividades industriais modernas (SWAINE e GOODARZI, 1995; VALKOVIC, 1983).

Geralmente, os métodos clássicos de análise de carvão, empregam processos de decomposição que necessitam primeiramente da sua redução às cinzas, pelo método de calcinação, o que está de acordo com os diferentes métodos oficiais propostos pela American Society for Testing and Materials (ASTM). A decomposição das cinzas resultantes é feita com uma mistura de água régia e posterior dissolução em ácido nítrico ou o ácido fluorídrico, ou, em alguns casos, a amostra é dissolvida com ácido nítrico ou com uma mistura de ácido clorídrico/fluorídrico e ácido bórico (ASTM, 2000^a). Os procedimentos da ASTM recomendam a determinação de elementos por ET AAS, ICP-MS (ASTM, 2000^b) ICP OES (ASTM, 2001) ou F AAS (ASTM, 2000^a).

Quando a decomposição destas amostras é realizada com ácidos minerais, independente de ser realizada em sistemas abertos ou fechados, a decomposição total é obtida na presença de ácido fluorídrico combinado com outros ácidos, permitindo uma solubilização eficiente dos elementos presentes nestas matrizes. Porém, estes métodos apresentam muitas limitações, normalmente envolvem o uso de misturas corrosivas e ácidos oxidantes fortes os quais apresentam propriedades explosivas, apresentando riscos à segurança do analista, bem como consomem tempo, pois estão aliados a longos períodos de aquecimento, além de necessitarem do uso de materiais apropriados de laboratório (RODUSHKIN et al., 2000; XU, 2005).

A decomposição assistida por micro-ondas em sistemas fechados tem sido amplamente utilizada para a decomposição de amostras de carvão. Isto se deve, provavelmente, pelo método apresentar alta eficiência de decomposição

para a maioria das amostras, relativamente baixo consumo de reagente, bem como a redução de riscos de perdas e contaminação em comparação com procedimentos de decomposição convencionais (BETTINELLI et al., 1988; WANG et al., 2004; ANTES et al., 2010). Entretanto, estes instrumentos (fornos micro-ondas) ainda são de difícil acesso, pelo seu alto valor aquisitivo.

Antes e colaboradores (2010), apresentaram um procedimento de combustão induzido por micro-ondas (MIC) e aplicado para a decomposição de amostras de carvão e posterior determinação de As, Cd e Pb por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e Hg usando geração de vapor frio (CV), acoplado ao ICP-MS. Pelots de carvão (500 mg) foram formados usando 20 bar de oxigênio e de nitrato de amônio como um auxílio para a ignição. Avaliou-se a utilização de ácido nítrico como solução absorvedora (1,7; 3,5; 5,0; 7,0 e 14 mol L⁻¹). Para amostras de carvão com maior teor de cinzas, os melhores resultados foram encontrados usando 7,0 mol L⁻¹ HNO₃ e um passo de refluxo adicional de 5 min após a etapa de combustão. Para as amostras de carvão com teor de cinzas inferior a 8%, 5,0 mol L⁻¹ de ácido nítrico era adequado para a absorção de todos os analitos. A exatidão foi avaliada utilizando material de referência certificado (CRM) de carvão. As recuperações ficaram entre 95 e 97%, para todos os analitos. Para comparação dos resultados, foi utilizado um procedimento recomendado pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM). Além disso, também foi realizada uma decomposição assistida por micro-ondas convencional (MAD). Utilizando o procedimento ASTM, perdas de analito foram observadas e um tempo relativamente longo de decomposição foi necessário (> 6 h). Em comparação com o procedimento de MAD, maior massa de amostra pode ser digerida usando MIC permitindo melhores limites de detecção. Além disso, os autores ressaltam que neste caso não se faz necessário à utilização de ácidos concentrados, obtendo-se baixos valores de brancos e consequentemente menores limites de detecção. O teor de carbono residual na decomposição obtida por MAD e MIC foi de cerca de 15% e <1%, respectivamente, mostrando a melhor eficiência da decomposição de procedimento MIC. Usando MIC foi possível digerir completamente e, simultaneamente, até oito amostras em apenas 25 minutos, com diminuição significativa de efluentes.

Frequentemente, tem sido proposto o uso da amostragem direta de sólidos. Estes métodos buscam ultrapassar as desvantagens associadas com os processos de dissolução das amostras de carvão (MIOR et al., 2013). A técnica de amostragem de suspensão também vem sendo muito utilizada para o preparo de amostras de carvão, visando conciliar de forma satisfatória, tanto as vantagens da amostragem sólida (redução do tempo de preparação da amostra, minimizando os riscos de contaminação e perdas de analitos voláteis) quanto a amostragem em solução (facilidade de introdução da amostra nos equipamentos e o uso de calibração aquosa e diluições) (MAIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004). Porém, na maioria dos casos, com o uso das suspensões se faz necessário uma instrumentação mais robusta, com detectores e sistemas de correção de fundo de alta resolução, a fim de corrigir interferências que são decorrentes da presença da matriz da amostra.

Mior e colaboradores (2013) desenvolveram um método analítico para a determinação do enxofre em carvão usando análise direta de uma amostra sólida, em um forno de grafite por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução. A absorvância molecular do monossulfureto de carbono (CS), o qual é formado na fase de vaporização, foi medida usando a linha de rotação em 258.033nm. Vários modificadores químicos foram testados, porém o Ru aplicado como modificador permanente foi escolhido, por apresentar melhor desempenho. As temperaturas ótimas de pirólise e de atomização foram de 500 °C e 2200°C, respectivamente. Para a calibração foram usadas soluções padrão aquosas preparadas a partir de L-cisteína, sendo que os coeficientes de regressão linear obtidos para este padrão não foram significativamente diferentes do que para um material de referência certificado de carvão (CRM) de acordo com um teste *t* de Student. Os resultados obtidos para o enxofre em três CRM de carvão e seis amostras adicionais também não mostraram nenhuma diferença significativa para as duas técnicas de calibração. O método apresentou uma boa precisão (<10%) e os parâmetros analíticos, tais como LD e LQ, eram apropriados para o estudo proposto.

Segundo Maia e colaboradores (2003), resultados exatos e precisos foram obtidos através do uso de suspensão ácida de carvão e cinzas para a

determinação de Cd, Hg, Pb e Tl por vaporização eletrotérmica e ICP-MS. As suspensões foram preparadas através de mistura da amostra em pó ($\leq 36-45 \mu\text{m}$) com soluções de ácidos (ácido nítrico para o carvão e ácido nítrico e fluorídrico para cinzas) e, posteriormente, levadas a uma agitação ultrassônica, deixando-o repousar em seguida em banho de água a 60 °C durante 2 horas. As melhores condições foram determinadas tais como, sensibilidade analítica, programa de temperatura do forno, a quantidade de modificador, concentração de ácido, a taxa de fluxo de gás e de tamanho de partícula. A exatidão foi verificada com a determinação dos analitos em CRMs, sendo observada uma boa concordância dos valores obtidos com os certificados, bem como relatam uma boa precisão do método, com RSD menores que 5%.

Outro trabalho envolvendo o uso de suspensão de amostra de carvão é relatado por Ribeiro e colaboradores (2004). Neste estudo, os autores desenvolveram um método simples e robusto para a determinação de Hg em amostras ambientais (carvão e sedimento) por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, diretamente para suspensões ácidas. As suspensões ácidas foram preparadas após a redução das partículas para $\leq 50 \mu\text{m}$ e foram tratadas com 6,7% v/v de ácido nítrico ou 10% v/v de água-régia mais 2% v/v de ácido fluorídrico. O método apresentou boa exatidão quando a água-régia mais o ácido fluorídrico foram utilizados nas suspensões dos CRMs analisados, bem como o uso da calibração convencional com padrões aquosos. Os autores ainda salientam a praticidade e simplicidade do método desenvolvido, sendo o mesmo adequado para análise de rotina.

Dentro deste contexto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento e da validação de novos métodos analíticos para a determinação elementar em amostras de carvão, focando principalmente a etapa de preparo das amostras, bem como uma maior difusão desses métodos de análise para os órgãos fiscalizadores brasileiros, garantindo desta forma, informações valiosas que poderão contribuir de forma efetiva na proteção ambiental e na melhoria da qualidade de vida e de saúde da população.

3.3 Técnicas de Espectrometria Atômica

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a determinação de metais, comumente encontrados nas amostras em estudo, estão as técnicas de espectrometria atômica, que são versáteis e comuns tanto na comunidade acadêmica, como nos laboratórios que fazem análises de rotina, apresentando sensibilidades adequadas aos objetivos pretendidos.

A técnica de AAS a qual baseia-se na absorção de energia pelos átomos no estado fundamental e gasoso, pode ser utilizada, basicamente, em três modos de atomização: chama (F AAS), forno de grafite (GF AAS) e geração de hidretos (HG AAS). Dentre estas, a GF AAS é adequada para a determinação de elementos em baixas concentrações, apresentando alta sensibilidade, com limites de detecção na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} , uma vez que a alíquota da amostra inserida no interior do forno é totalmente atomizada em um curto período de tempo, e o tempo de residência médio dos átomos no caminho óptico é elevado (1 s ou mais). Além disso, apresenta vantagens como boa seletividade, requer pequenos volumes de amostra (em torno de μg), tolera concentrações elevadas de matriz, sendo desta forma, muitas vezes utilizada para tais determinações (L'VOV, 1984; RIBEIRO et. al., 2002).

No modo GF AAS, a amostra normalmente, é depositada sob a forma de uma solução ou suspensão, sobre uma plataforma de grafite pirolítico (plataforma de L'vov), inserida dentro do tubo de grafite, o qual é submetido a um programa de aquecimento, podendo-se separar a matriz da amostra durante estas etapas, antes da atomização do analito. A lâmpada de cátodo oco emite uma radiação característica do elemento a ser determinado, sendo que sua radiação emitida, assim como, a da lâmpada de arco de deutério, é modulada e, desta maneira, a radiação proveniente do atomizador (não modulada), não é considerada. O colimador tem a função de separar as radiações das duas lâmpadas e, dessa maneira, uma radiação de cada vez é lida, possibilitando descontar o valor do sinal de fundo gerado simultaneamente, fornecendo assim, o valor correspondente a absorção de energia. O monocromador tem a função de selecionar a linha espectral desejada, sendo o sinal modulado ampliado por um amplificador seletivo e,

finalmente, registrado no detector (BEATY e KERBER, 1993; L'VOV, 1984; RIBEIRO et al., 2002).

Já na F AAS, a amostra é introduzida no equipamento por meio de um sistema de nebulização pneumática alcançando a chama, que trabalha em uma faixa de temperaturas que variam entre 2100-2300 °C, dependendo da mistura de gases empregado e sendo este processo de combustão, responsável pela atomização do analito. Um feixe de radiação é emitido por uma lâmpada cujo cátodo é construído do elemento a ser determinado. A radiação após atravessar a chama passa por um monocromador e atinge o detector. Os átomos livres no estado fundamental e gasoso absorvem radiação em comprimentos de ondas característicos para cada elemento, sem do que a redução de energia vinda da fonte é uma medida da quantidade do elemento na amostra (LAJUNEN, 1992; BEATY e KERBER, 1993).

Atualmente, as técnicas multielementares se tornaram mais viáveis, trazendo mais praticidade para as análises. As técnicas de Espectrometria de Emissão Atômica apresentam essa grande vantagem da análise multielementar, tendo como exemplo, a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) muito utilizado em determinações de diversos metais em diferentes tipos de amostras. Recentemente, outra fonte alternativa de excitação é utilizada para determinações multielementares sendo um plasma induzido por micro-ondas. Este plasma é produzido através da transferência indutiva de energia a partir de ondas estacionárias em um ressonador adequado e sustentado em um quartzo ou tubo cerâmico, que está localizado dentro de uma cavidade ressonante. O sistema de eletrodo é comumente referido como plasma de micro-ondas (MIP). Os equipamentos baseados no MIP apresentam uma característica economicamente atraente, sendo possível a utilização de diferentes gases, Ar, He, N₂, ou mistura deles, Ar/He e N₂/O₂, para gerar o plasma. Na técnica de MIP OES que usa a combinação N₂/O₂, o nitrogênio é fornecido através de um gerador de ar (compressor de ar), o que reduz drasticamente o custo de operação em comparação com qualquer outra técnica de espectrometria atômica. O plasma é mantido pelo nitrogênio à pressão atmosférica e a amostra é introduzida em forma de um aerossol a partir de um

nebulizador pneumático convencional (LI et al., 2013; JANKOWSKI e RESZKE, 2010).

A técnica de MIP OES apresenta-se de forma promissora, pois permite uma análise elementar mais segura e uma brusca redução dos custos operacionais comparando a outros instrumentos de espectroscopia atômica. Esta técnica apresenta uma variedade de recursos, não necessitando de fontes de gases inflamáveis para seu uso. Desta forma, o equipamento pode trabalhar de forma contínua, sem supervisão, proporcionando um aumento na segurança e na flexibilidade dos laboratórios (JANKOWSKI e RESZKE, 2010).

Com base nestas vantagens, a técnica de MIP OES vem se destacando e ganhando mercado nos últimos anos, o que pode ser visto em termos de aplicações para análises de caráter multielementar em diversos tipos de amostras, como por exemplo, amostras de solos (VUMMITI, 2015), sedimento (DRVODELIC, 2015), leite (TANABE et al., 2015), vinho (NELSON et al., 2015), sucos de fruta (TRUONG e CAUDURO, 2015), combustíveis (KULIKOV, 2015), dentre outras.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumental

4.1.1 Instrumentação utilizada no desenvolvimento do método em microescala para amostras biológicas

Para determinação de Cd, sinais de absorbância integrada foram medidos em um espectrômetro de absorção atômica PinAAcle 900Z (Perkin-Elmer, Walthan, EUA), equipado com um forno de grafite aquecido transversalmente, um amostrador automático (Modelo AS 900) e um corretor de fundo Zeeman. Foram utilizadas as condições operacionais recomendadas pelo fabricante, tais como, comprimento de onda (228,8 nm) e largura da banda de resolução espectral (0,7 nm). Uma lâmpada de cátodo oco (Perkin-Elmer, Walthan, EUA) foi usada operando a 8 mA. Argônio 99,996% (Linde, Barueri, Brasil) foi utilizado como gás de proteção e purga. Todas as determinações foram realizadas através da utilização de tubos de grafite revestidos pirolíticamente com a plataforma fixa. O programa de temperatura otimizado é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de temperatura do forno de grafite utilizado para determinação de Cd nos CRMs analisados

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo permanência (s)	Vazão Ar (L min ⁻¹)
1 ^a Secagem	110	10	30	250
2 ^a Secagem	130	10	30	250
Pirólise	500	10	20	250
Atomização	1200	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

Um espectrômetro de absorção atômica AA-6300 (Shimadzu, Japão) no modo chama foi utilizado para a determinação de Mg nas amostras certificadas. Foi utilizada uma chama composta de ar-acetileno e corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério, bem como, uma lâmpada de cátodo oco de Mg (Hamamatsu Photonics K.K, Japão) operando a 8 mA. Para estas medições foram empregadas as condições operacionais recomendadas pelo

fabricante do equipamento, tais como comprimento de onda (285,2 nm) e largura da banda de resolução espectral (0,7 nm). Todas as análises foram feitas através da utilização de um sistema de microinjeção de amostra adaptado ao nebulizador pneumático, o qual é disponibilizado nesse equipamento pelo fabricante. Através deste sistema, é permitido a microinjeção de pequenos volumes de solução da amostra na chama (5 a 200 μL), o que resulta em um sinal transiente, podendo ser registrada tanto a altura máxima do pico, quanto a sua área integrada.

As determinações de Na e K foram realizadas em um fotômetro de chama modelo B462 (Micronal, São Paulo, Brasil), o qual foi operado nas seguintes condições para ambos os elementos: taxa de aspiração da amostra (5 mL min^{-1}), ar comprimido (9 L min^{-1}) a uma pressão de 1 kgf cm^{-2} e chama de gás butano.

As amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica com resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g (Ohaus Adventurer, Modelo AR 2140, Pine Brook, EUA). Para a microdigestão ácida das amostras foi utilizado um forno de micro-ondas fabricado pela Panasonic (Modelo NN-ST571WRU, Manaus, Brasil) com frequência operacional de 2450 MHz e potência variável de até 800 W.

A Figura 1 apresenta o minifrasco que foi desenvolvido para os procedimentos de microdigestões. Estes foram produzidos com material inerte a base de PTFE (politetrafluoretileno), por possuir propriedades resistentes à ação de reagentes oxidantes fortes, tolerar altas temperaturas (ponto de fusão de 327 °C) e ser transparente às micro-ondas. A cavidade interna do minifrasco apresenta um volume total de 2,0 mL e para uma eficiente vedação o encaixe da tampa é através do sistema de rosca e ainda conta com a adição de um o'ring, evitando assim perdas de reagentes e analitos, permitindo a determinação de elementos voláteis, como por exemplo, o Cd.

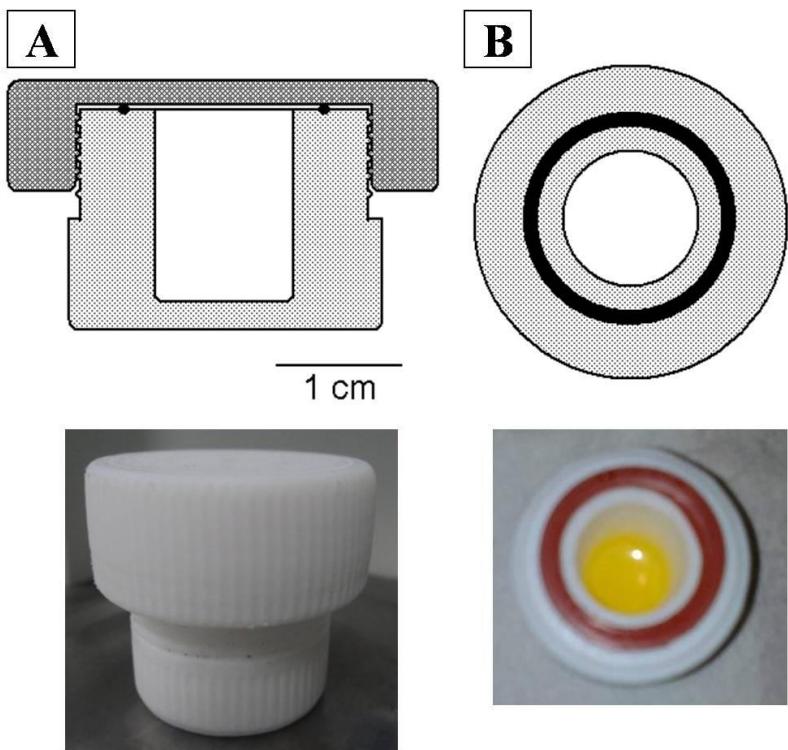


Figura 1: Minifrascos confeccionados em PTFE. A) Minifrasco e tampa confeccionado em PTFE; B) Cavidade do minifrasco reacional com encaixe do o`ring.

As dimensões dos minifrascos são:

- A parte externa do frasco reacional mede 23 mm de altura por 28 mm de diâmetro e a cavidade interna mede 18 mm de profundidade por 13 mm de diâmetro.
- A parte externa da tampa mede 17 mm de altura por 40 mm de diâmetro e a parte interna mede 12 mm de profundidade por 28 mm de diâmetro.
- O o`ring mede 20 mm de diâmetro e 2 mm de diâmetro.

4.1.2 Instrumentação utilizada no desenvolvimento dos métodos com sistema de refluxo para amostras de carvão e cinzas

As amostras foram trituradas em um gral de porcelana e peneiradas utilizando um agitador de peneiras (Modelo AG-G1712) de inox (malha 270 mesh, 53 µm), ambas produzidas pela a bronzinox, São Paulo, Brasil. Após

esta etapa, as amostras foram pesadas utilizando a balança analítica já citada no item 3.1.1. Para o processo de decomposição ácida das amostras, foi utilizado um bloco digestor convencional (Marconi, modelo MA-4025, Piracicaba, Brasil). Em cada um dos tubos de digestão foi introduzido um sistema de dedo frio (Figura 2) para evitar perdas por volatilização dos elementos e reagentes. O sistema consiste de um tubo de vidro fechado, o qual contém em seu interior um tubo de vidro pequeno, onde a água é continuamente circulada com temperatura controlada através de um banho termostatizado modelo Q-214M2 (Quimis, Diadema, Brasil), com o objetivo de promover o resfriamento da parte superior do tubo digestor, a fim de ajudar a recirculação dos ácidos dentro do tubo maior.

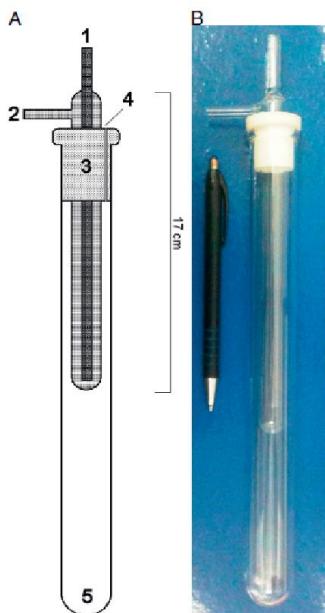


Figura 2. A) Diagrama esquemático do sistema de dedo frio que foi acoplado aos tubos digestores de vidro. 1: entrada água; 2: saída de água; 3: Tampa de PTFE; 4: saída para gás; 5: tubo de reação. B) Imagem real do sistema de dedo frio (ORESTE et. al., 2013^a).

Para as determinações do primeiro método desenvolvido (decomposição parcial de carvão e cinzas) foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Aanalyst 200 (Perkin Elmer, Connecticut, Brasil), com chama de ar e acetileno. Para este estudo, utilizaram-se lâmpadas de catodo oco (Perkin Elmer, Singapura) de Cu, Fe e Zn, operando nas condições fixadas pelo fabricante, nos comprimentos de onda: 324,75; 248,33; 213,86 nm; respectivamente, e

uma lâmpada de arco de deutério como corretor de fundo. Para a determinação do Na foi empregado o modo emissão, sendo utilizado o comprimento de onda de 589 nm.

Para as determinações do segundo método, o qual visa a total decomposição das amostras usando o sistema de dedo frio, foi utilizado um espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (MP AES) modelo Agilent 4200 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) equipado com uma câmara de pulverização ciclônica de vidro de dupla passagem (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). O nitrogênio utilizado é extraído do ar atmosférico usando um gerador de nitrogênio (4107 Nitrogen Generator - Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). O alinhamento da tocha e a seleção da melhor linha espectral foram realizadas utilizando uma solução de calibração em meio ácido, usadas para decompor as amostras ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) e otimizados automaticamente pelo instrumento com o MP Expert Software (versão 1.5.1.0, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália).

Os elementos quantificados e os parâmetros instrumentais utilizados estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros operacionais para determinação de Al, Cu, Cr, Fe e Mn em amostras de carvão e cinzas por MIP OES

Parâmetros	Elementos				
	Al	Cu	Cr	Fe	Mn
Comprimento de onda (nm)	396,152	327,395	425,433	373,486	403,307
Posição de observação	-10	0	-10	0	0
Fluxo do nebulizador (L/min)	1	0,6	0,95	0,75	0,85
Tempo de leitura (s)			3		
Numero de replicatas			3		
Tempo de captação da amostra (s)			15		
Tempo de estabilização (s)			15		
Velocidade da bomba (rpm)			15		
Nebulizador	Ciclônico de PTFE de dupla passagem				
Acionamento rápido da bomba	Ligado				
Corretor de fundo	Auto				
Introdução da amostra	Manual				

4.2 Reagentes, materiais e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água utilizada no preparo das amostras e das soluções foi obtida por meio de um sistema de purificação com resina de troca iônica. Ácido nítrico 65% (m/m) (Synth, São Paulo, Brasil) foi purificado por destilação em um sistema de sub-ebulição de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Antes de usar, todos os materiais de vidro foram lavados e imersos em um banho de 10% (v/v) de HNO₃ durante pelo menos 48 horas e, em seguida, enxaguados com água deionizada. Os microfrascos utilizados nas microdigestões foram descontaminados em um banho de 50% (v/v) de HNO₃ durante pelo menos 24 horas e, em seguida, enxaguados com água deionizada.

Soluções padrões de Al, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Mn, Mg, Na, e Zn foram diariamente preparadas a partir da diluição de uma solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Buchs, Alemanha) de cada elemento em água deionizada. Uma solução de KCl (10 mg/L) foi utilizada para a minimização de interferências de ionização relacionadas ao processo de atomização do Mg por

F AAS. Para determinação de Cd por forno de grafite, uma solução de Pd (Sigma Aldrich, Alemanha) foi usada como modificador químico, com a adição de 5 mg para cada medição.

Para o desenvolvimento e verificação de exatidão do método em microescala proposto para a análise de material biológico foram utilizados diferentes materiais de referência certificados (CRM): DOLT-4 (fígado de peixe) do Conselho de Pesquisa Nacional do Canadá (NRCC, Canadá) e, 8414 (músculo bovino), 2976 (tecido muscular de molusco) e 1577c (fígado bovino) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, EUA). Já para a método de decomposição completa de carvão, em desenvolvimento, o CRM utilizado foi o 1632d – Trace Elements in Coal (Betuminous) da NIST.

As amostras de carvão e cinzas utilizadas neste estudo foram cedidas pela Companhia Riograndense de Mineração (CRM), as quais foram adquiridas diretamente das minas a céu aberto de carvão mineral, que estão localizadas no município de Candiota/RS.

4.3 Estudos prévios (otimizações) e procedimentos de preparo das amostras

4.3.1 Otimizações e preparo de amostras biológicas

4.3.1.1 Otimizações realizadas para o método em microescala

Tendo em vista que o processo de decomposição das amostras foi feito em um forno de micro-ondas convencional, com um nível de segurança inferior aos equipamentos científicos, é fundamental que se trabalhe em escala miniaturizada e com uso de vasos reacionais projetados para esta finalidade, evitando riscos desnecessários ao analista. Assim, também se deve conhecer a potência real do equipamento, para empregar a quantidade de energia necessária para a mineralização das amostras biológicas, evitando aquecimentos excessivos e altas pressões dentro dos minifrascos. Assim sendo, o estudo para otimização da potência real foi realizado para o forno de micro-ondas, conforme descrito no trabalho apresentado por Rosini e colaboradores (2004). Além disso, para que a vida útil do aparelho fosse preservada, evitando que as micro-ondas retornem e danifique o magnetron,

um bêquer com água foi colocado na cavidade do forno, para absorver o excesso de radiação.

Um estudo prévio para avaliar as condições ideais para uma completa decomposição das amostras foi realizado, buscando um menor tempo de irradiação das amostras, bem como a potência mais eficiente. Amostras do CRM DOLT- 4 em diferentes tempos (2, 5 e 10 minutos) e níveis de potência (1, 5 e 10) foram testados. Após a etapa de decomposição e aferidas com água deionizada, as amostras foram levadas para a quantificação de Na e K em um fotômetro de chama e os valores obtidos foram comparados com os valores certificados. Verificando-se a exatidão do método proposto, as mesmas condições otimizadas para Na e K foram aplicadas para a determinação dos demais elementos.

Como já citado, também foi realizado um estudo de otimização das temperaturas de pirólise e atomização para a determinação de Cd em amostra biológica certificada, testando dois tipos de modificadores químicos (Pd e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), podendo assim avaliar as melhores condições para a análise.

4.3.1.2 Preparo de amostras biológicas em microescala

Massas de amostras (10 a 20 mg) dos CRMs (1577c, DOLT-4 e 8414 para quantificação de K, Na e Mg; e 1577c, 8414 e 2976 para quantificação de Cd) foram pesadas diretamente nos minifrascos e volumes entre 150 a 300 μL de HNO_3 bidestilado foram adicionados. As amostras foram levadas ao forno micro-ondas sendo submetidas a uma potência média de 350 W por um período de 5 minutos. Após a completa decomposição e a temperatura ambiente, estas foram transferidas de forma quantitativa através de pipetas descartáveis para frascos tipo eppendorf, e foram aferidas a 2 mL com água deionizada.

4.3.2 Estudos prévios e preparo de amostras de carvão e cinzas

4.3.2.1 Estudos prévios realizados para a decomposição ácida sob refluxo

Neste trabalho, primeiramente foi realizado um estudo sobre a perda de massa pela umidade característica da amostra, tendo em vista que esta é uma variável importante, pois a quantidade de energia absorvida pela amostra está diretamente relacionada ao seu teor de umidade. Em amostras desidratadas o

aquecimento não é eficiente, o que pode vir a dificultar a interação com a mistura ácida durante o processo de mineralização (CASADA et. al., 1983).

Primeiramente, cerca de 1,0 g de amostra de carvão mineral foi pesado em um vidro de relógio, em triplicata, e levado até uma estufa, onde foi seco a uma temperatura de aproximadamente 105 °C, por 90 minutos, e permaneceu em um dessecador até a pesagem a temperatura ambiente. Este estudo foi realizado até as amostras adquirirem peso constante, eliminando assim, a umidade, conforme é descrito pela NBR 8293 da ABNT (ABNT, 1983). Posteriormente, foi realizado o estudo das cinzas resultantes, o qual elimina a matéria orgânica das amostras de carvão. Este procedimento foi realizado baseando-se da NBR 8289 da ABNT (ABNT, 1983).

Para verificar a influência de cada parâmetro referente à etapa de preparo das amostras em relação ao sinal analítico de cada elemento foi realizado um planejamento estatístico utilizando o software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), em ambos métodos desenvolvidos, o qual possibilita a otimização das condições de trabalho, buscando uma condição compromisso para as variáveis em estudo.

No primeiro método desenvolvido para decomposição de carvão e cinzas, quatro variáveis de estudos foram selecionadas: Volume de ácido nítrico (Vac), volume de peróxido de hidrogênio (Vp), temperatura (T) e tempo de decomposição no bloco digestor (td). Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^4 com 3 pontos centrais e 8 pontos axiais, totalizando 27 ensaios realizados de forma aleatória de acordo com a ordem das análises arranjadas pelo software Statistica 6.0. As respostas selecionadas (variáveis dependentes) foram os sinais analíticos obtidos para cada elemento em estudo (Cu, Fe, Na e Zn). Em todos os ensaios, a adição do volume de H_2O_2 (mL) foi realizada faltando $\frac{1}{4}$ do tempo total de decomposição, a fim de padronizar o procedimento.

Já no segundo método estudado, a qual busca a total decomposição dessas amostras, as três variáveis de estudos foram: Temperatura (T), tempo de decomposição (td) e razão ácido sulfúrico e ácido nítrico (Razão H_2SO_4/HNO_3). Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios

realizados de forma aleatória de acordo com a ordem das análises arranjadas pelo software Statistica 7.0. As respostas selecionadas (variáveis dependentes) foram os sinais analíticos obtidos para cada elemento em estudo (Cu, Cr e Fe) determinados por MIP OES.

4.3.2.2 Preparo de amostras de carvão (Decomposição ácida parcial sob refluxo)

Após a interpretação dos dados gerados pelos gráficos de superfície obtidos para os elementos estudados, foi possível fixar as melhores condições de trabalho e aplicar nas amostras de carvão. Assim, aproximadamente 50 mg de amostras (carvão e cinzas) foram pesadas, em triplicata, e adicionados 6 mL de HNO_3 e levados ao aquecimento à 145°C em bloco digestor, com o sistema de dedo frio acoplado aos tubos. Depois de passados 45 minutos, os tubos foram resfriados e adicionados 2,5 mL de H_2O_2 e retornaram ao aquecimento por mais 15 minutos, totalizando um tempo de decomposição final de 1 hora. Para verificar a exatidão do método proposto, testes de adição e recuperação de analitos foram realizados na presença das duas amostras em estudo.

Cabe ressaltar que outro preparo de amostras de carvão foi realizado a fim de comparar os métodos e comprovar a exatidão, tendo em vista que neste período ainda não se tinha disponível o CRM de carvão. O método recomendado pela ASTM via calcinação foi aplicado as amostras de carvão. Neste procedimento, também realizado em triplicata, foi utilizado aproximadamente 1,0 g da amostra de carvão em cadinhos de porcelana, os quais foram calcinados por 2 h à 500 °C em uma mufla. Após, transferiu-se as cinzas resultantes do processo de calcinação para tubos de PTFE e estas foram dissolvidas na presença de 20 mL de água régia e 20 mL HF concentrado, sendo a solução mantida sob aquecimento a uma temperatura de 150 °C em bloco digestor até a secura. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL HNO_3 e 20 mL de água deionizada e levou-se ao aquecimento novamente por mais 1 h. Ao final, a solução resultante foi transferida para o frasco de PP previamente calibrado e aferida à 50 mL com água deionizada (ASTM, 2000).

4.3.2.3 Preparo de amostras de carvão (Decomposição ácida total sob refluxo)

Após a análise dos dados foram gerados gráficos de superfície de resposta para cada analito, sendo possível fixar as melhores condições de trabalho. Tendo em vista que as amostras em estudo apresentam características similares, as mesmas condições otimizadas para as amostras de carvão foram aplicadas às amostras de cinzas. Assim, cerca de 150 mg de amostras foram pesadas diretamente nos tubos digestores e adicionados 4,0 mL de H_2SO_4 e 1,0 mL HNO_3 e levados ao aquecimento a 320 °C em bloco digestor por 4 horas, com o sistema de refluxo acoplado aos tubos digestores, utilizando uma recirculação de água a 15 °C. A solução resultante foi transferida para frasco de PP (polipropileno) de 50 mL previamente calibrado e adicionado 1 mL de HF e levados por uma hora em banho ultrassônico. Após foram aferidos a 15 mL com água deionizada. Todas as análises foram feitas em triplicata e para verificar a exatidão do método proposto, o método foi aplicado ao material de referência certificado de carvão (1632d – Trace Elements in coal).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Método em microescala para amostras biológicas

Durante os estudos iniciais para o emprego do preparo das amostras em microescala, tinha-se a ideia inicial de utilizar minifrascos comerciais fabricados em polipropileno com volumes na ordem de 2 mL, conforme relatados nos trabalhos de Araujo et al. (2000) e Flores et al. (2001). No entanto, alguns problemas não relatados por estes trabalhos foram observados, tais como algumas misturas durante o processo reacional atingiam elevadas temperaturas, a tal ponto que chegavam a deformar o frasco. Em outros momentos, o aumento de pressão que fazia com que a tampa fosse projetada e o sistema se abria, ocasionando perdas dos analitos e reagentes. Tentativas foram feitas para tubos maiores, no caso tubos de centrifuga, com volumes de 15 ou 50 mL, desta forma o problema de pressão foi resolvido, porém as deformações dos frascos, em alguns casos, ainda persistiram.

Essas dificuldades nos encorajaram a desenvolver um frasco que superasse todos esses inconvenientes que enfrentamos em nossos testes experimentais com as amostras biológicas. Desta forma, partiu-se para o desenvolvimento de um novo minifrasco reacional para decomposição das amostras utilizando o aquecimento pelas micro-ondas. Tomamos como ponto de partida os frascos maiores já utilizados nos fornos comerciais destinados ao preparo de amostras. Assim, decidimos que o novo frasco deveria ser construído em PTFE, devido a sua resistência química, pureza, tolerância a altas temperaturas e ser transparente às radiação de micro-ondas. Em nossos primeiros protótipos, observamos que o aumento da pressão permitia a fuga de vapores junto a tampa, o que foi solucionado posteriormente com a adição de um o’ring, resultando no design definitivo apresentado anteriormente na Figura 1.

5.1.1 Estudo das condições (tempo e potência) no forno de micro-ondas

Nas Tabelas 3 e 4, estão apresentados os resultados obtidos referentes aos estudos de otimização do tempo e da potência do forno de micro-ondas, respectivamente, utilizados no processo de microdigestão das amostras biológicas, citados no item 3.3.1.1.

Tabela 3: Estudo do tempo necessário para obter a completa decomposição do CRM DOLT-4 (NRC) no forno de micro-ondas

Potência média (5) Fixa	Na			K			
	Tempo	VI (mg kg ⁻¹)	VE (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	VI (mg kg ⁻¹)	VE (mg kg ⁻¹)	RSD (%)
2 min			-*	-*		-*	-*
5 min	6.800	6.979 ± 188		2,7	9.800	9.591 ± 379	3,9
10 min		6.608 ± 170		2,6		9.259 ± 381	4,1

VI= Valor Informado; VE= Valor Encontrado; RSD= Desvio Padrão Relativo; * Não foi possível fazer as leituras neste parâmetro, pois a decomposição foi incompleta.

Tabela 4: Estudo da potência necessária para obter a completa decomposição do CRM DOLT-4 (NRC) no forno de micro-ondas

Tempo Fixo 5 min	Na			K			
	Potência	VI (mg kg ⁻¹)	VE (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	VI (mg kg ⁻¹)	VE (mg kg ⁻¹)	RSD (%)
1 (mínima)			-*	-*		-*	-*
5 (média)	6.800	6.979 ± 188		2,7	9.800	9.591 ± 379	3,9
10 (máxima)		6.614 ± 449		6,8		9.159 ± 329	3,6

VI= Valor Informado; VE= Valor Encontrado; RSD= Desvio Padrão Relativo; * Não foi possível fazer as leituras neste parâmetro, pois a decomposição foi incompleta.

Pode-se observar que as concentrações obtidas para Na e K na amostra biológica certificada, apresentaram valores abaixo dos valores certificados, tanto quando se utilizou a potência máxima, bem como quando irradiou as amostras por um tempo mais prolongado (10 minutos), o que provavelmente, está diretamente relacionado à alta turbulência da solução da amostra no interior do frasco de digestão sob estas condições.

Baseado nestes estudos foi possível avaliar a potência mais eficiente e o menor tempo para a realização das microdigestões. Sendo assim, as amostras biológicas analisadas foram digeridas em uma potência média de aproximadamente 350 W sob um tempo de irradiação de 5 minutos.

5.1.2 Otimizações do programa de temperatura do GF AAS para determinação de Cd

Nas Figura 3 e 4, estão apresentadas as curvas de pirólise e atomização para o Cd em meio da matriz da amostra e em solução aquosa na presença de 5 µg de Pd e 50 µg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificadores químicos, respectivamente.

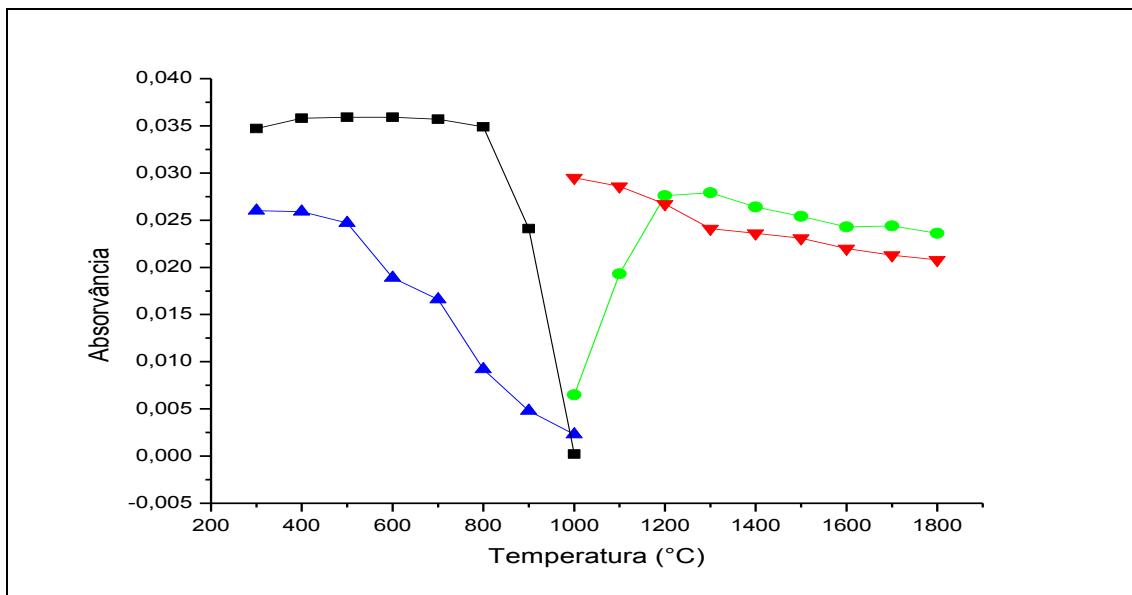


Figura 3. Curvas de pirólise e atomização da solução de amostra (CRM 1577c) e padrão ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de 5 µg de Pd. Pirólise: amostra (-■-) e padrão (-▲-); Atomização: amostra (-●-) e padrão (-▼-).

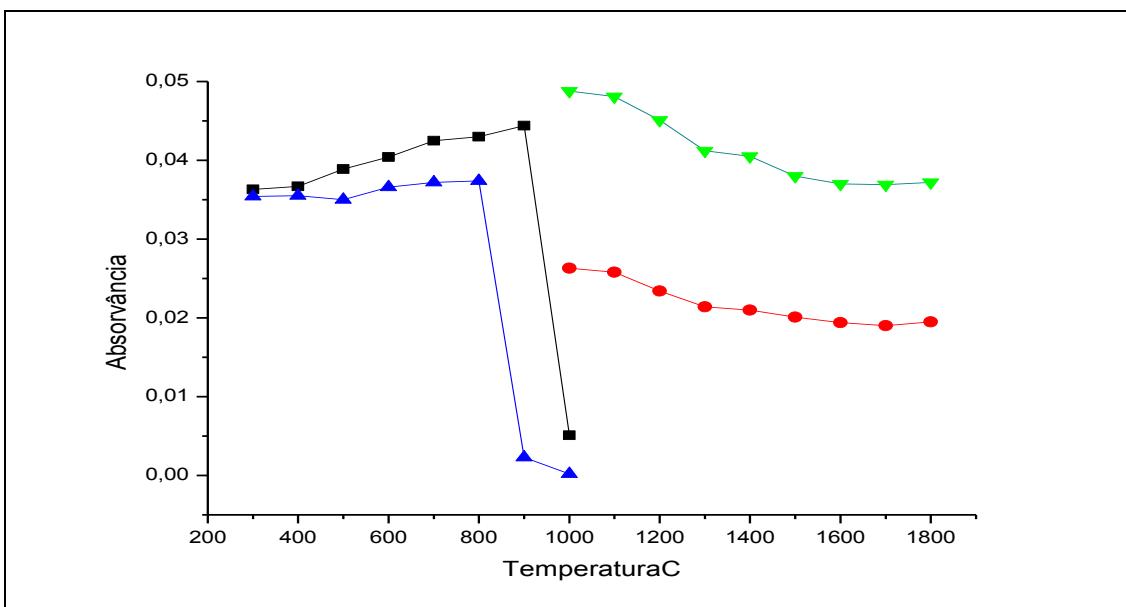


Figura 4. Curvas de pirólise e atomização da solução de amostra (CRM 1577c) e padrão ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de $50 \mu\text{g}$ de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Pirólise: amostra (-■-) e padrão (-▲-); Atomização: amostra (-●-) e padrão (-▼-).

Com os estudos de otimização das temperaturas de pirólise e de atomização para Cd (Figuras 3 e 4), pode-se observar uma proximidade dos sinais analíticos obtidos para as curvas de pirólise independente do modificador químico utilizado. No entanto, na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ não foi obtida uma temperatura de atomização compromisso entre os meios aquoso e matriz biológica. Desta forma, para as subsequentes determinações $5 \mu\text{g}$ de Pd foi utilizado como modificador.

Através da análise das curvas verifica-se que na presença do modificador químico ($5 \mu\text{g}$ de Pd), não houve perdas de Cd em temperaturas de até 500°C , para ambos os meios, desta forma optou-se em fixar esta temperatura a fim de garantir uma maior eliminação da matriz da amostra durante a etapa de pirólise. Com respeito à temperatura de atomização, esta foi fixada em 1200°C , já que sob esta condição verifica-se uma maior concordância do sinal analítico tanto em meio aquoso como na presença da amostra, além de uma melhor sensibilidade. O programa completo das condições de trabalho de tempo e temperatura para a determinação de Cd por GF AAS já foram apresentados anteriormente na Tabela 1.

5.1.3 Concentrações de Cd, K, Mg e Na em amostras de CRMs pelo método de microdigestão proposto

A exatidão dos resultados obtidos pelo método proposto e sua aplicabilidade para determinação de metais em amostras biológicas, pode ser verificada através da análise de diferentes amostras biológicas certificadas. Segundo os resultados apresentados na Tabela 5, foi possível verificar uma boa concordância entre os resultados obtidos e os valores certificados para os analitos em estudo, o que comprova a exatidão dos resultados. Além disso, a aplicação do teste-t de Student ($n = 3$) mostrou para um nível de 95% de confiança, que os resultados encontrados não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores certificados. Com base nos valores relativamente baixos dos RSDs, a precisão do método proposto também pode ser verificada.

Tabela 5. Resultados analíticos obtidos para a determinação de Cd, K, Mg e Na por técnicas de espectrometria atômica em diferentes CRMs

CRM	Valor Certificado	Valor Encontrado*	RSD (%)
Cd			
2976 (mg kg ⁻¹)	0,82 ± 0,16	0,80 ± 0,10	12,5
1577c (µg kg ⁻¹)	97 ± 1,4	95,6 ± 1,8	1,9
8414 (mg kg ⁻¹)	0,013 ± 0,011	0,014 ± 0,001	7,1
Mg			
DOLT-4**	1.500	1.443,0 ± 69,4	4,8
1577c (mg kg ⁻¹)	620 ± 42	636,9 ± 31,8	5,0
8414 (mg kg ⁻¹)	960 ± 95	938,8 ± 19,7	2,1
Na			
DOLT-4**	6.800	6.811,0 ± 93,5	1,4
1577c (%)	0,2033 ± 0,0064	0,2049 ± 0,0113	5,5
8414 (%)	0,210 ± 0,008	0,204 ± 0,011	5,4
K			
DOLT-4**	9.800	9.786,5 ± 78,9	0,8
1577c (%)	1,023 ± 0,064	1,021 ± 0,027	2,6
8414 (%)	1,517 ± 0,037	1,541 ± 0,109	7,1

*média ± desvio padrão para n=3; **Valor Informado em mg kg⁻¹.

É importante mencionar que o minifrasco desenvolvido inseriu contribuições significativas para a etapa de preparo das amostras biológicas, apresentando-se como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de análise já existentes utilizando este procedimento de microdigestão. Devido ao alto custo dos fornos de micro-ondas desenvolvidos para aplicações laboratoriais, propomos um procedimento de microdigestão das amostras utilizando um forno de micro-ondas convencional, mas conseguimos garantir a total segurança do analista, pois a abertura da amostra baseou-se no uso de minifrascos de teflon, sendo estes resistentes às pressões e temperaturas obtidas durante as microdigestões, bem como apresentam propriedades de inércia química frente a ácidos concentrados. Além disso, foram utilizadas micro quantidades de amostras e reagentes, o que vem a somar em termos de segurança, custo da análise e menor geração de resíduo.

5.1.4 Parâmetros de Mérito

Avaliando-se os parâmetros de mérito obtidos, apresentados na Tabela 6, pode-se observar boa linearidade das curvas de calibração ($R \geq 0,99$), bem como valores elevados de inclinação da curva, mostrando a sensibilidade do método proposto. Os limites de detecção (instrumental e método) alcançados pelo método se apresentaram adequados à proposta do trabalho para a determinação de todos os analitos em estudo.

Tabela 6. Parâmetros de Mérito para K, Na, Mg e Cd.

Analito	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	a (L ⁻¹ mg)	LD (μg g ⁻¹) Método	LD (μg L ⁻¹) Instrumental	R
K	1,0 – 5,0	0,1680	26,2	131,0	0,9988
Na	1,0 – 5,0	0,1671	10,6	53,0	0,9982
Mg	0,1 – 0,4	1,2747	7,48	37,4	0,9963
Cd	0,25 – 1,0 ^b	0,0750	0,01	0,09	0,9955

a: coeficiente angular da curva; LD: limite de detecção; R: coeficiente linear da curva de calibração; ^b μg L⁻¹.

5.2 Método de decomposição ácida com sistema de refluxo para amostras de carvão

5.2.1 Umidade e teor de cinzas das amostras de carvão

Os resultados obtidos tanto com relação ao teor de umidade quanto para o teor de cinzas na amostra de carvão analisada foram condizentes com os valores citados na literatura para esta matriz. De acordo com Pires e colaboradores (2001), que realizaram um estudo de caracterização de amostras de carvão e cinzas oriundas das minas de Candiota, foram encontrados teores de aproximadamente 50% e 16% m/m, para o teor de cinzas e umidade, respectivamente. Ao comparar com os valores obtidos neste trabalho, pode-se observar a semelhança nos resultados, os quais foram de aproximadamente 54% e 15% m/m, para as cinzas e umidade, respectivamente.

5.2.2 Método de decomposição ácida parcial (extração) em carvão

5.2.2.1 Otimizações (Delineamento estatístico experimental)

A otimização das melhores condições de trabalho para realizar a decomposição ácida das amostras de carvão no sistema de refluxo foi realizada através de um delineamento estatístico experimental considerando as seguintes variáveis independentes: volume de HNO_3 , volume de H_2O_2 , tempo de decomposição e temperatura do bloco, de acordo com a Tabela 7, cujos valores dos níveis foram determinados através de testes preliminares e também por trabalhos descritos na literatura.

Tabela 7. Variáveis e valores utilizados no DCCR

Variáveis independentes	Nível				
	-2	-1	0	+1	+2
Volume de HNO_3 (mL)	5	6	7	8	9
Volume de H_2O_2 (mL)	0,5	1	1,5	2	2,5
Tempo de decomposição (min)	30	60	90	120	150
Temperatura (°C)	120	145	170	195	220

A matriz do DCCR (Tabela 8) contém os ensaios com as combinações das variáveis e os resultados obtidos para os quatro analitos quantificados em amostras de carvão mineral após o processo de decomposição ácida.

Tabela 8. Matriz do DCCR para o processo de preparo de amostras de carvão mineral com o sistema de refluxo proposto

Ensaios	Variáveis Independentes				Variáveis Dependentes			
	Vac	Vp	Tempo	Temperatura	Cu*	Na**	Zn*	Fe*
1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,2030	1806,7	0,3084	1,0349
2	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,1787	1969,3	0,2471	1,0167
3	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,1783	2576,4	0,2927	1,0402
4	1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,1713	2591,8	0,2481	1,0300
5	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,1979	2018,4	0,2789	1,0452
6	1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,1726	2077,4	0,2374	1,0293
7	-1,0	1,0	1,0	-1,0	0,2017	2527,8	0,2829	1,0496
8	1,0	1,0	1,0	-1,0	0,1817	2640,6	0,2432	1,0418
9	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,2043	2093,3	0,2840	1,0461
10	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,1778	2065,8	0,2460	1,0403
11	-1,0	1,0	-1,0	1,0	0,1840	2539,4	0,2517	1,0528
12	1,0	1,0	-1,0	1,0	0,1927	2541,1	0,2600	1,0257
13	-1,0	-1,0	1,0	1,0	0,1897	2068,8	0,2653	1,0660
14	1,0	-1,0	1,0	1,0	0,1879	2043,0	0,3452	1,0221
15	-1,0	1,0	1,0	1,0	0,2075	2569,3	0,3135	1,0412
16	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1902	2549,7	0,3467	1,0273
17	-2,0	0,0	0,0	0,0	0,2178	2370,0	0,2958	1,0741
18	2,0	0,0	0,0	0,0	0,1821	2204,0	0,2554	1,0259
19	0,0	-2,0	0,0	0,0	0,2150	1673,7	0,2834	1,0606
20	0,0	2,0	0,0	0,0	0,2071	2851,9	0,2916	1,0239
21	0,0	0,0	-2,0	0,0	0,2040	2277,2	0,2864	1,0223
22	0,0	0,0	2,0	0,0	0,2110	2332,0	0,2774	1,0400
23	0,0	0,0	0,0	-2,0	0,2018	2210,2	0,2362	1,0481
24	0,0	0,0	0,0	2,0	0,2038	2202,9	0,2440	1,0366
25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2290	2230,2	0,2730	1,0599
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2100	1936,9	0,2657	1,0562
27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2294	1941,7	0,2804	1,0591

*Valores referentes aos sinais de absorvância; **Valores referentes aos sinais de emissão.

De acordo com a análise estatística dos dados, representada pelos Diagramas de Pareto (Figura 5), pode-se verificar que as variáveis estatisticamente significativas para o Cu foram: volume de ácido nítrico, tempo e temperatura. Já para o Fe, apenas o volume de ácido nítrico e o tempo foram estatisticamente significativos. Para o Zn, as variáveis estatisticamente significativas foram as interações entre volume de ácido, tempo e temperatura. Para o Na, todas as variáveis foram estatisticamente significativas. As equações 1, 2, 3 e 4 correspondem aos modelos referentes a determinação para Cu, Fe, Na e Zn.

$$y = 0,21 - 0,007 \text{ Vac} - 0,006 \text{ Vac}^2 - 0,004 \text{ td}^2 - 0,005 \text{ T}^2 \quad (1)$$

$$y = 1,05 - 0,009 \text{ Vac} - 0,003 \text{ Vp}^2 - 0,006 \text{ td}^2 - 0,003 \text{ T}^2 \quad (2)$$

$$y = 0,21 - 0,007 \text{ Vac} - 0,006 \text{ Vac}^2 - 0,004 \text{ td}^2 - 0,005 \text{ T}^2 \quad (3)$$

$$y = 0,27 - 0,007 \text{ Vac} + 0,007 \text{ T} + 0,010 \text{ Vac td} + 0,16 \text{ Vac T} + 0,017 \text{ td T} \quad (4)$$

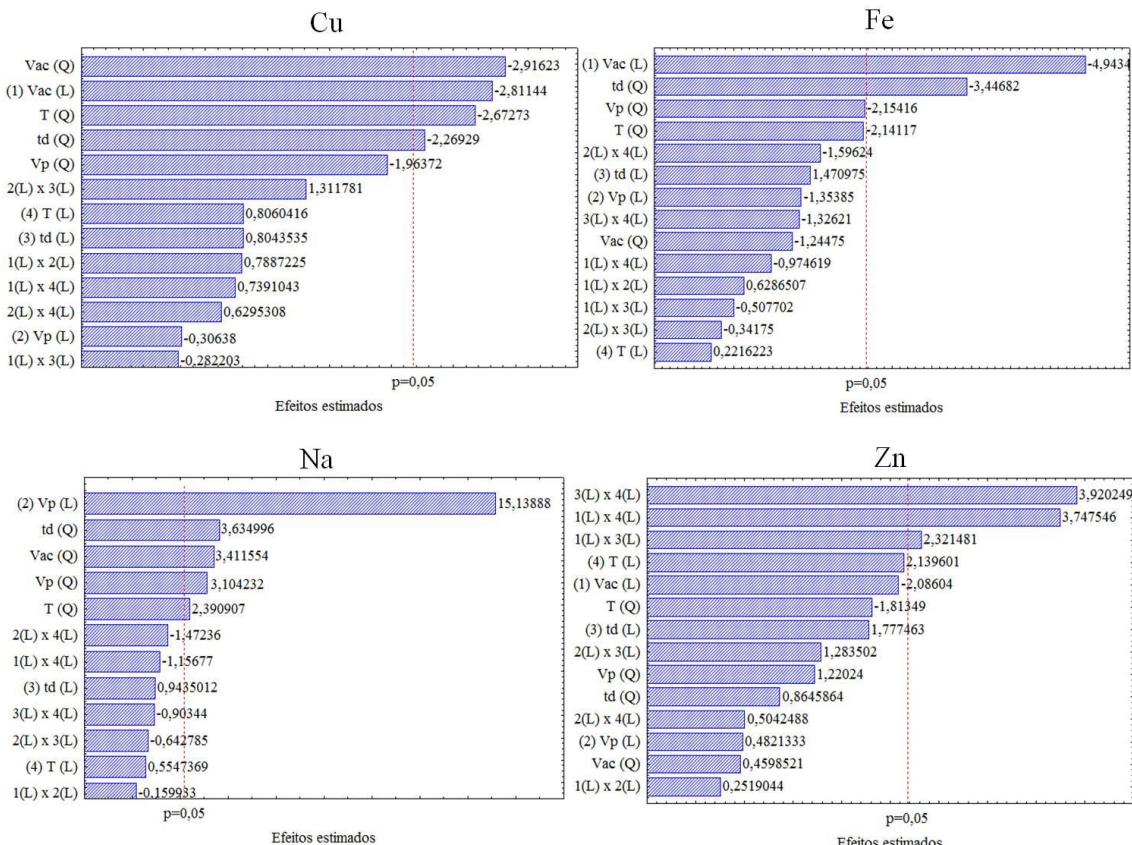


Figura 5. Gráficos de Pareto para Cu, Fe, Na e Zn.

Através da análise de variância, cujos dados são apresentados na Tabela 9, foi possível calcular estatisticamente alguns parâmetros importantes, como por exemplo, o valor de F. Os valores de F obtidos para todos os elementos estudados foram maiores que o valor de F tabelado. Com este requisito ($F_{cal} > F_{tab}$), foi possível gerar os gráficos de superfícies de respostas e avaliar uma possível condição compromisso, levando em consideração as melhores condições de análise para cada elemento.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a determinação de Cu, Fe, Na e Zn em amostra de carvão mineral

Respostas	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
Cu	Regressão	0,00305	4	0,00076	4,75
	Resíduos	0,00372	22	0,00016	
	Total	0,00677	26		
Fe	Regressão	0,00357	4	0,00089	8,55
	Resíduos	0,00230	22	0,00010	
	Total	0,00588	26		
Na	Regressão	207211	5	414423	58,4
	Resíduos	148911	21	7091	
	Total	222102	26		
Zn	Regressão	0,0143	5	0,00286	7,24
	Resíduos	0,0083	21	0,00039	
	Total	0,0226	26		

$$F_{4,22} = 2,82; F_{5,21} = 2,68.$$

Desta forma, avaliando os gráficos de superfície de respostas obtidos para Cu e Fe (Anexos 1 e 2, respectivamente), exemplificados aqui pelas Figuras 6 e 7, verifica-se que as melhores condições tendem aos pontos centrais. No entanto, cabe salientar que os ensaios apresentaram pouca variação entre as respostas (sinal de absorção), variando de 0,1778 a 0,2294 para o Cu e de 1,0167 a 1,0741 para o Fe, indicando que qualquer condição utilizada para estes elementos resultam em uma eficiente quantificação.

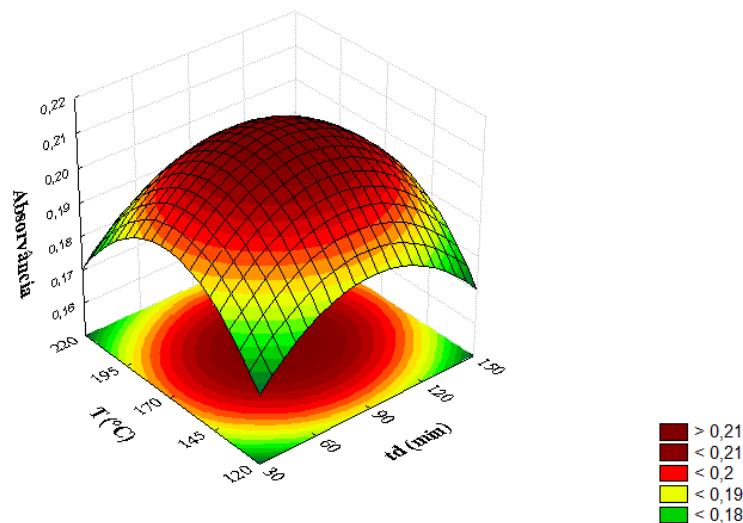


Figura 6. Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Cu (Txtd).

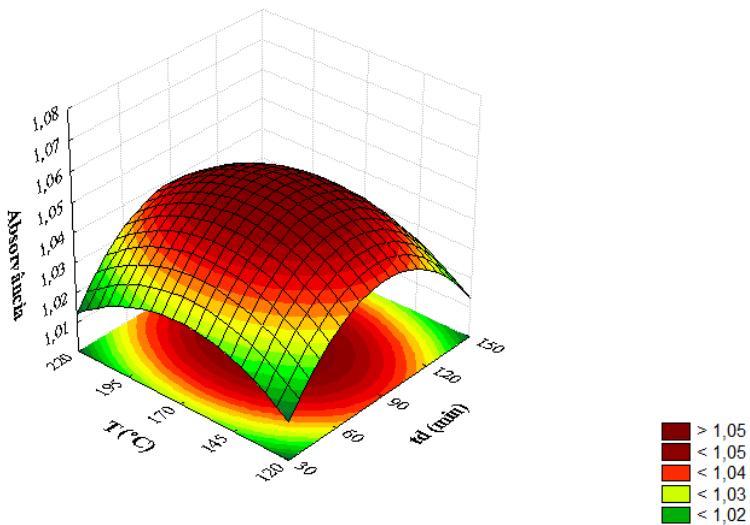


Figura 7. Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Fe (Txtd).

De acordo com as superfícies de respostas obtidas para o Zn (Anexo 3), melhores resultados foram obtidos quando utilizados os valores das extremidades das variáveis Vac, td e T (entre os pontos -1 e -2; +1 e +2), conforme exemplificada na Figura 8.

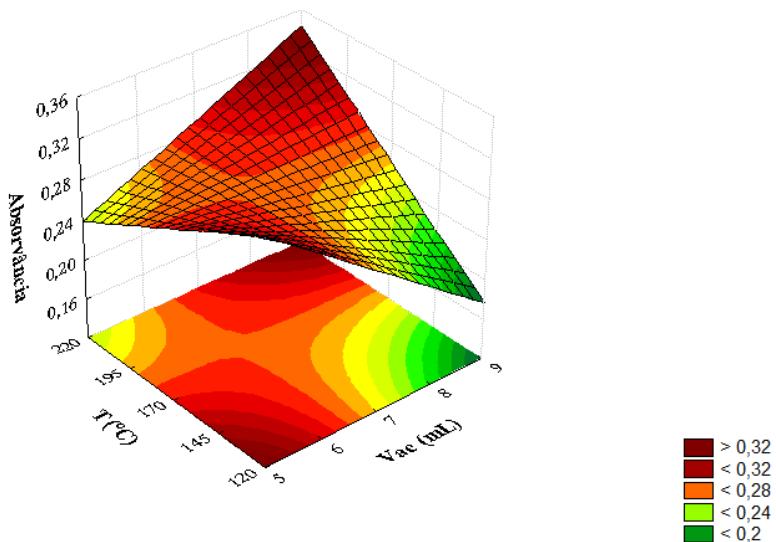


Figura 8. Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Zn (TxVac).

Pode-se observar na Figura 9, como em todos os gráficos de superfície de resposta gerados para o Na (Anexo 4), que as melhores condições tendem aos pontos extremos estudados. Os melhores resultados para o Na foram obtidos quando utilizados os níveis -2 ou +2 para o Vac, td e T. Para o Vp a melhor condição foi no nível +2. Entretanto, pode-se observar que não houve grande variação no sinal de emissão obtido nos ensaios. Portanto, as condições para validação foram baseadas nos resultados dos outros elementos.

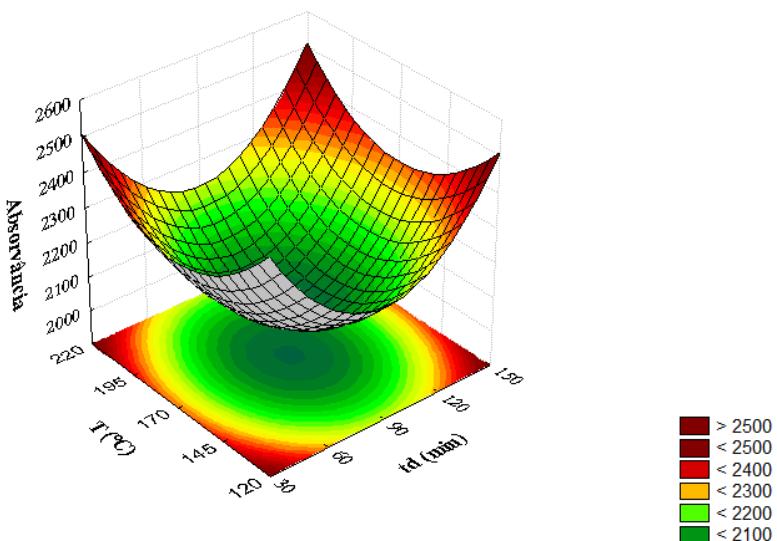


Figura 9. Gráfico de superfície de resposta em função do sinal analítico do Na (Txtd).

Após a avaliação dos gráficos de superfície gerados para os elementos em estudo, pode-se buscar uma condição compromisso para uma tentativa de determinação dos quatro analitos em um único preparo de amostras. Assim, foi fixado um volume maior de H_2O_2 (2,5 mL), visto que foi uma condição fundamental para a determinação de Na, e para os demais foi verificado que não alteraria significativamente na determinação dos mesmos. As outras condições (temperatura, tempo e volume de HNO_3) foram estabelecidas levando em consideração os resultados para a determinação de Zn, as quais foram fixadas em 6,0 mL HNO_3 , à uma temperatura de 145°C por 60 min. É importante salientar que, mesmo não sendo as condições ótimas observadas para os demais elementos, como Cu e Fe, que apontavam para os pontos centrais, estas condições ainda demonstraram estar dentro de uma faixa de boa resposta, permitindo assim o uso destas condições de trabalho.

De acordo com a literatura, de maneira geral, o carvão e as cinzas apresentam normalmente os metais na forma de sulfetos, podendo apresentar também carbonatos, sulfatos, entre outros, os quais são facilmente extraídos em condições ácidas. Em função disso, a temperatura de 145 °C por 60 minutos foi suficiente para romper a ligação dos metais com os grupamentos e liberá-los em solução, os quais foram certificados pelos testes de recuperação. O volume de 2,5 mL de H_2O_2 foi necessário devido a amostra possuir alta carga orgânica, auxiliando o processo de decomposição iniciado pelo HNO_3 .

O uso do DCCR como ferramenta estatística possibilitou a determinação da condição otimizada do processo de decomposição. A análise dos dados permitiu a seleção de uma condição com um menor consumo de reagentes, menor tempo, bem como uma boa qualidade nos resultados. Além disso, foi possível realizar um menor número de ensaios quando comparado ao método de tentativa e erro ou a combinação de todos os fatores. Cabe salientar que todas as respostas foram avaliadas simultaneamente, o que possibilitou a determinação da mesma condição para todos os analitos estudados.

5.2.2.2 Aplicação das condições otimizadas e verificação da exatidão

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método proposto para o preparo das amostras estudadas, foram utilizadas amostras de carvão e cinzas

fortificadas e não fortificadas. A Tabela 10 apresenta os resultados dos testes de adição e recuperação para Cu, Fe, Na e Zn em ambas as amostras, bem como as concentrações encontradas para estes elementos nas amostras em estudo.

Tabela 10. Concentrações obtidas em mg L^{-1} de Cu, Fe, Zn e Na em carvão e cinzas, média \pm desvio padrão (RSD) e % de recuperação

	Concentração \pm DP (RSD)	Recuperação (%)	Concentração \pm DP (RSD)	Recuperação (%)
	Amostras de Carvão		Amostras de cinzas	
Cu				
Sem adição	$0,092 \pm 0,001$ (1,1)	104,7	$0,148 \pm 0,004$ (2,7)	115,3
Adição de 1,5 ppm	$1,663 \pm 0,026$ (1,6)		$1,877 \pm 0,022$ (1,2)	
Fe				
Sem adição	$37,11 \pm 0,76$ (2,1)	93,6	$23,79 \pm 0,86$ (3,6)	113,7
Adição de 3,0 ppm	$39,92 \pm 0,39$ (0,9)		$27,20 \pm 0,39$ (1,4)	
Zn				
Sem adição	$0,288 \pm 0,002$ (0,7)	96,0	$0,128 \pm 0,004$ (3,1)	114,8
Adição de 0,5 ppm	$0,768 \pm 0,026$ (3,4)		$0,702 \pm 0,012$ (1,7)	
Na				
Sem adição	$0,696 \pm 0,013$ (1,9)	92,7	$5,930 \pm 0,085$ (1,4)	98,7
Adição de 3,0 ppm	$3,477 \pm 0,182$ (5,2)		$8,890 \pm 0,028$ (0,3)	
RSD (Desvio Padrão Relativo), DP (Desvio Padrão)				

Tendo como base os percentuais obtidos nos testes de adição e recuperação para o carvão, apresentados na Tabela 10, os quais variam entre 92,7 a 104,7%, foi possível verificar que o método proposto apresenta exatidão para análise. Além disso, foram encontrados baixos valores de desvio padrão relativos (RSD), sendo estes inferiores a 6%, o que evidencia uma boa precisão dos resultados.

Conforme citado anteriormente, as mesmas condições otimizadas para decomposição das amostras de carvão também foram aplicadas para análise de cinzas, apresentando exatidão e precisão adequada para determinação dos

respectivos analitos, o que pode ser visto a partir dos resultados apresentados na Tabela 10, onde os percentuais de recuperação variaram entre 98,7 e 115,3% e RSDs menores que 4%.

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 10, também pode-se verificar que a amostra de cinzas em estudo encontra-se dentro dos limites máximos de concentração permitidos para Cu, Zn e Na de acordo com a normativa vigente (ABNT NBR 10004:2004), a qual classificaria esta matriz em resíduos sólidos classe II B – Inerte. Porém, o valor obtido para o Fe (23,79 mg L⁻¹) encontra-se bem acima do valor estipulado pela normativa, sendo que o máximo permitido é de 0,3 mg L⁻¹, salientando a importância de controlar a concentração de metais nestas amostras, a fim de prevenir maiores problemas ambientais, pelo descarte indevido destes resíduos.

Além disso, foi aplicado um método oficial recomendado pela ASTM para análise de carvão mineral, a fim de comprovar a exatidão do método proposto, através da comparação dos dois métodos. Na Tabela 11, pode-se observar que os valores obtidos através dos dois métodos de preparo das amostras estão de acordo para os analitos em estudo, indicando a exatidão dos resultados, uma vez que não houve diferenças significativas entre os resultados a um nível de confiança de 95%, atestado pela aplicação do teste *t-student* pareado, com valores de *t* calculados (1,98; 1,62; 1,56 e 0,33 para Cu, Fe, Na e Zn, respectivamente) < *t* crítico (4,30).

Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos de Cu, Fe, Na e Zn em carvão por F AAS entre o método proposto e o método oficial recomendado

	Método Proposto (Dedo Frio)		Método Oficial (ASTM)	
	Concentração (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Concentração (mg kg ⁻¹)	RSD (%)
Cu	25,9 ± 0,4	1,5	24,1 ± 1,9	7,9
Fe	10487,4 ± 184,0	1,8	11770,5 ± 66,0	0,6
Na	203,3 ± 8,3	4,1	229,0 ± 14,8	6,5
Zn	80,7 ± 0,4	0,5	78,9 ± 9,6	12,2

n=3, para ambos métodos.

Neste trabalho foi possível verificar a eficiência do uso da decomposição ácida com sistema de refluxo nas amostras de carvão e cinzas. Essa eficiência no processo pode ser atribuída à zona de baixa temperatura no dedo frio, proporcionando a condensação dos vapores gerados, aumentando a capacidade de decomposição sem a necessidade de reposição dos ácidos. Provavelmente, na superfície do dedo frio, é gerada uma película fina de nitratos (pela decomposição com o ácido nítrico), permitindo a condensação dos analitos. Além disso, o sistema também apresenta uma ranhura para alívio de pressão, diminuindo ou anulando qualquer risco de explosão, tornando-se um método mais seguro ao analista. O método, quando comparado ao método oficial, reduz em 80 % o tempo de análise, e 70 % do consumo de reagentes, permitindo que sejam avaliados elementos sem o risco de contaminação e perdas.

5.2.2.3 Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Cu, Fe, Na e Zn em amostras de carvão e cinzas por FAAS, a partir do método proposto, estão apresentados na Tabela 12. Como pode ser observado, as curvas de calibração para todos os analitos estudados apresentaram bons coeficientes de correlação linear, com $R > 0,99$, bem como mostraram LDs, LQs e sensibilidades adequadas para atender ao objetivo que o trabalho se propõe.

Tabela 12. Parâmetros de Mérito para Cu, Fe, Zn e Na por técnicas espectrométricas em carvão e cinzas

Analito	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	a (L ⁻¹ mg)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	R
Cu	0,5 – 3,0	0,056	0,023	0,079	0,999
Fe	1,0 – 5,0	0,032	0,038	0,128	0,999
Zn	0,25 – 1,0	0,218	0,003	0,010	0,998
Na	1,0 – 5,0	389,0	0,029	0,097	0,998

a: coeficiente angular da curva; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação;
R: coeficiente da curva de calibração.

5.2.3 Método de decomposição ácida total em carvão

Tendo em vista as dificuldades encontradas para se obter uma decomposição total do carvão, o qual já era o objetivo a ser alcançado no primeiro método proposto, buscou-se alguma forma de aumentar o poder oxidante da solução ácida, bem como outras condições físicas (aumento de temperatura) para oferecer uma melhora na decomposição dessas amostras. Como pode ser visto na Figura 10, o primeiro método estudado possibilitou uma decomposição ácida parcial das amostras, extraíndo eficientemente os analitos até então estudados. No entanto, resíduos ainda eram evidentes no final do processo. Deste modo, optou-se pela utilização de uma nova mistura ácida (H_2SO_4/HNO_3), a qual possibilitou um aumento na temperatura de trabalho devido ao elevado ponto de ebulição do H_2SO_4 , permitindo assim, o uso de temperatura superior a 300 °C de aquecimento no bloco digestor, o que consequentemente iria proporcionar uma melhor decomposição dessas amostras aliados as vantagens já citadas do sistema de refluxo.



Figura 10. Amostra de carvão no processo final da decomposição ácida parcial.

5.2.3.1 Otimizações (Delineamento estatístico experimental)

Neste estudo foi aplicado um delineamento estatístico experimental para a otimização das melhores condições de trabalho e buscar a decomposição ácida total das amostras de carvão no sistema de refluxo. Este planejamento foi realizado considerando as seguintes variáveis independentes: temperatura (T), tempo de decomposição (td) e razão ácido sulfúrico e ácido nítrico (Razão

$\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) de acordo com a Tabela 13, cujos valores dos níveis foram determinados através de testes preliminares.

Tabela 13. Variáveis e valores utilizados no DCCR

Variáveis independentes	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Razão $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (mL)	2/3	2,4/2,6	3/2	3,6/1,4	4/1
Temperatura (°C)	250	265	285	305	320
Tempo de decomposição (min)	60	95	150	205	240

A matriz do DCCR (Tabela 14) contém os ensaios com as combinações das variáveis e os resultados obtidos para os três analitos quantificados em amostras de carvão mineral após o processo de decomposição ácida proposto e os sinais de intensidade de emissão obtidos por MIP OES em cada ensaio.

Tabela 14. Matriz do DCCR para a decomposição total de amostras de carvão mineral com o sistema de refluxo proposto

Ensaios	Tempo (min)	Razão		Temperatura (°C)	Variáveis dependentes		
		$\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$	H_2SO_4 (mL)		Cu^*	Cr^*	Fe^*
1	95	2,4	2,6	265	73746,66	58608,53	1307074
2	205	2,4	2,6	265	66456,65	54660,19	1342412
3	95	3,6	1,4	265	62736,15	46447,47	1076603
4	205	3,6	1,4	265	83475,61	54499,92	1550295
5	95	2,4	2,6	305	65885,84	55755,67	1438571
6	205	2,4	2,6	305	73136,63	53547,94	1482663
7	95	3,6	1,4	305	77399,1	48434,81	1232878
8	205	3,6	1,4	305	72145,77	61306,61	1475215
9	60	3,0	2,0	285	73100,96	57983,21	1346505
10	240	3,0	2,0	285	66023,38	52607,28	1262578
11	150	2,0	3,0	285	64248,26	50311,01	1199402
12	150	4,0	1,0	285	73861,87	57053,72	1388571
13	150	3,0	2,0	250	78029,94	64522,83	1588319
14	150	3,0	2,0	320	75766,68	43332,56	1586992
15	150	3,0	2,0	285	63024,24	52456,63	1290230
16	150	3,0	2,0	285	67067,38	51495,68	1335418
17	150	3,0	2,0	285	76578,48	55513,87	1401782

*Valores referentes aos sinais de intensidade de emissão

De acordo com os resultados obtidos e depois de analisados no software Statistica 7.0 foi possível concluir que nenhuma das respostas avaliadas (analitos) apresentaram alguma diferença significativa à 95% de confiança entre os ensaios. De maneira geral, houve pouca variação nos sinais de emissão no decorrer dos ensaios para os três analitos, sendo, portanto, possível utilizar qualquer uma das condições estudadas sem alterar o resultado final. Por se tratar de uma amostra de difícil decomposição, optamos por aplicar as condições mais drásticas das variáveis independentes estudadas (razão 4:1 mL H₂SO₄/HNO₃, 320 °C e 2 horas), tendo em vista a garantia de que todos analitos sejam liberados à solução durante a decomposição, permitindo a quantificação dos mesmos, bem como tentar obter a quantificação de outros elementos tais como Al e Mn contidos no CRM e nas amostras reais. Pode-se ressaltar que as condições drásticas utilizadas no método proposto também foram escolhidas tendo em vista a melhor decomposição visual (Figura 11), sendo que nessas condições utilizadas foi possível obter uma solução final límpida, sem resíduos aparentes no fundo do frasco.



Figura 11. Triplicata do CRM 1632d no processo final.

5.2.3.2 Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Al, Cu, Cr, Fe e Mn em amostras de carvão e cinzas por MIP OES, a partir do método proposto, estão apresentados na Tabela 15. Como pode ser observado, as curvas analíticas para todos os analitos estudados apresentaram bons

coeficientes de correlação linear, com $R>0,99$, bem como mostraram LDs, LQs e sensibilidades adequadas para atender ao objetivo que o trabalho se propõe.

Tabela 15. Parâmetros de Mérito para Al, Cu, Cr, Fe e Mn por MIP OES em carvão e cinzas

Analito	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	a (L ⁻¹ mg)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	R
Al		34594,02	0,001	0,003	0,99835
Cu		74231,63	0,004	0,012	0,99974
Cr	0,5 – 5,0	40532,31	0,003	0,009	0,99638
Fe		7096,32	0,005	0,015	0,99366
Mn		29410,72	0,004	0,011	0,99966

5.2.3.3 Avaliação da exatidão do método proposto

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método proposto de preparo das amostras estudadas, foi preparada uma triplicata de um material de referência certificado de carvão mineral (NIST 1632d). A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para Al, Cu, Cr, Fe e Mn no CRM por MIP OES.

Tabela 16. Concentração dos analitos Al, Cu, Cr, Fe e Mn no CRM 1632d – trace elements in coal (betuminous)/NIST (média ± desvio padrão para n=3) por MIP OES

Elementos	Valor certificado	Valor Obtido	RSD (%)
Al	0,912 ± 0,005 ^b	0,925 ± 0,007 ^b	0,8
Cu	5,83 ± 0,31 ^a	6,32 ± 0,41 ^a	6,5
Cr	13,7 ± 0,1 ^a	13,7 ± 0,4 ^a	2,9
Fe	0,749 ± 0,016 ^b	0,768 ± 0,079 ^b	10
Mn	13,1 ± 0,4 ^a	13,2 ± 0,7 ^a	5,3

^a mg kg⁻¹; ^b % (g 100g⁻¹).

Segundo os resultados apresentados na Tabela 16, foi possível verificar uma boa concordância entre os resultados obtidos e os valores certificados para os analitos em estudo (Al, Cu, Cr, Fe e Mn), o que comprova a exatidão dos resultados. Além disso, a aplicação do teste *t*-Student (n=3) mostrou para um nível de 95% de confiança, que os resultados encontrados não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores certificados

(Valores de t calculados: 3,22; 2,07; 0,08; 0,42 e 0,21; respectivamente são < t crítico 4,30). A precisão do método proposto também pode ser atestada tendo como base valores adequados de RSDs (<10%).

Após verificar a exatidão do método para os analitos estudados, foi possível aplicar as mesmas condições de preparo às amostras reais de carvão mineral e cinzas. Na Tabela 17, estão expostas as concentrações obtidas nas amostras citadas.

Tabela 17. Concentrações dos analitos encontrados (média ± desvio padrão para n=3) em amostras reais de carvão e cinzas por MIP OES

Analitos	Carvão (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Cinzas (mg kg ⁻¹)	RSD (%)
Al	58414 ± 3507	6,0	98432 ± 6588	6,7
Cu	33,7 ± 0,6	1,8	57,5 ± 2,1	3,7
Cr	74,7 ± 1,2	1,6	75,0 ± 2,1	2,8
Fe	11702 ± 352	3,0	27567 ± 1142	4,1
Mn	105,0 ± 3,0	2,9	234,0 ± 12,7	5,4

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 17, também pode-se verificar que a amostra de cinzas em estudo encontra-se dentro do limite máximo permitido para Cu de acordo com a normativa vigente (ABNT NBR 10004:2004), a qual poderia classificar esta matriz em resíduos sólidos classe II B – Inerte. Entretanto, os valores obtidos para o Al (584 mg L⁻¹), Cr (0,7 mg L⁻¹), Fe (117 mg L⁻¹) e Mn (1,0 mg L⁻¹) encontram-se bem acima do valor estipulado pela normativa, sendo que os valores máximos permitidos são de 0,2; 0,05; 0,3 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente, salientando a importância de um maior controle da concentração desses metais entre tantos outros nestas amostras, a fim de prevenir maiores problemas ambientais, pelo descarte indevido destes resíduos.

6. CONCLUSÕES

O método proposto de microdigestão de amostras biológicas se apresentou como um procedimento simples, rápido e seguro requerendo micro quantidades de amostra e reagentes. Os resultados obtidos foram concordantes com os valores informados nos CRMs utilizados para a quantificação dos respectivos elementos (Cd, K, Mg e Na), sendo adequado ao preparo de amostras biológicas para posterior determinação dos respectivos elementos por técnicas de espectrometria atômica.

O primeiro método apresentado para a decomposição ácida parcial de amostras de carvão e cinzas em um sistema sob refluxo, demonstrou ser um método eficiente para a extração dos analitos estudados, que utiliza poucas quantidades de amostras e reagentes, quando comparado a outros métodos convencionais já utilizados. Mostrou ser um preparo de amostras rápido, simples e seguro, tendo em vista que a maioria dos procedimentos adotados para essas amostras utilizam misturas ácidas bastante perigosas ao serem manipuladas. Apesar do método não obter uma decomposição completa e sim uma extração dos analitos para o meio aquoso, a eficiência do método proposto também pôde ser avaliada pelos resultados obtidos, que apresentaram taxas de recuperação entre 93 a 105% dos analitos em estudo, atestando uma boa exatidão do método, bem como boa concordância dos valores obtidos pelo método oficial recomendado.

O segundo método proposto para a decomposição ácida total de amostras de carvão e cinzas apresentou resultados preliminares muito satisfatórios, tendo em vista que no final do processo já foi possível obter uma solução límpida, sem resíduos aparentes, o que permite concluir a possibilidade da utilização do sistema sob refluxo para essas amostras e obter uma total decomposição. Este método se apresenta como uma alternativa promissora a decomposição de amostras de carvão e cinzas, pois demonstrou ser rápido, simples e seguro quando comparado aos métodos oficiais recomendados. A eficiência do método também pode ser observada através dos resultados obtidos, que apresentaram boa concordância entre os valores e os dados certificados para os analitos em estudo (Al, Cu, Cr, Fe e Mn) por MIP

OES, atestando uma boa exatidão, bem como apresentou boa precisão e sensibilidade adequada para atender o propósito do trabalho.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – NBR 10004 – Resíduos Sólidos: Classificação; Rio de Janeiro, **2004**.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – Carvão Mineral: Determinação de umidade. NBR 8293 (MB1893), **1983**.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – Carvão Mineral: Determinação do teor de cinzas. NBR 8289 (MB1891), **1983**.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; MESKO, M. F.; NUNES, M. A. G.; PEREIRA, V. A.; MULLER, E. I.; DRESLLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion *Talanta*, 83, 364-369, **2010**.

ARAUJO, G. C. L., NOGUEIRA, A. R. A., NOBREGA, J. A., Single vessel procedure for acid-vapour partial digestion in a focused microwave: Fe and Co determination in biological samples by ETAAS. *Analyst*, 125, 1861-1864, **2000**.

ASTM (Annual Book of ASTM Standards), D 6357-00a, **2000**.^a

ASTM (Annual Book of ASTM Standards), D 6349-01, **2001**.

ASTM (Annual Book of ASTM Standards), D 3683-94, **2000**.^b

BEATY, R. D.; KERBER, J. D. *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry*, Perkin Elmer Corporation, **1993**.

BETTINELLI, M; BARONI, U.; PASTORELLI, N.J. Determination of arsenic, cadmium, lead, antimony, selenium and thallium in coal fly ash using the stabilised temperature platform furnace and Zeeman-effect background correction. *Anal. At. Spectrom.*, 3, 1005-1011, **1988**.

CAMPOS, R.C.; VEGUERIA, S. F. J; GONÇALVES, R. A.; WAGENER, A. L. R.; Microdigestion Procedure Directly Performed in the Autosampler Cups for the Determination of Trace Elements in Biological Samples by GF AAS *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, 1925-1930, **2009**.

CASADA, M. E.; WALTON, L. R.; SWETNAM, L. D.; CASADA, J. H.; Moisture content as a function of temperature rise under microwave radiation. *Transactions of the ASAE – Am. Soc. of Agricul. Eng.*, 82-3066, 907-911, **1983**.

DAMIN, I. C. F., SILVA, M. M., VALE, M. G. R., WELZ, B. Feasibility of using direct determination of cadmium and lead in fresh meat by electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes. *Spectrochim. Acta Part B*, 62, 1037-1045, **2007**.

DRVODELIC, N., Elemental analysis of river sediment using the Agilent 4200 MP-AES. (Application Note: 5991-6161EN) Agilent Technologies (2015).

FERREIRA, S.L.C.; SILVA, L.O.B.; SANTANA, F.A.; JUNIOR, M.M.S.; MATOS, G.D.; SANTOS, W.N.L.; A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. *Microchem. J.*, 106, 307-310, **2013**.

FINKELMAN, R. B.; GROSS, P. M. K.; The types of data needed for assessing the environmental and human health impacts of coal. *Int. J. of Coal Geol.* 40, 91-101, **1999**.

FLORES, É. M. M. ; SAIDELLES, A. P. F. ; BARIN, J. S. ; MORTARI, S. R. ; MARTINS, A. F. J. Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. At. Spectrom.*, 16, 1-6, **2001**.

GHISI, M.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria atômica com chama. *Rev. Analyt.*, 28, 58-65, **2007**.

JANKOWSKI, K. J.; RESZKE, E. *Microwave induced plasma analytical spectrometry*. Roy. Soc. of Chem., **2010**.

KORN, M. G. A.; BOA MORTE, E. S.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N.; Sample Preparation for the

Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. *App. Spectrosc. Rev.* 43, 67, **2008**.

KRUG, F.J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, Cap. 5, 141-156, **2010**.

KULIKOV, E. Determination of major elements in methanol using the Agilent 4200 MP-AES with External Gas Control Module. (Application Note: 5991-6469EN) Agilent Technologies (2015).

LAJUNEN, L. H. J. *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*, University of Oulu, Finland, **1992**.

LI, W., SIMMONS, P., SHRADER, D., HERRMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, 112, 43-48, **2013**.

L'VOV, B.V. The investigation of atomic absorption spectra by complete vaporization of the sample in a graphite cuvette. *Spectrochim. Acta. Part.*, 39, 149-157, **1984**.

MAIA, S.M.; POZEBON, D.; CURTIUS, A. J.; Determination of Cd, Hg, Pb and Tl in coal and coal fly ash slurries using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18, 330–337, **2003**.

MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; KEMIECIKI, G.A.; Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, 470, 195–204, **2002**.

MEERAVALI, N. N.; MADHAVI, K.; KUMAR, S. J.; Microwave assisted aqua regia extraction of thallium from sediment and coal fly ash samples and interference free determination by continuum source ETAAS after cloud point extraction. *Talanta*, 104, 180-186, **2013**.

MIOR, R.; MORÉS, S.; WELZ, B.; CARASEK, E.; ANDRADE, J. B. Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace. *Talanta*, 104, 368-374, **2013**.

MORTARI, S. ; SAIDELLES, A. P. F. ; BARIN, J. S. ; FLORES, É. M. M. ; MARTINS, A. F. A Simple Procedure for Decomposition of Human Hair Using Polypropylene Vials for Selenium Determination by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Mikrochim. Acta*, 148, 157-162, **2004**.

MUJURU, M.; MOYO, S.; McCRINDLE, R. I.; MOKGALAKA-MATLALA, N., Extraction of trace elements in coal for determination by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry using N,N-dimethylformamide and ultrasound. *Spectrochim. Acta Part B*, 76, 147-151, **2012**.

NELSON, J.; HOPFER, H.; GILLELAND, G.; CUTHBERTSON, D.; BOULTON, R.; EBELE, S. E. Elemental profiling of Malbec Wines for geographical origin using an Agilent 4200 MP-AES. (Application Note: 5991-5922EN) Agilent Technologies (2015).

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUZA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochim. Acta Part B*, 61, 465-495, **2006**.

NOMURA, C. S., OLIVEIRA, P. V.; Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por Espectroemtria de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. *Quim. Nova*, 29(2), 234–239, **2006**.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *J. of Braz. Chem. Soc.*, 14, 174–182, **2003**.

OLIZ, C. M.; PEREIRA, C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, A. M., Avaliação de tratamentos da amostra em microescala para a determinação de K, Mg, Na e Zn em carnes por técnicas de espectrometria atômica. *Quím. Nova*, 36, 972-977, **2013**.

ORESTE, E.Q.; JESUS, A.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, M.M.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S.; New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. *Microchem. J.*, 109, 5-9, **2013.**^a

ORESTE, E. Q.; OLIVEIRA, R. M.; NUNES, A. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GF AAS: Use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. *Anal. Methods*, 5, 1590-1595, **2013.**^b

PIRES, M; QUEROL, X.; TEIXEIRA, E.C.; Caracterização do carvão de Candiota e suas cinzas. *Geochim. Brasilien.*; 15(1/2), 113- 130, **2001**.

RIBEIRO, A.S.; ARRUDA, M.Z.A.; CADORE, S., Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio: uma revisão crítica. *Quím. Nova*, 25, 396-405, **2002**.

RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. Slurry preparation procedures for Hg determination in sediments, sewage sludge and coal samples by cold vapor atomic absorption spectrometry CV AAS. *J. of Braz. Chem. Soc.*, 15, 825-831, **2004**.

RODUSHKIN, I; AXELSSON, M. D.; BURMAN, E. Multielement analysis of coal by ICP techniques using solution nebulization and laser ablation. *Talanta*, 51 (4), 743, **2000**.

ROSINI, F.; NASCENTES, C. C.; NÓBREGA, J. A.; Experimentos Didáticos Envolvendo Radiação Microondas; *Quim. Nova*, 27, 1012, **2004**.

SWAINE, D. J.; GOODARZI, F.; *Environmental Aspects of Trace Elements in Coal*, Kluwer Academia Publishers: Dordrecht, **1995**.

TANABE, C.; SILVA, F.; GILLELAND, G.; NELSON, J. Determination of major elements in milk using the Agilent 4200 MP-AES. (Application Note: 5991-6159EN) Agilent Technologies (2015).

TRUONG, P.; CAUDURO, J. Determination of major elements in fruit juices using the Agilent 4200 MP-AES with the Agilent 4107 Nitrogen Generator. (Application Note: 5991-3613EN) Agilent Technologies (2015).

VALKOVIC, V.; *Trace elements in coal*, CRC Press: Boca Raton, **1983**.

VUMMITI, D., Determination of available nutrients in soil using the Agilent 4200 MP-AES. (Application Note: 5991-5675EN) Agilent Technologies (2015).

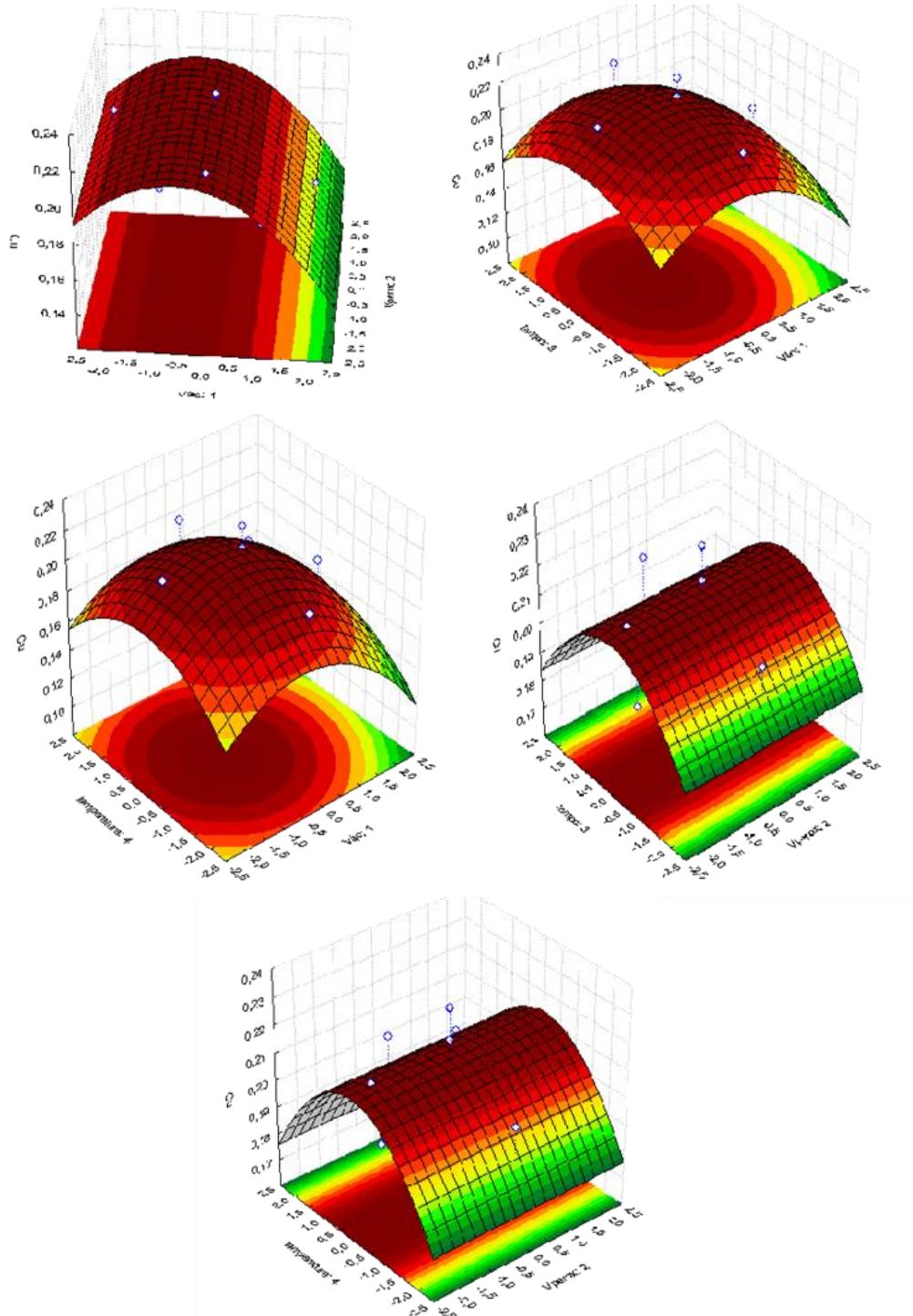
XU, Y. H.; IWASHITA, A.; NAKAJIMA, T.; YAMASHITA, H.; TAKANASHI, H.; OHKI, A.; Effect of HF addition on the microwave-assisted acid-digestion for the determination of metals in coal by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Talanta*, 66, 58-64, **2005**.

ZJUSZ-ZUBEK, E.; KONIECCZYNSKI, J.; Dynamics of trace elements release in a coal pyrolysis process. *Fuel*, 82, 1281-1290, **2003**.

WANG, J.; NAKAZATO, T.; KINYA, S.; YAMADA, O.; TAO, H.; SAITO, I.; Microwave digestion with $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ mixture at high temperatures for determination of trace elements in coal by ICP-OES and ICP-MS. *Anal. Chim. Acta*, 514, 115-124, **2004**.

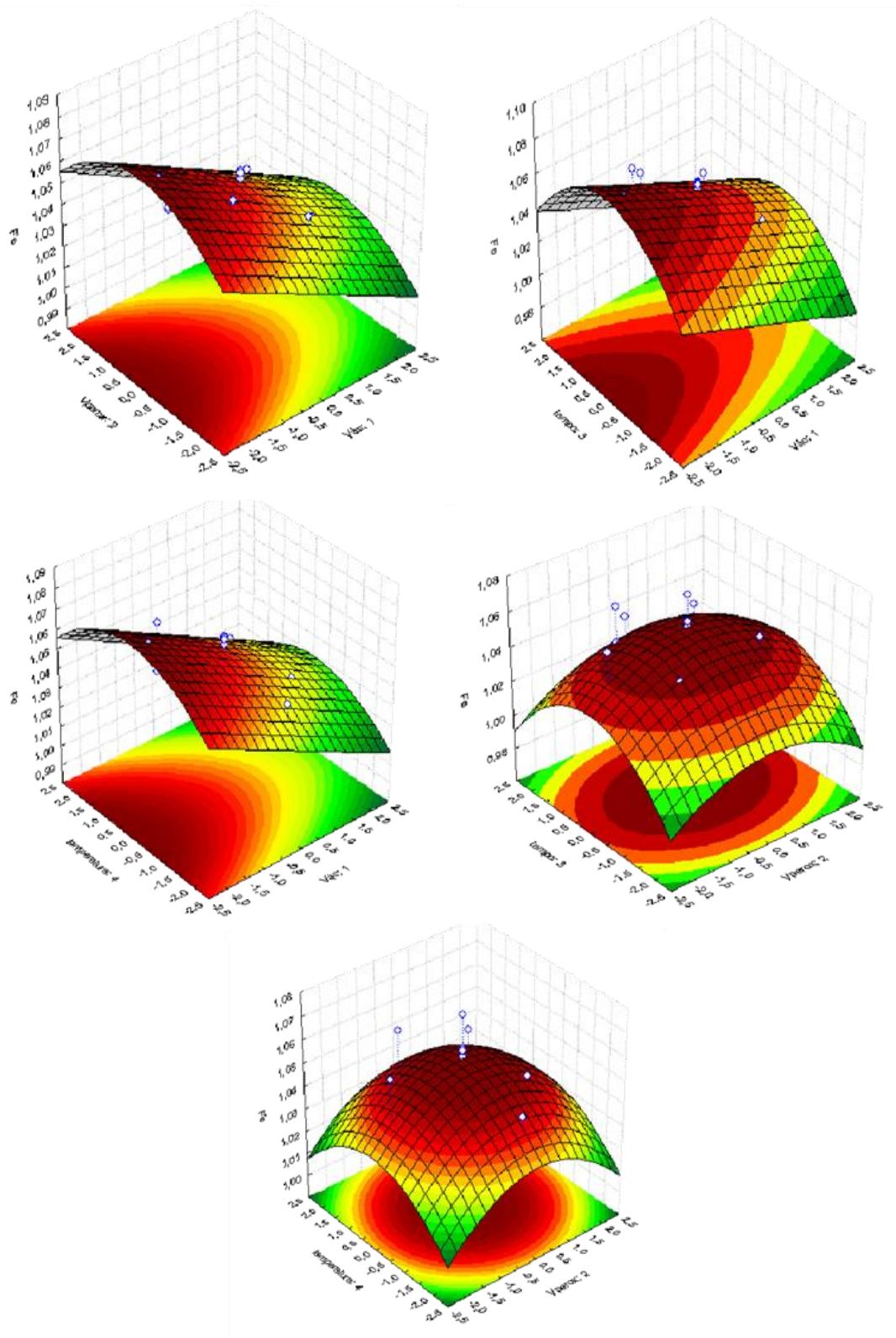
ANEXO 1

Superfícies de resposta para o Cu no método de decomposição ácida parcial de carvão.



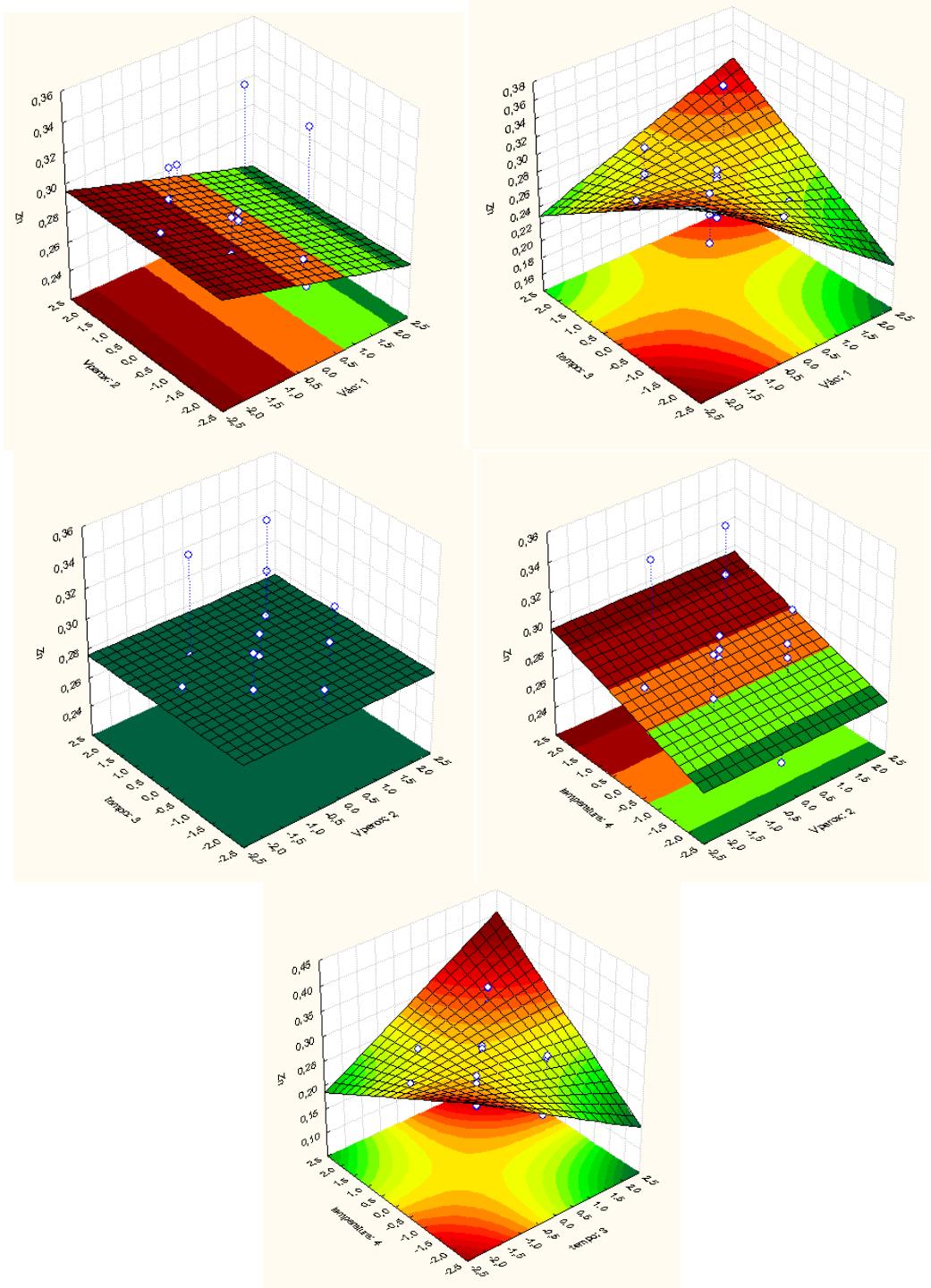
ANEXO 2

Superfícies de resposta para o Fe no método de decomposição ácida parcial de carvão.



ANEXO 3

Superfícies de resposta para o Zn no método de decomposição ácida parcial de carvão.



ANEXO 4

Superfícies de resposta para o Na no método de decomposição ácida parcial de carvão.

