

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

**Determinação de Na, K em amostras biológicas e Hg em
álcool combustível por Espectrometria Atômica**

Caroline Santos da Silva

Pelotas, fevereiro de 2011.

Caroline Santos da Silva

Determinação de Na, K em amostras biológicas e Hg em álcool combustível por Espectrometria Atômica

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira

Pelotas, 2011.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Determinação de Na, K em amostras biológicas e Hg em álcool combustível por Espectrometria Atômica.”, de autoria de Caroline Santos da Silva.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro (Orientador)

.....
Dr^a. Adriane Medeiros Nunes (PNPD-UFPeI)

.....
Prof^a. Dr^a. Solange Cadore (Unicamp)

**“Impossível ganhar sem saber perder.
Impossível andar sem saber cair.
Impossível acertar sem saber errar.
Impossível viver sem saber reviver”**

*Dedico esse trabalho aos meus pais
João e Maria Luiza, minha irmã Thaís e
minha Madrinha Eliane, que são minha
base para tudo e sem eles não teria
chegado até aqui. Eu amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de execução do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelas inúmeras contribuições e valiosos ensinamentos feitos para o meu crescimento profissional, pela amizade, ajuda, conselhos e pela confiança em mim depositada durante esses dois anos. Muito obrigada de coração.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira, pelas contribuições realizadas neste trabalho, pela ajuda, carinho, amizade e também pela confiança em mim depositada.

Ao meu colega de laboratório e Iniciação Científica, Eliézer, um agradecimento especial, devido a sua amizade conquistada ao longo desses dois anos, paciência e principalmente pela ajuda na realização deste trabalho.

À minha colega de laboratório, Dra. Adriane Medeiros Nunes, pela grande amizade em pouco tempo e ajuda nos trabalhos realizados no laboratório. Muito obrigada mesmo.

Aos meus colegas de laboratório: Tanize, Camila Oliz, Camila Corrêa, Meibel, Eliane e Rafael pela convivência, pela amizade, pelas risadas e pelos bons momentos vividos.

Aos meus colegas de Mestrado: Cátia, Cristiane, Matheus, Maraísa, Lóren e Fabiane, agradeço por todos os momentos bons que vivemos, vocês ficarão guardados pra sempre no meu coração. Um agradecimento especial a

Cristiane, pela amizade e por toda ajuda neste último ano de mestrado

À minha amiga Claudia Santos pela amizade desde a minha graduação e pela força que sempre me deu em todos os momentos. Muito obrigada de verdade.

Ao Coordenador da Pós-Graduação, Prof. Dr. Eder João Lenardão e Vice-coordenador Gelson Perin, pela confiança em mim depositada como Representante Discente e pela amizade.

Aos funcionários do IQG, José Marcos, Márcio, D. Rosa, Algemiro, Paulinho, Richele, e principalmente a Djanira por toda amizade.

Aos Professores Sérgio e Alzira, pela amizade desde a Graduação, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus tios: Guigo e Luci, Claudia e Antonio e ao meu Dindo Gilmar pela ajuda e força desde o início do mestrado.

Às minhas grandes amigas: Adriane, Camila, Clarissa, Elisa, Gisele, Lídia, Lisiane, Paula, Sharon e Tati, obrigada por ser meu refúgio dos finais de semana, obrigado por cada sorriso, cada palavra amiga e cada conselho, com certeza eu posso dizer que sem vocês eu não seria nada, muito obrigada mesmo!

Agradeço a CAPES e ao MAPA pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos aos membros da banca avaliadora deste trabalho Prof^a. Dr^a. Solange Cadore e a Dr^a. Adriane Medeiros Nunes, por sua disposição e grandiosa contribuição científica.

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

CURRÍCULO VITAE

1. Formação Acadêmica/ Titulação

1.1 Bacharelado em Química pela Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, RS, 2004-2007.

2. Formação Complementar

2.1 Extensão Universitária em Microscopia Eletrônica de Varredura, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL - RS, 2007, Carga horária: 12 horas.

2.2 Inglês FIRST CHOICE A, ZK Idiomas, Rio Grande - RS, 2008, Carga horária: 60 horas.

2.3 Operação no Sistema de Absorção Atômica AA-6300 Shimadzu, SINC do Brasil Instrumentação Científica LTDA, 2009, Carga horária: 12 horas.

2.4 Fundamentos em Espectrometria de Absorção Atômica, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL - RS, 2009, Carga horária: 4 horas.

2.5 I Workshop em Química Analítica, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL-RS, 2010, Carga horária: 20 horas.

2.6 VIII Workshop sobre Preparo de Amostras, Universidade de São Paulo, USP-SP, 2010, Carga horária: 32 horas.

2.7 V Curso Teórico- Prático sobre AAS e ICP-MS, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC – SC, 2010, Carga horária: 50 horas.

2.8 Difração de Raios – X em Monocristal, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL- RS, 2010, Carga horária: 8 horas.

3. Atividades Didáticas

3.1 Docência orientada na disciplina de Química Analítica Quantitativa para o Curso de Química de Alimentos, sob orientação do Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, com carga horária de 68 horas, no período de 04/2009 a 08/2009.

3.2 Docência orientada na disciplina de Química Geral para o Curso de Tecnologia em Alimentos, sob orientação da Profª. Drª Mariana Antunes Vieira, com carga horária de 68 horas, no período de 08/2010 a 01/2011.

4. Comunicações e Resumos Expandidos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos

4.1 SILVA, Caroline Santos; ORESTE, Eliézer Quadro; NUNES, Adriane Medeiros; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Estudos para a Determinação de Mercúrio e Metilmercúrio em Álcool Combustível por Geração Fotoquímica de Vapor acoplada a Espectrometria de Absorção Atômica. In: Simpósio Estadual de Agroenergia e Reuniões Técnicas de Agroenergia (3º), da Mandioca (10º) e Batata-doce (2º), 2010, Pelotas - RS. Resumos do Simpósio Estadual de Agroenergia e Reuniões Técnicas de Agroenergia (3º), da Mandioca (10º) e Batata-doce (2º). V. Único.

4.2 ORESTE, Eliézer Quadro; SILVA, Caroline Santos; NUNES, Adriane Medeiros; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Estudos para a Determinação de Mercúrio em Carnes por Geração Fotoquímica de Vapor Acoplada a Espectrometria de Absorção Atômica. In: XIX Congresso de Iniciação Científica XII ENPOS II Mostra Científica, 2010, Pelotas - RS. Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica XII ENPOS II Mostra Científica, 2010. V. Único.

4.3 SILVA, Caroline Santos; ORESTE, Eliézer Quadro; NUNES, Adriane Medeiros; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Determinação de Hg Proveniente do Etilmercúrio em Álcool Combustível por Geração Fotoquímica de Vapor acoplada a Espectrometria de Absorção Atômica. In: XIX Congresso de Iniciação Científica XII ENPOS II Mostra Científica, 2010, Pelotas - RS. Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica XII ENPOS II Mostra Científica, 2010. V. Único.

4.4 RAUBACH, Cristiane Wienke; CARRENO, Neftali L.V.; GUIMARAES, Claudia Cunha; SILVA, Caroline Santos; GARCIA, Irene Teresinha Santos; ALVARO, Gisele Oliveira; FAJARDO, Humberto Vieira; PROBST, Luiz Fernando Dias. Obtenção de um nanocompósito de carbono por aproveitamento de derivados de óleo vegetal com aplicação catalítica na reação de reforma do Etanol. In: IV Congresso do Carbono, 2007, Gramado - RS. Anais do IV Congresso do Carbono, 2007.

5. Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos

5.1 SILVA, Caroline Santos ; NUNES, Adriane Medeiros; ORESTE, Eliézer Quadro; ACUNHA, Tanize dos Santos; RIBEIRO, Anderson Schwingel . Determinação de Na e K em carnes processadas após tratamento com TMAH por FAES. In: 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP. Resumos da 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010. V. Único. p. QA-020.

5.2 SILVA, Caroline Santos; ORESTE, Eliézer Quadro; NUNES, Adriane Medeiros; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Determination of Mercury in Alcohol Fuel by Photochemical Vapor Generation. In: Eleventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2010, Mar del Plata - Argentina. Book of Abstract - Eleventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2010. V. Único.

5.3 MENDES, R. P.; FARIAS, B. M. P.; **SILVA, Caroline Santos** ; NUNES, Adriane Medeiros ; YAMASAKI, Alzira . Determinação de Manganês em águas de abastecimento através da técnica de Voltametria de Redissolução Catódica por Onda Quadrada. In: XVIII Encontro de Química da Região Sul - SBQSul 2010, 2010, Curitiba - PR. Resumo do XVIII Encontro de Química da Região Sul - SBQSul 2010, 2010. V. Único.

5.4 NUNES, Adriane Medeiros; SOUSA, R. A.; **SILVA, Caroline Santos**; VIEIRA, Mariana Antunes; RIBEIRO, Anderson Schwingel; CADORE, S.. Determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in different meat samples by ICP-AES after solubilization with tetramethylammonium hydroxide. In: VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2010, São Carlos - SP. Resumos do VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2010. V. único

5.5 ORESTE, Eliézer Quadro; **SILVA, Caroline Santos**; NUNES, Adriane Medeiros; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Determinação de mercúrio em amostras de carnes processadas por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica/ XI ENPOS/ I Mostra Científica, 2009, Pelotas. Resumo XVIII Congresso de Iniciação Científica/ XI Encontro de Pós-Graduação/ I Mostra Científica. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2009. V. Único.

5.6 ACUNHA, Tanize dos Santos; **SILVA, Caroline Santos** ; NUNES, Adriane Medeiros ; RIBEIRO, Anderson Schwingel . Determinação de Cd em enlatados por Espectroscopia de Absorção Atômica com Forno de Grafite. In: XVII Congresso de Iniciação Científica/ XI Encontro de Pós-Graduação/I Mostra Científica, 2009, Pelotas. Resumo XVIII Congresso de Iniciação Científica/ XI Encontro de Pós-Graduação/ I Mostra Científica. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2009. V. Único.

5.7 ORESTE, Eliézer Quadro; **SILVA, Caroline Santos**; RIBEIRO, Anderson Schwingel. Estudo para a determinação de Hg em amostras de carnes processadas por CV-AAS. In: XVII Encontro de Química da Região Sul (XVII SBQ Sul): Desafios em Química Tecnológica e Ambiental, 2009, Rio Grande. Resumos do XVII Encontro de Química da Região Sul (XVII SBQ Sul), 2009. V. Único.

5.8 NUNES, Michael Ramos; **SILVA, Caroline Santos**; GRANADA, Rossana Leitzke; RAUBACH, Cristiane Wienke; CARRENO, Neftali L.V.; GARCIA, Irene Teresinha Santos; ORLANDI, Marcelo Ornaghi. Obtenção e Caracterização de Nanopartículas de Dióxido de Estanho em Matriz Amorfa de Sílica. In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, 2007, Ponta Grossa. Obtenção e Caracterização de Nanopartículas de Dióxido de Estanho em Matriz Amorfa de Sílica, 2007.

5.9 RAUBACH, Cristiane Wienke; KROLOW, Matheus Zorzoli; **SILVA, Caroline Santos**; NUNES, Michael Ramos; CARRENO, Neftali L.V.; ORLANDI, Marcelo Ornaghi. Nanoestruturas de Dióxido de Estanho Funcionalizadas em uma Matriz de Vidro Amorfa. In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, 2007, Ponta Grossa - PR. Nanoestruturas de Dióxido de Estanho Funcionalizadas em uma Matriz de Vidro Amorfa, 2007.

5.10 SANTOS, Claudia Guimarães; **SILVA, Caroline Santos**; CARRENO, Neftali L.V.; LENARDAO, Eder João; PERIN, Gelson. Síntese Química de Nanomateriais Ativos em Processos Catalíticos. In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006, Pelotas - RS. Síntese Química de Nanomateriais Ativos em Processos Catalíticos, 2006.

RESUMO

Título: Determinação de Na, K em amostras biológicas e Hg em álcool combustível por Espectrometria Atômica.

Autora: Caroline Santos da Silva

Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira

No Capítulo 1, um novo procedimento baseado na solubilização de amostras de carnes processadas utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foi desenvolvido para a determinação de Na e K por Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (F AES). A metodologia proposta foi validada através de testes de adição e recuperação de analito, bem como, utilizando diferentes procedimentos de decomposição na presença de ácido nítrico ou ácido fórmico, seguido da aplicação de testes estatísticos, os quais não apresentaram diferenças significativas entre os resultados quando comparados, com um nível de confiança de 95% pelo Teste t de Student. Limites de detecção (LOD) de $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$ para Na e $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para K foram obtidos utilizando o TMAH. O método proposto mostrou-se simples, requerendo uma pequena quantidade de amostra e reagentes, provando ser eficiente na solubilização das amostras analisadas para posterior determinação dos respectivos analitos. O potencial da sua aplicação em outros tipos de amostras e analitos é evidente.

No Capítulo 2, um novo procedimento baseado na exposição das amostras de álcool combustível à radiação UV na presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular foi desenvolvido para a determinação de Hg total a partir da forma inorgânica e orgânica (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) por geração fotoquímica de vapor frio acoplada a espectrometria de absorção atômica (*photo*-CV-AAS). Para cada espécie, as condições ótimas da geração fotoquímica foram investigadas, tal como o efeito das concentrações dos reagentes empregados no preparo das amostras, que também fornece a melhor condição de formação dos radicais no reator fotoquímico, o tempo de exposição da amostra frente à radiação UV e a vazão do gás carreador. A

exatidão do método foi validada através de testes de adição e recuperação para cada espécie de Hg estudada e também para o Hg total (mistura das espécies investigadas) empregando a calibração convencional com álcool bidestilado e padrão inorgânico. Os resultados obtidos para as recuperações foram satisfatórios, ficando entre 91 a 107%, utilizando tanto o sistema comercial adaptado *photo*-CV-AAS 1 e também pelo sistema *photo*-CV-AAS 2, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. Os limites de detecção ficaram entre 0,10 a 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Sistema 1 e de 0,06 a 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o sistema 2. Os desvios padrão relativos foram sempre menores que 4,5 %, possibilitando dessa forma a determinação de Hg total em álcool combustível por *photo*-CV-AAS. De um modo geral, podemos dizer que a metodologia proposta apresenta uma sensibilidade adequada, sendo muito simples e barata, com excelente frequência analítica permitindo uma fácil implementação para o uso em análise de rotina, além de promover a química verde. Certamente, o uso da geração fotoquímica de vapor poderá ser empregada com sucesso em outras amostras de combustível, assim como sua aplicabilidade deverá ser adequada para a determinação de outros elementos ainda não investigados.

Palavras-chave: sódio, potássio, mercúrio, carnes processadas, álcool combustível, geração fotoquímica de vapor, Espectrometria atômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Dissertação de Mestrado em Química
Pelotas, Fevereiro, 2011.

ABSTRACT

Title: Determination of Na, K in biological samples and Hg in ethanol fuel by Atomic Spectrometry

Author: Caroline Santos da Silva

Academic Advisor: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Academic Co-Advisor : Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira

In Chapter 1, a new procedure based on solubilization of the processed meats samples using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was developed for the determination of Na and K by flame atomic emission spectrometry (F AES). The proposed methodology was validated through tests of addition and recovery of analyte, as well as using different decomposition procedures in the presence of nitric acid or formic acid after application statist test, which showed no significant differences between the results compared with a confidence level of 95% with application test t of Student. Limit of detection (LOD) $0.8 \mu\text{g g}^{-1}$ for Na and $2.0 \mu\text{g g}^{-1}$ for K were obtained using TMAH. The proposed methodology is very simple, requiring small amounts of sample and reagent, proving to be efficient in solubilization of the analyzed samples for later determination of the respective elements. The potential for application to other sample types and analytes is evident.

In Chapter 2, a new procedure based on the exposure of fuel ethanol samples to UV radiation in the presence of organic acids of low molecular weight was developed for determination of total Hg from inorganic and organic species (Hg_2^+ , CH_3Hg^+ and $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) by photochemical vapor generation coupled with atomic absorption spectrometry (*photo* - CV-AAS) using different kinds of systems for vapor generation. For each species, the optimum conditions for the photochemical generation were investigated such as the effects of concentrations in medium of sample preparation, time of exposure to UV radiation from the sample and carrier gas flow rate. The accuracy was evaluated through tests of addition and recovery of analyte individually and in a mixture of all species of the metal in fuel ethanol samples, using calibration standards in media with bidistilled alcohol. The recovery results were satisfactory (91-107%) for different species of analyte in both medium of sample

preparation, either in the commercial system (1) as in the adapted system (2). Limits of detection were obtained in a range from 0.10 to 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the commercial system and from 0.06 to 0.09 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the adapted system for all addition and recovery tests, enabling the determination of total Hg. The proposed methodology is sensitive, simple and inexpensive, and promotes the “green” chemistry. The potential for application to other sample types and analytes is evident.

Key-words: sodium, potassium, mercury, meat processed, ethanol fuel, photochemical vapor generation, atomic spectrometry.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Master Dissertation in Chemistry
Pelotas, February, 2011.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes básicos de um espectrômetro de AAS.....	10
Figura 2	Processos que ocorrem durante a atomização por F AAS.....	12
Figura 3	Processos que ocorrem em emissão atômica.....	16
Figura 4	Instrumentação básica de um fotômetro de chama convencional.....	16
Figura 5	Efeito da concentração de CsCl na minimização do efeito de ionização na presença de soluções padrão de 0,4 mg L ⁻¹ Na e 0,5 mg L ⁻¹ K.....	28
Figura 6	Ciclo global do Hg.....	39
Figura 7	Ciclo de intoxicação por Hg pelo ser humano.....	41
Figura 8	Vias metabólicas com destaque para a formação de acetil coenzima A, a partir do piruvato da glicólise.....	43
Figura 9	Domínio dos espectros de emissão dos principais tipos de lâmpadas, λ em nm.....	49
Figura 10	Reator fotoquímico que utiliza uma lâmpada de Hg de baixa pressão para emissão da radiação UV com potência nominal de 15 W envolvida com uma bobina de Teflon®.....	50
Figura 11	Esquema de um sistema de <i>photo</i> -CVG.....	53
Figura 12	Reator fotoquímico utilizado nos dois sistemas estudados no presente trabalho.....	56
Figura 13	Esquema utilizado para o sistema 1 comercial que foi adaptado para ser utilizado com a <i>photo</i> -CV-AAS.....	56
Figura 14	Esquema utilizado para o sistema 2 não comercial utilizado para a <i>photo</i> -CV-AAS.....	56

Figura 15	Efeito da concentração do HCOOH no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (□) ou álcool combustível (○) contendo 10 µg L ⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg ²⁺ , (B) CH ₃ Hg ⁺ ou (C) CH ₃ CH ₂ Hg ⁺	61
Figura 16	Efeito da concentração do H ₃ CCOOH no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (○) ou álcool combustível (□), contendo 10 µg L ⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg ²⁺ , (B) CH ₃ Hg ⁺ ou (C) CH ₃ CH ₂ Hg ⁺	62
Figura 17	Espectro de massas de (A) álcool bidestilado e (B) álcool combustível.....	64
Figura 18	– Cromatograma da amostra de álcool combustível.....	65
Figura 19	Efeito da vazão da amostra no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (□) e de álcool combustível (○) contendo 10 µg L ⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg ²⁺ , (B) CH ₃ Hg ⁺ ou (C) CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ para o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 1 sem a presença dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular.....	67
Figura 20	Efeito da vazão da amostra no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (□) e de álcool combustível (○) contendo 10 µg L ⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg ²⁺ , (B) CH ₃ Hg ⁺ ou (C) CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ para o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2, sem a presença dos ácidos orgânicos.....	69
Figura 21	Efeito da vazão do gás carreador no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (□) e de álcool combustível (○) contendo 10 µg L ⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg ²⁺ , (B) CH ₃ Hg ⁺ ou (C) CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ para o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2, sem a presença dos ácidos orgânicos.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades das chamas comumente empregadas em F AAS.....	13
Tabela 2	Parâmetros operacionais empregados para a determinação de Na e K nas amostras de carnes processadas por F AAS.....	19
Tabela 3	Teor de umidade encontrado nas diferentes amostras estudadas.....	22
Tabela 4	Resultados analíticos para amostras de carne processadas após tratamento com TMAH por F AES 1. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ e $n = 3$	23
Tabela 5	Parâmetros de mérito para os diferentes métodos estudados para a determinação de Na e K em carnes processadas por FAES 1.....	24
Tabela 6	Resultados obtidos para Na e K em amostras carnes processadas preparadas em três diferentes meios por F AES.....	25
Tabela 7	Resultados analíticos, em mg g^{-1} , para amostras de carne processadas em massa úmida por FAES 1, após tratamento com TMAH.....	26
Tabela 8	Resultados para os testes de adição e recuperação de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Na e K nas amostras de carnes processadas após tratamento com TMAH por FAES 1($n = 3$).....	27
Tabela 9	Resultados analíticos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para amostras de carne processadas por F AAS e F AES 2, após tratamento com TMAH.....	29
Tabela 10	Reações de formação de Acetil Coenzima A catalisadas pelas enzimas do complexo piruvato desidrogenase.....	44
Tabela 11	Tempo de irradiação da amostra em função da velocidade da bomba peristáltica para o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 1 usando o Tygon® de cor laranja/roxo/laranja com diâmetro interno de 2,62 mm.....	66

Tabela 12	Tempo de radiação da amostra em função da velocidade da bomba peristáltica para o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2, usando o Tygon® de cor amarelo/azul/amarelo com diâmetro interno de 1,52 mm.....	68
Tabela 13	Resumo dos parâmetros utilizados para os dois sistemas na determinação das espécies de Hg por <i>photo</i> -CV-AAS.....	72
Tabela 14	Parâmetros de mérito para as curvas de calibração obtidas em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v utilizando o sistema 1.....	73
Tabela 15	Parâmetros de mérito para curvas de calibração obtidas em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v utilizando o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2.....	73
Tabela 16	Parâmetros de mérito das curvas de calibração com Hg ²⁺ em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v empregadas nas determinações das misturas de diferentes espécies de Hg adicionadas às soluções das amostras.....	74
Tabela 17	Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ ou CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ em amostras de álcool combustível em meio de HCOOH 2,5 % v/v utilizando o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 1 (n = 3).....	75
Tabela 18	Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ ou CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ em amostras de álcool combustível em meio de CH ₃ COOH 5,0 % v/v utilizando o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 1 (n = 3).....	76
Tabela 19	Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ ou CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ em amostras de álcool combustível em meio de HCOOH 2,5 % v/v utilizando o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2 (n = 3).....	77
Tabela 20	Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ ou CH ₃ CH ₂ Hg ⁺ em amostras de álcool combustível em meio de CH ₃ COOH 5,0 % v/v utilizando o sistema <i>photo</i> -CV-AAS 2 (n = 3).....	78

Tabela 21 Resultados para os testes de adição e recuperação no álcool combustível pela adição de misturas das diferentes espécies de Hg e calibração com padrão de Hg^{2+} em álcool bidestilado utilizando o sistema *photo-CV-AAS 1* ($n = 3$).....79

Tabela 22 Resultados para os testes de adição e recuperação no álcool combustível pela adição de misturas das diferentes espécies de Hg estudadas e calibração com padrão de Hg^{2+} em álcool bidestilado utilizando o sistema *photo-CV-AAS 2* ($n = 3$).....79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BV	Banda de Valência.
BC	Banda de Condução.
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.
CF	Fluxo Contínuo, do inglês <i>continuous flow</i> .
CV-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio, do inglês <i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i> .
CVG-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Química de Vapor, do inglês <i>Chemical Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry</i> .
DH	Departamento de Saúde, do inglês <i>Department of Health</i> .
EDL	Lâmpada de descarga sem eletrodo, do inglês <i>Electrodeless Discharge Lamp</i> .
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês <i>Environmental Protection Agency</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> .
FI-CV-AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica com geração de vapor frio através de fluxo contínuo, do inglês <i>continuous flow cold vapor generation</i>

coupled atomic fluorescence spectrometry.

FSA Agência de Padrões Alimentares, do inglês *Food Standards Agency*.

GC-FID Cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama, do inglês *Gas chromatography flame ionization detector*.

GF-AAS Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectrometry*

GLP Gás liquefeito de petróleo.

GLS Separador Gás/Líquido, do inglês *gas liquid separator*.

HCL Lâmpada de cátodo oco, do inglês *hollow cathode lamp*.

HR-CS AAS Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua, do inglês *High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*

ICP-MS Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*.

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia.

LOD Limite de detecção, do inglês *limit of detection*.

OMS Organização Mundial da Saúde.

photo-CVG-AAS Espectrometria de Absorção Atômica com Geração Fotoquímica de Vapor, do inglês *Photochemical Vapor Generation coupled with Atomic Absorption Spectrometry*.

PP Polipropileno.

PROÁLCOOL Programa nacional do álcool.

QTA Atomizador de tubo de quartzo, do inglês *quartz tube atomizer*.

R Coeficiente de correlação linear.

RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> .
SACN	Comitê Científico Consultivo em Nutrição, do inglês <i>Scientific Advisory Committee on Nutrition</i> .
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio, do inglês <i>tetramethylammonium hydroxide</i> .
UV	Ultravioleta.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
CURRÍCULO VITAE.....	VIII
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXI
CAPÍTULO 1	
1. Introdução.....	2
2. Objetivo.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 Teores de Na e K em carnes.....	5
3.2 Técnicas analíticas para a determinação de Na e K.....	8
3.2.1. Espectrometria de Absorção Atômica.....	8
3.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).....	10
3.2.1.1.1 Interferências de Ionização.....	14
3.2.1.2 Espectrometria de emissão atômica com chama (F AES).....	15
3.2.1.3 Espectrometria de absorção atômica vs Espectrometria de emissão atômica.....	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1 Reagentes e Materiais.....	18
4.2 Instrumentos e parâmetros instrumentais	18
4.2.1 Espectrômetro 1 (F AES OU F AAS).....	19
4.2.2 Espectrômetro 2 (F AES 2).....	19
4.3 Amostras e procedimentos de preparo.....	20
4.3.1 Procedimento 1 – Solubilização alcalina com TMAH	20
4.3.2 Procedimento 2 – Mineralização com HNO ₃ /H ₂ O ₂ em copo aberto.....	21
4.3.3 Procedimento 3 – Solubilização com ácido fórmico.....	21
5. Resultados e Discussões.....	22
5.1 Resultados para FAES 1	23
5.2 Resultados para F AES 2 e F AAS.....	27

6. Conclusões.....	30
--------------------	----

CAPÍTULO 2

1. Introdução.....	32
2. Objetivo.....	34
3. Revisão Bibliográfica.....	35
3.1 Álcool Combustível.....	35
3.2 Metais em combustíveis.....	36
3.3 Espécies de mercúrio em combustíveis.....	37
3.3.1 Intoxicação humana por Hg.....	40
3.4 Técnicas de análise e avaliação da exatidão de métodos analíticos.....	45
3.5 Geração Química de Vapor acoplada à técnica de AAS.....	45
3.5.1 Espectrometria de Absorção Atômica Acoplada à Geração Fotoquímica de Vapor (<i>photo-CVG-AAS</i>).....	49
4. Materiais e Métodos.....	55
4.1 Instrumentação.....	55
4.2 Materiais e Reagentes.....	57
4.3. Preparo das Amostras e Soluções de Calibração.....	57
4.3.1 Ácido Fórmico.....	58
4.3.2 Ácido Acético.....	58
4.4 Procedimento Analítico.....	58
5. Resultados e Discussão.....	60
5.1 Otimizações das condições experimentais	60
5.1.1 Efeito da concentração dos reagentes no preparo das amostras....	60
5.1.2 Efeito da vazão das soluções de amostra e padrão.....	65
5.1.2.1. Sistema 1.....	65
5.1.2.2 Sistema 2.....	68
5.1.3 Efeito da vazão do gás carreador.....	70
5.1.3.1. Sistema 1.....	70
5.1.3.2. Sistema 2.....	70
5.2 Aplicação Analítica e Parâmetros de Mérito.....	72
6. Conclusões.....	81
Referências Bibliográficas Gerais.....	82

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A pecuária nacional, atualmente, é uma das maiores e mais rentáveis atividades do agronegócio brasileiro. A carne bovina é um dos itens mais importantes da dieta alimentar da população brasileira e do ponto de vista nutricional, é uma importante fonte de nutrientes e proteínas [1].

O Brasil vem se tornando um país muito competitivo no mercado internacional, devido ao crescimento gradativo nos últimos anos no que diz respeito à produção e exportação de diversos produtos alimentícios, principalmente da carne bovina que é alvo de destaque, visto que, pode chegar a custar até um terço da produzida na Europa. No entanto, a exportação da carne bovina está enfrentando um crescente processo de evolução e reestruturação para obter ganhos de produtividade e qualidade, e essa inserção no mercado internacional vem dando origem a crescentes transformações estruturais nas indústrias exportadoras e na cadeia produtiva como um todo. Ao mesmo tempo, o mercado externo tenta de alguma forma criar cenários desfavoráveis a importação desses produtos com o propósito de favorecer e proteger os produtores locais através de subsídios agrícolas ou criando barreiras sanitárias e tecnológicas [2-3].

Além da carne *in natura*, o mercado da carne processada, que é uma modificação das propriedades originais da carne fresca, também se encontra em constante expansão e alta competitividade, uma vez que o seu consumo se tornou parte do hábito alimentar, principalmente no que diz respeito à praticidade e rapidez. Outros fatores importantes são a segurança dada pela garantia da procedência dos alimentos e os preços relativamente baixos [4-5].

Recentemente, a União Europeia, maior importador de carne brasileira, suspendeu a importação da carne *in natura*, alegando que o Brasil não vinha cumprindo as exigências sanitárias aderidas espontaneamente no ano de 2000. Os frigoríficos nacionais, de uma forma geral, ainda apresentavam problemas, e com isso, o governo brasileiro reduziu drasticamente o número de fazendas, pois poucas estavam aptas para as exportações, gerando uma perda em torno de 30% do que se ganhava na venda de carne para o exterior. Dentre as principais mudanças, as mais importantes deveriam ser de ordem sanitária e de qualidade, com adequações que atendessem as normas de certificação, os planos de boas práticas de fabricação e ainda, a adaptação com as exigências de mercado [1, 6]. Atualmente, de acordo com as exigências, fiscalizações vêm sendo feitas com a carne brasileira que é exportada, a fim de impedir que carnes

não certificadas venham a ser consumidas.

A Comissão de Regulação da Comunidade Europeia publicou recentemente, normas referentes ao desempenho de métodos analíticos usados e à interpretação de resultados, bem como os níveis máximos de certos contaminantes em alimentos que serão comercializados e importados. Essas normas também vêm sendo apresentadas e fiscalizadas no Brasil através do órgão regulamentador INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), e com isso, deve-se assegurar a confiabilidade dos resultados, através da validação dos métodos analíticos que são empregados nas análises químicas desses alimentos [2, 7].

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia analítica simples para avaliação do uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) à temperatura ambiente no preparo de amostras de carnes processadas para posterior determinação de Na e K por Espectrometria de Emissão Atômica com chama (F AES). Os resultados obtidos serão comparados frente a outros métodos convencionais de preparo de amostra, como mineralização com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ e solubilização em meio de ácido fórmico. A metodologia proposta será validada através de testes de adição e recuperação de analito, bem como o uso de diferentes técnicas analíticas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Teores de Na e K em carnes

Atualmente, o grande desafio das indústrias alimentícias, principalmente a de produtos cárneos, é o desenvolvimento de produtos que satisfaçam sensorialmente a expectativa dos consumidores, e que, em contrapartida possam ser consumidos sem culpa. Sendo assim, algumas reformulações estão sendo feitas através da substituição de alguns ingredientes usados como aditivos alimentares, apresentando-se como uma alternativa para a redução de problemas relacionados à saúde [8].

O cloreto de sódio (NaCl), ou mais comumente conhecido como sal de cozinha, é considerado um dos principais aditivos alimentares utilizados para a conservação da carne e outros alimentos, e sua ação está relacionada com a inibição do crescimento microbiológico. A carne possui um grande valor nutricional e torna-se altamente sensível ao desenvolvimento de micro-organismos que conduzem a sua deterioração. Algumas bactérias são inibidas a baixas concentrações de sal, como 2 % m/m, embora outras, como as leveduras e os fungos, são capazes de crescer em concentrações salinas muito elevadas, exigindo o uso de uma maior concentração deste aditivo [9-10].

Com isso, a concentração salina desempenha um papel importante na conservação de produtos cárneos juntamente com a temperatura e o pH do meio, pois a água disponível é significativamente reduzida com a adição de sal, e até mesmo o nitrito, considerado um antioxidante muito eficaz na conservação da carne, não consegue superar o efeito pró-oxidante do NaCl [11-12].

Além disso, o Na ainda possui outra função importante: a percepção de sabor, uma vez que este aditivo é responsável pela intensificação do paladar do alimento. E, devido a esse papel palatabilizante, as indústrias alimentícias abusam dos níveis de sal adicionado, fazendo desta forma, com que a população ingira Na em excesso, numa quantidade acima da dose diária essencial para o organismo [13-14]. Esse aumento da concentração de íons Na aumenta o risco de hipertensão, e o recomendado é que sua ingestão diária seja reduzida. Algumas pesquisas indicam que uma das principais fontes de ingestão de sal na dieta é decorrente de comidas processadas e de restaurantes, e devido a isso, algumas indústrias alimentícias da Comunidade Europeia vêm reduzindo a concentração de sal nos alimentos. Porém, essa redução em alimentos processados não

é considerada uma tarefa simples, pois os consumidores não abrem mão da saúde e nem do paladar.

Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) e a SACN (*Scientific Advisory Committee on Nutrition*), o recomendado é que o consumo médio de sal deva ser reduzido de 9,5 para 6,0 g por dia em adultos, e níveis ainda mais baixos são recomendados para crianças. Outras organizações reguladoras de vários países estão conscientizando a população sobre a importância da redução da ingestão de sal, e estão mobilizando as indústrias de alimentos para diminuir a quantidade deste aditivo em seus produtos. Assim, desde 2003, a FSA (*Food Standards Agency*) e o DH (*Department of Health*) na Inglaterra, baseado nas conclusões e recomendações do SACN, estão tomando medidas para a redução do consumo de sal, e as metas para 2012, abrangem 85 categorias de alimentos processados, de acordo com a publicação no “*Food Standards Agencies Strategic Plan*” [15-16].

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para reduzir o teor de Na em produtos cárneos, principalmente pela substituição do NaCl por outros sais de cloretos, e o K é provavelmente o substituto mais comumente utilizado. Com os resultados de estudos clínicos e epidemiológicos, os autores concluíram que o K atua como um fator fundamental na regulação da pressão arterial [17, 18-19]. E devido a isso, alguns fabricantes, já estão substituindo ao máximo, os sais de Na por sais de K [20-21].

Segundo Anderson e colaboradores [19], uma possível explicação para esse efeito protetor contra a hipertensão seria que, aumentando os níveis de K no organismo, mais fácil é a excreção do excesso de Na e com isso se consegue manter o equilíbrio da água no corpo. Em vista disso, o recomendado é que nos alimentos, estes elementos estejam em quantidades equivalentes, ou seja, na mesma proporção nutricional. No entanto, essa substituição em mais da metade, normalmente resulta em aumento significativo da amargura acarretando em sabores indesejáveis no alimento [22-23].

Ruusunen e colaboradores [24], demonstraram que o uso de fosfato também pode ser uma alternativa muito útil na redução do teor de cloreto de sódio em produtos de carnes, devido as suas propriedades de aumento da retenção de água e para melhorar o rendimento no cozimento, onde é mais efetiva quando se aumenta a temperatura de processamento. A melhoria da capacidade de retenção de água explica-se como resultado de pH superior, que aumenta o espaço em torno das proteínas onde se aloja a água. Outro papel importante dos fosfatos é a melhoria da cor e aroma devido a sua ação antioxidante, o que provavelmente está relacionada à formação de complexos com

metais presentes em quantidades residuais como contaminantes dos sais usados na conservação dos alimentos. Isso se deve, por exemplo, a união de íons Fe^{2+} aos fosfatos, já que esse íon livre é considerado um oxidante eficaz [25-26].

Em um estudo realizado por Romans e colaboradores [22] usando fosfatos alcalinos, foi observado segundo os autores uma redução de 2% na concentração de NaCl, devido a inserção desse sal para completar a ligação de proteínas, que se ligam às moléculas de água.

Segundo a literatura, dos métodos convencionais de análise mais comumente utilizados no preparo de amostras para a determinação de Na e K através do uso de técnicas espectrométricas, pode-se citar a digestão das amostras utilizando ácidos inorgânicos que possuem características oxidantes, as quais podem ser aquecidas utilizando um bloco digestor ou por radiação microondas. Porém, esses procedimentos, na maioria das vezes, são considerados demorados e tediosos, necessitando também do uso de aparelhos de laboratórios complexos, e normalmente um grande volume de reagentes se faz necessário, o que aumenta os riscos de contaminação por outros elementos, além disso, o uso da temperatura durante esse processo torna esse tipo de procedimento suscetível a perda de analito por volatilização ou adsorção nos frascos onde são conservadas as amostras [27-28].

Para evitar esses possíveis inconvenientes, a análise direta de amostras sólidas ou o uso de suspensões se apresenta de forma promissora, pois há uma redução significativa do tempo necessário para o preparo da amostra diminuindo consequentemente os riscos de perdas dos analitos e/ou contaminação da amostra e no uso de reagentes altamente corrosivos e perigosos [29-31]. Além disso, também estão sendo reportados da literatura métodos alternativos de amostragem por suspensão, os quais envolvem a solubilização parcial ou completa da matriz da amostra [32-33].

Uma alternativa simples que recentemente vem sendo utilizada, é o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a solubilização de amostras biológicas [29, 34-35]. O TMAH é considerado um reagente fortemente alcalino, solúvel em água, que atua na solubilização de diferentes tipos de tecidos, causando a dissociação das espécies químicas.

Amostras biológicas tratadas com esse reagente alcalino fornecem uma solução com características de uma suspensão, apresentando um baixo fator de diluição, permanecendo estável por meses a temperatura ambiente, o que resulta em um método extremamente simples de preparo de amostra, o qual normalmente não requer sistemas

de aquecimento, prevenindo desta forma, a perda de elementos voláteis antes das determinações. Além disso, pequenos volumes da solução de TMAH são necessários para a solubilização completa das amostras, o que resulta em um menor fator de diluição, o que se torna de grande relevância para a determinação de elementos que encontram-se a nível traço [36].

3.2 Técnicas analíticas para a determinação de Na e K

3.2.1 Espectrometria de absorção atômica

Em 1955, Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) foi proposta como uma técnica analítica, simultaneamente por Alkemade e Milatz e Alan Walsh, para determinações de caráter elementar, em trabalhos independentes. No entanto, devido ao seu entusiástico trabalho em defesa da nova idéia, Walsh é reconhecidamente considerado o “pai” da AAS moderna. Além do seu esforço na divulgação da técnica, Walsh também se destacou devido ao seu importante trabalho no desenvolvimento das lâmpadas de cátodo oco, as quais até hoje, são as mais utilizadas como fontes de radiação para o uso em absorção atômica [37].

A técnica é baseada na capacidade de absorção de radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária de comprimento de onda específico por átomos neutros de elementos químicos no estado gasoso, assim os elétrons da camada de valência são excitados para um orbital de maior energia, e após permanecer por um curto intervalo de tempo no estado excitado, retornam ao estado inicial de energia, emitindo os fótons absorvidos. Isso pode ser observado através da equação de Planck:

$$\varepsilon = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: ε é a energia responsável pela transição eletrônica do átomo do estado fundamental para o estado excitado, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda [37-38].

Os átomos isolados no estado gasoso não vibram como geralmente acontece com as moléculas, devido a isso, não há nenhuma energia vibracional ou rotacional

envolvida no processo de excitação eletrônica dos átomos, e por essa razão, os espectros de absorção são constituídos por linhas e não por bandas como os espectros das espécies moleculares. Assim, cada elemento químico possui uma configuração eletrônica específica, as quais definem os espectros de linhas de emissão/absorção de cada elemento.

Por outro lado, a relação entre os átomos no estado fundamental e no estado excitado em relação a um determinado nível de energia em função da temperatura é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$N_1 / N_0 = (g_1 / g_0) e^{-E/kT} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: N_1 é o número de átomos no estado excitado, N_0 é o número de átomos no estado fundamental, g_1/g_0 é a razão dos pesos estatísticos dos estados fundamental e excitado, E é a energia específica da excitação, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta em Kelvin.

Baseado nesses princípios chega-se à lei de Lambert-Beer, que possui um significado importante para AAS, pois permite relacionar a concentração dos átomos no estado fundamental com a absorção de radiação eletromagnética monocromática, a qual é dada como:

$$A = \epsilon bC \quad \text{Equação 3}$$

Onde: ϵ é a absortividade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o comprimento do caminho óptico (cm) e c é a concentração do elemento que absorve, na solução (mol L^{-1}) [38-39].

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) convencional é hoje, uma técnica largamente difundida, empregada para a determinação de elementos em diversos tipos de amostras, apresenta alta seletividade e poucas interferências, uma vez que as transições eletrônicas ocorrem em comprimentos de onda específicos para cada elemento [40-41]. São empregadas nesta técnica, fontes de radiação específicas de mesmo comprimento de onda do elemento a ser determinado que, são capazes de emitir radiação na região do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético. As fontes de radiação mais utilizadas são as lâmpadas de cátodo oco (HCL) e ou lâmpadas de

descarga sem eletrodo (EDL). Os componentes básicos incluem ainda, os atomizadores, que geralmente são uma chama, um forno de grafite ou uma célula de quartzo, um monocromador, um detector (fotomultiplicadora), um amplificador e ainda um sistema de leitura, como pode ser observado na Figura 1 abaixo:

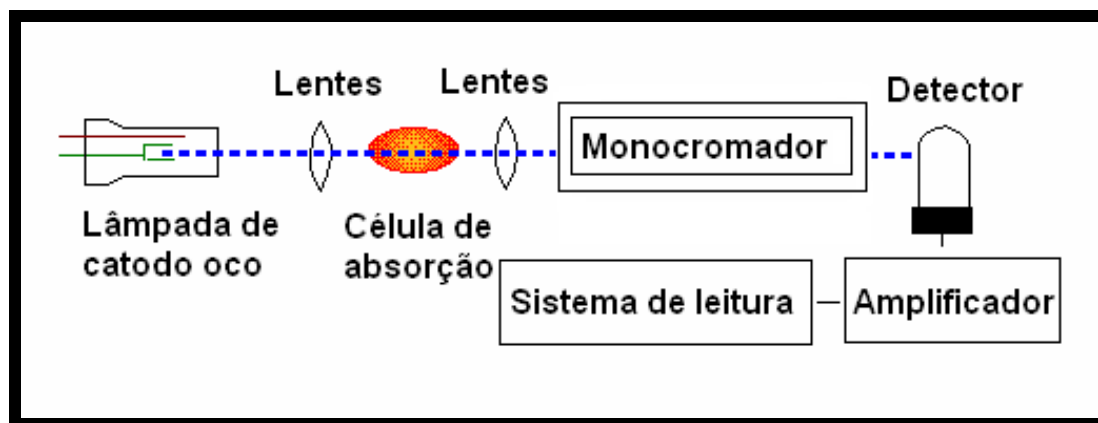


Figura 1 – Componentes básicos de um espectrômetro de AAS.

Além dessa configuração, recentemente foi desenvolvido o uso da fonte contínua aliada a um novo espectrômetro de alta resolução, no caso a Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS), a qual tem possibilitado uma visualização em regiões vizinhas ao comprimento de onda estudado. O espectrômetro de alta resolução fornece um espectro 3D e permite visualizar mais eficientemente as possíveis interferências espectrais ou de fundos estruturados, além de possibilitar que sejam realizadas análises do tipo multielementar sequencial ou até mesmo simultânea quando os elementos estudados apresentam comprimento de onda na mesma janela de observação [39-40].

3.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)

Os primeiros espectrômetros de absorção atômica utilizavam uma chama como atomizador, no entanto, com o desenvolvimento da técnica, novos sistemas alternativos de atomização foram desenvolvidos, proporcionando uma melhor sensibilidade e consequentemente, uma maior aplicabilidade a respectiva técnica analítica. O

atomizador é uma parte importantíssima do equipamento, pois neste dispositivo é que serão gerados os átomos gasosos no estado fundamental, que absorverão radiação de mesmo comprimento de onda proveniente da fonte de radiação. A quantificação da atenuação dessa radiação, no caso a absorvância, emitida pela fonte, permite a determinação da concentração do analito de interesse presente na amostra, comparando as atenuações produzidas pelas soluções de calibração [41-44].

Em um atomizador por chama, através do uso de nebulizadores pneumáticos como sistemas de introdução das amostras, operando pela ação de fluxo de gás comprimido, a solução da amostra contendo os elementos de interesse é aspirada e nebulizada, onde na câmara de nebulização as pequenas gotículas formadas no aerossol chegam ao atomizador arrastado pelos gases combustível e oxidante. Essas pequenas gotas penetram na chama e o solvente é evaporado produzindo partículas sólidas finamente divididas, tal processo é chamado de dessolvatação, seguido da volatilização dessas partículas para a formação de moléculas gasosas que são subsequentemente dissociadas a átomos, sob elevadas temperaturas. Alguns dos átomos desse gás se ionizam formando cátions e elétrons, porém outras moléculas e átomos também são produzidos na chama como resultado de algumas interações do combustível com o oxidante e com várias espécies presentes na matriz da amostra. Com esses nebulizadores pneumáticos, a taxa de aspiração da solução da amostra varia de 4 a 7 mL min⁻¹, porém no máximo 10 % da solução da amostra introduzida é transformada em aerossol útil, sendo sua maior parte (acima de 90 %), portanto, descartada. Através da Figura 2, é possível observar os processos que ocorrem durante a atomização por F AAS.

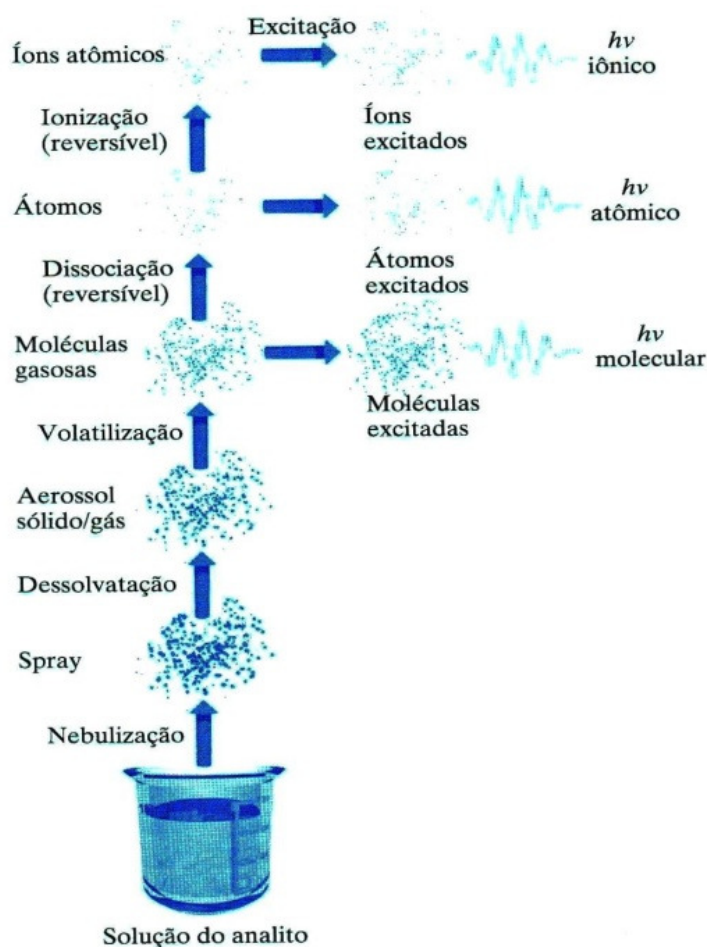


Figura 2 – Processos que ocorrem durante a atomização por F AAS. Fonte: Holler e colaboradores [43]

A chama tem um formato que permite que a radiação incidente atravessasse a amostra atomizada continuamente introduzida, e posteriormente, um detector aliado a uma fotomultiplicadora pode controlar a intensidade da radiação, e, portanto ocorrerá a absorção dos átomos [41-44].

Uma grande fração das moléculas, átomos e íons também são excitadas pelo calor da chama, resultando em espectros de emissão atômica, iônica e molecular. Devido a esse problema, a atomização é considerada a etapa mais crítica na técnica de F AAS e limita a precisão de alguns métodos, sendo imprescindível compreender as características e as variáveis dessas chamas.

Um grande número de combinações de combustível e oxidante pode ser utilizado para a produção da chama, e as misturas mais comumente utilizadas em AAS são as de ar e acetileno ou óxido nitroso e acetileno. A temperatura da chama e as razões

entre o combustível e o oxidante são consideradas os parâmetros mais importantes, onde algumas variações na proporção oxidante e combustível podem alterar o equilíbrio, o que pode vir a melhorar significativamente a eficiência de atomização, deste modo a otimização destes parâmetros é de fundamental importância para garantir uma temperatura constante e uniforme.

Os primeiros trabalhos em absorção atômica se limitavam a utilizar chamas de baixas temperaturas, o que acabava restringindo a aplicação de alguns métodos para elementos que não são capazes de ser convertidos em átomos a essas temperaturas. A alternativa seria usar chamas com temperaturas relativamente altas, porém o problema não foi resolvido, uma vez que, se ricas em oxigênio (chama acetileno e oxigênio), uma fração significativa de certos elementos era convertida a óxidos. Para evitar ou inibir a formação desses óxidos, passou-se então a utilizar uma chama acetileno e óxido nitroso que, além de produzir uma chama mais quente (em torno de 2950 °C), contém uma concentração de oxigênio livre relativamente mais baixa, o que possibilitou uma análise mais segura para a determinação de elementos que são difíceis de serem atomizados. Na Tabela 1 são apresentadas as principais propriedades das chamas mais utilizadas em absorção atômica [41-44].

Tabela 1 - Propriedades das chamas comumente empregadas em F AAS.

Combustível	Oxidante	Temperatura °C	Velocidade máxima de queima, cm s ⁻¹
Gás natural	Ar	1700 – 1900	39-43
Gás natural	Oxigênio	2700-2800	370-390
Hidrogênio	Ar	2000-2100	300-440
Hidrogênio	Oxigênio	2550-2700	900-1400
Acetileno	Ar	2100-2400	158-266
Acetileno	Oxigênio	3050-3150	1100-2480
Acetileno	Óxido Nitroso	2600-2800	285

Outro fator importante, citado na Tabela acima, são as velocidades de queima, pois as chamas são estáveis somente em certos intervalos de vazão de gás. Se a vazão do gás não excede a velocidade de queima, a chama se propaga voltando ao queimador, produzindo o efeito chamado “*flashback*”. Com isso, a chama cresce à medida que a vazão do gás aumenta, até atingir um ponto acima do queimador, onde a vazão de gás e a velocidade de queima são iguais, sendo esta a região mais estável [41-44].

3.2.1.1.1 Interferências de ionização

Em absorção atômica, de um modo geral, as interferências podem ser classificadas em dois tipos: as interferências espectrais que aparecem quando a absorção ou emissão de uma espécie interferente se sobrepõe ou fica muito próxima da absorção ou emissão do analito, tornando impossível separá-las através da resolução do monocromador. Assim como, as interferências não-espectrais as quais são decorrentes de vários processos que ocorrem durante a etapa de atomização, afetando as características de absorção do analito [43].

A interferência de ionização é um exemplo de interferência não-espectral, que ocorre quando a temperatura da chama é muito alta para a determinação do analito de interesse e, por isso, tem energia suficiente para levá-lo além do seu estado atômico neutro e produzir uma fração significativa de íons, acarretando na diminuição da absorção da radiação, fazendo com que o número de átomos no estado fundamental seja menor, o que resulta em um menor sinal de absorvância. Os metais alcalinos e alcalinos terrosos, como o Na e K são considerados os elementos mais suscetíveis a interferências desta natureza, devido a seus baixos potenciais de ionização em relação aos demais elementos [43]. Esse tipo de interferência pode ser minimizada através da reprodução da matriz das amostras nas soluções de calibração, ou através da uniformização da matriz, pela adição às amostras e padrões de um sal que contenha um elemento mais facilmente ionizável que o analito (cloreto de lítio, cézio ou rubídio) conhecidos como tampões de ionização, de forma a aumentar a pressão parcial dos elétrons na chama. A concentração destes elementos deve ser tal que, a partir de um determinado valor, o efeito da interação de ionização seja constante. Tais interações são bem conhecidas, por isso os tampões de ionizações são comumente utilizados, quando se pretende determinar elementos que se ionizam facilmente na chama. Outra estratégia é trabalhar com chamas

mais frias, que também podem diminuir os efeitos da ionização sofridas por estes elementos [42-43,45].

3.2.1.2 Espectrometria de emissão atômica com chama (F AES)

Por muitos anos, as chamas foram empregadas para excitar os átomos que vão gerar os espectros de emissão para vários elementos, e os espectrômetros de absorção mais modernos podem ser prontamente adaptados para trabalhar no modo de emissão em chama. Estes métodos, entretanto, não são largamente utilizados, porque os métodos de absorção fornecem resultados tão bons ou melhores em termos de precisão, conveniência e limites de detecção para a determinação de um número maior de elementos, tendo em vista as temperaturas utilizadas nas chamas.

A espectrometria de emissão atômica com chama (F AES), ou fotometria de chama, é considerada a mais simples das técnicas analíticas baseadas em espectrometria atômica. Baseia-se na excitação de átomos neutros e a introdução da amostra na chama é semelhante ao sistema empregado na F AAS. O ar comprimido é utilizado como o gás oxidante e o gás butano (GLP) é utilizado como combustível nos fotômetros de chama convencional, dessa forma a chama opera em temperatura entre 1700 e 1900 °C. Já quando se utiliza a chama de ar- acetileno, a temperatura pode ficar em torno de 2125 a 2397 °C no F AAS operando no modo de emissão. Os elementos, ao receberem energia de uma chama, geram espécies excitadas que, ao retornarem ao estado fundamental, liberam parte da energia recebida na forma de radiação eletromagnética na região do visível através de relativamente poucas linhas intensas, em comprimentos de onda característicos para cada elemento químico.

A radiação produzida pela chama passa, então, por uma lente e um filtro óptico, normalmente um filtro de interferência é usado para isolar a linha de emissão desejada, que só permite a passagem da radiação característica do elemento de interesse para o fotodetector, no caso uma fotomultiplicadora, e a leitura é feita em um visor digitalizado, onde são gerados espectros simples. Na técnica de emissão atômica, estão envolvidos os processos de excitação, ou seja, a absorção de energia, e decaimento que é a liberação de energia, como pode ser observada na Figura 3 apresentada a seguir:

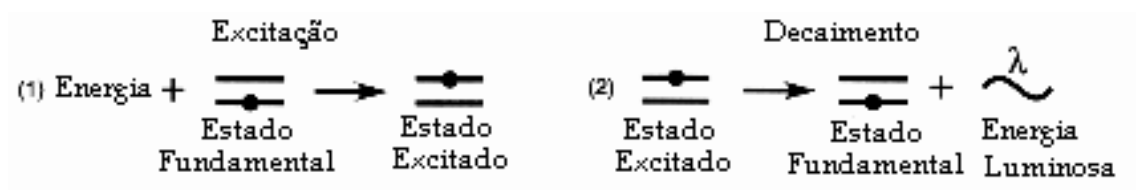


Figura 3 - Processos que ocorrem em emissão atômica. Fonte: Beaty, R.D; Kerber, J.D. 1993. [46]

O átomo é colocado em um ambiente com alta disponibilidade de energia a fim de produzir átomos no estado excitado. O espectro de emissão das espécies consiste em uma larga faixa de comprimentos de onda de emissão denominados linhas de emissão. A intensidade das linhas de emissão aumenta à proporção de átomos excitados para o estado específico de cada elemento em relação a sua população total. Devido à simplicidade espectral, nas determinações de rotina dos metais alcalinos e alcalino-terrosos, é suficiente o uso de fotômetros simples de filtros. Chamas de baixa temperatura são usadas para eliminar a excitação da maioria dos outros metais. [43-44, 47-48]. A Figura 4 abaixo mostra um esquema da instrumentação básica de um fotômetro de chama convencional.

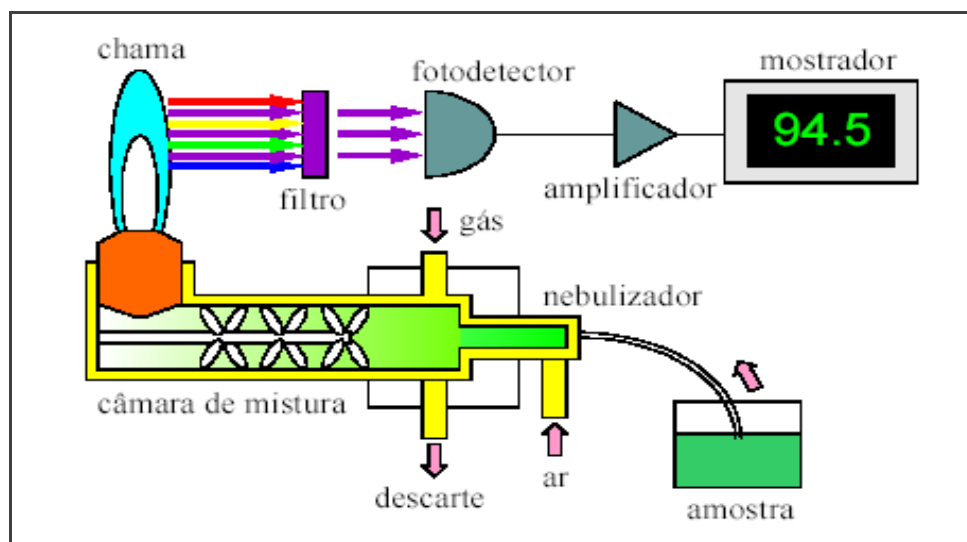


Figura 4 – Instrumentação básica de um fotômetro de chama convencional.

A técnica é largamente utilizada no controle de qualidade de alimentos, além de inúmeras outras aplicações, para averiguar a quantidade de íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos, como o sódio entre outros.

3.2.1.3 Espectrometria de absorção atômica vs Espectrometria de emissão atômica

Existem algumas diferenças básicas entre as duas técnicas espectrométricas. Como a absorção atômica utiliza a população de átomos no estado fundamental, pode parecer que esta técnica teria uma grande vantagem sobre a técnica de emissão atômica em termos de limite de detecção e sensibilidade, porém isto não é verdade. Tais técnicas são consideradas bastante semelhantes, onde alguns elementos possuem limites de detecção menores para emissão do que para a absorção atômica. Isso se deve pela discrepância aparente na estabilidade relativa dos átomos no estado fundamental e gasoso.

Enquanto a absorção atômica depende dos átomos no estado fundamental, que são estáveis e permanecem nesta condição quase indefinidamente, para a emissão atômica é necessário que a energia emitida por uma fonte decresça para que haja uma interação com um átomo no estado fundamental para produzir um átomo excitado, processo considerado ineficiente, pois somente uma pequena porção de átomos no estado fundamental absorve radiação no eixo óptico, o que reduz a energia do feixe de radiação incidente.

Outra diferença importante está entre seus sinais. O sinal analítico na emissão atômica é a soma de todas as energias emitidas quando os átomos excitados voltam ao estado fundamental, ou seja, o sinal vem inteiramente dos átomos que emitem. Já em absorção atômica, o sinal é a diferença entre a intensidade da fonte na ausência de átomos do elemento considerado e o decréscimo da intensidade ocasionado pela presença de átomos no eixo óptico, e neste caso, somente a radiação colimada da fonte é considerada. Então, em emissão a intensidade de luz emitida está relacionada com a concentração do elemento de interesse na solução, enquanto que na absorção é a quantidade de radiação absorvida que está relacionada com a concentração do elemento de interesse na solução [38].

4. Materiais e Métodos

4.1 Reagentes e materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Para o preparo de todas as soluções, utilizou-se água desionizada obtida a partir de um sistema de purificação Direct-Q 3 da Millipore (BedFord, MA, Estados Unidos), com resistividade de 18,3 M Ω cm. O ácido nítrico (Synth, Brasil) utilizado foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Soluções de referência de trabalho de Na e K foram diariamente preparadas por diluição de soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Buchs, Alemanha) em água desionizada. Para a digestão das amostras, foram utilizados os seguintes reagentes: ácido fórmico (Fluka Analítica, Alemanha), hidróxido de tetrametilamônio pentahidratado (Sigma Aldrich, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 35% v/v (Fluka Analítica, Alemanha), assim como o ácido nítrico citado anteriormente.

Toda a vidraria e materiais de laboratório foram limpos por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por, pelo menos 48 horas, sendo posteriormente lavadas com água deionizada e secas em capela antes de seu uso.

4.2 Instrumentos e parâmetros instrumentais

Todas as amostras foram trituradas utilizando um mini-processador de alimentos (Black&Decker, Brasil) e pesadas utilizando uma balança analítica Ohaus Adventurer Modelo AR 2140 (Pine Brook, NJ, EUA) com uma resolução de 0,1 mg e máximo de tara de 210 g. Para realizar a digestão ácida das amostras, foi utilizado um bloco digestor MA-4025 (Piracicaba, SP, Brasil). Para verificar a exatidão dos resultados, as medidas para ambos os elementos foram realizadas utilizando dois modelos diferentes de espectrômetros, conforme descrito abaixo:

4.2.1 Espectrômetro 1 (F AES OU F AAS)

Um Espectrômetro de Absorção/Emissão Atômica modelo AA-6300 (Shimadzu, Japão) foi utilizado para as determinações de Na e K pelo modo de emissão atômica em chama, utilizando uma chama ar-acetileno. Os resultados dessas determinações foram comparados através do uso desse Espectrômetro no modo de absorção atômica com corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério, operando também com a mesma chama. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco Hamamatsu Photonics K.K (Japão), para Na e K. Foram empregadas as condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento, tais como comprimento de onda, corrente da lâmpada e largura da banda de resolução espectral, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais empregados para a determinação de Na e K nas amostras de carnes processadas por F AAS.

Analito	Na	K
Comprimento de onda (nm)	589,0	766,5
Largura da banda de resolução espectral (nm)	0,2	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	8/600	8/600

4.2.2 Espectrômetro 2 (F AES 2)

Um fotômetro de chama modelo B462 (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para as determinações de Na e K, 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 Kg/cm^2 e uma chama de gás butano.

4.3. Amostras e procedimentos de preparo

Foram utilizadas para o desenvolvimento do procedimento proposto e verificação das concentrações dos analitos, amostras comerciais de carne bovina fatiada, salsicha e almôndega compradas em comércio local. As amostras foram lavadas com água deionizada, cortadas, trituradas em um mini-processador comercial e logo após, homogeneizadas. Em seguida, foram armazenadas e estocadas a -16 °C em potes de plásticos previamente limpos e descontaminados.

Primeiramente, as amostras foram pesadas em um vidro de relógio, 1 g de cada amostra de carne processada em triplicata, as quais foram levadas até uma estufa, onde foram secas a uma temperatura de 103 °C e permaneceram em um dessecador até a pesagem a temperatura ambiente. Este estudo foi realizado até as amostras adquirirem peso constante, eliminando assim, a umidade. Através deste procedimento, pode-se avaliar possíveis erros de pesagem e ainda calcular o teor de umidade para cada amostra a ser analisada.

A fim de otimizar as condições operacionais para utilizar o mínimo de amostra possível, foram investigadas diferentes massas de cada amostra, com o objetivo de verificar problemas relacionados à homogeneidade. Neste estudo, foram pesadas massas na faixa de 0,25 a 0,75 g, utilizando 5 µL de TMAH para cada 1 mg de massa seca para solubilização das amostras, e posteriores análises.

As amostras foram preparadas utilizando três procedimentos diferentes, apresentados a seguir:

4.3.1. Procedimento 1 – Solubilização alcalina com TMAH

As amostras foram pesadas e preparadas diretamente em frascos volumétricos de polipropileno (PP) de 50 mL, através de uma mistura simples de 250 mg de cada amostra úmida com 400 µL de uma solução de TMAH 25% m/v em meio aquoso. Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente durante a noite com o frasco fechado até a sua completa solubilização. Com as amostras solubilizadas, o volume foi aferido com água desionizada, resultando em uma concentração final de 0,2% m/v de TMAH. As soluções resultantes apresentaram aspecto de uma suspensão, com tons, dependendo da amostra, variando entre amarelados à marrom escuro.

4.3.2. Procedimento 2 – Mineralização com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ em copo aberto

As amostras de carnes processadas também foram tratadas através do método de digestão ácida, com base no procedimento proposto por Damin e colaboradores [49]. Aproximadamente 250 mg das amostras úmidas foram pesadas diretamente em tubos de digestão, onde 2,5 mL de HNO_3 concentrado foi adicionado. Essa mistura foi levada a um bloco digestor aquecido a 90 °C durante 1h. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 2,0 mL de H_2O_2 e a mistura foi novamente aquecida à mesma temperatura por mais 1h. Foi observada a digestão completa quando houve a dissolução total da gordura, e após o resfriamento, as amostras foram quantitativamente transferidas para frascos volumétricos de PP de 50 mL, onde seu volume foi aferido com água desionizada.

4.3.3. Procedimento 3 – Solubilização com ácido fórmico

Neste terceiro procedimento, as amostras de carnes processadas foram solubilizadas com ácido fórmico, com base no procedimento descrito por Scriver e colaboradores [50]. Aproximadamente 250 mg das amostras úmidas foram pesadas diretamente em tubos de digestão, onde 10 mL de ácido fórmico foram adicionados. Essa mistura foi levada a um bloco digestor e aquecida a 50 °C por aproximadamente 2h. Após o resfriamento, as soluções das amostras foram quantitativamente transferidas para frascos volumétricos de PP de 50 mL e seu volume foi aferido com água desionizada.

5. Resultados e Discussão

Inicialmente, foram realizados estudos para avaliar possíveis erros associados a pesagem e calcular o teor de umidade presente em cada amostra de carne processada, e ainda investigar a influência da massa de amostra para a verificação de problemas relacionados à homogeneidade. Segundo Lückner e Schuierer [51], estudos mostram que havendo heterogeneidade na amostra, a perda de massa em matrizes com o alto teor de água são as menores fontes de erro, no entanto, os autores recomendam que algumas precauções devem ser tomadas, tais como amostragem rápida, conservação da amostra em baixas temperaturas e a utilização da mesma à temperatura ambiente, ou até mesmo o uso de uma grande massa de amostra, evitando massas inferiores a 0,07 mg. Sendo assim, para que não houvesse o risco de perda de umidade antes da pesagem, as amostras previamente trituradas, foram imediatamente homogeneizadas e transferidas para potes de plástico limpos e bem fechados, os quais só foram abertos no momento da pesagem, e em seguida já foram armazenadas e estocadas a -16 °C. Antes de cada pesagem, as amostras foram retiradas do resfriamento até se manterem a temperatura ambiente, seguida de uma subsequente homogeneização.

Outro estudo tão importante quanto à perda de massa por umidade, é a avaliação de possíveis erros por pesagem, onde foi necessário a secagem das amostras até peso constante para a eliminação de umidade presente. As amostras em geral apresentaram um teor de umidade de aproximadamente 70% em massa, conforme se pode observar na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de umidade encontrado nas diferentes amostras estudadas.

Amostra	Umidade (%)
Carne Bovina fatiada	66
Salsicha	72
Almôndegas	71

Neste estudo, pode-se utilizar um fator de correção para essa perda de massa para as concentrações de Na e K, a fim de facilitar a comparação com os valores

encontrados. Através dos procedimentos de otimização das condições de trabalho, a opção adotada foi utilizar amostras de carne fresca, com o objetivo de diminuir o número de etapas durante o preparo das amostras e uma quantidade mínima de massa, como pode ser observado na Tabela 4, onde os resultados das concentrações obtidas para os dois analitos em meio de TMAH apresentaram resultados semelhantes com RSD inferiores a 7 %.

Tabela 4 - Resultados analíticos para amostras de carne processadas após tratamento com TMAH por F AES 1. Valores em mg g⁻¹ e n = 3.

Amostra e Analito	Amostras secas	Amostras úmidas				
	1g	0,7 g	0,5 g	0,3 g	0,25 g	RSD (%)
<i>Carne Bovina Fatiada</i>						
K	3,25 ± 0,06	3,16 ± 0,12	3,16 ± 0,14	3,18 ± 0,04	3,18 ± 0,06	1,16
Na	12,69 ± 0,04	13,31 ± 0,04	13,52 ± 0,11	13,10 ± 0,09	13,67 ± 0,05	2,86
<i>Salsicha</i>						
K	3,23 ± 0,11	3,43 ± 0,10	3,41 ± 0,09	3,29 ± 0,06	3,33 ± 0,04	2,48
Na	26,34 ± 0,12	28,88 ± 0,98	31,14 ± 0,2	30,58 ± 0,13	30,53 ± 0,2	6,61
<i>Almôndega</i>						
K	4,86 ± 0,05	5,34 ± 0,05	5,08 ± 0,04	4,98 ± 0,03	5,02 ± 0,10	3,56
Na	10,90 ± 0,13	10,93 ± 0,06	10,94 ± 0,04	10,94 ± 0,03	10,52 ± 0,04	1,66

5.1. Resultados para F AES 1

Os resultados analíticos foram obtidos mediante a preparação e construção de curvas de calibração usando soluções padrão nos mesmos meios utilizados para a decomposição das amostras, tanto para TMAH, ácido fórmico ou ácido nítrico. As amostras foram diluídas com água ultrapura a fim de as concentrações ficarem dentro do intervalo da faixa de calibração obtida para cada elemento. Os parâmetros de mérito do método são apresentados na Tabela 5. De acordo com os resultados apresentados pode-se verificar que as curvas de calibração para ambos os elementos apresentaram boa linearidade com coeficientes de correlação maiores que 0,99 para as faixas de calibração estudadas, independente do método utilizado durante a etapa de preparo das

amostras. As sensibilidades, dadas pela inclinação das curvas, também foram semelhantes para os diferentes métodos. Os limites de detecção (LODs) que foram definidos como a concentração equivalente a três vezes o desvio padrão de dez medidas consecutivas do branco da amostra, dividindo-se pela inclinação da curva de calibração (sensibilidade) para cada analito e considerando a massa utilizada de cada amostra foram da mesma ordem de grandeza e não apresentaram diferenças significativas entre os três tipos de preparo de amostra utilizados neste trabalho. No entanto, como é possível observar na tabela abaixo, um menor LOD foi obtido de HNO_3 , porém este parâmetro não foi considerado relevante tendo em vista as altas concentrações de Na e K presentes nas respectivas amostras.

Tabela 5 - Parâmetros de mérito para os diferentes métodos estudados para a determinação de Na e K em carnes processadas por F AES 1.

Analito	TMAH			HCOOH			HNO ₃		
	<i>a</i>	LOD	R	<i>a</i>	LOD	R	<i>a</i>	LOD	R
	s.(mg/L)	(µg/L)		s.(mg/L)	(µg/L)		s.(mg/L)	(µg/L)	
K	0,5922	4,6	0,9986	0,5697	5,7	0,9986	0,6049	2,8	0,9989
Na	0,8679	1,4	0,9992	0,8004	3,6	0,9977	0,8275	1,0	0,9942

a: sensibilidade da curva; LOD: limite de detecção na solução de medida; R: coeficiente de correlação

Para obter maiores informações sobre a veracidade dos resultados, foram realizadas comparações entre diferentes métodos de preparo de amostra, conforme pode ser observado na Tabela 6, as concentrações obtidas são aparentemente concordantes para ambos os analitos estudados. Essas concentrações foram obtidas a partir de análises de amostras comerciais de carnes processadas, as quais foram submetidas ao teste t-pareado (usa o mesmo tipo de procedimento que o teste t-normal, exceto o que utiliza pares de dados) com um nível de confiança de 95%.

Os resultados obtidos em meio de ácido fórmico em relação à dissolução com ácido nítrico indicam que os dois métodos fornecem resultados diferentes para K, o nível de probabilidade foi de 99% enquanto que para Na foi de 99,9%. Porém, a concentração medida para ambos os elementos através da solubilização com TMAH comparado com o método de digestão ácida não apresentaram diferenças significativas entre os resultados com um nível de confiança de 95%, indicando que estes procedimentos são os mais adequados para o preparo das amostras. Aplicando-se o

teste-t normal, foi possível verificar que os resultados obtidos para Na em todas as amostras solubilizadas em meio de ácido fórmico em relação à digestão com ácido nítrico convencional, apresentou $t < t_{crit}$, aceitando a hipótese nula a um nível de confiança de 95 % e não foram observadas diferenças significativas. No entanto, para o K os testes estatísticos mostraram $t_{crit} > t$, chegando a conclusão que os dois métodos fornecem resultados diferentes.

Tabela 6 - Resultados obtidos para Na e K em amostras de carnes processadas preparadas em três diferentes meios por F AES.

Analito	Amostra	TMAH			HCOOH			HNO ₃		
		V _E	RSD	LOD	V _E	RSD	LOD	V _E	RSD	LOD
		(mg g ⁻¹)	(%)	(µg/g)	(mg g ⁻¹)	(%)	(µg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(%)	(µg g ⁻¹)
K	A	3,18 ± 0,05	1,6	2,0	3,39 ± 0,04	1,2	3,0	3,11 ± 0,04	1,3	1,5
	B	3,33 ± 0, 03	0,9		3,59 ± 0,08	2,2		3,22 ± 0,01	0,3	
	C	5,02 ± 0,10	2,0		5,70 ± 0,03	0,5		5,21 ± 0,03	0,6	
Na	A	13,67 ± 0,05	0,4	0,8	14,18 ± 0,20	1,4	2,0	13,85 ± 0,08	0,6	0,6
	B	30,53 ± 0,20	0,6		31,56 ± 0,30	0,9		30,92 ± 0,19	0,6	
	C	10,52 ± 0,04	0,4		9,98 ± 0,10	1,0		9,68 ± 0,16	1,6	

A: Carne Bovina Fatiada; B: Salsicha; C: Almôndega.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, foi possível verificar que todas as amostras de carne comerciais processadas analisadas apresentaram altas concentrações de Na e uma concentração relativamente baixa de K. Segundo a literatura, o sal é um dos principais ingredientes adicionados aos alimentos, e em produtos cárneos, as funções do sal adicionado em concentrações entre 2,5 a 3,0 % em massa são utilizados para a inibição do crescimento de micro-organismos ou também para adicionar sabor ao alimento [13-14]. Com isso, com uma elevada concentração de Na e uma baixa concentração de K nas amostras analisadas, pode haver um aumento no risco de desenvolvimento da hipertensão e conduzir a um aumento da pressão arterial, e o que se recomenda é que esses elementos estejam em quantidades iguais nos alimentos.

De todas as amostras de carnes processadas analisadas, a salsicha foi a que apresentou maior concentração de íons Na⁺, o que pode ser atribuído ao uso de altas proporções de sais de sódio em sua composição, como por exemplo: NaCl (sal), usado para a melhor percepção do sabor, nitrito/nitrato de sódio, usado como conservante nos

alimentos, fosfato de sódio, como estabilizante, e eritorbato de sódio, que atua como antioxidante.

Analisando os resultados obtidos e comparando com os objetivos atuais da *Food Agency Standards* [52], as amostras de carne fatiada processada apresentaram valores de concentração pra Na^+ acima dos valores estabelecidos pela Comunidade Européia, enquanto que as amostras de salsicha apresentaram concentrações duas vezes maiores que o recomendado, conforme pode ser observado através dos resultados apresentados na Tabela 7.

Com relação a concentração de Na encontrada nas amostras (Tabela 7), é necessário mencionar também a discrepância entre os valores obtidos nas análises de almôndegas processadas e as informações fornecidas no rótulo da embalagem, cujas concentrações apresentaram valores quatro vezes maiores que o informado. De acordo com as normas brasileiras da ANVISA [53], a tolerância máxima é de 20 % em relação a concentração informada nos rótulos dos alimentos e a concentração encontrada. No entanto, para produtos que contenham valores acima dos permitidos, no caso, que contenham excesso de micronutrientes, a empresa deve se manter a disposição aos estudos que justifiquem tal variação. Casos como estes, evidenciam a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso, principalmente em alimentos, bem como mostram a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas simples e confiáveis para o monitoramento desses metais em carnes processadas a serem consumidas pela população.

Tabela 7. Resultados analíticos, em mg g^{-1} , para amostras de carne processadas em massa úmida por FAES 1, após tratamento com TMAH.

Analito	Amostra	Valor encontrado (mg g^{-1})	Valores fornecidos nos rótulos em mg g^{-1}	Valores estabelecidos em mg g^{-1} (Comunidade Européia - 2012)
Na	A	4,63	5,9	4,5
	B	8,93	11,7	4,5
	C	2,85	0,7	3,0

A: Carne fatiada; B: Salsicha; C: Almôndega.

Assim, para assegurar a veracidade da metodologia proposta, testes de adição e recuperação de analito foram realizados nas amostras comerciais. Desta maneira, foram realizadas adições em triplicata de soluções padrão de Na e K equivalentes a 0,200 mg L⁻¹ antes da etapa de solubilização com TMAH. Os valores de concentração para ambos os analitos adicionados foram recuperados e tais recuperações ficaram entre 91 a 103 %, mostrando que a metodologia desenvolvida é adequada para a determinação de Na e K em amostras de carnes processadas, conforme pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados para os testes de adição e recuperação de 0,2 mg L⁻¹ de Na e K nas amostras de carnes processadas após tratamento com TMAH por FAES 1 (n = 3).

	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Adição de 0,200 mg L⁻¹ de Na			
Carne Fatiada	0,187 ± 0,005	94	2,7
Salsicha	0,182 ± 0,001	91	0,5
Almôndega	0,206 ± 0,005	103	2,4
Adição de 0,200 mg L⁻¹ de K			
Carne Fatiada	0,206 ± 0,002	103	1,0
Salsicha	0,199 ± 0,001	100	0,5
Almôndega	0,187 ± 0,003	94	1,6

5.2. Resultados para F AES 2 e F AAS

A fim de verificar a veracidade dos resultados obtidos pela metodologia proposta utilizando a solubilização com TMAH, as análises dessas amostras também foram feitas para os dois analitos utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama e por outro instrumento de emissão atômica, o fotômetro de chama convencional (F AES 2).

Para determinação por espectrometria de absorção atômica com chama, primeiramente, foi feito um estudo de otimização da concentração necessária de uma solução tampão de CsCl, a qual é comumente utilizada quando se pretende determinar elementos que são facilmente ionizados nestes atomizadores, a fim de proporcionar uma completa minimização destas interferências. Esta solução tampão a base de cério, é

adicionada às soluções padrão e amostras, de forma a aumentar a pressão parcial dos elétrons na chama, e a concentração desse elemento deve ser tal que, a partir de um valor determinado, o efeito da interação de ionização seja constante [42]. Elementos como Na e K podem sofrer interferências durante as análises de absorção atômica, devido a seus baixos potenciais de ionização, em relação a outros elementos [45].

Através da Figura 5, pode-se observar que, sem a adição da solução tampão, o sinal analítico de K foi fortemente afetado, e uma supressão no sinal analítico em torno de 30%, devido a interferência de ionização foi verificada. No entanto, foi observado, que com a adição de apenas 0,09 % CsCl m/v a solução padrão já foi suficiente para a obtenção de uma melhor sensibilidade e uma minimização completa deste efeito. Para Na, um comportamento semelhante de interferência foi verificado, porém com 20% de supressão do sinal, assim, a mesma quantidade de solução tampão foi necessária.

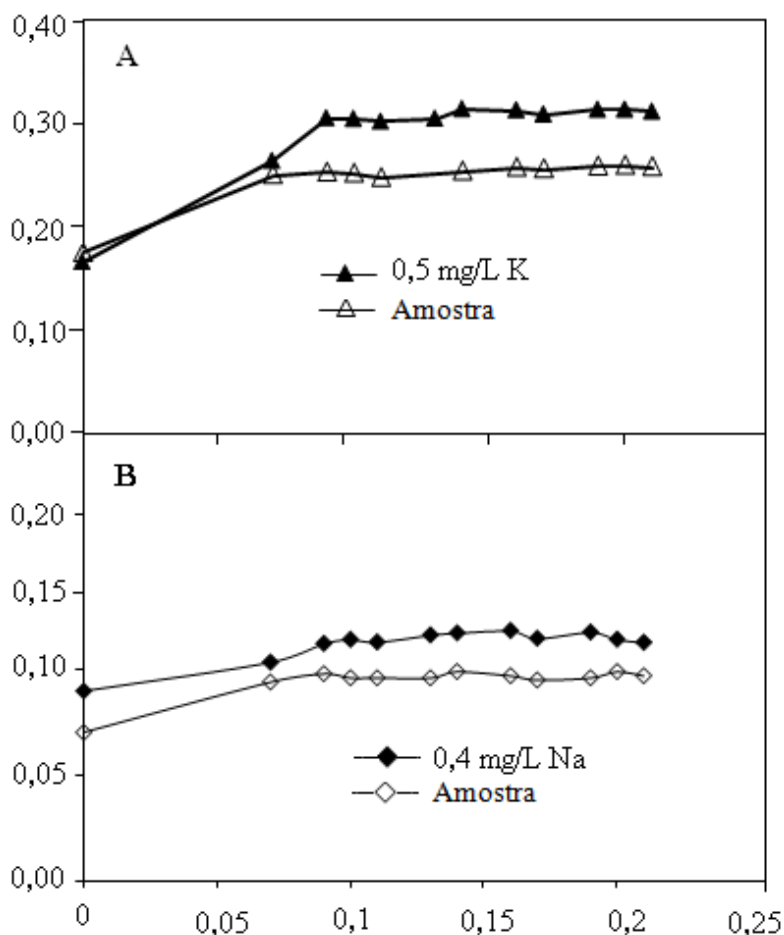


Figura 5- Efeito da concentração de CsCl na minimização do efeito de ionização na presença de soluções padrão de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ Na e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ K.

Com base neste estudo preliminar, os resultados analíticos foram obtidos mediante a construção de curvas de calibração utilizando soluções em meio de TMAH adicionando 0,09 % m/v de CsCl. Para as amostras, a mesma concentração de solução tampão foi adicionada logo após a diluição das mesmas com água desionizada. Na Tabela 9, se encontram os valores de concentrações de Na e K para todas as amostras analisadas, e de acordo com esses resultados verificou-se que os valores de concentração para ambos os elementos, independente da técnica analítica utilizada estão de acordo com resultados obtidos anteriormente, o que comprova a veracidade dos resultados através da metodologia proposta.

Tabela 9 – Resultados analíticos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para amostras de carne processadas por FAAS e FAES 2, após tratamento com TMAH.

Analito	Amostras	FAAS			FAES 2		
		Concentração (mg/g)	RSD (%)	R	Concentração (mg/g)	RSD (%)	R
K	A	3,21 $\pm$ 0,17	5,3	0,9988	3,52 $\pm$ 0,26	7,4	0,9966
	B	3,27 $\pm$ 0,05	1,5		3,47 $\pm$ 0,02	0,6	
	C	5,45 $\pm$ 0,20	3,7		5,37 $\pm$ 0,48	8,9	
Na	A	13,32 $\pm$ 0,18	1,3	0,9954	13.63 $\pm$ 0,54	4,0	0,9980
	B	29,60 $\pm$ 0,50	1,7		31.93 $\pm$ 0,58	1,8	
	C	10,69 $\pm$ 0,05	0,5		9.82 $\pm$ 0,16	1,6	

A: Carne Bovina Fatiada; B: Salsicha; C: Almôndega.

6. Conclusões

As altas concentrações de Na encontradas nas amostras de carnes processadas comerciais analisadas e valores de concentrações não concordantes com o informado pelo rótulo, ressaltam a importância de um controle de qualidade, bem como uma redução do teor de sal nos alimentos processados produzidos no Brasil. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias que sejam simples, reprodutíveis e que forneçam resultados confiáveis, enfocando principalmente as exigências referentes à Comunidade Europeia sobre os produtos alimentares que contribuem para a ingestão total de sal, se faz necessário.

O método de preparação de amostra proposto utilizando a solubilização com TMAH, em comparação ao método convencional de digestão com ácido nítrico e a solubilização com ácido fórmico para a determinação de Na e K por F AES, mostrou-se uma metodologia muito simples e reprodutível, exigindo pequenas quantidades de amostras e reagentes, promovendo a solubilização das amostras. Além disso, este método é menos suscetível à contaminação ou perdas de analito por volatilização e ainda não apresenta nenhum risco para a saúde, pois é um método muito adequado para a utilização em análises de rotina.

O método proposto utilizando a solubilização com TMAH pode ser usado para outras amostras de carne, e certamente, outros analitos podem ser determinados.

CAPÍTULO 2

1. Introdução

A crescente demanda de energia no mundo e os potenciais esforços para a redução do aquecimento global causado pela emissão de gases à atmosfera, que acarreta consequentes mudanças climáticas e problemas de poluição ambientais relacionados ao grande consumo de derivados de petróleo, têm impulsionado a busca por fontes de energia alternativas aos combustíveis fósseis com o objetivo de diminuir essa dependência, o que tem atraído atenção no mercado do mundo inteiro [54-56].

Como há uma grande frota mundial abastecida com esse tipo de combustível, milhões de toneladas de poluentes são gerados na atmosfera da Terra por dia, levando às condições de má qualidade do ar, principalmente em grandes áreas urbanizadas, causando, entre outros efeitos, a deterioração da saúde humana e alterações climáticas. Além de poluentes regulamentados, os veículos também são responsáveis pela emissão de outros poluentes, tais como os aromáticos policíclicos, conhecidos como HPA, alguns deles reconhecidos como cancerígenos levando a um aumento da morbidade e da mortalidade [57]. Em muitos países, programas governamentais e privados estabelecem normas, visando encontrar alternativas viáveis para a substituição dos derivados de petróleo, onde o objetivo principal é a substituição parcial desses combustíveis fósseis, tornando-os então menos dependentes das importações, uma vez que há incerteza quanto ao preço em períodos de instabilidade econômica e de política mundial [58]. Os biocombustíveis, que são derivados de biomassa renovável, são considerados como uma das melhores fontes de energia alternativa para essa substituição, principalmente para motores a combustão ou qualquer outro tipo de geração de energia, destacando-se os óleos vegetais, biogás, o biodiesel e o álcool [59-60].

O setor de transportes é um dos grandes consumidores desses combustíveis fósseis e o que mais contribui para a poluição ambiental. Como consequência disso, percebe-se um interesse crescente na utilização de combustíveis automotivos devido ao aumento da comercialização da frota de veículos do tipo bicombustíveis, os chamados “flexfuel”, os quais são projetados para serem abastecidos tanto com gasolina quanto com etanol, ou com a mistura de ambos em qualquer proporção, onde através de sensores eletrônicos adequados, o computador de bordo do veículo reconhece o tipo de combustível e ajusta os parâmetros de combustão do motor, sem qualquer necessidade de interferência do motorista [61-64].

O álcool tem sido amplamente utilizado como combustível no setor automotivo, principalmente no Brasil, desde 1970, com o início do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) e é obtido através do processamento da cana de açúcar, com produção de etanol anidro usado como componente da gasolina. Posteriormente, também passou a ser utilizado na forma hidratada como fonte única de combustível, o que gerou uma expansão de uma nova matriz energética proveniente de uma fonte renovável, e o que era pra ser uma solução de um problema econômico, tornou-se com o seu uso uma solução para problemas ambientais [65].

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e validação de uma metodologia simples e rápida para a determinação de Hg em amostras de álcool combustível, diluídas em meio de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e analisadas por photo-CVG acoplada à técnica de espectrometria atômica. Serão investigadas as diferentes espécies de Hg inorgânico e orgânico (metilmercúrio e etilmercúrio). Neste contexto, foram avaliados dois sistemas para a geração do vapor frio de Hg: um sistema comercial que é utilizado como um sistema convencional de redução química (fabricado pela Shimadzu) o qual foi adaptado ao sistema de photo-CV para o espectrômetro de AAS e um sistema que foi desenvolvido no laboratório e adaptado a respectiva técnica analítica. Para ambos os sistemas, condições experimentais como concentração do ácido orgânico de baixo peso molecular, vazão do gás de arraste e tempo de exposição da amostra à radiação ultravioleta, foram otimizados a fim de se alcançar uma maior sensibilidade e, consequentemente, menores limites de detecção.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Álcool Combustível

O álcool etílico é um combustível renovável que contribui significativamente para a independência energética do Brasil, o que tem atraído o interesse de muitos países. Tem sido amplamente utilizado principalmente no setor automotivo, como uma alternativa aos derivados de petróleo na frota brasileira, desde a década de 70, devido à primeira crise do petróleo, com consequente aumento no preço de seus derivados [66-67].

É um combustível líquido que possui alto desempenho e baixa toxicidade, tanto em relação ao evaporado, quanto aos gases provenientes de sua queima, principalmente quando são comparados aos gases resultantes da queima dos combustíveis fósseis [68]. O uso do álcool etílico contribui para uma menor emissão de gases como SO_2 , CO e de hidrocarbonetos do que a gasolina. Já para a emissão de NO_x , a produção é considerada menor ou equivalente, porém a geração de acetaldeídos e de compostos orgânicos voláteis é maior [65,69-72]. Considerando o processo global de plantio, a produção e seu uso, o que resulta em um ciclo fechado para o elemento carbono, o uso do álcool etílico não contribui efetivamente para o aumento do estoque de carbono atmosférico [65].

O etanol brasileiro é obtido a partir da fermentação da cana de açúcar e pesquisas têm sido realizadas para a otimização da produção de etanol no sentido de reduzir a produção de resíduos provenientes do bagaço da cana-de-açúcar ou no próprio processo de produção do álcool combustível, o que reduz significativamente a emissão de CO_2 e, consequentemente, contribui para a diminuição no aquecimento global [69-71]. É predominantemente consumido como combustível para automóveis, e é classificado como anidro ou hidratado, dependendo do seu uso. O etanol anidro é aquele misturado à gasolina como aditivo em proporções de 20 a 26% v/v, o que resulta no aumento da octanagem da gasolina. Tal procedimento pode reduzir a emissão de CO em até 50% e de NO_x sem diminuição significativa no desempenho do motor. Já o etanol hidratado, possui em sua constituição, aproximadamente 94% v/v de etanol, é o mais utilizado como combustíveis em automóveis [55, 58,73].

A elevada demanda do uso do etanol no panorama mundial e brasileiro, seja na

forma de combustível ou de matéria-prima para indústrias, justifica um rígido controle de qualidade do álcool vendido, devido à alta produção de álcool no Brasil feita por inúmeras destilarias espalhadas no país inteiro, fato este que dificulta a padronização do produto [65].

3.2 Metais em Combustíveis

O álcool combustível, apesar de ser menos poluente que os derivados de petróleo, apresenta diversos contaminantes, os quais exercem efeitos prejudiciais, tanto aos motores quanto ao meio ambiente, quando emitidos durante o processo de combustão [74].

No processo de combustão, tanto de combustíveis derivados de petróleo quanto de álcool etílico, ocorre a emissão de vários poluentes, partículas sólidas, metais pesados e produtos gasosos à base de enxofre e óxidos de nitrogênio ocasionando efeitos comprovadamente nocivos à saúde humana e ao meio ambiente [67].

Seinfeld e colaboradores [75] relatam que o transporte, manuseio e o uso de combustíveis são considerados os principais responsáveis pela emissão de compostos orgânicos voláteis para a atmosfera nos grandes centros urbanos. Assim, conhecer esses contaminantes sejam eles orgânicos ou inorgânicos presentes em combustíveis é importante para que se possa estabelecer normas de estocagem e de manipulação.

Dentre os contaminantes inorgânicos, destacam-se os íons metálicos, e principalmente os metais com caráter tóxico, os quais em virtude de estarem presentes no álcool combustível em concentrações muito baixas, são considerados como as impurezas que apresentam os maiores desafios quanto ao desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade [67, 74-75].

A presença de diversas espécies metálicas nos combustíveis pode reduzir a eficiência dos reatores catalíticos presentes nos sistemas de exaustão dos veículos, aumentando assim, a emissão de gases, e ainda podendo provocar o chamado “envenenamento” dos catalisadores no processo industrial, como na produção de eteno a partir deste álcool. Além disso, podem causar o aumento da corrosão dos componentes metálicos promovendo a formação de gomas e sedimentos em motores que utilizam a mistura etanol e gasolina como combustível [65, 67,74-76]. As principais fontes de contaminação dos combustíveis por espécies metálicas são devido a processos

corrosivos sofridos pelas colunas de destilação, reservatórios e nos postos de combustíveis [74].

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) é o órgão regulador federal que estabelece os padrões do álcool combustível produzido e comercializado no Brasil. A legislação brasileira especifica para metais, apenas limites de concentração para Cu, Fe e Na que variam de acordo com o tipo de combustível (anidro ou hidratado). Há um grande controle desses elementos em matrizes alcoólicas, principalmente o Cu, o qual tem um limite de $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$. Sua presença é proveniente do uso de destiladores feitos de ligas de cobre, os quais hoje estão sendo, substituídos por equipamentos de aço inox ou vidro, devido a contaminações pela presença deste metal. Em etanol anidro, quando misturado à gasolina, esse metal funciona como um catalisador, promovendo reações oxidativas via radicais livres, causando uma deterioração da gasolina através da formação de gomas, que bloqueiam os orifícios do motor, diminuindo assim, a eficiência do combustível. A legislação não especifica limites de concentração para elementos de interesse ambiental, como por exemplo, o Hg [73, 77-78].

3.3 Espécies de Mercúrio em Combustíveis

O Hg é um poluente global identificado como altamente tóxico, além de ser acumulativo e persistente no meio ambiente e biota, podendo sofrer biometilação em meios aquáticos, ou seja, ser biotransformado da forma inorgânica para a forma orgânica. As várias espécies de Hg diferem em suas propriedades bio-físico-químicas tal como toxicidade, solubilidade e taxa de bioacumulação pelos organismos. Dentre as diferentes formas químicas do Hg, esse metal pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação: o Hg elementar (Hg^0), o qual se encontra principalmente na forma de gás, sendo a espécie mais amplamente encontrada na atmosfera, o íon mercurioso (Hg_2^{2+}), que é pouco estável em sistemas naturais e o íon mercúrico Hg^{2+} que é a forma dominante em águas naturais. Na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) os mais comuns, ou ainda com ligantes orgânicos naturais. O CH_3Hg^+ é a forma de maior importância ambiental devido a sua elevada toxicidade a organismos superiores, particularmente os mamífero e em sua maior parte, é produzido

biologicamente por bactérias, como um mecanismo natural de detoxificação. Nos mamíferos, esta espécie acumula-se preferencialmente no sistema nervoso central devido à sua afinidade com aminoácidos, os quais são abundantes neste sistema, podendo levar a uma disfunção neural e, eventualmente, à paralisia e morte. Quando assimilado, 95 % da dose oral é absorvida pelo intestino para a corrente sanguínea, e para que 50 % da dose ingerida seja excretada, são necessários cerca de 70 dias. Desta forma, ocorre uma acumulação de Hg no organismo ao longo do tempo, mesmo com exposição relativamente baixa [79-81].

Na atmosfera, existem várias formas de vapor de Hg, porém nem todas identificadas devido ao seu ciclo global ser muito complexo. A forma química influencia drasticamente no seu transporte, uma vez que o Hg elementar na forma de vapor pode percorrer grandes distâncias, enquanto as outras formas podem ligar-se a partículas mais pesadas e ali se depositarem. Com isso, a distribuição do metal é encontrada na forma gasosa e particulada, fazendo com que este elemento passe a ser depositado nos sedimentos. O tempo médio de residência do Hg na forma de vapor na atmosfera é estimado entre quatro meses e quatro anos; consequentemente, o vapor de Hg apresenta distribuição global. Para as formas solúveis, entretanto, este tempo é de algumas semanas, apresentando, portanto capacidade de dispersão [82].

A Figura 6 mostra detalhadamente o ciclo global do Hg, onde o metal de origem antropogênica ou natural é lançado no meio ambiente, que por sua vez pode ligar-se a grupos orgânicos, principalmente em ambientes aquáticos, ou ser oxidado a Hg inorgânico pelo oxigênio do ar [83].

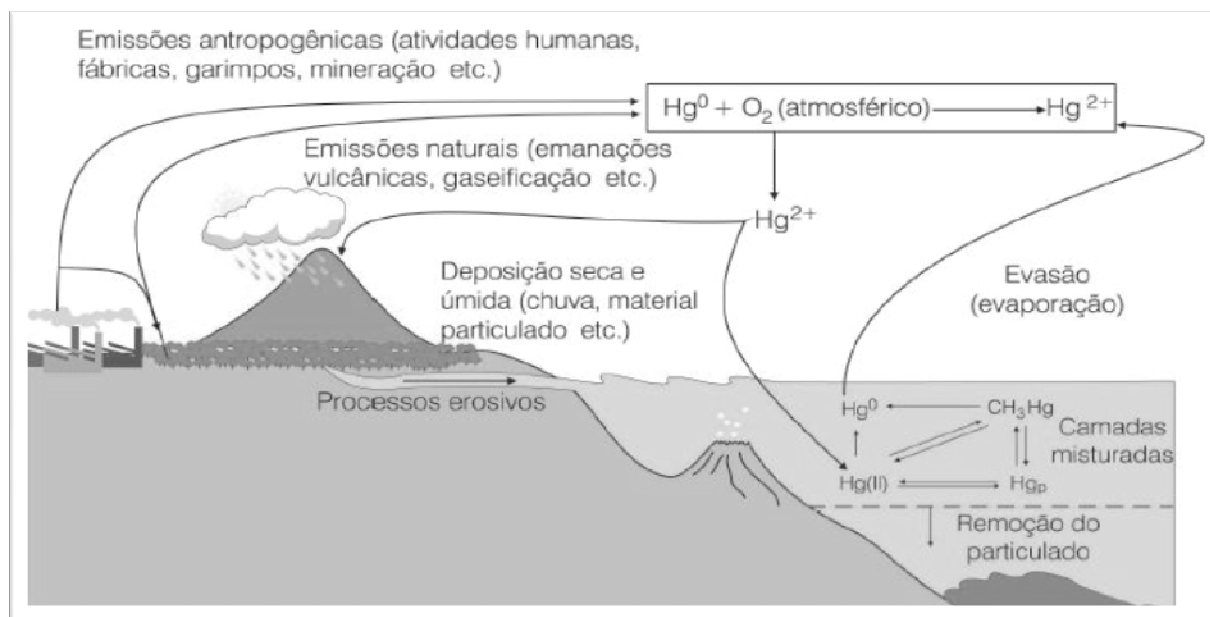


Figura 6 – Ciclo global do Hg. Fonte: Souza e colaboradores [83].

O principal caminho para a exposição humana é o consumo de peixes contaminados e outros frutos do mar que bioacumulam Hg orgânico. A meia vida do CH_3Hg^+ em peixes depende da espécie, variando geralmente de um a três anos. A forte ligação de CH_3Hg^+ com os tecidos do peixe não é destruída pelo cozimento ou fritura [82]. Porém, o Hg figura também na lista da *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos, como um dos poluentes atmosféricos nocivos conhecidos ou suspeitos de causar sérios danos a saúde, fato que levou a EPA a criar uma lei chamada “*Clean Air Act*” para estabelecer padrões para que fontes altamente poluidoras reduzam drasticamente suas emissões de poluentes atmosféricos [84].

Segundo Wong e colaboradores [85], há vários estudos sendo desenvolvidos sugerindo que os automóveis são possíveis fontes de emissão de Hg atmosférico. Devido a isso, as atividades antrópicas são de grande importância na mobilização do Hg e seus compostos, e dentre eles a queima de combustíveis é de especial preocupação, pois pode causar a liberação desse elemento altamente tóxico para a atmosfera [86]. Porém, poucos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para a determinação de Hg em combustíveis e biocombustíveis, pois o Hg é difícil de ser determinado devido tanto a complexidade dessas matrizes, como da alta volatilidade do Hg e da própria matriz, o que pode acarretar em graves perdas durante as análises [87].

No entanto, Aranda e colaboradores [88] propuseram um procedimento para a determinação de Hg total e inorgânico em amostras de biodiesel utilizando emulsões

para a introdução direta através de um fluxo contínuo seguido de geração de vapor frio acoplado a espectrometria de fluorescência atômica (FI-CV-AFS), onde para a determinação de Hg orgânico, as amostras passaram por um procedimento de decomposição utilizando uma fonte de irradiação UV, o que não foi preciso para a determinação da espécie inorgânica. Os vapores de Hg foram gerados utilizando uma solução ácida de SnCl_2 em fluxo contínuo para posterior determinação no equipamento.

Torres e colaboradores [89] desenvolveram um método simples para a determinação de Hg em amostras de gasolina diluída em etanol por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF-AAS). Os vapores de Hg foram gerados através da reação da amostra com um agente redutor (NaBH_4 ou SnCl_2), os quais foram pré-concentrados em uma coluna de ouro e ainda retidos em um tubo de grafite revestido com Au como modificador permanente. Em outro trabalho, Brandão e colaboradores [86], também desenvolveram um método para a determinação de Hg em gasolina por Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (CV-AAS), após a redução utilizando NaBH_4 em meio de microemulsões e os vapores de Hg gerados foram retidos em uma coluna de Au-Pt. Após a redução, os vapores de Hg foram transportados para uma solução intermediária de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$ para evitar a contaminação da coluna de Au-Pt e em seguida, foram transportados até a coluna para a liberação de Hg^0 para posterior quantificação.

3.3.1 Intoxicação humana por Hg

A progressiva utilização do Hg para fins industriais e o emprego de seus compostos durante décadas na agricultura resultaram no aumento significativo da contaminação ambiental, especialmente em águas e alimentos [90].

A exposição humana ao Hg também pode ser proveniente de fontes naturais, como liberação de gás da crosta terrestre, evaporação dos oceanos ou através da queima de combustíveis fósseis e/ou artificiais, produzidos por mineradoras e refinarias, células com Hg para a fabricação de soda/cloro, na indústria de cosméticos, amálgama dentário, entre outros.

O total de Hg liberado na atmosfera devido à atividade humana é de aproximadamente 2000 a 3000 toneladas por ano, enquanto a emissão natural é de 2700 a 6000 toneladas por ano. As emissões associadas à saúde humana representam riscos

quando confinados a áreas limitadas. Dados históricos e os contemporâneos indicam que os teores atmosféricos de Hg aumentaram de duas a cinco vezes a partir da era industrial. Assim, devido ao fato de ter um longo período de residência na atmosfera e por ser a contaminação do Hg nas cadeias alimentares lacustre bastante difundida, o Hg é visto como um problema global [82, 84]. A Figura 7 mostra esquematicamente as principais formas de intoxicação humana por Hg [93].

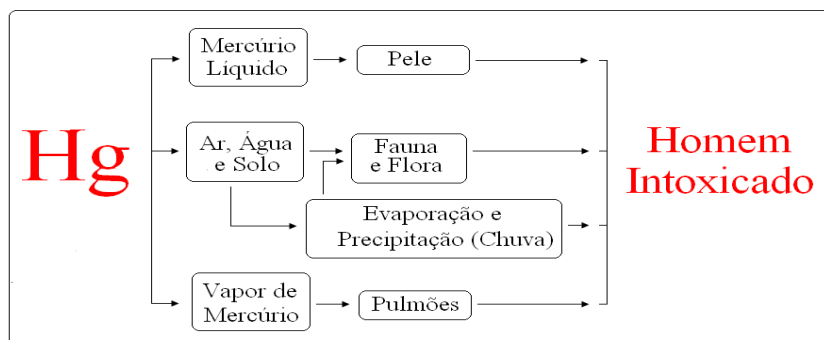


Figura 7 – Ciclo de intoxicação por Hg pelo ser humano.

Devido à falta de conhecimento sobre o risco que o Hg poderia causar ao ser humano, antigamente, os chineses acreditavam que este metal continha propriedades medicamentosas que poderiam prolongar a vida, o que levou a morte de vários imperadores que buscavam a imortalidade. Já os antigos hindus, por outro lado, acreditavam que o Hg possuía propriedades afrodisíacas [91].

Um dos casos mais famosos de intoxicação por Hg ocorreu no século passado, onde entre os anos de 1920 e 1960, uma indústria japonesa usou Hg como catalisador na produção de acetaldeído e cloreto de vinila, lançando CH_3Hg^+ nos efluentes que atingiam a baía de Minamata, na costa sudoeste de Kyushu. Com isso, os médicos da região se confrontaram com uma nova doença, cuja ação envolvia o sistema nervoso central, que foi denominada “Doença de Minamata” [91-92]. Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala também foram palcos de graves casos de intoxicação através de grãos tratados com fungicidas mercuriais. No caso do Iraque, no final da década de 60 e 70, mais de 6900 pessoas foram hospitalizadas e pelo menos 459 morreram após o consumo de grãos tratados com CH_3Hg^+ como praguicida. [91-92].

No Brasil, a região mais afetada por contaminação de Hg é a Amazônica, onde mineradores usam Hg para recuperar ouro devido a sua capacidade de formação de amálgamas (Hg-Au). Uma vez formada a amálgama, esta é então queimada e por

volatilização do Hg, obtém-se a separação de Hg e Au. Com isso, uma enorme quantidade de Hg foi utilizada e liberada de modo abusivo no ecossistema local desde meados da década de 70 até os anos 90. Estima-se que cerca de 100 toneladas de Hg tenham sido emitidas anualmente, as quais 45% foram despejadas nos rios e 55% na atmosfera [93].

O Hg e seus compostos podem causar vários danos à saúde tanto em situações de exposição aguda quanto crônica, interferindo, por sua afinidade com grupamentos sulfidrilas presentes em sistemas enzimáticos, em diferentes órgãos e tecidos. Assim, existem estudos que avaliam o efeito nocivo associado ao Hg nos sistemas nervoso, reprodutivo, digestivo, renal, cardíaco, imunológico, respiratório, entre outros.

A intoxicação por Hg pode levar a diversas patologias associadas ao sistema nervoso central, tais como irritabilidade, insônia, cefaleia, perda auditiva, tremores, convulsões, falta de coordenação motora, hipersalivação, depressão, alucinações, coma e entre outros, inclusive a morte [91]. O sistema nervoso central necessita exclusivamente da energia proveniente da degradação da glicose, uma vez que se tem a formação de acetil coenzima A, a partir de piruvato para a entrada no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). Diferentemente, outros tecidos podem utilizar os lipídeos como fonte de energia [94].

O Hg tem alta afinidade por grupamentos sulfidrilas vizinhas (-SH), podendo provocar alterações em sistemas enzimáticos essenciais. A formação de acetil coenzima A, a partir do piruvato é catalisada por um complexo denominado piruvato desidrogenase, o qual forma em uma de suas etapas um composto com grupamento sulfidrilas que ao se ligar com o Hg, é desativada provocando assim sérias lesões no sistema nervoso central, visto que, esta não pode dar sequência ao ciclo de Krebs e, posteriormente, as etapas de respiração celular. A Figura 8 mostra algumas vias metabólicas com destaque para a formação de acetil coenzima A proveniente da glicólise [94].

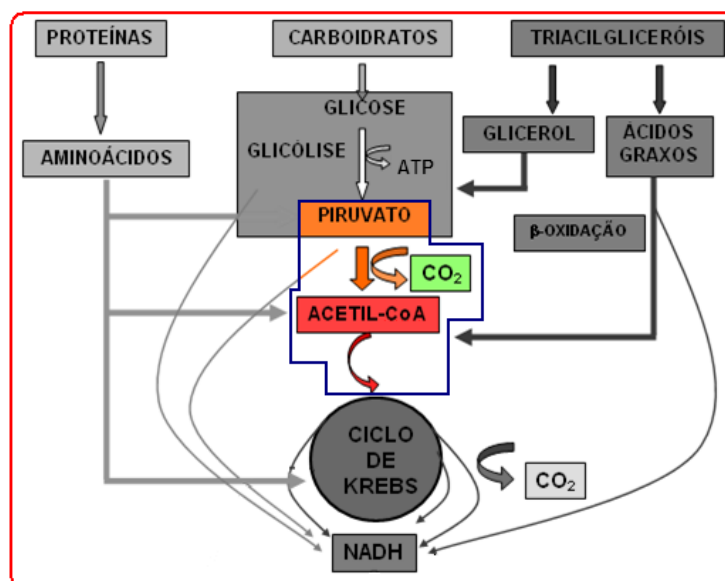
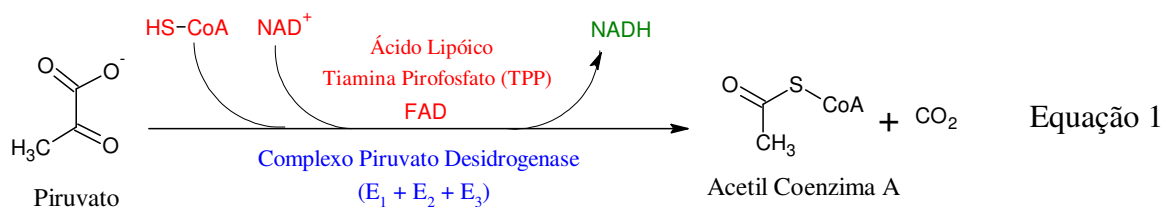


Figura 8 – Vias metabólicas com destaque para a formação de acetil coenzima A, a partir do piruvato da glicólise. Fonte: Berg e colaboradores [94].

A reação de formação de acetil coenzima A necessita das 3 enzimas do complexo piruvato desidrogenase e de 5 coenzimas. Nesta reação tem-se a transferência de um grupo acetila proveniente da descarboxilação do piruvato para a Coenzima A, ao qual se liga através de seu grupo sulfidríla terminal, formando uma reação rica em energia [94].

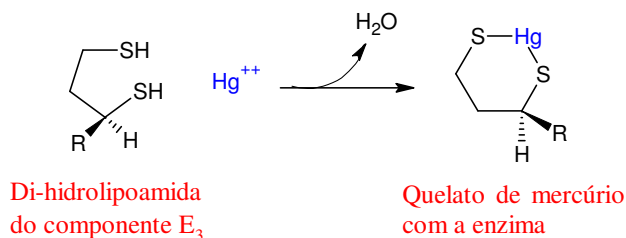


Cada enzima do complexo piruvato desidrogenase catalisa uma etapa de formação de acetil coenzima A, as quais são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Reações de formação de Acetil Coenzima A catalisadas pelas enzimas do complexo piruvato desidrogenase.

Enzima	Reação Catalisada
Componente Piruvato Desidrogenase (E ₁)	Descarboxilação Oxidativa do Piruvato
Di-hidrolipoil Transacetilase (E ₂)	Transferência da Acetila à CoA
Di-hidrolipoil Desidrogenase (E ₃)	Regeneração da Forma Oxidativa da Lipoamida

Na segunda etapa de formação de acetil coenzima A, a qual é catalisada pelo componente E₁, a lipoamida liga-se ao hidroxietil-TPP regenerando o carbanion de TPP e formando o acetil-lipoamida. Posteriormente, tem-se a formação da acetil coenzima A, a partir da reação de acetil-lipoamida com a coenzima A, a qual é catalisada pelo componente E₂. A di-hidrolipoamida também formada é então regenerada à lipoamida, a qual é catalisada pelo componente E₃, para que o ciclo catalítico seja completado. Porém, a di-hidrolipoamida pertence a grupos vizinhos os quais o Hg tem alta afinidade que, ao se ligar, impede a regeneração da lipoamida e, conseqüentemente, o reinício do ciclo catalítico [94].



Equação 2

Uma alternativa para o tratamento desse caso é a administração de reagente com sulfidrilas adjacentes, para competir com as do grupamento di-hidrolipoil pela ligação ao íon metálico, a fim de formar um complexo reagente-metal relativamente estável para poder ser excretado pela urina, por exemplo [94].

A partir destas evidências, se torna cada vez mais relevante a necessidade do controle deste metal, seja na sua forma inorgânica ou orgânica, nos mais diferentes tipos de matrizes (biológicas, ambientais e entre outras).

3.4 Técnicas de Análise e Avaliação da Exatidão de Métodos Analíticos

A avaliação da exatidão dos resultados de análises de amostras de álcool combustível não pode ser feita com o uso de materiais de referência certificado, pois ainda não há disponibilidade comercial para as espécies estudadas apesar de alguns materiais estarem sendo desenvolvidos. Portanto, a avaliação da exatidão do método neste tipo de matriz pode ser feita através de testes de adição-recuperação de analito.

Assim, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a determinação de metais em combustíveis é de grande interesse ambiental e econômico devido a problemas associados à alta complexidade dessa matriz orgânica [95]. Dentre as técnicas analíticas utilizadas na determinação de metais pesados que encontram-se em baixas concentrações, a Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) apresenta-se como uma ferramenta importante, devido a sua alta sensibilidade e especificidade [39, 94]. Uma discussão detalhada da técnica de AAS foi apresentada no capítulo 1.

3.5 Geração Química de Vapor Acoplada à técnica de AAS

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é considerada atualmente como uma técnica largamente difundida e bem sucedida, que pode ser empregada na determinação de elementos a nível traço ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos mais variados tipos de amostras [91, 96-97]. Esta técnica apresenta diversas alternativas para as análises, as quais podem variar os diferentes tipos de atomizadores ou formas para introduzir a amostra no equipamento.

Uma das maneiras mais eficientes de se introduzir a amostra no instrumento pode ser feita através do uso da Geração Química de Vapor acoplada a Espectrometria de Absorção Atômica (CVG-AAS), a qual se baseia na transformação da espécie de interesse em um composto volátil e seu posterior transporte para a célula de absorção/atomização, geralmente um tubo de quartzo em forma de T aquecido pela chama ou por resistência elétrica, além de outras possibilidades como a retenção dos vapores gerados em um tubo de grafite.

A técnica de CVG-AAS, consiste em promover a reação da amostra com um agente redutor adequado, geralmente NaBH_4 ou SnCl_2 em meio ácido para reduzir o

analito metálico ou combiná-lo com o hidrogênio para promover a geração de hidretos metálicos gasosos. Como em temperatura ambiente os hidretos encontram-se na forma gasosa, após a etapa de geração, estes são separados em um separador gás-líquido e conduzidos através de um fluxo de gás inerte até a cela de absorção/atomização. Esta técnica pode ser considerada como um dos procedimentos mais populares utilizados para a determinação de elementos como As, Bi, Ge, Pb, Sn, Sb, Te e Se. Além disso, é considerada como sendo uma técnica que apresenta poucas interferências, pois implica na separação do analito da matriz da amostra antes da etapa de atomização, sendo esta uma das principais vantagens do uso desta técnica [97].

Entretanto, a CVG possui algumas limitações, que inclui a suscetibilidade a interferências por concomitantes existentes na solução da amostra que interferem na reação de geração do hidreto; fatores físicos associados à solução, como densidade, viscosidade e volume, que podem afetar a cinética da reação; o pH do meio; concentrações dos reagentes para promover a redução de alguns elementos; o estado de oxidação e a forma em que o analito encontra-se presente na amostra, bem como a instabilidade dos agentes redutores que são utilizados [41].

A técnica de CVG-AAS pode ser dividida basicamente em três etapas: geração da espécie volátil, transporte da espécie volátil até a cela de quartzo e decomposição do hidreto até a total atomização do elemento a ser determinado [98].

Em relação à instrumentação, existem três formas de promover a geração de vapor:

- Sistema de injeção em fluxo (FI): são baseados no bombeamento de soluções, onde um pequeno volume da amostra, geralmente 100 a 1000 μL são injetados na linha de uma solução carreadora em intervalos regulares de tempo, a qual sofre dispersão ao ser conduzida através do percurso analítico até um ponto de confluência com uma solução redutora. As espécies gasosas são geradas em uma bobina reacional e após, são separadas em um separador do tipo gás/líquido (GLS), e por fim, são conduzidas pelo gás carreador até ao atomizador.

- Sistema de Fluxo Contínuo (CF): apresenta um procedimento semelhante ao sistema de FI, mas neste caso ocorre um bombeamento contínuo da solução da amostra e reagentes até o ponto de confluência, sendo assim, um volume maior tanto de amostras quanto de reagentes se faz necessário. A medida é realizada em altura do sinal e sofre influência pela liberação da espécie na fase líquida.

- Sistema em batelada: é um sistema manual para a introdução da amostra, onde volumes em torno de 1 a 50 mL de amostra em meio ácido são colocados em um frasco reacional, e posteriormente, com o sistema fechado são adicionados o reagente redutor com uso de uma bomba peristáltica ou injetado manualmente ou por pressão. A reação e a liberação do hidreto ocorrem no mesmo frasco de reação e a espécie gasosa é então transportada para a célula de absorção/atomização através de um fluxo gás de carreador. Esse transporte da espécie volátil até o atomizador é chamado de transferência direta [98-99].

Vários métodos de CVG-AAS têm sido estudados, tal como a geração de hidretos e vapor frio, além de outras maneiras de se gerar espécies de vapor, como reações de alquilação, geração de haletos, geração química de derivados carbonilados, geração eletroquímica de vapor e geração de vapor frio com aplicação de energia ultrassônica [100-104].

O método analítico, baseado na AAS, mais amplamente utilizado para a determinação de concentrações de Hg em uma grande variedade de matrizes, é conhecido como Geração de Vapor Frio, popularmente conhecida em inglês como sendo a *Cold Vapor* (CV-AAS). Esta técnica é específica para a determinação de Hg, pois é um elemento cuja forma atômica (Hg^0) está presente na forma de vapor à temperatura ambiente, visto que, este possui considerável pressão de vapor nesta temperatura maior que 1,6 mbar a 20 °C [98].

Poluetkov e Vitkun desenvolveram e implementaram a técnica mais utilizada para a determinação de Hg. Durante algumas investigações por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS), os autores perceberam o aumento da magnitude do sinal de absorvância, de uma a duas ordens de grandeza, quando o agente redutor era adicionado (no caso o SnCl_2) à amostra aspirada pelo nebulizador pneumático do equipamento. A partir destas observações foi possível verificar que não seria necessário o uso do nebulizador pneumático e da chama, pois o Hg podia ser transformado em vapor atômico somente pela adição do agente redutor na amostra em solução, onde no momento da adição, o analito poderia ser conduzido através de um fluxo de gás inerte até uma cela de quartzo. Os autores foram os primeiros a usar esta reação combinada com a AAS, mas não foram os primeiros a descrever a redução de sais de Hg elementar no estado gasoso com SnCl_2 . Outros autores também reportam o uso desta técnica, mas com pequenas modificações para determinação de Hg nas mais diversas amostras [104].

A CV-AAS baseia-se na redução da forma iônica ou orgânica do Hg para a forma elementar (Hg^{2+} a Hg^0), utilizando um agente redutor adequado (SnCl_2 ou NaBH_4), onde o vapor gerado é transportado através de um fluxo de gás inerte até a célula de absorção, situada longitudinalmente no caminho óptico do equipamento de AAS, não necessitando de aquecimento, caracterizando assim, um sistema de geração de vapor frio. É uma técnica relativamente simples, de baixo custo, quando comparado as demais técnicas analíticas apresentando alta sensibilidade e ausência quase absoluta de interferências espectrais [39].

A especificidade do comportamento do Hg, em ser reduzido a sua forma elementar, permite o uso de uma cela de quartzo fria, e principalmente, a importância ambiental deste elemento, tem levado os fabricantes a oferecer ao mercado equipamentos exclusivos para a sua determinação. Em geral, são equipamentos com uma cela de absorção de caminho óptico mais longo, de modo a aumentar a sensibilidade, que utilizam lâmpadas de descarga de Hg como fonte primária de radiação, que são mais potentes, diminuindo, assim, o nível de ruído, com detectores de estado sólido e sistema de fluxo acoplado. Consequentemente, estes equipamentos apresentam melhores limites de detecção [39].

Levando em consideração as limitações e os inconvenientes da Geração Química de Vapor convencional, principalmente pelo uso de SnCl_2 ou NaBH_4 que são instáveis e caros, bem como os tratamentos extensivos das amostras, novos estudos vêm sendo desenvolvidos para a substituição ou redução do uso de reagentes redutores utilizados na respectiva técnica, e dentre estas novas técnicas, a Geração Fotoquímica de Vapor (photo-CVG), que utiliza a radiação ultravioleta para a redução de analitos, tem se mostrado uma alternativa, apresentando-se como uma metodologia mais simples e barata quando comparadas a outras técnicas de geração de vapor.

3.5.1 Espectrometria de Absorção Atômica Acoplada à Geração Fotoquímica de Vapor (photo-CVG-AAS)

Os primeiros estudos que apontam o uso de radiação ultravioleta (UV) surgiram em 1966, onde Golimowski e colaboradores [106] descrevem o uso da geração fotoquímica de vapor para promover a decomposição de matéria orgânica em amostra de água de mar, a fim de determinar elementos e compostos inorgânicos. Para facilitar o

processo de oxidação, agentes oxidantes fortes, tais como O_3 , $K_2S_2O_8$ e $K_2Cr_2O_7$, como também HNO_3 ou H_2O_2 foram adicionados junto ao sistema. Com isso, a irradiação UV pode produzir radicais $OH^\cdot$ e $O^\cdot$ na presença de compostos orgânicos, e outros radicais como $CO^\cdot$ e $R^\cdot$ podem também surgir e promover a redução fotoquímica das espécies [107-110].

Dentre as fontes de radiação UV disponíveis comercialmente (lâmpadas de deutério, xenônio ou vapor de Hg), a de vapor de Hg é a mais usada em laboratórios e indústrias, devido ao seu custo relativamente baixo e ser de fácil funcionamento, bem como por possuir eficiência energética e espectral. A Figura 9 ilustra uma relação entre os tipos de lâmpadas.

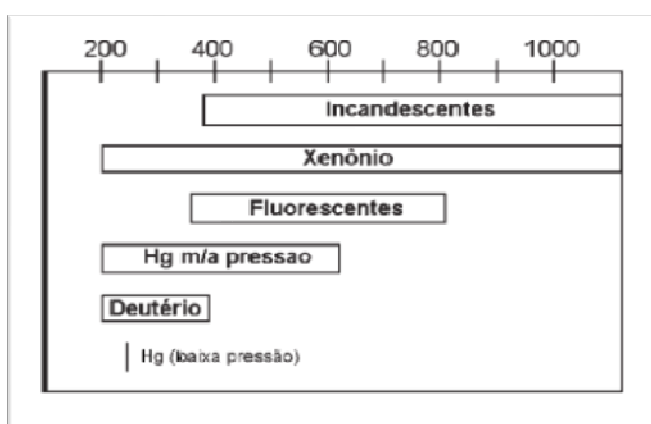


Figura 9 - Domínio dos espectros de emissão dos principais tipos de lâmpadas, λ em nm. Fonte: Cavicchioli, A.; Gutz, I.G.R. [107]

A lâmpada de Hg possui baixa pressão, que resulta em eficiência de conversão da potência em radiação UV, onde é melhor do que em lâmpadas de média e alta pressão que, apesar de apresentarem potência nominal de aproximadamente uma ordem de grandeza maior, convertem em luz UV somente cerca de 30% da potência elétrica consumida [107]. A Figura 10 mostra uma lâmpada de Hg que pode ser usada no sistema de redução fotoquímica.

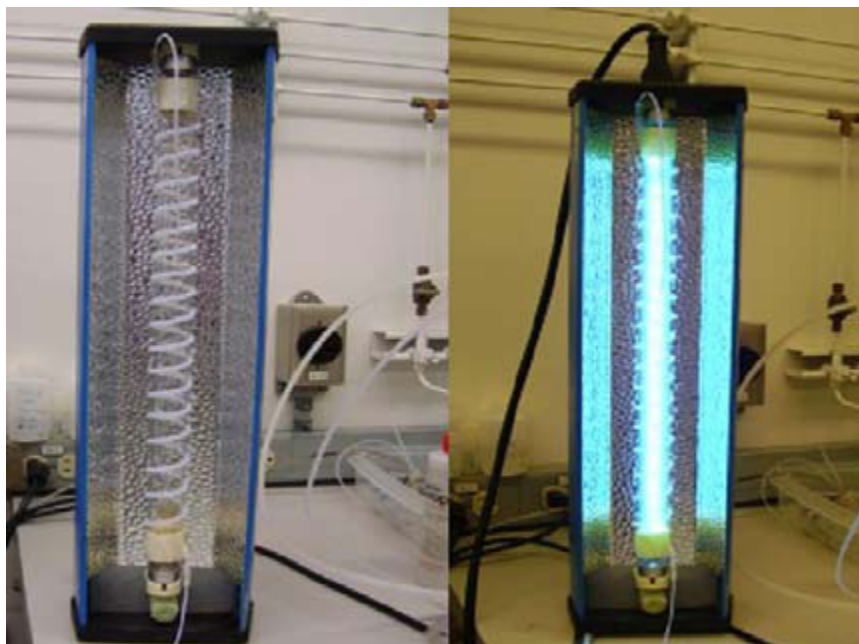


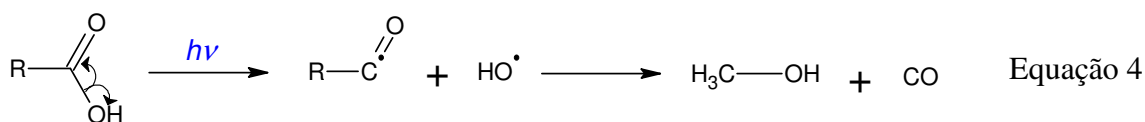
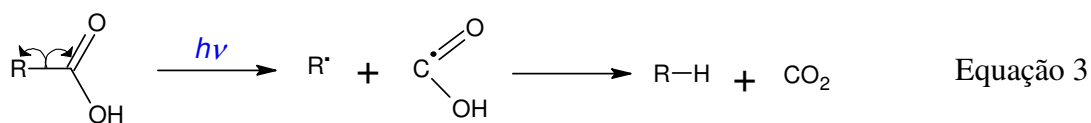
Figura 10 – Reator fotoquímico que utiliza uma lâmpada de Hg de baixa pressão para emissão da radiação UV com potência nominal de 15 W envolvida com uma bobina de Teflon®.

Muitos artigos apresentam possíveis mecanismos envolvidos na geração fotoquímica de vapor, mas até o presente momento, não se chegou a um mecanismo definitivo, devido a natureza complexa das reações fotoquímicas. Supondo que uma espécie volátil possa ser gerada com ou sem o uso do TiO_2 (agente catalisador), pode-se propor então dois mecanismos diferentes. É muito comum o uso do TiO_2 como catalisador semiconductor dada a sua grande eficiência, insolubilidade em fase aquosa e atoxicidade. Baseado na absorção pelas partículas do catalisador TiO_2 ($E_{\text{band-gap}} = 3,2$ eV), de fótons de energia suficiente para que se verifique a promoção de um elétron da BV (banda de valência) para a BC (banda de condução), são gerados centros oxidantes (lacunas), na banda de valência onde estes centros de potencial são suficientes para oxidar moléculas de solvente (H_2O e HO^- , meio aquoso), e também moléculas de substratos adsorvidos na superfície do semiconductor, produzindo radicais hidroxilas e radicais orgânicos ($\text{HR}^{\bullet+\text{ads}}$) [108-110].

A radiação UV forma compostos intermediários a partir da interação com compostos orgânicos ou inorgânicos. Os mecanismos fotoquímicos de reação envolvem várias etapas que podem ser agrupadas em processos primários e secundários. Nos processos primários, ocorre interação direta entre a radiação e as espécies químicas presentes no meio. O primeiro passo é sempre uma transição eletrônica, ou seja, a passagem para um estado excitado, visto que a reatividade de espécies excitadas

eletronicamente é, evidentemente, bem diferente daquela de moléculas no estado fundamental. Portanto, sua subsequente evolução conduz a formação de produtos que seriam impossíveis de alcançar a partir da molécula no estado não excitado. Os processos secundários são reações térmicas convencionais, que permitem converter espécies intermediárias geradas durante a primeira etapa e só são fotoquímicos no sentido de que envolvem espécies formadas por efeito da radiação [107].

Atualmente, o uso de reagentes alternativos, no processo de oxidação das espécies, vem sendo apresentado com a adição de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácido fórmico (CH_2O_2), ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), ácido propiônico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$) e ácido malônico ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$), visto que o produto da reação da solução desses ácidos, quando irradiados com UV ($\text{H}^\cdot$, $\text{CO}^\cdot$ e $\text{CH}_3^\cdot$) são capazes de reagir com uma série de íons para a produção de compostos voláteis. Recentemente, vários autores vem apresentando discussões sobre o suposto mecanismo envolvido na redução fotoquímica de espécies metálicas, as quais se dão através de radicais orgânicos formados da seguinte maneira, onde $\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ e $n = 0, 1$ e 2 [109].



A primeira reação ocorre mais frequentemente do que a segunda, pois a ligação entre C–R apresenta uma diferença de eletronegatividade menor do que a ligação C–O, o que é preferível para uma cisão do tipo homolítica. Com isso, quanto maior for a cadeia R, menos favorável se torna a segunda reação.

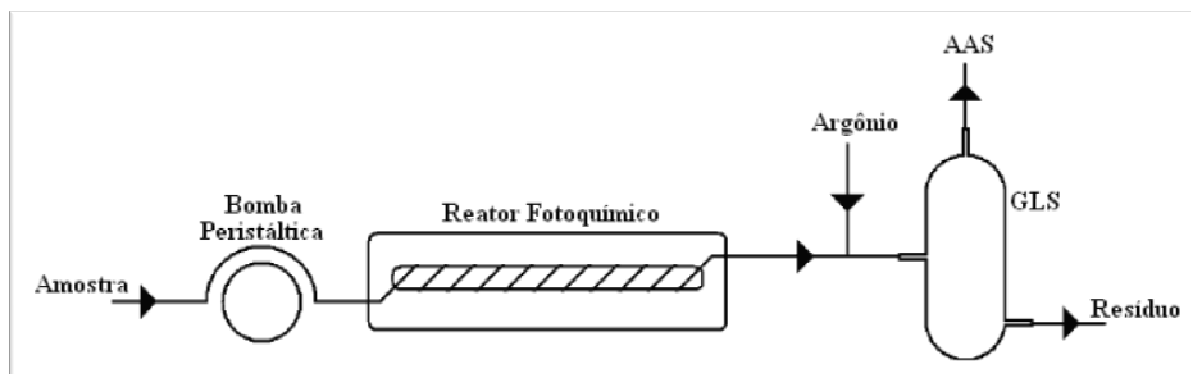


Figura 11 – Esquema de um sistema de photo-CVG. Fonte: Vieira e colaboradores [99].

Além de levar em consideração o ácido de baixo peso molecular adicionado para a reação de formação dos compostos voláteis, outras variáveis também são importantes para a técnica de photo-CVG, tais como a fonte de radiação (sendo esta de vapor de Hg em baixa pressão), o caminho da amostra através da lâmpada (constituído de tubos de politetrafluoretileno ou de quartzo), o tempo de irradiação, a espécie do analito e o tipo da amostra, bem como a vazão da amostra. Essas condições devem ser necessariamente otimizadas para a determinação de cada elemento em uma amostra específica, a fim de obter as melhores condições para a formação das espécies voláteis [111].

Com base em metodologias que visam a formação de compostos voláteis a partir da radiação UV, recentemente, trabalhos vêm sendo desenvolvidos para a determinação de elementos que sejam favoráveis a geração de vapor a partir desta técnica, apresentando resultados comparáveis em termo de eficiência de geração.

Vieira e colaboradores desenvolveram pesquisas para a determinação de Hg total e metilmercúrio em amostras biológicas com redução fotoquímica pela exposição à radiação UV e detecção por CV-AAS. As amostras foram solubilizadas em meio de HCOOH 10% v/v e de TMAH 2,5% m/v e em seguida foi determinado o teor de Hg total, após o mesmo ser reduzido pela exposição da solução à irradiação ultravioleta. Já para a determinação de metilmercúrio, as amostras foram solubilizadas com TMAH 0,125% m/v, diluídas com CH₃COOH 10% v/v e pH ajustado para 0,3 com HCl. Os resultados foram validados com a análise de materiais biológicos de referência certificados, confirmando assim, a veracidade da metodologia proposta. Através dos resultados, também foi possível observar a especiação para mercúrio, sem a necessidade do uso de uma técnica cromatográfica. Para este estudo, foi utilizado um tempo 108 segundos de exposição das amostras à radiação UV (vazão da amostra de 5 mL min⁻¹) e

um fluxo de gás carreador de 56 mL min^{-1} para a geração das espécies voláteis. Sendo assim, os autores obtiveram LOD de 6 ng g^{-1} para Hg total quando foi utilizado HCOOH e LOD de 8 ng g^{-1} para CH_3Hg^+ utilizando TMAH [99]. Em outro trabalho, Madden e Fitzgerald desenvolveram um estudo comparativo para determinação de mercúrio pela investigação da geração de vapor com fotólise ultravioleta usando aprisionamento em forno de grafite por Espectrometria de Absorção Atômica. Nesta metodologia, foi investigada a melhor condição de geração e redução para a quantificação de Hg^{2+} , onde foram otimizadas as condições ideais de forma independente, como uma concentração de 3 mol L^{-1} de CH_3COOH , tempo de 10 minutos de exposição das amostras à radiação UV devido ao uso de uma pen light, um fluxo de gás carreador de 1 mL min^{-1} , temperatura de pirólise de 650°C durante 5 segundos com um volume de $5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução do modificador químico (Pd). Sendo assim, os autores obtiveram um LOD de $0,12 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação de Hg^{2+} pela respectiva técnica analítica.

4. Materiais e Métodos

4.1 Instrumentação

Todas as medidas foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica modelo AA-6300 (Shimadzu, Japão), equipado com uma lâmpada de cátodo oco de Hg (Hamamatsu photonics K.K, Japão) e um corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério. O espectrômetro foi operado sob as seguintes condições: comprimento de onda de 253,7 nm, fenda espectral de 0,7 nm e corrente da lâmpada de 6,0 mA. Um atomizador de tubo de quartzo (QTA) com comprimento de 14,7 cm e um diâmetro de 2,4 mm foi montado no compartimento da chama do espectrômetro, posicionado no caminho óptico e mantido a temperatura ambiente. Argônio, com uma pureza de 99,996% (Linde, Barueri, SP) foi usado como gás carreador. Para avaliação do sinal, as medidas foram feitas em absorvância integrada em modo contínuo. Uma lâmpada de UV com baixa pressão de vapor de Hg (254 nm, 15 W, Cole Parmer, Estados Unidos) foi usada no reator fotoquímico, e o caminho pelo qual as soluções passaram, foi construído usando tubos de quartzo envolvendo a lâmpada, com um volume interno resultante de aproximadamente 26,0 mL, como é mostrado na Figura 12. As soluções foram transportadas para o reator fotoquímico através de dois sistemas: o primeiro utilizando uma bomba peristáltica Shimadzu modelo HVG-1 *Hydride Vapor Generator* (Japão) com uma vazão constante de Ar de 70 mL min⁻¹ para a introdução ao separador gás/líquido a fim de efetuar o transporte das espécies voláteis resultantes diretamente para o QTA para todas as determinações. Já no segundo sistema, foi utilizada uma bomba peristáltica Ismatec modelo CP-78017-35 (Cole Parmer, Vernon Hills, Estados Unidos). A vazão do fluxo de gás foi controlada através de um fluxômetro modelo 03217-10 de 150 mm (Cole Parmer, USA), o qual foi ajustado em uma vazão de 51,7 mL min⁻¹ de Ar, sendo utilizado para introdução ao separador gás/líquido a fim de efetuar o transporte das espécies voláteis resultantes diretamente para o QTA. As Figuras 13 e 14, mostram respectivamente, os esquemas dos sistemas 1 e 2 utilizados no presente trabalho.

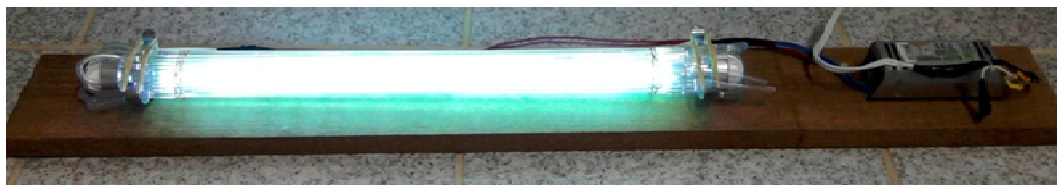


Figura 12 - Reator fotoquímico utilizado nos dois sistemas estudados no presente trabalho.

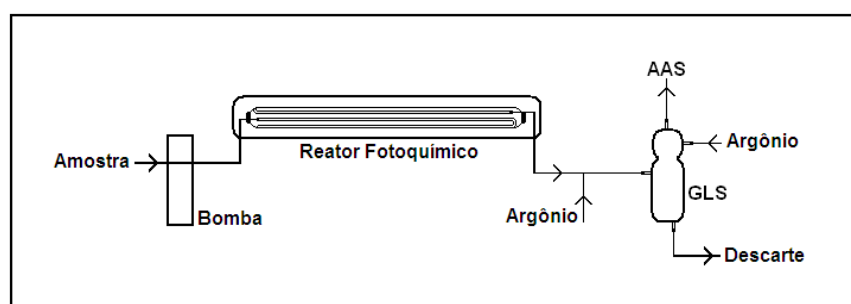


Figura 13 – Esquema utilizado para o sistema 1 comercial que foi adaptado para ser utilizado com a photo-CV-AAS.

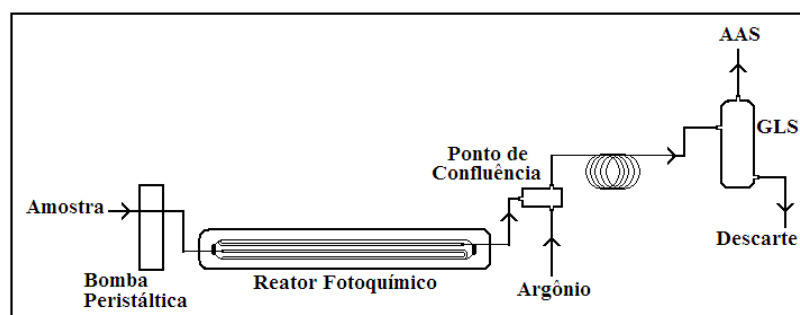


Figura 14 – Esquema utilizado para o sistema 2 não comercial utilizado para a photo-CV-AAS.

As análises por CG-MS foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo GC 2010 (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas - QP2010 Plus, com injetor automático AOC-20i, coluna capilar RTX-1MS (100% metilpolissiloxano, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm). As análises cromatográficas foram efetuadas em um cromatógrafo a gás modelo GC2014 (Shimadzu, Japão) equipado com injetor *split/splitless*, detector por ionização em chama (FID) e coluna capilar coluna RTX-1 (100% metilpolissiloxano, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm).

4.2 Materiais e Reagentes

Os reagentes utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas utilizando água de alta pureza tratada em um sistema Direct-Q 3 de purificação de água (Millipore Corporation, Bedford, USA) com resistividade de 18,3 MΩ cm. Uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de Hg²⁺ foi preparada pela diluição adequada de uma ampola Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha) em HNO₃ 0,5% v/v. Similarmente, padrões de 1000 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ e de 400 mg L⁻¹ de C₂H₅Hg⁺ foram preparados pela dissolução do sal de cloreto de metilmercúrio (Fluka Analytical, Steinheim, Alemanha) e cloreto de etilmercúrio (Analytical Supelco, Bellefonte, Estados Unidos), respectivamente, e diluídos em meio de etanol bidestilado. Também foram usados reagentes como ácido fórmico 98 % v/v (Fluka Analytical, Alemanha), ácido acético glacial 99 % v/v (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O álcool etílico utilizado foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

Frascos de polipropileno (PP) foram utilizados para o preparo e preservação das amostras. Os frascos de PP, vidrarias e materiais de laboratório, foram lavados, logo após foram imersos em uma solução de HNO₃ 10 % v/v durante 48h, e posteriormente, enxaguados com água de alta pureza e postos para secar em capela de exaustão.

4.3 Preparo das Amostras e Soluções de Calibração

As amostras de álcool combustível foram adquiridas em postos de combustíveis da região e foram usadas para o desenvolvimento e avaliação do método proposto para a determinação de Hg.

As amostras foram preparadas em dois diferentes meios de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, utilizando ácido fórmico e ácido acético para a determinação de Hg²⁺, CH₃Hg⁺ e C₂H₅Hg⁺, conforme é apresentado a seguir:

4.3.1 Ácido Fórmico

Neste procedimento, foram utilizados 25 mL da amostra de álcool combustível, ao qual foram adicionados 1, 275 mL de HCOOH e o volume final foi completado com água desionizada a 50 mL, resultando em um volume final de 50% v/v para a amostra

de álcool combustível e de 2,5% v/v de HCOOH. Semelhantemente, as soluções de calibração foram preparadas do mesmo modo, porém utilizando álcool bidestilado.

4.3.2 Ácido Acético

Neste procedimento, foram utilizados 25 mL da amostra de álcool combustível, ao qual foram adicionados 2,52 mL de CH₃COOH e o volume final foi completado com água desionizada a 50 mL, resultando em um volume final de 50% v/v para a amostra de álcool combustível e de 5% v/v de CH₃COOH. Semelhantemente, as soluções de calibração foram preparadas do mesmo modo, porém utilizando álcool bidestilado.

4.4. Procedimento Analítico

Para o procedimento das medições, 50 mL de cada solução (amostra ou solução de calibração) foram introduzidas no reator fotoquímico através de uma bomba peristáltica, com uma determinada velocidade de rotação, o qual fornecia uma vazão das soluções e determinava o tempo de exposição frente à luz UV. Subsequentemente, a solução proveniente do reator fotoquímico foi diretamente misturada, em um ponto de confluência, com um fluxo de gás Ar e introduzida no separador gás/líquido, onde as espécies voláteis formadas foram então transportadas para a cela de absorção do AAS.

Entretanto, algumas condições operacionais foram otimizadas antes das calibrações e quantificações deste metal nas amostras estudadas. Para ambos os sistemas foram otimizados os efeitos da concentração dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular (HCOOH e CH₃COOH) utilizados no preparo das soluções das amostras e o tempo de exposição destas à radiação UV. A taxa de vazão do gás de arraste foi otimizada somente para o sistema 2. Estes parâmetros são fundamentais para se obter um melhor sinal analítico para a redução das espécies.

O sistema 1, de origem comercial tem a vazão do gás carreador fixa e não permite um controle minucioso deste parâmetro, o que fez com que durante o desenvolvimento da dissertação um novo sistema fosse estudado (sistema 2), o qual foi configurado e montado em nosso grupo de pesquisa, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e obter um melhor limite de detecção. Posteriormente, curvas de calibração em uma faixa linear de 5,0 até 20,0 µg L⁻¹ para o sistema 1 e de 2,5 até 10,0

$\mu\text{g L}^{-1}$ para o sistema 2 para cada espécie de Hg estudada foram construídas no mesmo meio de preparo das soluções das amostras, a fim de minimizar diferenças entre as soluções e evitar uma possível interferência provocada pela matriz da amostra. Em seguida, curvas de calibração em uma faixa linear de 2,5 até 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os sistemas foram construídas no mesmo meio do preparo das soluções das amostras somente para a espécie inorgânica de Hg, para posterior leitura de soluções das amostras contendo adição simultânea das três espécies estudadas, a fim de determinar a quantidade de Hg total independente da espécie presente na amostra.

5. Resultados e Discussão

5.1 Otimizações das condições experimentais

Inicialmente, foi feito um estudo para avaliar o risco de explosão de uma solução inflamável, no caso, os meios alcoólicos, em contato com a radiação UV. Foram testadas concentrações que variaram de 5 a 50% com um tempo de exposição de 4,2 minutos, constatando-se que até a maior concentração estudada, não houve nenhum risco de explosão. Então, a concentração de 50% foi adotada para os posteriores estudos.

5.1.1 Efeito da concentração dos reagentes no preparo das amostras

Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como por exemplo, o ácido fórmico e o ácido acético, são comumente utilizados em estudos que envolvem a geração fotoquímica de vapor através da exposição à radiação UV, devido a uma elevada eficiência em gerar espécies voláteis [106]. Desta forma, as amostras de álcool combustível foram preparadas com a adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg provenientes de diferentes espécies, em meio de ácidos orgânicos com concentrações que variaram de 0,5 a 20 % v/v, avaliando dessa forma o efeito da concentração destes ácidos no sinal analítico de Hg.

Simultaneamente, este mesmo estudo foi realizado para amostras de álcool etílico bidestilado, com o objetivo de avaliar a melhor concentração, onde não haja discrepância entre os sinais analíticos obtidos na presença das soluções padrão e das amostras, com a finalidade de eliminar um possível efeito de matriz, possibilitando assim o uso da técnica de calibração padrão convencional.

A Figura 15 apresenta o estudo para avaliar o efeito da concentração do ácido fórmico no sinal de absorvância de soluções de álcool bidestilado ou álcool combustível, contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg preparado a partir do Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$. As medições foram realizadas utilizando o sistema 1 (photo-CV-AAS). Como se pode observar, há um aumento significativo do sinal analítico até a concentração de 2,5 % v/v de HCOOH para ambas as soluções e, nas concentrações mais elevadas, ocorre uma diminuição do sinal de absorvância e a partir de 4% v/v de

HCOOH pode-se verificar uma diferença no sinal para todas as espécies estudadas em ambos os meios alcoólicos.

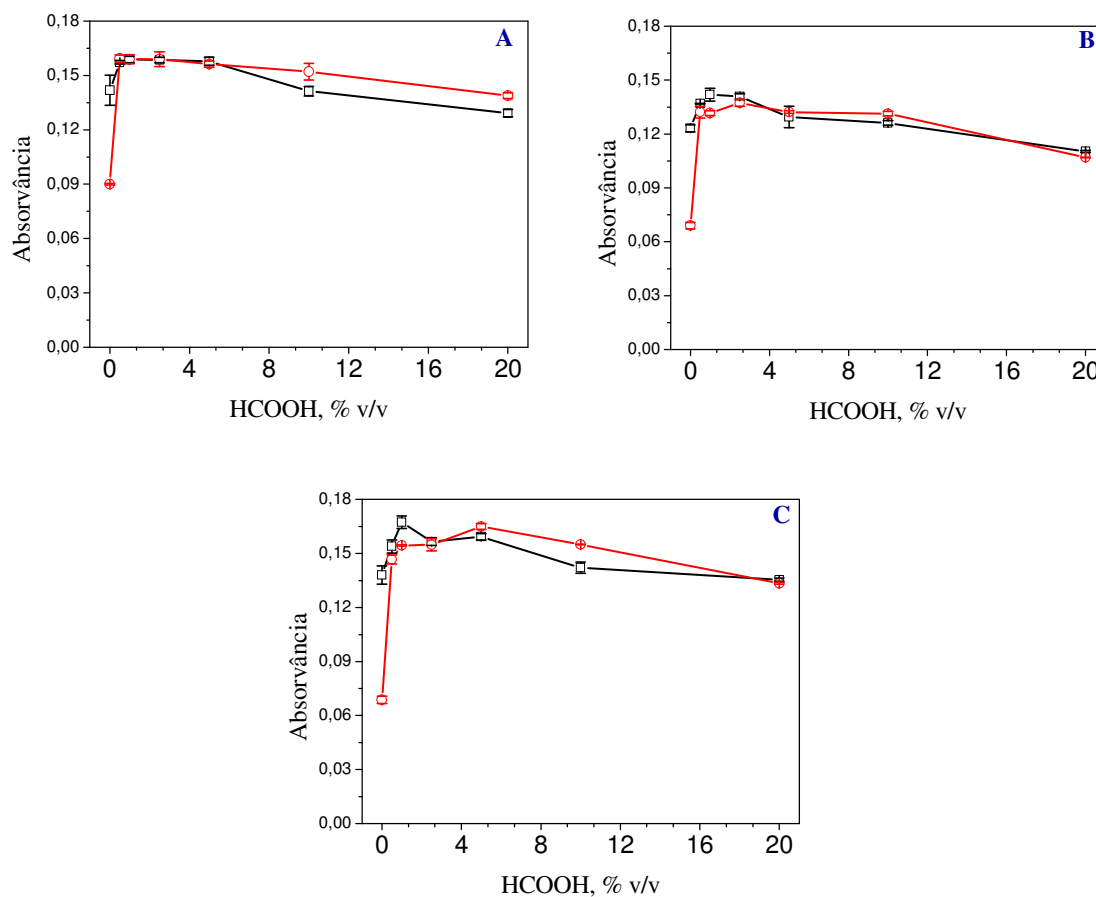


Figura 15 – Efeito da concentração do HCOOH no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (—○—) ou álcool combustível (—□—) contendo $10 \mu g L^{-1}$ de Hg a partir das espécies de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ ou (C) $CH_3CH_2Hg^+$.

O efeito da concentração do ácido acético no sinal de absorvância de Hg das soluções de álcool bidestilado e álcool combustível também foram avaliados e a Figura 16 apresenta os resultados obtidos. De acordo com a figura, um comportamento semelhante ao do HCOOH foi observado em ambas às soluções. No entanto, a concentração de 5 % v/v do reagente proporcionou um maior sinal de absorvância.

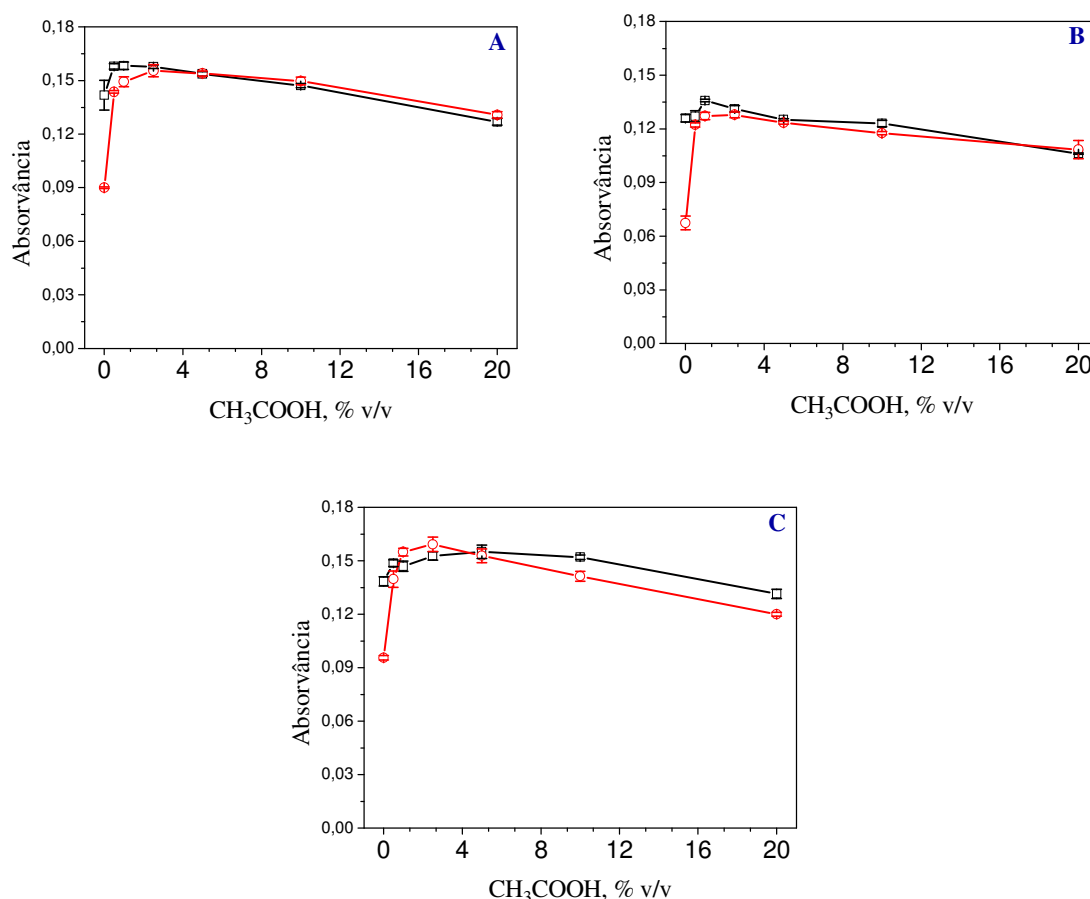


Figura 16 – Efeito da concentração do H₃CCOOH no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado (—○—) ou álcool combustível (—□—), contendo 10 µg L⁻¹ de Hg a partir das espécies de (A) Hg²⁺, (B) CH₃Hg⁺ ou (C) CH₃CH₂Hg⁺.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 15 e 16, fica evidente a eficiência do sistema para promover a geração fotoquímica de vapor de Hg⁰ utilizando a radiação UV, tanto a partir da espécie inorgânica quanto das espécies orgânicas de Hg em meio de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como evidenciado pelo fato de que o CH₃Hg⁺ e CH₃CH₂Hg⁺ são degradados pela quebra das ligações C-Hg seguido da posterior redução do Hg²⁺ a Hg⁰. Como pode se observar por este estudo, não houve uma separação ou diferença significativa nos sinais de absorvância das diferentes espécies de Hg. Sendo assim o reator fotoquímico utilizado não possibilitou realizar a separação das espécies de Hg (espeiação), uma vez que este foi projetado de tal forma que permitisse um elevado tempo de exposição da amostra à radiação UV, em canais construídos em quartzo com diâmetro interno de 2,4 mm, possibilitando assim, uma

elevada eficiência do sistema para a determinação de Hg total independente da espécie de Hg nas amostras. Desta forma, as concentrações de 2,5 % v/v de HCOOH e 5% v/v para o H₃CCOOH foram escolhidas e adotadas para os trabalhos subsequentes, uma vez que estas concentrações já foram suficientes para a obtenção de ótimos sinais de absorvância de Hg, com uso mínimo dos reagentes.

Também se pode perceber a eficiência do HCOOH em baixas concentrações para a redução das espécies de Hg, uma vez que este reagente é facilmente oxidado a CO₂ com formação mínima de intermediários, devido ao tamanho da sua cadeia carbônica [113]. A vazão de amostra fixada foi de 6,2 mL min⁻¹, a qual corresponde a 70 rpm de velocidade de rotação da bomba peristáltica e um tempo de exposição a radiação UV de 4,2 minutos, com uma vazão de fluxo de gás carreador de 70 mL min⁻¹ utilizando o sistema 1.

Foi possível observar também, de acordo com as Figura 15 e 16, que apenas utilizando o meio alcoólico, ou seja, sem adição de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, há formação de Hg⁰, porém com um sinal de absorvância menos intenso quando comparado com os sinais analíticos na presença destes reagentes. Este fato também é relatado por Han e colaboradores [114], onde na presença de alcoóis, aldeídos ou ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, há a conversão de Hg²⁺ a Hg⁰ utilizando apenas a radiação UV. No entanto, como pode ser verificado pelos nossos estudos, há uma resposta no sinal muito diferente entre o álcool combustível e o bidestilado quando não se usa os ácidos orgânicos, o que dificulta o procedimento de calibração. Para compreender melhor este efeito, um estudo foi realizado empregando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) e os espectros de massa obtidos são apresentados na Figura 17.

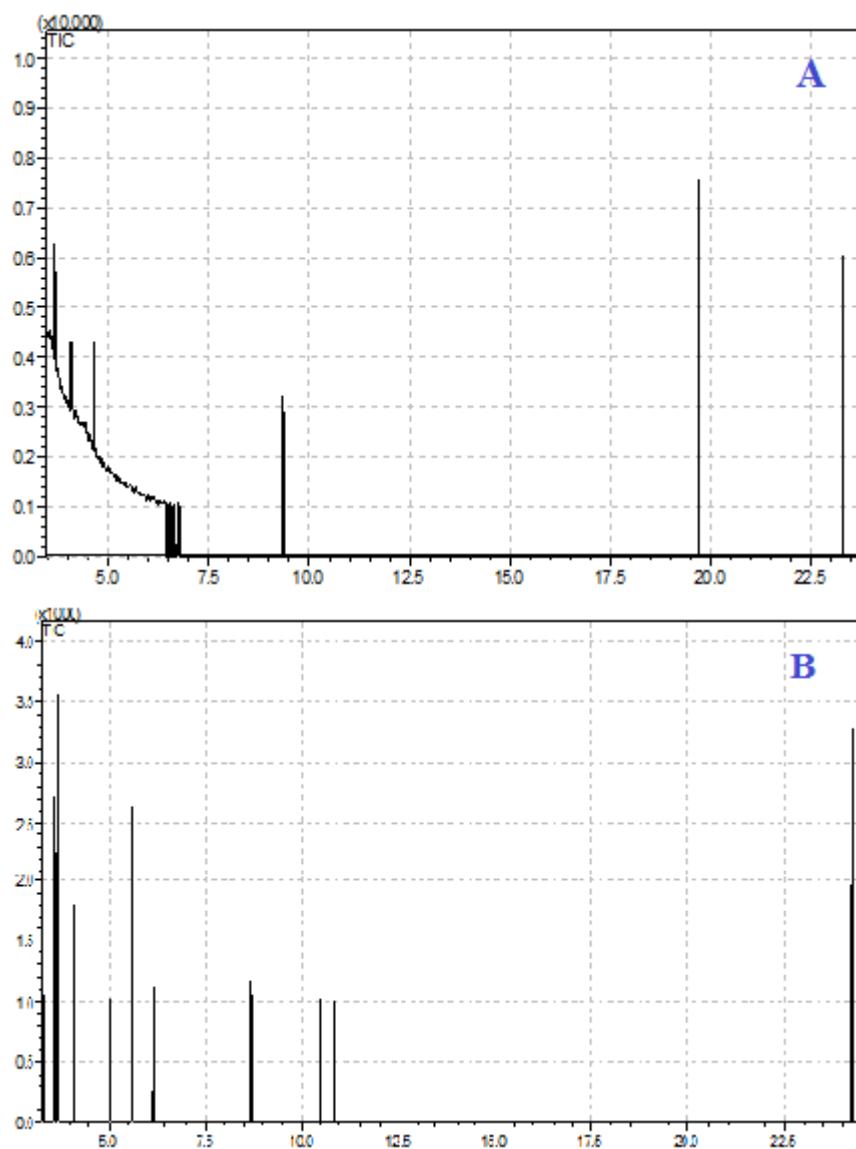


Figura 17 – Espectro de massas de (A) álcool bidestilado e (B) álcool combustível.

De acordo com o Espectro de Massas apresentado na Figura 17 não é possível a visualização do pico correspondente a massa característica do metanol em álcool combustível, devido ao programa de temperatura utilizado no procedimento de análise, o que acarretou na volatilização do mesmo. Porém, conforme Figura 18, a qual se trata de um cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID), é possível visualizar um pico característico do metanol, o qual se encontra antes do pico característico do etanol. Esse cromatograma pode ser comparado com um de referência, que foi retirado da literatura, em um trabalho desenvolvido por McCurry e colaboradores [115].

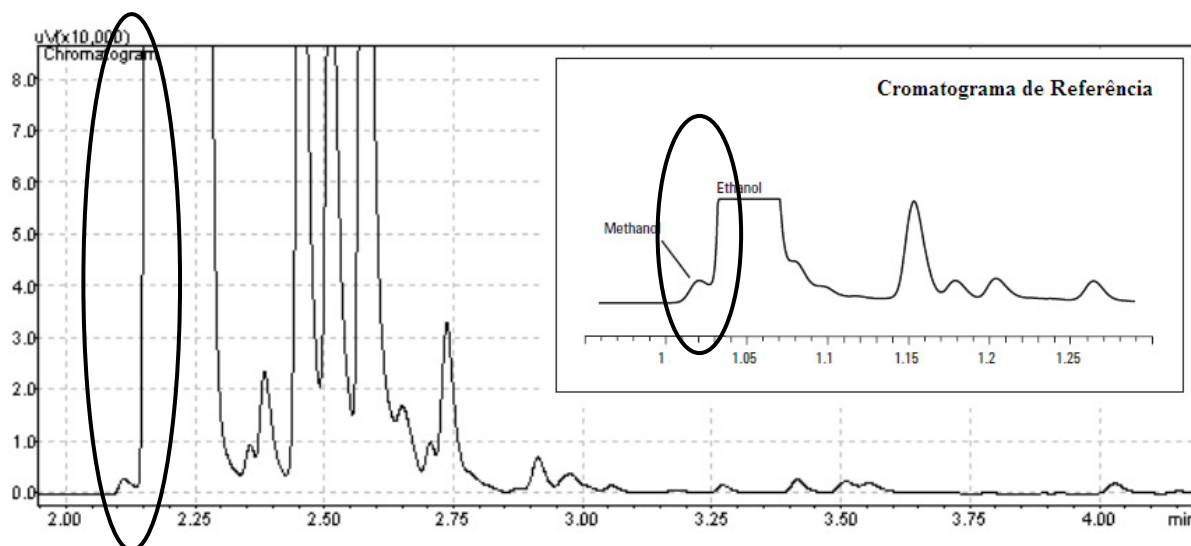


Figura 18 – Cromatograma da amostra de álcool combustível.

Pode se observar por este estudo que o álcool combustível apresenta outras espécies orgânicas em sua composição, como por exemplo, o metanol, que é uma espécie com pequena cadeia carbônica, o que também leva a formação de radicais e desta forma, aumenta a eficiência da geração fotoquímica de vapor, justificando assim, a obtenção dos maiores sinais de absorvância de Hg no álcool combustível frente ao álcool bidestilado na ausência os ácidos orgânicos de baixo peso molecular.

Ao considerar os dois sistemas utilizados no presente trabalho, o efeito da concentração dos reagentes no preparo das amostras foi fixado, pois este não depende dos diferentes sistemas utilizados, uma vez que o reator fotoquímico não foi alterado em ambos os sistemas, porém, as demais otimizações como efeito da vazão da amostra e efeito da vazão do gás carreador foram avaliados para cada sistema independentemente, como será discutido a seguir.

5.1.2 Efeito da vazão das soluções de amostra e padrão

5.1.2.1. Sistema 1

O tempo de residência da amostra no caminho do reator fotoquímico é considerado um parâmetro importante a ser otimizado, pois a quantidade de radiação UV recebida é que irá determinar a extensão da formação dos radicais produzidos, o que está diretamente relacionado à eficiência de redução das espécies de Hg. Sendo assim,

foi investigado o efeito do tempo de irradiação na resposta do sinal analítico para todas as espécies de Hg estudadas, através da mudança da vazão das soluções de amostra e padrão, ou seja, a velocidade de rotação da bomba peristáltica, levando em consideração também o comprimento do tubo de quartzo envolto no reator fotoquímico, onde o seu volume interno é de 26 mL. Para ambos os meios foram avaliados os tempos de irradiação variando conforme as velocidades de rotação da bomba peristáltica, os quais são apresentados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11 – Tempo de irradiação da amostra em função da velocidade da bomba peristáltica para o sistema photo-CV-AAS 1 usando o Tygon® de cor laranja/roxo/laranja com diâmetro interno de 2,62 mm.

Velocidade de rotação da bomba peristáltica (rpm)	Vazão da solução (mL min ⁻¹)	Tempo de radiação (min)
20	2,4	10,8
30	3,2	8,1
40	4,0	6,5
50	4,8	5,4
60	5,6	4,6
70	6,2	4,2

A bomba peristáltica possui uma velocidade regulável de 0 a 100 rpm, porém os estudos foram realizados até a velocidade de 70 rpm da bomba peristáltica, pois a partir desse valor, a velocidade não variava, permanecendo sempre constante, o que pode estar relacionado a problemas no controle elétrico da bomba peristáltica.

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos para o efeito da vazão da amostra no sinal de absorvância do Hg preparado a partir de Hg²⁺, CH₃Hg⁺ ou CH₃CH₂Hg⁺, na concentração de 10 µg L⁻¹, em soluções de álcool bidestilado e de álcool combustível, variando o tempo de exposição para todas as espécies estudadas em ambos os meios alcoólicos.

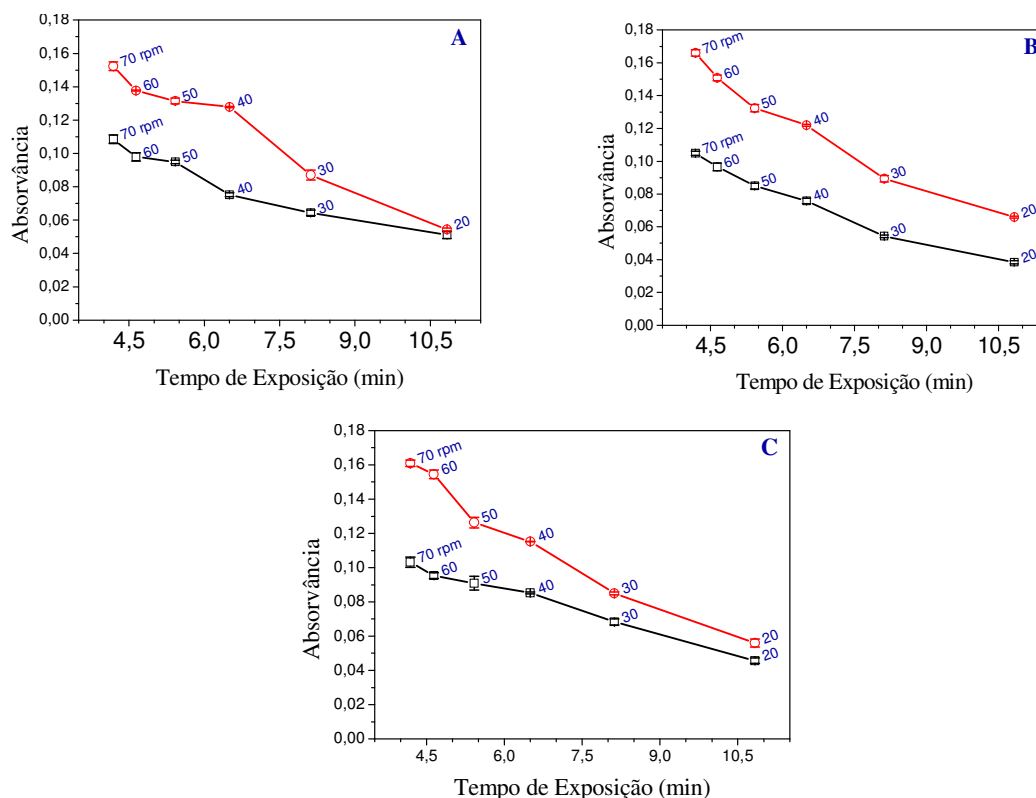


Figura 19 - Efeito da vazão da amostra no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado ($\square$) e de álcool combustível ($\circ$) contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg a partir das espécies de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ ou (C) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ para o sistema *photo*-CV-AAS 1 sem a presença dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular.

Através deste estudo, pode-se observar nos gráficos da Figura 19 que com o aumento da velocidade da bomba peristáltica, ou seja, a mudança da vazão da amostra e consequentemente do tempo de radiação, há um aumento proporcional da intensidade do sinal de absorvância para as espécies de Hg estudadas, o que deve estar associado a uma maior geração de radicais que são eficientes para promover a geração das espécies voláteis, o que reflete no aumento do sinal. Nesse sistema comercial utilizado, não há a possibilidade de controle da variação da vazão do gás carreador, que é fixa no aparelho em 70 mL min^{-1} . Além disso, a velocidade de rotação da bomba peristáltica não varia a partir de 70 rpm (tempo de radiação de 4,2 minutos e vazão da amostra de $6,2 \text{ mL min}^{-1}$), mesmo que o gerador permita o aumento dessa velocidade até 100 rpm. Sendo assim, estas condições foram selecionadas para os experimentos posteriores utilizando ambos os meios, tanto para o álcool bidestilado quanto para o álcool combustível.

5.1.2.2 Sistema 2

De modo similar ao sistema 1, porém utilizando uma bomba peristáltica com uma velocidade de rotação com maior precisão, o efeito da vazão da amostra foi reavaliado e os resultados deste estudo são apresentados na Figura 20. As velocidades de rotação desta bomba peristáltica e os respectivos tempos de exposição da amostra à radiação UV, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Tempo de radiação da amostra em função da velocidade da bomba peristáltica para o sistema photo-CV-AAS 2, usando o Tygon® de cor amarelo/azul/amarelo com diâmetro interno de 1,52 mm.

Velocidade de rotação da bomba peristáltica (rpm)	Vazão da solução (mL min⁻¹)	Tempo de radiação (min)
30	3,0	8,7
40	4,0	6,5
50	5,0	5,2
60	6,0	4,3
70	7,0	3,7
80	8,0	3,2
90	9,0	2,9
99	9,6	2,7

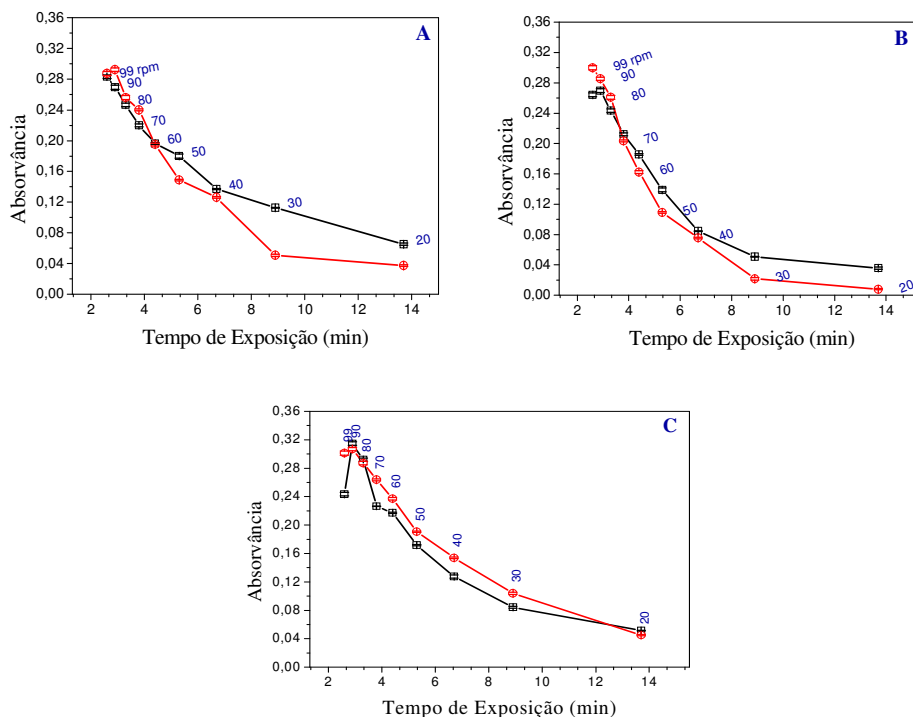


Figura 20 - Efeito da vazão da amostra no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado ($\square$) e de álcool combustível ($\circ$) contendo $10 \mu g L^{-1}$ de Hg a partir das espécies de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ ou (C) $CH_3CH_2Hg^+$ para o sistema *photo*-CV-AAS 2, sem a presença dos ácidos orgânicos.

Através da Figura 20, pode-se observar que, tanto em meio de álcool combustível como de álcool bidestilado, aumentando a velocidade de rotação da bomba peristáltica, ou seja, a mudança da vazão da amostra e, conseqüentemente do tempo de exposição à radiação UV, é produzido um proporcional aumento do sinal de absorvância para todas as espécies de Hg estudadas. Foram avaliados tempos de exposição à radiação UV variando entre 2,7 e 8,7 minutos, o que representa vazões entre $3,0$ a $9,6 mL min^{-1}$. Neste estudo, pode-se perceber que com uma velocidade de rotação de 90 rpm, há uma maior intensidade no sinal de absorvância. Porém, nesta velocidade, é necessário um maior tempo para a estabilização do sinal, levando assim, a um maior consumo de solução das amostras ($> 50 mL$).

Foi possível observar também que em uma faixa de velocidade de 40 a 70 rpm (tempo de radiação de 6,5 a 3,7 minutos), há uma pequena minimização da diferença de sinal entre as soluções contendo álcool bidestilado e álcool combustível para as espécies de Hg provenientes de Hg^{2+} , CH_3Hg e CH_3CH_2Hg . Isso se deve, possivelmente, ao fato de que os sinais analíticos foram registrados apenas em meio alcoólico, ou seja, sem a

adição de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, o que minimizaria ainda mais esta diferença de sinais em ambas as matrizes, conforme evidenciado pelo estudo realizado anteriormente e apresentado na Figura 16.

De um modo geral, como a vazão da amostra causa influência na taxa de processamento da amostra e consequentemente do vapor atômico do Hg levado até o separador gás/líquido, foi considerado o mesmo tempo de exposição para todas as espécies de Hg estudadas. Levou-se em conta também o tempo que o sinal leva para retornar a linha base, buscando aliar uma boa frequência analítica, livre do efeito de memória, uma vez que o analito pode ficar aderido ao longo do caminho da fase líquida ou de vapor, causando interferências nas leituras subsequentes. Desta forma, um tempo de radiação de 3,7 minutos, o que representa uma vazão da amostra de $7,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionado para os experimentos posteriores utilizando os dois ácidos orgânicos de baixo peso molecular estudados.

5.1.3 Efeito da vazão do gás carreador

5.1.3.1. Sistema 1

Outro parâmetro de extrema importância é a vazão do gás argônio como gás carreador, uma vez que este transporta o vapor frio gerado de Hg até a cela de absorção. No sistema comercial, como já mencionado, não há a possibilidade de variar esta vazão, sendo esta fixada pelo fabricante em 70 mL min^{-1} .

5.1.3.2. Sistema 2

No sistema 2, pode-se também acoplar um fluxômetro para o controle da vazão do gás utilizado para separação das fases no GLS, com posterior transporte dos vapores gerados pelo reator fotoquímico, e assim, permitir uma melhora no sinal analítico, visando obter um menor limite de detecção. A Figura 21 apresenta os resultados deste estudo para todas as espécies de Hg estudadas na presença de álcool combustível ou álcool bidestilado sem a presença de ácidos orgânicos.

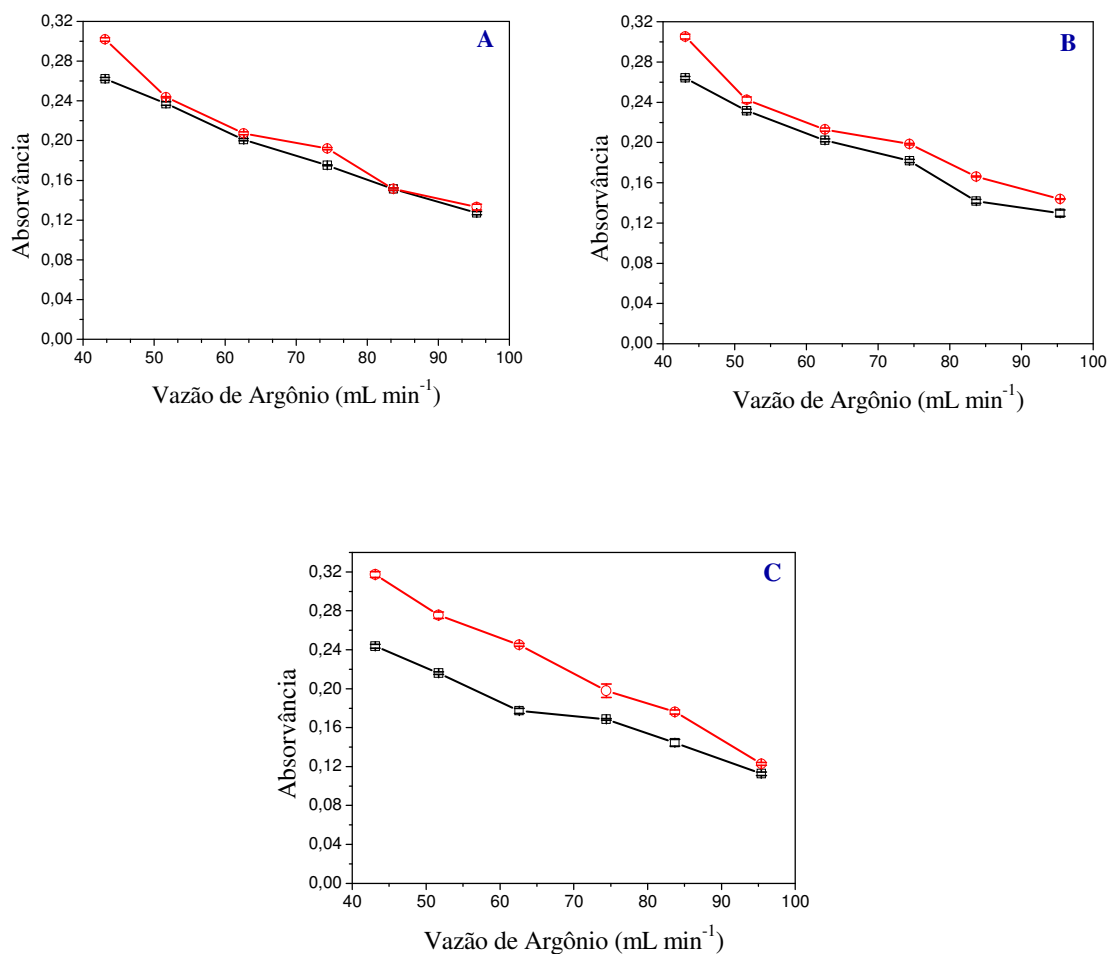


Figura 21 - Efeito da vazão do gás carreador no sinal analítico para soluções de álcool bidestilado ($\square$) e de álcool combustível ($\circ$) contendo $10\ \mu g\ L^{-1}$ de Hg a partir das espécies de (A) Hg^{2+} , (B) CH_3Hg^+ ou (C) $CH_3CH_2Hg^+$ para o sistema *photo*-CV-AAS 2, sem a presença dos ácidos orgânicos.

O sinal de absorvância mais intenso é observado com a vazão do gás carreador de $43,1\ mL\ min^{-1}$. No entanto, nesse ponto há a possibilidade do registro de efeito de memória devido a um maior tempo para o sinal voltar à linha base, prejudicando a frequência analítica. À medida que a vazão do gás é aumentada, o sinal de absorvância tende a diminuir para todas as espécies, a qual está relacionada com a diluição da nuvem atômica que chega até a cela de absorção, pois quanto maior a quantidade do gás argônio, mais diluído estará o analito e consequentemente, um menor sinal é registrado. Sendo assim, um fluxo de $51,7\ mL\ min^{-1}$ foi escolhido como uma condição adequada para a obtenção de um bom sinal analítico e com boa frequência analítica, sendo este adotado para os trabalhos posteriores com o sistema *photo*-CV-AAS 2.

5.2 Aplicação Analítica e Parâmetros de Mérito

A Tabela 13 apresenta um resumo dos parâmetros empregados com base nas orientações do fabricante do equipamento ou das condições instrumentais otimizadas que foram utilizadas durante as calibrações e análises.

Tabela 13 – Resumo dos parâmetros utilizados para os dois sistemas na determinação das espécies de Hg por photo-CV-AAS.

	Sistema 1	Sistema 2
Tempo de radiação (min)	4,2	3,7
Vazão das soluções (mL min ⁻¹)	6,2	7,0
Vazão do gás carreador (mL min ⁻¹)	70	51,7
Concentração de HCOOH (% v/v)		2,5
Concentração de CH ₃ COOH (% v/v)		5,0
Comprimento de onda (nm)		253,7
Largura da banda de resolução espectral (nm)		0,7
Corrente da lâmpada (mA)		4,0

Os parâmetros de mérito para a determinação de Hg total em amostras de álcool combustível utilizando o sistema de photo-CV-AAS estão apresentados na Tabela 14 para o Sistema 1 e na Tabela 15 para o Sistema 2, tanto para amostras em meio de HCOOH 2,5% v/v ou em CH₃COOH 5% v/v. As curvas de calibração para o Sistema 1 foram construídas com padrões de calibração a partir das espécies de Hg²⁺, CH₃Hg⁺ ou CH₃CH₂Hg⁺, em uma faixa linear de 5,0 a 20,0 µg L⁻¹ de Hg. As curvas de calibração para o Sistema 2 foram construídas com padrões de calibração em uma faixa linear de 2,5 a 10,0 µg L⁻¹ de Hg a partir das mesmas espécies.

Já as curvas de calibração para a determinação da mistura das três espécies estudadas em ambos os sistemas na presença dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular, foram construídas com uso do padrão de calibração de Hg²⁺ em uma faixa linear de 2,5 a 10,0 µg L⁻¹ e os parâmetros de mérito obtidos estão apresentados na Tabela 16. A idéia foi de calibrar o sistema somente com uma espécie de Hg, no caso a espécie inorgânica, que é a menos tóxica e não apresenta o efeito de bioacumulação no ser humano, e assim exemplificar que é possível determinar a concentração total de Hg

mesmo na presença de uma mistura de diferentes espécies de Hg, demonstrando a eficiência do reator fotoquímico em liberar o Hg ligado as espécies orgânicas e de reduzi-lo para a forma de Hg^0 .

Tabela 14 – Parâmetros de mérito para as curvas de calibração obtidas em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v, utilizando o sistema photo-CV-AAS 1.

	$a \text{ (L } \mu\text{g}^{-1})$	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
HCOOH 2,5 % v/v			
Hg^{2+}	0,0155	0,9978	0,20
CH_3Hg^+	0,0158	0,9986	0,12
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	0,0148	0,9986	0,19
CH₃COOH 5,0 % v/v			
Hg^{2+}	0,0156	0,9986	0,15
CH_3Hg^+	0,0166	0,9996	0,17
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	0,0168	0,9977	0,12

Tabela 15 – Parâmetros de mérito para curvas de calibração obtidas em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v utilizando o sistema photo-CV-AAS 2.

	$a \text{ (L } \mu\text{g}^{-1})$	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
HCOOH 2,5 % v/v			
Hg^{2+}	0,0219	0,9989	0,05
CH_3Hg^+	0,0216	0,9986	0,08
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	0,0210	0,9980	0,06
CH₃COOH 5% v/v			
Hg^{2+}	0,0216	0,9993	0,05
CH_3Hg^+	0,0205	0,9957	0,09
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	0,0204	0,9993	0,09

Tabela 16 – Parâmetros de mérito das curvas de calibração com Hg^{2+} em meio de etanol bidestilado 50,0 % v/v empregadas nas determinações das misturas de diferentes espécies de Hg adicionadas às soluções das amostras.

	a ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sistema Photo-CV-AAS 1			
HCOOH 2,5 % v/v	0, 0162	0, 9972	0,12
CH ₃ COOH 5,0 % v/v	0, 0162	0, 9998	0,10
Sistema Photo-CV-AAS 2			
HCOOH 2,5 % v/v	0, 0278	0, 9974	0,06
CH ₃ COOH 5,0 % v/v	0, 0273	0, 9998	0,10

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 14,15 e 16, de um modo geral foi possível obter boas linearidades nas faixas de trabalho avaliadas, tendo em vista que, nas condições utilizadas, todos os coeficientes de correlação linear (R) foram maiores que 0,99. Nos dois sistemas estudados, a sensibilidade foi independente da espécie de Hg utilizada para a calibração, apresentando sensibilidades muito próximas para as espécies inorgânica e orgânicas. Além disso, como era de se esperar, o sistema photo-CV-AAS 2, apresentou as melhores sensibilidades, com um incremento mínimo de 30%, em razão desse sistema não comercial permitir o controle da vazão do gás carreador e este atuar diretamente na concentração do vapor atômico dentro da cela de absorção.

O limite de detecção, LOD, foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão de dez medidas da solução do branco dividido pela sensibilidade da curva de calibração. Os LODs obtidos e apresentados nas tabelas mostram de uma forma geral valores próximos, com mesma ordem de grandeza nos diferentes meios estudados. No entanto, comparando-se os diferentes sistemas, verifica-se que o Sistema 2 apresenta uma maior sensibilidade e consequentemente a menores LODs, o que possibilitou a determinação das espécies de Hg em menores concentrações. Isso se deve ao fato também da melhora na eficiência de bombeamento da solução da amostra, pois a bomba peristáltica utilizada neste sistema apresentou melhor estabilidade do seu funcionamento durante a leitura, fornecendo um sinal analítico contínuo e uniforme, sem os típicos pulsos de bombeamento, comum nos sistema de FI, além da possibilidade que este sistema permitiu no controle da vazão do gás carreador.

Utilizando as condições otimizadas com as calibrações apresentadas nas tabelas 14,15 e 16, a exatidão das metodologias desenvolvidas foi avaliada através de testes de adição e recuperação de analito, uma vez que não está disponível material de referência certificado de álcool combustível para a determinação da concentração de Hg total. As validações foram então realizadas pela análise de amostras de álcool combustível de origem comercial obtidas em postos de abastecimento da cidade de Pelotas, fazendo uso de adições das espécies de Hg em concentrações de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg total para o Sistema 1 e adições de 2,5 a 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Sistema 2. Os resultados obtidos destes estudos são apresentados nas Tabelas 17,18, 19 e 20.

Tabela 17 – Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ em amostras de álcool combustível em meio de HCOOH 2,5 % v/v utilizando o sistema photo-CV-AAS 1 (n = 3).

Adição em $\mu\text{g L}^{-1}$ /Analito	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
5,00			
Hg^{2+}	5,01 $\pm$ 0,04	100	0,9
CH_3Hg^+	4,83 $\pm$ 0,07	97	1,4
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	5,26 $\pm$ 0,04	105	0,8
7,50			
Hg^{2+}	7,95 $\pm$ 0,12	105	1,4
CH_3Hg^+	7,49 $\pm$ 0,14	100	1,8
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	7,61 $\pm$ 0,02	101	0,2
10,0			
Hg^{2+}	10,1 $\pm$ 0,1	101	1,2
CH_3Hg^+	9,9 $\pm$ 0,1	99	0,7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	10,5 $\pm$ 0,1	105	1,2
20,0			
Hg^{2+}	20,2 $\pm$ 0,3	101	1,4
CH_3Hg^+	19,8 $\pm$ 0,1	99	0,5
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	20,7 $\pm$ 0,1	103	0,3

Tabela 18 – Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ em amostras de álcool combustível em meio de CH_3COOH 5,0 % v/v utilizando o sistema photo-CV-AAS 1 ($n = 3$).

Adição em $\mu\text{g L}^{-1}$ /Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) $\bar{x} \pm SD$	Recuperação (%)	RSD (%)
5,0			
Hg^{2+}	$4,88 \pm 0,09$	98	1,9
CH_3Hg^+	$5,15 \pm 0,05$	103	1,0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$4,96 \pm 0,04$	99	0,8
7,5			
Hg^{2+}	$7,72 \pm 0,15$	103	2,0
CH_3Hg^+	$7,13 \pm 0,08$	95	1,1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$7,57 \pm 0,03$	101	0,4
10,0			
Hg^{2+}	$9,8 \pm 0,2$	98	1,6
CH_3Hg^+	$10,0 \pm 0,3$	100	3,5
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$10,0 \pm 0,1$	100	1,2
20,0			
Hg^{2+}	$18,8 \pm 0,2$	94	1,0
CH_3Hg^+	$18,3 \pm 0,3$	91	1,5
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$19,2 \pm 0,8$	96	4,4

Tabela 19 – Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ em amostras de álcool combustível em meio de HCOOH 2,5 % v/v utilizando o sistema photo-CV-AAS 2 ($n = 3$).

Adição em $\mu\text{g L}^{-1}$ /Analito	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
2,50			
Hg^{2+}	$2,42 \pm 0,04$	97	1,5
CH_3Hg^+	$2,47 \pm 0,03$	99	1,2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$2,43 \pm 0,05$	97	2,0
5,00			
Hg^{2+}	$4,87 \pm 0,08$	97	1,7
CH_3Hg^+	$5,04 \pm 0,10$	101	1,9
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$4,96 \pm 0,04$	99	0,8
7,50			
Hg^{2+}	$7,56 \pm 0,03$	101	0,5
CH_3Hg^+	$7,51 \pm 0,13$	100	1,7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$7,62 \pm 0,05$	101	0,6

Tabela 20 – Resultados analíticos para os testes de adição e recuperação de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ em amostras de álcool combustível em meio de CH_3COOH 5,0 % v/v utilizando o sistema photo-CV-AAS 2 (n = 3).

Adição em $\mu\text{g L}^{-1}$ /Analito	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
2,50			
Hg^{2+}	$2,45 \pm 0,04$	98	1,5
CH_3Hg^+	$2,50 \pm 0,04$	100	1,8
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$2,49 \pm 0,04$	100	1,6
5,00			
Hg^{2+}	$5,14 \pm 0,03$	103	0,7
CH_3Hg^+	$4,94 \pm 0,05$	99	1,0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$4,91 \pm 0,04$	98	0,8
7,50			
Hg^{2+}	$7,53 \pm 0,08$	100	1,1
CH_3Hg^+	$7,76 \pm 0,25$	103	3,2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$	$7,49 \pm 0,02$	100	0,3

A fim de avaliar a eficiência da metodologia proposta para determinar a concentração de Hg total nas amostras de álcool combustível, testes de adição e recuperação de Hg proveniente de uma mistura contendo as três diferentes espécies foram realizados. Para este estudo, foi adicionada uma concentração igual de Hg proveniente do Hg^{2+} , CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ nas soluções de amostras de álcool combustível e a calibração dos sistemas foi feita com o uso do padrão inorgânico, no caso Hg^{2+} , preparado em meio de álcool bidestilado para os dois ácidos orgânicos estudados. Os resultados deste estudo estão apresentados nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 – Resultados para os testes de adição e recuperação no álcool combustível pela adição de misturas das diferentes espécies de Hg e calibração com padrão de Hg²⁺ em álcool bidestilado utilizando o sistema photo-CV-AAS 1 (n = 3).

Reagente/Hg adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
HCOOH 2,5 % v/v			
3,00	$3,03 \pm 0,01$	101	0,01
7,50	$7,57 \pm 0,21$	101	2,7
9,00	$9,17 \pm 0,26$	102	2,8
CH₃COOH 5,0 % v/v			
3,00	$2,99 \pm 0,03$	99	0,9
7,50	$7,52 \pm 0,10$	100	1,3
9,00	$8,89 \pm 0,01$	99	0,1

Tabela 22 – Resultados para os testes de adição e recuperação no álcool combustível pela adição de misturas das diferentes espécies de Hg estudadas e calibração com padrão de Hg²⁺ em álcool bidestilado utilizando o sistema photo-CV-AAS 2 (n = 3).

Reagente/Hg adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
HCOOH 2,5 % v/v			
3,00	$2,86 \pm 0,04$	95	1,5
6,00	$5,96 \pm 0,05$	100	0,9
9,00	$8,82 \pm 0,03$	98	0,4
CH₃COOH 5,0 % v/v			
3,00	$3,21 \pm 0,04$	107	1,3
6,00	$6,44 \pm 0,02$	107	0,3
9,00	$9,13 \pm 0,18$	102	2,0

Os resultados das tabelas anteriores mostram que o método proposto para a determinação de Hg total em amostras de álcool combustível é eficiente tanto para amostras tratadas com HCOOH como para CH₃COOH e independem da espécie de Hg presente na amostra, seja esta inorgânica ou orgânica. As porcentagens de recuperações foram semelhantes tanto no meio de preparo de amostra utilizando HCOOH 2,5 % v/v

ou no meio de CH_3COOH 5,0 % v/v, os quais através dos dois sistemas geradores de vapor frio de Hg mostraram-se como uma ótima alternativa para o controle de Hg total em álcool combustível, obtendo resultados reprodutíveis e confiáveis.

6. Conclusões

A Agência Nacional do Petróleo, que é o órgão regulador federal que estabelece os padrões do álcool combustível produzido e comercializado no país não especifica limites máximos de concentração para elementos de interesse ambiental como o Hg, talvez pela falta de uma metodologia confiável que permita um fácil controle deste contaminante para esse tipo de amostra. Isto mostra a importância do método desenvolvido para a determinação deste contaminante em baixas concentrações.

A redução fotoquímica através da exposição à radiação UV, combinada com a técnica de CV-AAS, foi aplicada com sucesso e mostrou-se como uma ótima alternativa para o controle de espécies de Hg em amostras de álcool combustível. Para ambos os reagentes empregados, resultados satisfatórios foram obtidos, devido a eficiência na redução das espécies tanto inorgânica quanto orgânica (CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) do analito para Hg^0 .

Além disso, a metodologia proposta não requer um tratamento extensivo da amostra, e elimina a necessidade do uso de agentes redutores instáveis e caros, quando comparada com o sistema de geração química de vapor convencional, promovendo assim a química verde, devido à redução de reagentes nocivos à saúde e ao meio ambiente. Além disso, fica evidente a possibilidade da determinação de Hg total nas amostras de álcool combustível estudadas, visto que, não há a possibilidade da realização de possíveis estudos de fracionamento do respectivo metal devido à eficiência do sistema para a redução tanto de espécies inorgânicas como de espécies orgânicas.

Certamente, o método desenvolvido poderá ser melhorado ainda mais com o uso de etapas de pré-concentração com sistemas de amálgama com colunas de Au, ou ainda com o acoplamento a técnicas mais sensíveis, como por exemplo, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Referências Bibliográficas Gerais

- [1] Silva, C.; Monteiro, M.L.G.; Ribeiro, R.O.R.; Guimarães, C.F.M.; Mano, S.B.; Pardi, H.S.; Mársico, E.T.; Presença de aditivos conservantes (nitrito e sulfito) em carnes bovinas moídas, comercializadas em mercados varejistas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 16-1, **2009**, 33-36.
- [2] Decisão da Comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias L221/8-36 de 17/08/2002*.
- [3] Duailibi, J. “Sem jeitinho: Exigências europeias para importar carne brasileira expõem a importância de se adequar à regra do jogo. Outros setores já fizeram isso. *Revista Veja* 2050, **2008**.
- [4] Santos L.V.; Palmeira, E.M. Exportações gaúchas de carne bovina processada para os EUA. *Revista Americana de Economia*, 71, **2006**, 1-12.
- [5] Mendes, C.; Levy, F.; Marques, M.; Montalvão, R. *Fast foods* oferecem opções mais saudáveis, *Revista Eclética*, Janeiro/Junho, **2006**, 34-37.
- [6] Siffert Filho, N.; Faveret Filho, P. O Sistema Agroindustrial de Carnes: Competitividade e Estruturas de Governança, site acessado em 28 de outubro de 2010. (http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev1012.pdf)
- [7] Orientação sobre validação de métodos de ensaios Químicos, documento de caráter orientativo publicado pelo Instituto Nacional de Metrologias, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) em junho de 2007 (DOQ-CGCRE-008).

- [8] Nascimento, R.; Campagnol, P.C.B.; Monteiro, E.S.; Pollonio, M.A.R.; Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsichas. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 18-3, **2007**, 297-302.
- [9] Sobrinho, A.G. S.; Zeola, N.M.B.L.; Souza, H.B. A; Lima, T.M.A., Qualidade da carne ovina submetida ao processo de salga, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24-3, **2004**, 369-372.
- [10] Furtado, S.M.B.; Shimokomaki, S.; Romanelli, P.F.; Rodrigues-Awaya, D.B. Avaliação da qualidade da carne caprina salgada. *Higiene Alimentar*, 5- 18, **1991**, 34-38.
- [11]<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html#3.2>
acessado em outubro de **2010**.
- [12] Zipser, M. W., Kwon, T. W., & Watts, B. M. Oxidative changes in cured and uncured frozen cooked pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 1964, 105–109.
- [13] Sofos, J. N. Use of phosphates in low-sodium meat products, *Food Technology*, 40, 9, **1986**, 52-64.
- [14] Sebranek, J. G. Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications, Chapter 1, **2009**, 6-21.
- [15] Abreu, V. Redução de Sal, *BioNews*, 1, **2008**, 1-2.
- [16] Collated information on salt reduction in the EU, **2008**.
http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/compilation_salt_en.pdf, acessado em outubro de 2010.
- [17] Pearson, A. M. & Wolzak, A. M. Salt- Its use in animal products-A human health dilemma, *Journal of Animal Science*, 54, **1982**, 1263-1278.

- [18] Aliño, M.; Grau, R.; Toldrá, F.; Blesa, E.; Pagán, M.J. ;Barat, J.M. Physicochemical properties and microbiology of dry-cured loins obtained by partial sodium replacement with potassium, calcium and magnesium. *Meat Science*, 85, **2010**, 580-588.
- [19] Anderson, J., Young, L.; Long, E. Potassium and Health, *Food and Nutrition series*, n° 9.355, **2008**.
- [20] Guo, P., Guerrero, L., Gelabert, J., & Arnau, J. Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin. *Meat Science*, 42-1, **1996**, 37–48.
- [21] King, A. J., & Earl, L. A. (1988). Effect of selected sodium and potassium salts on TBA values of dark meat turkey patties. *Journal of Food Science*, 53, **1988**, 723.
- [22] Romans, J. R., Costello, W. J., Carlson, C. W., Greaser, M. L., & Jones, K.W. The meat we eat ,14 th ed. Danville, IL: Interstate Publishers, **2001**.
- [23] Desmond, E. Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, **2006**, 188–196.
- [24] Ruusunen, M.; Puolanne, E. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, **2005**, 531–541.
- [25] Varnam, A.H.; Sutherland, J.P.; Meat and meat products technology, chemistry and microbiology. *Meat Science*, 43-1, **1995**.
- [26] Ordañez, J.A. Tecnologia de Alimentos : Alimentos de Origem animal, Volume 2, Porto Alegre: Artmed, **2005**.
- [27] Oliveira, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 14, **2003**, 174–182.
- [28] Krug, F.J. Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Capítulo 5, **2008**, 141-156.

- [29] Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Silva, A. F.; Borges, D. G.; Welz, B.; Heitmann, U.; Curtius, A. J. Determination of cobalt in biological samples by linesource and high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, **2005**, 693-698.
- [30] Dittert, I.M.; Borges, D.L.G.; Welz, B.; Curtius, A.J.; Becker-Ross, H. Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling, *Microchimica Acta* 167, **2009**, 21-26.
- [31] Borges, D.L.G.; Silva, A.F.; Curtius, A.J.; Welz, B.; Heitmann, U. Determination of Lead in Coal Using Direct Solid Sampling and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Microchimica Acta*, 154, **2006**, 101–107.
- [32] Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J. ;Pozebon, D. Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchemical Journal*, 64, **2000**, 105-110.
- [33] Ribeiro, A. S.; Moretto, A. L.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S. Analysis of powdered coffee and Milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchimica Acta*, 141, **2003**, 149-155.
- [34] 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. *Revista Analytica*, 28, **2007**, 58-65.
- [35] Torres, D. P.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J. Determination of inorganic and total Mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20, **2005**, 289-294.

- [36] Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; Sousa, R. A.; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B*, 61, **2006**, 465-495.
- [37] Walsh, A., The application of atomic absorption spectra to chemical analysis, *Spectrochimica. Acta Part B*, 7, **1955**, 108 – 117.
- [38] Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rded., Wiley-VCH, Weinheim, New York, **1999**.
- [39] Borges, D. L. G.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Heitmann, U. Fundamentos de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. *Revista Analytica*, 18, **2005**, 58-67.
- [40] Heitmann, U.; Schütz, M.; Becker-Ross, H.; Florek, S. Measurements on the Zeeman splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. *Spectrochimica Acta Part B*, 51, **1996**, 1095-1105.
- [41] Takase, I.; Pereira, H. B.; Luna, A. S.; Grinberg, P.; Campos, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova*, vol. 25- 6B, **2002**, 1132-1144.
- [42] Krug, F.J.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica – Parte 1 – Fundamentos e Atomização com chama, Julho, **2004**, 1-39.
- [43] Holler, F.J.; Skoog, D.A.; Crouch, S.R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6º edição, Porto Alegre: Bookman, **2009**.
- [44] Higson, S.P.J. *Química Analítica*, São Paulo: McGraw-Hill, **2009**.
- [45] Bond, A. M., & Canterford, D. R. Interference of lithium in atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, 43, **1971**, 134-135.

- [46] Beaty, R.D.; Kerber, J.D. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry, The Perkin-Elmer corporation, Norwalk, CT, Estados Unidos, **1993**.
- [47] Okumura, F.; Cavaleiro, E.T.G.; Nóbrega, J.A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica, *Química Nova*, 27-5, **2004**, 832-836.
- [48] Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K. *Vogel: Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., LTC: Rio de Janeiro, **2002**.
- [49] 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. *Spectrochimica Acta Part B*, 62, **2007**, 1037-1045.
- [50] Sriver, C., Kan, M., Willie, S., Soo, C., & Birnboim, H. Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP-AES. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, **2005**, 1460-1466.
- [51] Lücker, E. ; Schuierer, O. Sources of error in direct solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry analyses of biological samples with high water content, *Spectrochimica Acta Part B*, 51, **1996**, 201-210.
- [52]<http://www.food.gov.uk/multimedia/spreadsheets/salttargets20102012.xls>, acessado em novembro/2010.
- [53]ANVISA http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm, acessado em novembro/**2010**.
- [54] Jesus, A.; Zmozinski, A.V.; Barbará, J.A.; Vale, M.G.R.; Silva, M.M. Determination of Calcium and Magnesium in Biodiesel by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Microemulsions as Sample Preparation. *Energy Fuels*, 24, **2010**, 2109–2112.

- [55] Tormen, L.; Chaves, E. S.; Saint’Pierre, T. D.; Frescura, V. L. A. and Curtius, A. J. Determination of trace elements in fuel ethanol by ICP-MS using direct sample introduction by a microconcentric nebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, **2008**, 1300-1304.
- [56] Meher, L.C.; Sagar, V.; Naik, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10, **2006**, 248–268.
- [57] Abrantes, R.; Assunção, J.V.; Pesquero, C.R.; Bruns, R.E.; Nóbrega, R.P. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from gasohol and ethanol vehicles. *Atmospheric Environment*, 43, **2009**, 648–654.
- [58] Saint’Pierre, T.; Aucélio, R.Q.; Curtius, A.J. Trace elemental determination in alcohol automotive fuel by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal* 75, **2003**, 59–67.
- [59] Agarwal, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science* 33, **2007**, 233-271.
- [60] <http://www.anp.gov.br/?id=470>. Acessado em 15/12/2010.
- [61] Cerra, A. L.; Maia, J. L.; Filho, A. G. A. *Projetos locais de desenvolvimento no contexto das cadeias de suprimento de montadoras de motores veteranas e entrantes. Gestão de Produção*, 14-3, **2007**, 505-519.
- [62] Joseph Jr., H. *Veículos “flex-Fuel”*. Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA), **2004**.
- [63] Teixeira, E. C. *O desenvolvimento da tecnologia flex-fuel no Brasil*. Instituto DNA Brasil. São Paulo, **2005**.

- [64] Ambrozin, A. R. P.; Monteiro, M. R.; Santos, A. O. e Kuri, S. E. Evaluation of galvanic corrosion of a Zn alloy in alcohol fuel. *Fuel Processing Technology*, 91, **2010**, 1687-1690.
- [65] Pereira, E. A. Tavares, M.F.M.; Stevanato, A. Cardoso, A.A. Avaliação de contaminantes inorgânicos e orgânicos em álcool combustível utilizando eletroforese capilar, *Química Nova*, 29-1, **2006**, 66-71.
- [66] Alves, V.N.; Mosquetta, R.; Coelho, N.M.C.; Bianchin, J.N.; Di Pietro Roux, K.C.; Martendal, E.; Carasek, E. Determination of cadmium in alcohol fuel using Moringa oleifera seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS, *Talanta* 80, **2010**, 1133–1138.
- [67] Oliveira, M.F Adelir; Saczk, A.; Okumura; Stradiotto, N.L. Determination of zinc in fuel alcohol by anodic stripping voltammetry. *Eclética Química*, 27, **2002**, n° especial.
- [68] Lynd, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*, 21, **1996**, 403-465.
- [69] Wheals, A.E.; Basso, L.C.; Alves, .D.M.G.; Amorim, H.V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, 17, **1999**, 482-487.
- [70] Asfar, K.R.; Hamed, H. Combustion of fuel blends. *Energy Conversion and Management* 39, **1998**, 1081-1093.
- [71] Macedo, I.C. Greenhouse gas emissions and energy balances in bioethanol production and utilization in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, 14, **1998**, 77-81.
- [72] Rosillo-Calle, F.; Cortez, L.A.B. Towards ProAlcool II – A review of the Brazilian bioethanol programme. *Biomass and Bioenergy*, 14, **1998**, 115-124.

- [73] Munoz, R.A.A; Angnes, L. Simultaneous determination of copper and lead in ethanol fuel by anodic stripping voltammetry. *Microchemical Journal*, 77, **2004**, 157-162.
- [74] Bergamini, M.F.; Vital, S.I.; Santos, A.L.; Stradiotto, N.R. Determinação de chumbo em álcool combustível por voltametria de redissolução anódica utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com resina de troca iônica Amberlite IR 120. *Eclética Química*, São Paulo, 31-2, **2006**, 45-52.
- [75] Seinfeld, J.H.; Pandis, S. N.; Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change, Wiley: New York, **1998**.
- [76] Santos, D.S.S.; Korn, M.G.A.; Guida, M.A.; Santos, G.L.; Lemos, V.A.; Teixeira, L.S.G. Determination of Copper, Iron, Lead and Zinc in Gasoline by Sequential Multi-Element Flame Atomic Absorption Spectrometry after Solid Phase Extraction, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 00-00, **2010**, 1-6.
- [77] Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – Resolução ANP Nº 36, DE 6.12.2005 - DOU 7.12.2005. www.anp.gov.br, acessado em 16/12/2010.
- [78] Polss, P. What additives do for gasoline? *Hydrocarbon Processing* fev. 61-68, **1973**.
- [79] Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L.; Amyot, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics*. 29, **1998**, 543-466.
- [80] Micaroni, R. C. C. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, 23-4, **2000**, 487-495.
- [81] Lacerda, L.D.; Santos, A.F.; Marins, R.V.; Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. *Química Nova*, 30-2, **2007**, 366-369.

- [82] Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M. Metais: gerenciamento da toxicidade – São Paulo: Editora Atheneu, **2003**.
- [83] Souza, J. R.; Barbosa, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Química Nova na Escola*, 12, **2000**, 3-7.
- [84] Azevedo, F.A.; Toxicologia do mercúrio. Fausto Antonio de Azevedo – São Carlos: RiMa, São Paulo: InterTox, **2003**.
- [85] Wong, J.H.; Park, J.Y.; Lee, T.G. Mercury emissions from automobiles using gasoline, diesel, and LPG. *Atmospheric Environment*, 41, **2007**, 7547–7552.
- [86] Brandão, G. B.; Campos, R.C.; Luna, A.S. Determination of mercury in gasoline by cold vapor atomic absorption spectrometry with direct reduction in microemulsion media. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, **2005**, 625 – 631.
- [87] Liang, L.; Horvat, M.; Danilchik, P. A novel analytical method for the determination of pictogram levels of total mercury in gasoline and other petroleum based products, *Science of the Total Environment*, 187,**1996**, 57–64.
- [88] Aranda, P.R.; Pacheco, P.H.; Olsina, R.A.; Martinez, L.D.; Gil, R.A. Total and inorganic mercury determination in biodiesel by emulsion sample introduction and FI-CV-AFS after multivariate optimization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, **2009**, 1441–1445.
- [89] Torres, D.P.; Dittert, I.M.; Hohn, H.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Determination of mercury in gasoline diluted in ethanol by GF AAS after cold vapor generation, pre-concentration in gold column and trapping on graphite tube. *Microchemical Journal*, 96, **2010**, 32–36.
- [90] Boening, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review, *Chemosphere*, 40, **2000**, 1335-1351.

- [91] Nascimento, E. S.; Chasin, A. A. M. *Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos*, *Caderno de referência ambiental*, vol. 1, Editora Centro de Recursos Ambientais, Salvador, **2001**.
- [92] Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. *Química Nova*, 27- 4, **2004**, 593-600.
- [93] Akagi, H.; Malm, O.; Branches, F. J. P.; Kinjo, Y.; Kashima, Y.; Guimaraes, J. R. D.; Oliveira, R. B.; Haraguchi, K.; Pfeiffer, W. C.; Takizawa, Y.; Kato, H. *Water, Air, and Soil Pollution*, 80, **1995**, 85-94.
- [94] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Bioquímica*, 6^a ed. Editora Guanabara Koogan, **2008**.
- [95] Korn, M. G. A.; Santos, D.S.S.; Welz, B.; Vale, M.G.R.; Teixeira, A.P.; Lima, D. C.; Ferreira, S.L.C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. *Talanta* 73, **2007**, 1-11.
- [96] Amorim, F. A.C.; Lobo, I. P.; Santos, V. L. C. S.; Ferreira, S. L. C.; *Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares*, *Química Nova*, 31-7, **2008**, 1784-1790.
- [97] Dedina, J.; Tsalev, D.L, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Sons, 1st ed., Chichester , UK, **1995**.
- [98] Vieira, M. V.; Ribeiro, A. S. ; Curtius, A. J. Geração Química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. *Revista Analytica*, n° 09, Fevereiro/ Março, **2004**, 30.
- [99] Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Sturgeon, R. E. Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, **2007**, 837-847.

- [100] Sturgeon, R.E.; Mester, Z. Analytical Applications derivatives, *Applied Spectroscopy*, 56, **2002**, 202A-213A.
- [101] Mond, L.; Langer, C.; Quincke, F. Action of Carbon Monoxide on Nickel, *Journal of Organometallic Chemistry*, 383, **1990**, 1-5.
- [102] Guo, X.; Sturgeon, R.E.; Mester, Z.; Gardner, G.J. UV photosynthesis of nickel carbonyl, *Applied Organometallic Chemistry*, 18, **2004**, 205-211.
- [103] Sanz Medel, A. Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. *Pure Applied Chemistry*, 70, **1998**, 2281.
- [104] Capote, F.P.; Castro, M.D.L. Ultrasound in analytical chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, **2007**, 249.
- [105] Río-Segade, S.; Bendicho, C. Slurry sampling combined with ultrasonic pretreatment for total mercury determination in samples containing inorganic and methylmercury by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, **1999**, 1907-1912.
- [106] Golimowski, J. and Golimowska, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 325, **1996**, 111-133.
- [107] Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R. O Uso de Radiação Ultravioleta para o Pré-Tratamento de Amostras em Análise inorgânica. *Química Nova*, 26 – 6, **2003**, 913-921.
- [108] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J. UV Vapor Generation for Determination of Selenium by Heated Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75, **2003**, 2092-2099.
- [109] He, Y.; Hou, Xiandeng. ; Zheng, Chengbin.; Sturgeon, R.E.; Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, **2007**, 769–774.

- [110] Maria Eliza Nagel Hassemer, *Oxidação Fotoquímica - UV/H₂O₂ - para degradação de poluentes em efluentes da indústria têxtil*. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina, **2006**.
- [111] Zheng, C.; Li, Y.; He, Y.; Ma, Q.; Hou, X.; Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20, **2005**, 746-750.
- [112] Madden J.T.; Fitzgerald, N.; Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. *Spectrochimica Acta Part B*, 64, **2009**, 925–927.
- [113] Tan, T.; Beydoun, D.; Amal, R. Effects of organic hole scavengers on the photocatalytic reduction of selenium anions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 159, **2003**, 273-280.
- [114] Han, C.; Zheng, C.; Wang, J.; Cheng, G.; Lv, Y.; Hou, X. Photo-induced cold vapor generation with low molecular weight alcohol, aldehyde, or carboxylic acid for atomic fluorescence spectrometric determination of mercury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, **2007**, 825–830.
- [115] McCurry, J.D. Fast determination of denatured fuel ethanol purity by two-dimensional gas chromatography. *Agilent Technologies*, **2003**.