

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

Paola Ramos Coutinho Reis

**DETERMINAÇÃO DE Al, Cr, Cu e Zn EM AMOSTRAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR USANDO AMOSTRAGEM DIRETA DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO
ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE (GF AAS)**

Juiz de Fora - MG

2014

Paola Ramos Coutinho Reis

**DETERMINAÇÃO DE Al, Cr, Cu e Zn EM AMOSTRAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR USANDO AMOSTRAGEM DIRETA DE SUSPENSÃO E DETECÇÃO
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO
ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE (GF AAS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, na área de concentração em Química Analítica, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César José da Silva (DQ – UFJF)

Coorientador: Dr. Leônidas Paixão Passos (Embrapa Gado de Leite – JF)

Juiz de Fora - MG

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Paola Ramos Coutinho.

Determinação de Al, Cr, Cu e Zn em amostras de cana-de-açúcar usando amostragem direta de suspensão e detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) / Paola Ramos Coutinho Reis. -- 2014.

82 f. : il.

Orientador: Júlio César José da Silva

Coorientador: Leônidas Paixão Passos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Cana-de-açúcar. 2. Suspensões. 3. Preparo de Amostras. 4. Metais. 5. GF AAS. I. Silva, Júlio César José da, orient. II. Passos, Leônidas Paixão, coorient. III. Título.

*“Mesmo onde há ouro e rubis em grande quantidade, os lábios que transmitem conhecimento são uma rara preciosidade.”
(Provérbios 20: 15)*

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele. À minha família que esteve sempre ao meu lado diante das dificuldades. Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, auxílio nas minhas escolhas e conforto em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Júlio César José da Silva, pela orientação, amizade, apoio e compreensão nas horas mais difíceis.

Ao meu coorientador Dr. Leônidas Paixão Passos por me acolher tão bem em seu laboratório, pela amizade, incentivo, paciência e oportunidade de crescer como profissional e como pessoa.

Aos professores Rafael e Dora pelas sugestões e apoio na qualificação.

Ao Sebastião Evaristo e aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite, pela colaboração, apoio, conversas e amizade.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora pelas instruções e esclarecimentos.

A secretária da pós-graduação Simone que sempre esteve pronta a ajudar com eficiência e disposição.

A minha amiga Ângela, pelos conselhos, apoio em todas as horas, sempre com uma palavra amiga.

Aos colegas do NUPIS e do Grupo Baccan, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

A minha mãe, Helena, pelo amor, apoio e principalmente pelas orações.

Ao meu pai, Luiz, pelo amor, incentivo e por acreditar em mim.

Ao meu marido Marcos, pelo amor, paciência e companheirismo sempre.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

A coordenação da pós-graduação em química.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química.

A Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora.

Aos órgãos financiadores do projeto e à CAPES.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

RESUMO

Neste trabalho são apresentados métodos desenvolvidos para determinação direta de Al, Cr, Cu e Zn em amostras de folha de cana-de-açúcar usando amostragem direta de suspensão e detecção por GF AAS. As amostras vegetais foram desidratadas e moídas em diferentes granulometrias (106 μm , 75 μm e 53 μm). Amostras com granulometria menor do que 53 μm associadas aos agentes estabilizantes ácido nítrico 5% v/v e a mistura ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v foram as mais adequadas para o preparo das suspensões. A melhor estratégia para homogeneização da suspensão foi o borbulhamento com ar, porém, com interrupção no momento da amostragem (*stop-flow*). A otimização das condições experimentais para a determinação de Al, Cr, Cu e Zn por GF AAS incluiu estudos dos efeitos de matriz, utilização de modificadores químicos e a otimização das temperaturas de pirólise e atomização. Na determinação de Al e Cr foi utilizado o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico, enquanto que para o Zn foi usado o Pd como modificador, já para a determinação do Cu não foi necessário a utilização de modificador químico. As melhores temperaturas de pirólise e atomização obtidas foram 1700°C e 2400°C para Al; 1500°C e 2300°C para Cr; 1000°C e 2100°C para Cu e 1100°C e 2100°C para Zn. Os efeitos de matriz foram avaliados pela comparação dos dados obtidos com o método das adições de padrões e com a curva analítica em meio aquoso. A exatidão do procedimento proposto foi avaliada pela comparação com os dados obtidos usando a técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O método otimizado foi utilizado para análise direta de amostras em suspensão de folhas de cana-de-açúcar. As amostras apresentaram valores entre 6,03 a 56,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Al; 23,95 a 472,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cr; 11,59 a 19,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cu e 15,14 a 26,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Zn. Os resultados obtidos demonstraram que a análise direta de suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) apresenta-se como alternativa factível para estudos envolvendo o diagnóstico e correção de desequilíbrios nutricionais das plantas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Suspensões. Preparo de Amostras. Metais. GF AAS.

ABSTRACT

In this work developed methods for the direct determination of Al, Cr, Cu and Zn in leaf samples of sugarcane using slurry sampling and detection by GF AAS are presented. Leaf samples were dried and ground at different particle sizes (106 μm , 75 μm and 53 μm). Samples with granulometry smaller than 53 μm associated with the stabilizing agents nitric acid 5 % v/v and the mixture nitric acid 5% v/v:Triton X-100 0.04% v/v were the most suitable for the slurry preparation. The best strategy for slurry homogenization was the bubbling with air. However, this was stopped during the sampling step (*stop-flow*). The optimization of the experimental conditions for the determination of Al, Cr, Cu and Zn by GF AAS included studies of matrix effects, the use of chemical modifiers and optimization of the temperatures of pyrolysis and atomization. In the determination of Al and Cr, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ was used as chemical modifier, while for the Zn, Pd was used. The use of a chemical modifier for Cu determinations was not necessary. The best pyrolysis and atomization temperatures obtained were 1700°C and 2400°C for Al; 1500°C and 2300°C for Cr; 1000°C and 2100°C for Cu and 1100°C and 2100°C for Zn. The matrix effects were evaluated by comparing data obtained by using the method of standard additions and analytical curves in an aqueous medium. The accuracy of the procedure was evaluated by comparison with the data obtained using the technique of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The optimized method was used for direct analysis of a series of slurry samples of sugarcane leaves. Values between 6.03 to 56.70 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Al; 23.95 to 472.79 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Cr; 11.59 to 19.38 $\mu\text{g g}^{-1}$ to Cu and 15.14 to 26.44 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Zn were found. The results demonstrate that the direct analysis of slurry samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) presents itself as a feasible alternative for studies involving the diagnosis and correction of nutritional imbalances of plants as sugarcane.

Keywords: Sugarcane. Slurry. Sample Preparation. Metals. GF AAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Deficiência de cobre: clorose uniforme seguida de pontuações verde-escuras (ilhas).....	20
Figura 2-	Deficiência de zinco: a folha de cana-de-açúcar fica mais susceptível ao ataque de fungos.....	21
Figura 3-	Programa de temperatura de um forno de grafite.....	24
Figura 4-	Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GF AAS) com o uso de aerador de aquário para manter suspensão homogênea.....	42
Figura 5-	(a) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, por agitação manual de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, por agitação manual de 30 segundos para 30 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm	45
Figura 6-	(a) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v, por agitação manual de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v, por agitação manual de 30 segundos para 30 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm	47

Figura 7-	(a) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, agitação por ultrassom de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v agitação por ultrassom de 30 segundos para 15 mg de amostra , comprimento de onda 660 nm.....	49
Figura 8-	Decaimento da absorbância em 15 mg de amostra de folha de cana menor que 53µm com borbulhamento constante, comprimento de onda 660 nm.....	50
Figura 9-	Sinal da absorbância do cobre em diferentes meio de agentes estabilizantes, no decorrer de 20 minutos.....	52
Figura 10-	Diferentes tempos de borbulhamento para suspensões preparadas em meio de ácido nítrico 5% v/v e Triton X-100% v/v.....	53
Figura 11-	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para 50µg L ⁻¹ de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v.....	55
Figura 12-	(a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra na presença de Mg(NO ₃) ₂ como modificador químico.....	55
Figura 13-	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para 50µg L ⁻¹ de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v.....	57

Figura 14-	(a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra na presença de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico.....	57
Figura 15-	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $10\mu g L^{-1}$ de Cu em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v.....	59
Figura 16-	Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cu em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra.....	59
Figura 17-	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $50\mu g L^{-1}$ de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v.....	60
Figura 18-	(a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra na presença de Pd como modificador químico.....	61
Figura 19-	Estudo do efeito de matriz na metodologia para o alumínio em folha de cana-de-açúcar.....	64
Figura 20-	Estudo do efeito de matriz na metodologia para o cromo em folha de cana-de-açúcar.....	64
Figura 21-	Estudo do efeito de matriz na metodologia para o cobre em folha de cana-de-açúcar.....	65
Figura 22-	Estudo do efeito de matriz na metodologia para o zinco em folha de cana-de-açúcar.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Al, Cr, Cu e Zn.....	35
Tabela 2-	Teores de Al, Cr, Cu e Zn em folha de cana-de-açúcar, curvas analíticas preparadas em meio aquoso e analisadas em ICP OES comparados com GF AAS.....	66
Tabela 3-	Parâmetros de mérito obtidos para a metodologia de Al, Cr, Cu e Zn em folha de cana-de-açúcar.....	67
Tabela 4-	Teores médios de alumínio, cromo, cobre e zinco em amostras de folha de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes composições da solução nutritiva de Clark (1975) obtidos com o método proposto.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> .
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> .
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i> .
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> .
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquide Chromatography</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	18
2.2	MACRO E MICRONUTRIENTES.....	18
2.3	ESPÉCIES METÁLICAS TÓXICAS.....	21
2.4	QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM AMOSTRAS VEGETAIS	23
2.4.1	GF AAS.....	24
2.4.2	Análise direta de suspensões por GF AAS.....	25
3	OBJETIVOS.....	31
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1	AMOSTRAS.....	32
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	32
4.3	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	32
4.4	PROCEDIMENTO.....	33
4.4.1	Estudo do tamanho de partícula.....	33

4.4.2	Estudo do melhor agente estabilizante.....	34
4.4.3	Estudo do melhor tempo de borbulhamento.....	34
4.4.4	Estudo das curvas de pirólise e atomização dos elementos.....	34
4.4.5	Digestão Nítrico-perclórica.....	36
4.4.6	Validação dos métodos	36
4.4.7	Determinação de Al, Cr, Cu e Zn em amostras de folha de cana-de-açúcar.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	ESTUDO DA MASSA E TAMANHO DE PARTÍCUL DA AMOSTRA.	43
5.2	ESTUDO DO MELHOR AGENTE ESTABILIZANTE.....	50
5.3	ESTUDO DO MELHOR TEMPO DE BORBULHAMENTO.....	52
5.4	ESTUDO DAS CURVAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO DOS ELEMENTOS.....	53
5.4.1	Curvas de pirólise e atomização para Al.....	54
5.4.2	Curvas de pirólise e atomização para Cr.....	56
5.4.3	Curvas de pirólise e atomização para Cu.....	58
5.4.4	Curvas de pirólise e atomização para Zn.....	60

5.5	EFEITOS DE MATRIZ E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PARA A METODOLOGIA DE Al, Cr, Cu E Zn EM FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	62
5.6	DETERMINAÇÃO DE Al, Cr, Cu E Zn EM AMOSTRAS DE FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	68
6	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Informações a respeito da composição química das plantas são importantes, pois permitem a comparação de diferentes tipos de adubação com extrações e translocações de nutrientes através da planta como um todo ou parte dela, permitindo que a fertilização possa ser direcionada ou corrigida. Essas informações, além de possibilitar o diagnóstico do balanço nutricional dos tecidos vegetais, também identificam a presença de substâncias tóxicas que podem comprometer o crescimento da planta e sua produtividade.

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias de baixo custo que permitam a detecção rápida, exata e precisa de espécies metálicas importantes para o desenvolvimento das plantas, como por exemplo, a análise direta de suspensões por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), apresenta-se como alternativa factível para estudos envolvendo a correção de desequilíbrios nutricionais em matrizes vegetais.

O alumínio e o cromo foram escolhidos para esse estudo, porque destacam-se entre os metais mais tóxicos aos cultivos agrícolas no território brasileiro. Já o cobre e o zinco foram selecionados por serem micronutrientes de requerimento relativamente pequeno, porém, causadores de sintomas severos e irreversíveis de deficiência mineral na planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo. A cana-de-açúcar foi trazida para o Brasil pelos primeiros colonizadores, sendo utilizada principalmente para a produção de açúcar e de álcool, e também como recurso forrageiro na alimentação de ruminantes. A utilização da cana-de-açúcar como recurso forrageiro, apresenta uma série de vantagens importantes, tais como, pequena taxa de risco na sua utilização como forragem, o baixo custo por unidade de matéria seca produzida e a sua maturidade coincidindo com o período de escassez de outras pastagens (AZEVEDO *et al.*, 2003; VALE *et al.*, 2011).

Para aumentar a produção da cana-de-açúcar é necessário controlar os fatores produtivos, como por exemplo, o adequado fornecimento de nutrientes para atender as exigências nutricionais da cultura, pois eles podem limitar o crescimento e produção do vegetal. Apesar da importância dos nutrientes para a cultura da cana-de-açúcar, existe uma carência de estudos envolvendo a supressão de nutrientes e seus reflexos nos sintomas visuais, no estado nutricional e no crescimento da cultura. A falta ou o excesso de um nutriente pode proporcionar efeitos semelhantes em diferentes espécies vegetais, devido à similaridade das funções dos mesmos. No entanto, é comum a existência de efeitos diferenciados entre e dentro espécies, como resultado da expressão genética, influenciada pela deficiência ou toxicidade dos nutrientes. Portanto, é importante acompanhar os efeitos da supressão dos nutrientes na nutrição das plantas para a maximização do retorno econômico da atividade canavieira (VALE *et al.*, 2011).

2.2 MACRO E MICRONUTRIENTES

Além de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), os vegetais necessitam de uma série de outros nutrientes. Macronutrientes, tais como, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), são exigidos em maiores quantidades (kg/ha). Micronutrientes, como boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn), são exigidos em menores quantidades (g/ha). A deficiência de qualquer desses nutrientes no solo ou no adubo pode levar a uma redução na produtividade da cana-de-açúcar (FILHO *et al.*, 1994).

Segundo Filho *et al.* (1994), cobre e zinco são os micronutrientes mais limitantes para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Deficiências de Cu e de Zn situam-se entre as mais importantes em solos brasileiros. Essas deficiências podem ser atribuídas à pequena reserva natural desses micronutrientes e às suas baixas disponibilidades, os quais se encontram, predominantemente, nas formas oxidadas e complexadas, não disponíveis às plantas (NASCIMENTO & FONTES, 2004).

O cobre é um micronutriente essencial para as plantas, pois é componente de diversas enzimas que catalisam o fluxo de elétrons e as reações de oxirredução nas células. Também participa do metabolismo de carboidratos e do nitrogênio, da síntese de lignina e de clorofila (SANTOS *et.al.*, 2004; SANTOS, 2006). No solo, o cobre se encontra geralmente na forma de íon Cu^{2+} e sua concentração na solução do solo encontra-se na faixa de 6 a 8 mg kg^{-1} . O cobre encontra-se mais fortemente ligado à matéria orgânica do solo do que outros micronutrientes catiônicos, como Zn^{2+} e Mn^{2+} (SANTOS, 2006).

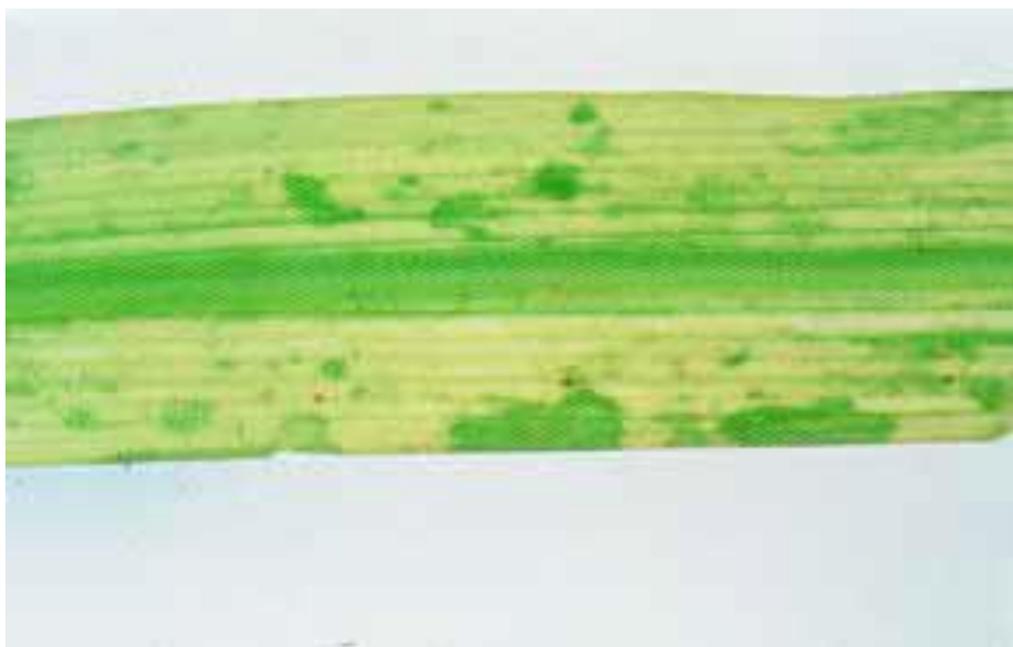
A deficiência nutricional de cobre pode causar manchas verdes ("ilhas") em folhas de cana-de-açúcar como mostrado na Figura 1. Quando a deficiência é severa as folhas são eventualmente descoloridas que se tornam finas como papel e enroladas, colmos e meristemas perdem a turgidez (doença do "topo caído"), adquirem aparência semelhante à borracha e apresentam perfilhamento reduzido (FILHO *et al.*, 1994). Por outro lado, em elevadas concentrações na solução do solo, o cobre pode manifestar toxidez, caracterizada por necrose das folhas, desfolhamento precoce e diminuição da ramificação da parte aérea e raiz (BORKERT *et al.*, 1994), causando significativas perdas de produtividade. As propriedades físico-químicas de cada solo, tais como pH e conteúdo de matéria orgânica, irão determinar a sua fitotoxicidade (SANTOS *et al.*, 2004).

O zinco é um micronutriente que atua como ativador enzimático. É responsável pela síntese de proteínas, aminoácidos e um precursor da auxina (ácido indolacético), envolvido no processo de enraizamento (ORIOLI JÚNIOR *et al.*, 2008; ABRANCHES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). O zinco é absorvido pelas plantas na forma de cátion bivalente (Zn^{+2}) e, em seguida, transportado para as folhas pelo xilema, onde é facilmente redistribuído, pelo floema, acumulando-se nas raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os solos brasileiros geralmente apresentam baixas concentrações de zinco (RIBEIRO & SANTOS, 1996). Na ausência deste mineral há o acúmulo de

aminoácidos, principalmente nas partes mais jovens da planta, devido à redução da síntese protéica. Os efeitos da deficiência de zinco nas folhas podem ser constatados pela formação de estrias cloróticas na lâmina foliar, que sobrepõem e formam uma faixa larga de tecido clorótico de cada lado da nervura central, mas não se estendendo à margem da folha, exceto em casos severos de deficiência (Figura 2). Outro efeito da deficiência de zinco é a clorose que inicia-se vascularmente produzindo faixas longitudinais verde-claras ao longo das margens das folhas e verde-escuras ao longo da nervura central e das margens. Inicialmente, os tecidos internervais das folhas permanecem verdes, mas logo toda a lâmina foliar pode tornar-se clorótica, estendendo-se para a base. Outras características do problema são as folhas perceptivelmente curtas e largas na parte média e assimétricas, necrose na ponta da folha quando a deficiência é severa podendo progredir da base para a ponta da lâmina foliar, perfilhamento reduzido e internódios mais curtos e colmos finos que podem perder a turgidez (elásticos) (FILHO *et al.*, 1994). Porém, em altas doses, esse nutriente pode afetar o desenvolvimento das raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2010), além de interferir na absorção de ferro e fósforo (ABRANCHES *et al.*, 2009).

Figura 1 - Deficiência de cobre: a folha de cana-de-açúcar apresenta clorose uniforme seguida de pontuações verde-escuras (ilhas)



Fonte: FILHO *et al.*, 1994

Figura 2 - Deficiência de zinco: a folha de cana-de-açúcar fica mais susceptível ao ataque de fungos



Fonte: FILHO *et al.*, 1994

2.3 ESPÉCIES METÁLICAS TÓXICAS

Ocorrência de metais tóxicos em solos agrícolas é um problema grave e persistente. A contaminação dos solos com espécies metálicas tóxicas, mais conhecidas como metais pesados, tem ocorrido em decorrência do uso indiscriminado de insumos agrícolas e do avanço da atividade industrial ilegal. Os poluentes liberados por resíduos industriais contêm quantidades apreciáveis de Al e Cr. Alguns fertilizantes orgânicos e inorgânicos também contêm uma quantidade considerável de Al e Cr. Além disso, a disponibilidade desses elementos no solo aumenta significativamente com a diminuição do pH do solo, tem-se dado enfoque tanto para a adaptação das plantas ao solo como do solo às plantas, pois as pastagens, em geral, ocupam solos inférteis (ALI *et al.*, 2011).

Em razão dessas características, o Al^{3+} assume papel importante em relação às trocas iônicas em solos ácidos, aumentando os níveis tóxicos deste na solução do solo, condições estas que são extremamente limitantes ao crescimento e à produtividade

(ISHITANI *et al.*, 2004). A solubilidade do alumínio no solo e, conseqüentemente, sua toxidez são influenciadas por vários fatores, incluindo pH, tipo de argila predominante, concentração de sais na solução do solo e teor de matéria orgânica do solo (FOY, 1974; SILVA, 1997). Em geral, a toxidez de alumínio é mais comum em solos com pH abaixo de 5,5, mas é particularmente severa em pH abaixo de 5, situação em que a solubilidade de alumínio aumenta acentuadamente (MAGISTAD, 1925).

A redução da taxa de crescimento radicular de plantas sensíveis tem sido considerada o principal efeito de níveis tóxicos de alumínio, que afeta o alongamento e a divisão celular. Essa restrição diminui a capacidade da planta absorver água e nutrientes do subsolo em virtude do enraizamento superficial, tornando-a menos produtiva e mais susceptível à seca. Uma alternativa para reduzir esse efeito tóxico nesses solos é a incorporação profunda de corretivos e de fertilizantes. Entretanto, as técnicas atualmente disponíveis para este fim são consideradas impraticáveis, tanto por não se conhecer uma metodologia que permita controlar adequadamente o alumínio permutável na parte superficial dos solos, quanto por causa dos custos dos corretivos e de sua aplicação, e da grande extensão de áreas de solos que apresentam acidez nociva em grau considerável (FERREIRA *et al.*, 2006).

Como a utilização de corretivos do pH do solo nem sempre apresenta viabilidade técnica ou econômica, são realizadas pesquisas para o desenvolvimento de genótipos tolerantes a esse estresse (HARTWIG *et al.*, 2007). Conseqüentemente, os mecanismos e as bases genéticas para a tolerância ao Al^{3+} têm sido intensamente investigados (BENITO *et al.*, 2010). Esses efeitos assumem maior importância porque quase 68% do território nacional possuem solos ácidos (COCHRANE *et al.*, 1982).

Os sintomas da toxidez por alumínio nem sempre são facilmente identificáveis. Os sintomas foliares assemelham-se à deficiência de fósforo (folhas de crescimento anormal; coloração púrpura nos colmos, nas folhas e nas nervuras) ou à deficiência de cálcio (enrolamento das folhas jovens, colapso do ápice da planta e dos pecíolos), (FURLANI, 1989). As raízes danificadas por alumínio são caracteristicamente curtas, grossas e quebradiças, com poucas ramificações finas, e são, portanto, pouco eficientes na absorção de água e de nutrientes do subsolo (FOY, 1976; KOCHIAN, 1995).

O cromo é um dos principais poluentes lançados pelas indústrias. As principais fontes de contaminação ambiental de cromo são os curtumes, a indústria galvânica e os fertilizantes. A utilização de fertilizantes, além de possibilitar o rápido crescimento da planta, como por exemplo a cana-de-açúcar, facilita o controle do processo da erosão.

No entanto, a utilização desses fertilizantes e herbicidas contendo diferentes concentrações de cromo, são os principais pontos negativos do cultivo da cana-de-açúcar (LABRA *et al.*, 2010; CORBI *et al.*, 2008).

O cromo é amplamente distribuído no solo, água e material biológico e ocorre no intervalo de 5 a 1000 mg Kg⁻¹ no solo. Há duas principais formas de cromo disponíveis no solo, Cr³⁺ e Cr⁶⁺ e este último é mais móvel e tóxico para as plantas, conseqüentemente, pode ser apropriado usar o termo toxicidade de Cr nas plantas, em vez de toxicidade de Cr trivalente ou hexavalente (GYANA & PREMANANDA, 1998).

A exposição das plantas a longo prazo a estresse por cromo apresentam respostas fisiológica diversas, tais como redução no crescimento e diminuição da relação parte aérea/raiz. Os efeitos tóxicos do cromo sobre o crescimento e desenvolvimento da planta incluem alterações no processo de germinação, bem como no crescimento de raízes, caules e folhas, que podem reduzir a produção total de matéria seca e também da produtividade. Adicionalmente, o cromo também provoca efeitos deletérios sobre os processos fisiológicos das plantas, tais como respiração celular, fotossíntese e nutrição mineral (SHANKER *et al.*, 2005; CASTILHOS *et al.*, 2005).

O cromo é relatado por interagir com a nutrição de ferro (Fe) nas plantas, enquanto um baixa concentração de Cr diminui a clorose em plantas deficientes em Fe, uma alta concentração de Cr induz clorose de ferro e reduz a atividade de enzimas (GOPAL *et al.*, 2009). Vázquez (1987) relatou que na presença de Cr, alterações nas raízes das plantas, inibem a absorção de água.

A absorção e distribuição de cromo em plantas é de grande interesse para determinar a absorção e padrão de distribuição de metais em diferentes partes vegetais, especialmente nas partes comestíveis, devido à crescentes problemas de toxicidade causada por metais no sistema solo-planta (BAXTER *et al.*, 1983).

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM AMOSTRAS VEGETAIS

Na determinação de constituintes inorgânicos em amostras vegetais, sejam eles essenciais ou tóxicos, é necessária a utilização de técnicas com alta sensibilidade e exatidão. Para tanto, é comum o emprego de técnicas analíticas sensíveis, tais como, a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS), a espectrometria de absorção em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de

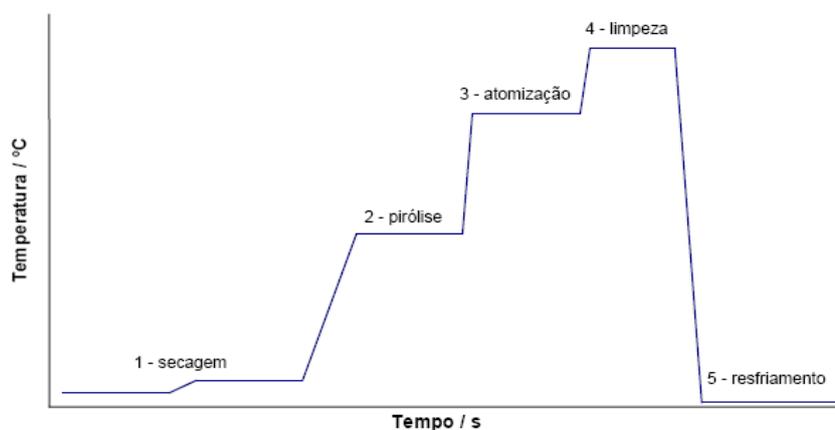
massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (TAYLOR *et al.*, 2000, EBDON *et al.*, 1995, GARCÍA *et al.*, 1992, TAKUWA *et al.*, 1997).

As técnicas que apresentam fonte de plasma (ICP), possuem como principal vantagem a análise multi-elementar, sendo possível em alguns casos, a determinação de vários elementos em uma única análise. No entanto, são técnicas que necessitam de equipamentos de maior custo, bem como seus insumos; nem sempre é possível a introdução direta da amostra, necessitando uma digestão prévia da amostra (FEIST *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2005).

2.4.1 GF AAS

Para determinações monoelementares, a técnica de GF AAS é uma técnica bem estabelecida, onde cada analito requer programas de tempo/temperatura específicos, o volume de amostra necessário para uma análise é geralmente pequeno, é comum se analisar amostras de volume inferior a 100 μL . Para se fazer medidas por GF AAS é necessário estabelecer um programa de aquecimento apropriado para controlar as etapas de secagem, de pirólise e de atomização (Figura 3). Este programa otimizado permite vaporizar o solvente bem como reduzir os constituintes da matriz, antes da atomização do analito, a fim de se reduzirem eventuais interferências. Cada elemento (numa determinada matriz) possui uma temperatura de pirólise e uma de atomização características (FRESCHI *et al.*, 2000).

Figura 3 - Programa de temperatura de um forno de grafite



Fonte: OLIVEIRA, 2009

Mesmo ocorrendo etapas distintas pode haver perdas de analito na etapa de pirólise ou a presença de concomitantes da amostra ainda não eliminados na etapa de atomização, causando interferências. A modificação química é uma prática comum em determinações por GF AAS cuja função é aumentar a estabilidade térmica do analito e/ou a eficiência da etapa de pirólise por aumento na volatilização da matriz, eliminando, assim, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra. O modificador químico pode atuar de duas formas: combinando-se com o analito, aumentando sua estabilidade térmica ou combinando-se com a matriz aumentando sua volatilidade (FROES *et al.*, 2006; WELZ & SPERLING, 1999).

Um modificador químico é normalmente uma solução concentrada contendo um ou mais compostos químicos que é adicionada à alíquota da amostra no forno de grafite através do amostrador automático ou diretamente no tubo de grafite pouco antes da introdução da amostra. A solução apresenta uma alta concentração de modo a favorecer as reações entre os concomitantes, analito e o modificador (NÓBREGA *et al.*, 2004). São várias as espécies empregadas como modificadores, no entanto uma mistura dos sais nitrato de paládio e nitrato de magnésio é aquela que se destaca como uma das mais usadas em determinações de diversos analitos, sendo por essa razão classificada como universal (VOLYNSKII, 2003).

2.4.2 Análise direta de suspensões por GF AAS

Entre os principais objetivos da química analítica estão o aperfeiçoamento e a simplificação das operações preliminares no sentido de minimizar a interferência humana no processo analítico, sem comprometer, no entanto, a qualidade do resultado obtido (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998). Nesse sentido a técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) associada com a amostragem direta de sólidos ou suspensão é uma estratégia interessante para a determinação de elementos-traço em amostras vegetais, tais como, espinafre, folhas de tomate e pepino; em amostras de sedimentos marinhos, solos, alimentos, peixes, sedimentos de rio, sangue humano, cerveja, entre outras (STEPHEN *et al.*, 1985; RESANO *et al.*, 2006; PHOUNG *et al.*, 1995; BARRERA *et al.*, 1994; HINDS *et al.*, 1988; STEPHEN *et al.*, 1987; MADRID *et al.*, 1990; EPSTEIN *et al.*, 1989; XIAO-QUAN *et al.*, 1988, CERVERA *et al.*, 1991).

A etapa de preparo de amostra é crítica em qualquer procedimento analítico, visto que a digestão de amostras por via úmida ou seca pode ocasionar a perda de analito por volatilização, formação de resíduos insolúveis, aumento da possibilidade de haver contaminação, necessidade de ácidos concentrados, condições drásticas de temperatura e pressão, além do dispêndio de tempo (LIMA *et al.*, 2001, MILLER-LHLI, 1988).

A associação da técnica de GF AAS com a amostragem em suspensão oferece vantagens potenciais na velocidade de análise e também sobre os procedimentos convencionais de preparo de amostra (via úmida e via seca) incluindo, (i) redução no tempo de preparação de amostras, (ii) diminuição da possibilidade de perdas do analito por volatilização antes da análise, (iii) redução de perdas de analito relacionadas a formação de resíduos insolúveis, (iv) possibilidade de emprego de injetores automáticos e (v) menor possibilidade de contaminação da amostra (ALVES *et al.*, 2001; MILLER-LHLI, 1993; PADILHA *et al.*, 2011; STEPHEN *et al.*, 1985, BARALNIEWIEZ *et al.*, 2007).

Entre as vantagens da técnica destaca-se, a habilidade de trabalhar com pequenos volumes de amostra, o tubo de grafite pode agir como um reator químico dispensando a necessidade de decomposição prévia da amostra (análise direta), atingindo excelentes limites de detecção, é uma técnica seletiva e de relativo baixo custo operacional (OSHITA *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2001, MILLER-LHLI, 1994).

Usando F AAS, Dias *et al.* (2011) desenvolveram um procedimento analítico para determinação de suspensão em folhas de mandioca em pó em uma mistura líquida constituída por HNO₃, HCl, e H₂O₂, após um processo de ultra-sons. O procedimento foi validado por comparação dos resultados obtidos com a aplicação do processo de digestão e a análise dos materiais de referência certificados de folhas de macieira. Sendo que os resultados encontrados estão de acordo com os valores certificados.

Sánchez-Moreno *et al.* (2010) realizaram análise direta de cobre, níquel, cádmio e chumbo em níveis muito baixos de concentração em folhas, usando GF AAS e a introdução de amostras em suspensão. Diferentes parâmetros que influenciam a preparação nas suspensões de amostras como, teor de ácido, presença de agentes estabilizantes e de sonda de ultra-sons foram estudados. Parâmetros instrumentais como modificador químico, temperatura e tempos de secagem, pirólise e atomização foram otimizados. O método foi aplicado para análise de metais em um material de referência

de pinheiro e a metodologia tem sido utilizada com sucesso em determinações de metais nas amostras reais de folhas.

Bezerra *et al.* (2010) usaram a técnica de amostragem de suspensão para determinar manganês e zinco em folhas de chá, usando espectrometria de absorção atômica. As proporções na fase líquida das suspensões compostas por soluções de HCl, HNO₃ e Triton X-100 foram otimizadas, utilizando 200 mg de amostra moída em um moinho de bolas de carboneto de tungstênio (tamanho de partículas < 100 µm). A precisão do método foi confirmada pela análise de materiais certificados com folhas de maçã e folhas de espinafre. Os resultados foram comparados com os obtidos por um procedimento de digestão ácida. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos com base em um teste t pareado (ao nível de confiança de 95 %).

No trabalho de Dias *et al.* (2009) a amostragem de suspensão foi utilizada de modo a encurtar o tempo de análise e para minimizar os problemas associados com o tratamento da amostra sólida, tais como digestão ácida, a contaminação da amostra e a perda de analito. As amostras de folhas de mandioca foram lavadas com Extran 10% v/v, logo seguida foram secas numa estufa a 60°C, triturou-se num moinho de bolas, e o material obtido foi peneirado em malha de 100 µm e analisadas por AAS. As análises de material de referência certificado de folhas de espinafre e maçã evidenciaram a precisão do método.

A fim de avaliar o método de suspensão em ICP OES como um método alternativo para a análise de chá, Mokgalaka *et al.* (2004) determinaram as concentrações de seis elementos, Al, Ba, Ca, Mg, Mn e Zn. A calibração foi realizada com soluções padrão tanto aquosas ou usando o método de adições de padrão. Inicialmente, a folha de chá foi moída por 3 h antes da preparação. Um processo de carbonização foi incluído antes da amostra moída. O tempo de moagem foi reduzido para apenas 30 min. Para comparação, o chá também foi digerido em ácido para ser introduzido no plasma como uma solução aquosa. A precisão do método foi verificada através da análise de um material de referência certificado de chá. O teste t de Student mostrou que os valores obtidos utilizando-se para a suspensão foram próximos dos valores certificados em um nível de confiança de 95%.

Chen (2003), utilizou politetrafluoretileno (PTFE) como um modificador químico para determinação direta de elementos traço como Cu e Zn, em amostras ambientais em GF AAS com amostragem de suspensão. O método proposto foi aplicado para a

determinação direta dos elementos-traço em folhas de árvore de cânfora e material de referência padrão (a amostra combinada de ramo e folha de arbusto), com resultados satisfatórios.

Um método para a determinação de titânio em GF AAS com a amostragem em suspensão foi desenvolvida por Sorlie & Wibetoe (2003), em vários níveis de concentração em materiais de referência certificados, como cabelo humano em pó, galhos e folhas de arbusto e solo, as determinações de Ti foram feitas com modificadores (BaF_2 and NH_4F) e sem modificador, a precisão foi melhor para o material com o mais alto teor de titânio, apesar do fato de apenas 3 mg de amostra terem sido introduzidas.

Engelsen & Wibetoe (2000), determinaram Al, Cu, Li e Mn em agulhas de pinheiro e em ramos e folhas do arbusto, em suspensão obtidas com o emprego de ultra-som e analisadas por GF AAS. A densidade dos materiais foi determinada por dois métodos, utilizando um analisador de partículas Coulter e por meio de um método gravimétrico. Os dois métodos apresentaram exatidão e precisão similar. Modificadores químicos não foram necessários e a análise de dois materiais de referência certificado de plantas confirmaram a exatidão do método. Além disso nenhuma diferença significativa foi encontrada para análises das amostras digeridas e em suspensão.

Mierzwa *et al.* (1998) realizaram a determinação comparativa de bário, cobre, ferro, chumbo e zinco em amostras de folhas de chá por duas técnicas de espectrometria atômica. Na primeira, a amostragem de suspensão em GF AAS foi aplicado, sendo os resultados do Ba e Pb calculados usando o método da adição de padrão, e os resultados de Cu, Fe e Zn dos gráficos da curva baseada em padrões aquosos. Estes resultados foram comparados com os resultados obtidos em digestão assistida por microondas em recipientes fechados, seguido por (ICP OES) com a curva em meio aquoso. A exatidão dos métodos estudados foi verificada pela utilização do material de referência de chá certificado. As recuperações dos analitos variaram no intervalo 91-99 % para amostragem de suspensão GF AAS e 92,5-102 % na amostragem líquida para ICP OES.

Meeravali & Kumar (1998) desenvolveram um procedimento de suspensão de atomização rápida para a determinação de Cd, Cu, Mn e Pb em materiais de referência certificados, como repolho, tecidos de ostra e folhas de pomares, usando espectrometria de absorção atômica transversalmente aquecida. A suspensão foi preparada em 5% de HNO_3 , utilizando um agitador magnético. O teste t de Student ao nível de confiança de 95%, foi realizado sobre os resultados obtidos e boa concordância foi observada em

comparação com os valores certificados . Os testes de estabilidade das suspensões em glicerol e HNO_3 indicou perda de Cd em suspensões de repolho e tecidos de ostra . Pb não se mostrou estável em suspensão de repolho em meio HNO_3 0,5% v/v e Cu não se mostrou estável em suspensão em tecidos de ostra na presença de glicerol.

Karadjova & Karadjov (1998), apresentaram procedimentos analíticos simples e rápido para a determinação de Cd e Pb em folhas de banana e álamo por GF AAS. Condições ideais são apresentados para a digestão das plantas com uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, juntamente com programas de temperatura ideais para posterior determinação sem modificador. Procedimentos usando hidróxido de tetrametilamônio ou uma mistura de 1 mol L^{-1} de HNO_3 + $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 têm sido propostas como uma outra abordagem para a análise de rotina rápida e precisa de cádmio e chumbo nas folhas das plantas. Verificou-se que a adição de um padrão único pode ser utilizado para a determinação quantitativa no caso de digestão úmida em GF AAS e adição de um padrão para cada matriz analisada é recomendado no caso de suspensão por GF AAS. Validade e versatilidade dos métodos foram verificados pela análise de materiais de referência padrão.

Takuma *et al.* (1997) utilizaram um método ultra-sônico de amostragem de suspensão por GF AAS para a determinação de Co, Ni e Cu em quatro espécies de plantas *Helichrysum candolleianum*, *Peristrophe decorticans*, *Blepharis diverspinia* e *Tephrosia burchelli*. As plantas foram amostradas em uma área de mineração de cobre e níquel em Botsuana, na África. Para cada espécie de planta; flores, folhas, caule e raízes foram analisadas. O método foi validado por comparação dos resultados da amostragem de suspensão com aqueles a partir da análise de amostras decompostas. Os dois métodos apresentaram precisão e exatidão comparáveis. Os desvios padrão relativos foram na faixa de 1-14 e 1-20 % para amostragem de suspensão e materiais decompostos, respectivamente. Análise dos materiais de referência certificados das plantas também confirmaram a exatidão do método, não houve diferença significativa entre os valores certificados encontrado quando a técnica de amostragem de suspensão foi utilizada.

Manickum & Verbeek (1994), utilizaram amostras de chá disponíveis comercialmente, essas foram moídas em um pilão de ágata. As partículas com diâmetro maior do que cerca de $80 \mu\text{m}$ foram removidas a partir desse material da moagem inicial. As análises da moagem inicial e o material mais fino foram realizados por ICP OES. Enquanto o material de moagem inicial apresentaram resultados para Al, Ba, Mg e Mn até 4,3% mais baixos do que aqueles obtidos quando usando análise de solução

convencional, a nebulização da suspensão de material mais fino originou resultados com desvios padrão relativos entre 0,3 e 1,8% e não significativamente diferentes (nível de confiança de 95%) a partir das técnicas de análise convencionais.

Byrd & Butcher, (1993), investigaram a amostragem sólida e suspensões para a determinação de Ag, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em materiais de referência por GF AAS. Boa exatidão e precisão (3-13%) foram obtidos com amostragem de suspensão, com exceção da determinação de cobre em folhas de citros. Este baixo resultado (três vezes abaixo do valor certificado) e baixa precisão (RSD = 31%) foram provavelmente causados por atomização irreprodutível da matriz da amostra.

Dobrowolski & Mierzwa (1992), usaram GF AAS para determinar cádmio, chumbo, níquel e cobalto em duas amostras de folhas de tabaco (materiais de referência) por amostragem direta de sólidos e amostragem de suspensão. Para ambos os métodos de amostragem investigados os parâmetros ótimos de programas de temperatura-tempo, são discutidos e a influência de modificador Pd e métodos de calibração. Há um acordo entre os resultados obtidos a partir de sólidos, suspensões e solução (depois da decomposição úmida) amostragem direta.

O tamanho de partícula e a falta de homogeneidade da amostra são fatores que podem afetar a precisão e a exatidão das análises, quando a amostragem de suspensão é utilizada. O tamanho de partícula é um fator crítico no preparo das suspensões e, portanto, os erros de quantificação podem ser minimizados quando se trabalha com pequenos tamanhos de partícula (ALVES *et al.*, 2001).

Para contornar o problema da homogeneidade uma opção é preparar uma suspensão da amostra sólida finamente dividida em meio líquido, entretanto, todo cuidado deve ser tomado na moagem e peneiramento do material, devido a possibilidade de ocorrer problemas de contaminação das amostras. Igual problema pode ser encontrado ao se adicionar agentes estabilizantes nas suspensões. Para amostras difíceis de homogeneizar, consegue-se melhorar a precisão quando se aumenta a massa da amostra. Logo após o preparo da suspensão, a amostra sólida deve estar distribuída igualmente no volume do líquido. Dessa forma combinam-se as vantagens das amostragens sólidas e líquidas visto que apenas uma pesagem é requerida por amostra e, assim, é possível empregar procedimentos convencionais de introdução de amostras (sistemas de fluxo, micropipetas e auto-amostradores), com um mínimo de tratamento (MAGALHÃES & ARRUDA, 1998).

3 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver um método para quantificação de Al, Cr, Cu e Zn em amostras de folhas de cana-de-açúcar usando amostragem direta de suspensão e detecção por GFAAS.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a influencia do tamanho de partícula na homogeneização da suspensão;
2. Investigar a estabilização da suspensão na presença de diferentes reagentes;
3. Determinar as melhores temperaturas de pirólise e atomização na presença e ausência de modificador químico;
4. Investigar as vantagens e limitações da amostragem em suspensão em relação ao método convencional de digestão ácida total;
5. Avaliar o método otimizado para análise de amostras de folhas de cana-de-açúcar.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 AMOSTRAS

As amostras usadas para os estudos das suspensões são materiais vegetais provenientes da casa de vegetação, que são utilizados em experimentos com tecidos vegetais realizados no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As determinações dos analitos nas amostras foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GF AAS), modelo Thermo Scientific, Solaar Série M5, com amostrador automático no modo forno (Thermo Scientific, modelo GF 95). Os elementos determinados foram Al (309,3 nm); Cr (357,9 nm); Cu (324,8 nm) e Zn (213,9 nm). Os sinais de absorbância foram registrados em área de pico. O gás de purga utilizado foi o argônio de alta pureza (99,99% - White Martins). O fluxo de gás foi interrompido durante a atomização para aumentar o tempo de residência da nuvem atômica na zona de observação. Foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Perkin Elmer - Optima 2000 DV) para validação do método.

Foi utilizada também, balança analítica, moinho analítico (IKA, modelo A11 basic), estufa, bloco digestor, ultrassom (Unique UltraSonic Cleaner, modelo USC 2800A, com frequência de 40kHz, potência de 150 W), espectrofotômetro UV-Vis (Analyser 850M), peneiras de 106 μm , 75 μm e 53 μm (bronzinox), compressor para aquário (Power 500). Vidrarias em geral, tais como, béqueres, balões volumétricos, também foram utilizadas.

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram reagentes químicos de grau analítico. Os padrões utilizados para a construção das curvas de pirólise e atomização foram preparados a partir de soluções estoque de Al, Cr, Cu e Zn (Vetec) com concentração de 1000 mg L⁻¹. Foram usados nos experimentos HNO₃ (65% v/v –

Vetec), Triton X-100 (Vetec); Glicerol (Vetec), para preparo das suspensões e HClO_4 (Vetec) para a digestão nítrico-perclórica. Todas as vidrarias e frascos plásticos foram descontaminados em banho ácido contendo HNO_3 10% v/v por no mínimo 24 horas sendo posteriormente enxaguados com água deionizada antes de cada utilização. Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura purificada em um sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.4 PROCEDIMENTO

As amostras vegetais depois de serem desidratadas à 65°C até peso constante e moídas em moinho de facas. As amostras foram peneiradas em peneiras de aço inoxidável em diferentes granulometrias (106 μm , 75 μm e 53 μm). As frações com diferentes tamanhos de partículas foram utilizadas para a definição da melhor faixa de tamanho para o preparo das suspensões. As amostras foram peneiradas com a colaboração do Departamento de Zoologia (Mestrado em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal) da UFJF.

4.4.1 Estudo do tamanho de partícula

O estudo do tamanho de partícula foi realizado observando-se o tempo de sedimentação das partículas da amostra. Esse estudo baseou-se no trabalho de Sánches-Moreno *et al.* (2010) que usou o índice de refletância para mediar a taxa de sedimentação de partículas de amostras em folhas de pinheiros.

Para a realização desse estudo foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis. Foram pesadas massas de 15 e 30 mg da amostra com diferentes granulometrias, maior que 106 μm , entre 75 e 106 μm , entre 53 e 75 μm e menor que 53 μm .

O procedimento foi realizado primeiramente pesando-se 15 mg da amostra diretamente na cubeta do espectrofotômetro onde posteriormente adicionou-se 3 mL de água deionizada na mesma. A amostra foi homogeneizada por 30 segundos manualmente e realizada a leitura no espectrofotômetro imediatamente após agitação. O mesmo procedimento foi repetido, porém, empregando Triton X-100 0,04% v/v. O comprimento de onda adotado para os experimentos foi de 660 nm, pois não haveria interferência do solvente com a amostra, sendo este mantido para todos os estudos. O mesmo procedimento foi realizado para a massa de 30 mg de amostra.

Além da homogeneização manual, foi testado a homogeneização usando energia de ultrassom. Sendo que nos estudos por ultrassom a massa da amostra utilizada foi de 15 mg. Baseado no trabalho de Oliveira (2009); também foi testada a homogeneização por borbulhamento com a utilização de um compressor de aquário adaptado para uso diretamente na cubeta. Nos experimentos com borbulhamento as suspensões foram preparadas pesando cerca de 15 mg do material homogêneo previamente moído. Esse experimento foi realizado apenas em meio aquoso, pois a suspensão já se manteve estável nesse meio.

4.4.2 Estudo do melhor agente estabilizante

Os agentes estabilizantes foram escolhidos de acordo com Sánchez-Moreno *et al.* (2010). Nesse trabalho os autores usaram ácido nítrico 5% v/v, mistura de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, Triton X-100 0,04% v/v e Glicerol 1% v/v para preparar suspensões de amostras de folhas de pinheiros. Com a definição da proporção da suspensão (massa por volume) e do tamanho de partícula mais adequada; uma massa de 10 mg de amostra de folha de cana-de-açúcar peneirada com tamanho de partícula menor que 53 μm e pesada diretamente no frasco utilizado no aparelho GF AAS. Adicionou-se a essa amostra 1 mL de agente estabilizante, para o preparo da suspensão e escolha do melhor sinal dos analitos na suspensão. Ficando assim a suspensão preparada na razão de 10 mg mL⁻¹.

4.4.3 Estudo do melhor tempo de borbulhamento

Esse estudo foi realizado variando-se o tempo de borbulhamento em 15, 30, 45 e 60 segundos com posterior leitura no GF AAS. A suspensão foi preparada pesando-se uma massa de 10 mg de amostra com granulometria menor que 53 μm e posterior adição de 1 mL de agente estabilizante ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, ficando a suspensão na proporção de 10 mg mL⁻¹. Uma amostra foi preparada para cada variação de tempo de borbulhamento.

4.4.4 Estudo das curvas de pirólise e atomização dos elementos

As temperaturas ótimas de pirólise e atomização foram estabelecidas através da construção de curvas de área de pico *versus* temperatura. Para isso, foram utilizados

padrões de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, diluídos automaticamente a uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (para o Al, Cu, Cr e Zn) nos estudos em meio nítrico 5 % v/v:Triton X-100 0,04 % v/v. O branco utilizado foi uma solução de ácido nítrico 5% v/v: Triton X-100 0,04 % v/v para os estudos realizados nesse meio. O volume total de suspensão de amostra inserida no forno foi de $20 \mu\text{L}$.

Para o estabelecimento do programa de aquecimento na presença da amostra, foi preparada uma suspensão de 100 mg de amostra em 10 mL de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, ficando a suspensão na razão de 10 mg mL^{-1} . Uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ dessa suspensão foi inserida no forno para a construção das curvas de pirólise e atomização.

As curvas de pirólise e atomização na matriz foram construídas com e sem a presença de modificador químico. Nos estudos do elemento cobre não foi necessário o uso de modificadores químicos, pois as curvas de pirólise e atomização se mantiveram estáveis nessas condições estabelecidas. Já para os elementos alumínio e cromo foi utilizado $50 \mu\text{g}$ de Mg como modificador químico e $25 \mu\text{g}$ de Pd na determinação de zinco. As soluções dos modificadores foram preparadas considerando as massas necessárias destes em um volume total de $20 \mu\text{L}$ inseridos no forno.

O frasco de lavagem do amostrador automático foi preenchido com ácido nítrico 5% v/v para evitar adsorção das soluções no capilar. As medidas foram realizadas em triplicata. Para a construção das curvas de pirólise e atomização a temperatura foi variada em incrementos de $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Na Tabela 1 estão as condições experimentais do GF AAS.

Tabela 1- Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Al, Cr, Cu e Zn.

Etapa	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Rampa ($^\circ\text{C s}^{-1}$)	Permanência (s)	Fluxo de gás (L min^{-1})	Medida
Secagem	100	10	30	0,2	Não
Pirólise	400 – 2100 ^a	150	20	0,2	Não
Atomização	1400 – 2900 ^a	-	3	-	Sim
Limpeza	2500 – 2900 ^b	-	3	0,2	Não

^aAs temperaturas de pirólise e atomização foram variadas para construção das curvas.

^bA temperatura de limpeza foi definida depois de se encontrar a melhor temperatura de atomização.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.4.5 Digestão Nítrico-Perclórica (HNO₃:HClO₄)

Os extratos obtidos por meio deste método foram utilizados para a determinação dos teores de Al, Cr, Cu e Zn em folha de cana-de-açúcar em ICP OES. Pesou-se cerca de 0,5 g da amostra previamente seca e moída, transferiu-se para tubos de digestão. Acrescentou-se cerca de 10 mL de uma mistura de ácido nítrico (HNO₃):ácido perclórico (HClO₄), elevou-se inicialmente a temperatura à 70 °C, aumentado-a gradativamente até 210 °C.

A digestão foi finalizada quando a solução se tornou incolor, aparecendo uma fumaça branca e densa do ácido perclórico. Então, resfriou-se e adicionou-se à amostra 75 mL de água deionizada, agitando o tubo para lavagem da parede interna. Dessa forma a amostra apresenta-se pronta para a análise.

4.4.6 Validação dos métodos

Para validação dos métodos, foram construídas curvas analíticas em meio aquoso e adição de padrão para os elementos estudados. A mesma amostra utilizada para avaliação dessas curvas analíticas em suspensão foi submetida à digestão nítrico-perclórica e posterior análise em ICP OES para avaliar a exatidão do método proposto em GF AAS em relação a essa técnica.

A curva analítica é o método de quantificação mais utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações de um dado analito. A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível se relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração do analito). As técnicas de se adequar a reta aos dados e verificar o quanto a reta descreve os dados chamam-se regressão e correlação, respectivamente (CHASIN *et al.*, 1998).

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A medição pode ser alterada porque os reagentes, amostra ou outros componentes, alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque esses compostos afetam diretamente a resposta. Os efeitos de erros constantes

(interferências) e erros proporcionais (efeito matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo (INMETRO, 2003).

A curva analítica aquosa obtida no instrumento, ou seja, com os padrões preparados em água, relaciona a resposta do aparelho com a massa do analito, sem levar em conta a interferência da matriz, já a curva analítica por adição de analito à matriz visa eliminar interferência da matriz e de outras etapas do método.

O efeito da matriz pode ser testado comparando-se as inclinações das curvas analíticas do instrumento, sem a matriz, com a curva analítica por adição de padrão. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear foram as mesmas, o único efeito matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito. Para tal, são preparadas 3 curvas analíticas do instrumento e 3 curvas analíticas com adição de analito com leituras em triplicata. Primeiro, faz-se o teste F para verificar se as variâncias das inclinações podem ser consideradas similares, calculando-se:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Equação 1})$$

onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada inclinação, com a maior variância no numerador. Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de F_{Tabelado} , com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador; usualmente, adota-se um nível de confiança de 95%. Tem-se dois casos:

(I) se o teste F não é significativo, isto é, se o $F_{\text{calculado}}$ for menor que o F_{Tabelado} , a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Nesse caso, os desvios-padrões dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student. Neste caso, calculam-se:

x_1 e x_2 = médias das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz” na mesma faixa de concentrações,

s_1^2 e s_2^2 = variâncias das respostas dos analitos dos dois grupos de amostras, bem como o valor

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (\text{Equação 3})$$

n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras 1 e 2.

O valor de t_{Tabelado} é obtido a partir da Tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

(II) Se o teste F é significativo, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, as variâncias podem ser consideradas desiguais e o $t_{\text{calculado}}$ é calculado por:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Equação 4})$$

Neste caso, para a obtenção do t_{Tabelado} , o número de graus de liberdade (n) é igual a:

$$v = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (\text{Equação 5})$$

No caso de somente uma faixa relativamente estreita de concentrações interessar, ou se o erro analítico devido a uma possível dependência com a concentração for desprezível, o teste t com dados pareados pode ser utilizado para verificar efeitos de matriz. O cálculo neste caso é:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

$$\bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{(d_{i1} - d_{i2})}{n} \quad (\text{Equação 7})$$

$$s_d = \frac{\sum_{i=1}^n [(d_{i1} - d_{i2}) - \bar{x}_d]^2}{n - 1} \quad (\text{Equação 8})$$

Nas equações, x_d = média das diferenças entre as respostas dos pares de analitos; d_{i1} , d_{i2} = respostas do analito para o par de amostras “com matriz” e “sem matriz”; s_d = desvio padrão das diferenças e n = número de pares. O valor de t_{Tabelado} é obtido da distribuição t de Student com $(n-1)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o t_{Tabelado} , pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio. Se o valor de t for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio.

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

No caso de técnicas instrumentais (HPLC, GC, AAS), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Pode ser determinado pela equação:

$$LD = \frac{3,0 \times S}{\alpha} \quad (\text{Equação 9})$$

em que: s é o desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva analítica; α é a inclinação da curva de analítica.

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{10 \times S}{\alpha} \quad (\text{Equação 10})$$

em que: s é o desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva de analítica; α é a inclinação da curva de analítica.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade do método é verificada por no mínimo 3 concentrações, baixa, média e alta, contemplando o intervalo linear do método, realizando-se, no mínimo, 5 determinações por concentração (ANVISA, 2003).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$CV\% = \frac{s}{C} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

em que, s é o desvio padrão e C , a concentração média determinada.

A sensibilidade de métodos em AAS é dada pela concentração característica (β_0 ou c_0) e pela massa característica (m_0). Essa concentração ou massa corresponde a uma absorvância de 0,0044 ou uma absorvância integrada de 0,0044s (1% de absorvância). Com o método no forno de grafite, o volume de amostra pode variar com a viscosidade, amostra efetivamente útil e capacidade do tubo. Por isso, a massa característica é mais usada do que a concentração característica. A unidade usada para quantificar a massa característica é o picograma (10^{-12} g) (WELZ & SPERLING, 1999).

$$Massa\ característica = \frac{volume\ (\mu L) \times concentração\ (\mu g\ L^{-1}) \times 0,0044}{absorvância\ da\ amostra} \quad (\text{Equação 12})$$

Após obter as melhores condições de aquecimento do forno com as curvas de pirólise e atomização para cada elemento. Foi realizado o estudo para avaliar possíveis efeitos de matriz. Na técnica de GF AAS a presença de efeitos de matriz podem ser determinados a partir da comparação dos resultados obtidos com curvas analíticas construídas em meio aquoso e com curvas de adição de padrão. Os resultados também foram comparados com a técnica de ICP OES após digestão nítrico-perclórica das amostras. Nesse estudo, as inclinações de três curvas obtidas foram comparadas estatisticamente, através de testes *F* e *t* de Student.

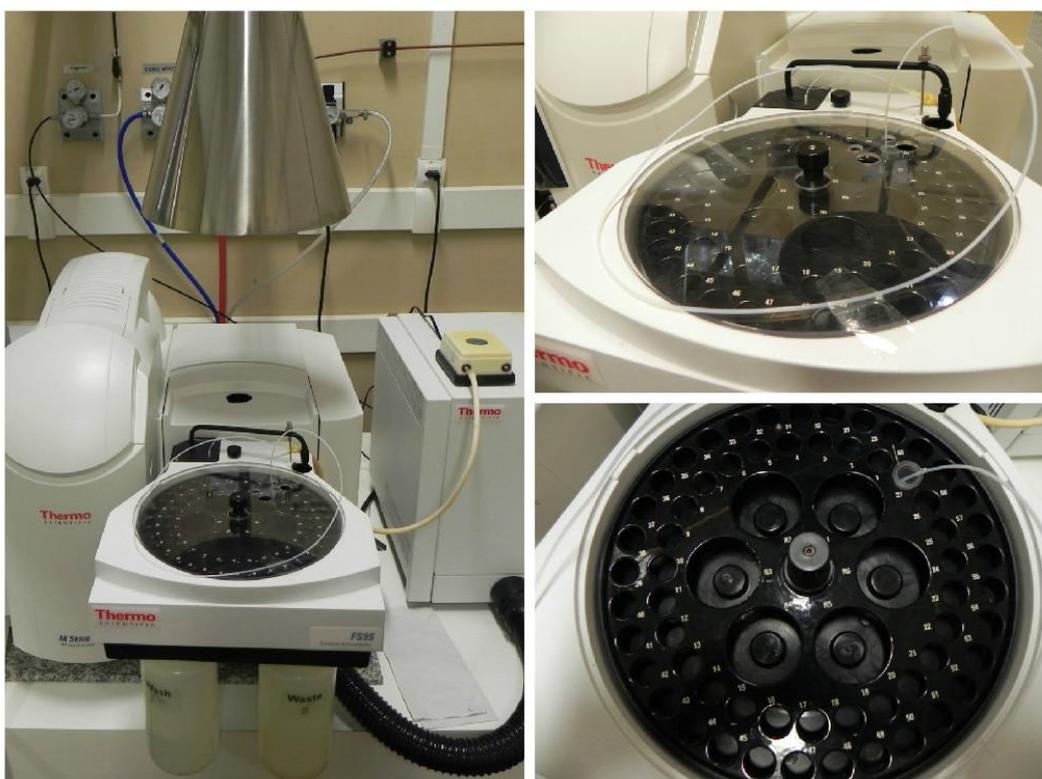
Foram realizadas medidas ($n = 10$) nas soluções em branco para os cálculos do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os LD's e LQ's instrumentais foram calculados multiplicando o desvio padrão por 3 e 10, respectivamente e dividindo o resultado pelo coeficiente angular da curva analítica. Para calcular os valores de LD e LQ do método proposto, foi calculado um fator de correção considerando a massa da amostra utilizada no método e o volume final da suspensão (HARRIS, 2005). Para avaliar a sensibilidade, nas condições dadas as massas características (m_0) foram calculadas dividindo o valor 0,0044 pelo coeficiente angular da curva analítica, multiplicado pelo volume de amostra introduzido no tubo (20 μ L) (WELZ, 1985; SLAVIN, 1984).

4.4.7 Determinação de Al, Cr, Cu e Zn em amostras de folha de cana-de-açúcar.

Para a determinação dos elementos Al, Cr, Cu e Zn em amostras de folha de cana-de-açúcar, foram realizados experimentos com as plantas de cana-de-açúcar cultivadas no laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal, da Embrapa Gado de Leite, onde foram submetidas à solução nutritiva de acordo com Clark (1975). Os nutrientes presentes nessa solução exercem uma força iônica sobre o material vegetal. O experimento reduziu essas quantidades de nutrientes para observar se esse efeito afetaria a absorção dos metais nas plantas. O experimento com 1/8 de força iônica possui a metade dos nutrientes do 1/4 força, este possui metade dos nutrientes do 1/2 força, que possui metade dos nutrientes da solução original apresentada por Clark (1975).

Além da quantidade de nutrientes disponíveis para as amostras, houve também a adição de 6 mg L^{-1} de Al e de 5 mg L^{-1} de Cr para avaliar a toxicidade desses metais e a absorção destes pela planta. As amostras de folha de cana-de-açúcar do experimento de força iônica realizado na Embrapa Gado de Leite foram desidratadas à 65°C até peso constante, moídas em moinho de facas e peneiradas em peneiras de aço inoxidável de $53\mu\text{m}$, sendo posteriormente analisadas por GF AAS após otimização das condições de preparo das suspensões das amostras e das condições experimentais do GF AAS. Também foi empregado durante os experimentos um aerador de aquário de forma a manter as suspensões estáveis, conforme apresentado da Figura 4.

Figura 4 - Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GF AAS) com o uso de aerador de aquário para manter suspensão homogênea.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA MASSA E TAMANHO DE PARTÍCUL DA AMOSTRA

Esse experimento foi executado com o objetivo de escolher o tamanho de partícula mais adequado (granulometria), a melhor massa e o melhor agente estabilizante para o preparo da suspensão de folhas de cana-de-açúcar.

O tamanho de partícula ideal para o preparo da suspensão foi avaliada observando-se o tempo de sedimentação da mesma (Figuras 5a e 5b). Quanto mais lenta a velocidade de sedimentação da amostra melhor, pois significa que as partículas permanecem por um tempo maior em suspensão. Esse comportamento foi avaliado usando um espectrômetro UV- Vis, onde foi observado o decaimento do sinal de absorvância com o tempo. A Lei de Beer estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando esta é atravessada por uma radiação luminosa monocromática. A absorção da luz é tanto menor quanto menos concentrada for a solução por ela atravessada, originando assim menor valor de sinal de absorvância (A) que é determinada diretamente por leitura no espectrofotômetro. Consequentemente, quanto menor a concentração; menor a quantidade de partículas presentes em suspensão.

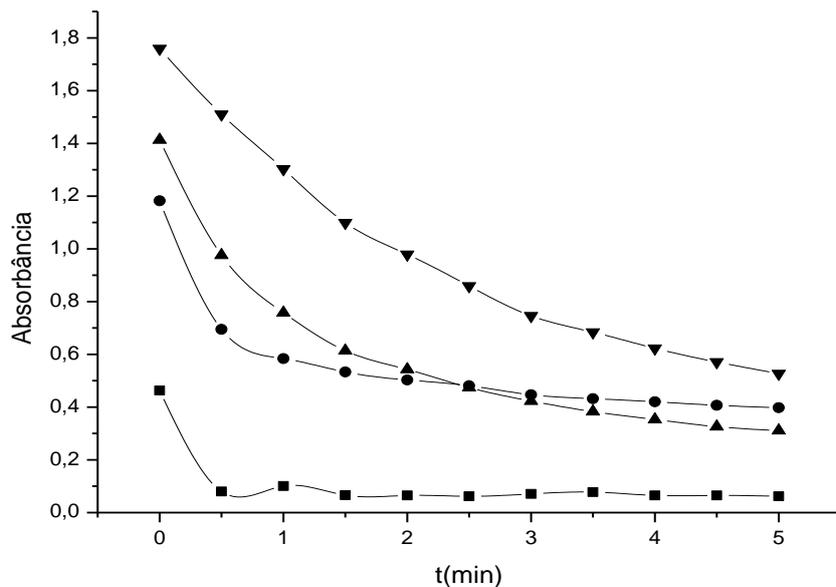
A massa de amostra utilizada para o preparo da suspensão de folhas de cana-de-açúcar foi outro parâmetro avaliado. Segundo Sanches-Moreno *et al.* (2010) quanto maior a massa da suspensão maior a sensibilidade do método para determinação dos analitos presentes em baixas concentrações na amostra. Também existe uma razão ótima entre a massa utilizada e a velocidade de sedimentação, onde a homogeneização da suspensão é avaliada observando o tempo em que houver um decaimento cerca de 10% do valor do sinal de absorvância em relação ao tempo inicial, teoricamente o ponto anterior ao início do processo de sedimentação (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2010). Nesse estudo as massas escolhidas foram 15 e 30 mg. Considerando o volume da cubeta do espectrofotômetro que pode se preenchida com um volume de até 3 mL de solução, a proporção de suspensão na cubeta foi de 5 mg mL⁻¹ ou 10 mg mL⁻¹. De acordo com Amoedo *et al.* (1999), essas razões massa/volume são adequadas para o preparo de suspensões vegetais. Inicialmente a suspensão foi homogeneizada manualmente por um período de 30 segundos. Após esse tempo a suspensão foi imediatamente colocada no espectrofotômetro.

Os resultados em meio aquoso (Figura 5a-b) mostraram que a sedimentação das partículas nas amostras tem início imediato independentemente da massa utilizada. Empregando uma massa de 15 mg as partículas com granulometrias maiores que 106 μm sofreram sedimentação em torno de 80% em menos de trinta segundos, partículas entre 75 e 106 μm sofreram sedimentação em torno de 40% em trinta segundos, partículas entre 53 e 75 μm sedimentaram 30% em trinta segundos e partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 10% em trinta segundos (Figura 5a). De acordo com os resultados apresentados, partículas com granulometria menor do que 53 μm permanecem por mais tempo distribuídas na fase líquida possibilitando a formação de uma suspensão mais homogênea.

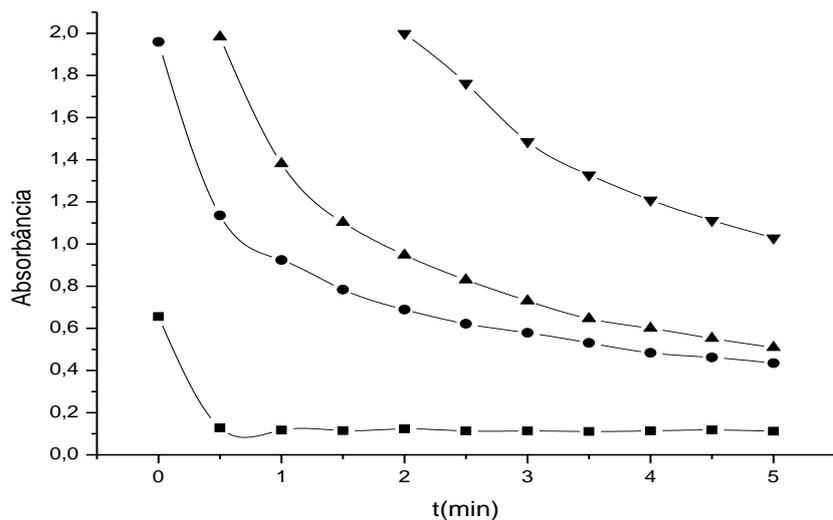
Comportamento semelhante foi observado para uma massa de 30 mg em meio aquoso (Figura 5b), onde partículas com granulometrias maiores que 106 μm sofreram sedimentação em torno de 75% em torno de 30 segundos. Já partículas entre 75 e 106 μm sofreram sedimentação em torno de 40% em trinta segundos, partículas entre 53 e 75 μm sedimentaram 30% em trinta segundos e partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 10% em trinta segundos. Novamente os melhores resultados foram observados para a suspensão preparada com partículas menores que 53 μm .

Os resultados na presença do agente estabilizante Triton X-100 0,04% v/v (Figura 6a e 6b) também mostraram que a sedimentação das partículas nas amostras teve início imediato independentemente da massa utilizada. Empregando uma massa de 15 mg, as partículas com granulometrias maiores que 106 μm sofreram sedimentação em torno de 80% em menos de trinta segundos, partículas entre 75 e 106 μm sofreram sedimentação em torno de 50% em trinta segundos, partículas entre 53 e 75 μm sedimentaram 30% em trinta segundos e partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 8% em trinta segundos (Figura 6a). De acordo com os resultados apresentados, partículas com granulometria menor do que 53 μm permanecem por mais tempo distribuídas na fase líquida possibilitando a formação de uma suspensão mais homogênea.

Figura 5 - (a) Decaimento da absorvância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, por agitação manual de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorvância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, por agitação manual de 30 segundos para 30 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm . (■) maior que 106 μm (●) entre 75 e 106 μm (▲) entre 53 e 75 μm (▼) menor que 53 μm .



(a)



(b)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

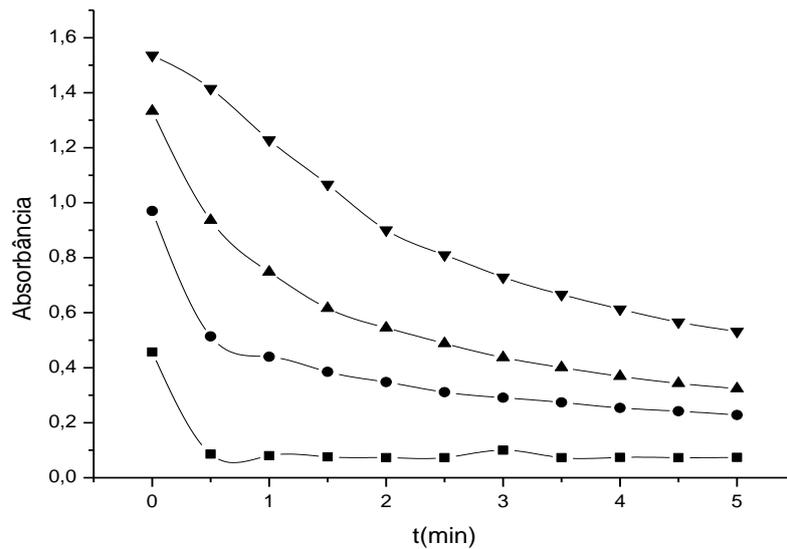
Comportamento semelhante foi observado para uma massa de 30 mg em meio Triton X-100 0,04% v/v (Figura 6b). Partículas com granulometrias maiores que 106 μm sofreram sedimentação em torno de 75% em menos de trinta segundos, partículas entre 75 e 106 μm sofreram sedimentação em torno de 20% em trinta segundos, partículas entre 53 e 75 μm sedimentaram 26% em trinta segundos e partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 12% em trinta segundos. É possível concluir que a menor velocidade de sedimentação é obtida com tamanho de partícula menor que 53 μm .

Os resultados em meio Triton X-100 0,04% v/v, não diferenciaram no comportamento da sedimentação da suspensão em relação à preparada em água deionizada. Esses resultados foram concordantes com os estudos de Sánchez-Moreno *et al.* (2010) e Engelsen & Wibetoe (2000). Segundo esses pesquisadores as suspensões mais estáveis foram obtidas quando o tamanho de partícula foi menor que 100 μm .

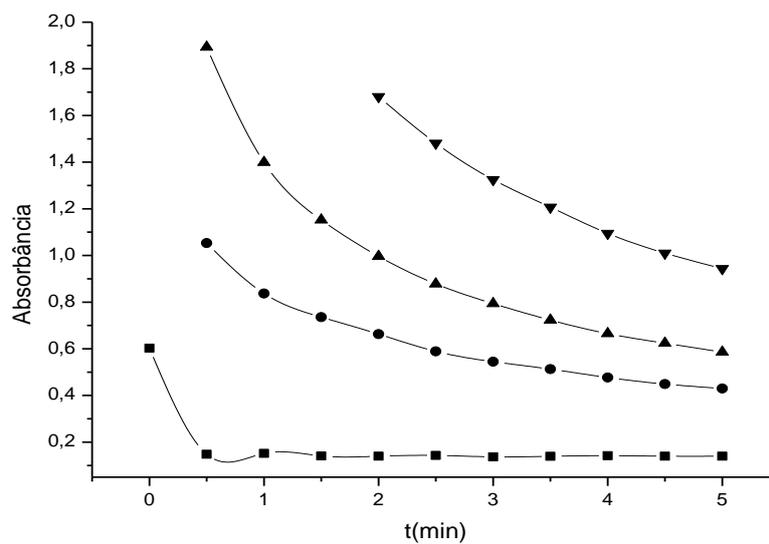
A agitação por ultrassom foi outro parâmetro testado com o objetivo de obtenção de uma melhor homogeneização e estabilização da suspensão. Foi escolhido um tempo de 30 segundos de agitação por ultrassom já que esse também foi o tempo definido para a agitação manual, a massa de 15 mg de amostra foi utilizada pois nos experimentos de agitação manual não houve diferenças no comportamento das suspensões preparadas empregando massas de 15 e 30 mg.

Os resultados em meio aquoso (Figura 7a), empregando uma massa de 15 mg, demonstraram que as partículas com granulometrias maiores que 106 μm e entre 75 e 106 μm sofreram sedimentação em torno de 10% em trinta segundos. Porém, apesar da baixa taxa de sedimentação, a agitação por ultrassom não se mostrou eficiente para esses tamanhos de partículas, resultando em uma suspensão não homogênea; já as partículas entre 53 e 75 μm sedimentaram em torno de 6% em trinta segundos e partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 9% em trinta segundos. Nesses tamanhos de partículas a agitação por ultrassom se mostrou mais eficiente, apesar da suspensão visualmente não apresentar uma completa homogeneização.

Figura 6 - (a) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v, por agitação manual de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorbância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v, por agitação manual de 30 segundos para 30 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm . (■) maior que 106 μm (●) entre 75 e 106 μm (▲) entre 53 e 75 μm (▼) menor que 53 μm .



(a)



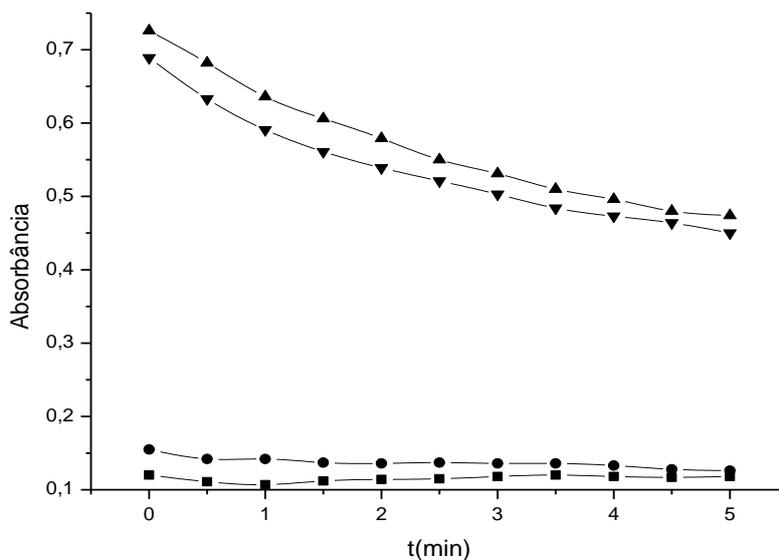
(b)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

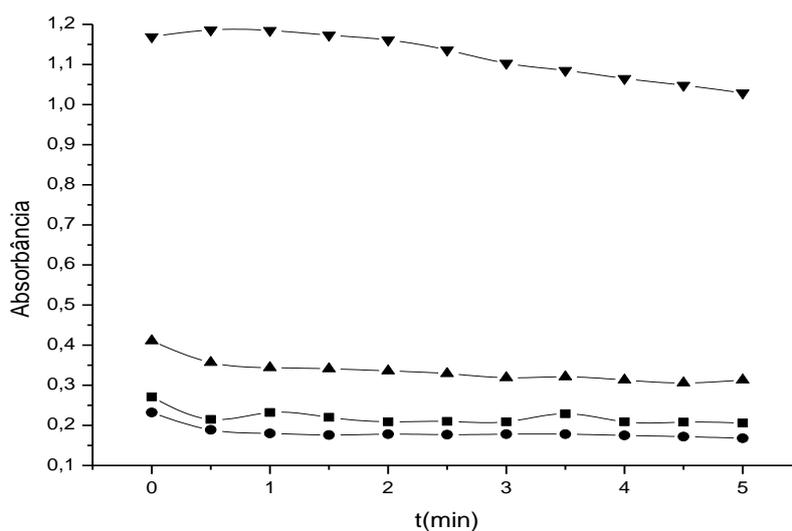
Os resultados em meio Triton X-100 0,04% (Figura 7b), empregando também uma massa de 15 mg de amostra, apresentou comportamento semelhante observado para as partículas com granulometrias maiores que 106 μm , entre 75 e 106 μm e entre 53 e 75 μm que sedimentaram em torno de 20% em trinta segundos. Apesar da pequena queda de sinal novamente, a agitação por ultrassom não se mostrou eficiente para esses tamanhos de partículas, resultando em uma suspensão não homogênea. Já partículas menores que 53 μm sedimentaram em torno de 9% em trinta segundos e mais uma vez, a agitação por ultrassom se mostrou mais eficiente, apesar de também não ter homogeneizado toda a suspensão. Os melhores resultados observados para a suspensão preparada foram com partículas menores que 53 μm e em meio Triton X-100 0,04% v/v. No entanto, a agitação da solução por ultrassom apresentou dificuldade para homogeneização da amostra na cubeta do espectrofotômetro, resultando em valores baixos de absorvância desde o início da análise.

Uma terceira opção de estabilização da suspensão testada foi o uso de borbulhamento contínuo da suspensão com ar (Figura 8). Para o estudo no espectrofotômetro, uma suspensão de 15 mg de amostra com tamanho de partícula menor que 53 μm , foi preparada em meio aquoso com borbulhamento constante. A estratégia do borbulhamento foi escolhida baseada no estudo de Oliveira (2009) que obteve bons resultados na preparação de suspensão em amostras de mandioca e batata para quantificação de As, Cd, Ni e Pb por GF AAS. Assim, no presente trabalho foram utilizadas as melhores condições baseadas nos estudos anteriores, ou seja, 15 mg de amostra com tamanho de partícula menor que 53 μm , para o estudo da agitação por borbulhamento. O meio aquoso foi escolhido para observar se mesmo em presença de água somente, a suspensão se apresentava estável, no que diz respeito à homogeneização da suspensão monitorada por UV-Vis. Como os valores de absorvância foram semelhantes aos valores de absorvância quando a suspensão foi preparada em meio Triton X-100 0,04%, o estudo não foi repetido nesse meio.

Figura 7 - (a) Decaimento da absorvância em diferentes tamanhos de partículas em meio aquoso, agitação por ultrassom de 30 segundos para 15 mg de amostra, comprimento de onda 660 nm (b) Decaimento da absorvância em diferentes tamanhos de partículas em meio Triton X-100 0,04% v/v agitação por ultrassom de 30 segundos para 15 mg de amostra , comprimento de onda 660 nm. (■) maior que 106 μm (●) entre 75 e 106 μm (▲) entre 53 e 75 μm (▼) menor que 53 μm .



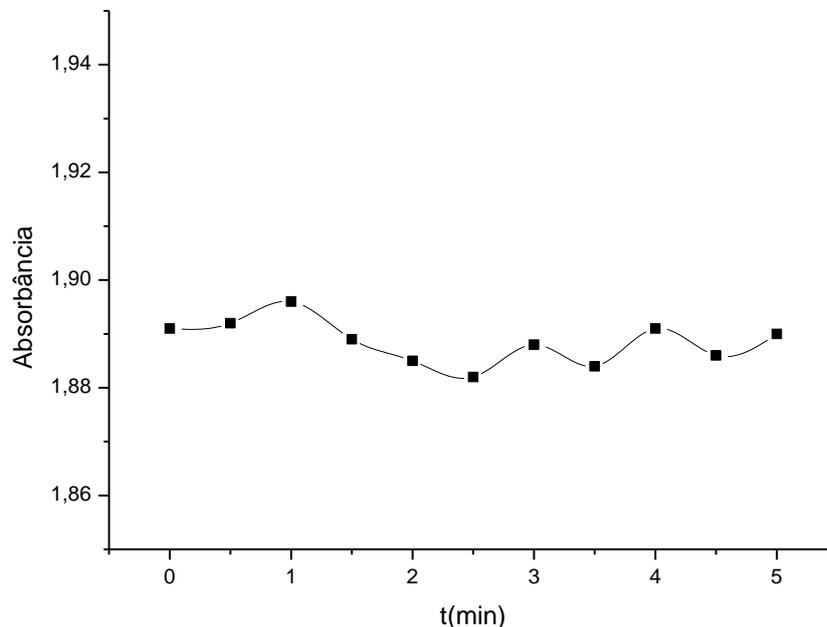
(a)



(b)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 8 - Decaimento da absorbância em 15 mg de amostra de folha de cana menor que 53 μm e com borbulhamento constante, comprimento de onda 660 nm. (■) menor que 53 μm .



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.2 ESTUDO DO MELHOR AGENTE ESTABILIZANTE

Após a definição do tamanho de partícula, da massa e da melhor estratégia de homogeneização da suspensão, investigou-se o comportamento do agente estabilizante diretamente no GF AAS. No UV-Vis o sinal de absorbância depende somente das características da suspensão, como tamanho de partícula e massa, não sendo influenciado pelas características do analito presente e natureza da amostra. Portanto, havia a necessidade de saber a influencia de diferentes agentes estabilizantes sobre a intensidade do sinal de absorbância dos analitos no GF AAS. Diferentes diluentes têm sido utilizados para preparo de suspensões de plantas. Esses diluentes podem agir tanto como estabilizantes das suspensões, como extrator das espécies de interesse, melhorando a exatidão, sensibilidade e precisão (CAL-PRIETO *et al.*, 2002; AMOEDO *et al.*, 1999; ENGELSEN & WIBETOE, 2000).

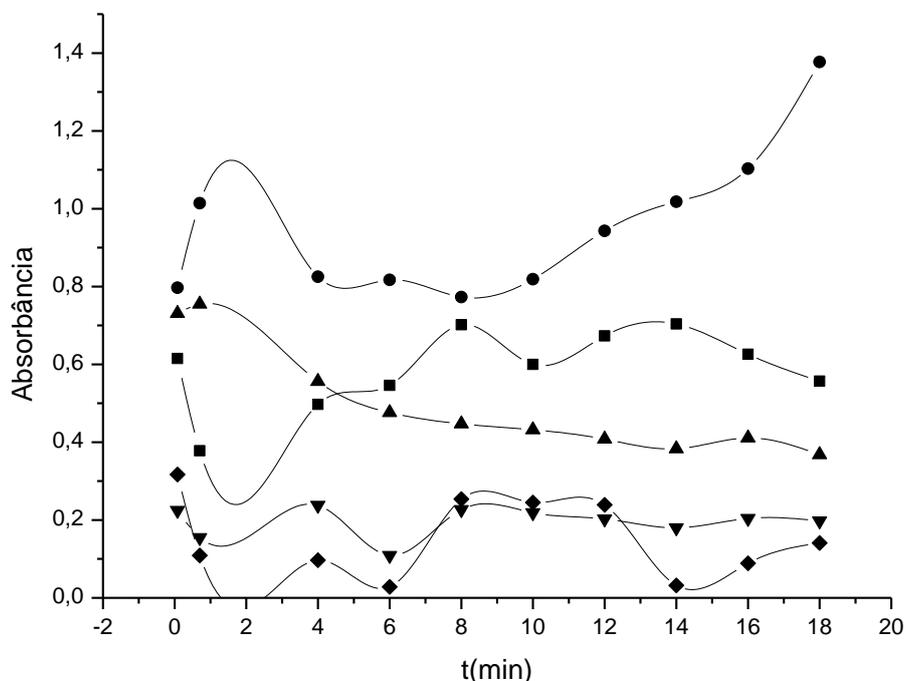
Nesse estudo o elemento cobre (324,8 nm) foi escolhido de acordo com o trabalho de Engelsen & Wibetoe (2000), para a avaliação do comportamento da suspensão na

presença de diferentes agentes estabilizantes. A massa (15 mg), a homogeneização da suspensão (borbulhamento) e a granulometria (menor que 53 μm) adotadas foram definidas a partir dos resultados prévios (seção 5.1). Os agentes estabilizantes escolhidos de acordo com a literatura (SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 2010, ENGELSEN & WIBETOE, 2000; AMOEDO *et al.*, 1999; MOKGALAKA *et al.*, 2004) foram: água deionizada, ácido nítrico 5% v/v, mistura de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, Triton X-100 0,04% v/v e Glicerol 1% v/v.

As suspensões foram preparadas com 15 mg de amostra com granulometria menor que 53 μm em cada agente estabilizante mencionado anteriormente, sendo aeradas constantemente. De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, a suspensão preparada com glicerol 1% v/v apresentou comportamento similar aos observados com a suspensão preparada somente com água deionizada. Embora o sinal de cobre tenha permanecido estável ao longo do tempo, foi significativamente menor em relação aos sinais obtidos nos demais reagentes. A queda de sinal nesses agentes foi de aproximadamente 60% em relação ao ácido nítrico 5% v/v. Sánchez-Moreno *et al.* (2010) observaram extrações superiores a 80% para o elemento cobre na presença de ácido nítrico 5% v/v, esses maiores valores de concentração de cobre podem estar relacionados com a extração parcial do analito.

O uso somente do Triton X-100 0,04% v/v apresentou queda de sinal no decorrer do tempo. A porcentagem de queda após 18 minutos foi de aproximadamente 50%. Os melhores valores de sinais foram observados com ácido nítrico 5% v/v e com a mistura ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, onde houve um acréscimo de sinal de absorbância com o decorrer do tempo, indicando uma relação direta entre o potencial de extração e o tempo de contato da fase sólida com o agente estabilizante.

Figura 9 - Sinal da absorvância do cobre em diferentes meio de agentes estabilizantes, no decorrer de 20 minutos em GF AAS. (●) ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v (■) ácido nítrico 5% v/v (▲) Triton X-100 0,04% v/v (▼) Glicerol 1% v/v (◆) água deionizada.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.3 ESTUDO DO MELHOR TEMPO DE BORBULHAMENTO

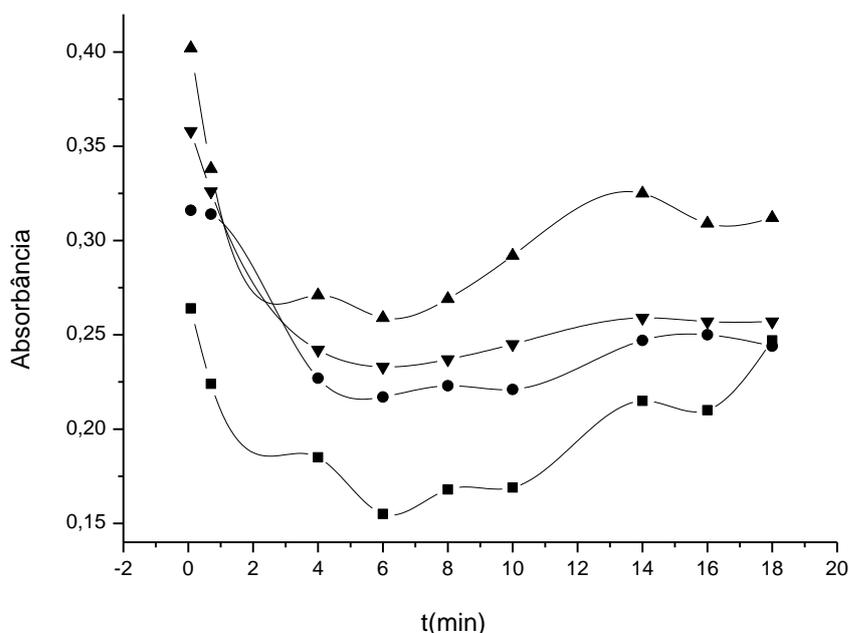
O estudo do comportamento do agente estabilizante foi realizado na presença de borbulhamento, porém os resultados na presença de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, ocorreu à formação de espuma que pode levar a perdas de solução. Dessa forma foi realizado um estudo objetivando observar se o tempo de borbulhamento influenciaria o sinal de absorvância do elemento na suspensão.

Nesse estudo as suspensões foram preparadas diretamente nas amostras em meio nítrico 5% v/v: Triton X-100 0,04% v/v. Os seguintes tempos de agitação do sistema foram investigados: 15, 30, 45 e 60 segundos antes da injeção da suspensão no tubo de grafite.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, observou-se que o tempo de 15 segundos de borbulhamento foi o que apresentou pior resultado, apresentando

baixos valores de sinais analíticos. O tempo de 30 e 60 segundos apresentaram valores dos sinais analíticos semelhantes e melhores que os valores observados no tempo de 15 segundos; já o tempo de 45 segundos também apresentou bons resultados e sinais analíticos maiores que os demais. No entanto, o tempo de 30 segundos foi o escolhido, pois 45 segundos apresentou instabilidade nos valores dos sinais analíticos do cobre na suspensão. Portanto o tempo de borbulhamento da suspensão foi fixado em 30 segundos para os experimentos seguintes.

Figura 10 - Diferentes tempos de borbulhamento para suspensões preparadas em meio de ácido nítrico 5% v/v e Triton X-100% v/v. (■) 15 segundos; (●) 30 segundos; (▲) 45 segundos e (▼) 60 segundos.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.4 ESTUDO DAS CURVAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO DOS ELEMENTOS

Objetivando o conhecimento do comportamento térmico dos analitos e matriz, e consequentemente, reduzir possíveis efeitos de matriz, a influência das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cr, Cu e Zn foram estudadas na presença da mistura de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v na ausência e presença da matriz.

Empregando o programa de aquecimento mostrado na Tabela 1 (pág.35). Os experimentos realizados na presença da folha de cana-de-açúcar, ou seja, as suspensões preparadas foram com tamanho de partícula menor que 53 μm , concentração da suspensão de 10 mg mL^{-1} e agitação por 30 segundos usando borbulhamento.

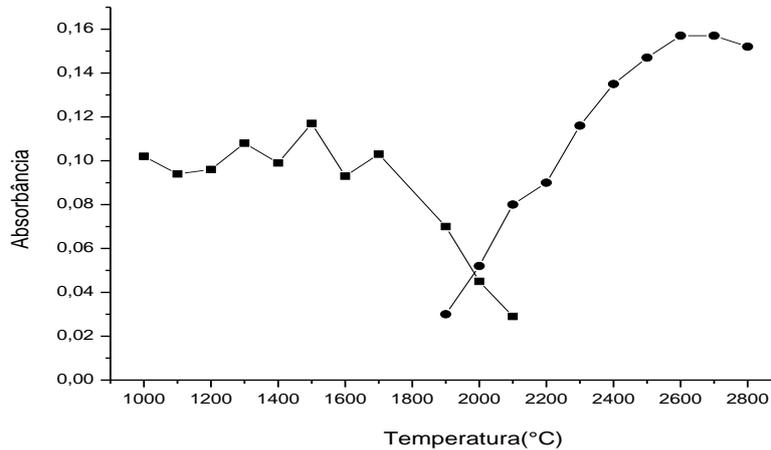
5.4.1 Curvas de pirólise e atomização para Al

Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al foram experimentalmente obtidas em meio de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v para estabelecimento da máxima temperatura de pirólise sem perdas de Al por volatilização. A curva de pirólise foi gerada pela variação de temperatura de 800 a 2100°C (Figura 11), mantendo-se a temperatura de atomização fixa em 2300°C. O sinal máximo de absorvância para a curva de pirólise ocorreu em uma temperatura de 1500°C, apresentando um desvio de 0,03. Já a curva de atomização foi gerada pela variação da temperatura de atomização de 1900 a 2800°C, com a temperatura de pirólise fixa em 1500°C. O máximo sinal para a atomização ocorreu em 2600°C (Figura 11). O desvio padrão foi de 0,007 para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al na etapa de atomização.

Curvas de temperatura de pirólise na suspensão preparada foram geradas pela variação de temperatura de 1000 a 2100°C, mantendo-se a temperatura de atomização fixa em 2300°C. A curva de atomização foi construída a partir de uma variação de temperatura de 1800°C a 2500°C (Figura 12). Pela curva de temperatura de pirólise na suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v verificou-se a estabilidade térmica do Al em folha de cana até a temperatura de 1800°C, com desvio padrão de 0,094. Para a curva de atomização, a maior sensibilidade no sinal analítico foi obtida para a temperatura de 2500°C, com desvio padrão de 0,032 (Figura 12a). Na suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico (WELZ *et al.* 1992) a temperatura máxima de pirólise encontrada foi de 1700°C, com desvio padrão de 0,045. A partir dessa temperatura há quebras de compostos de Al tais como $3\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2$ a 1750°C e Al_2TiO_5 a 1860°C (LIDE, 2009). Já a máxima temperatura de atomização foi de aproximadamente 2400°C, com desvio padrão de 0,104 (Figura 12b). Conclui-se então que nos estudos para o elemento Al a suspensão preparada em meio de ácido nítrico

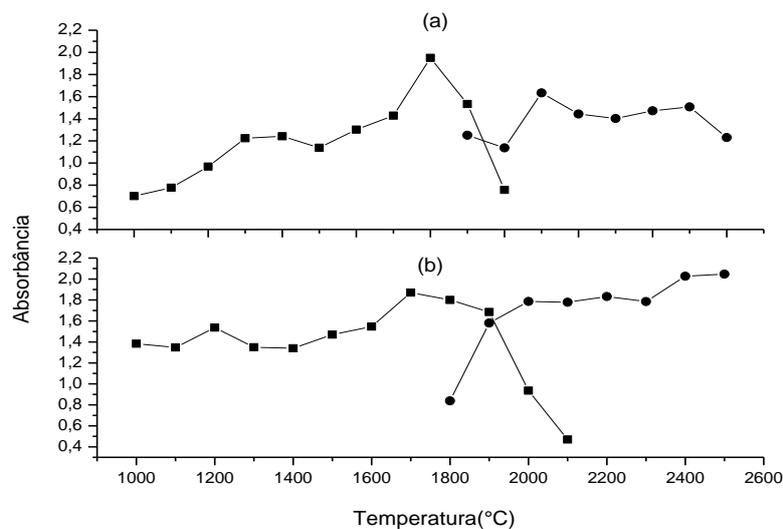
5%:Triton X-100 0,04% v/v na presença de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico, apresentou curvas de pirólise e atomização mais estáveis.

Figura 11 - Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $50\mu g L^{-1}$ de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 12 - (a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Al em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra na presença de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.4.2 Curvas de pirólise e atomização para Cr

Para a verificação do comportamento do Cr em meio de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v, foram feitas curvas de pirólise e atomização para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr com variação de temperatura de 1000 a 2900°C (Figura 13). A curva de pirólise foi gerada pela variação de temperatura de 1000 a 2100°C, mantendo-se a temperatura de atomização fixa em 2500°C. A temperatura de pirólise encontrada foi de 1500°C.

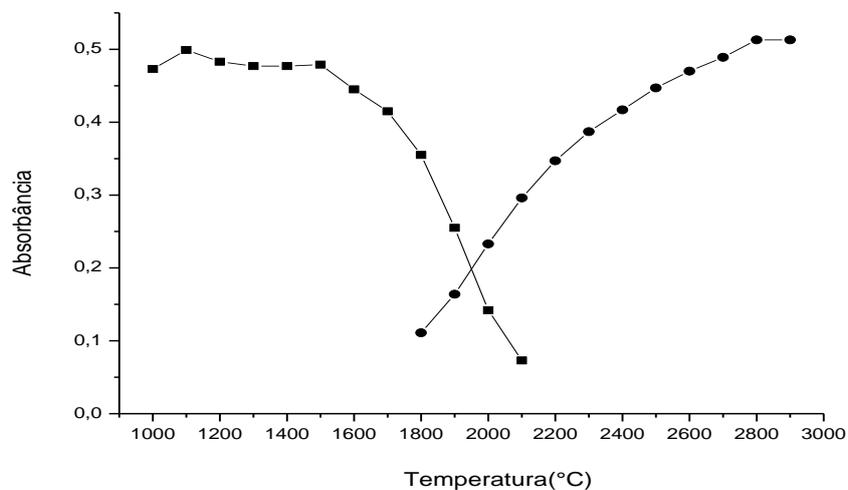
Já a curva de atomização foi gerada pela variação da temperatura de atomização de 1800 a 2900°C, com a temperatura de pirólise fixa em 1500°C. O máximo sinal para a atomização ocorreu em 2900°C (Figura 13). O desvio padrão foi de 0,023 para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr na etapa de atomização.

Após o estudo realizado para o Cr na presença de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v. O mesmo estudo foi realizado, porém, na presença da folha de cana-de-açúcar (Figura 14). Curvas de temperatura de pirólise foram geradas pela variação de temperatura de 1000 a 1800°C. A curva de atomização foi construída a partir de uma variação de temperatura de 1800°C a 2600°C (Figura 14a). Pela curva de temperatura de pirólise verificou-se a estabilidade térmica do Cr em folha de cana preparada em meio de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v até a temperatura de 1600°C, a partir dessa temperatura iniciou-se a perda de sensibilidade devido à volatilização do elemento. A partir dessa temperatura há quebras de compostos de Cr tais como o Cr_2B a 1875°C, Cr_3C_2 a 1895°C, Cr_3Si a 1770°C, CrB a 2100°C e Cr_2O_3 a 2320°C (LIDE, 2009). A máxima de temperatura de atomização ocorreu em 2800°C. Para a curva de atomização, a maior sensibilidade no sinal analítico foi obtida para a temperatura de 2500°C.

Na suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico (BRUHN *et al.* 1999), a curva de pirólise foi gerada pela variação de temperatura de 1800 a 2500°C, mantendo-se a temperatura de atomização fixa em 2500°C. A temperatura máxima de pirólise encontrada foi de 1500°C. A curva de atomização foi gerada pela variação da temperatura de atomização de 1800 a 2500°C, com a temperatura de pirólise fixa em 1500°C. O máximo sinal para a atomização ocorreu em 2300°C (Figura14b).

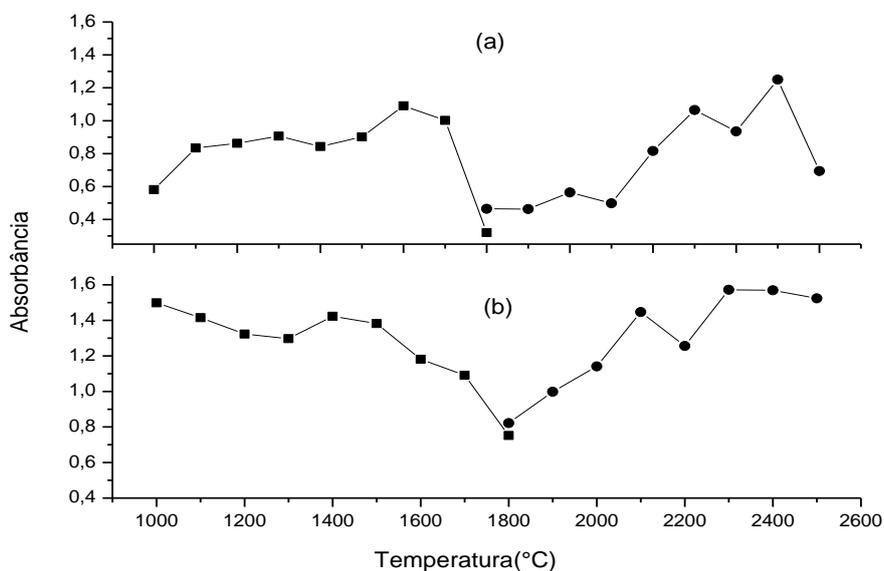
Para o elemento Cr a suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico, apresentou curvas de pirólise e atomização mais estáveis.

Figura 13 - Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 14 - (a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cr em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra e na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.4.3 Curvas de pirólise e atomização para Cu

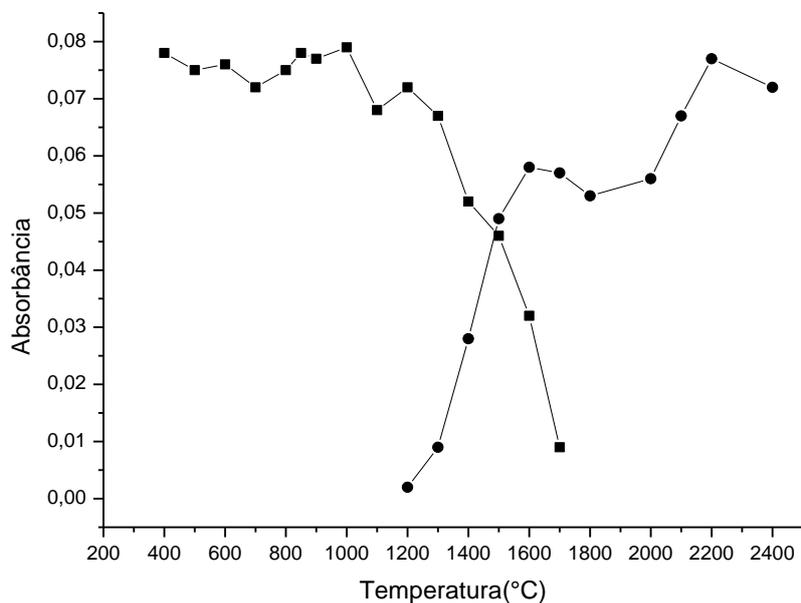
Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre em meio de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v foram construídas. Os resultados podem ser visualizados na Figura 15. A curva de pirólise foi obtida com uma variação de temperatura de 400 a 1500°C e a curva de atomização, entre 1400 a 2400°C . A máxima temperatura de pirólise obtida foi de 1000°C , acima dessa temperatura o Cu apresentou perdas em virtude de sua volatilização.

Considerando a temperatura de ebulição do CuCl_2 a 993°C (LIDE, 2009) podemos aferir que essa é a provável forma do cobre que está sendo volatilizada no limite da curva de pirólise. A temperatura de atomização com maior sinal analítico foi de 2200°C . Considerando a temperatura de fusão do CuO a 1227°C (LIDE, 2009), temperatura de ebulição do Cu_2O a 1800°C (LIDE, 2009) e estabilização do sinal a partir de aproximadamente a 1700°C (LIDE, 2009), é provável que essas sejam as formas mais estáveis do cobre nessas condições.

Após o estudo realizado para o Cu na presença apenas dos agentes estabilizantes, o mesmo estudo foi repetido, porém, na presença da de folha de cana-de-açúcar (Figura 16). Curvas de temperatura de pirólise foram geradas pela variação de temperatura de 400 a 1500°C com temperatura de atomização fixa em 2100°C . A curva de atomização foi construída a partir de uma variação de temperatura de 1400°C a 2400°C . Pela curva de temperatura de pirólise verificou-se a estabilidade térmica do Cu em folha de cana até a temperatura de 1000°C , a partir dessa temperatura iniciou-se a perda de sensibilidade devido à volatilização do elemento, com desvio padrão de 0,06. Para a curva de atomização, a maior sensibilidade no sinal analítico foi obtida para a temperatura de 2100°C .

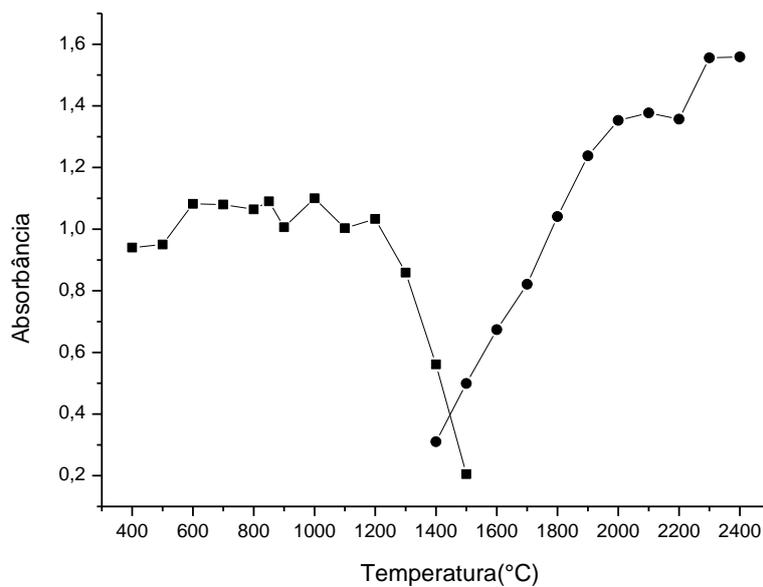
Nos estudos para o elemento cobre conclui-se que tanto nos padrões como na amostra, a suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v, apresentaram curvas de pirólise e atomização estáveis nesse meio (WELZ *et al.* 1992).

Figura 15 - Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 16 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Cu em ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v na amostra. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.4.4 Curvas de pirólise e atomização para Zn

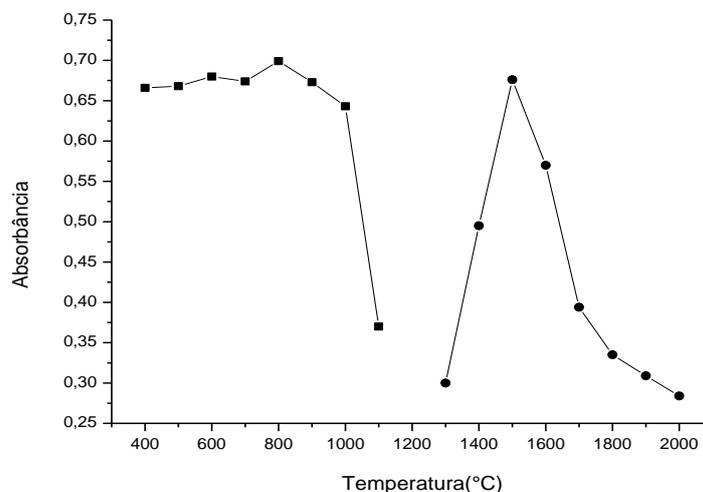
Curvas de pirólise e atomização de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Zn em meio de ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v foram construídas, com variação de temperatura de 400 a 2000°C. A temperatura de pirólise foi de 800°C e a temperatura de atomização foi de 1500°C (Figura 17).

Curvas de temperatura de pirólise na suspensão preparada foram geradas pela variação de temperatura de 400 a 1100°C (Figura 18).

Pela curva de temperatura de pirólise na suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v verificou-se a estabilidade térmica do Zn em folha de cana até a temperatura de 900°C (Figura 18a). Na suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v na presença de Pd como modificador químico a temperatura máxima de pirólise encontrada foi de 1100°C e a máxima temperatura de atomização foi de aproximadamente 2100°C (Figura 18b). Considerando a temperatura de ebulição do ZnCl_2 a 732 °C (LIDE, 2009) podemos aferir que essa é a provável forma do zinco que está sendo volatilizada no limite da curva de pirólise.

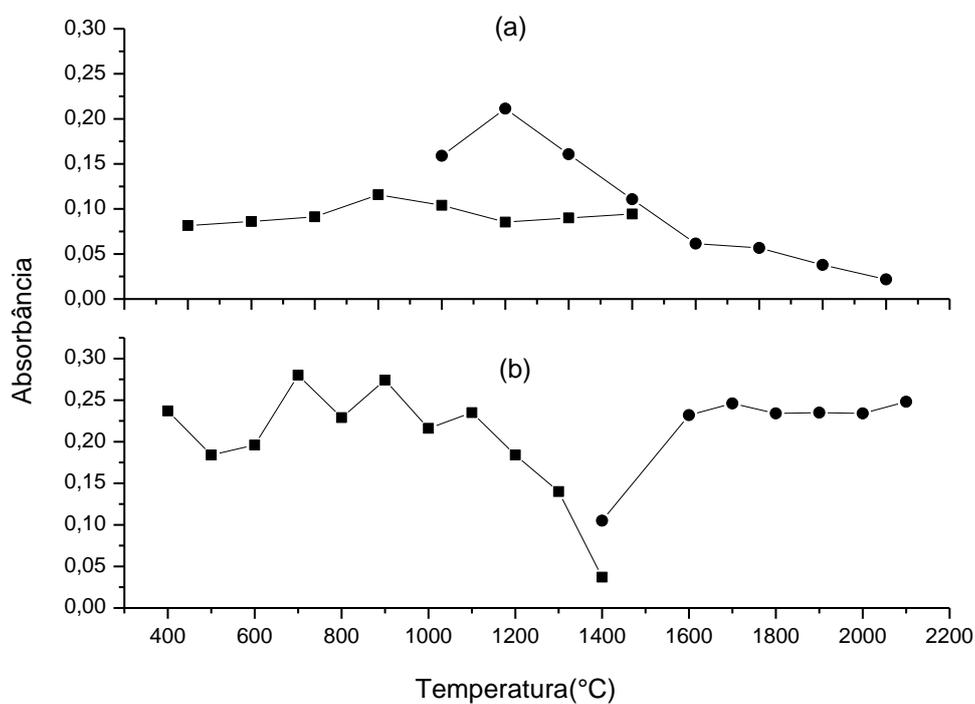
Conclui-se que nos estudos para o elemento Zn a suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% e Triton X-100 0,04% v/v na presença de Pd como modificador químico (WELZ *et al.* 1992), apresentou curvas de pirólise e atomização mais estáveis.

Figura 17 - Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $50\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 18 - (a) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra (b) Curvas de temperatura de pirólise e atomização de Zn em ácido nítrico 5% v/v:Triton X-100 0,04% v/v na amostra na presença de Pd como modificador químico. (■) Pirólise. (●) Atomização.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.5 EFEITOS DE MATRIZ E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PARA A METODOLOGIA DE Al, Cr, Cu E Zn EM FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os efeitos de matriz foram avaliados pela comparação dos dados obtidos com o método das adições de padrões e com a curva analítica em meio aquoso. Para os elementos Al e Cr as curvas foram preparadas em meio de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v na presença de $Mg(NO_3)_2$ como modificador químico (Figura 19 e 20). Já para o elemento cobre foram preparadas curvas em meio de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v (Figura 21) e para o elemento Zn as curvas foram preparadas em meio de ácido nítrico 5% v/v: Triton X-100 0,04% v/v na presença de Pd como modificador químico (Figura 22).

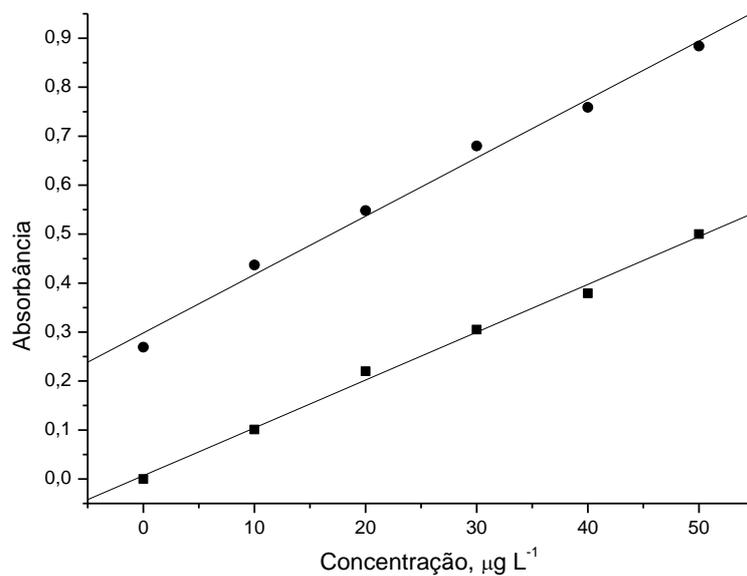
Os métodos apresentaram linearidade satisfatória (0,9896 a 0,9994) para as faixas estudadas (0 a 50,0 $\mu g L^{-1}$) para os elementos Al, Cu e Zn e (0 a 10,0 $\mu g L^{-1}$) para o Cr. No entanto, mesmo com as curvas aparentando inclinações semelhantes, foram aplicados testes estatísticos (teste F e teste t de Student) para confirmar essa possibilidade. Curvas com coeficientes angulares estatisticamente iguais indicam ausência de efeitos de matriz. O alumínio apresentando como coeficientes angulares da curva aquosa ($0,00977 \pm 0,00033$), do método das adições de padrão ($0,01102 \pm 0,0006$) e valores de F e t calculados (3,01 e 3,4, respectivamente). No caso do cromo, os coeficientes angulares da curva aquosa ($0,02019 \pm 0,00202$), do método das adições de padrão ($0,02059 \pm 0,00148$) e valores de F e t calculados (0,006 e 0,04 respectivamente). Já o cobre, os coeficientes angulares da curva aquosa ($0,00851 \pm 0,00034$), do método das adições de padrão ($0,00794 \pm 0,00021$) e valores de F e t calculados (0,001 e 2,46 respectivamente). E o zinco, os coeficientes angulares da curva aquosa ($0,00561 \pm 0,00054$), do método das adições de padrão ($0,00662 \pm 0,0003$). Avaliando-se essas informações com um teste F e teste t, foi possível concluir com 95% de confiabilidade que não há diferença significativa entre os valores, visto que os valores de F e t calculados foram inferiores aos valores de F e t Tabelados (19 e 4,3, respectivamente).

Os estudos da exatidão e da precisão foram aceitáveis. Ao analisar a amostra de folha de cana-de-açúcar por ICP OES, cujo teor de alumínio indicado é ($19,98 \pm 1,09$) $\mu g g^{-1}$, e no método de curva aquosa em GF AAS foi encontrado um valor médio de ($20,80 \pm 2,20$) $\mu g g^{-1}$ e valores de F e t calculados (1,2 e 0,17, respectivamente). O teor

de cromo indicado é $(6,98 \pm 0,88) \mu\text{g g}^{-1}$, e no método de curva aquosa em GF AAS foi encontrado um valor médio de $(6,97 \pm 1,45) \mu\text{g g}^{-1}$ e valores de F e t calculados (2,7 e 0,01, respectivamente). O resultado indicado para o cobre é $(10,29 \pm 5,109) \mu\text{g g}^{-1}$, e no método de curva aquosa em GF AAS foi encontrado um valor médio de $(7,11 \pm 0,6) \mu\text{g g}^{-1}$ e valores de F e t calculados (6,0 e 0,17, respectivamente). Já teor de zinco indicado é $(14,89 \pm 1,23) \mu\text{g g}^{-1}$, e no método de curva aquosa em GF AAS foi encontrado um valor médio de $(16,47 \pm 0,91) \mu\text{g g}^{-1}$ e valores de F e t calculados (13,9 e 2,97, respectivamente), são inferiores aos valores de F e t Tabelados (19 e 4,3, respectivamente). Foi possível concluir com 95% de confiabilidade que não há diferença significativa entre esses valores, visto que os valores de F e t calculados são inferiores aos valores de F e t Tabelados (19 e 4,3, respectivamente). Esses resultados estão apresentados na Tabela 2.

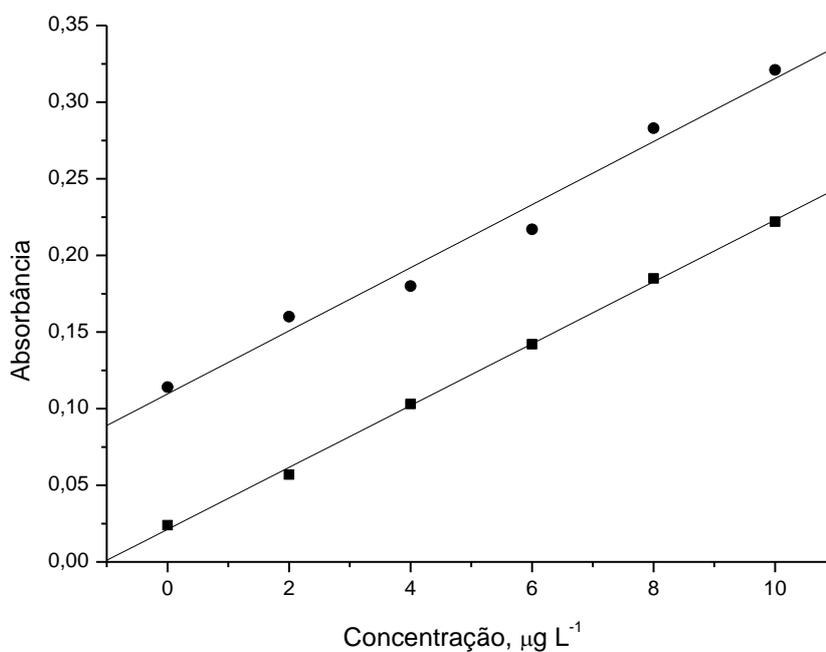
As figuras de mérito determinadas para essa metodologia estão apresentadas na Tabela 3. O coeficiente de correlação das curvas variou entre 0,9913 a 0,9987 para todos os analitos investigados. Os LD's instrumentais determinados foram 4,27; 0,30; 1,05; e $6,79 \mu\text{g L}^{-1}$ para Al, Cr, Cu e Zn, respectivamente. Já os LD's do método foram $8,54 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Al), $0,59 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Cr), $2,09 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Cu) e $22,64 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Zn). Os LQ's instrumentais para o Al foi, $14,23 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,98 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cr, $3,48 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Cu e $22,64 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Zn, enquanto que os LQ's do método foram 28,46; 1,96; 6,96 e $45,28 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para Al, Cr, Cu e Zn, respectivamente. Já as massas características ficaram em 4,45 pg (Al), 3,77 pg (Cr), 9,06 pg (Cu) e 4,59 pg (Zn).

Figura 19 - Estudo do efeito de matriz na metodologia para o alumínio em folha de cana-de-açúcar. (■) curva aquosa (●) curva adição de padrão



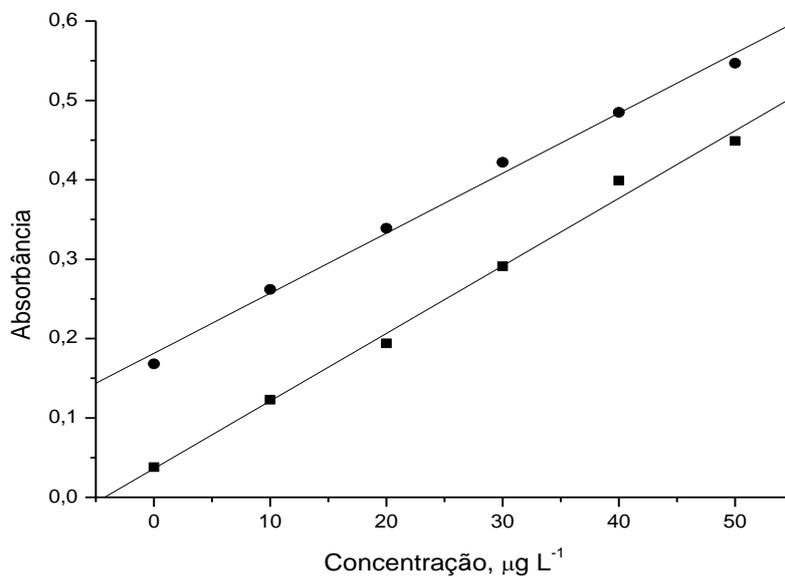
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 20 - Estudo do efeito de matriz na metodologia para o cromo em folha de cana-de-açúcar. (■) curva aquosa (●) curva adição de padrão



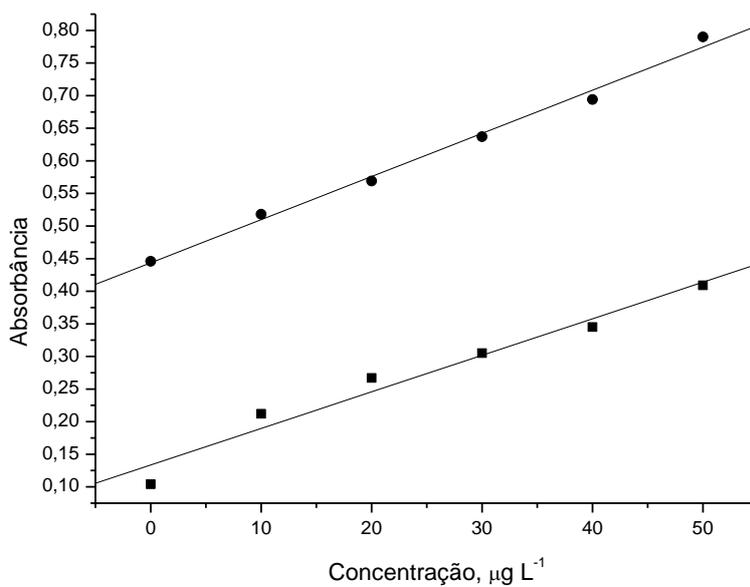
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 21 - Estudo do efeito de matriz na metodologia para o cobre em folha de cana-de-açúcar. (■) curva aquosa (●) curva adição de padrão.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 22 - Estudo do efeito de matriz na metodologia para o zinco em folha de cana-de-açúcar. (■) curva aquosa (●) curva adição de padrão.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 2 - Teores de Al, Cr, Cu e Zn em folha de cana-de-açúcar, curvas analíticas preparadas em meio aquoso e analisadas em ICP OES comparados com GF AAS.

Elemento	ICP OES (mg g⁻¹)	GF AAS (mg g⁻¹)
Al	19,98 ± 1,09	20,80 ± 2,20
Cr	6,98 ± 0,88	6,97 ± 1,45
Cu	10,29 ± 5,11	7,11 ± 0,6
Zn	14,89 ± 1,23	16,47 ± 0,91

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 3 - Parâmetros de mérito obtidos para a metodologia de Al, Cr, Cu e Zn em folha de cana-de-açúcar, curvas analíticas preparadas em meio aquoso.

Parâmetro	Al	Cr	Cu	Zn
Equação de regressão (n=3)	$y = 0,0105x + 0,4461$	$y = 0,0202x + 0,0211$	$y = 0,0085x + 0,0362$	$y = 0,0066x + 0,4435$
R^2 (n=3)	0,9913	0,9987	0,9936	0,9924
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0 – 50,0	0,0 – 10,0	0,0 – 50,0	0,0 – 50,0
LD inst. ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=10	4,27	0,30	1,05	6,79
LD met. ^b ($\mu\text{g Kg}^{-1}$), n=10	8,54	0,59	2,09	13,58
LQ inst. ($\mu\text{g Kg}^{-1}$), n=10	14,23	0,98	3,48	22,64
LQ met. ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=10	28,46	1,96	6,96	45,28
Massa característica (pg)	4,45	3,77	9,06	4,59

^ainst. = instrumental; ^bmet.= método

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

5.6 DETERMINAÇÃO DE Al, Cr, Cu E Zn EM AMOSTRAS DE FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na Tabela 4 estão apresentados os teores de Al, Cr, Cu e Zn determinados em amostras de folha de cana-de-açúcar do experimento realizado de força iônica, pelo método desenvolvido. Foram encontrados valores entre 6,03 a 56,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Al; 23,95 a 472,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cr; 11,59 a 19,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cu e 15,14 a 26,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Zn.

Analisando os dados dos elementos apresentados na Tabela 4, pode-se observar que as diferentes soluções preparadas, com forças iônicas diferentes não afetaram de forma geral a absorção dos nutrientes. A concentração de Al e Cr aumentaram somente quando houve adição desses elementos na solução preparada. Os valores de concentração do Cu também não variaram mesmo nas soluções com adição de Al e Cr. Aparentemente o Zn sofre uma alteração no valor de concentração nas amostras que foram adicionados 5 mg L^{-1} de Cr, sendo que se manteve estável nas outras soluções, porém mais estudos devem ser feitos para a confirmação dessa hipótese.

Tabela 4 - Teores médios de alumínio, cromo, cobre e zinco em amostras de folha de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes composições da solução nutritiva de Clark (1975) obtidos com o método proposto. Média \pm SD^a, n=3.

Amostras	Analitos ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Al	Cr	Cu	Zn
1/2 Força Completa	26,45 \pm 5,01	27,22 \pm 1,55	12,18 \pm 1,33	18,55 \pm 3,84
1/4 Força Completa	11,07 \pm 1,31	26,04 \pm 1,38	14,44 \pm 3,39	16,39 \pm 1,63
1/8 Força Completa	12,81 \pm 3,67	59,35 \pm 8,91	15,67 \pm 5,44	20,60 \pm 1,86
1/2 Força Incompleta ^b	9,92 \pm 3,23	25,38 \pm 2,41	11,59 \pm 4,94	22,69 \pm 3,23
1/4 Força Incompleta ^b	10,63 \pm 2,32	60,58 \pm 5,86	17,58 \pm 0,79	15,87 \pm 0,50
1/8 Força Incompleta ^b	6,03 \pm 1,69	36,50 \pm 5,52	19,38 \pm 6,96	17,38 \pm 2,35
1/2 Força Incompleta Al ^b (6 mg L ⁻¹)	47,99 \pm 4,87	35,57 \pm 9,31	12,92 \pm 2,93	15,14 \pm 3,69
1/4 Força Incompleta Al ^b (6 mg L ⁻¹)	34,63 \pm 1,95	23,95 \pm 6,55	16,97 \pm 3,02	16,34 \pm 3,38
1/8 Força Incompleta Al ^b (6 mg L ⁻¹)	56,70 \pm 6,24	36,04 \pm 5,28	17,59 \pm 2,87	18,23 \pm 2,23
1/2 Força Incompleta Cr ^b (5 mg L ⁻¹)	14,15 \pm 3,91	472,79 \pm 2,93	13,02 \pm 1,29	26,44 \pm 3,64
1/4 Força Incompleta Cr ^b (5 mg L ⁻¹)	22,94 \pm 3,23	437,00 \pm 4,83	13,12 \pm 0,87	22,62 \pm 2,16
1/8 Força Incompleta Cr ^b (5 mg L ⁻¹)	21,98 \pm 6,50	407,51 \pm 8,11	14,28 \pm 3,11	21,28 \pm 5,31

^aDesvio padrão

^bSolução preparada sem adição de Fe e de P, pH=4,2.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6 CONCLUSÕES

As amostras vegetais com granulometria menor do que 53 μm foram as mais adequadas para o preparo das suspensões. A velocidade de sedimentação das suspensões preparadas apenas em meio aquoso demonstraram a necessidade do uso de agentes estabilizantes. Entre os diversos agentes estabilizantes da suspensão investigados, os melhores resultados foram observados para o ácido nítrico 5% v/v e para a mistura de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v. Foi possível ainda determinar a melhor estratégia para homogeneização da suspensão, que foi o borbulhamento com ar, porém, com interrupção no momento da amostragem (*stop-flow*).

As curvas de pirólise e atomização apresentaram perfis adequados demonstrando que os meios investigados não causaram instabilidade térmica dos analitos no GF AAS. Nos estudos para o elemento Al e Cr a suspensão preparada em meio de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico, apresentaram curvas de pirólise e atomização mais estáveis. Para o elemento Cu, tanto nos padrões como na amostra preparada em meio de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v, as temperaturas de pirólise e atomização foram semelhantes às observadas na literatura, dispensando assim a necessidade de utilização de modificador químico. Já para o elemento Zn a suspensão foi preparada em meio de ácido nítrico 5% v/v : Triton X-100 0,04% v/v na presença de Pd como modificador químico. As melhores temperaturas de pirólise e atomização obtidas foram 1700°C e 2400°C para Al; 1500°C e 2300°C para Cr; 1000°C e 2100°C para Cu e 1100°C e 2100°C para Zn.

Os efeitos de matriz foram avaliados pela comparação dos dados obtidos com o método das adições de padrões e com a curva analítica em meio aquoso. A exatidão do procedimento proposto foi avaliada comparando-se os dados obtidos pelo método proposto com os dados obtidos pelo método de digestão ácida nítrico-perclórica e análise por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma (ICP OES). A análise estatística (teste F e teste t a 95% de confiança) dos dados demonstrou que o método proposto possui adequada exatidão. O método otimizado foi utilizado para análise direta de uma série de amostras em suspensão de folhas de cana-de-açúcar. Foram encontrados valores entre 6,03 a 56,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Al; 23,95 a 472,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cr; 11,59 a 19,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cu e 15,14 a 26,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Zn. O uso de suspensões foi

apropriado para análise de Al Cr, Cu e Zn em amostras de folhas de cana-de-açúcar e os valores encontrados estão dentro do esperado.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, J. L.; BATISTA, G. S.; RAMOS, S. B.; PRADO, R. M., **Resposta da aveia preta à aplicação de zinco em Latossolo Vermelho Distrófico**, *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2009, 4, 278-282.

ALI S.; ZENG F.; QIU L.; ZHANG G., **The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars**, *Biologia Plantarum* 2011, 55, 291-296.

ALVES, F. L.; JARDIM, W. F.; CADORE, S.; ARRUDA, M. A. Z. ; SMICHOWSKI, P.; MARRERO, J., **Emprego da Amostragem de Suspensão na Determinação de Cu e Zn em Lapa Antártica e Ni em Sedimento de Rio por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama**, *Quim. Nova* 2001, 24, 756-760.

AMOEDO, L.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C., **Ultrasound-assisted extraction of lead from solid samples: a new perspective on the slurry-based simple preparation methods for electrothermal atomic absorption spectrometry**, *J.Anal. At. Spectrom.* 1999, 14, 1221-1226.

ANVISA, Brasil, M. S., **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, 2003.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; CARNEIRO, P. C. S.; QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M. H. P.; FERNANDES, A. M.; RENNÓ, F. P., **Avaliação da Divergência Nutricional de Variedades de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*)**, *R. Bras. Zootec.* 2003, 32, 1431-1442.

BARALNIEWIEZ, D.; KANEEKA-HANC, A.; GRAMOWSKA, H., **ICP slurry introduction for simple and rapid determination of Pb, Mg and Ca in plant roots**, *Central European Journal of chemistry* 2007, 1148-1157.

BARRERA, P. B.; ALONSO, C. B.; SOMOZA, M. A.; BARRERA, A.B., **Slurry sampling for the determination of lead in marine sediments by electrothermal**

atomic absorption spectrometry using palladium–magnesium nitrate as a chemical modifier, *J. Anal. At. Spectrom.* 1994, 9, 469.

BAXTER, J. C.; AGUILAR, M.; BROWN, K. **Heavy metals and persistent organics at a sewage sludge disposal site**, *Journal of Environmental Quality*, 1983, 12, 311-316.

BENITO, C.; SILVA-NAVAS, J.; FONTECHA, G.; HERNÁNDEZ-RIQUER, M. V.; EGUREN, M.; SALVADOR, N.; GALLEGO, F. J., **From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals**, *Plant Soil* 2010, 327, 107-120.

BEZERRA, M. A.; CASTRO, J. T.; MACEDO, R. C.; SILVA D. G. **Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling**, *Analytica Chimica Acta*, 2010, 670, 33–38.

BORKERT, C. M.; YORINORI, J. T.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; SFREDO, G. J., **Seja o doutor da sua soja** 1994, 66.

BRUHN, C. G.; NEIRA, J. Y.; GUZMÁN, M. I.; DARDER, M. M.; NÓBREGA, J. A. **Study of chemical modifiers for the determination of chromium in biological materials by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 364, 273–278.

BYRD, E. D.; BUTCHER, D. J. **Determination of Trace Elements in Biological Standard Reference Materials by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with Solid and Slurry Sampling**, *Spectrometry Letters*, 1993, 26, 1613-1624.

CAL-PRIETO M. J.; FELIPE-SOTELO M.; CARLOSENA A.; ANDRADE J. M.; LÓPEZ-MAHÍA P.; MUNIATEGUI S.; PRADA D., **Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS)**, *Talanta* 2002, 56, 1-51.

CASTILHOS, D. D.; BORTOLON, L.; OLIVEIRA, E. S. **Crescimento, Nodulação e Absorção de Nutrientes em Soja Sob Concentrações Crescentes de Cromo**, *Magistra*, 2005, 17, 33-37.

CERVERA, M. L.; NAVARRRO, A.; MONTORO, R.; GUARDIA, M.; SALVADOR, A. **Platform in furnace Zeeman-effect atomic absorption spectrometric determination of arsenic in beer by atomization of slurries of sample ash**, *J. Anal. At. Spectrom.* 1991, 6, 477.

CHASIN A. A. M, NASCIMENTO E. S., RIBEIRO N. L. M, SIQUEIRA M. E. P. B, ANDRAUS M. H., SALVADOR M. C. **Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral**, *Rev. Bras. Toxicol.* 1998, 11, 1-6.

CHEN, S., **Slurry Sampling Electrothermal Vaporization Combined with ICP-AES for Direct Analysis of Environmental Samples**, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2003, 83, 727-733.

CLARK, R. B. **Characterization of Phosphatase of Intact Maize Roots**, *J. Agric. Food Chem.* 1975. 23, 3.

COCHRANE, T. T.; TERGAS, L. E.; SANCHEZ, P. A.; SERRÃO, E. A. S., **Avaliação dos ecossistemas de savana utilizados na América Tropical para produção de gado de corte**. In: *Produção de pastagens em solos ácidos dos trópicos*, Brasília: CIAT/EMBRAPA, 1982,17-28.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; SANTOS, A., **Environmental Evaluation of Metals in Sediments and Dragonflies Due to Sugar Cane Cultivation in Neotropical Streams**, *Water Air Soil Pollut* 2008, 195, 325–333.

DIAS, F. S.; ALVES, L. S.; SANTOS, W. N. L.; BRUNS, R. E.; BEZERRA M. A. **Mixture Design Optimization of an Analytical Procedure for Iron Extraction and Determination From Cassava Leaves by Slurry Sampling Flame Atomic Absorption Spectrometry**, *Spectrometry Letters* 2011 , 44, 388-392.

DIAS, F. S.; ALVES, L. S.; SANTOS, W. N. L.; DAVID, J. M.; FERREIRA, S. L. C. **Determination of Manganese in Cassava Leaves by Slurry Sampling Flame Atomic Absorption**, *Spectrometry Analytical Letters* 2009, 42, 2206-2213.

DOBROWOLSKI, R.; MIERZWA, J. **Direct solid vs. slurry analysis of tobacco leaves for some trace metals by graphite furnace AAS**, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1992, 344, 340-344.

EBDON, L.; FOULKES, M.; O'HANLON, K., **Optimised simultaneous multi-element analysis of environmental slurry by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using a segmented array charge-coupled device detector**, *Analytica Chimica Acta* 1995, 123-134.

ENGELSEN, C.; WIBETOE, G., **Determination of Al, Cu, Li and Mn in spruce seeds and plant reference materials by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry**, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 494-503.

EPSTEIN, M. S.; CARNICK, G. R.; SLAVIN, W.; MILLER-LHLI, N. J., **Automated slurry sample introduction for analysis of a river sediment by graphite furnace atomic absorption spectrometry**, *Anal. Chem.* 1989, 61, 1414.

FEIST, B., MIKULA, B., PYTLAKOWSKA, K., PUZIO, B., BUHL, F., **Determination of heavy metals by ICP-OES and F-AAS after preconcentration with 2, 2'-bipyridyl and erythrosine**, *Journal of hazardous materials*, 2008, 152, 1122-1129.

FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; NETO, J. A. G.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P., V., **Padronização interna em espectrometria de absorção atômica**, *Quim. Nova* 2003, 26, 249-252.

FERREIRA, R. P., **Toxidez de alumínio em culturas**, *Embrapa Pecuária Sudeste* 2006.

FILHO, J. O., MACEDO, N.; TOKESHI, H., **Seja o doutor do seu canavial**, *Potafos* 1994, 6, 1-17.

FOY, Ch D., **Effects of aluminum on plant growth**. *The plant root and its environment*. Univ. Press VA., Box, 1974, 601-642.

FOY, W. H., **Position-location solutions by Taylor-series estimation**, *Aerospace and Electronic Systems, IEEE Transactions on* 1976, 2, 187-194.

FRESCHI G. P. G.; DAKUZAKU C. S; NETO J. A. G.; MORAES M., **Espectrometria de Absorção Atômica Multielementar Simultânea com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite** – Uma Revisão da Técnica e Aplicações, *Eclética Química* 2000, 25.

FROES, R. E. S.; WINDMÖLLER, C.C.; SILVA, J.B.B., **Emprego da Modificação Química Permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite**, *Revista Analytica* 2006, 23.

FURLANI, P. R., **Physiological effects of aluminum on plants**, *Solos e Nutrição de Plantas* 1989.

GARCÍA, I. L.; VIÑAS, P.; CÓRDOBA, M. H., **Slurry Procedure for the Determination of Titanium in Plant Materials Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1992, 7.

GYANA R. J.; PREMANANDA D., **Role of chromium on plant growth and metabolism** *Sanghamitra Samantaray*, *Acta Physiologiae Plantarum* 1998, 20, 201-212.

GOPAL R.; RIZVI A. H.; NAUTIYAL N., **Chromium Alters Iron Nutrition and Water Relations of Spinach**, *Journal of Plant Nutrition* 2009, 32, 1551–1559.

HARRIS, D., **Análise Química Quantitativa** 6 ed., *Livros Técnicos e Científicos Editora SA*. 2005.

HARTWIG, I. ; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S., **Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas**, *Ciências Agrárias* 2007, 28, 219-228.

HINDS, M. W.; KATYAL, M.; JACKSON, K. W., **Effectiveness of palladium plus magnesium as a matrix modifier for the determination of lead in solutions and soil slurries by electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry**, *J. Anal. At. Spectrom.* 1988, 3, 83-87.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), DOQ. CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, rev, 2003, 1.

ISHITANI, M.; RAO, I.; WENZL, P.; BEEBE, S.; TOHME, J., **Integration of genomics approach with traditional breeding towards improving abiotic stress adaptation: drought and aluminum toxicity as case studies**, *Field Crops Res.* 2004, 90, 35-45.

KARADJOVA, I.; KARADJOV, M. **ETAAS determination of Cd and Pb in plants**, *Fresenius; Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 360, 246-251.

KOCHIAN, L. V., **Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants**, *Annual review of plant biology* 1995, 46, 237-260.

LABRA, M.; DE MATTIA, F.; BERNASCONI, M.; BERTACHI, D.; GRASSI, F.; BRUNI, I.; CITTERIO, S., **The combined toxic and genotoxic effects of chromium and volatile organic contaminants to *Pseudokirchneriella subcapitata***, *Water Air Soil Pollut*, 2010.

LIDE, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 89th Edition, 2009.

LIMA, M. C., GIACOMELLI, M. B. O., STUPP, V., ROBERGE, F. D., BARRERA, P. B., **Especiação de cobre e chumbo em sedimento do rio tubarão (sc) pelo método tessier**, *Química Nova* 2001, 24(6), 734-742.

MADRID, Y.; BONILLA, M.; CÁMARA, C., **Lead hydride generation in a lactic acid-potassium dichromate medium and its application to the determination of lead in fish, vegetable and drink samples**, *Analyst* 1990, 115, 563.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z., **Amostragem de Suspensões: Emprego da Técnica na Análise Direta de Amostras**, *Química Nova* 1998, 21, 4.

MAGISTAD, O. C., **The aluminum content of the soil solution and its relation to soil reaction and plant growth**, *Soil Science*, 1925, 20, 181-226.

MANICKUM, C. K.; VERBEEK, A. A. **Determination of aluminium, barium, magnesium and manganese in tea leaf by slurry nebulization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, 9, 227-229.

MEERAVALI, N. N.; KUMAR, S. J. **Rapid slurry atomization using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium, copper, manganese and lead in biological reference materials**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 647-652.

MIERZWA, J.; SUN, Y.C.; CHUNG, Y.T.; YANG, M.H. **Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**, *Talanta*, 1998, 47, 1263-1270.

MILLER-LHLI, N. J., **Advances in Ultrasonic Slurry Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry**, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1993, 345, 482-489.

MILLER-LHLI, N. J., **Influence of Slurry Preparation on the Accuracy of Ultrasonic Slurry Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry**, *J. Anal. At. Spectrom.* 1994, 9.

MILLER-LHLI, N. J., **Slurry Sample Preparation for Simultaneous Multi-element Furnace Atomic Absorption Spectrometry**, *Anal. At. Spectrom.* 1988, 3, 73.

MOKGALAKA, N. S.; McCRINDLE, R. I.; BOTHA, B. M., **Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulisation**, *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 1375-1378.

NASCIMENTO, C. W. A. & FONTES R. L. F., **Correlação Entre Características de Latossolos e Parâmetros de Equações de Adsorção de Cobre e Zinco**, *R. Bras. Ci. Solo* 2004.

NÓBREGA, J. A.; RUST, J.; CALLOWAY, JR C. P.; JONES, B. T., **Use of modifiers with metal atomizers in electrothermal atomic absorption spectrometry: a short review**. *Spectrochim, Acta Part* 2004, 59, 1337-1345.

OLIVEIRA, L. A. A.; SILVA, K. B.; TOSTA, M. S.; GUIMARÃES, A. A.; SILVA, R. M., **Doses de sulfato de zinco e ácido bórico na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo**, *Revista Verde* 2010, 5, 24.

OLIVEIRA, R. F., **Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de As, Cd, Ni e Pb em Batata em Mandioca Produzidas em Regiões Mineiras Empregando Espectrometria de Absorção Atômica Forno de Grafite**, *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais* 2009.

ORIOLO JÚNIOR, V.; PRADO, R. M.; LEONEL, C. L.; CAZETTA, D. A.; SILVEIRA, C. M.; QUEIROZ, R. J. B.; BASTOS, J. C. H. A. G., **Modos de aplicação de zinco na nutrição e na produção de massa seca de plantas de trigo**, *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal* 2008, 8, 28-36.

OSHITA, D.; OLIVEIRA, A. P.; NETO, J. A. G.; MORAES, M., **Determinação direta de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**, *Ecl. Quím.* 2003, 28, 91-96.

PADILHA, C. C. F.; MORAES, P.M.; GARCIA, L. A.; POZZI, C. M. C.; LIMA, G. P. P.; VALENTE J. P. S.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M., **Evaluation of Cu, Mn, and Se in Vegetables Using Ultrasonic Extraction and GF AAS Quantification**, *Food Anal. Methods* 2011.

PHOUNG, D. D. T.; TATAR, E.; VARGA, I.; ZARAY, G.; CSEH, E.; FODOR, F., **Accumulation and Translocation of Lead in Cucumber Plants Monitored by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry**, *Microchemical Journal* 1995, 51, 145–150.

RESANO, M.; BRICEÑO, J.; ARAMENDÍA, M.; BELARRA, M. A., **Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of boron in plant tissues**, *Analytica Chimica Acta* 2006, 582, 214-222.

RIBEIRO, N. D.; SANTOS, O. S., **Aproveitamento do zinco aplicado na semente na nutrição da planta**, *Ciência Rural* 1996, 26, 159-165.

SÁNCHEZ-MORENO, R. A.; GISMERA, M. J.; SEVILLA, M. T.; PROCOPIO, J. R., **Direct and Rapid Determination of Ultratrace Heavy Metals in Solid plant Materials by ET-AAS Ultrasonic-assisted Slurry Sampling**, *Phytochemical Analysis* 2010, 21, 340-347.

SANTOS, H. P.; MELO, G. W. B.; LUZ, N. B.; TOMASI, R. J., **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**, *Comunicado Técnico, Bento Gonçalves – RS* 2004, 49.

SANTOS, I. R. D., BAISCH, P., LIMA, G. T. N. P. D., SILVA - FILHO, E. V. D., **Metais pesados em sedimentos superficiais da Lagoa Mirim, fronteira Brasil-Uruguai**, *Geochimica brasiliensis* 2001, 17(1).

SANTOS, L. C., **Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, associação ectomicorrízica e no desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula**, *Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)* 2006.

SHANKER, A. K.; CERVANTES, C.; LOZA-TAVERA, H.; S.; AVUDAINAYAGAMD, S., **Chromium toxicity in plants**, *Environment International* 2005, 739– 753.

SILVA, M.A.S., **Teste de envelhecimento acelerado em sementes de maxixe (*Cucumis anguria* L.)**, *EMBRAPA-CPATSA* 1997, 7, 167.

SLAVIN, W. **Graphite Furnace AAS**, a source book. Perkin-Elmer, 1984.

SORLIE, T. M.; WIBETOE, G., **Determination of titanium by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of fluoride modifiers**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, 376, 721-727

STEPHEN, S. C.; LITTLEJOHN, D.; OTTAWAY, J. M., **Evaluation of a Slurry Technique for the Determination of Lead in Spinach by Electrothermal Atomic-absorption Spectrometry**, *Analyst* 1985, 110 1147.

STEPHEN, S. C.; OTTAWAY, J. M; LITTLEJOHN, D., **Slurry atomisation of foodstuffs in electrothermal atomic absorption spectrometry**, *Fresenius'J. Anal. Chem.* 1987, 328, 346.

TAKUWA, D. T.; SAWULA, G.; WIBETOE, G.; LUND, W., **Determination of Cobalt, Nickel and Copper in Flowers, Leaves, Steam and Roots of Plants Using Ultrasonic Slurry Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry**, *Analytica Chimica Acta* 1997, 12, 849-854.

TAYLOR, A.; BRANCH, S.; HALLS, D. J.; OWEN, L. M. W.; WHITE, M., **Atomic Spectrometry Update-Clinical and Biological Materials, Foods and Beverages**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000,15, 451-487.

VALE, D. W. ; PRADO, R. M.; AVALHÃES, C. C.; HOJO, R. H., **Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva**, *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2011, 6,189-196.

VÁZQUEZ, E. A., **Geoquímica de las rocas volcánicas de la Formación Alisitos del arroyo La Bocana en el Estado de Baja California Norte**, *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 1987, 7, 78-88.

VOLYNSKII, A. B., **Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry**, *Journal of Analytical Chemistry* 2003, 58, 10.

VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; DIAS, L. F.; CURTIS, A. J., **Determination of Cd, Hg, Pb and Se in sediments slurries by isotopic dilution calibration ICP-MS after chemical vapor generation using an on-line system or retention in an electrothermal vaporizer treated with iridium**, *Spectrochimica Acta* 2005, 643-652.

XIAO-QUAN, S; SHEN, L.: ZHE-MING, N, **Determination of aluminium in human blood and serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry using potassium dichromate matrix modification**, *J. Anal. At. Spectrom.* 1988, 3, 99.

WELZ, B., **Atomic Absorption Spectrometry**, Second Edition, VCH, 1985.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVIT, J. R., **Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, Performance for the Determination of 21 Elements**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*,1992, 7, 1257.

WELZ, B.; SPERLING, M., **Atomic absorption spectrometry**, *Weinheim: Wiley-VCH*, 1999, 941.