

4 PARTE EXPERIMENTAL

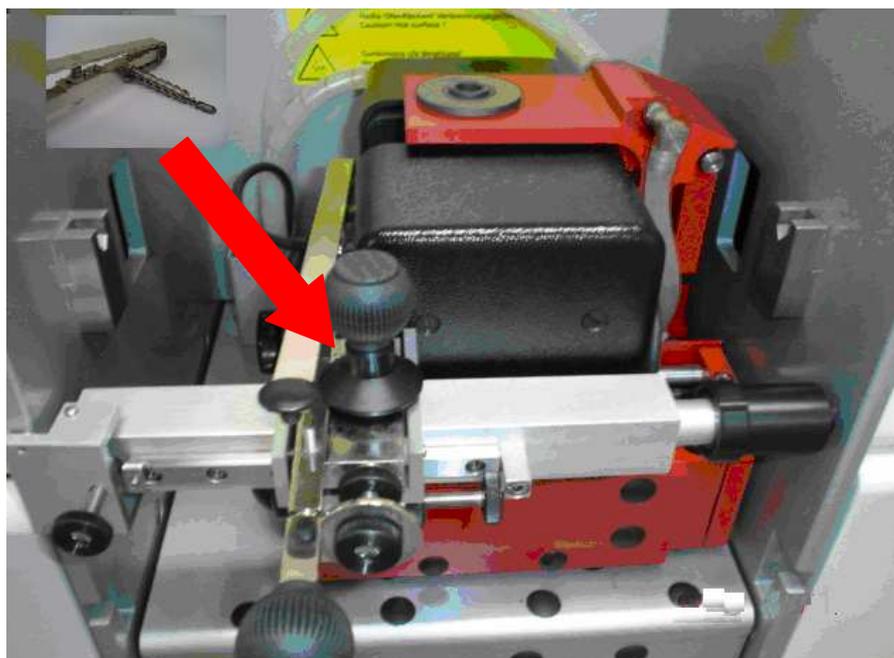
4.1. Instrumentação

4.1.1 Espectrometria de absorção atômica no forno de grafite (GF AAS)

As medidas instrumentais foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica Zeenit 60 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), com aquecimento transversal, acoplado a um amostrador de sólidos modelo SSA6Z para a introdução da amostra (figura 2). Como fonte primária foram utilizadas lâmpadas de cátodo ôco de Ni (VWR Scientific cat n° 58137-452, USA) e de Cu (Analytik Jena, cat. n° 450.014, Alemanha). No caso do Cu, a linha utilizada foi a de 324 nm, e a corrente foi de 2 mA. Já para o Ni, o comprimento de onda utilizado foi de 232 nm, e a corrente de operação foi de 5 mA. Foram usados tubos de grafite de contato integrado sem plataformas (Analytik Jena 407-152.013) e plataformas de grafite específicas para a análise de sólidos (Analytik Jena, cat. n° 407-152.023, Alemanha). As medidas foram sempre realizadas em absorvância integrada (área do sinal), e os resultados apresentados foram a média de pelo menos três medidas.



(a)



(b)

Figura 3. (a) Amostrador de sólidos acoplado ao Espectrômetro de Absorção Atômica com forno de grafite (b) Plataforma presa no amostrador de sólidos.

4.1.2.

Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS)

Um espectrômetro de fluorescência atômica modelo PS Analytical Millennium Excalibur (Kent, Reino Unido) foi utilizado para a detecção de As, Sb, Bi, Se e Te (figura 3). Como fontes de excitação foram utilizadas lâmpadas de cátodo ôco com excitação secundária de As, Sb, Bi, Se e Te, todas elas Photron (Victoria, Austrália). Fazem parte do sistema um filtro específico para minimizar a radiação de espalhamento que alcança o detector e uma membrana Perma Pure, para a secagem do hidreto que alcança o atomizador.

O funcionamento deste espectrômetro baseia-se no bombeamento contínuo de uma solução de redutor, de uma solução carreadora e da amostra ou branco, que confluem para a bobina de reação. Uma válvula eletronicamente controlada permite alternar entre o branco e a amostra, e o bombeamento das soluções é realizado por duas bombas peristálticas. Os hidretos que se formam são separados da fase aquosa no separador gás-líquido e arrastados por um fluxo de argônio até o sistema de secagem Perma Pure (PS Analytical, cat n° H003S001), onde o vapor de água é separado. Este sistema de secagem consiste de dois tubos concêntricos, de 24 cm de comprimento, ligados mediante peças em forma de T, como se mostra na figura 4. O tubo interior é uma membrana higroscópica de Nafion e o tubo externo é fabricado em PTFE. Ao passar ao longo da membrana, o gás úmido proveniente do separador gás-líquido perde a umidade, pois o vapor de água se transfere ao tubo externo. O gás de secagem (ar) entra de forma perpendicular e em contracorrente, secando a superfície externa da membrana. Assim secos, os hidretos são carreados pelo argônio, atingem o atomizador, que consiste de uma chama de difusão de hidrogênio e argônio, sendo o hidrogênio proveniente da própria reação decomposição do tetrahidroborato de sódio ao entrar em contato com o meio ácido. Este tipo de chama é um atomizador ideal, pois não emite abaixo de 300 nm, no entanto, tem emissões entre 305 e 325 nm devidas aos radicais OH, que podem ser detectadas pelo fotomultiplicador. Os átomos formados são então excitados pela radiação proveniente da fonte de excitação, e o sinal de fluorescência atinge o fotomultiplicador e é registrado. Observa-se que o filtro multirefletor isola o comprimento de onda do analito e reduz as emissões devidas à chama que alcançam o detector. Para evitar que ao detector chegue emissão procedente da lâmpada este, se situa a 90° respeito a ela (figura 5).

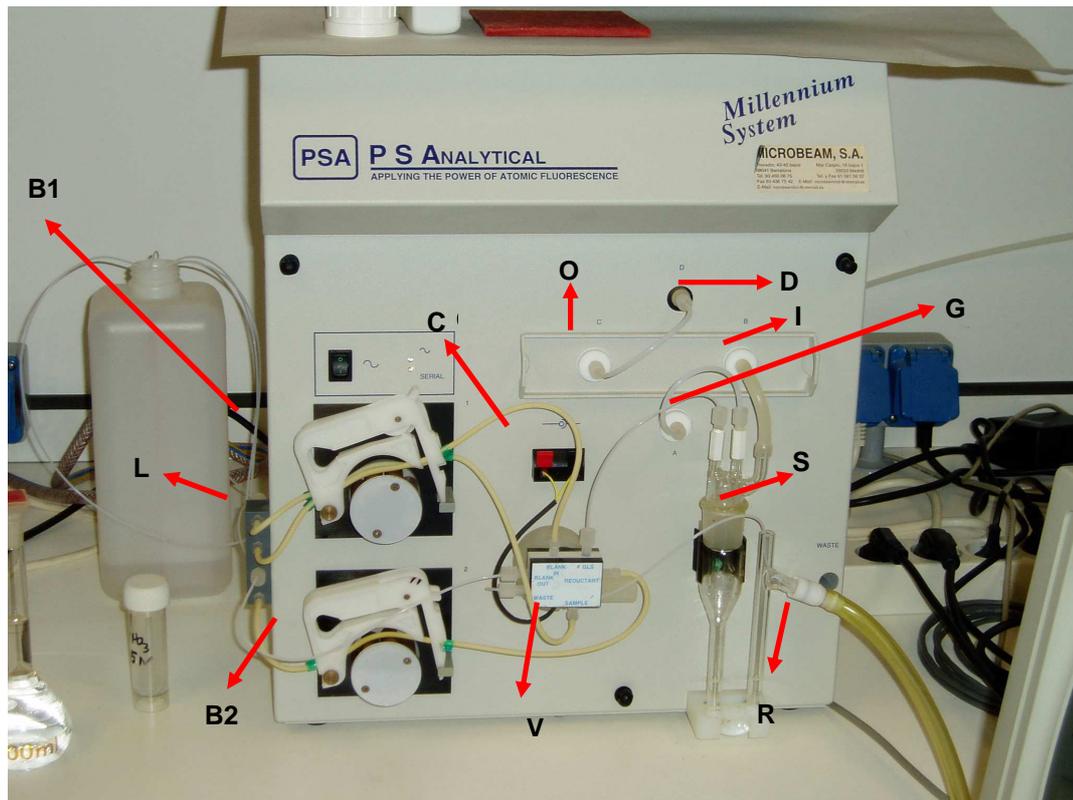


Figura 4. Espectrômetro de Fluorescência Atômica: **B1**= bomba peristáltica 1; **B2**= bomba peristáltica 2; **L**= conexão para reagentes externos, amostra e soluções de reciclagem do branco; **C**= conexões elétricas para a válvula da amostra; **V**=válvula da amostra; **O**= saída do sistema de secagem; **I**= entrada ao sistema de secagem; **D**= entrada da amostra para o detector; **G**= saída do gás carreador; **S**= separador gás - líquido; **R**= canal de rejeito.



Figura 5. Membrana Perma Pure.

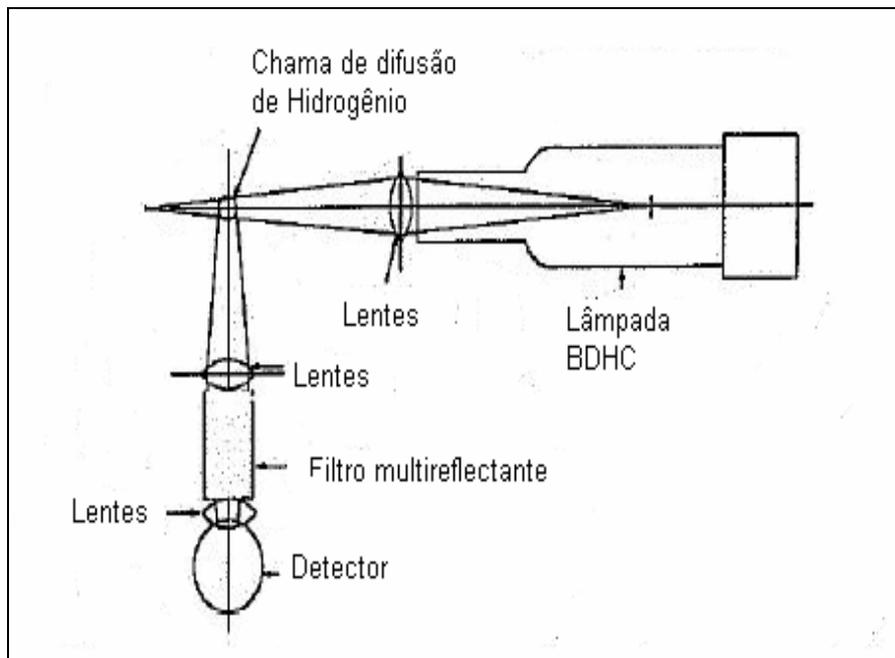


Figura 6. Esquema do aparelho de fluorescência atômica

4.1.3 Outros equipamentos

Uma micro balança analítica modelo AD-4 (Perkin-Elmer, part no. C655-001; 0,1 μg de sensibilidade) foi utilizada para a pesagem das amostras de óleos vegetais, enquanto que um digestor de microondas, modelo DGT 100 Plus (Provecto Analítica, Brasil) foi utilizado para a digestão assistida por microondas das amostras citadas nos procedimentos comparativos aplicados.

Um banho de ultra-som de 350 mL (Selecta, Barcelona, Espanha), operado a 50 W e 50 Hz foi utilizado para a sonicação das amostras estudadas, assim como um liofilizador (Telstar, Barcelona, Espanha) para a preparação das mesmas. Um banho de areia PL 512 (Raypa, Scharlau, Barcelona, Espanha) e uma mufla K1253, equipada com um programa de controle Eurotherm Control 902 (Heraeus, Madrid, Espanha) foram utilizados para a calcinação (via seca) das amostras.

4.2. Reagentes, soluções e amostras

As soluções foram preparadas a partir de reagentes de alta pureza e água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), obtida de um sistema Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA), previamente destilada e deionizada. Alternativamente, a água ultra pura foi obtida de um sistema Gehaka (São Paulo, Brasil).

Soluções padrão de Ni e Cu em meio aquoso, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram obtidas por diluição de ampola Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha) com solução HNO_3 0,2% v/v. As soluções analíticas aquosas de Ni e Cu foram preparadas por diluição adequada das soluções padrão com solução HNO_3 0,2% v/v.

Soluções estoque orgânicas de Ni e Cu $5000 \mu\text{g g}^{-1}$ (Conostan, Houston, USA) em óleo foram também utilizadas.

Amostras de óleo de soja e óleo de milho de três diferentes fornecedores brasileiros foram obtidas de um supermercado da cidade do Rio de Janeiro. Durante a manipulação, as amostras foram armazenadas em tubos Sarstedt (part no. 62.547.004, Nümbrecht, Alemanha), de 15 e 50 mL, de polietileno, fundo cônico e tampa de rosca. Ácidos clorídrico e nítrico concentrados (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), previamente destilados, e permanganato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) foram utilizados para as digestões no microondas.

As soluções de As (V) foram preparadas a partir de soluções padrão 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha). A solução padrão de As(III) 1000 mg L⁻¹ foi preparada pela dissolução, após secagem, de As₂O₃ (Riedel de Häen, Hannover, Alemanha) em KOH 20% m/v (Panreac, Barcelona, Espanha), neutralizando-se com H₂SO₄ 20% v/v e diluindo-se ao volume final com H₂SO₄ 1% v/v. A solução padrão do ácido dimetilarsínico (DMA) 1000 mg L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução, após secagem, do sal (CH₃)₂AsO(ONa).3H₂O (Fluka, Buchs, Suíça). A solução estoque do ácido monometilarsônico (MMA) foi preparada a partir da dissolução, após secagem, do sal disódico CH₃AsO(ONa)₂.6H₂O (Carlo Erba, Milano, Itália). Também se utilizou uma solução padrão de arsenobetaina (CH₃)₃As⁺CH₂COO⁻ (BCR-626, 1031 mg L⁻¹). As soluções estoque de concentração intermediária de As(III), As(V), MMA, DMA e arsenobetaina, todas elas 10 mg L⁻¹, foram preparadas mensalmente e armazenadas em geladeira, a 4°C, para preservação das espécies. Um controle de estabilidade de cada uma das soluções foi realizado, não apresentado variação significativa.

Para o procedimento de extração assistida por ultra-som, HCl 37 % m/v (Merck, Darmstadt, Alemanha), HNO₃ 65% m/v (J.T. Baker; Deventer, Holanda), ácido acético (>99,5%, Fluka), H₃PO₄ 85% m/v (Analar, Inglaterra), metanol (99,98%, Scharlau, Barcelona, Espanha), ácido trifluoroacético (Merck, Darmsdat, Alemanha) e ácido tricloroacético (Probus, Barcelona, Espanha) foram utilizados. Uma solução do sal etilendiaminotetracético 0,1% m/v (Panreac), um agente surfactante (Triton XT114, Feinbiochimica, Heidelberg, Alemanha) e um antiespumante Antifoam A (Fluka, Buchs, Suíça) foram também utilizados na etapa de extração.

Uma solução redutora de KI 50% (Merck, Darmsdat, Alemanha) e ácido ascórbico 10% (Scharlau) foi utilizada para reduzir As(V) e MMA ao estado de oxidação III depois da etapa de extração.

Tetrahidroborato de sódio (Fluka), dissolvido em NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi usado para gerar os hidretos correspondentes, previamente à medição instrumental. Esta solução foi preparada diariamente e filtrada antes do uso.

Argônio (pureza >99,995%) foi utilizado como gás de proteção (carreador) e ar sintético como gás de secagem. Os gases foram fornecidos por Carburos Metálicos (Barcelona, Espanha) e Aga (Rio de Janeiro, Brasil).

Amostras de diferentes cereais, vegetais e legumes, foram utilizadas para o estudo, todas elas foram adquiridas em diferentes supermercados e feiras da cidade de Valencia (Espanha).

Como materiais de referência foram utilizados o NIST-SRM 1568a (Rice Flour) e NIST 1573 (Tomato leaves), ambos fornecidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, Estados Unidos).

4.3. Procedimentos

4.3.1. Análise direta de amostras de óleo vegetal

Aproximadamente 0,5 mg de amostra foi pesada na plataforma de grafite usualmente utilizada para a análise de sólidos utilizando uma micro balança analítica. A plataforma, contendo a amostra, foi inserida no atomizador, manualmente, utilizando-se o sistema amostrador de sólidos. É muito importante levar em consideração a posição correta da plataforma no interior do tubo de grafite para obter resultados repetitivos (figura 6). Uma vez inserida a plataforma no atomizador, procedeu-se ao programa de temperatura otimizado do forno de grafite (tabela 1). Devido a que o amostrador automático deve ser retirado para o uso do amostrador de sólidos, as soluções de calibração foram manualmente dispensadas na plataforma de sólidos, utilizando pipetas automáticas, sendo introduzidas dentro do atomizador tal como descrito para as amostras. A figura 6 mostra algumas das etapas deste procedimento.

Tabela 1. Programas de temperatura para a determinação de Ni e Cu em óleos vegetais

Etapa	Ni			Cu		
	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Permanência (s)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Permanência (s)
1	90	10	5	90	10	5
2	120	10	5	150	10	5
3	350	4	10	600	40	10
4	800	40	15	1000 ¹	40	20
5	1200 ¹	40	20	1000 ¹	0	6
6	1200 ¹	0	6	2000 ²	1800	6
7	2400/2300 ^{2,3}	2200	6	2650	1000	5
8	2600	2000	7			

¹ Temperatura de pirólise

² Temperatura de atomização

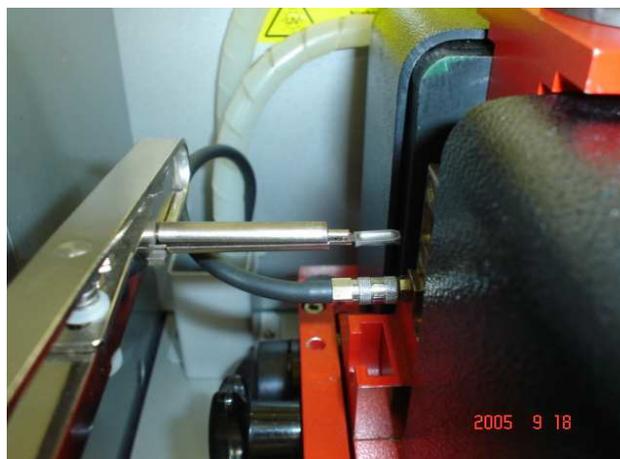
³ Temperatura de atomização para óleo de milho e óleo de soja respectivamente



(a)



(b)



(c)

Figura 7. (a) Amostra pesada diretamente na plataforma; (b) A plataforma presa pelo suporte para ser levada ao tubo de grafite; (c) O suporte ajustado no amostrador de sólidos, voltado para o atomizador de grafite.

4.3.2.

Procedimentos comparativos para a determinação de Cu e Ni em óleo vegetal

4.3.2.1.

EPA 3051

Aproximadamente 0,5 g de amostra foram pesados em frascos de teflon e digeridos com 10 mL de HNO₃ concentrado em um digestor de microondas DGT 100 Plus seguindo o programa estabelecido (tabela 2). Destaca-se que este programa foi diferente daquele utilizado no método EPA 3051¹³⁴. Após esfriamento, as soluções digeridas foram filtradas, avolumadas com HNO₃ 0,2% v/v e analisadas por GF AAS.

4.3.2.2.

EPA 3031

A uma amostra representativa de aproximadamente 0,5 g amostra adicionou-se 0,5 g de KMnO₄ e 1 mL de H₂SO₄ concentrado sob agitação, levando esta solução a aquecimento num bloco de digestão até reação total. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de HNO₃ concentrado, deixou-se reagir por alguns minutos para adicionar seguidamente 10 mL de HCl concentrado. As soluções digeridas foram filtradas, avolumadas com HNO₃ 0,2% v/v e analisadas por GF AAS.

Tabela 2. Programa do digestor de microondas DGT 100 Plus

Etapa	Tempo (min)	Potencia (W)
1	5	400
2	10	550
3	5	400
4	5	0
5	0	0

4.3.3.

Determinação de As, Sb, Bi, Se e Te em amostras de vegetais

4.3.3.1.

Preparação de amostras

As amostras analisadas foram de três tipos: olerícolas, grãos, leguminosas. As amostras foram cortadas em partes pequenas, trituradas e colocadas em bandejas de alumínio, cobertas com plástico transparente, para evitar contaminações. Posteriormente, foram congeladas a -20°C , para depois serem liofilizadas por um período de 48 horas, a uma pressão de, no máximo, 0,05 mbar. Em seguida, os legumes e cereais foram triturados, até se obter um pó fino e homogêneo. Para determinação da umidade, foram utilizados dois procedimentos: liofilização e secagem em estufa.

4.3.3.2.

Calcinação por via seca

Uma massa de amostra de aproximadamente 1 g de amostra foi pesada. Adicionaram-se 2,5 mL de uma mistura em suspensão de MgO 2% m/v e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20% m/v, junto com 5 mL de HNO_3 50% v/v, evaporando-se até secura, em um banho de areia. Para a calcinação, foi utilizada uma mufla com rampa de 50°C por hora, até uma temperatura de 450°C , que é mantida por um mínimo de 12 horas. A calcinação finalizou quando apenas cinzas brancas foram observadas. As cinzas foram então umedecidas com 1 mL de água ultra pura e dissolvidas em 9 mL de HCl 10% v/v, perfazendo um volume final de 10 mL.

Para a determinação de As e Sb, a 3 mL de solução anterior (solução resultante após a calcinação por via seca) adicionaram-se 8,75 mL de HCl concentrado (de modo a se obter uma concentração final de $3,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,6 mL de uma mistura de KI 50%/ácido ascórbico 10%, para reduzir o As(V) e Sb(V) ao estado de oxidação III. Após 30 minutos, a solução resultante foi levada a 30 mL com água ultra pura, em tubos de polietileno de 50 mL.

Para a determinação de Se, Te e Bi, a 5 mL de solução resultante após a calcinação por via seca, adicionaram-se 16,7 mL de HCl concentrado (obtendo-se uma concentração final de 4 mol L^{-1}) e 0,5 g de KBr. A solução resultante foi levada a 50 mL com água ultra pura, em tubos de polietileno de 50 mL e

aquecida durante 30 minutos, a uma temperatura de 80 - 85 °C, para reduzir o Se(VI) e Te(VI) a seus estados de oxidação IV.

A determinação do conteúdo total dos elementos em estudo por HG-AFS realizou-se a partir de alíquotas destas soluções, nas condições mostradas na tabela 3. As condições instrumentais empregadas foram selecionadas mediante um estudo de otimização prévio das vazões, e concentrações de ácido e redutor.

Tabela 3. Parâmetros experimentais selecionados para a medição instrumental com o espectrômetro de fluorescência atômica

Parâmetros experimentais	As	Sb	Bi	Se	Te
Comprimento de onda de ressonância (nm)	193,7	217,6	223,1	196,0	214,3
Corrente primaria (mA)	27,5	17,5	12,0	20,0	15,0
Corrente de ressonância (mA)	34,9	15	10,1	25,1	17,6
Tempo de demora (s)	15	15	15	15	15
Tempo de análise (s)	30	30	30	30	30
Tempo de retorno à base (s)	30	30	30	30	30
Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	3,5	3,5	4	4	4
Concentração de NaBH ₄ % (m/v)	0,7	0,7	1,2	1,2	1,2
Vazão de Argônio (mL min ⁻¹)	300	300	300	300	300
Vazão de redutor (mL min ⁻¹)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Vazão do branco e amostra (mL min ⁻¹)	9	9	9	9	9
Vazão do ar (L min ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Filtro	32	32	45	32	45

4.3.4.

Análise de especiação: determinação de As(III), As(V), DMA e MMA

Uma massa de amostra de aproximadamente 1 g foi pesada em tubos de centrífuga de polietileno de 50 mL, adicionando-se, em seguida, 10 mL de agente de extração, levando-se para o banho de ultra-som por 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação por 10 minutos, a 3500 rpm, sendo o sobrenadante separado e transferido a um balão volumétrico. O sólido residual foi lavado com uma solução de EDTA 0,1% m/v, agitando-se manualmente por 5 segundos e centrifugando-se novamente por mais 10 minutos, a 3500 rpm. Desta última centrifugação, a solução sobrenadante foi decantada, e juntada à procedente da primeira extração, adicionando-se finalmente 0,5 mL de Antiespumante A.

Para realizar a determinação das espécies (As(III), As(V), DMA e MMA), o extrato obtido foi dividido em duas partes e cada uma delas foi transferida a tubos de polietileno de 50 mL. Adicionaram-se diferentes volumes de HCl concentrado, segundo a concentração final do meio (tabela 4) a ambas as partes, sendo que, a uma delas, adicionou-se 1 mL da solução de KI 50%/ácido ascórbico 10% e avolumou-se ambos os tubos a 50 mL com água ultra pura. As soluções foram medidas nas condições experimentais apresentadas na tabela 4, que referem-se às concentrações de HCl e NaBH₄ utilizadas para cada condição.

Tabela 4. Condições experimentais para a determinação de As(III), As(V), MMA e DMA nos extratos obtidos por HG AFS

Parâmetro	Condição ^a			
	A	B	C	D ^b
HCl (mol L ⁻¹)	2	4	3,5	3,5
NaBH ₄ (% m/v)	1,4	1,4	1,2	1,2

^a Condições A, B e C correspondem a diferentes concentrações de HCl e NaBH₄ para as quais foram encontrados diferentes sinais relativos para As(III), As(V), MMA e DMA, com o intuito de obter quatro equações proporcionais e independentes.

^b Na condição D, as amostras foram previamente tratadas com KI 1% e ácido ascórbico 0,2%, para produzir uma redução prévia das espécies de As(V).