



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Determinação simultânea de Cd, Pb e Cu em amostras de chá (*Camellia sinensis*) por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica

Cleilson Lucena de Medeiros

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Determinação simultânea de Cd, Pb e Cu em amostras de chá (*Camellia sinensis*) por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica

Cleilson Lucena de Medeiros*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos

Co-orientador: Dra. Amália Geíza Gama Pessoa

***Bolsista CAPES**

João Pessoa – PB – Brasil

Agosto/2015

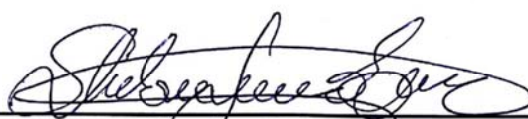
M488d Medeiros, Cleilson Lucena de.
Determinação simultânea de Cd, Pb e Cu em amostras de chá (*Camellia sinensis*) por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica / Cleilson Lucena de Medeiros.- João Pessoa, 2015.
73f. : il.
Orientador: Sherlan Guimarães Lemos
Coorientadora: Amália Geíza Gama Pessoa
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Química analítica. 2. Determinação simultânea.
3. Análise de traços. 4. Chá. 5. Eletrodo de bismuto.
6. Voltametria de redissolução anódica.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

Determinação simultânea de Cd, Pb e Cu em amostras de chá (camellia sinenses) por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Cleilson Lucena de Medeiros e aprovada pela banca examinadora em 31 de agosto de 2015.



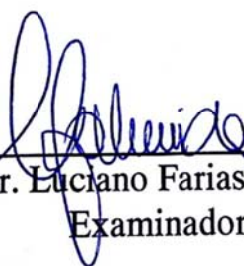
Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Orientador/Presidente



Dra. Amália Geiza Gama Pessoa
2ª. Orientadora



Profa. Dra. Teresa Cristina Bezerra Saldanha
Examinadora



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

DEDICATÓRIA

*A minha amada mãe. Essa
minha vitória é da senhora que está
vencendo uma das lutas mais
difíceis que um ser humano pode
enfrentar;*

*Ao meu sobrinho Natan que
está para nascer trazendo consigo
esperança, amor e felicidades para
toda família;*

*Aos entes queridos que se
foram durante essa jornada deixando
saudades. Meu tio Antônio, e meus
avós Abidal e Francisco Elói;*

(in memoriam)

*A toda minha família que
esteve sempre ao meu lado, em
especial minha noiva Suelen;*

**Com muito amor, carinho e
gratidão. DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Pai Criador. Sem ele não teria oportunidades em minha vida. Obrigado, meu senhor bom Deus, por trilhar meus passos até aqui e por sempre dispor em minha vida anjos que estiveram ao meu lado.
- ✓ Ao meu orientador Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos pelo companheirismo, compreensão, paciência e perseverança em mim durante quase toda minha vida acadêmica desde a iniciação até a execução deste trabalho. MUITO OBRIGADO POR TUDO!
- ✓ A minha co-orientadora Dra. Amália Geíza Gama Dionisio pela contribuição, discussão e incentivo. SOU IMENSAMENTE GRATO por você ter adotado com unhas e dentes esse projeto.
- ✓ Ao professor Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima pelas valiosas contribuições na etapa de pré-defesa.
- ✓ Ao prof. Dr. Luciano Farias de Almeida pelo seu aporte durante a pré-defesa e defesa, enriquecimento de forma substancial este documento.
- ✓ A Prof^a Dra. Teresa Cristina Bezerra Saldanha por ter aceitado, mesmo às pressas, contribuir de forma imponderável enobrecendo o trabalho;
- ✓ Ao meu amigo Dayvison (Lorran) que sempre esteve ao meu lado, caminhando comigo e me ajudando do início ao término deste trabalho. Sem sua inestimável contribuição sei que não teria conseguido atingir essa meta. SOU ETERNAMENTE GRATO, baixinho!
- ✓ À sua família, D. Gláucia, Sr. Francisco, Sara, Luana (esposa), que me acolheram em sua residência durante os dias mais corridos;
- ✓ À minha noiva Suelen que esteve diariamente ao meu lado nos momentos de alegria e sempre nos momentos difíceis nunca deixando “a peteca cair”. TE AMO;
- ✓ Aos amigos Barba e Laís que contribuíram de forma direta e indireta para que eu conseguisse concluir esse trabalho.

- ✓ Aos meus pais Cicero Eloi de Medeiros e Maria Lucena de Medeiros que se mostraram firmes na perseverança por uma educação melhor, sempre me apoiando e incentivando, nunca desistiram de mim. OBRIGADO, AMO VOCÊS;
- ✓ A todos os familiares, pelo apoio, preocupação e incentivo. Em especial meus irmãos Clenildo e Celiane, meu cunhado Fred, minha avó Maria, minhas tias Sebastiana (Bastinha) e Vilani, e minha prima Gercilene;
- ✓ Em especial ao meu avô Francisco Eloi de Medeiros (padrinho), que sempre me incentivava, mesmo aos seus 100 anos de vida, a continuar minha formação e a todo o momento se orgulhava de ter um neto formado e fazendo uma pós-graduação, "estudando pra ser doutor" como ele dizia. OBRIGADO PADRINHO, que Deus o tenha;
- ✓ A minha outra família que ajudou e me acolheu em momentos difíceis. Edízio (sogro), Silvana (sogra), Bruna, Anderson e Lucas (cunhados), Petrônio, Lêda, Rosa, Nena e dona Rita;
- ✓ Ao grupo LEQA: Jefferson "Kepra", Josy, Emanuel, Taís, Mariana, Mikeas, Matheus, Aline, Rayanne e Carol, pelo convívio no laboratório e troca de experiências nos seminários de grupo;
- ✓ Aos amigos da empresa Amazonas Paraibor, em especial Gabriel, João Almeida, Carlos Diego e Hamilton Vasconcelos, que me motivaram a deixar a empresa e concluir essa etapa pendente de minha vida;
- ✓ Aos amigos Neilson, Betoven, Lily e Camila do grupo de "volta para o meu sertão", pelo apoio moral;
- ✓ A todos os amigos DQ que se mostraram preocupados comigo, e olhe que não foram poucos! Nesse período de aflição pude perceber que tenho muitos amigos, pessoas que verdadeiramente se preocupam comigo. Dentre tantos: Abraão, Arnayra, camarada André, Clarissa, Dariston, Elizeu, Ferreira, Gaby, Graycy, Handerson Venceslau, Helivaldo, Hugo, Iran, Israel, João Jarllys, Juliana e Danilo, Léo, Paulo;
- ✓ Todos que fazem ou fizeram parte da família LAQA: Sófacles, Stefani, Marcelo, Inakã, Francisco Cunha, Wellington, Anderson, Eduardo,

Paulo Henrique, Licarion, Adriano, Williame, Daniel, Janete, Ana Luíza, Aline, Danielly, Fátima, Mayara, Renan, Flaviano, Willy Renato Allan, Adenilton, Jullys, Heltinho, Rômulo, Jardel, Urão (Urijatan), Osmundo, Pedro, Jonathan, Lucas, todos os professores e demais colegas;

✓ Ao LEQA, nas pessoas das professoras Dra. Teresa Saldanha e Dra. Kátia Messias Bichinho por humildemente ceder o espaço no qual o trabalho foi desenvolvido;

✓ Ao Prof^o Dr. Mário Ugulino por ter aberto as portas do LAQA para que eu pudesse começar minha carreira na pesquisa desde a iniciação;

✓ Ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ), que me concedeu a oportunidade de crescer na minha vida acadêmica;

✓ Aos coordenadores prof. Dr. Gerd Bruno e prof. Dr. Júlio Santos Rebouças, e ao secretário Marcos Pequeno que estiveram à disposição para esclarecer qualquer dúvida em relação ao processo;

✓ Ao portal de pesquisa comunista sci-hub.io, que ajudou bastante nesse tempo em que os portais legais de pesquisa dos periódicos foram bloqueados de nossa instituição por falta de pagamento;

✓ A Universidade Federal da Paraíba que abriu as portas desde a Graduação até a conclusão deste trabalho;

✓ A Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira em nome da Embrapa Pecuária Sudeste por conceder o material de referência;

✓ A CAPES pelo apoio financeiro;

"Sabemos que a pesquisa é uma fascinante combinação de intuição, especulação, subjetividade, imaginação, esperanças e sonhos mesclados".

(Dibs: em busca de si mesmo -
Virginia M. Axline)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	5
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3.1 CHÁ	7
3.2 VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO	12
3.3 VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	13
3.4 ELETRODOS DE TRABALHO	15
3.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM CHÁ POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	17
4 METODOLOGIA	23
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	23
4.2 INSTRUMENTAÇÃO	23
4.3 OTIMIZAÇÃO DO FILME DE BISMUTO	25
4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA	25
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS	27
4.6 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	30
4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	31
4.8 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AS AMOSTRAS DE CHÁS	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE BISMUTO	34
5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA	38
5.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	43
5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	51
5.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AS AMOSTRAS DE CHÁS	58
6 CONCLUSÕES	64

7	REFERÊNCIAS.....	66
----------	-------------------------	-----------

Lista de Figuras

- Figura 1 – (A) Aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de onda quadrada. Onde: I_1 e I_2 = pontos de coleta da corrente direta e reversa, respectivamente; ΔE_p = amplitude da onda; ΔE_s = incremento de potencial; τ = tempo de um ciclo de onda. (B) Voltamograma ilustrativo de um processo reversível (Adaptado de UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003)..... 14
- Figura 2 - Esquema das etapas de construção do eletrodo de trabalho... 24
- Figura 3: Sequência do procedimento usado para digestão das amostras 29
- Figura 4 - Formação do filme de bismuto em diferentes concentrações do cátion; $f = 50$ Hz, $\Delta E_p = 50$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV, $T_d = 300$ s, $E_d = -1,3$ V. 34
- Figura 5 - Curvas analíticas dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} construídas nas concentrações de 75, 100 e 200 $\mu g L^{-1}$ de Bi^{3+} ; $f = 50$ Hz, $\Delta E_p = 50$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV, $T_d = 300$ s, $E_d = -1,3$ V. 36
- Figura 6 - Voltamogramas referentes aos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1} 38
- Figura 7 - Cartas de Pareto referentes à avaliação da influência dos parâmetros ΔE_p , T_d , ΔE_s , f e T_e sobre as correntes de pico. 40
- Figura 8 - Cartas de Pareto referentes à avaliação da influência dos parâmetros ΔE_p , T_d , ΔE_s , f e T_e sobre os coeficientes de variação. 41
- Figura 9 - Estudo do tempo de remoção do filme; $f = 75$ Hz, $\Delta E_p = 75$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV, $T_d = 300$ s, $E_d = -1,3$ V. 43
- Figura 10 - Quebra da capacidade tamponante em função da adição da amostra digerida com ácido 11,0 mol L^{-1} . Uma alíquota de 100 μL do digerido (curva em vermelho) foi adicionado ao branco (curva em preto) provocando uma mudança no perfil do voltamograma; $f = 75,0$ Hz, $\Delta E_p = 75$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV, $T_d = 300$ s, $E_d = -1,3$ V. 44
- Figura 11 - Estudo da influência do peróxido de hidrogênio sobre os voltamogramas. Ao branco (curva em preto) foram adicionados 15 μg

L ⁻¹ dos metais (curva em vermelho), e, em seguida, alíquotas de 0,1 % v/v (curva em azul) e 0,2 % v/v (curva em verde) de H ₂ O ₂ ; f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	46
Figura 12 - Voltamograma registrado no eletrólito (curva em preto) contendo uma alíquota de 300 μL (curva em vermelho) de uma amostra de chá digerida com HNO ₃ 3,5 mol L ⁻¹ ; f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	47
Figura 13 - Aspecto final das amostras digeridas com o HNO ₃ nas concentrações 3,5, 1,0 e 0,5 mol L ⁻¹ . A: Branco de uma digestão, B: 0,5 mol L ⁻¹ , C: 1,0 mol L ⁻¹ , D: 3,5 mol L ⁻¹	48
Figura 14 - Avaliação da digestão com ácido nítrico 0,5 mol L ⁻¹ . Ao branco (curva em preto) foram adicionadas alíquotas de 500 μL (curva em vermelho) e 1500 μL (curva em azul) do digerido; f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	50
Figura 15 - Voltamogramas resultantes da adição simultânea dos íons Cd ²⁺ , Pb ²⁺ e Cu ²⁺ sobre o branco do procedimento. As curvas analíticas referentes as correntes de pico desses íons encontram-se inseridas na figura; f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	52
Figura 16 - Voltamogramas da análise do material de referência. Ao branco (curva em preto) foi adicionado 200 uL do material digerido com ácido 0,5 mol L ⁻¹ (curva em vermelho), 1,0 mol L ⁻¹ (curva em azul) e 3,5 mol L ⁻¹ (curva em verde); f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	54
Figura 17 - Voltamogramas e curvas de adição-padrão construídas individualmente para quantificar os elementos Cd ²⁺ , Pb ²⁺ e Cu ²⁺ presentes na amostra do material certificado; f = 75,0 Hz, ΔE _p = 75 mV, ΔE _s = 5 mV, T _d = 300 s, E _d = -1,3 V.	55
Figura 18 - Voltamogramas e curvas de adição-padrão construídas simultaneamente para quantificar os elementos Cd ²⁺ , Pb ²⁺ e Cu ²⁺	

presentes na amostra do material certificado; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$	57
Figura 19 - Voltamogramas provenientes de adição de padrão simultâneo de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} sobre duas amostras de chá avaliadas neste trabalho, sem e com fortificações; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$	59
Figura 20 - Método de adição-padrão empregado para quantificar os metais nas amostras de chás fortificadas; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Teores de Cd, Pb e Cu em amostras de chás de acordo com o tipo e país originário.	10
Tabela 2 - Descrição dos principais trabalhos que determinam metais em chá por técnicas voltamétricas.....	20
Tabela 3 - Planejamento fracionário 2^{5-1} usado na otimização dos parâmetros da voltametria de redissolução anódica por onda quadrada.....	26
Tabela 4 – Programa de aquecimento para o procedimento de digestão empregado neste trabalho.	28
Tabela 5 - Parâmetros empregados na voltametria de onda quadrada com redissolução anódica durante a etapa de quantificação.....	31
Tabela 6 - Parâmetros de desempenho para as curvas analíticas dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas concentrações de 75, 100 e 200 $\mu g L^{-1}$ de Bi^{3+}	37
Tabela 7 – Valores escolhidos pelo planejamento.	42
Tabela 8 - Parâmetros de desempenho das curvas analíticas construídas sobre o branco do procedimento.	53
Tabela 9 - Resultados das recuperações individuais encontradas pelo método proposto e valores de referência dos cátions na amostra certificada.	56
Tabela 10 - Resultados das recuperações simultâneas encontradas pelo método proposto e valores de referência dos cátions na amostra certificada.	58
Tabela 11 - Resultados das recuperações encontradas pelo método proposto aplicado sobre quatro amostras de chá (2 verdes e 2 pretos).	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

AdASV	---	<i>Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica)
AdCSV	---	<i>Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry</i> (Voltametria Adsorptiva de Redissolução Catódica)
ΔE_p	---	Amplitude de pulso
ΔE_s	---	Incremento de potencial
ASV	---	<i>Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltametria de Redissolução Anódica)
CV	---	Coeficiente de variação
f	---	Frequência
GF AAS	---	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite)
HDME	---	<i>Hanging mercury drop electrode</i> (Eletrodo gota pendente de mercúrio)
I_p	---	Corrente de pico
ICP-MS	---	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)
ICP OES	---	<i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i> (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)
LOD	---	Limite de detecção
LOQ	---	Limite de quantificação
LSASV	---	<i>Linear Scan Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltametria de Redissolução Anódica de Varredura Linear)
E_{dep}	---	Potencial de deposição
MWCNT	---	<i>multi-walled carbono nanotubes</i> (Nanotubos de carbono de Paredes Múltiplas)
SWASV	---	<i>Square Wave Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltametria de Onda Quadrada por Redissolução Anódica)
T_d	---	Tempo de deposição
T_e	---	Tempo de equilíbrio
VOQ	---	Voltametria de Onda Quadrada

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método de quantificação dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , em chás, realizada de forma simultânea, empregando voltametria de onda quadrada por redissolução anódica com eletrodo de pasta de nanotubo de carbono modificado por filme de bismuto. O chá é uma das bebidas mais benéficas e consumidas no mundo, sendo preparado a partir da infusão de partes da planta *Camellia sinensis*. Normalmente são encontrados cátions metálicos, como o Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , que se ingeridos acima do limite máximo representam riscos à saúde. Para detectar esses metais é necessário fazer uso de técnicas com alta sensibilidade. Os métodos espectrométricos são os que mais amplamente tem sido utilizado, porém apresentam custo elevado, são laboriosos e dispendiosos. As técnicas voltamétrica caracterizam-se por serem baratas e possuir sensibilidade igual e até maior que alguns métodos espectrométricos. Os parâmetros da técnica utilizada foram obtidos após otimização com planejamento fatorial fracionário. As amostras de chá foram preparadas via digestão com aquecimento por radiação micro-ondas em sistema fechado empregando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio diluídos. A validação do método foi realizada com base na amostra certificada de tecido vegetal (forrageira Marandu) e aplicada em amostras de chá verde e preto. As recuperações dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} variaram de 79,3 a 107,6%, na amostra certificada, e de 73,3 a 122,1% nas amostras de chás avaliadas. Os limites de detecção obtidos na análise simultânea de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , foram 0,16; 0,20; 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Foi detectado apenas Cu^{2+} nas amostras de chá, porém o método se mostrou eficiente para quantificação simultânea de todos os metais na matriz avaliada após a adição e recuperação.

Palavras-chave: Determinação simultânea. Análise de traços. Chá. Eletrodo de bismuto. Voltametria de Redissolução Anódica.

Abstract

This paper describes the development of a method for quantification Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} cations, in teas, performed simultaneously, using Square Wave Anodic Stripping Voltammetry carbon nanotube paste electrode modified with bismuth film. Tea is one of the most beneficial and consumed beverage through the world, being prepared from the infusion parts of the plant *Camellia sinensis*. Most commonly this kind of tea presents metal ions, such as Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} , which offers health risk, in case of being ingested above the limit. To detect these metals, it is necessary to make use of techniques with high sensitivity. The spectrometric methods are the most widely used, but they have a high cost, are laborious and expensive. The voltammetric techniques are characterized by being inexpensive and having equal sensitivity, and even greater than some spectrometric methods. The parameters of the technique used were obtained after optimization with fractional factorial design. The tea samples were prepared through digestion with heating by microwave radiation in a closed system using diluted nitric acid and hydrogen peroxide. The method was validated based on the sample certified plant tissue (forage Marandu) and applied in green and black tea samples. Recoveries of cations Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} ranged from 79.3 to 107.6%, the certified sample, and 73.3 to 122.1% in the evaluated samples of teas. The detection limits obtained in the simultaneous analysis of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} were 0.16; 0.20; 0.39 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Cu^{2+} was detected only in samples of tea, but the method was efficient for the simultaneous quantification of all metals in the matrix assessed after the addition and recovery.

Keywords: Simultaneous determination. Trace analysis. Tea. Bismuth electrode. Anodic stripping voltammetry.



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uma lenda chinesa afirma que o chá foi descoberto acidentalmente pelo rei Shên Nung no ano de 2737 a.C., quando uma rajada de vento soprou algumas folhas da planta em uma chaleira de água fervente (SHOUYI, 1982). Essa lenda é divulgada como a primeira infusão das folhas de chá verde.

Dentre os diversos tipos de chás consumidos mundialmente, merecem destaque as infusões preparadas a partir das folhas de *Camellia sinensis*, uma espécie de planta da família *Theaceae*. Desta planta derivam os principais chás consumidos no mundo: preto (fermentado), *oolong* (semi fermentado) e verde (não fermentado) (LIMA et al., 2009). Aproximadamente três bilhões de toneladas de chás são produzidos e consumidos no mundo. Desses, 78% são preto e usualmente consumidos nos países ocidentais, 20% é do tipo verde e comumente ingerido nos países asiáticos e 2% é do tipo *oolong*, consumido principalmente no sul da China (SANG et al., 2011).

Por ser uma das bebidas mais consumidas mundialmente (KARAK; BHAGAT, 2010) os pesquisadores têm dado uma atenção especial aos ingredientes biologicamente ativos presentes nos chás, tais como os alcalóides e os polifenóis, devido aos seus efeitos positivos à saúde humana. Estudos relacionam o consumo de chá à redução do risco de doenças cardiovasculares, artrite e osteoporose, além da redução nos níveis de colesterol (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). Os efeitos benéficos do chá têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes dos compostos polifenólicos, particularmente os derivados da catequina (KERIO et al., 2013). O poder antioxidante da catequina é reforçado não apenas pela presença de compostos fenólicos, mas também por minerais tais como Cr, Mn, Se e Zn, assim como a vitamina C (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006).

Existe um crescente interesse na determinação dos constituintes inorgânicos presentes nos chás, principalmente cátions como chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e estanho (Sn^{2+}), uma vez que estes são considerados contaminantes pelo Regulamento da Comunidade Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Devido à presença desses cátions em baixas concentrações, sua determinação requer a utilização de técnicas com elevada sensibilidade, tais como: a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2012), técnicas eletroforéticas (FENG; WANG; LI, 2003) e voltamétricas (MELUCCI; LOCATELLI; LOCATELLI, 2013).

Uma característica comum a essas técnicas analíticas é a necessidade da amostra estar em uma forma adequada à medida, geralmente na forma de uma solução aquosa, sendo uma prática comum a eliminação da matriz orgânica empregando misturas de oxidantes fortes na presença de calor. O emprego de ácido nítrico concentrado é frequente, principalmente na presença de peróxido de hidrogênio que é usado para potencializar a oxidação. A presença do excesso desses oxidantes nos digeridos finais pode ser um problema para a maioria das técnicas espectrométricas e, principalmente, para os métodos eletroanalíticos, pois estes podem ser muito sensíveis à mudança da força iônica e do pH do meio, bem como à presença de carbono orgânico não mineralizado na etapa de preparo.

Neste trabalho propõe-se desenvolver um método eletroanalítico de determinação simultânea de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em amostras de chás empregando voltametria de onda quadrada com redissolução anódica, preparando as amostras por digestão com radiação micro-ondas utilizando ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver um método para determinação simultânea de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica empregando eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado por filme de bismuto.

Para alcançar o objetivo principal, alguns objetivos específicos podem ser destacados:

- ✓ Otimizar os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada com redissolução anódica;
- ✓ Desenvolver o procedimento de digestão das amostras de chá empregando aquecimento com radiação micro-ondas e reagentes diluídos;
- ✓ Validar o método empregando material de referência certificado (forrageira Marandu);
- ✓ Aplicar essa metodologia na determinação simultânea dos cátions em amostras de chás verdes e pretos.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CHÁ

A definição literal e correta do termo chá se refere somente à infusão das folhas da planta arbustiva *Camellia sinensis*. As demais infusões de diversas outras ervas e até de frutas ficaram popularmente também conhecidas como “chás” devido ao processo de obtenção ser semelhante ao da *Camellia Sinensis* (DINIZ, 2013).

Trata-se da bebida aromatizada e não alcoólica mais consumida mundialmente (WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2013). Essa elevada demanda se deve aos seus conhecidos efeitos benéficos para a saúde humana, pois atua como antioxidante em doenças como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (JESZKA-SKOWRON; KRAWCZYK; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, 2015). Suas propriedades organolépticas dependem da composição química da folha que é constituída por vários tipos de compostos como catequinas, teaflavinas, flavonóides, teanina, proteínas e amino-ácidos, açúcares e polissacarídeos, lipídios, cafeína e outras metilxantinas, minerais e muitos outros constituintes (JIANG et al., 2015).

São seis os principais tipos de chá proveniente da *Camellia sinensis* (branco, verde, amarelo, preto, oolong e pós-fermentado), destacando-se os chás verde, oolong e preto por serem os mais consumidos no mundo (SANG et al., 2011). A principal etapa responsável pela diferenciação entre esses três tipos de chás é a oxidação, pois é nessa etapa que são produzidos os compostos característicos dos chás oolong (médio grau de oxidação) e preto (alto grau de oxidação). O chá verde não passa por essa etapa, e sim por uma etapa para desativar as enzimas responsáveis pela oxidação dos compostos presentes e, que dariam origem aos compostos característicos dos chás fermentados (oolong e preto) durante o processo de oxidação (FRASER et al., 2013). O chá tem uma composição média de

minerais em torno de 5%, podendo variar de acordo com o tipo de fertilizante aplicado durante o cultivo, solo, água de irrigação, condições climáticas, localização geográfica e processamento durante a manufatura (JABEEN et al., 2015).

As plantas absorvem os minerais que estão presentes no solo, principalmente quando seus níveis estão elevados. Estes minerais absorvidos ficam acumulados nas folhas, que é a parte empregada da planta *Camellia sinensis* (LASHEEN; AWWAD, 2008). Aplicação de defensivos agrícolas, poeira proveniente dos escapamentos veiculares ou até mesmo de atividades industriais próximas as regiões de cultivo são outros fatores não edáficos que elevam a concentração final de metais na folha (JIN et al., 2005; SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2012).

A comunidade europeia estabelece limites máximos de concentração nos chás apenas para Pb^{2+} ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) e Cd^{2+} ($0,050 \text{ mg L}^{-1}$) (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Estes metais são frequentemente encontrados em produtos químicos como pesticidas e fertilizantes, sendo empregados em tratamentos agrícolas, especialmente em países produtores de chá que não possuem legislação para controlar seus limites de concentração (MELUCCI; LOCATELLI; LOCATELLI, 2013). Há uma grande preocupação entre os pesquisadores em quantificar a presença desses metais pesados na folha e na infusão da *camellia sinensis*, uma vez que esses metais representam toxicidade para à saúde humana (LI et al., 2015).

Da mesma forma como a Comissão Europeia, a legislação brasileira também só estabelece limites apenas para cádmio e chumbo em amostras de chá. A resolução – RDC nº 42 de 29 de Agosto de 2013 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2013) aprova e dispõe sobre o regulamento técnico MERCOSUL em relação aos limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. De acordo com tal resolução, os níveis de chumbo e cádmio máximos em amostras de chá, erva mate e

outros vegetais de infusão devem ser 0,60 e 0,40 mg L⁻¹, respectivamente.

Quanto aos níveis de Cu²⁺, Jin et al., (2008) constataram que a acidez do solo seguido pelo teor de matéria orgânica são fatores edáficos estreitamente ligados ao aumento desse metal na folha. Enquanto que a principal causa antrópica que provoca o aumento das quantidades de chumbo e, principalmente, cobre, é o uso de maquinário à base de ligas metálicas durante os processos de torção e remoção d'água nas folhas (LV et al., 2013; NOOKABKAEW; RANGKADILOK; JUTAMAAD, 2006; SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2012).

A presença de cádmio na composição química das folhas está associada principalmente ao uso de fertilizantes fosfatados nas lavouras de *Camellia sinensis* (LV et al., 2013), bem como aos fungicidas empregados no controle de pragas. Outra forma de contaminação de cádmio e chumbo é através da poluição proveniente das emissões gasosas dos veículos, especialmente em plantações próximas de estradas (SEENIVASAN et al., 2008).

A Tabela 1 revisa alguns trabalhos, cujo objetivo é a quantificação dos metais Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺, focando nas concentrações encontradas, na técnica e no país de origem. Pode-se perceber uma grande variabilidade nos níveis desses cátions nas diferentes amostras de chás, sendo os fatores edáficos e antrópicos os principais contribuintes para essa variabilidade.

Esse levantamento focou apenas nas técnicas espectrométricas, uma revisão semelhante que aborda a determinação por técnicas eletroquímicas pode ser vista na tabela 2.

Tabela 1 – Teores de Cd, Pb e Cu em amostras de chás de acordo com o tipo e país originário.

Metal	Tipo de Chá	Níveis detectados (mg L⁻¹)	Origem do chá	Técnicas de Análise	Referência
Cd ²⁺	Verde	Nd - 1,07	China	ICP OES	HAN et al., (2005)
		0,002 – 0,100	Tailândia	ICP-MS	NOOKABKAEW et al., (2006)
		Nd - 1,07	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)
		0,67*	Sul da China	GF AAS	ZHENG et al., (2014)
	Preto	Nd - 0,09	China	ICP OES	HAN et al., (2005)
		(0,05 – 0,38)*	Sul da Índia	GF AAS	SEENIVASAN et al., (2008)
		Nd - 8,60	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)
		1,28*	Sul da China	GF AAS	ZHENG et al., (2014)
Pb ²⁺	Verde	0,59 – 4,49	China	GF AAS	JIN et al., (2005)
		0,060 – 53,89	Tailândia	ICP-MS	NOOKABKAEW et al., (2006)
		0,2 a 97,9	China	ICP OES	HAN et al., (2006)
		Nd - 92,7	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)
		1,81*	Sul da China	GF AAS	ZHENG et al., (2014)
	Preto	(0,55 – 1,03)*	Sul da Índia	GF AAS	SEENIVASAN et al., (2008)
		Nd - 240	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)
		2,06*	Sul da China	GF AAS	ZHENG et al., (2014)
Cu ²⁺	Verde	2,06 - 239,02	China	ICP OES	HAN et. al., (2005)
		3,075 – 22,42	Tailândia	ICP-MS	NOOKABKAEW et al., (2006)
		8,05 - 33,50	China	GF AAS	JIN et al., (2008)
		0,03 – 270	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)
		17,01 – 63,07	Diversos países	GF AAS	ZHONG; REN; ZHAO, (2015)
	Preto	2,04 - 447,50	China	ICP OES	HAN et. al., (2005)
		19,6 – 36,7	Irã	GF AAS	ANSARI et al., (2007)
		0,05 – 602	Diversos países	Espectrométricas	SZYMCZYCHA-MADEJA et al., (2012)

*Valor médio. Nd: Nível não detectável.

Todos os trabalhos citados na tabela anterior efetuaram uma etapa de mineralização da amostra antes de sua quantificação. Essa decomposição da amostra é necessária em muitos métodos analíticos (DEMIREL et al., 2008).

Essa etapa tem como objetivo principal disponibilizar o constituinte de interesse para algum meio de fácil análise (geralmente aquoso), por intermédio de digestão/extração ou algum outro processo. Quando o interesse analítico for pelos constituintes inorgânicos é comum realizar digestão empregando misturas de ácidos. Se a etapa de digestão for realizada por via seca, então será necessário realizar uma etapa de solubilização antes da quantificação (MESTER; STURGEON, 2003). Caso a digestão seja realizada por via úmida, a etapa de solubilização pode não ser requerida.

Digestão por via úmida assistida por micro-ondas é um dos métodos mais empregados devido a sua aplicação em uma grande variedade de amostras (ARRUDA; SANTELLI, 1997). O princípio que rege o aquecimento por radiação micro-ondas é que um material não transparente à radiação pode absorvê-la e sofrer um aumento de temperatura. Esse aumento na temperatura deve-se, principalmente, às interações entre a radiação micro-ondas e as moléculas do material, devido aos mecanismos de rotação do dipolo e migração iônica (DATTA; DAVIDSON, 2000). Quando um solvente polar é submetido a um campo elétrico oscilante, suas moléculas tendem a alinhar seus dipolos com o campo elétrico produzido. Essa constante tentativa de alinhamento gera calor devido ao atrito entre as moléculas, sendo este efeito chamado de mecanismo dipolar. O mecanismo iônico ocorre devido à interação do campo elétrico da radiação com os íons em solução, causando mudanças drásticas na direção de transporte dos mesmos, também gerando calor devido à resistência aplicada pelo solvente ao movimento dos íons (CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2013).

3.2 VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO

Os níveis de metais em amostras de chá podem chegar a unidades de mg L^{-1} ou até mesmo ng L^{-1} , levando em consideração os dados de pesquisas apresentados na seção anterior. Os teores de metais presentes nas amostras podem ficar ainda menores quando estas são submetidas à processos de digestão, uma vez que após a mineralização da matriz normalmente se realiza uma diluição do digerido. Uma prática comum para alcançar baixas concentrações é a realização de uma etapa de pré-concentração antes da quantificação, contudo, essa etapa pode ser dificultada por problemas como contaminação e/ou perda de amostra.

Dessa forma, faz-se necessário o emprego de técnicas com alta sensibilidade analítica como a ICP OES, ICP-MS, GF AAS e análise por ativação neutrônica. No entanto, estas técnicas têm custo elevado, são laboriosas e dispendiosas (ABBASI; BAHIRAEI; ABBASAI, 2011). Uma alternativa bastante eficaz na quantificação de níveis baixos desses metais é o emprego de métodos voltamétricos de análises aliados a técnicas de redissolução anódica, catódica ou adsortiva.

A redissolução anódica é a técnica voltamétrica mais empregada para determinação de íons metálicos. Ela compreende por uma etapa de acumulação (deposição), geralmente aplicando potenciais negativos para reduzir o analito, e uma etapa de redissolução onde o analito acumulado é reoxidado para a solução à medida que é feita uma varredura no sentido dos potenciais positivos (PACHECO et al., 2013). Os íons metálicos presentes na solução (M^{n+}) são reduzidos (M^0) durante a etapa de acumulação, sendo a corrente de oxidação o sinal obtido durante a etapa de redissolução ($\text{M}^0 \rightarrow \text{M}^{n+} + n\text{e}^-$).

A redissolução catódica é o oposto da anódica. Nela existe uma etapa de acumulação, na qual é aplicado um potencial positivo sobre o eletrodo de trabalho, e uma etapa de redissolução onde é realizada uma varredura no sentido dos potenciais negativos. Esse tipo de redissolução é

mais empregado para compostos que formam sais insolúveis sobre a superfície do eletrodo durante a etapa de acumulação (PACHECO et al., 2013; WANG, 2000).

Por fim, a redissolução adsortiva. Ela envolve uma etapa de acumulação, na qual ocorre a adsorção de um complexo (ML_n) formado entre um íon (Mⁿ⁺) e um Ligante (nL), e uma etapa de redissolução onde o complexo adsorvido é reduzido ou oxidado, retornando para a solução (PACHECO et al., 2013; SERRANO et al., 2003).

As técnicas de redissolução são apropriados métodos de pré-concentração, desde que os sinais provenientes da etapa de varredura, responsável pela aquisição das correntes de oxidação (anódica) ou redução (catódica), sejam realizadas por uma técnica de pulso. Essas técnicas apresentam como principal vantagem a capacidade de suprimir a corrente capacitiva, aumentando a contribuição da corrente faradaica que é produzida pela redução/oxidação da espécie de interesse, conseqüentemente ampliando a sensibilidade e diminuindo o limite de detecção (BRETT; BRETT, 1993; UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003). Uma das principais técnicas de pulsos empregadas atualmente é a voltametria de onda quadrada.

3.3 VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas mais rápidas e sensíveis, com limites de detecção comparáveis aos da cromatografia e espectroscopia (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Teoricamente, quando se trata da SWASV, os limites de detecção podem chegar à ordem de 10^{-10} a 10^{-11} mol dm⁻³ (MONK, 2001).

Na VOQ, a redução ou oxidação do analito é realizada por intermédio de uma onda quadrada sobreposta a uma rampa de potencial elétrico em forma de escada (do inglês *staircase*, que são os degraus de potencial elétrico, ou seja, o incremento). Nesta técnica, as correntes

elétricas são medidas ao final do pulso direto (aplicado no início do degrau) e ao final do pulso reverso (aplicado no meio do degrau), como ilustrado na Figura 1A. O voltamograma resultante é obtido como diferença entre essas duas correntes *versus* a rampa de potencial aplicado (Figura 1B) (ALEIXO, 2003; UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003).

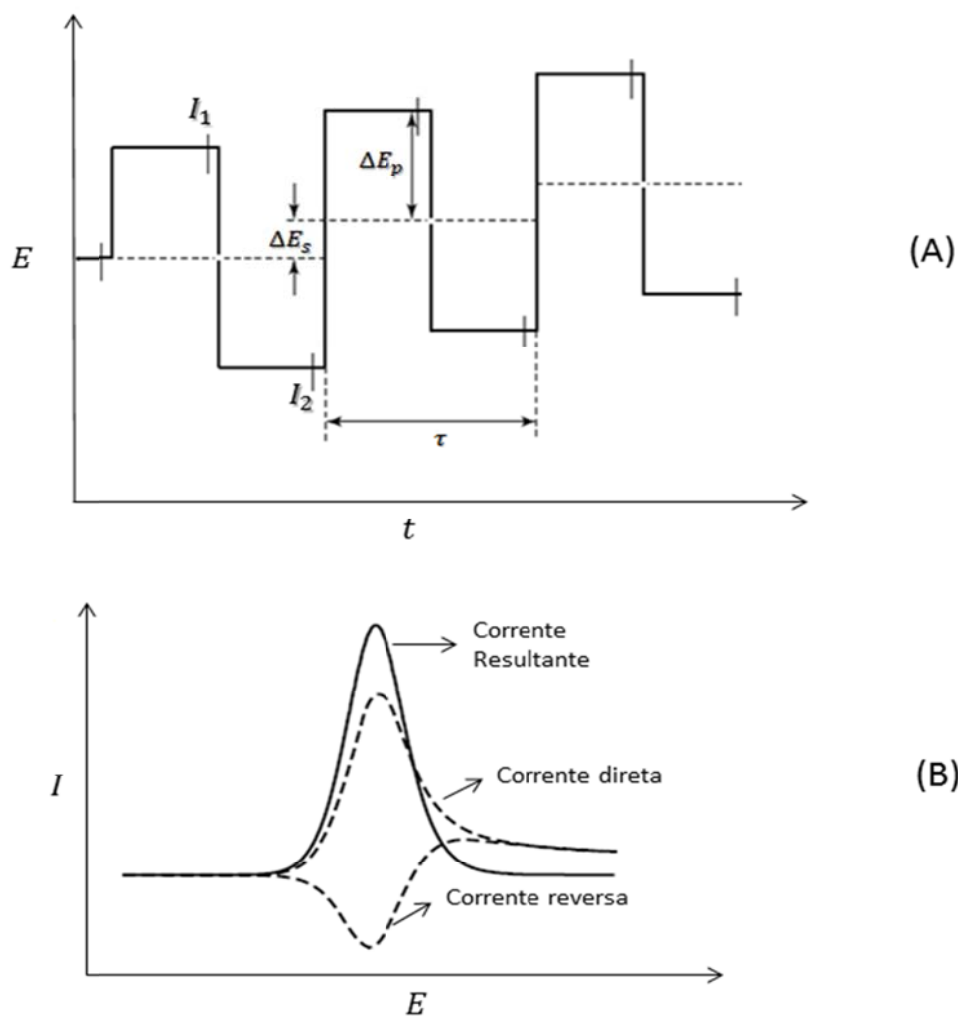


Figura 1 – (A) Aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de onda quadrada. Onde: I_1 e I_2 = pontos de coleta da corrente direta e reversa, respectivamente; ΔE_p = amplitude da onda; ΔE_s = incremento de potencial; τ = tempo de um ciclo de onda. (B) Voltamograma ilustrativo de um processo reversível (Adaptado de UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003).

Do ponto de vista prático, a maior vantagem da VOQ é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura. Enquanto que na voltametria de pulso diferencial as análises são realizadas em alguns minutos (3 a 5 min), na VOQ essa duração cai para ordem de poucos segundos (3 a 10 seg) (PACHECO et al., 2013). Além disso, por se tratar de uma técnica de pulso, a corrente faradáica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente capacitiva seja minimizada, como foi ilustrado na figura 1A. (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

3.4 ELETRODOS DE TRABALHO

O principal constituinte da célula responsável pela resposta analítica das técnicas descritas anteriormente, é o eletrodo de trabalho.

Em eletroquímica, eletrodo é um condutor elétrico em contato com uma solução eletrolítica. O termo, tecnicamente, geralmente abrange todas as peças mecânicas que constituem tal aparato (como p. ex., fio que realiza o contato elétrico e corpo de sustentação) e todas suas modificações químicas e/ou físicas da superfície. Porém, não abrange a solução eletrolítica e nem a dupla camada da interface eletrodo/solução. A superfície desses sensores é formada por um condutor quimicamente inerte para matriz que se deseja trabalhar, e serve apenas como uma fonte e receptor de elétrons. Os íons reduzidos e oxidados, envolvidos na reação eletroquímica, permanecem em solução (SCHOLZ, 2010).

A escolha do eletrodo é crucial para o sucesso das análises. O eletrodo ideal deve oferecer pré-concentração eficaz, reação redox favorável para o metal que se deseja determinar, reprodutibilidade, superfície renovável, baixa corrente de fundo e uma ampla faixa linear de trabalho (UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003).

Os eletrodos de mercúrio (HDME e filme de mercúrio) são um dos mais usados em técnicas de redissolução, porém, nas últimas décadas vem sendo substituídos devido à sua grande toxicidade (ENSAFI; HAJIAN, 2006). Dentre os eletrodos que substituem o de mercúrio, se destacam o eletrodo de ouro, de carbono, prata, filme de bismuto entre outros. Os eletrodos quimicamente modificados por filme de bismuto são particularmente atraentes, pois formam ligas com diversos metais, da mesma maneira que o mercúrio forma amálgamas, e não apresentam toxicidade (ECONOMOU, 2005; UNWIN; STRATMANN; BARD, 2003). Outras características importantes apresentadas pelo eletrodo de filme de bismuto são a preparação simples (*in situ*), picos bem definidos com sinal não distorcido, alta sensibilidade e excelente resolução entre picos vizinhos (WANG et al., 2001).

Para realizar a modificação por filme de bismuto é necessário empregar um eletrodo que sirva de substrato para a formação do filme. Os eletrodos de nanotubos de carbono são uma excelente opção nesse sentido, e podem ser divididos em duas categorias de acordo com a forma dos nanotubos empregados. Os nanotubos de parede única ou simples (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*), são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafeno, e os nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*), são constituídos por vários cilindros concêntricos de grafeno, espaçados aproximadamente em 3,45 Å um do outro (IIJIMA, 1991; RAO et al., 2001). Os nanotubos de carbono vêm sendo amplamente empregados nas análises voltamétricas, principalmente por apresentarem elevadas áreas superficiais e boas propriedades eletrocatalíticas (AGÜÍ; YÁÑEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN, 2008; ARAGAY; MERKOÇI, 2012). Quando aplicados na construção de eletrodos de trabalho, esses materiais promovem uma grande melhora no desempenho analítico em comparação aos eletrodos compósitos construídos à base de carbono grafite em pó (GANJALI et al., 2010).

3.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM CHÁ POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

Poucos trabalhos na literatura propõem métodos para determinação simultânea dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em amostras de chás, principalmente por voltametria de redissolução anódica. Poucos trabalhos propostos antes de 2010 foram encontrados, e entre os encontrados após esse ano, somente um propõe uma análise simultânea dos cátions de interesse por voltametria de redissolução anódica.

ABBASI; KHANI; TABARAKI, (2010) propuseram um método para determinação de Cu^{2+} por via adsortiva empregando a tiosemicarbazida como agente complexante. O procedimento foi aplicado para determinação desse cátion em amostras de chás, além de amostras de águas de diversas procedências, amostras de sangue, de arroz e de tomate. Foram utilizados HNO_3 , HCl , persulfato de amônio em diferentes momentos. Duas calcinações foram realizadas. No geral, foram gastos mais de duas horas e meia no preparo dessa amostra. A quantidade de cobre encontrada pelo método foi de $12,8 \pm 0,68 \mu\text{g L}^{-1}$ e um desvio padrão relativo de 2,11 %. O GF AAS foi o método de referência;

ABBASI; BAHIRAEI; ABBASAI, (2011) propuseram mais um método de análise via adsortiva, agora para determinação simultânea de Cu^{2+} e Cd^{2+} empregando luminol como agente complexante. As matrizes estudadas foram as mesmas do trabalho descrito anteriormente, apenas com o acréscimo de amostras de espinafre. O procedimento empregado para digestão dos chás também foi o mesmo do trabalho de 2010. Foi realizada adição e recuperação a fim de certificar a metodologia. Foram encontrados nas amostras de chás $7,5 \pm 0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} e $1,66 \pm 0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} com percentual de recuperação de 94,7 e 103,05 %, respectivamente.

CHAIYO et al., (2013) recomendaram um método para determinação de Cu^{2+} por via adsortiva anódica (AdASV) empregando a

1,10 fenantrolina como agente complexante. As amostras de chá foram filtradas, e 1 mL de cada filtrado foi diluído com 9 mL do eletrólito suporte antes da medida. A validação foi realizada por adição e recuperação, com recuperações de 98,6 a 111,6 %, e através de um método padrão (ICP OES). Esse último detectou uma faixa de concentração de 2,93 a 6,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos chás analisados, enquanto que o método proposto quantificou concentrações do metal entre 3,50 e 6,61 $\mu\text{g L}^{-1}$;

MELUCCI; LOCATELLI; LOCATELLI, (2013) sugeriram dois métodos, um para a determinação simultânea de Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , com o eletrodo estacionário de mercúrio, e outro para determinação simultânea de Cu^{2+} e Hg^{2+} , com o eletrodo de ouro. Ambos os procedimentos empregam a voltametria de redissolução anódica. No procedimento de preparo da amostra foram empregados HNO_3 , HCl e H_2SO_4 concentrados. O processo de mineralização foi mais de 2 horas. Com o método proposto, os autores encontraram entre 9,3 e 24,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cobre, 0,19 e 1,86 $\mu\text{g g}^{-1}$ de chumbo e uma quantidade mínima de 0,09 e máxima de 0,77 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cádmio nas amostras de chás analisadas. O método de referência foi a absorção atômica com a qual obteve valores semelhantes ao obtido com a SWASV. Além de comparar os resultados encontrados com os resultados alcançados via método padrão, a eficácia do método proposto por Melucci e colaboradores também foi verificado frente às amostras certificadas;

DAI et al., (2014a, 2014b) propuseram dois métodos separadamente, um para análise de Cu^{2+} , e outro para determinação simultânea de Cd^{2+} e Pb^{2+} . Eles empregaram eletrodo de carbono vítreo funcionalizado com uma amina, e voltametria de redissolução anódica por varredura linear com técnica para detecção. No procedimento de preparo da amostra foram empregados HNO_3 e HClO_4 concentrados. A metodologia proposta foi capaz de detectar aproximadamente 92 $\mu\text{g L}^{-1}$ do metal Pb^{2+} na amostra de chá, porém não se detectou cádmio. Também não foi detectado presença de cádmio através do método de rotina (ICP OES), pelo qual o procedimento proposto foi confrontado e obteve boa

concordância. Além disso, Dai e colaboradores também validaram o trabalho por adição e recuperação.

HEVIA; ARANCIBIA; ROJAS-ROMO, (2015) estudaram uma nova metodologia para determinação de Cu^{2+} em amostras alimentares, entre elas, folhas de chá. A técnica utilizada foi AdCSV empregando o ácido α -lipoico como agente complexante. Foi preparada uma espécie de infusão que posteriormente foi submetida a dois processos de digestão, com H_2O_2 como agente oxidante e a uma temperatura de 90 °C, que duraram 4 horas. Foram quantificados $0,317 \pm 0,014 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. O trabalho foi validado através de adição e recuperação e por meio de amostras de água certificadas.

A tabela 2 resume as principais características de todos os trabalhos descritos anteriormente, dando ênfase aos parâmetros de desempenho analítico.

Tabela 2 - Descrição dos principais trabalhos que determinam metais em chá por técnicas voltamétricas.

Analitos	Técnica	Eletrodo	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tipo de Chá	Preparo	Referência
Cu^{2+}	AdCSV	HDME	0,007	-	0,01 - 90,0	Verde	Digestão por via úmida em sistema aberto	ABASSI et al. (2010)
Cu^{2+} Cd^{2+}	AdCSV	HDME	0,04 0,02	0,127 0,063	0,5-105,0 0,8-70,0	Preto	Digestão por via úmida em sistema aberto	ABASSI et al. (2011)
Cu^{2+}	AdASV	Carbono Vítreo	0,0185	0,0619	0,1 - 50	Verde	Infusão	CHAIYO et al. (2013)
Hg^{2+} Cu^{2+}	SWASV	Eletrodo de Ouro	0,039 0,0069	-	0,23 - 24,5	Verde	Digestão por via úmida em sistema fechado	MELUCCI et al. (2013)
Cu^{2+} Pb^{2+} Cd^{2+} Zn^{2+}		HDME	0,0061 0,0051 0,0073 0,0091		0,09 - 24,5			
Cu^{2+}	LSASV	Carbono Vítreo funcionalizado	0,0009	-	0,005 - 1,0	Verde	Digestão por via úmida em sistema aberto	DAI et al. (2014a)
Cd^{2+} Pb^{2+}	ASV	Carbono Vítreo funcionalizado	0,2 1,0		0,5 - 250 50 - 450			DAI et al. (2014b)
Cu^{2+}	AdCSV	HDME	0,10	-	0,33 - 65,0	Verde	Digestão por via úmida em sistema aberto	HEVIA et al. (2015)

Para alcançar o melhor desempenho que uma técnica possa oferecer ao analista e conseqüentemente extrair o máximo de informação útil, é necessário aperfeiçoar os parâmetros que a envolve. Em todos os trabalhos relatados acima, por exemplo, os autores realizaram uma etapa de planejamento experimental baseada em princípios estatísticos a fim de otimizar tais parâmetros.

Ao planejar, o experimentador está interessado em descobrir como a variável de interesse, a resposta, depende da ou das variáveis manipuláveis, os fatores (que podem ser os parâmetros da técnica) (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Na VOQ, as manipulações dos parâmetros devem ser avaliadas, entre outras respostas, principalmente em função da corrente de pico, já que este sinal está relacionado diretamente com a concentração da espécie eletroativa (WANG, 2000).

Normalmente, é de interesse investigar todos os fatores e sua influência sobre a resposta de interesse, dessa forma emprega-se os planejamentos fatoriais completos. Porém, quando são muitos os fatores é possível que alguns deles não tenham influência significativa sobre a resposta. Nesse caso um planejamento completo seria um desperdício de tempo e dinheiro para o laboratório. Dessa forma, é melhor fazer uma triagem para decidir quais fatores merecem ser estudado mais detalhadamente. Uma ferramenta útil para casos assim, é o planejamento fatorial fracionário (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).



METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções-estoque dos cátions Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Bi^{3+} na concentração de $1000 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$, empregadas durante a realização deste trabalho, foram adquiridas da Sigma. As soluções padrão dos cátions Cd^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} foram preparados por diluição das soluções estoques para uma concentração de 10 mg L^{-1} , sendo a diluição realizada com uma solução de HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução do Bi^{3+} foi diluída para uma concentração de 100 mg L^{-1} também em HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Como eletrólito de suporte foi empregada uma solução-tampão, pH 4,7, preparada misturando-se volumes iguais das soluções de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os reagentes de partida foram da marca Merck (Ácido acético glacial 99,8 % e NaOH 99,9 %).

Para a digestão das amostras foram empregados peróxido de hidrogênio 35% e ácido nítrico 65%, ambos da marca Synth.

Na construção do eletrodo de trabalho foram empregados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) adquiridos da Sigma (código 773840) e óleo mineral da Specsol[®].

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro T-100 da Tekna. A digestão das amostras de chás e da amostra certificada foi realizada com auxílio de um forno micro-ondas Mars Xpress CEM com capacidade para 40 tubos, sendo os mesmos feitos em teflon – temperatura máxima de $260 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão máxima de 40 bar. As medidas das massas foram realizadas numa balança analítica Shimadzu, modelo AY220.

As medidas eletroquímicas foram realizadas no multi potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT M101 (Eco Chemie) acoplado a um módulo polarográfico Metrohm 663 VA Stand®, controlado pelo software NOVA 1.10. Um eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) foi empregado como eletrodo de referência, enquanto uma mina de grafite foi empregada como eletrodo auxiliar.

Um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificado por filme de bismuto foi empregado como eletrodo de trabalho. O mesmo foi preparado com uma mistura contendo 40% de nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT) e 60% de óleo mineral. Essa mistura foi macerada e homogeneizada com auxílio de almofariz e pistilo durante 30 minutos. A pasta pronta foi colocada na ponta de uma seringa de 5 mL e compactada com auxílio de um fio de cobre, que também serviu como contato elétrico. Finalmente, a ponta da seringa contendo a pasta foi friccionada sobre uma folha virgem de papel A4 para renovação da superfície. Na Figura 2 é apresentado um diagrama esquemático das etapas da preparação deste eletrodo.

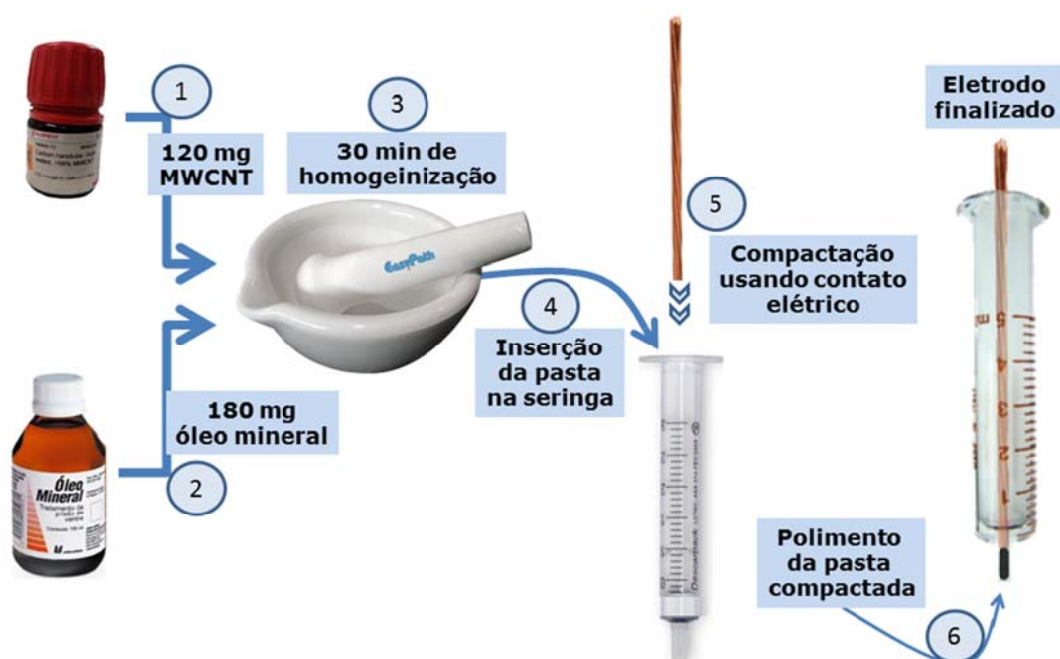


Figura 2 - Esquema das etapas de construção do eletrodo de trabalho.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO FILME DE BISMUTO

Como o filme de bismuto é preparado na própria solução de medida (*in situ*), a concentração de bismuto em solução deve ser avaliada a fim de encontrar a concentração adequada para obtenção de picos com maiores intensidades e resolução. Foram avaliadas as seguintes concentrações: 75, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, curvas analíticas dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} foram construídas nas três concentrações de Bi^{3+} , separadamente. As respostas desse estudo foram os parâmetros de desempenho dessas curvas. Os parâmetros da VOQ empregados durante essa etapa foram os otimizados: potencial de deposição (E_{dep}) de -1,3 V; tempo de deposição (T_d) de 300 s, tempo de equilíbrio (T_e) de 10 s, potencial inicial (E_{inicial}) de -1,3 V, potencial final (E_{final}) 0,3 V, amplitude de pulso (ΔE_p) 50 mV, incremento de potencial (ΔE_s) de 10 mV e frequência (f) de 50,0 Hz.

4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA

Um planejamento fracionário 2^{5-1} foi realizado com a finalidade de encontrar os parâmetros da voltametria de onda quadrada com redissolução anódica que proporcionassem sinais analíticos com maior intensidade da corrente de pico. Para gerar o planejamento e as respostas na forma de gráfico de pareto, foi utilizado o software STATGRAPHICS Centurion XVI[®].

Os parâmetros avaliados nesse estudo foram a amplitude de pulso (ΔE_p), incremento de potencial (ΔE_s), frequência (f), tempo de deposição (T_d) e tempo de equilíbrio (T_e). Os níveis inferior e superior de cada parâmetro, assim como todos os ensaios realizados estão descritos na Tabela 3. Para cada ensaio foram realizadas duas réplicas independentes, cada uma em triplicata. A corrente de pico (I_p) e seu coeficiente de

variação (CV) foram usados como respostas na avaliação. O CV trata-se de um termo estatístico que descreve, neste caso, o quanto as I_p estão dispersas da média, ou seja, refere-se à precisão (SKOOG et al., 2005). As concentrações do bismuto e dos cátions foram mantidas fixas em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, durante a realização desse estudo.

Tabela 3 - Planejamento fracionário 2^{5-1} usado na otimização dos parâmetros da voltametria de redissolução anódica por onda quadrada.

Experimento	T_d (s)	T_e (s)	f (Hz)	ΔE_p (mV)	ΔE_s (mV)
1	300	10	75	75	5
2	180	10	25	25	10
3	180	10	75	75	10
4	300	20	75	25	5
5	180	20	75	75	5
6	180	20	25	25	5
7	300	20	25	75	5
8	180	10	25	75	5
9	180	20	25	75	10
10	180	20	75	25	10
11	300	10	25	75	10
12	300	10	25	25	5
13	300	20	25	25	10
14	180	10	75	25	5
15	300	20	75	75	10
16	300	10	75	25	10

Após a etapa de redissolução foi aplicado o potencial de 0,3 V ao eletrodo de trabalho para a remoção do filme de bismuto da superfície do mesmo. Assim, o tempo de aplicação do potencial foi avaliado nos valores

60, 180 e 300 segundos. Neste estudo, a concentração dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} foi mantida em $30 \mu\text{g L}^{-1}$ e o Bi^{3+} em $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A avaliação foi realizada em quintuplicata para cada tempo estudado.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

A metodologia empregada na digestão das amostras de chás teve como princípio o método proposto por SOYLAK et al. (2007) para análise dos cátions Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em amostras de chás por espectrometria de absorção atômica em chama. O procedimento proposto por Soyak emprega ácido nítrico $11,0 \text{ mol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, massa de 200 mg de amostra, e o programa de aquecimento é baseado no controle da potência da radiação incidente. O procedimento adotado neste trabalho foi realizado conforme descrito a seguir.

A massa de chá ($200 \pm 0,2 \text{ mg}$) foi transferida para o tubo digestor, e sobre a mesma foram adicionados 6 mL de HNO_3 (65% m/v) e 2 mL de peróxido de hidrogênio (35% m/v). Os tubos digestores foram fechados e submetidos ao seguinte programa de aquecimento: Foi aplicada uma rampa de temperatura de 10 minutos com incidência de 400 W de potência para alcançar $120 \text{ }^\circ\text{C}$ manteve-se essa temperatura por mais 10 minutos, em seguida outra rampa de 10 minutos com incidência de 800 W de potência foi empregada a fim de alcançar 200°C , manteve-se essa temperatura por mais 20 minutos (Adaptado de SOYLAK et al., 2007). Ao final, um processo de ventilação foi realizado durante 5 min com o intuito de resfriar as amostras.

Como a acidez residual do digerido estava comprometendo a quantificação, decidiu-se realizar novos procedimentos empregando reagentes mais diluídos. Para tanto, as quantidades de amostra e de peróxido de hidrogênio foram fixadas em $200 \pm 0,2 \text{ mg}$ e $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, enquanto a concentração de HNO_3 foi variada. Três

concentrações de HNO₃ foram avaliadas: 3,5, 1,0 e 0,5 mol L⁻¹. O volume final nos tubos digestores foi levado para 10 mL com água deionizada. Após resfriamento do sistema, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 15 mL e aferidos com água deionizada. O mesmo programa de aquecimento descrito acima foi usado nas digestões com reagentes diluídos, porém a rampa de potência foi substituída pelo programa de aquecimento baseado no controle de temperatura, além disso, os valores de potência foram duplicados (Tabela 4).

Tabela 4 – Programa de aquecimento para o procedimento de digestão empregado neste trabalho.

Etapas	Potência (W)	Tempo de rampa (min)	T (°C)	Tempo de patamar (min)
1	800	10	120	10
2	1600	10	200	20
Resfriamento	-	-	-	5

A sequência do procedimento empregado para a digestão das amostras de chá e da forrageira Marandu encontra-se descrita a seguir e ilustrada na Tabela 3.



Figura 3: Sequência do procedimento usado para digestão das amostras

- 1) Pesar uma massa de $200 \pm 0,2$ mg da amostra (chá ou forrageira Marandu) e transferi-la para os tubos digestores;
- 2) Adicionar 700 µL de HNO₃, 1 mL de H₂O₂, ambos concentrados, e aferir o volume final para 10 mL com água deionizada. As concentrações finais do HNO₃ e H₂O₂ eram 1,0 e 1,2 mol L⁻¹, respectivamente (1,0 mol L⁻¹ foi a concentração otimizada escolhida para digestão das amostras de chá e da forrageira);
- 3) Submeter a mistura ao programa de aquecimento da Tabela 4;
- 4) Transferir os digeridos para os balões volumétricos de 15 mL e aferi-los com água deionizada.

A acidez residual nos digeridos foi encontrada por titulação de uma alíquota do digerido com uma solução de NaOH padronizada com biftalato. A acidez residual nos digeridos foi expressa como porcentagem da acidez residual relativa no branco do procedimento.

As digestões das amostras com as mesmas concentrações dos reagentes foram realizadas numa mesma batelada, e nunca misturando tubos contendo concentrações de ácido/peróxido diferentes. A principal razão é que o micro-ondas empregado regula a incidência da radiação em função da temperatura média nos tubos presentes. Assim, se alguns dos tubos tiverem maior concentração de eletrólitos que outros, a temperatura nos mesmos tenderá a ser maior. Isso faz com que a média da temperatura medida seja maior, e a radiação incidente sobre os demais tubos seja insuficiente para alcançar a temperatura programada.

4.6 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A primeira etapa da análise é a renovação da superfície do eletrodo por abrasão da mesma com uma folha de papel A4 virgem. Em seguida, 10 mL do tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ são adicionados à cuba eletroquímica e 50 ciclos rápidos (1 V s^{-1}) na faixa de potencial de $-1,4 \text{ V}$ a $1,4 \text{ V}$ são realizados para ativar a superfície do eletrodo.

Uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ do Bi^{3+} (100 mg L^{-1}) é adicionada ao tampão e o branco analítico é então registrado. Em seguida, uma alíquota de $200 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra (chá ou material de referência digeridos) é adicionada à cuba eletroquímica, e seu voltamograma registrado. Por fim, sobre a amostra são feitas as adições do padrão simultâneo dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} para obtenção das curvas analíticas (sem partição da amostra). Os parâmetros da VOQ empregados na aquisição dos sinais encontram-se listados na Tabela 5. Uma etapa de limpeza aplicando um

potencial de 0,3 V por 60 s deve ser realizada sempre que um voltamograma é registrado.

Tabela 5 - Parâmetros empregados na voltametria de onda quadrada com redissolução anódica durante a etapa de quantificação.

Tempo de deposição (T_d)	300 s
Potencial de deposição (E_{dep})	-1,3 V
Janela de potencial	-1,3 a 0,4 V
Amplitude de pulso (ΔE_p)	75 mV
Frequência (f)	75 Hz
Incremento de potencial (ΔE_s)	5 mV
Tempo de equilíbrio (T_e)	10 s

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi validado pela análise do material certificado de referência MR FO-01/2012 forrageira Marandu (*Brachiaria Brizantha*), da Embrapa. As análises das amostras de chás foram realizadas após a validação dos procedimentos escolhidos.

Para cada analito foram construídas curvas analíticas observando-se a região onde houvesse uma relação linear entre a concentração e a corrente de pico observada. A sensibilidade da calibração do método, b , é igual à inclinação da curva de calibração que descreve a região linear de resposta (SKOOG et al., 2005). Para a determinação do LOD e do LOQ, voltamogramas do eletrólito suporte foram registrados e a estimativa do desvio-padrão das correntes de pico, S_b , foi usada segundo as relações: $LOD = 3S_b/b$ e $LOQ = 10S_b/b$ (CURRIE, 1999; SKOOG et al., 2005)

A exatidão do método foi expressa em termos de porcentagem de recuperação (R%) empregando os valores encontrados pelo método proposto e os valores de referência da amostra certificada. A precisão foi apresentada em termos de coeficiente de variação.

4.8 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AS AMOSTRAS DE CHÁS

Duas amostras de chá verde e duas de chá preto foram adquiridas no comércio de João Pessoa, e digeridas (em HNO_3 na concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) sem etapas de tratamentos prévios. As digestões foram realizadas em triplicata, entretanto só foram mostrados os resultados provenientes das análises de duas réplicas de cada amostra. Para fins de validação, essas amostras foram fortificadas com $70,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd^{2+} e Pb^{2+} , e $106,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu^{2+} . As fortificações também foram feitas em triplicata, porém, assim como nas análises das amostras, só foram mostrados resultados provenientes da análise de duas réplicas.



RESULTADOS e DISCUSSÕES

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE BISMUTO

O filme de bismuto é formado na cuba eletroquímica durante a etapa de deposição. Nesta etapa é aplicado um potencial negativo capaz de reduzir o Bi^{3+} na superfície do eletrodo e formar um filme. A concentração de Bi^0 presente no filme será diretamente proporcional à concentração de Bi^{3+} presente na solução. A Figura 4 mostra os sinais provenientes das concentrações 75, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Bi^{3+} em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} . Pode-se perceber que o voltamograma registrado no tampão acetato 0,1 mol L^{-1} na ausência do Bi^{3+} (curva em preto) não apresenta sinal.

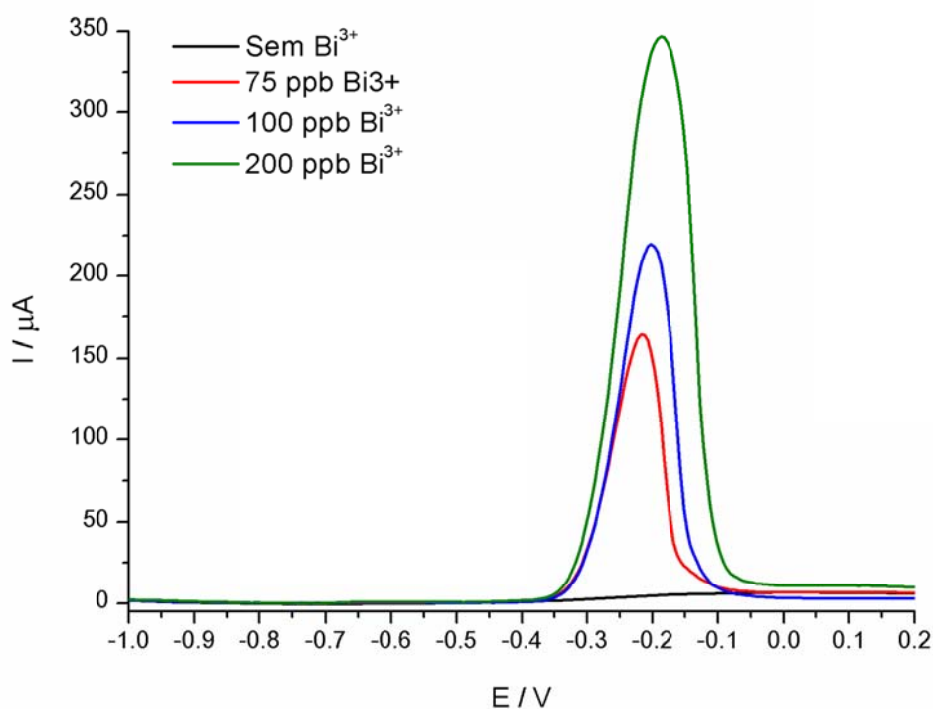


Figura 4 - Formação do filme de bismuto em diferentes concentrações do cátion; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

A menor concentração de Bi^{3+} teve como principal vantagem a possibilidade de determinar menores teores de cobre, pois ocorreu uma maior sobreposição do pico de bismuto sobre o pico do cobre a medida em que houve um aumento da concentração do filme. Assim, com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Bi^{3+} , só foi possível visualizar o pico do Cu^{2+} quando a concentração era no mínimo de $15 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, uma concentração três vezes superior à observada com quantidades inferiores de Bi^{3+} . Portanto, o emprego de uma concentração menor de bismuto é necessário para a determinação simultânea, principalmente se o teor do Cu^{2+} presente na amostra for inferior a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 5).

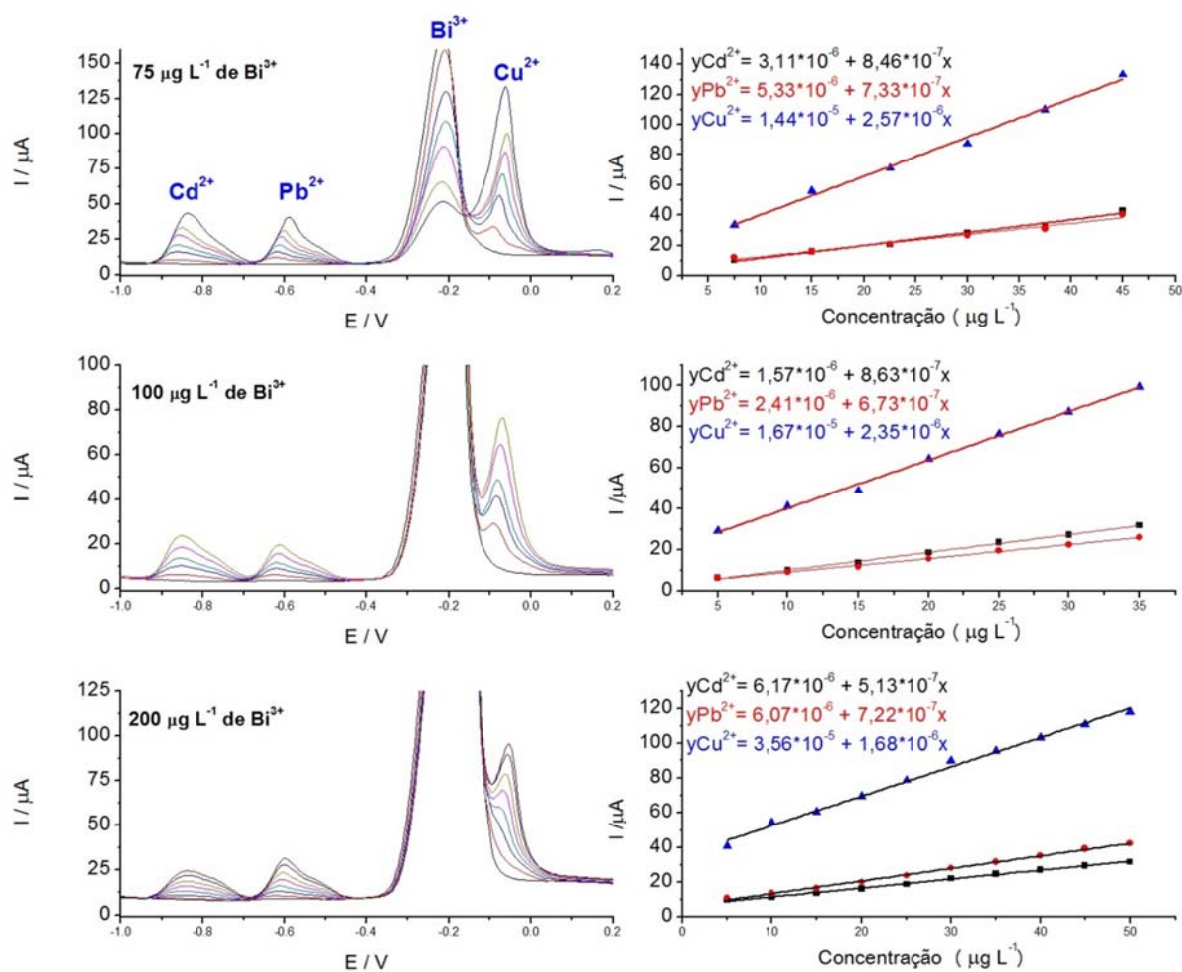


Figura 5 - Curvas analíticas dos cátions Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ construídas nas concentrações de 75, 100 e 200 µg L⁻¹ de Bi³⁺; f = 50 Hz, ΔE_p = 50 mV, ΔE_s = 5 mV, T_d = 300 s, E_d = -1,3 V.

A avaliação qualitativa foi suficiente para descartar a concentração de 200 µg L⁻¹ de Bi³⁺, tendo em vista a intensificação da sobreposição. Fazendo uma análise quantitativa entre os parâmetros obtidos nas concentrações 75 e 100 µg L⁻¹, observa-se que não há diferença significativa entre os limites de quantificação e detecção (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros de desempenho para as curvas analíticas dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas concentrações de 75, 100 e 200 $\mu g L^{-1}$ de Bi^{3+} .

-	Cátions	LOD ($\mu g L^{-1}$)	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	R²	Faixa dinâmica linear ($\mu g L^{-1}$)
75 $\mu g L^{-1}$	<i>Cd⁺²</i>	0,19	0,64	0,9813	0,6 - 45
	<i>Pb⁺²</i>	0,30	1,02	0,9750	1,0 - 45
	<i>Cu⁺²</i>	0,52	1,75	0,9922	1,8 - 45
100 $\mu g L^{-1}$	<i>Cd⁺²</i>	0,18	0,60	0,9966	0,6 - 35
	<i>Pb⁺²</i>	0,31	1,04	0,9955	1,0 - 35
	<i>Cu⁺²</i>	0,57	1,91	0,9958	1,9 - 35
200 $\mu g L^{-1}$	<i>Cd⁺²</i>	0,29	0,98	0,9961	1,0 - 50
	<i>Pb⁺²</i>	0,27	0,90	0,9972	0,9 - 50
	<i>Cu⁺²</i>	0,68	2,26	0,9940	2,3 - 50

No entanto, houve diferença significativa entre os coeficientes de correlação, os quais os melhores valores foram referentes ao filme na concentração de 100 $\mu g L^{-1}$, indicando que as curvas obtidas nessa quantidade de bismuto apresentaram uma melhor linearidade. Ademais, uma notória saturação do filme de 75 $\mu g L^{-1}$ constatado pela diminuição do sinal de Bi^{3+} , à medida que se aumentava a concentração de cobre na cela (Figura 5), levou a conclusão de que a melhor concentração para formação do filme é com 100 $\mu g L^{-1}$ de bismuto.

5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA

A técnica selecionada para ser usada durante as análises foi a voltametria de onda quadrada com redissolução anódica. Para que o sinal analítico medido possua a máxima relação sinal/ruído, é necessário ajustar os parâmetros da técnica. Por isso, um planejamento fatorial fracionário foi executado para avaliar os níveis de cada parâmetro investigado, e fornecer um direcionamento sobre quais níveis desses parâmetros escolher. As concentrações dos cátions Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) e Bi^{3+} ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) foram mantidas fixas durante esse estudo. A Figura 6 apresenta todos os voltamogramas resultantes desse planejamento.

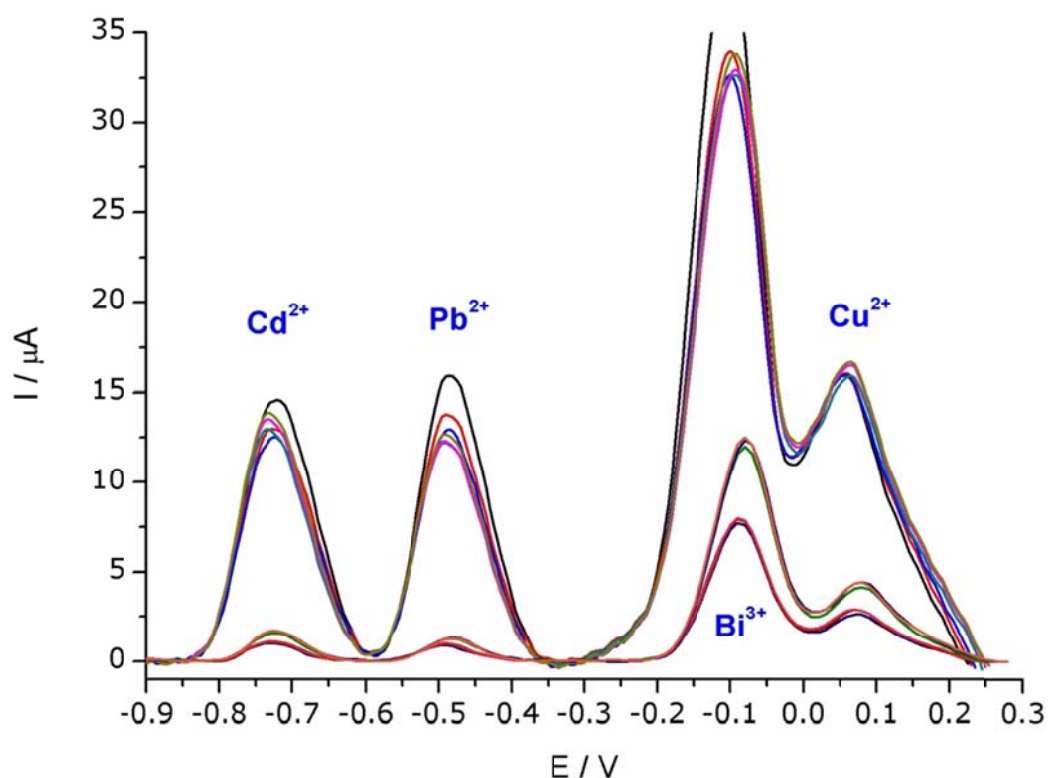


Figura 6 - Voltamogramas referentes aos ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1} .

A corrente de pico (I_p) e o coeficiente de variação (CV) dos voltamogramas acima foram empregados como respostas do planejamento. A ferramenta utilizada para avaliar o planejamento foi o gráfico de Pareto. Através deste gráfico é possível identificar de forma simples as variáveis que são mais significantes e o tipo de efeito dessas variáveis sobre as respostas. Variáveis que influenciam a resposta de forma significativa possuem valores calculados superiores ao valor crítico (linha em azul nas Figura 7 e 6). A cor da barra representa o tipo de efeito causado pelo aumento do nível em um parâmetro. Assim, se o aumento no nível do parâmetro avaliado provoca um aumento na resposta avaliada, então esse parâmetro possui um efeito sinérgico (barra em cinza nas Figura 7 e Figura 8) sobre a resposta. Por outro lado, se o aumento no nível desse parâmetro provoca uma diminuição na resposta avaliada, o efeito do mesmo sobre essa resposta é antagônico (barra em azul da Figura 7 e Figura 8).

A avaliação dos efeitos das variáveis sobre a corrente de pico mostrou que todos os parâmetros possuem efeito sinérgico e somente o tempo de equilíbrio (T_e) não influenciava de forma significativa as correntes de todos os cátions. Os parâmetros mais significativos para todos os picos, simultaneamente, foram a frequência (f), a amplitude de pulso (ΔE_p) e o tempo de deposição (T_d). O T_e não contribuiu de forma significativa para nenhuma resposta, o incremento de potencial (ΔE_s) foi significativo apenas para o Cu^{2+} . A Figura 7 mostra a contribuição de cada fator para as respostas.

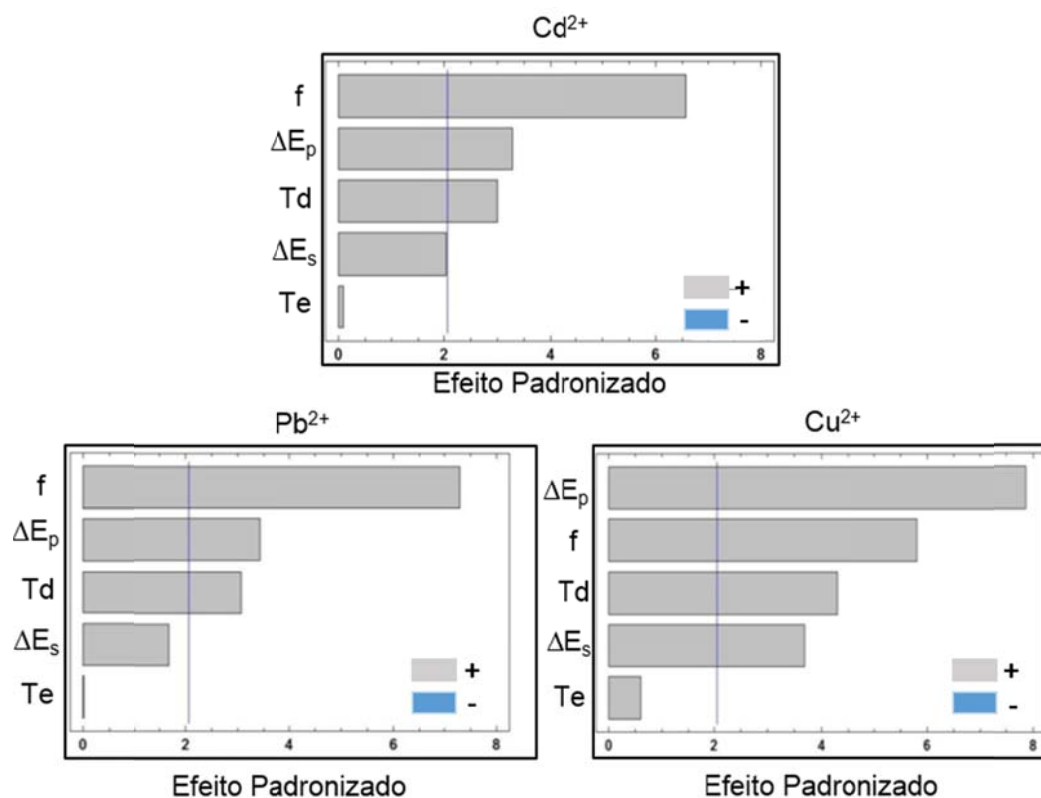


Figura 7 - Cartas de Pareto referentes à avaliação da influência dos parâmetros ΔE_p , T_d , ΔE_s , f e T_e sobre as correntes de pico.

O coeficiente de variação reflete a dispersão das correntes de pico em torno da média. De forma geral, espera-se que os valores desse coeficiente sejam os menores possíveis. O tempo de deposição apresentou uma influência significativa sobre a resposta do cobre, foi um efeito antagônico, indicando que o aumento do nível provoca menores variações nas correntes de pico do Cu^{2+} . O outro parâmetro que exibiu valores superiores ao valor crítico foi a frequência, apresentando um efeito sinérgico para o CV, ou seja, um efeito não desejável já que coeficiente com valor alto é indicativo de imprecisão (SKOOG et al., 2005) (Figura 8).

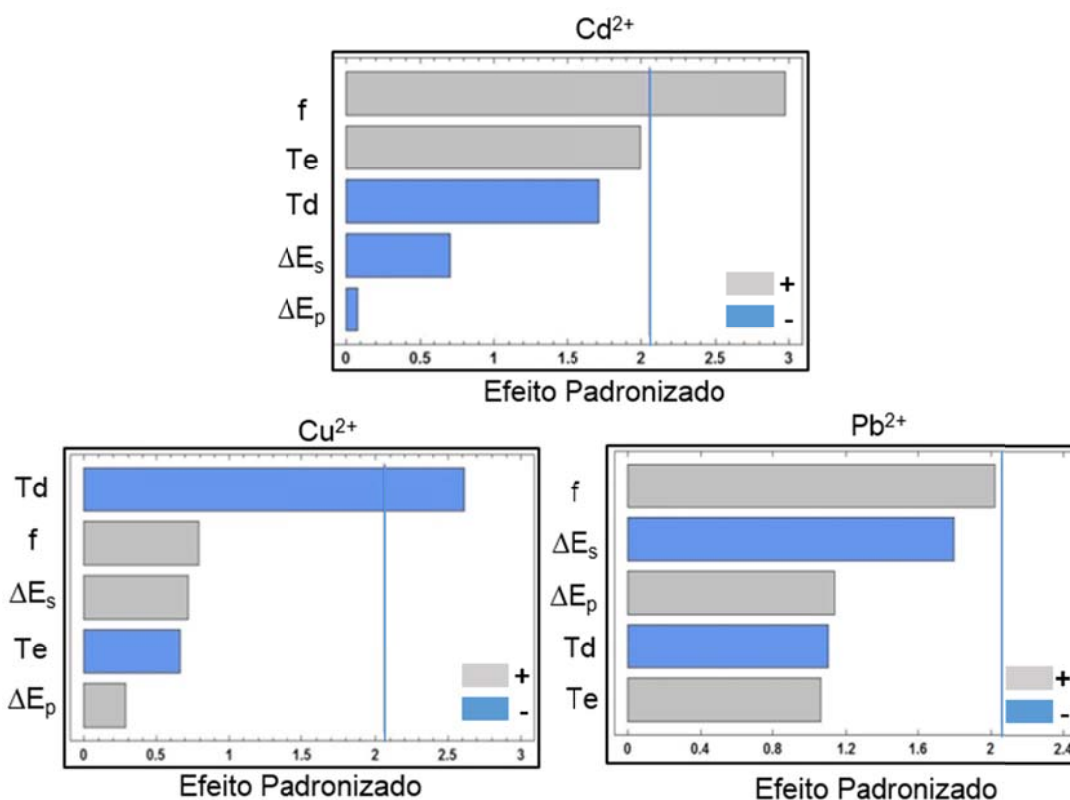


Figura 8 - Cartas de Pareto referentes à avaliação da influência dos parâmetros ΔE_p , T_d , ΔE_s , f e T_e sobre os coeficientes de variação.

Avaliando de uma maneira geral as respostas das figuras Figura 7 e Figura 8 se optou por manter a frequência no valor máximo, pois isto implica no aumento da corrente de pico de todos os metais, mesmo acarretando um ganho na dispersão das correntes de Cd^{2+} . Os parâmetros ΔE_p e T_d também foram mantidos nos níveis máximos do planejamento. Como T_e não foi significativo para nenhuma resposta, este foi mantido no seu nível mínimo. O ΔE_s apenas foi significativo para a I_p do cobre, assim decidiu manter esse parâmetro também em seu nível mínimo, pois isto designa voltamogramas com melhores resolução. As interações entre os parâmetros do planejamento não foram avaliadas, tendo em vista que o interesse do estudo era encontrar a combinação entre os níveis dos parâmetros estudados que fornecesse as melhores

respostas. A Tabela 7 exibe os melhores valores encontrados através do planejamento.

Tabela 7 – Valores escolhidos pelo planejamento.

Parâmetros da técnica	Valores escolhidos
Tempo de deposição (T_d)	300 s
Amplitude de pulso (ΔE_p)	75 mV
Frequência (f)	75 Hz
Incremento de potencial (ΔE_s)	5 mV
Tempo de equilíbrio (T_e)	10 s

A próxima etapa foi otimizar o processo de limpeza do eletrodo, pois a permanência de resíduos do filme na sua superfície pode provocar um acúmulo de massa ao longo das medidas e ocasionar variação do sinal medido (efeito de memória). Uma concentração de 10 µg L⁻¹ de Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺, e 100 µg L⁻¹ de Bi³⁺, foram empregadas nesta avaliação. Uma diferença de potencial de 0,3 V foi aplicada após a etapa de redissolução, e os tempos de aplicação de 60, 180 e 300 s foram avaliados. Cada análise (redissolução + limpeza) em cada tempo foi realizada cinco vezes, e a média das correntes e desvios-padrão obtidos serviram como respostas na avaliação. O estudo mostrou que a aplicação de um potencial de 0,3 V durante 60 s foi suficiente para remover o bismuto remanescente da superfície do eletrodo, pois neste tempo foram alcançadas maiores correntes com menores desvios (Figura 9).

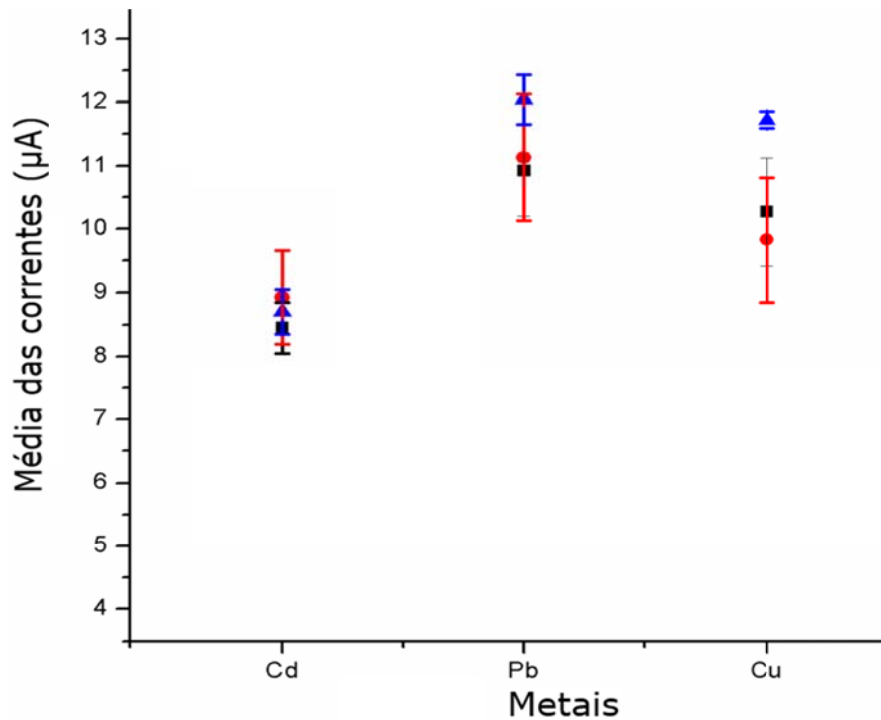


Figura 9 - Estudo do tempo de remoção do filme; $f = 75 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

5.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

O primeiro procedimento de digestão empregado foi baseado na utilização de uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio concentrados. Essa mistura foi aplicada numa amostra de chá verde e o aspecto visual final dos digeridos foram soluções límpidas. Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ tomada de um dos digeridos foi adicionada à cuba eletroquímica contendo 10 mL de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O voltamograma está apresentado na Figura 10. Não foi possível observar o sinal de nenhum dos analitos no voltamograma, além disso, percebeu-se que a adição dessa alíquota provocava o desaparecimento do pico do bismuto. Esse perfil anômalo provavelmente surgiu em decorrência da quebra da capacidade tamponante, que provocou o abaixamento do pH da solução e a evolução de hidrogênio molecular durante a etapa de

deposição. Esse problema foi contornado adicionando alíquotas menores dos digeridos ($< 50 \mu\text{L}$), porém, com volume nessa magnitude não foi observado nenhum pico dos analitos. A suspeita foi de que os níveis desses cátions na cuba estavam ficando abaixo do limite de detecção.

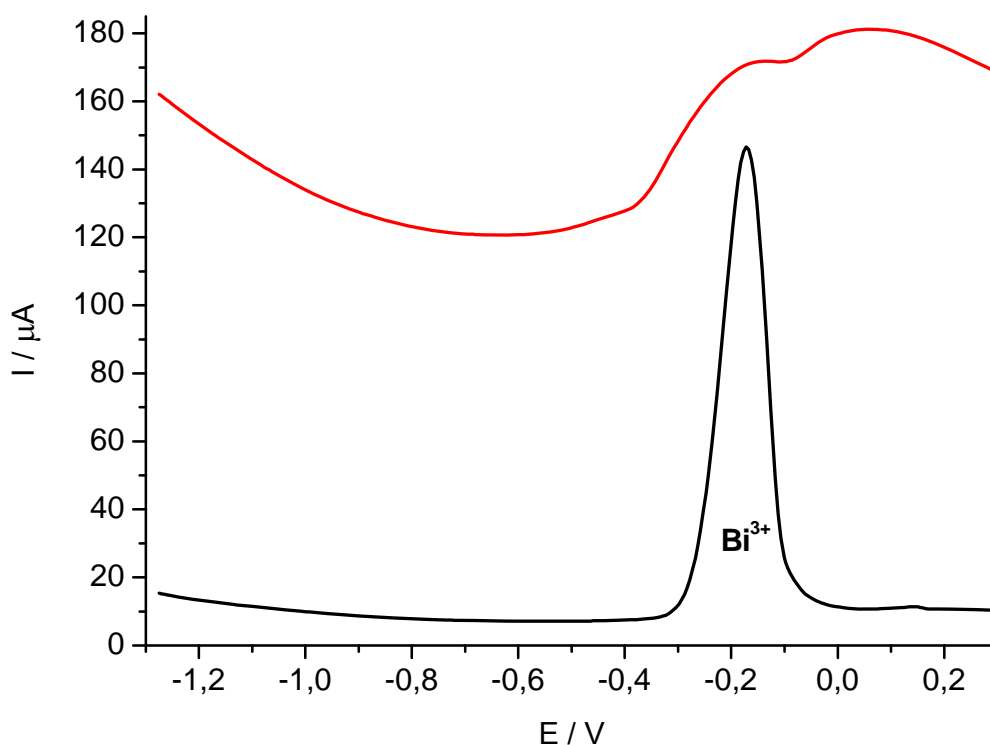


Figura 10 - Quebra da capacidade tamponante em função da adição da amostra digerida com ácido $11,0 \text{ mol L}^{-1}$. Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ do digerido (curva em vermelho) foi adicionado ao branco (curva em preto) provocando uma mudança no perfil do voltamograma; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

A partir de então, foi decidido realizar novas digestões empregando reagentes mais diluídos, visando obter digeridos menos ácidos para que fosse possível adicionar maiores quantidades de amostra na cuba sem que houvesse comprometimento da capacidade tamponante. Foram realizados outros três procedimentos de digestões, dessa vez empregando uma concentração ácida mais diluída ($3,5$, $1,0$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido nítrico). A

concentração de peróxido nesses procedimentos foi reduzida, e mantida em $1,2 \text{ mol L}^{-1}$.

É essencial garantir uma baixa concentração de peróxido, pois foi verificado que a presença do mesmo nos digeridos provocava elevação da corrente de fundo, deslocando a linha de base dos voltamogramas e interferindo na medição das correntes de pico. Isso foi verificado após medir algumas amostras de chá verde digeridas com ácido nítrico em baixa concentração, porém com o H_2O_2 mantido em $3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Dessa forma, decidi fazer um breve estudo dessa interferência do peróxido. Foram adicionadas à cuba, contendo o eletrólito de suporte, Bi^{3+} e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , alíquotas de H_2O_2 (35% m/v) em proporções de 0,1 e 0,2 % em relação ao volume total da cela, e realizada a varredura. Percebeu-se que havia alteração da linha de base dos voltamogramas após a adição dessas alíquotas comprometendo o sinal dos picos (Figura 11).

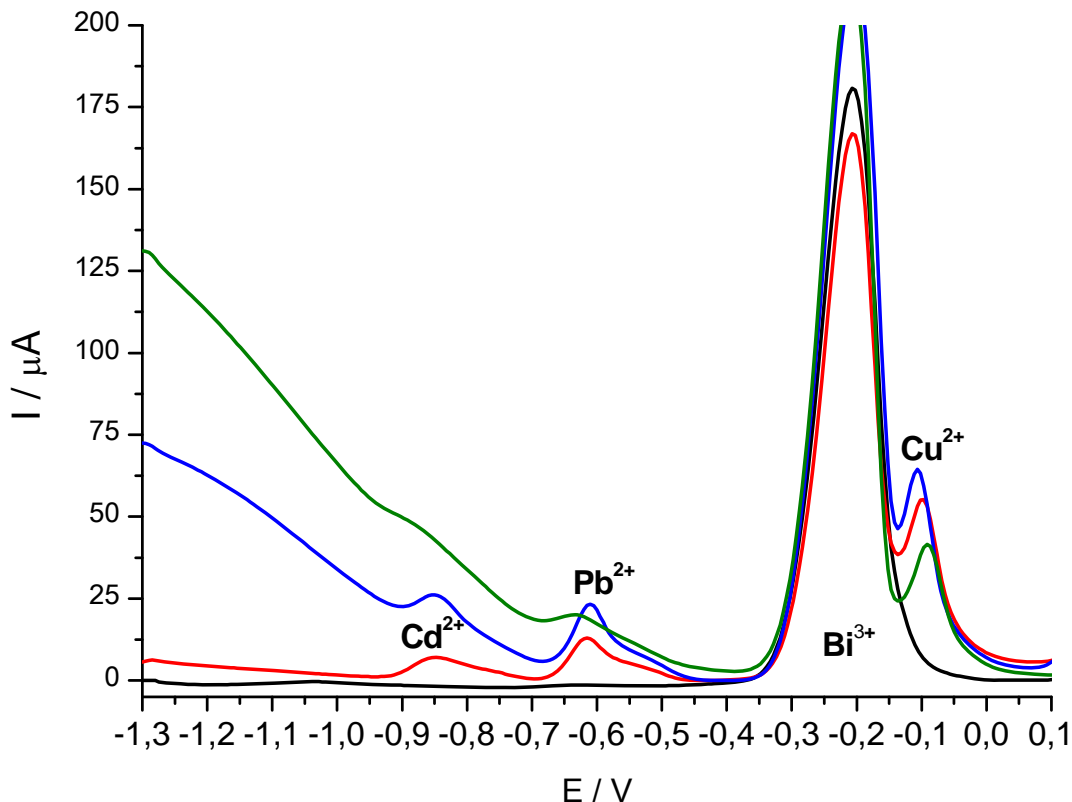


Figura 11 - Estudo da influência do peróxido de hidrogênio sobre os voltamogramas. Ao branco (curva em preto) foram adicionados $15 \mu\text{g L}^{-1}$ dos metais (curva em vermelho), e, em seguida, alíquotas de 0,1 % v/v (curva em azul) e 0,2 % v/v (curva em verde) de H_2O_2 ; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

Por isso, $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi a concentração do peróxido de hidrogênio que mais se adequou ao procedimento. No entanto, apesar dos digeridos nessas condições não apresentarem problemas de elevação da corrente de fundo, os brancos dos procedimentos da digestão exibiram tal problema. Isso era de se esperar, pois nos brancos do procedimento era conservado um volume maior de oxidantes, já que não eram consumidos uma vez que nesses frascos não havia, obviamente, matéria orgânica. Mas isso não comprometeu o levantamento dos parâmetros de desempenho, descritos na Tabela 8 da próxima seção.

Após o esclarecimento acerca do H_2O_2 , faz-se necessário retomar a discussão a respeito do uso de HNO_3 menos concentrado.

A primeira digestão das amostras de chá foi executada na concentração de $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 . De princípio já houve a possibilidade de se adicionar um volume maior de digerido à célula eletroquímica, que nesse caso foi de $300 \mu\text{L}$, cerca de seis vezes mais que a máxima quantidade adicionada com a digestão anterior (com HNO_3 11 mol L^{-1}), sem que a capacidade tamponante fosse ultrapassada. Nessa varredura surgiu um sinal na região do cobre (Figura 12), indicando a presença desse metal no chá digerido, fato que não aconteceu com a adição de alíquotas abaixo de $50 \mu\text{L}$, ou seja, comprovava-se aí que a análise com pequenos volumes de chá não era capaz de detectar sinal algum pois o LOD não era alcançado.

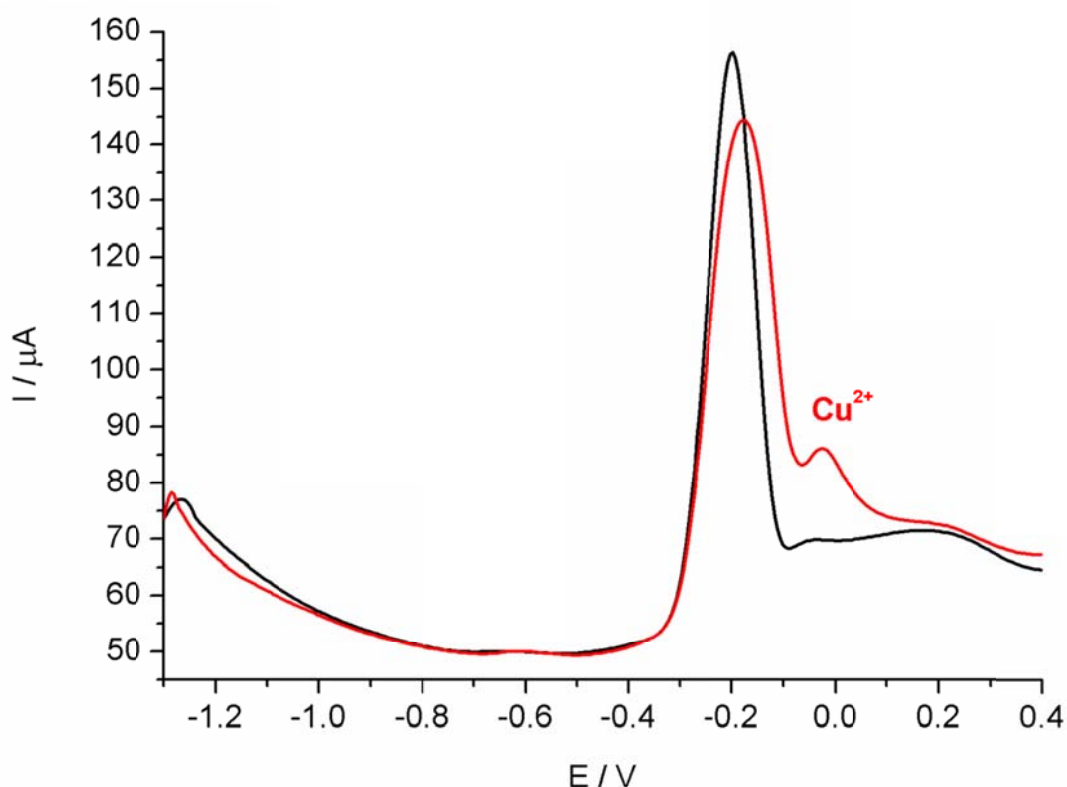


Figura 12 - Voltamograma registrado no eletrólito (curva em preto) contendo uma alíquota de $300 \mu\text{L}$ (curva em vermelho) de uma amostra de chá digerida com HNO_3 $3,5 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

Esse resultado impulsionou a realização de preparos da amostra empregando menores quantidades de ácido, e por isso foram feitas digestões com ácido nítrico 1,0 e 0,5 mol L⁻¹.

As digestões realizadas com HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹ exibiram aspectos límpidos com leve coloração esverdeada. A acidez residual encontrada por titulação variou de 91% a 94% nas amostras digeridas com ácido 1,0 mol L⁻¹, e de 93% a 95% nas amostras digeridas com ácido 0,5 mol L⁻¹. O aspecto dos digeridos com ácido nítrico 3,5, 1,0 e 0,5 mol L⁻¹ pode ser visualizado na Figura 13.

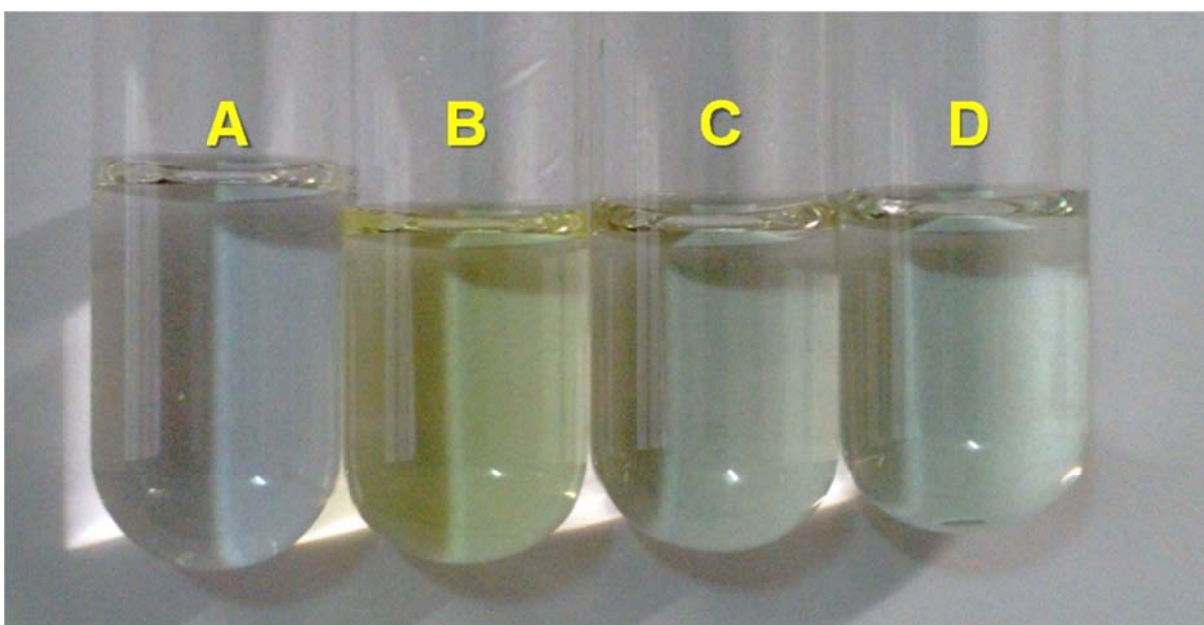


Figura 13 - Aspecto final das amostras digeridas com o HNO₃ nas concentrações 3,5, 1,0 e 0,5 mol L⁻¹. A: Branco de uma digestão, B: 0,5 mol L⁻¹, C: 1,0 mol L⁻¹, D: 3,5 mol L⁻¹.

Na digestão com ácido nítrico 0,5 mol L⁻¹ não foi possível alcançar a temperatura de 200 °C, sendo 165°C a temperatura máxima atingida nesse sistema. Esse fato provavelmente está ligado ao baixo ponto de ebulição da solução. A grande redução no volume por evaporação foi outro fato que aconteceu na digestão com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹. O aumento da

fração volumétrica de ácido nítrico na digestão com $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi suficiente para que a temperatura atingisse 200°C , e fosse mantida pelo menos por 10 minutos na etapa final. Na análise do digerido com ácido $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi possível verificar a presença do Pb^{2+} , além do Cu^{2+} , quando uma alíquota de 1,5 mL de um dos digeridos foi empregada. Com alíquotas menores como, por exemplo, 500 μL o sinal do chumbo era inibido pelo ruído da medida. Dessa forma, esse estudo inferiu que o nível do Pb^{2+} na amostra era baixo e que, portanto, o sinal do mesmo só poderia ser quantificado quando quantidades maiores do digerido fossem usadas. A mesma avaliação foi feita com os digeridos em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com a diferença de que alíquotas menores foram usadas, até no máximo 800 μL , pois acima disso a capacidade tamponante era comprometida. Os resultados foram similares para o Cu^{2+} , porém não foi detectado sinal de chumbo, o que era esperado pelo baixo volume de digerido que tinha que ser adicionado.

A Figura 14 apresenta esse estudo realizado com os digeridos em ácido $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

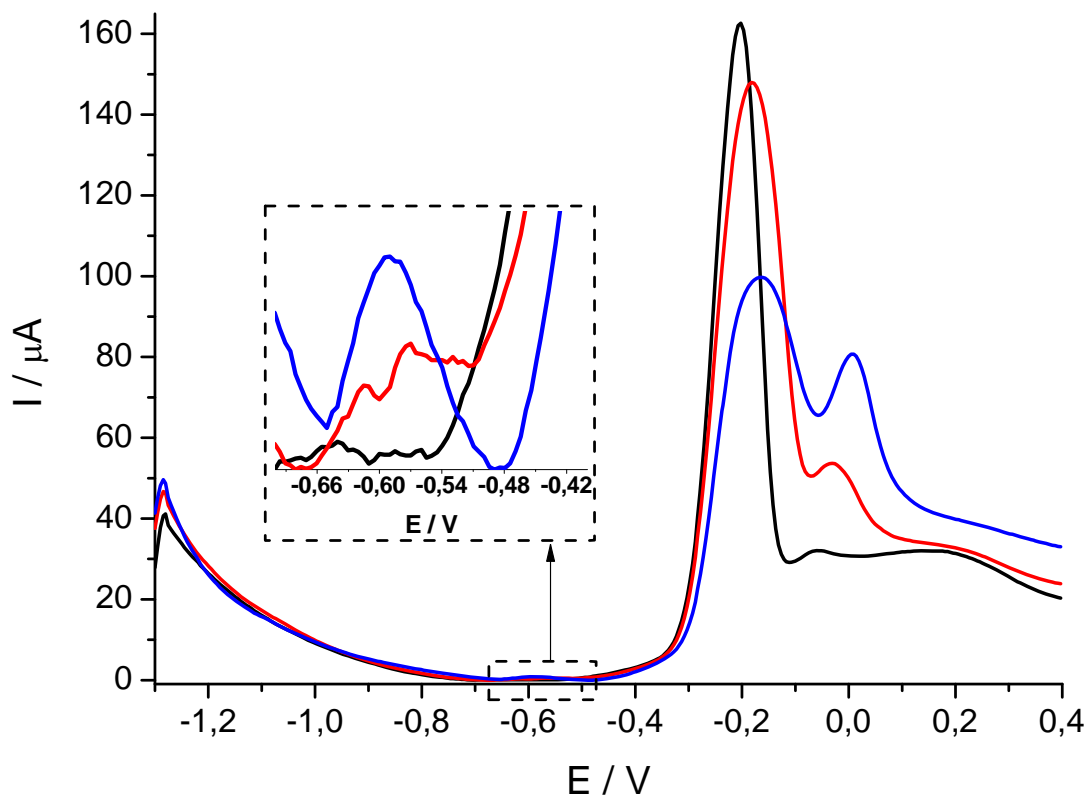
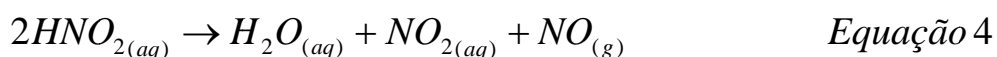
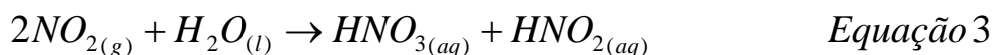
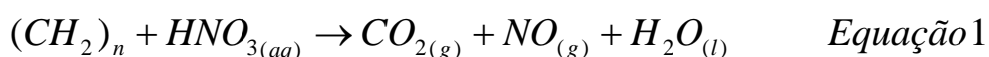


Figura 14 - Avaliação da digestão com ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Ao branco (curva em preto) foram adicionadas alíquotas de $500 \text{ } \mu\text{L}$ (curva em vermelho) e $1500 \text{ } \mu\text{L}$ (curva em azul) do digerido; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

De princípio conseguir digestões com ácido mais diluído não era esperado, já que a literatura reporta na sua grande maioria casos com digestões concentradas de oxidantes. Porém, Castro et al., (2009) explicou que as digestões utilizando soluções de ácido nítrico diluído e radiação micro-ondas, permitem trabalhar com frascos fechados sob altas pressões e moderadas temperaturas sem diminuição da eficiência da digestão, e que esse processo está baseado no ciclo de regeneração do ácido nítrico, descrito a seguir.

Um dos produtos gerados durante a digestão é o óxido nítrico (**NO**) (Equação 1). O mesmo reage com o oxigênio presente na fase gasosa para formar o dióxido de nitrogênio (**NO₂**) (Equação 2). O dióxido

de nitrogênio sofre reação de desproporcionamento em meio aquoso gerando ácido nítrico (**HNO₃**) e ácido nitroso (**HNO₂**) (*Equação 3*). O ácido nitroso se decompõe em óxido nítrico (**NO**) (*Equação 4*), e este reage com o oxigênio para formar (*Equação 2*) ácido nítrico. Esse é o mecanismo proposto para explicar a grande eficiência da digestão empregando o ácido nítrico diluído.



Mediante a análise prévia das digestões com 3,5 e 0,5 mol L⁻¹, realizadas através dos voltamogramas descritos anteriormente, decidiu-se aplicar as três metodologias empregando HNO₃ mais diluído no preparo das amostras certificada da forrageira Marandu.

5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A metodologia sob avaliação refere-se a determinação simultânea dos cátions Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ por voltametria de onda quadrada por redissolução anódica, empregando eletrodo de pasta de nanotubos modificado por filme de bismuto. Os parâmetros da onda quadrada otimizados e aqui avaliados são: frequência de 75 Hz, amplitude de pulso de 75 mV, incremento de potencial de 5 mV, tempo de deposição de 300 s, potencial de deposição de -1,3 V, e 100 µg L⁻¹ de Bi³⁺ em tampão

acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As digestões foram realizadas com quantidades fixas do material certificado (200 mg) e de H_2O_2 ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$), enquanto a concentração de HNO_3 variou entre 3,5, 1,0 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A primeira etapa foi a avaliação dos parâmetros de desempenho das curvas analíticas construídas sobre o branco. Os voltamogramas referentes às diferentes concentrações dos íons adicionadas sobre o branco da digestão encontram-se na Figura 15.

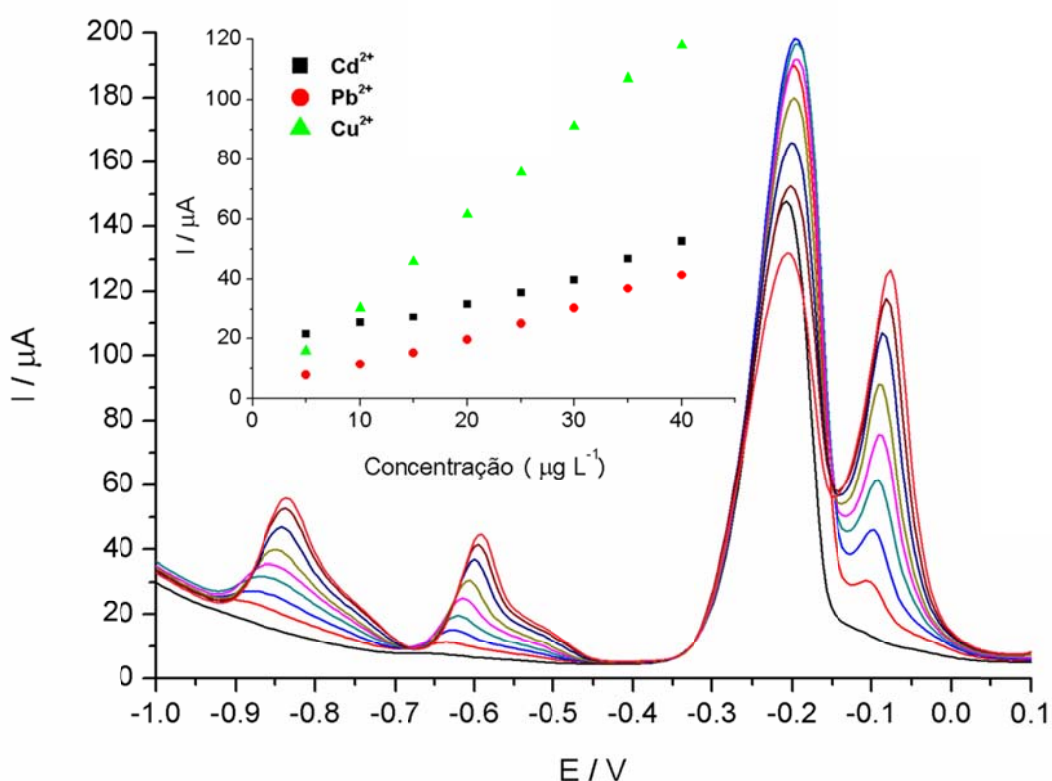


Figura 15 - Voltamogramas resultantes da adição simultânea dos íons Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} sobre o branco do procedimento. As curvas analíticas referentes as correntes de pico desses íons encontram-se inseridas na figura; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

Os parâmetros de desempenho das curvas analíticas construídas com as correntes de pico dos voltamogramas registrados no branco do procedimento (branco da digestão) encontram-se na Tabela 8. A

interferência do peróxido presente no branco do procedimento foi insignificante e excelentes parâmetros foram alcançados.

Tabela 8 - Parâmetros de desempenho das curvas analíticas construídas sobre o branco do procedimento.

Cátions	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R²	Sensibilidade da calibração	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cd	0,16	0,52	0,9813	$8,71 \cdot 10^{-7}$	5 - 40
Pb	0,20	0,66	0,9947	$9,87 \cdot 10^{-7}$	5 - 40
Cu	0,39	1,29	0,9985	$2,96 \cdot 10^{-6}$	5 - 40

A adição de 200 μL do material de referência, provenientes das digestões com HNO_3 0,5 mol L^{-1} , 1,0 mol L^{-1} e 3,5 mol L^{-1} foi suficiente para que os picos do Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} aparecessem (Figura 16). As linhas de base dos voltamogramas foram corrigidas para facilitar a visualização dos três perfis, pois uma comparação quantitativa não foi possível devido ao fato da área do eletrodo variar de uma medida para outra. A renovação da superfície antes da análise de cada amostra era a principal razão para a variação da área, e conseqüentemente da corrente medida. Outro problema que impediu a comparação direta foi o fato de ambos voltamogramas terem sido registrados sobre efeitos de matrizes diferentes. Assim, a melhor maneira de avaliar a eficiência dos procedimentos foi através da comparação entre os valores de referência e os obtidos pelo método da adição de padrão.

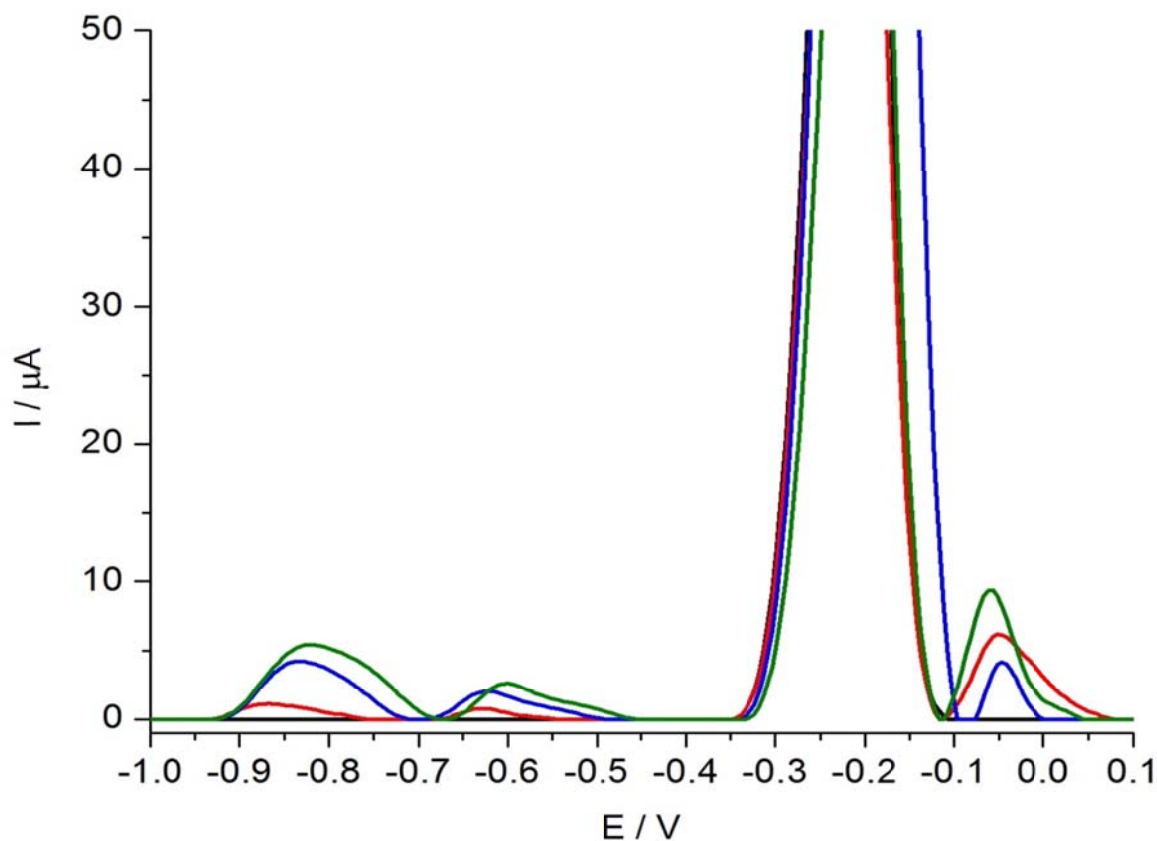


Figura 16 - Voltamogramas da análise do material de referência. Ao branco (curva em preto) foi adicionado 200 uL do material digerido com ácido $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (curva em vermelho), $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (curva em azul) e $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ (curva em verde); $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

Após essa análise prévia dos digeridos do material certificado, prossegui para as quantificações dos metais a fim de confrontar o valor encontrado com o valor certificado.

Inicialmente foram realizadas quantificações individuais dos cátions para garantir que fontes de variação não estivessem presentes durante as medidas. A Figura 17 exhibe os voltamogramas e as respectivas curvas de adição-padrão dos analitos obtidas para a determinação individual na amostra de material de referência digerida com o ácido nítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Um perfil linear também foi verificado nas digestões com as demais concentrações de ácido nítrico.

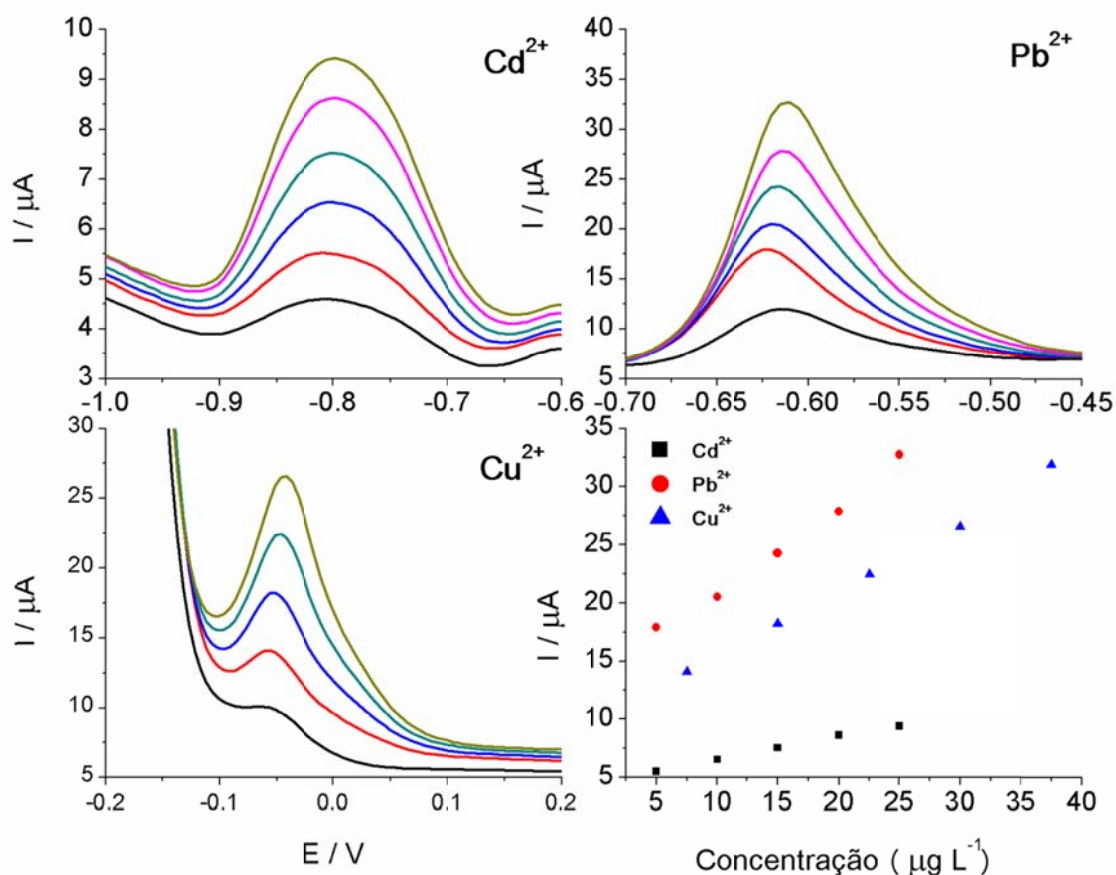


Figura 17 – Voltamogramas e curvas de adição-padrão construídas individualmente para quantificar os elementos Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ presentes na amostra do material certificado; $f = 75,0$ Hz, $\Delta E_p = 75$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV, $T_d = 300$ s, $E_d = -1,3$ V.

Os resultados encontrados através das análises dos digeridos com ácido 1,0 e 3,5 mol L⁻¹ aproximaram-se muito dos valores de referência, alcançando recuperações que variaram de 90,0 a 94,3% para o Cd²⁺, 102,6 a 123,0% para o Pb²⁺ e 96,6 a 100,6% para o Cu²⁺ (Tabela 9). As recuperações da digestão com ácido 0,5 mol L⁻¹ não foram satisfatórias para o Cd²⁺ e o Pb²⁺, pois foram muito baixas. Em função disso, somente

as digestões com ácido 1,0 mol L⁻¹ e 3,5 mol L⁻¹ foram validadas para serem aplicadas nas análises dos cátions Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ de forma individual.

Tabela 9 - Resultados das recuperações individuais encontradas pelo método proposto e valores de referência dos cátions na amostra certificada.

	Método Proposto				Material de ref. certificado
	Digeridos →	0,5 mol L ⁻¹	1,0 mol L ⁻¹	3,5 mol L ⁻¹	
Cd²⁺	μ (μg L ⁻¹)	11,4	18,8	17,9	19,9
	s	1,7	1,8	0,4	5,1
	R%	57,4	94,3	90,0	-
	CV	15,1	9,4	2,2	25,6
Pb²⁺	μ (μg L ⁻¹)	1,7	4,1	4,9	4,0
	s	1,3	0,7	0,3	1,8
	R%	42,1	102,6	123,0	-
	CV	78,7	18,1	7,1	45,0
Cu²⁺	μ (μg L ⁻¹)	3,9	3,9	4,0	4,0
	s	0,8	0,1	0,5	0,7
	R%	98,3	96,6	100,3	-
	CV	20,4	2,6	13,7	17,5

μ é Média das medidas, **s** é o desvio padrão das medidas, **R%** é a porcentagem de recuperação e **CV** é o coeficiente de variação.

Wood, (1999) aborda que a faixa de recuperação aceita para esse nível de concentração estudado é de 60% a 115% na avaliação da exatidão do método, e até 45% para o coeficiente de variação. No caso desse estudo individual, uma avaliação global nos norteia que a digestão em 1,0 mol L⁻¹ foi a que apresentou melhores resultados em relação à de

3,5 mol L⁻¹. Essa conclusão foi baseada no R% para o metal Pb²⁺, que apresentou um valor acima de 115 %. Ademais, como já foi discutido anteriormente, digerido menos ácido permite a adição de maiores alíquotas de amostra sem que haja comprometimento da capacidade do eletrólito.

Tendo em vista essa elucidação, na análise simultânea foram utilizados os digeridos da forrageira Marandu com o HNO₃ em 1,0 mol L⁻¹. A validação simultânea foi realizada após a validação individual. A Figura 18 exibe os voltamogramas referentes a essa validação.

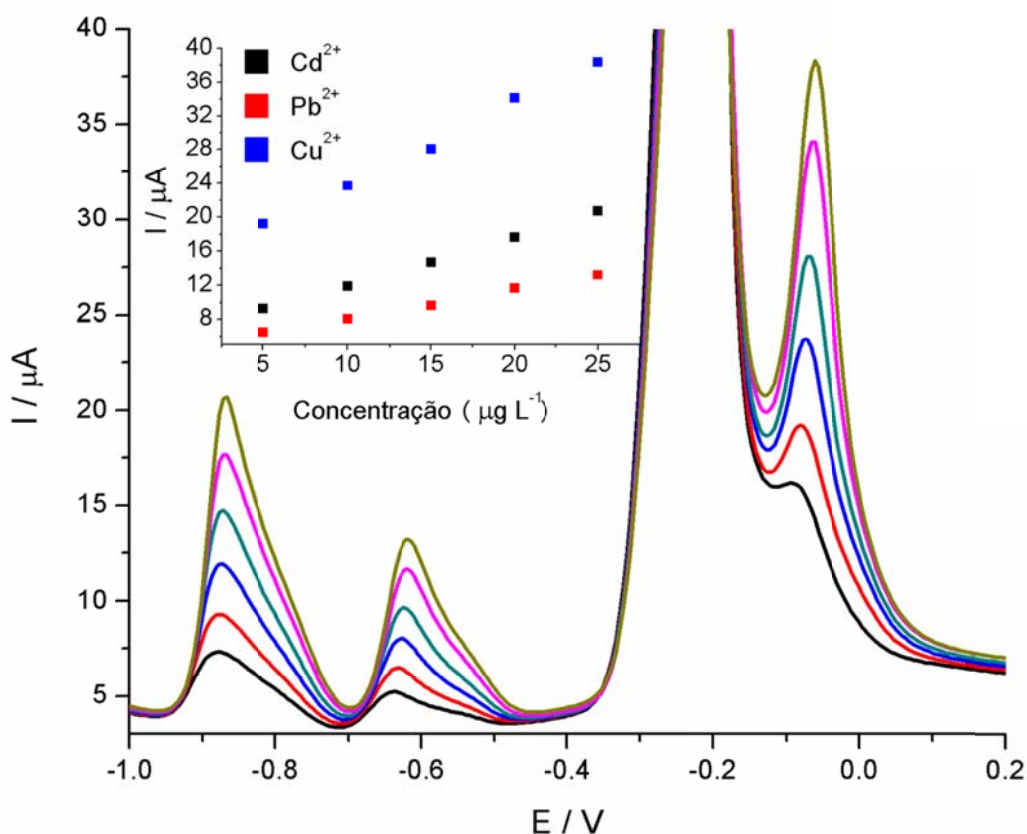


Figura 18 - Voltamogramas e curvas de adição-padrão construídas simultaneamente para quantificar os elementos Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ presentes na amostra do material certificado; f = 75,0 Hz, ΔE_p = 75 mV, ΔE_s = 5 mV, T_d = 300 s, E_d = -1,3 V.

Os percentuais de recuperação da avaliação simultânea da digestão com ácido 1,0 mol L⁻¹ assim como na avaliação individual, estão dentro dos limites para a faixa de concentração trabalhada, segundo Wood, (1999). Os valores dos R% variaram de 79,3% a 107,6% e os coeficientes de variação de 17,5 a 45% (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados das recuperações simultâneas encontradas pelo método proposto e valores de referência dos cátions na amostra certificada.

	Cd ²⁺				Pb ²⁺				Cu ²⁺			
	μ	s	R%	CV	μ	s	R%	CV	μ	s	R%	CV
Método Proposto	18,3	3,1	92,1	17,1	3,2	0,9	79,3	26,9	4,3	1,7	107,6	39,9
Material de Referência	19,9	5,1	-	25,6	4,0	1,8	-	45,0	4,0	0,7	-	17,5

μ é Média das medidas, **s** é o desvio padrão das medidas, **R%** é a porcentagem de recuperação e **CV** é o coeficiente de variação.

5.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AS AMOSTRAS DE CHÁS

A metodologia para quantificação simultânea de Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica, empregando digestão com HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, foi validada com uma amostra certificada da forrageira Marandu. A metodologia já validada foi aplicada na análise de duas amostras de chá verde ("verde 1" e "verde 2") e duas amostras de chá preto ("preto 1" e "preto 2") digeridas com HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ em triplicata. Uma ressalva que deve ser feita é que as amostras de chás empregadas nesse trabalho não passaram por etapa de tratamento prévio.

Os voltamogramas das amostras de chás só exibiram os sinais de oxidação do Cu, não aparecendo os sinais do Cd e Pb (Figura 19). Mesmo

adicionando alíquotas de 200 até 800 μL dos digeridos, não foi detectado chumbo e cádmio nas amostras. Certamente os níveis desses cátions na folha estão abaixo do limite de detecção.

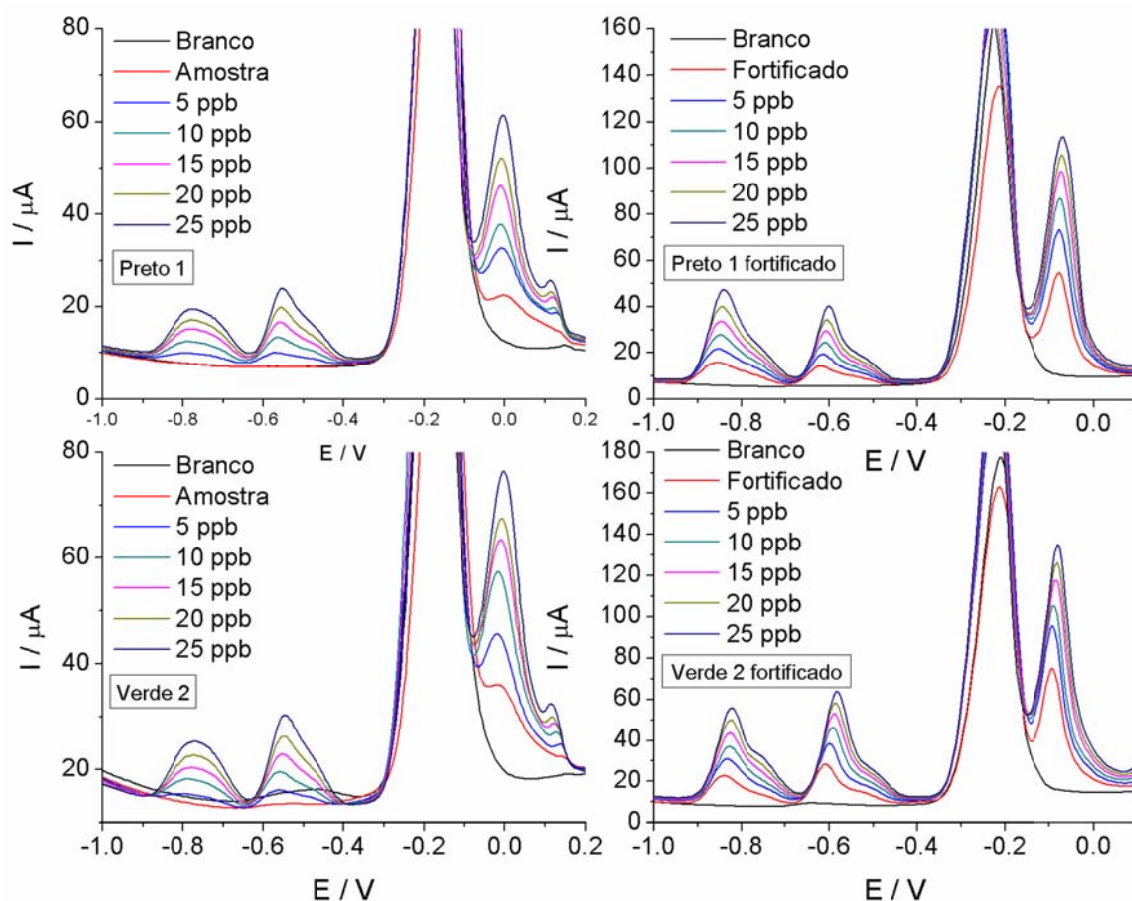


Figura 19 - Voltamogramas provenientes de adição de padrão simultâneo de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} sobre duas amostras de chá avaliadas neste trabalho, sem e com fortificações; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

A Figura 19 exhibe os voltamogramas provenientes do método de adição-padrão sem partição da amostra aplicado de forma simultânea para quantificar o cobre presente nos chás sem fortificação e com fortificação. Quantidades equivalentes a $70,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd^{2+} e Pb^{2+} na

folha ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ na cuba), e $106,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu^{2+} na folha ($15 \mu\text{g L}^{-1}$ na cuba) foram adicionadas como fortificação nas amostras avaliadas antes do processo de preparo da erva. A Figura 20 demonstra duas regressões realizadas em dois chás fortificados.

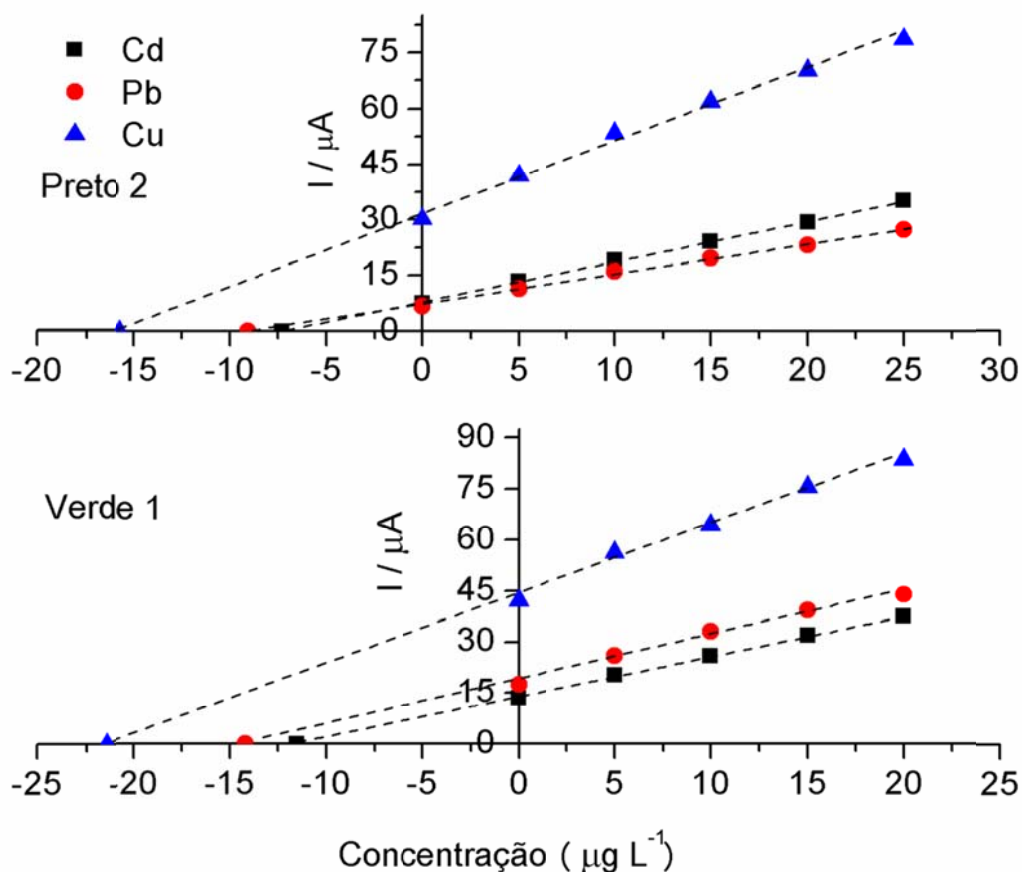


Figura 20 - Método de adição-padrão empregado para quantificar os metais nas amostras de chás fortificadas; $f = 75,0 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $T_d = 300 \text{ s}$, $E_d = -1,3 \text{ V}$.

Quantidades de cobre variando entre $3,6$ a $12,4 \text{ mg L}^{-1}$ foram encontradas nas quatro amostras de chá. As recuperações referentes as fortificações variaram de $73,3$ a $93,5\%$, para Cd^{2+} , de $81,9$ a $112,4\%$, para Pb^{2+} e de $100,4$ a $122,1\%$ para Cu^{2+} . No geral, as recuperações se encontraram dentro do limite máximo estabelecido para a faixa de

concentração avaliada pelo método, ou seja, a faixa de concentração desses íons na cuba eletroquímica. A Tabela 11 resume todos os resultados encontrados nos chás analisados.

Tabela 11 - Resultados das recuperações encontradas pelo método proposto aplicado sobre quatro amostras de chá (2 verdes e 2 pretos).

		Verde 1	Verde 2	Preto 1	Preto 2
Cd²⁺	Quantif. no Chá (mg L ⁻¹)	-	-	-	-
	Forticação (mg L ⁻¹)	70,7	70,7	70,7	70,7
	Medido (mg L ⁻¹)	66,1 ± 9,3	62,2 ± 13,5	51,8 ± 21,3	64,3 ± 8,6
	R%	93,5	88,0	73,3	90,9
Pb²⁺	Quantif. no Chá (mg L ⁻¹)	-	-	-	-
	Forticação (mg L ⁻¹)	70,7	70,7	70,7	70,7
	Medido (mg L ⁻¹)	63,5 ± 8,2	79,5 ± 20	57,9 ± 19,7	64,1 ± 10,1
	R%	89,8	112,4	81,9	91,2
Cu²⁺	Quantif. no Chá (mg L ⁻¹)	3,6 ± 2,7	12,4 ± 3,5	7,0 ± 1,2	10,2 ± 2,7
	Forticação (mg L ⁻¹)	106,1	106,1	106,1	106,1
	Medido (mg L ⁻¹)	106,5±10,2	123,3±12,9	129,6±16,3	111,2±5,4
	R%	100,4	116,2	122,1	104,8

Além da validação através das amostras certificadas da forrageira Marandu, o método também pode ser considerado validado pela adição e recuperação aplicado nas amostras coletadas no varejo da cidade de João Pessoa, Paraíba. Analisando as concentrações encontradas, essas

amostras apresentaram valores de cobre relativamente baixos quando comparados aos encontrados nas amostras analisadas em outros trabalhos da literatura (descritos na tabela 1).

CONCLUSÕES



6 CONCLUSÕES

Do presente estudo pode-se concluir que:

- ✓ O conjunto de parâmetros otimizados possibilitou fornecer um sinal analítico suficiente para detectar níveis de $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $0,39 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} em amostras digeridas;
- ✓ A digestão de 200 mg de tecidos vegetais na presença de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, assistido por micro-ondas, foi o procedimento mais promissor encontrado para o preparo das amostras, pois se mostrou eficiente na digestão do material vegetal e não comprometeu a capacidade tamponante da célula eletroquímica quando submetida à análise;
- ✓ A validação do método através do material certificado foi alcançada com êxito, uma vez que as quantidades de metal quantificadas se apresentaram em uma faixa percentual aceitável, 92,1, 79,3 e 107,6 % para Cd, Pb e Cu, respectivamente. Além disso, as medidas obtiveram um excelente desvio padrão quando comparados aos da amostra certificada;
- ✓ Foi possível aplicar com sucesso a metodologia desenvolvida para quantificar de forma simultânea os íons Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em amostra de chás verdes e pretos coletadas no varejo de João Pessoa. Mesmo após a validação do método através do material de referência, ainda assim foi realizada outra validação através de adição e recuperação dos metais nas amostras de chá, obtendo valores de R% em uma faixa bastante satisfatória.



REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABBASI, S.; BAHIRAEI, A.; ABBASAI, F. A highly sensitive method for simultaneous determination of ultra trace levels of copper and cadmium in food and water samples with luminol as a chelating agent by adsorptive stripping voltammetry. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1274–1280, 2011.

ABBASI, S.; KHANI, H.; TABARAKI, R. Determination of ultra trace levels of copper in food samples by a highly sensitive adsorptive stripping voltammetric method. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 507–512, 2010.

AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, n. 1-2, p. 11–47, 2008.

ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos E Técnicas. p. 1–40, 2003. Disponível em: < <http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas/>>. Acesso em: 04 ago 2015.

ANSARI, F.; NORBAKSH, R.; DANESHMANDIRANI, K. Determination of heavy metals in iranian and imported black tea. **Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng**, v. 4, n. 4, p. 243–248, 2007.

ARAGAY, G.; MERKOÇI, A. Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 49–61, 2012.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: O estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638–643, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA). **RDC (Resolução Diretoria Colegiada) 42** de 29 de agosto de 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 ago 2015.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. New York: Springer, 1993.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea-- a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.

CASTRO, J. T. et al. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p. 1378–1382, 2009.

CHAIYO, S. et al. Highly sensitive determination of trace copper in food by adsorptive stripping voltammetry in the presence of 1,10-phenanthroline. **Talanta**, v. 108, p. 1–6, 2013.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing-A review. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 243–261, 2013.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105–126, 1999.

DAI, X. et al. Amino-functionalized MCM-41 for the simultaneous electrochemical determination of trace lead and cadmium. **Electrochimica Acta**, v. 144, p. 161–167, 2014a.

DAI, X. et al. Amino-functionalized mesoporous silica modified glassy carbon electrode for ultra-trace copper(II) determination. **Analytica**

Chimica Acta, v. 848, p. 25–31, 2014b.

DATTA, A. K.; DAVIDSON, P. M. Microwave and Radio Frequency Processing. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 32–41, 2000.

DEMIREL, S. et al. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1020–1026, 2008.

DINIZ, P. H. G. D. **Novas estratégia para classificação simultânea do tipo e origem geográfica de chás**. 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 7, p. 404–421, 2001.

ECONOMOU, A. Bismuth-film electrodes: Recent developments and potentialities for electroanalysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 334–340, 2005.

ENSAFI, A. A.; HAJIAN, R. Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 579–585, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission Regulation (EC) No 1881/2006**. Official Journal of European Communities. Bruxelas, 2006. 20 p. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006R1881>>. Acesso em: 05 dez. 2015.

FENG, H.; WANG, T.; LI, S. F. Y. Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR). **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 607–611, 2003.

FRASER, K. et al. Monitoring tea fermentation/manufacturing by direct

analysis in real time (DART) mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2060–2065, 2013.

GANJALI, M. R. et al. Determination of Pb²⁺ ions by a modified carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and nanosilica. **Journal of Hazardous Materials**, v. 173, n. 1-3, p. 415–419, 2010.

HAN, W. Y. et al. Arsenic, cadmium, chromium, cobalt, and copper in different types of Chinese tea. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 2, p. 272–277, 2005.

HAN, W. Y. et al. Scale and causes of lead contamination in Chinese tea. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 1, p. 125–132, 2006.

HEVIA, K.; ARANCIBIA, V.; ROJAS-ROMO, C. Levels of copper in sweeteners, sugar, tea, coffee and mate infusions. Determination by adsorptive stripping voltammetry in the presence of α-lipoic acid. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 11–16, 2015.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, 7 Nov. 1991.

JABEEN, S. et al. Withering timings affect the total free amino acids and mineral contents of tea leaves during black tea manufacturing. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1–7, 2015.

JESZKA-SKOWRON, M.; KRAWCZYK, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 70–77, 2015.

JIANG, H. et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. **Food Chemistry**, v. 183, p. 30–35, 2015.

JIN, C. W. et al. Lead contamination in tea leaves and non-edaphic factors affecting it. **Chemosphere**, v. 61, n. 5, p. 726–732, 2005.

JIN, C. W. et al. Factors determining copper concentration in tea leaves produced at Yuyao County, China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2054–2061, 2008.

KARAK, T.; BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 9, p. 2234–2252, 2010.

KERIO, L. C. et al. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1405–1413, 2013.

LASHEEN, Y. F.; AWWAD, N. S. Annual effective dose and concentration levels of heavy metals in different types of tea in Egypt. **International Journal**, v. 3, n. 5, p. 112–119, 2008.

LI, L. et al. A comparison of the potential health risk of aluminum and heavy metals in tea leaves and tea infusion of commercially available green tea in Jiangxi, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 5, p. 228, 2015.

LIMA, J. D. et al. Tea: aspects related to the quality and prospects. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1270–1278, 2009.

LV, H. P. et al. Contents of fluoride, lead, copper, chromium, arsenic and cadmium in Chinese Pu-erh tea. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 938–944, 2013.

MELUCCI, D.; LOCATELLI, M.; LOCATELLI, C. Trace level voltammetric determination of heavy metals and total mercury in tea matrices (*Camellia sinensis*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 901–907, 2013.

MESTER, Z; STURGEON, R. **Sample Preparation for Trace Element Analysis**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2003. V. 41. (comprehensive

analytical chemistry).

MONK, P. M. S. **Fundamentals of Electroanalytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

NOOKABKAEW, S.; RANGKADILOK, N.; JUTAMAAD, S. Determination of Trace Elements in Herbal Tea Products and thier infusions.pdf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6939–6944, 2006.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Voltammetry: A Brief Review About Concepts Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

RAO, C. N. et al. Nanotubes. **Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry**, v. 2, n. 2, p. 78–105, 2001.

SANG, S. et al. The chemistry and biotransformation of tea constituents. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 2, p. 87–99, 2011.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2010.

SEENIVASAN, S. et al. Heavy metal content of black teas from south India. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 746–749, 2008.

SERRANO, N. et al. Comparison of constant-current stripping chronopotentiometry and anodic stripping voltammetry in metal speciation studies using mercury drop and film electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 560, n. 2, p. 105–116, 2003.

SHOUYI, B. An Outline History of China. **China Knowledge Series, Foreign Languages Press**, Pequim, (1982).

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a. ed. [s.l.] CENGAGE Learning, 2005.

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda

quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

SOYLAK, M. et al. Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 2, p. 264–268, 2007.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 165–181, 2012.

UNWIN, P. R.; STRATMANN, M.; BARD, A. J. **Encyclopedia of Electrochemistry, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry**. [s.l.] wiley, 2003. v. 3

WANG, J. **Analytical Electrochemistry, Secon Edit.** 2. ed. Canada: Wiley-VCH, 2000.

WANG, J. et al. Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 1, p. 29–34, 2001.

WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 922–930, 2013.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 624–632, 1999.

ZHENG, H. et al. Analysis of Trace Metals and Perfluorinated Compounds in 43 Representative Tea Products from South China. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. C1123–C1129, 2014.

ZHONG, W.-S.; REN, T.; ZHAO, L.-J. Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea

with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 100, p. 1–10, 2015.