



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PATRÍCIA DE PÁDUA CASTRO

***SPOT TEST* QUANTITATIVO PARA CHUMBO COM ANÁLISE DE
IMAGENS, APLICADO A SOLOS**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PATRÍCIA DE PÁDUA CASTRO

***SPOT TEST* QUANTITATIVO PARA CHUMBO COM ANÁLISE DE
IMAGENS, APLICADO A SOLOS**

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a ADRIANA VITORINO ROSSI

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
CIÊNCIAS**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR PATRÍCIA DE PÁDUA CASTRO, ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a ADRIANA VITORINO ROSSI.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

C279s Castro, Patrícia de Pádua (1980-).
Spot test quantitativo para chumbo com análise de
imagens, aplicado a solos / Patrícia de Pádua Castro. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Chumbo. 2. Spot test. 3. Microfluídica em papel. 4.
Processamento digital de imagens. I. Rossi, Adriana
Vitorino. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Spot test for lead in soils

Palavras-chave em inglês:

Lead
Spot test
Paper microfluidic
Processing of digital images

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Adriana Vitorino Rossi [Orientadora]
Efraim Lázaro Reis
Eny Maria Vieira
Matthieu Tubino
Edvaldo Sabadini

Data de defesa: 25/07/2013

Programa de pós-graduação: Química

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por cada recomeço.

À Professora Adriana Vitorino Rossi, que foi muito além da orientação, sendo também amiga, conselheira, “mãe” e “avó”. Também pela confiança e exemplo de profissionalismo.

Agradeço à UNICAMP e ao Instituto de Química pela oportunidade de cursar o doutorado. Aos funcionários do IQ, Raquel, Renata e Daniel pelo auxílio em algumas análises e aos funcionários da CPG, Bel, Miguel e Gabriela por todo apoio ao longo destes anos.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Professor Mathieu Tubino pelas longas conversas sobre a química, a vida terrena e o além desta.

Ao Professor Jarbas José Rodrigues Rohwedder pela disponibilização do programa DIGIMAGE e por ajustá-lo às minhas condições de utilização.

Ao Professor Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni por ceder o conjunto de amostras de solos que foram estudados neste trabalho.

Ao Professor Emanuel Carrilho por fornecer os primeiros dispositivos microfluídicos em papel, que foram imprescindíveis para execução desta tese.

Ao Professor Antônio Carlos de Azevedo com quem tive a oportunidade de trocar ideias, experiências e trabalhar, mesmo que em um curto período de tempo.

Um agradecimento especial aos membros que compuseram a banca de defesa pelas valorosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Ao fim desta etapa vejo que nada disto seria possível se eu não tivesse contado com a ajuda e o apoio de muitos...

Agradeço aos meus pais, Roberto de Castro e Ana Maria de Pádua Castro por me oferecerem a melhor educação formal e moral que puderam me proporcionar. Vocês são os exemplos em que me espelho e tenho muito orgulho de vocês!

Aos meus irmãos, Fabio e Aline pela admiração que sentem por mim, isto me faz querer ser a cada dia uma pessoa melhor.

Ao meu marido Leônidas, que é amigo, companheiro e parceiro de vida e trabalho. E ao meu filho João Gabriel, que me faz contemplar a beleza das coisas simples como um olhar, um sorriso, uma palavra, uma demonstração de amor... Com vocês e por vocês eu sou mais forte!

Aos tios(as), primos(as), sobrinhos(as), aos amigos(as) de longa data e aos que fiz em Piracicaba, Campinas e Viçosa, obrigada pela torcida, pelo apoio e pelas orações que me deram força e serenidade.

Aos meus sogros, Antônio e Zilda e às minhas cunhadas, Zildinha e Mariana que me acolheram com tanto amor e nunca mediram esforços para nos ajudar nos momentos mais tumultuados.

À Beth, Willian e Vivian, por amarem e cuidarem com tanto carinho do João Gabriel. Sem vocês eu não teria tido tranquilidade para finalizar este trabalho.

Por fim, agradeço aos amigos do IQ e do GPQUAE: Guadalupe, Eva, Lilia, Euzébio, Martha, Flávio, Willian, Gustavo, Luiz, Juliana, Patrícia, Sabir, Su, Paula, e principalmente à Acácia, pessoa na qual me faltam palavras para descrever e agradecer.

A todos muito obrigada!

“Nossa maior fraqueza está em desistir. A maneira mais segura de ter sucesso é sempre tentar mais uma vez;

Cada tentativa errada descartada é outro passo à frente.”

Thomas Edison

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

À minha vó Dindinha que dizia “menina de tanto estudar você vai acabar virando *Doutora*”, DEDICO.

À minha mãe,
exemplo, inspiração e saudade...
OFEREÇO

Curriculum vitae

1 – Formação Acadêmica/Titulação

- 2004 - 2006** Mestrado em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas.
Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Brasil.
- 2000 - 2004** Bacharel em Química – Habilitação Química Industrial.
Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, Brasil.

2 - Experiência Profissional

2.1 – Docência

Programa de Estágio Docente

- | | | |
|---------------------------------------|-----------------|--------------|
| Disciplina: QA – 313 Química III | Nível:C (PED C) | 1º sem./2010 |
| Disciplina: QA – 282 Química Clássica | Nível:B (PED B) | 1º sem./2011 |

Aulas ministradas

Disciplina: ARA025 – Química do solo. Curso de Pós-Graduação do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Carga horária: 8 horas-aula.

Palestras proferidas

“*Spot tests para chumbo em solos: desenvolvimento analítico e potencial educativo para espaço formal e não formal*”, Faculdade de Educação da UNICAMP, em 2009 e 2010.

“*Spot test em sistema microfluídico em papel, para determinação de chumbo em solos*”, Faculdade de Educação da UNICAMP, em 2011.

2.2 – Atividades Acadêmicas Especiais

- Monitora de atividades do *Simpósio de Profissionais do Ensino de Química*, desde de 2008.
- Monitora de atividades *II Química em Ação*, realizado nos dias 11 a 22 de julho de 2011.

Participação em Congressos, Simpósios e similares

- *II Escola de Inverno de Separações*, 25 a 28 de julho de 2011, UNICAMP-Campinas, SP.
- *Workshop em Microfluídica*, 24 de fevereiro de 2011, CNPEM - Campinas, SP.
- *IV Fórum de Pós-Graduação em Química*, 21 e 22 de outubro de 2010, UNICAMP-Campinas, SP.
- *VII SIMPEQ - Simpósio de Profissionais de Ensino de Química*. Instituto de Química – UNICAMP. Outubro de 2007. Carga Horária: 12 horas.

Cursos de capacitação

- *Preparo de amostras para análise inorgânica*, 34ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2011, 6 horas.
- *Multimídia no Ensino*, UNICAMP - Campinas, 2011, 8 horas.

- *Eletroforese capilar*, II Escola de Separações, UNICAMP - Campinas, 2011, 24 horas.

3. Produção científica

3.1 – Participação em Projetos de Pesquisa, Extensão e assemelhados

- Membro da equipe do projeto de Pesquisa de Iniciação Júnior (PICJr/CNPq) “*Determinação de alguns parâmetros de qualidade da água por spot test em papel microfluídico*”. Início: 2011.

- Membro da equipe do projeto de Pesquisa de Iniciação Júnior (PICJr/CNPq) “*Quantificação de antocianinas em extratos de frutas com medidas fotométricas em dispositivo portátil*”. Início: 2010.

- Membro da equipe do projeto de Pesquisa de Iniciação Científica “*Uso de extratos de antocianinas para determinação de pH em solo*”. Início: 2009.

3.2 – Trabalho em Congresso, Simpósios, Seminários e similares com resumo publicado

FRASSON, R. M.; BARROS, T. L.; OLIVEIRA, V. C. Z.; SALOMÃO, A. A.; SILVA, W. L. G.; GUIZELLINI, T. A.; MANZOOR, S.; **CASTRO, P. P.**; ROSSI, A. V. Análise colorimétrica de Fe(II) usando microfluídica em papel: abordagem integradora para iniciação científica júnior. *II Workshop em Microfluídica*, Campinas, SP. 2012.

SALOMÃO, A. A.; COELHO, A. G.; SHIMAMOTO, G. G.; FAVARO, M. M. A.; **CASTRO, P. P.**; SOUZA, P. T.; ROSSI, A. V. Quantificação de antocianinas em extratos de frutas com medidas colorimétricas em dispositivo portátil. 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, SP. 2011.

CASTRO, P. P.; ROSSI, A. V. ROHWEDDER, J. J. R. Quantificação de Níquel em *Spot-test* por reflectância e digitalização de imagens. Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis, SC. 2011.

CASTRO, P. P.; ROSSI, A. V. Estabilidade da solução de rodizonato e formação do complexo de chumbo em testes qualitativos: efeito de agentes tamponantes. Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP. 2010.

3.3 – Artigos

CASTRO, P. P.; CURI, N.; NETO, A. E. F.; RESENDE, A. V.; GUILHERME, L. R. G.; MENEZES, M. D.; ARAÚJO, E. F.; FREITAS, D. A. F.; MELLO, C. R.; SILVA, S. H. G. Química e mineralogia de solos cultivados com Eucalipto (*Eucalyptus* sp.). *Scientia Forestalis*, 38, 645-657, 2010.

FAVARO, M. M. A.; **CASTRO, P. P.**; SHIMAMOTO, G. G.; COELHO, A. G.; SOUZA, P. T.; SALOMÃO, A. A.; ROSSI, A. V. Photometric determination of total anthocyanins in fruits. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* (aceito para publicação).

Para mais informações, consultar Currículo Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4776903Y5>

Resumo

“SPOT TEST PARA CHUMBO EM SOLOS”

Autora: Patrícia de Pádua Castro

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi

Pb(II) é um contaminante acumulativo em solos; reações de *spot test* servem para análises exploratórias para avaliar contaminações. A reação de *spot test* entre Pb(II) e rodizonato (ROD) forma um complexo vermelho (PbROD), que pode ser quantificado em dispositivo microfluídico em papel (μ PAD) em associação com análise digital de imagens, estudada neste trabalho para aplicação em solos. Misturas reacionais de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$, em tampão tartarato, e soluções aquosas de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ na faixa de concentração de $0,20$ a $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ foram utilizadas para a formação de PbROD em μ PAD e empregadas no desenvolvimento do método que envolveu a utilização de um *scanner* comercial para obtenção das imagens e, um programa para extração de dados de cores em sistema RGB (*Red, Green e Blue*) para quantificação por meio de curvas de calibração. O método desenvolvido foi aplicado para análise de Pb(II) em 28 amostras de solos dopadas com $(\text{PbNO}_3)_2$ a uma concentração 300 mg kg^{-1} de solo, utilizando solução de HNO_3 $0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ como extrator, que extraiu em média 75% do Pb(II) adicionado. A limitação imposta pelas barreiras hidrofóbicas no μ PAD foi crucial para viabilizar a quantificação de Pb(II). Os dados extraídos da componente G da imagem do produto da reação obtido no μ PAD apresentaram os melhores resultados. A precisão intermediária do método de *spot test* para Pb(II) formando PbROD foi 4 %, com limites de detecção e quantificação iguais a $0,07$ e $0,24 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Das 28 amostras estudadas, sete não desenvolveram cor na reação devido às características físicas e químicas dos solos e à presença de possíveis interferentes (principalmente Ba, Sr, Matéria Orgânica, P e Argila). A grande heterogeneidade dos solos e os complexos mecanismos de adsorção e dessorção dos íons que afetam sua disponibilidade para a reação de análise representam aspectos limitantes para a aplicação do método desenvolvido, porém os resultados apontaram adequação para análise semiquantitativa exploratória de Pb(II) em áreas de solos contaminados.

Abstract

“*Spot test* for lead in soil”.

Author: Patrícia de Pádua Castro

Advisor: Adriana Vitorino Rossi

Lead (Pb) is a cumulative soil contaminant, which can be assessed by spot test reactions in exploratory analyzes regarding soil contamination. The spot test reaction between Pb(II) and rhodizonate (ROD) forms a red complex (PbROD), which can be quantified on paper microfluidic device (μ PAD) in combination with digital image analysis. The objective with this work was to develop a method based on the aforementioned system, for the determination of Pb(II) in soils. Reaction mixtures containing 9.96 mmol L^{-1} of ROD (prepared in tartrate buffer) and aqueous solutions of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in a concentration range from 0.20 to 5.00 mmol L^{-1} were used to form PbROD in μ PAD and employed for the method development. A commercial scanner was used to obtain images and a program was employed to extract data from the RGB (Red, Green and Blue) colors system for Pb(II) quantification, by using calibration curves. The method was applied for the analysis of Pb(II) in 28 soil samples spiked with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ at a concentration of 300 mg kg^{-1} of soil and a 0.43 mmol L^{-1} HNO_3 solution was used as the extractant, which was able to extract, in average, 75% of Pb(II) added. The limitation imposed by hydrophobic barriers in the μ PAD was crucial to enable the quantification of Pb(II). The data extracted from the G component of the image of the reaction product obtained in the μ PAD showed the best results. Intermediate precision of the spot test method for Pb(II) forming PbROD was 4%, with limits of detection and quantification equal to 0.07 and 0.24 mmol L^{-1} , respectively. From the 28 samples studied, seven did not develop color in the reaction, due to their physical and chemical characteristics and the presence of possible interferences (mainly Ba, Sr, Organic matter, P and clay content). The great heterogeneity of soils and the complex mechanisms of sorption and desorption of ions, that affect their availability for reaction analysis, represent limiting aspects for the quantitatively application of the method for soils. But the results show suitability for semiquantitative exploratory analyzes of Pb (II) in areas with soils contaminated with this element.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE FIGURAS.....	xxvii
PREFÁCIO.....	1
CAPÍTULO 1: OBJETIVOS.....	7
1.1 GERAL.....	9
1.2 ESPECÍFICOS.....	9
PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE <i>SPOT TEST</i> EM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA DETERMINAÇÃO DE Pb(II) USANDO ANÁLISE DIGITAL DE IMAGES.....	11
CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO.....	13
2.1 REAÇÕES DE <i>SPOT TEST</i>	15
2.2 PAPEL COMO SUPORTE REACIONAL.....	17
2.3 DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS EM PAPEL.....	18
2.4 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS COMO FERRAMENTA ANALÍTICA.....	19
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
3.2 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES.....	23
3.2.1 EQUIPAMENTOS.....	23

3.2.2 MATERIAIS.....	23
3.2.3 REAGENTES.....	24
3.3 INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE Pb(II) COM RODIZONATO.....	24
3.3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE RODIZONATO E FORMAÇÃO DE PbROD.....	24
3.3.2 AVALIAÇÃO DE MATERIAIS COMO SUPORTE PARA REAÇÃO.....	25
3.4 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS.....	29
3.4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROGRAMA DIGIMAGE.....	29
3.4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SCANNER.....	32
3.4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO DO PAPEL REAGENTE E DO COMPLEXO NA ABSORBÂNCIA CALCULADA.....	33
3.5 VALIDAÇÃO LABORATORIAL E ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO.....	35
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE Pb(II) COM RODIZONATO E SUPORTE REACIONAL.....	41
4.1.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE RODIZONATO E FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE Pb(II).....	41
4.1.2 INVESTIGAÇÃO DO SUPORTE PARA REAÇÃO.....	47
4.2 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS.....	55
4.2.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROGRAMA DIGIMAGE.....	55

4.2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SCANNER.....	59
4.2.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO DO PAPEL REAGENTE E DO COMPLEXO NA ABSORBÂNCIA CALCULADA.....	62
4.3 VALIDAÇÃO LABORATORIAL E ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO.....	65
PARTE 2: APLICAÇÃO DO MÉTODO DE SPOT TEST PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SOLOS.....	77
CAPÍTULO 5: INTRODUÇÃO.....	79
5.1 CHUMBO NOS SOLOS E SUA DISPONIBILIDADE.....	81
5.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SOLOS.....	84
CAPÍTULO 6: PARTE EXPERIMENTAL.....	87
6.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES.....	89
6.1.1 EQUIPAMENTOS.....	89
6.1.2 MATERIAIS.....	89
6.1.3 REAGENTES.....	89
6.2 SOLOS.....	90
CAPÍTULO 7: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
7.1 SOLOS.....	99
CAPÍTULO 8: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
CAPÍTULO 9: TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	113
CAPÍTULO 10: REFERÊNCIAS.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

- σ – Desvio-padrão
- σ_r – Desvio-padrão relativo
- μ PADs – Dispositivos microfluídicos em papel
- A_B – Absorbância calculada para componente B
- A_G – Absorbância calculada para componente G
- $Al_{(OX)}$ – Alumínio extraído por oxalato ácido de amônio;
- ATSDR – Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças
- A_X – Absorbância calculada
- COD – Carbono orgânico dissolvido
- CTC – Capacidade de troca de cátions
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético
- $Fe_{(DCB)}$ – Ferro extraído por ditionito-citrato-bicarbonato de sódio
- $Fe_{(OX)}$ – Ferro extraído por oxalato ácido de amônio;
- FLAA – Absorção Atômica por Chama
- GFAA – Absorção Atômica com Forno de Grafite
- ICP MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
- ICP OES – Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
- LD – Limite de detecção
- LIBS – Espectroscopia de plasma induzido por laser
- LQ – Limite de quantificação
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MnO – Óxidos de Mn extraídos por hidrocloreto de hidroxilamina em meio ácido.
- MO – Matéria orgânica
- P – Fósforo extraído por resina trocadora de íons;
- PbROD – Complexo rodizonato de chumbo
- PCA – Análise de componentes principais
- ROD – Solução de rodizonato de sódio
- USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.
- XRF – Fluorescência de raio-X

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das misturas reacionais em μ PAD utilizadas para MEV.	29
Tabela 2. Concentrações de Pb(II), em mmol L^{-1} , utilizadas no procedimento para formação de PbROD para avaliação da repetibilidade da análise de <i>spot test</i>	30
Tabela 3. Condições das imagens obtidas em <i>scanner</i> com resolução de 200 dpi.	32
Tabela 4. Condições de temperatura, incidência de luz e tempo de estocagem dos μ PADs impregnados com ROD.	34
Tabela 5. Distribuição das soluções utilizadas na avaliação de interferentes nas colunas do μ PAD.	37
Tabela 6. Médias de A_G de 49 medidas de cada concentração para raios de 12 e 24 pixels das áreas selecionadas nas zonas de reação.	59
Tabela 7. Dados das curvas de calibração a partir das medidas de A_G obtidas das imagens de três μ PADs preparados em um mesmo dia.	65
Tabela 8. Dados das curvas de calibração a partir das medidas de A_G obtidas das imagens dos μ PADs preparados em três dias distintos.	66
Tabela 9. Dados da concentração de uma mostra externa calculada a partir das equações da curva da Tabela 7.	66
Tabela 10. Dados da concentração de uma mostra externa calculada a partir das equações da curva da Tabela 8.	67
Tabela 11. Médias de concentração de Pb(II) em mg L^{-1} , de amostras desconhecidas, obtidas por ICP OES e por <i>Spot test</i> a partir dos dados de A_G utilizados na equação da curva de calibração com ajuste linear (Figura 28).	68
Tabela 12. Valores de LD e LQ para o método de determinação de Pb(II) por <i>spot test</i> calculados a partir das Equações 2 e 3.	69
Tabela 13. Concentrações de Pb(II) frente a diferentes proporções dos interferentes avaliados.	72
Tabela 14. Principais classes de solos predominantes em todo o estado de São Paulo (adaptação de SOARES, 2004).	90
Tabela 15. Concentrações de Pb(II) e posição das mesmas no μ PAD.	94
Tabela 16. Alguns parâmetros físicos e químicos dos solos estudados (adaptação de SOARES, 2004).	95
Tabela 17. Concentrações, em mg L^{-1} , de Pb, Ba e Sr nos solos obtidas pela extração com HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$	103
Tabela 18. Correlação de Pearson a 95% de confiança entre a concentração de Pb(II) quantificado pelo método de <i>spot test</i> e parâmetros dos 28 solos contaminados artificialmente.	105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do sistema para secagem do μ PAD com um secador de cabelo posicionado a uma distância de 26 cm medidos entre a saída de ar e o μ PAD.....27
- Figura 2.** Distribuição das concentrações (em mmol L^{-1}) das soluções de Pb(II) no μ PA.28
- Figura 3.** Distribuição das concentrações de Pb(II), em mmol L^{-1} , no μ PAD.....33
- Figura 4.** Esquema da sequência de oxidação do ácido rodizônico a ácido crocônico. Adaptado de GELORMINI e ARTZ, 1930.....41
- Figura 5.** (A) Espectros eletrônicos da solução de ROD em água, obtidos no intervalo de 120 minutos. (B) Decaimento da absorvância em 480nm dessa solução de ROD no referido intervalo.....42
- Figura 6.** Monitoramento, durante 96 horas, do decaimento da absorvância da solução de ROD em tampão citrato (■) e tampão tartarato (▲) em 318 e 322 nm, respectivamente.....43
- Figura 7.** Foto dos papéis contendo PbROD formado a partir de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ e Pb(II) $4,84 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de citrato (A) e tartarato (B).....44
- Figura 8.** Espectro de reflectância do complexo PbROD formado a partir de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ e Pb(II) $4,84 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de citrato e tartarato.....45
- Figura 9.** (A) Representação esquemática do acessório de reflectância Labsphare RSA-HP-84. (B) Representação frontal da área selecionada em A; o círculo central é o orifício com diâmetro de 6 mm por onde incide a luz para as medidas de reflectância.45
- Figura 10.** Testes para a detecção visual PbROD, formado a partir de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de citrato e tartarato em diferentes concentrações de Pb(II).46
- Figura 11.** Formação de PbROD em papéis com gramatura 180 e 250 g m^{-2} (papéis da esquerda e direita, respectivamente). Concentração de Pb(II) = $2,42 \text{ mmol L}^{-1}$48
- Figura 12.** Imagem do μ PAD contendo PbROD formado com ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato) e diferentes concentrações de Pb(II), com a distribuição nas zonas de reação conforme apresentada na Figura 2 (página 28).48
- Figura 13.** Distribuição do complexo PbROD no μ PAD formado a partir de diferentes concentrações de Pb(II), em mmol L^{-1} , seguindo o procedimento descrito por FEIGL E ANGER (1972).49
- Figura 14.** Imagens dos μ PADs contendo PbROD formado com ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato) e diferentes concentrações de Pb(II), com a distribuição nas zonas de reação conforme apresentada na Figura 2 (página 28). (a) Sequência: adição de Pb(II) seguido de secagem e posterior adição de ROD. (b) Sequência: adição de ROD seguido de secagem e posterior adição de Pb(II).51
- Figura 15.** MEV da superfície do μ PAD com aumento de 30 vezes. **A** - Papel cromatográfico; **B** - Papel cromatográfico + $10 \mu\text{L}$ de H_2O ; **C** - Papel cromatográfico+ $10 \mu\text{L}$ de solução de HCl pH = 2,78; **D** - Papel cromatográfico + $10 \mu\text{L}$ de tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2,78.....52
- Figura 16.** MEV da superfície do μ PAD com aumento de 1000 vezes. **A** - Papel cromatográfico + $10 \mu\text{L}$ de solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2,78.; **B** - Papel cromatográfico+ $10 \mu\text{L}$ de Pb(II) $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$; **C** - Papel cromatográfico + PbROD ($10 \mu\text{L}$ de solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato

0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 µL de Pb(II) 0,50 mmol L⁻¹); **D** - Papel cromatográfico + PbROD (10 µL de Pb(II) 0,50 mmol L⁻¹, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 µL de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78).53

Figura 17. Representação genérica e simplificada da proposta da reação incompleta entre Pb(II) e ROD.54

Figura 18. MEV da superfície do µPAD contendo papel cromatográfico + (10 µL de Pb(II) 0,50 mmol L⁻¹, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 µL de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78). **D1:** aumento de 2000 vezes; **D2:** aumento de 10000 vezes.55

Figura 19. Variação de A_x a partir das componentes (■) R, (●) G e (▲) B para PbROD obtido a partir de diferentes concentrações de Pb(II) na condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer.56

Figura 20. Variação de absorvância calculada (A_B e A_G) em função do aumento da concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 µl de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78) secagem sob fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de mesmo procedimento de secagem em três repetições, (■) Repetição 1, (●) Repetição 2 e (▲) Repetição 3, com intervalos de 240 dias. (A) A_B a partir da componente B e (B) A_G a partir da componente G. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.57

Figura 21. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 µl de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78) seca sob fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de secagem usando (■) papel e (●) papel com rodizonato como brancos (0% de absorvância). (A) Condição de secagem em fluxo de ar sem aquecimento. (B) Condição de secagem natural. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.58

Figura 22. Imagens do µPAD obtidas no dia da reação. Os números em algarismos romanos representam a condição de obtenção da imagem descritos na Tabela 3 (página 32). A distribuição das concentrações de Pb(II) no µPAD seguem a descrição da Figura 3 (página 33).60

Figura 23. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 µl de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de mesmo procedimento de secagem, adquiridas nas condições ▲ (Condição V: 25% de contraste e -25% de brilho), ● (Condição IV: 25% de contraste e -50% de brilho), ▼ (Condição VI: 0% de contraste e -25% de brilho) e ■ (Condição I: 0% de contraste e 0% de brilho). As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.61

Figura 24. Comparação das imagens do µPAD após diferentes tempos de envelhecimento do papel reagente. Ensaio para detecção de Pb(II) realizado na condição de secagem natural. A – Uso do µPAD imediatamente após aplicação do reagente. B – Uso do µPAD 24 horas após aplicação do reagente mantendo armazenamento sob refrigeração e protegido contra incidência de luz.62

Figura 25. Imagens do μ PAD obtidas em diferentes tempos de digitalização para condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer. I – imediatamente após a realização do ensaio para determinação de Pb(II), II – 24 horas após o ensaio, III – 72 horas após o ensaio e IV – 96 horas após o ensaio.63

Figura 26. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de secagem, com obtenção das imagens: (●) imediatamente após a secagem, (●) 24 horas após a secagem, (●) 72 horas após a secagem e (●) 96 horas após a secagem. (A) Condição de secagem natural. (B) Condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.64

Figura 27. Curva de calibração com ajuste linear da variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μ l de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de 10 μ l de solução de Pb(II), seguido também de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.68

Figura 28. Correlação de Pearson entre os resultados da concentração de Pb(II) obtidas por ICP OES e por *Spot test*. As barras verticais correspondem ao desvio-padrão de 3 replicatas enquanto as horizontais ao desvio-padrão de 8 replicatas. A linha sólida diagonal representa a linha 1:1. A linha segmentada representa o ajuste linear cuja equação da reta é: $C_{\text{Pb(ICP)}} = 22,5 + 0,77C_{\text{Pb(spot test)}}$69

Figura 29. Imagens dos μ PADs utilizados para avaliação de interferentes para condição de secagem natural. I – μ PAD com as concentrações de Pb(II) utilizadas para construção da curva de calibração com formação de PbROD a partir da terceira coluna com as concentrações de Pb(II) 0,28; 0,33; 0,43; 0,55; 0,68; 0,80; 1,00; 2,00; 3,02; 4,01 mmol L^{-1} , II - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de Ba(II), III - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de Cd(II), IV - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de Sr(II). A distribuição das soluções de Ba(II), Cd(II) e Sr(II) utilizadas na avaliação de interferentes nas colunas do μ PAD está de acordo com a apresentação da Tabela 5 (página 37).71

Figura 30. Curva de calibração da variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μ l de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de 10 μ l de solução de Pb(II), seguido também de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.72

Figura 31. Distribuição genérica das soluções de extratos de solos pré-concentrados no μ PAD.93

Figura 32. Imagens dos μ PADs, na condição de secagem natural, contendo a distribuição de PbROD formado a partir da reação de Pb(II) presente nos extratos de solos com ROD (9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78). A distribuição genérica das soluções de extratos de solos no μ PAD está de acordo com a representação da Figura 31 (página 93).99

Figura 33. Curvas de calibração para Pb(II) preparada em (■) HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ e em (▲) água deionizada com variação de A_G com a concentração de Pb(II). Formação de PbROD com procedimento de adição de $10 \mu\text{L}$ de solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$, seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição $10 \mu\text{L}$ de solução de Pb(II), seguido de procedimento de secagem natural.....101

Figura 34. Curvas de calibração para Pb(II) preparada em água deionizada, com variação de absorbância da componente G (A_G), em função da concentração de Pb(II). Formação de PbROD com procedimento de adição de $10 \mu\text{L}$ de ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição $10 \mu\text{L}$ de solução de Pb^{2+} , seguido de procedimento de secagem natural. (A) Faixa de trabalho: $0,25$ a $5,01 \text{ mmol L}^{-1}$, $A_G = 0,76 - 0,99e^{-0,55C}$, $R^2 = 0,998$; (B) Faixa Linear: $0,25$ a $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, $A_G = -0,06 + 0,26C$, $R^2 = 0,999$. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.102

Figura 35. Agrupamento de solos semelhantes de acordo com $\text{PC1} \times \text{PC2}$. A-Gráfico do peso das variáveis (*loadings*); B-Gráfico da distribuição das amostras (*scores*).106

Prefácio

Níveis de chumbo (Pb)¹ em solos podem servir como uma ferramenta sensível e robusta de diagnóstico ambiental, para indicar a qualidade de uma área em relação à contaminação. Algumas dificuldades operacionais para determinar Pb em solos incluem o grande espaço amostral, a geração de resíduos tóxicos, o custo elevado de métodos tradicionais, além da necessidade de pessoal qualificado para operar equipamentos sofisticados, que também devem ser acessíveis. Neste contexto, métodos de análises qualitativos e quantitativos com instrumentação simples representam importante destaque, pois representam redução de tempo e custos, principalmente quando é necessário processar grande número de amostras.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método analítico para determinação de Pb(II)² baseado na reação de *spot test*³ com rodizonato, utilizando dispositivos microfluídicos em papel⁴ com análise digital de imagens⁵ como ferramenta analítica, visando a quantificação de chumbo em solos. No desenvolvimento do trabalho, notou-se a relevância de discussões sobre parâmetros para avaliação das figuras de mérito quando se aplica a análise digital de imagens obtidas em dispositivos microfluídicos em papel.

Os resultados obtidos das análises de chumbo em solos pelo método desenvolvido apontaram boas perspectivas de aplicação como teste de *screening*, indicando sua potencialidade para uso em estudos ambientais.

Como opção para organizar o trabalho, esta tese está dividida em duas partes, constituindo nove capítulos.

¹ O termo chumbo, ou Pb, refere-se, neste trabalho, às várias espécies químicas contendo Pb, independentemente do número de oxidação, contra-íon ou presença de ligantes.

² O termo Pb(II) refere-se, neste trabalho, de forma indistinta às várias espécies químicas contendo Pb(II).

³ Em português, *spot tests* foram originalmente traduzidos como análise de toque ou análise de gota. Contudo, ainda é muito mais comum referir-se a eles, mesmo em português, como *spot tests*. Neste contexto, justifica-se a opção pelo uso da expressão em inglês.

⁴ Dispositivos microfluídicos em papel são dispositivos com barreiras hidrofóbicas na superfície porosa do papel que confinam a amostra em uma região delimitada e promovem transporte fluídico via fluxo lateral (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012).

⁵ Análise digital de imagens refere-se ao emprego de programas computacionais para análise de imagens digitalizadas (como fotografias e imagens escaneadas) para obter dados que podem ser utilizados na quantificação de compostos coloridos.

1. Desenvolvimento de método de *spot test* em dispositivo microfluídico em papel para determinação de Pb(II) usando análise digital de imagens.
2. Determinação de chumbo em solos.

A primeira parte abrange os quatro capítulos iniciais e trata dos detalhes de desenvolvimento do método analítico. Na segunda parte, é descrito o estudo para determinação de Pb(II) em amostras de diversos tipos de solos, englobando os capítulos cinco a sete.

O primeiro capítulo traz os objetivos gerais e específicos que orientaram a realização deste trabalho.

O segundo capítulo introduz uma revisão com informações da literatura sobre reações de *spot test*, com ênfase na reação entre Pb(II) e rodizonato, e sobre a importância do papel como suporte reacional apontando as suas características e vantagens de uso, culminando com sua aplicação para a produção de dispositivos microfluídicos. Também é introduzida a análise digital de imagens, em termos de sua aplicação para medidas de reflectância.

O terceiro capítulo traz a descrição da parte experimental, com os estudos para o desenvolvimento da reação de *spot test* de Pb(II) com rodizonato no dispositivo microfluídico em papel para a quantificação usando a análise digital de imagens. E também a validação laboratorial, com estabelecimento de algumas figuras de mérito do método desenvolvido.

No quarto capítulo, os resultados são apresentados e discutidos, seguindo-se as conclusões relacionadas.

O quinto capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre a presença de chumbo em solos e sua interação com a matriz solo, com destaque para a importância das técnicas empregadas no monitoramento ambiental deste elemento.

O sexto capítulo descreve a parte experimental de análise de chumbo em diversas amostras de solos, incluindo a aplicação do método analítico desenvolvido. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos no sétimo capítulo, juntamente com as referentes conclusões.

O oitavo capítulo traz as considerações finais da tese, salientando os pontos relevantes que indicam perspectivas e desdobramentos do trabalho.

No capítulo nove são apresentadas todas as referências.

Capítulo 1: Objetivos

1. Objetivos

1.1 Geral:

Desenvolver um método para a determinação de Pb(II) em solos por reações de *spot test* em dispositivo microfluídico em papel utilizando programas de digitalização de imagens.

1.2 Específicos:

- Aplicar *spot test* para identificação e quantificação de Pb(II) em solução aquosa, aplicando a reação com rodizonato de sódio.
- Determinar as melhores condições analíticas para a formação do complexo rodizonato de chumbo utilizando dispositivo microfluídico em papel como suporte reacional.
- Utilizar o sistema de cor RGB (*Red, Green, Blue*) para digitalização das imagens do complexo de chumbo com rodizonato para quantificar Pb(II), correlacionando a intensidade de cor com a concentração de Pb(II).
- Realizar a validação laboratorial, com estabelecimento de algumas figuras de mérito do método desenvolvido.
- Aplicar o método desenvolvido para quantificação de Pb(II) em solos.
- Comparar os resultados da concentração de Pb(II) pelo método desenvolvido com os resultados da espectroscopia de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente.

Parte 1: Desenvolvimento de método de *spot test* em dispositivo microfluídico em papel para determinação de Pb(II) usando análise digital de imagens

Capítulo 2: Introdução

2.1. Reações de *spot test*

Spot tests foram destacados e difundidos inicialmente com os trabalhos de Fritz Feigl em suas obras *Spot Tests in Inorganic Analysis* (FEILG e ANGER, 1972) e *Spot Tests in Organic Analysis* (FEIGL e ANGER, 1975) e ainda são muito utilizados em diversas áreas (ZERAİK *et al.*, 2008). Têm como aspectos favoráveis a simplicidade, o baixo custo, o uso de pequenas quantidades de amostras e reagentes, gerando, portanto, pouco resíduo, além dos baixos limites de detecção com características de seletividade que atingem a especificidade em muitos casos (FEIGL e ANGER, 1972). Por terem alta detectabilidade, *spot tests* podem ser interessantes para serem utilizados na determinação de substâncias orgânicas e inorgânicas em diferentes matrizes.

Sais de rodizonato vêm sendo amplamente empregados como reagente analítico para a identificação de Pb(II) em perícia criminal (BARTSCH *et al.*, 1996), e também em análise de rádio em águas doces (GANZERLI *et al.*, 1997a, 1997b). Servem também para reações de identificação de Fe(II), Ba(II) e Sr(II) dentre outros (FEIGL e SUTER, 1942). Controlando o pH do meio reacional é possível identificar Pb(II) na presença de outros íons que reagem com rodizonato (FEIGL e SUTER, 1942) e isso fundamenta a proposta deste trabalho.

Rodizonato reage com Pb(II) para formar um complexo insolúvel (PbROD), cuja coloração depende do pH. Soluções aquosas de rodizonato apresentam coloração amarela ou laranja, enquanto PbROD pode precipitar sob duas formas diferentes. Há uma forma cristalina, $2\text{Pb}(\text{C}_6\text{O}_6) \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, obtida sob condições ácidas (pH = 2,8), com coloração rosa avermelhado. Há também um sólido amorfo, $\text{PbC}_6\text{O}_6 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, de coloração violeta azulado, que precipita em meio neutro (FEIGL e SUTER, 1942; FEIGL e ANGER, 1972).

O reagente rodizonato de sódio é estável por um longo período de tempo, porém, em solução aquosa é degradado por processos oxidativos, que são acelerados termicamente e pela exposição à luz (CHALMERS e TELLING, 1967; IRACI e BACK, 1988). Visando aumentar a estabilidade da solução de rodizonato de sódio, alguns autores propuseram modificações do método empregado por FEIGL e SUTER (1942), substituindo a solução de rodizonato preparada em água

por solução reagente preparada diretamente em tampão tartarato, pH = 2,8, (BARTSCH *et al*, 1996) ou adicionando-se, à solução de rodizonato em água, 30% de etanol, ou acetona, ou EDTA (CHALMERS e TELLING, 1967).

Modificações no método de FIELG e SUTER (1942) também está relacionada com mudança do tampão utilizado a fim de evitar a co-precipitação de outros produtos da reação dos ânions da solução tampão com cátions eventualmente presentes na amostra. Pode-se citar como exemplo a propostas de PREER e MURSCISON, 1986, que optaram pela substituição do tampão tartarato de pH 2,8, por tampão citrato com pH 1,5, o que evita a precipitação com potássio, comum em extratos de solos.

Ao longo dos anos, também foram propostas preparações de papéis reagentes impregnados com rodizonato protegido por substâncias capazes de manter sua reatividade durante o período de estocagem do papel. Como exemplos, há os trabalhos de VAITSMAN *et al.* (1979) e JUNGREIS e NECHAMA (1986). No primeiro, tiras de papel de filtro foram impregnadas com rodizonato reagido com etilenodiamina e o papel reagente obtido pôde ser armazenado por até 6 meses se mantido ao abrigo da luz e de vapores do ambiente. No segundo, rodizonato de estrôncio foi precipitado sobre o papel como forma de proteger o reagente. O papel reagente preparado assim permaneceu estável e reativo mesmo após 30 dias a 50 °C. Segundo os autores, após adição de Pb(II) neste papel forma-se PbROD não cristalino, de coloração azul-violeta. A visualização da cor característica deste complexo pode ser mascarada pela presença de rodizonato de estrôncio, porém, a adição de ácido diluído degrada o sal de estrôncio, deixando evidente a coloração violeta do PbROD no papel.

A identificação de analitos a partir de reações de *spot tests* ocorre pela mudança de cor de solução ou formação de precipitado, sendo que, geralmente, a quantidade do produto da reação é proporcional à concentração inicial de analito na amostra (FEIGL e ANGER, 1972), o que representa potencial para exploração em termos quantitativos. A detecção de um analito em uma reação de *spot test*, realizada sobre papel envolve, na maioria das vezes, a formação de um produto colorido em uma área irregular, ou em várias regiões na superfície do papel teste.

YAGODA (1937) considerou vantajoso limitar a área de teste dentro de um espaço uniforme com o auxílio de uma barreira hidrofóbica, formada por parafina incorporada nas fibras do papel. Assim, seria possível realizar o teste em papel de filtro sem perder a capacidade de detecção devido ao espalhamento da mancha colorida sobre uma grande superfície. Além disso, essa uniformidade permitiria estabelecer relações quantitativas com a intensidade de coloração.

2.2. Papel como suporte reacional

Papel é um meio fibroso composto de cadeias paralelas de polissacarídeos. Ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das cadeias proporcionam regiões cristalinas, altamente ordenadas, que caracterizam a força e insolubilidade da celulose, enquanto regiões de baixa ordenação são tidas como amorfas, e responsáveis pela reatividade, sorção de água e inchaço das fibras (ZWEIG e SHERMA, 1971; PELTON, 2009).

O papel é um material anisotrópico, ou seja, a distribuição da massa em uma folha de papel geralmente não é constante na direção da espessura (PELTON, 2009). Normalmente, as fibras têm orientação preferencial ao longo do sentido de que o papel foi feito, assim, o transporte ao longo de uma tira de papel num dispositivo fluido de fluxo lateral tende a ser mais horizontal que vertical, e, como consequência, a propagação lateral de fluidos em papel é geralmente mais rápida que espalhando vertical (CARRILHO *et al.*, 2009).

Historicamente, papel vem sendo usado como suporte para indicadores reativos de pH (RICE, 1912); como suporte cromatográfico (CLEGG, 1950); como suporte para reações de *spot tests* para compostos orgânicos e inorgânicos (FIEGL e ANGER, 1972); como dispositivo para imunoenaios (ASSIS *et al.*, 2008) e, mais recentemente, para a confecção de dispositivos microflúidicos (MARTINEZ *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2010).

O vasto uso de papel em processos analíticos deve-se à abundância de matéria-prima, ao baixo custo e à facilidade de aquisição, de impressão, de revestimento, de impregnação, de estocagem em pouco espaço e, além disso, é

um bom material filtrante, facilmente biodegradável ou queimado. Sua estrutura porosa facilita ensaios de fluxo lateral, separações cromatográficas e a aplicação como dispositivos microfluídicos de baixo custo (PELTON, 2009).

2.3. Dispositivos microfluídicos em papel

A invenção de dispositivos microfluídicos em papel (μ PADs, do inglês, *Microfluidic Paper-based Analytical Devices*) tem sido atribuída ao grupo de George M. Whitesides da Universidade de Harvard, que publicou uma comunicação sobre o assunto em 2007 (MARTINEZ *et al.*, 2007), porém o trabalho de MÜLLER e CLEGG (1949) pode representar a primeira aplicação desses dispositivos segundo LI *et al.* (2012).

Em uma revisão sobre as perspectivas dos μ PADs, LI *et al.* (2012) encontraram na literatura dez técnicas empregadas na fabricação de μ PADs. Atualmente, o uso de cera como barreira hidrofóbica na construção de microestruturas é uma alternativa simples e de baixo custo para a fabricação de μ PADs (LU *et al.*, 2009). CARRILHO e colaboradores (2009) propuseram a criação de μ PADs em papel cromatográfico, com micro canais e zonas de reação obtidas a partir de uma impressora comercial, Xerox Phaser 8560N, à base de cera. Após a impressão, a cera que adere à superfície do papel deve passar por uma etapa de aquecimento, o que promove seu espalhamento uniforme vertical e lateralmente. Isto cria uma barreira hidrofóbica em toda espessura do papel com largura maior que os padrões impressos originalmente, com ligeira diminuição na área de reação. A impressora usada para esta aplicação tem custo atual da ordem de 3.000 reais e, segundo os autores, assumindo uma cobertura de tinta de 20% da área total, o custo total do dispositivo depende quase que inteiramente do tipo de papel empregado, podendo variar de cerca de 0,001 dólar/cm², com papel cromatográfico Whatman, até valores muito menores com o uso de outros papéis de baixo custo.

Os μ PADs possuem aplicações em diversas áreas dentre elas as áreas de análise ambiental (JAYAWARDANE *et al.*, 2012; MENTELE *et al.*, 2012) e de

saúde e diagnósticos (MARTINEZ *et al.*, 2007; ABE *et al.*, 2008; ELLERBEE *et al.*, 2009; FENTON *et al.*, 2009; ABE *et al.*, 2010; DUNGCHAI *et al.*, 2010; KLASNER *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010), sendo nesta última a maior concentração de estudos.

2.4. Análise digital de imagens como ferramenta analítica

Associar fotografia digital com programas para análise de imagem pode representar uma opção simples e acessível para obtenção de resultados quantitativos a partir de reações colorimétricas (ZAMORA *et al.*, 2011). Isso vem sendo chamado de análise digital de imagens e sua aplicação vem crescendo em diversas áreas, como em monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (PACIORNIK *et al.*, 2006), análise de misturas complexas (ALIMELLI *et al.*, 2007), controle de materiais (LOPEZ-MOLINERO *et al.*, 2010), detecção de ponto final de titulações (GAIÃO *et al.*, 2006); testes clínicos (BLICHARZ *et al.*, 2008), imunoensaios (SAPSFORD *et al.*, 2009) e estudos bioanalíticos (ABE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Uma imagem pode ser entendida como o resultado de um estímulo luminoso que, ao ser capturado por um dispositivo eletrônico, é convertido em um arquivo numérico. A imagem pode ser amostrada em um número finito de posições de um arranjo bidimensional (x, y), o assim chamado pixel (PACIORNIK *et al.*, 2006). Ou seja, o pixel é o menor ponto que forma uma imagem digital, sendo que o conjunto de milhares de pixels forma a imagem inteira.

Monitores, câmeras digitais e *scanners*, normalmente, decompõe a cor de cada pixel em três componentes: vermelho, verde e azul, no sistema de cores denominado RGB (*Red, Green, Blue*), que é um dos sistemas mais conhecidos (SCURI, 2002). Nesse sistema, cada tom de cor é definido pela combinação de três variáveis: R (vermelho), G (verde) e B (azul), com valores entre 0 e 255, o que permite uma combinação de 256^3 (ou seja, 16.777.216) tonalidades em cada pixel (GODINHO *et al.*, 2008).

A qualidade da imagem depende de parâmetros intrínsecos do equipamento utilizado em sua captura sendo, então, necessário calibrá-lo para

corrigir desajustes causados pelo uso. A obtenção de imagens por câmeras digitais depende também de fatores externos, como iluminação do objeto, enquanto no caso de uso de *scanners*, teoricamente, a intensidade da luz emitida é homogênea em toda a área de digitalização, sendo a escolha da resolução o fator mais crítico neste caso (SCURI, 2002). Porém, SCHIMIDT (1997) observou que as regiões da imagem situadas nas posições mais externas na área útil de digitalização do scanner apresentam menor intensidade de cor do que aquelas de localização central, de forma que a obtenção das imagens deve ser realizada sempre em uma mesma posição, para evitar a flutuação de valores em função da posição.

Com a digitalização das imagens, as informações das cores são traduzidas em números, que podem ser armazenados e utilizados para cálculos. A quantificação de um analito a partir de análise digital de imagem, com dados de intensidade de cor, envolve uma relação da luz refletida na superfície dos produtos coloridos com sua concentração (KOMPANY-ZREH *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2010), apontando uma alternativa de baixo custo para medidas espectrofotométricas.

Capítulo 3: Parte experimental

3.1. Considerações gerais

A parte experimental está dividida em três fases. A primeira fase envolveu o estudo para determinar as melhores condições analíticas para a formação de PbROD, bem como a avaliação de diferentes materiais como suporte reacional. Na segunda fase, foi utilizado um programa de digitalização de imagens para quantificação de Pb(II) e foi avaliado a influência dos parâmetros relacionados a este programa e à forma de aquisição das imagens nos resultados de absorvância calculada. Na terceira fase, fez-se a validação laboratorial, com o estabelecimento de algumas figuras de mérito do método desenvolvido.

3.2. Equipamentos, materiais e reagentes.

3.2.1. Equipamentos

- Espectrofotômetros (Pharmacia Ultrospech 2000 e HP-8452A);
- Acessório de reflectância (RSA-HP-84, Labsphare);
- Espectrômetro de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente, ICP OES, (OPTIMA 3000DV, Perkin Elmer);
- Prensa hidráulica (Carver) e pastilhador (Parkin Elmer);
- Impressora multifuncional com scanner (Photosmart C3180 All-in-One, HP);
- Impressora com tinta à base de cera (Xerox Phaser 8560N).

3.2.2. Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório;
- Cubetas de quartzo 1,0 cm de caminho óptico (Q4-Biocel);
- Papel de filtro quantitativo 80 g m⁻² (Bioline Filtros Industriais);
- Papel de filtro qualitativo 180 e 250 g m⁻² (Bioline Filtros Industriais);
- Microcelulose comercial (Galena);
- Papel cromatográfico (Whatman nº 1);
- Micropipeta (5 a 50 µL, LABMATEsoft);
- Pipeta automática (1,00 a 5,00 mL, Biohit, Proline Plus);
- Ponteiras para pipeta automática;
- Filme plástico autoadesivo transparente (Vini-Tac);

- Secador de cabelo (ST 2800 super turbo, 1800 W, Mega Professional);
- Programa DIGIMAGE (SCHIMIDT, 1997);
- Programa Origin 8.0.

3.2.3. Reagentes

- Água deionizada (deionizador MiliPoreMili-Q Plus);
- Água destilada (destilador de vidro);
- Rodizonato de sódio (VETEC);
- Nitrato de chumbo (ECIBRA);
- Ácido L (+) tartárico (Synth);
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Ácido cítrico (Synth);
- Citrato de sódio (Synth);

Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítico.

3.3. Investigação das condições de reação de Pb(II) com rodizonato

Uma revisão bibliográfica indicou algumas variações nas condições de preparo da solução reagente e da reação entre Pb(II) e rodizonato (FIELG e SUTER, 1942; FEIGL e BRAILE, 1944 a, b; CHALMERS e TELLING, 1967; VAITSMAN *et al.*, 1979; PREER e MURSCISON, 1986; BARTSCH *et al.*, 1996). Portanto, optou-se por iniciar o estudo buscando-se condições adequadas de preparo de reagentes e de reação, visando a aplicação para determinação de Pb(II) em solos.

3.3.1. Preparo da solução de rodizonato e formação de PbROD

Preparo da solução de rodizonato

Soluções de rodizonato de sódio (ROD) foram preparadas em água destilada ($C_{\text{ROD}} = 0,21 \text{ mmol L}^{-1}$) e em soluções tampão ($C_{\text{ROD}} = 0,63 \text{ mmol L}^{-1}$) de tartarato de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2,54) e de citrato de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2,52). As soluções preparadas foram mantidas em ambiente controlado

(termostatização a 20 ± 2 °C (ar condicionado) e iluminação ambiente) e os espectros eletrônicos (190 a 800 nm) foram monitorados por 96 horas, com leituras, em média, a cada seis horas, para avaliar a tempo de degradação das soluções.

Formação de PbROD

Para testes de detecção de Pb(II), foram preparadas soluções de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nas concentrações: 0,32; 0,35; 0,38; 0,40; 0,44; 0,48; 0,54; 0,61; 0,69; 0,81 e 0,97 mmol L^{-1} a partir de diluições adequadas de uma solução estoque de 4,84 mmol L^{-1} . Papel de filtro quantitativo (80 g m^{-2}) foi recortado em quadrados de $1,0 \text{ cm}^2$ os quais foram imersos nas soluções de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, em triplicata, removidos e secos naturalmente em temperatura ambiente. Em seguida, para formação do complexo, foram imersos em soluções de rodizonato 9,96 mmol L^{-1} , preparadas em soluções tampão (citrato e tartarato de 0,2 mol L^{-1} e $\text{pH} = 2,52$ e 2,54, respectivamente) e novamente secos a temperatura ambiente.

A observação visual dos complexos foi realizada por sete voluntários e como referência visual da cor do PbROD, utilizou-se papel preparado com solução de Pb(II) 4,84 mmol L^{-1} .

Para monitoramento da estabilidade do complexo em papel utilizaram-se as amostras do complexo em papel com concentração Pb(II) 4,84 mmol L^{-1} e foram feitas medidas da reflectância (350 a 750nm), em média, a cada 10 horas, durante oito dias. Como branco para as medidas foi utilizado o papel de filtro sem adição de reagentes.

3.3.2. Avaliação de materiais como suporte para reação

Estudos iniciais para avaliação de suporte sólido foram realizados com papéis de filtro quantitativo (80 g m^{-2}) e qualitativo de diferentes gramaturas (180 e 250 g m^{-2}), cortados em quadrados de $4 \times 4 \text{ cm}$. Também foram testadas pastilhas preparadas com 35 mg de microcelulose obtidas em pastilhador de 15 mm de diâmetro e prensadas sob 4500 psi. A estes suportes, adicionaram-se 50 μL de solução do Pb(II) de 0,32 a 4,84 mmol L^{-1} (preparadas pela diluição adequada de

solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $4,84 \text{ mmol L}^{-1}$). Nos casos em que as soluções adicionadas não eram absorvidas totalmente pelo papel, o procedimento foi repetido adicionando-se volumes menores de reagentes até um volume mínimo de $15 \mu\text{L}$.

Também foram feitos testes com μPAD , preparados utilizando impressão à base de cera em papel cromatográfico Whatman nº 1, num design com 96 áreas circulares (zonas de reação) impressas com linha de espessura igual a $0,5 \text{ mm}$ e dispostas em um arranjo de 12 colunas por 8 linhas, com diâmetro de $6,8 \text{ mm}$ e distância de $9,0 \text{ mm}$ do centro de duas zonas. O papel impresso foi levado a estufa a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por 120 segundos, para a permeação da cera e impermeabilização das zonas de reação (CARRILHO *et al.*, 2009). Para evitar perda de líquido por vazamento vertical, foi fixado no verso do dispositivo um filme plástico autoadesivo transparente.

Após testes variando-se os volumes de soluções reagentes, optou-se pelo uso de alíquotas de $10 \mu\text{L}$ no μPAD . A formação de PbROD em μPAD foram testadas em duas condições: a primeira, reproduzindo o método proposto por FEIGL E ANGER (1972) e a segunda com propostas de modificação.

Formação de PbROD com procedimentos de FEIGL e ANGER (1972)

Nas condições descritas pelos autores, a cada zona de reação do μPAD , adicionaram-se $10 \mu\text{L}$ de solução de $\text{Pb}(\text{II})$ e, em sequência, $10 \mu\text{L}$ de solução aquosa de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ seguindo-se de $10 \mu\text{L}$ de tampão tartarato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$). Testou-se a reação 1) na ausência de tampão e 2) com adição de tampão após a secagem completa das soluções reagentes. As soluções de $\text{Pb}(\text{II})$ foram utilizadas nas seguintes concentrações em mmol L^{-1} : 0,28; 0,33; 0,43; 0,55; 0,80; 1,00; 2,00; 3,02; 4,01; 5,01.

Ajustes de condições para obtenção de PbROD

Em cada zona de reação do μ PAD, adicionaram-se 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} , preparada em tampão tartarato (0,2 mol L^{-1} , $\text{pH} = 2,78$) e secou-se com fluxo de ar sem aquecimento, usando secador de cabelo fixado a uma distância de 26 cm, medida a partir da base do suporte onde o papel era posicionado, conforme ilustrado na Figura 1. O posicionamento do secador de cabelo a esta distância permitiu a secagem do μ PAD sem perda das soluções reagentes por transbordamento provocado pela intensidade do fluxo de ar. O fluxo de ar foi mantido até secagem completa e aparecimento de coloração amarela intensa dos íons rodizonato, em cerca de 10 minutos.

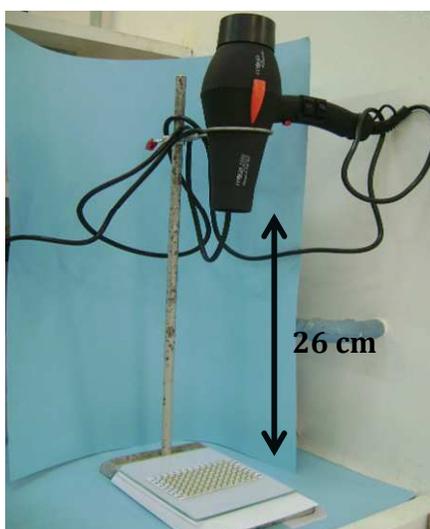


Figura 1. Esquema do sistema para secagem do μ PAD com um secador de cabelo posicionado a uma distância de 26 cm medidos entre a saída de ar e o μ PAD.

Na sequência, foram adicionados 10 μ L de solução de Pb(II), em concentrações variando de 0,20 a 4,84 mmol L^{-1} , em cada zona reacional, distribuídas de acordo com a representação na Figura 2. Secava-se até o aparecimento da coloração típica do complexo. Para cada concentração, foram realizadas sete replicatas.

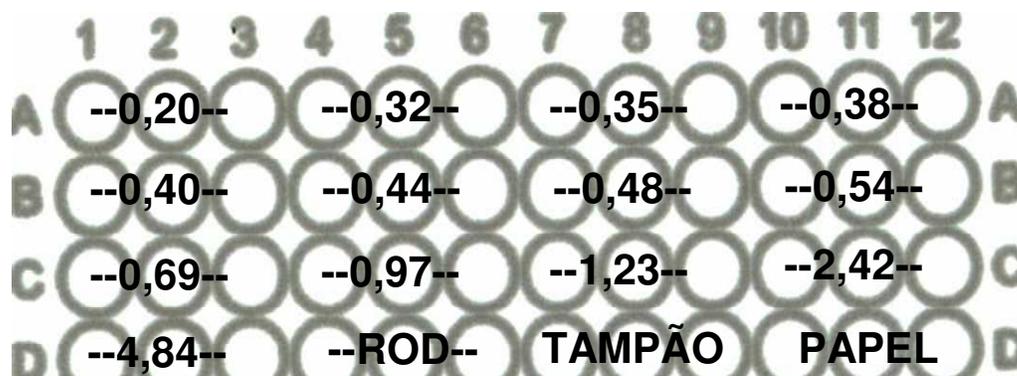


Figura 2. Distribuição das concentrações (em mmol L^{-1}) das soluções de Pb(II) no μPA .

A influência da ordem de adição dos reagentes na formação do complexo PbROD no μPAD também foi avaliada em dois testes: 1) seguindo-se a ordem de adição de reagentes de FEIGL e ANGER (1972), incluindo uma etapa de secagem em fluxo de ar sem aquecer, após cada adição de reagente; 2) invertendo-se a ordem de adição dos reagentes, iniciando-se pela adição de ROD, seguida de adição de Pb(II).

Microscopia eletrônica de varredura do complexo PbROD no μPAD

Ainda com o intuito de avaliar a influência da ordem de adição dos reagentes na formação de PbROD, foram obtidas microscopias eletrônica de varredura (MEV) dos complexos formado em μPAD , utilizando-se microscopio JSM-6360LV (JEOL) com um feixe de elétrons de 5 keV. A descrição do conteúdo dos μPAD está apresentada na Tabela 1. As amostras receberam cobertura de ouro, as imagens foram obtidas com resolução de 500, 10 e 1 μm .

Tabela 1. Descrição das misturas reacionais em μ PAD utilizadas para MEV.

Amostra	Descrição do conteúdo dos μ PAD
1	Papel cromatográfico
2	Papel cromatográfico + 10 μ L de H ₂ O
3	Papel cromatográfico + 10 μ L de tampão tartarato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 2,78.
4	Papel cromatográfico + 10 μ L de solução de HCl pH = 2,78.
5	Papel cromatográfico + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L ⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 2,78.
6	Papel cromatográfico + 10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L ⁻¹
7	Papel cromatográfico + PbROD (10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L ⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 2,78, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L ⁻¹).
8	Papel cromatográfico + PbROD (10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L ⁻¹ , secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L ⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L ⁻¹ , pH = 2,78).

3.4. Análise digital de imagens

Para as leituras da intensidade de cor do complexo no μ PAD, utilizou-se o DIGIMAGE, um programa de digitalização de imagem desenvolvido em Visual Basic[®] 6.0 por SCHIMDT (1997), que fornece arquivo de dados da intensidade de cor no sistema RGB. Alguns parâmetros do programa e o modo de aquisição das imagens do μ PAD foram testados, buscando-se condições adequadas para quantificar o Pb(II) a partir de PbROD obtido em papel, conforme descrito a seguir.

3.4.1. Avaliação dos parâmetros do programa DIGIMAGE

Visando avaliar os resultados obtidos a partir de cálculos com cada uma das componentes RGB considerando-se a resposta de absorvância para diferentes concentrações de Pb(II) e a repetibilidade da análise de *spot test*, realizaram-se três séries de experimentos para obtenção de dados para construir curvas de calibração num intervalo de 240 dias (oito meses). Neste intervalo entre cada repetição permite-se que seja avaliado o comportamento robusto da resposta de absorvância sem que ocorra o controle de algumas variáveis como clima,

intensidade de luz e habilidade adquirida pelo analista devido a repetibilidade constante dos procedimentos analíticos.

Para a formação de PbROD foram preparadas soluções com concentrações descritas na Tabela 2, obtidas pela diluição adequada de uma solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 5,01 mmol L⁻¹. As misturas reacionais de cada concentração foram feitas em sete replicatas, utilizando-se ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78.

Tabela 2. Concentrações de Pb(II), em mmol L⁻¹, utilizadas no procedimento para formação de PbROD para avaliação da repetibilidade da análise de *spot test*.

	Concentração de Pb(II) (mmol L ⁻¹)							
Repetição 1	0,32	0,49	0,86	2,40	4,85	-	-	-
Repetições 2 e 3	0,50	0,75	1,50	2,00	2,51	3,00	4,00	5,01

Em cada zona de reação do μPAD , com o auxílio de uma micropipeta adicionaram-se 10 μL de solução de ROD e secou-se sob fluxo de ar sem aquecimento, seguindo-se a adição de 10 μL de solução de Pb(II) e de nova etapa de secagem até o aparecimento da coloração típica do complexo. Foram testadas duas formas dessa segunda etapa de secagem: secagem natural e secagem em fluxo de ar sem aquecimento.

As leituras da intensidade de cor do complexo no μPAD foram realizadas utilizando o programa DIGIMAGE. O programa permite que a região da imagem de onde os dados são coletados seja escolhida pelo usuário e a varredura é realizada automaticamente para realização de leitura da intensidade de cor de todos os pixels da região delimitada (SCHIMIDT, 1997).

Em métodos espectrofotométricos, ao invés de intensidade de cores, utiliza-se a relação entre absorvância ou reflectância com a concentração de espécies absorventes para construir curvas de calibração de acordo com a Lei de Beer (KOMPANY-ZAREH *et al.*, 2002). Fazendo uma aproximação similar, os dados da intensidade da cor para cada componente RGB, obtidos pelo DIGIMAGE, foram utilizados na obtenção de um parâmetro que se passou a denominar absorvância calculada para cada componente (A_R , A_G e A_B), de acordo com a Equação 1.

$$A_x = -\log \frac{\frac{\sum I_x}{n}}{\frac{\sum b_x}{n}} \quad \text{Equação 1}$$

onde: A_x = absorvância calculada ($X = R, G$ ou B); I_x = valores de intensidade de cor para área selecionada da imagem do PbROD; n = número de pixel; b_x = valores de intensidade de cor para a imagem do branco.

Com os dados da absorvância calculada construíram-se curvas na faixa de trabalho para cada componente R, G e B, que serviu para orientar a escolha da componente de resposta mais correlacionada com a concentração de PbROD, além dos seguintes parâmetros do programa DIGIMAGE que também foram avaliados:

Branco

Para escolha adequada do branco no cálculo de absorvância, utilizaram-se os dados do suporte (papel) e das zonas impregnadas apenas com soluções de ROD como b_x da Equação 1. Os resultados encontrados foram plotados em gráficos e comparados visualmente.

Área para coleta de dados

A delimitação da área de reação nos μ PADs por barreiras hidrofóbicas torna a visualização do complexo mais nítida, devido a área restrita para sua formação, porém sua distribuição não é homogênea. Cogitou-se que o tamanho da área selecionada para a obtenção dos dados de intensidade de cor poderia afetar o valor de A_x e, por isso, compararam-se os resultados de A_x de áreas com raios de 24 e 12 pixels.

Para a formação do PbROD foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 0,15; 0,20; 0,24; 0,32; 0,49; 0,86; 2,40 mmol L⁻¹ pela diluição adequada de uma solução de Pb(NO₃)₂ 4,85 mmol L⁻¹. No μ PAD, as misturas reacionais de cada concentração foram obtidas com sete replicatas, utilizando-se solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78). Ao

todo, foram preparados sete μ PADs totalizando 49 medidas de cada uma das oito concentrações diferentes de Pb(II).

Em cada zona de reação do μ PAD, com o auxílio de uma micropipeta adicionaram-se 10 μ L de solução de ROD e secou-se sob fluxo de ar sem aquecimento, seguindo-se a adição de 10 μ L de solução de Pb(II) e nova etapa de secagem até o aparecimento da coloração típica do complexo. Foram testadas duas formas dessa segunda etapa de secagem: natural e com fluxo de ar sem aquecimento.

3.4.2. Avaliação dos parâmetros do *scanner*

Para avaliar a influência das condições de obtenção das imagens em *scanner*, no cálculo de absorvância e na precisão dos resultados, seguiu-se um planejamento fatorial 3^2 (BARROS NETO *et al.*, 2007) variando-se condições de brilho e contraste, conforme descrito na Tabela 3. Condições extremas de contraste negativo e brilho positivo geraram imagens totalmente negras e brancas, respectivamente, por isso não foram incluídas no estudo.

Para a formação de PbROD foram preparadas soluções de Pb(II) nas seguintes concentrações: 0,05; 0,15; 0,20; 0,24; 0,32; 0,41; 0,49; 0,86; 2,40 mmol L⁻¹, com diluições adequadas de solução de Pb(NO₃)₂ 4,85 mmol L⁻¹. As misturas reacionais de cada concentração foram feitas com sete replicatas, utilizando-se solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78).

Tabela 3. Condições das imagens obtidas em *scanner* com resolução de 200 dpi.

Condição	Contraste (%)	Brilho (%)
I	0	0
II	50	-25
III	50	-50
IV	25	-25
V	25	-50
VI	0	-25
VII	0	-50
VIII	25	0
IX	50	0

Em cada zona de reação do μ PAD, com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 10 μ L de solução de ROD com secagem em fluxo de ar sem aquecer e na sequência, adicionaram-se 10 μ L de solução de Pb(II) e com nova secagem até o aparecimento da coloração típica do complexo. Na Figura 3 está representada a distribuição das concentrações de Pb(II) no μ PAD, sendo que a primeira coluna denominada *background* corresponde à coluna onde não foram adicionados reagentes.

Após a adição do analito, os testes foram conduzidos distintamente com secagem natural e secagem em fluxo de ar sem aquecimento por aproximadamente 10 minutos.

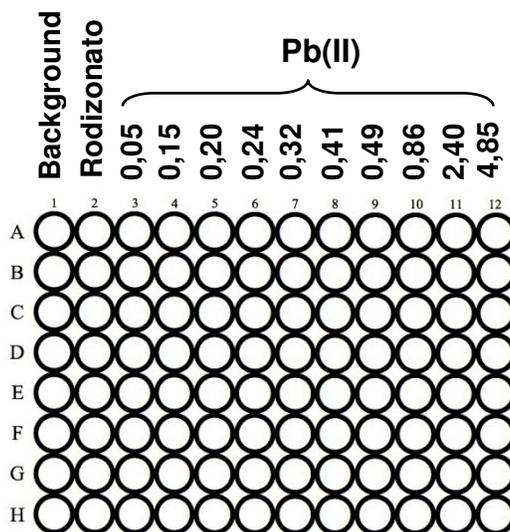


Figura 3. Distribuição das concentrações de Pb(II), em mmol L^{-1} , no μ PAD.

3.4.3. Avaliação da influência do envelhecimento do papel reagente e do complexo na absorbância calculada

Para avaliar a influência do tempo de envelhecimento do μ PAD impregnado com ROD na formação de complexo com Pb(II), em cada zona de reação, usando uma micropipeta, adicionaram-se 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78, seguindo-se de secagem em fluxo de ar sem aquecimento. Depois, os dispositivos foram armazenados conforme as

condições descritas na Tabela 4. Para cada condição prepararam-se μ PADs em duplicata.

Para a formação do PbROD foram preparadas soluções de Pb(II) nas seguintes concentrações: 0,28; 0,33; 0,43; 0,55; 0,80; 1,00; 2,01; 3,02; 4,01; 5,01 mmol L⁻¹ a partir de diluições adequadas de uma solução estoque 5,01 mmol L⁻¹ Pb(NO₃)₂. As misturas reacionais de cada concentração foram feitas com sete replicatas, adicionando-se 10 μ L de solução de Pb(II) em cada zona, seguido de secagem até o aparecimento da coloração típica do complexo. Foram testados os dois procedimentos de secagem após a adição do analito: secagem natural e secagem em fluxo de ar sem aquecimento por aproximadamente 10 minutos sendo as imagens obtidas posteriormente.

Tabela 4. Condições de temperatura, incidência de luz e tempo de estocagem dos μ PADs impregnados com ROD.

Condição	Temperatura de armazenamento	Incidência de luz	Tempo de armazenamento
I	Temperatura Ambiente	Sem proteção contra incidência de luz	24 horas
II	Temperatura Ambiente	Protegido contra incidência de luz	24 horas
III	Refrigeração em geladeira doméstica	Protegido contra incidência de luz	24 horas
IV	Temperatura Ambiente	Sem proteção contra incidência de luz	Uso imediato do μ PAD

Os μ PADs mantidos sob a condição IV (Tabela 4) foram digitalizados 4 vezes: imediatamente após a secagem, 24, 72 e 96 horas depois, buscando-se avaliar o envelhecimento do complexo nos resultados da A_{λ} .

3.5. Validação laboratorial e algumas figuras de mérito

Precisão

Para avaliar a precisão, foram utilizados os desvios-padrão das medidas de A_G do complexo PbROD obtido em três μ PADs preparados em um mesmo dia. Em cada μ PAD, para uma mesma concentração, a reação de complexação foi realizada em 7 replicatas, formando um conjunto de 21 replicatas.

Para avaliar a precisão intermediária, os testes foram repetidos novamente três vezes, com um intervalo de dois dias. Para a formação de PbROD foi preparada uma curva de calibração com dados da reação de soluções de Pb(II) nas seguintes concentrações: 0,05; 0,15; 0,20; 0,24; 0,32; 0,41; 0,86; 2,40 mmol L⁻¹, a partir de diluições adequadas de solução de Pb(NO₃)₂ 4,85 mmol L⁻¹. As misturas reacionais de cada concentração foram feitas com sete replicatas, utilizando-se solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78). A solução de Pb(NO₃)₂ 0,49 mmol L⁻¹ foi utilizada como amostra externa para cálculo do erro.

Exatidão

Para avaliar a exatidão, prepararam-se dois μ PADs. O primeiro para construção da curva de calibração linear com Pb(II) nas seguintes concentrações: 0,28; 0,33; 0,55; 0,68; 0,80; 0,90; 1,00 mmol L⁻¹ por diluições adequadas de solução de Pb(NO₃)₂ 5,01 mmol L⁻¹. E o segundo μ PAD com seis amostras com concentrações aleatórias de Pb(II), desconhecidas pelo analista. As misturas reacionais de cada concentração foram obtidas com sete replicatas, utilizando-se solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78).

As mesmas soluções utilizadas para o preparo da curva de calibração e as amostras aleatórias foram analisadas por ICP OES nas seguintes condições: 1300 W de potência incidente utilizando argônio de elevada pureza para geração do plasma, com linha de emissão de Pb em 220,353 nm e medidas com 3 replicatas.

Compararam-se os resultados das concentrações encontrados pelo método desenvolvido com os encontrados por ICP OES, considerando-se esses últimos como valores de referência para cálculo de erro. Foram aplicados os testes estatísticos: correlação de Pearson e teste F.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A curva de calibração utilizada na avaliação da exatidão foi empregada nos cálculos de LD e LQ. As Equações 2 e 3 foram aplicadas para calcular valores de LD e LQ. A Equação 2 segue a recomendação da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002) e a Equação 3 leva em consideração a propagação de erros para calcular LD (LONG e WINEFORDNER, 1983). Para cálculo de LQ, seguiu-se a recomendação da IUPAC e aplicou-se $k = 10$ para ambas as equações (THOMPSON *et al.*, 2002).

$$LD = \frac{k \times sd_B}{m} \quad \text{Equação 2}$$

onde: $k = 3$ para um nível de confiança de 99,86%, sd_B é o desvio-padrão do branco e m é a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

$$LD = \frac{k \times (sd_B^2 + sd_i^2 + (\frac{i}{m})^2 sd_m^2)^{1/2}}{m} \quad \text{Equação 3}$$

onde: $k = 3$ para um nível de confiança de 99,86%; sd_B é o desvio-padrão do branco, sd_i é o desvio padrão do coeficiente linear, i é o coeficiente linear, m é o coeficiente angular e sd_m é o desvio-padrão do coeficiente angular.

Avaliação de interferentes

Foi preparada uma solução de Pb(II) 0,45 mmol L⁻¹ a partir de diluição adequada de solução de Pb(NO₃)₂ 5,01 mmol L⁻¹. Soluções estoque de Cd(II), Ba(II) e Sr(II) foram preparadas a partir de seus nitratos nas respectivas concentrações 9,04, 4,89 e 4,87 mmol L⁻¹. Por meio de diluições adequadas prepararam-se soluções de cada interferente nas concentrações 0,23; 0,45; 2,25 e 4,50 mmol L⁻¹. Tomando-se a solução de Pb(II) 0,45 mmol L⁻¹ como referência, prepararam-se soluções do analito juntamente com cada interferente adicionando-

se a balões volumétricos de 10,00 mL volumes adequados de soluções estoques de Pb(II) e de cada interferente, individualmente, para atingir a concentração final da solução nas proporções de 1:0,5, 1:1, 1:5 e 1:10. Para cada interferente foram preparados dois μ PADs com duas formas de secagem após adição do analito: natural ou sob fluxo de ar sem aquecer. As misturas reacionais de cada concentração de cada analito foram feitas em sete replicatas, utilizando-se solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ (tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,78). Para formação dos complexos, adicionou-se uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ de ROD, seguindo secagem sob fluxo de ar sem aquecimento, adição de $10 \mu\text{L}$ de solução contendo o analito e posterior secagem. Na Tabela 5 estão representadas as distribuições das soluções utilizadas na avaliação de interferentes nas colunas do μ PAD.

Para construção da curva de calibração foram utilizadas soluções de Pb(II) nas seguintes concentrações: 0,28; 0,33; 0,43; 0,55; 0,68; 0,80; 1,00; 2,00; 3,02; $4,01 \text{ mmol L}^{-1}$, com diluições adequadas de solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $5,01 \text{ mmol L}^{-1}$. As misturas reacionais de cada concentração foram feitas com sete replicatas, utilizando-se solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ (tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,78). Para formação de PbROD, adicionou-se uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ de ROD, secou-se sob fluxo de ar sem aquecimento, juntaram-se $10 \mu\text{L}$ de Pb(II) e procedeu-se a secagem: natural ou sob fluxo de ar sem aquecer até secagem completa, aproximadamente 10 minutos.

Tabela 5. Distribuição das soluções utilizadas na avaliação de interferentes nas colunas do μ PAD.

Coluna	Solução adicionada	Coluna	Solução adicionada
1	Background	7	M(II) = $2,25 \text{ mmol L}^{-1}$
2	ROD	8	M(II) = $4,50 \text{ mmol L}^{-1}$
3	ROD + H_2O	9	Pb(II): M(II) = 1:0,5
4	Pb(II) = $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$	10	Pb(II): M(II) = 1:1
5	M(II) = $0,23 \text{ mmol L}^{-1}$	11	Pb(II): M(II) = 1:5
6	M(II) = $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$	12	Pb(II): M(II) = 1:10

M(II) corresponde a Cd(II) ou Ba(II) ou Sr(II); Pb(II): M(II) indica a proporção da mistura entre analito e interferente.

Os resultados de concentração de Pb(II) na ausência e presença de cada um dos interferentes estudados foram comparados estatisticamente pelo teste *t student* a 95 e 99% de confiança.

Capítulo 4: Resultados e discussão

4.1. Condições de reação de Pb(II) com rodizonato e suporte reacional

4.1.1. Preparo da solução de rodizonato e formação do complexo de Pb(II)

Preparo da solução de rodizonato

Na literatura há relatos envolvendo reações de oxi-redução do ácido rodizônico a ácido crocônico tanto em meio fortemente ácido (GELORMINI e ARTZ, 1930) quanto em meio alcalino em presença de oxigênio e luz ultravioleta (IRACI e BACK, 1988; ZHAO e BACK, 1991). Um esquema da sequência de oxidação a partir do ácido rodizônico está representado na Figura 4.

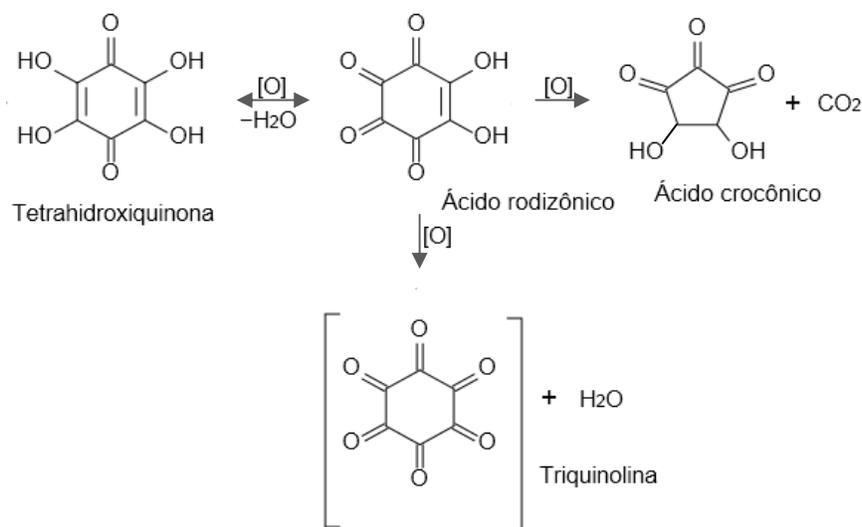


Figura 4. Esquema da sequência de oxidação do ácido rodizônico a ácido crocônico. Adaptado de GELORMINI e ARTZ, 1930.

Durante o monitoramento da solução aquosa de ROD $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, observou-se uma queda na absorvância entre 480 e 485 nm, indicando degradação do rodizonato, com geração de triquinolina, absorvância crescente em 280 a 285 nm (CHALMERS e TELLING, 1967), conforme pode ser observado na Figura 5A. A absorvância medida em 480 nm apresentou uma redução de sinal de 92% após intervalo de 2 horas (Figura 5B). CHALMERS e TELLING, 1967,

observaram que a decomposição de solução $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de ROD em água destilada foi completa em 36 horas, mas a produção de ácido crocônico, sinal em 365 nm , não foi completa até ter decorrido sete dias, o que pode explicar a ausência de sinal crescente neste comprimento de onda.

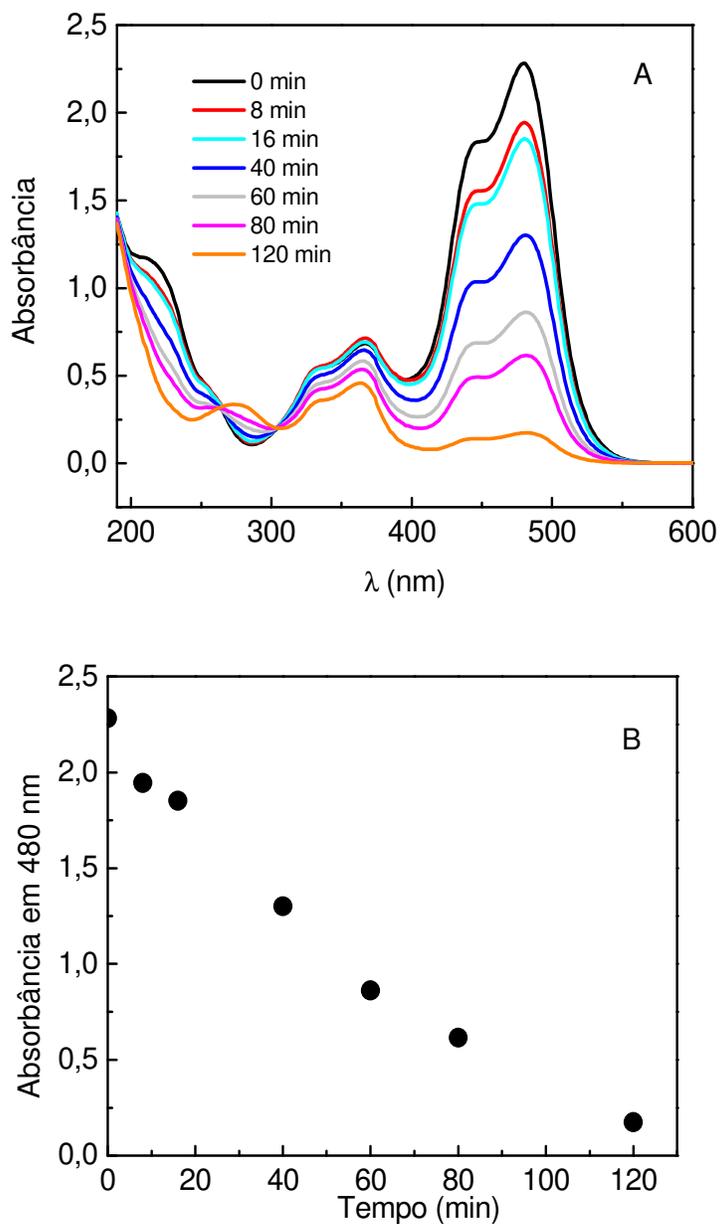


Figura 5. (A) Espectros eletrônicos da solução de ROD em água, obtidos no intervalo de 120 minutos. (B) Decaimento da absorbância em 480 nm dessa solução de ROD no referido intervalo.

Nas soluções de ROD $0,63 \text{ mmol L}^{-1}$ tamponadas, houve 49 % de decaimento em 45 h no tampão citrato e 51 % em 28 h no tampão tartarato (Figura 6). Isto indicou que a preparação da solução de ROD tamponada favorece sua estabilidade, análogo às observações de BARTSCH *et al.* (1996), que relataram que soluções de rodizonato, $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, são mais estáveis em meio ácido, $\text{pH} < 3,0$ e a taxa de decomposição da mesma é maior quando preparada em água (decomposição em 1 hora) do que quando preparado diretamente em tampão tartarato, $\text{pH} = 2,8$ (decomposição em 10 horas). Os autores também apontaram degradação mais lenta de soluções concentradas, como pode ser visto nos resultados encontrados.

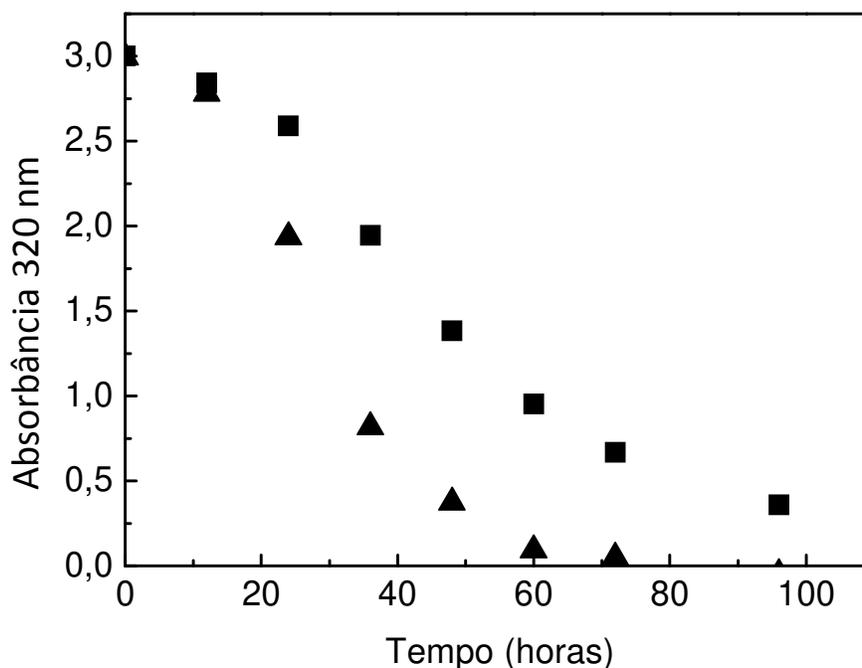


Figura 6. Monitoramento, durante 96 horas, do decaimento da absorbância da solução de ROD em tampão citrato (■) e tampão tartarato (▲) em 318 e 322 nm, respectivamente.

Pelo menos dois fatores podem afetar a estabilidade do rodizonato: pH e presença dos ânions citrato e tartarato. Embora não tenha sido feita avaliação sistemática da influência do pH, os resultados sugerem que ao se preparar a solução de rodizonato em tampão, a presença de H^+ no meio favorece a protonação dos íons rodizonato, podendo coexistir a forma de ácido rodizônico ou

tetrahidroxiquinona, o que retarda o processo de oxidação para formação de triquinolina (Figura 4, página 41). Quanto maior o número de grupos carboxílicos nos ânions (citrato e tartarato), maior seria a capacidade de liberar H^+ para o meio, o que explicaria a solução de rodizonato ser menos degradada em tampão citrato (triácido) que em tartarato (diácido).

Formação do complexo PbROD

Durante a avaliação da estabilidade do complexo PbROD formado em papel (Figura 7), observou-se que a coloração avermelhada de PbROD manteve-se estável durante 192 horas de monitoramento.

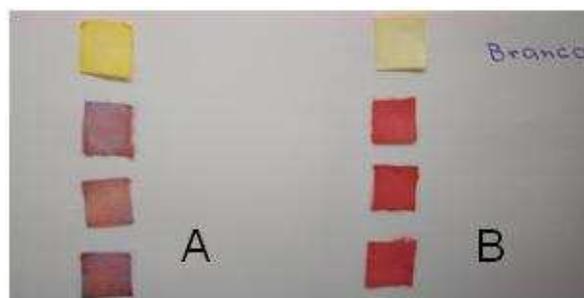


Figura 7. Foto dos papéis contendo PbROD formado a partir de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ e Pb(II) $4,84 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de citrato (A) e tartarato (B).

A reflectância máxima medida para o complexo formado em tampão citrato foi 0,250 em 538 nm e para o tartarato foi 0,470 em 543 nm (Figura 8). A formação heterogênea de PbROD na superfície do papel, associada à pequena área de leitura do acessório utilizado, círculo de 6 mm de diâmetro, (Figura 9) resultaram em medidas de reflectância com desvios-padrão elevados.

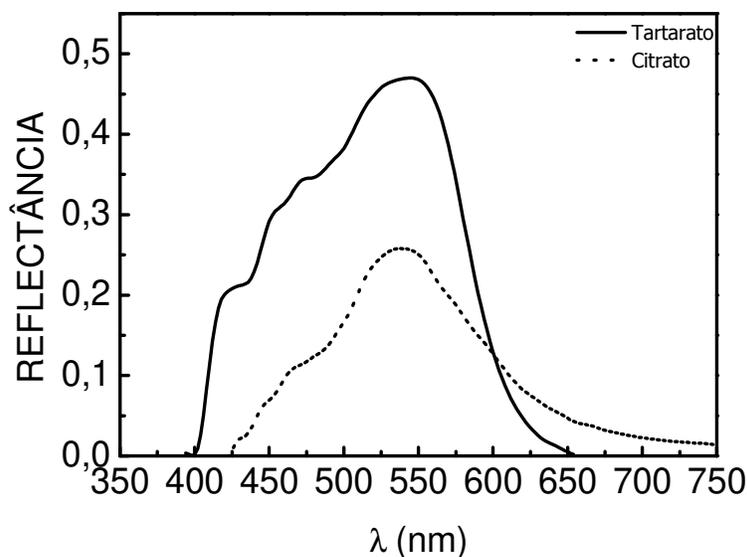


Figura 8. Espectro de reflectância do complexo PbROD formado a partir de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ e Pb(II) $4,84 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de citrato e tartarato.

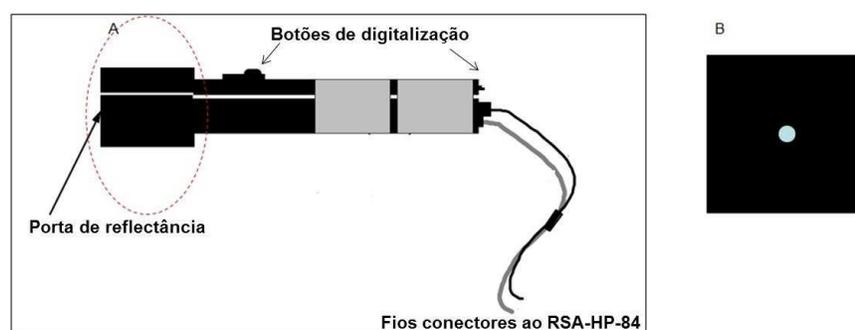


Figura 9. (A) Representação esquemática do acessório de reflectância Labsphere RSA-HP-84. (B) Representação frontal da área selecionada em A; o círculo central é o orifício com diâmetro de 6 mm por onde incide a luz para as medidas de reflectância.

Nos testes de detecção visual de Pb(II) dos produtos apresentados na Figura 10, considerou-se como resultado positivo a visualização da cor característica do complexo em pelo menos uma das replicatas de cada concentração avaliada. Os voluntários relataram dificuldades para distinção visual das amostras de PbROD em tampão citrato, devido a coloração heterogênea, o que não aconteceu nas amostras com tampão tartarato. Isto se deve,

provavelmente, à presença dos ânions citrato que podem competir por íons Pb(II) e desfavorecer a formação do complexo PbROD.

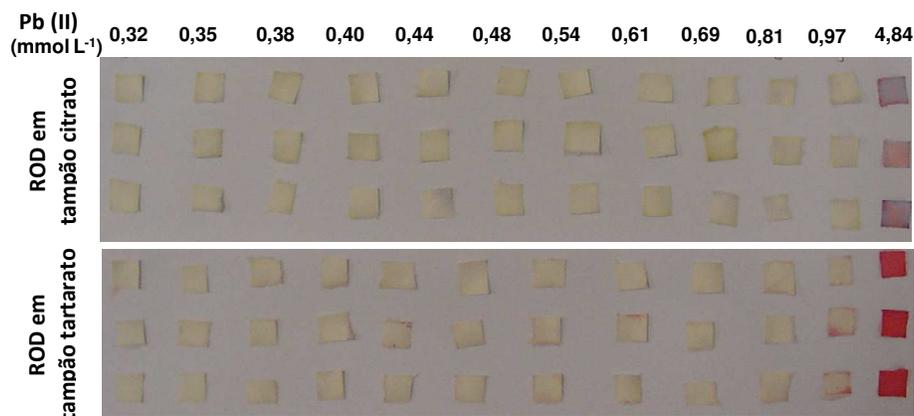


Figura 10. Testes para a detecção visual PbROD, formado a partir de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão de citrato e tartarato em diferentes concentrações de Pb(II).

Os voluntários observaram a presença de PbROD a partir de 0,69 mmol L⁻¹ de Pb(II) em tampão citrato e de 0,35 mmol L⁻¹ de Pb(II) em tampão tartarato. Tais resultados apontaram perda na detectabilidade da análise quando se preparou a solução reagente em tampão citrato, confrontando com os de PREER e MURSCISON (1986), que recomendaram o uso de tampão citrato em substituição ao tampão tartarato. Tais resultados reforçam a proposta de BARTSCH *et. al* (1996) que sugeriram que a interação de íons tartarato favorece a formação de PbROD.

Estes testes serviram para indicar as condições adequadas para formação de PbROD. Portanto, a partir deste ponto, passou-se a utilizar solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹, preparada em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, com pH entre 2,78 e 2,80.

4.1.2. Investigação do suporte para reação

No estudo de suportes para a reação, consideravam-se dois requisitos: 1) a mancha colorida do complexo deveria situar-se de forma homogênea numa única região e 2) as diferentes concentrações de Pb(II) deveriam ser possíveis de serem identificadas visualmente por diferenças na intensidade de cor da mancha.

O espalhamento lateral dos fluidos em papel é mais rápido do que o vertical devido ao direcionamento das fibras tenderem a ser mais horizontal do que vertical, o que explica o insucesso de se utilizar os papéis de filtros com gramaturas de 80, 180 e 250 g m⁻² como suportes para reação.

Em papéis de filtro com as gramaturas de 80 e 180 g m⁻², a espessura do papel não permitiu absorção completa das soluções aplicadas. Além disso, as manchas de complexo não apresentaram uniformidade (Figura 11), o que dificultou a visualização das cores, principalmente para concentrações de Pb(II) abaixo de 0,40 mmol L⁻¹. A dispersão da mancha ocorreu mesmo quando se reduziu o volume de cada reagente de 50 para 15 µL.

Papel de filtro com 250 g m⁻² absorveu completamente os reagentes aplicados (50 µL) e a maior gramatura do papel diminuiu também o fluxo lateral, tornando a mancha mais uniforme e centralizada (Figura 12). Porém, o aparecimento da cor só ocorreu após 30 minutos, aproximadamente. Visando acelerar o processo de aparecimento da cor, optou-se por secar o papel com fluxo de ar quente (secador de cabelos), no entanto, observou-se uma diminuição na detectabilidade, provavelmente devido à degradação do rodizonato pelo aquecimento (CHALMERS e TELLING, 1967; IRACI e BACK, 1988).

A utilização de pastilhas de microcelulose como suporte reacional, também não foi adequada, pois embora houvesse uma completa absorção dos reagentes, foi difícil visualizar diferenças na intensidade de cor e surgiram trincas após a adição dos reagentes.



Figura 11. Formação de PbROD em papéis com gramatura 180 e 250 g m⁻² (papéis da esquerda e direita, respectivamente). Concentração de Pb(II) = 2,42 mmol L⁻¹.

No μ PAD, as restrições impostas pelas barreiras hidrofóbicas mostraram-se adequadas para a proposta do trabalho, impedindo a propagação lateral dos fluídos e, conseqüentemente, proporcionando manchas mais uniformes em uma área pré-definida, o que facilitou a distinção visual das diferentes intensidades de coloração (Figura 12).

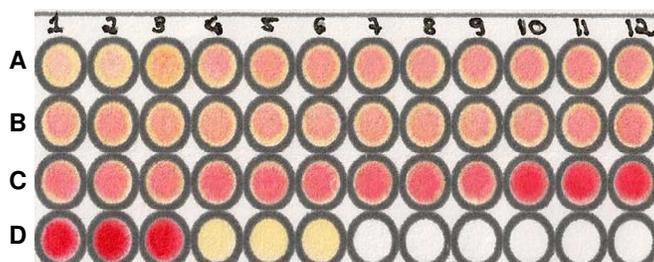


Figura 12. Imagem do μ PAD contendo PbROD formado com ROD (9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato) e diferentes concentrações de Pb(II), com a distribuição nas zonas de reação conforme apresentada na Figura 2 (página 28).

Formação de PbROD com procedimentos de FEIGL e ANGER (1972)

Ao se tentar reproduzir o teste descrito por FEIGL e ANGER (1972), obteve-se o complexo de coloração violeta, formado em meio neutro e, após a adição de tampão, não ocorreu outra mudança que indicasse a formação do complexo PbROD de coloração avermelhada. Tal situação persistiu mesmo com modificações no momento de adição do tampão tartarato (imediatamente após

adição de rodizonato, adição após a secagem do papel já contendo o analito e o agente complexante e também sem adicionar o tampão). Na Figura 13, pode ser observada a distribuição do complexo violeta PbROD formado em μ PAD utilizando-se diferentes concentrações de Pb(II) e seguindo-se o procedimento de complexação descrito por FEIGL E ANGER (1972).

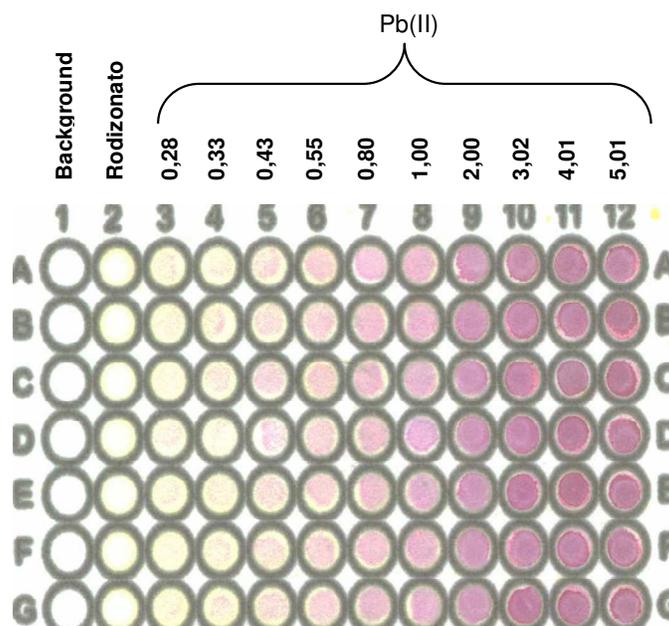


Figura 13. Distribuição do complexo PbROD no μ PAD formado a partir de diferentes concentrações de Pb(II), em mmol L^{-1} , seguindo o procedimento descrito por FEIGL E ANGER (1972).

Na descrição do método, os autores (FEIGL E ANGER, 1972) não mencionam os ânions da solução de Pb(II). Nos trabalhos de FEIGL e BRAILE (1944a, 1944b), os autores recomendaram a formação do complexo vermelho de PbROD para quantificação de Pb(II). Para isso, indicam a separação de Pb(II) como sulfato, seguindo-se dissolução em solução de acetato de amônio acidulada com ácido acético e só então complexação com ROD.

Com essa indicação, passou-se a questionar a formação de um complexo diferente devido à presença de íons nitrato, proveniente do sal utilizado no preparo das soluções de Pb(II). Íons nitrato, eventualmente, poderiam impedir o rearranjo na estrutura do complexo, após a adição de tampão tartarato, impossibilitando a

formação de PbROD. Pode-se considerar que, neste caso, os íons tartarato agiriam como um complexante previamente à reação com rodizonato, impedindo a formação de outros compostos com Pb(II) a partir dos demais íons presentes em solução.

BARTSCH *et. al* (1996) indicaram outra evidência da influência de ânions na formação de PbROD. Eles apontaram que ao aspergir HCl 5% v/v ao papel contendo o complexo avermelhado de PbROD, a coloração muda para azul-violeta. Este procedimento é utilizado como teste comprobatório para presença de Pb(II) em análises forenses.

Ajustes de condições para obtenção de PbROD

Considerando os resultados já descritos, optou-se por modificar o preparo da solução reagente (preparando o ROD diretamente na solução tampão de tartarato) e mudar a ordem de adição dos reagentes. Seguindo-se a ordem de adição de reagentes descrita por FEIGL e ANGER (1972), observou-se que o complexo formava-se no limite do círculo, o que dificultava a visualização, sendo possível a detecção visual para concentração de Pb(II) inferiores a $0,69 \text{ mmol L}^{-1}$. Iniciando-se a sequência de adição de reagentes com ROD, seguido de secagem e posterior adição de Pb(II), observou-se que a distribuição do complexo sobre o papel foi mais centralizada, com visualização do complexo a partir da concentração de Pb(II) = $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, conforme pode se observado na Figura 14.

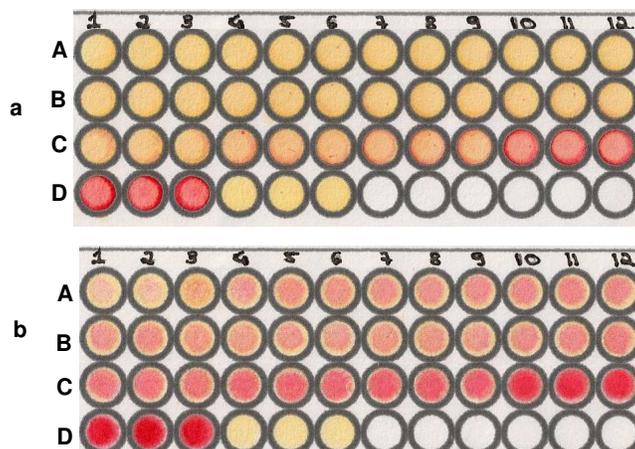


Figura 14. Imagens dos μ PADs contendo PbROD formado com ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato) e diferentes concentrações de Pb(II), com a distribuição nas zonas de reação conforme apresentada na Figura 2 (página 28). (a) Sequência: adição de Pb(II) seguido de secagem e posterior adição de ROD. (b) Sequência: adição de ROD seguido de secagem e posterior adição de Pb(II).

Estes resultados apontaram que provavelmente houvesse ocorrência de interações diferentes entre o papel do μ PAD e cada um dos reagentes utilizados na formação de PbROD.

Microscopia eletrônica de varredura do complexo PbROD no μ PAD

Como foi demonstrado no item anterior, a ordem de adição dos reagentes afeta a formação do complexo e ao se adicionar o analito antes do agente complexante, observa-se uma menor detectabilidade do complexo. Na tentativa de buscar uma explicação para este fato observou-se as singularidades das imagens da superfície do μ PAD obtidas pela MEV (Figuras 15, 16 e 18) das misturas reacionais apresentadas na Tabela 1 (página 29). Na Figura 15, pode-se observar que a adição de solventes ao μ PAD promove um distanciamento entre as fibras do papel. Embora isto possa ser observado independentemente da natureza do solvente adicionado, para a adição de tampão tartarato este distanciamento é menos pronunciado (Figura 15D).

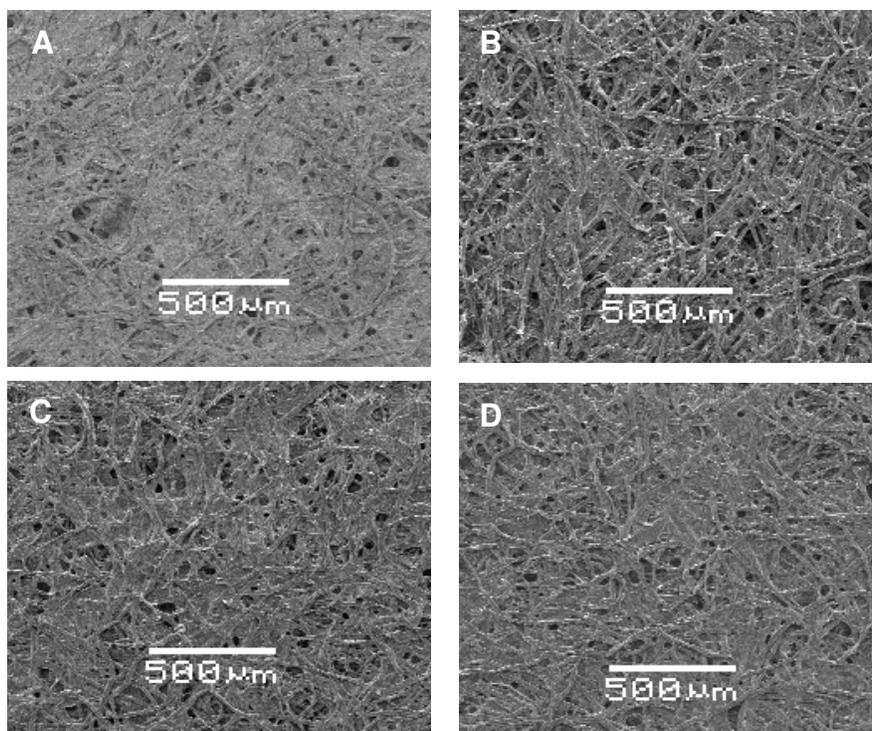


Figura 15. MEV da superfície do μ PAD com aumento de 30 vezes. **A** - Papel cromatográfico; **B** - Papel cromatográfico + 10 μ L de H_2O ; **C** - Papel cromatográfico+ 10 μ L de solução de HCl pH = 2,78; **D** - Papel cromatográfico + 10 μ L de tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78.

Nas Figuras 16A e 16B estão apresentadas as superfícies do μ PAD contendo os reagentes, adicionados individualmente, ROD (Figura 16A) e Pb(II) 0,50 mmol L^{-1} (Figura 16B). Nas Figuras 16C e 16D estão apresentadas as superfícies do μ PAD contendo PbROD. O produto visualizado na Figura 16C foi obtido a partir da adição inicial de ROD, seguido de secagem para posterior adição de Pb(II) 0,50 mmol L^{-1} , enquanto que o produto representado na Figura 16D foi obtido invertendo-se a ordem de adição dos reagentes. Na Figura 16D, observou-se a formação de micro cristais nas fibras do papel, o que deve corresponder, provavelmente, a cristais de ROD que não reagiram com Pb(II) ou a sítios de aglomeração de ROD devido a reação incompleta com o analito. Como não foi observada a formação de cristais nas Figuras 16A e 16B, que correspondem à adição individual dos reagentes, descarta-se a hipótese dos cristais observados serem originários de ROD ou Pb(II).

Superfícies de papel saturadas com água compreendem um meio ligeiramente aniônico, formado por celulose amorfa inchada e hemicelulose. Sendo assim, partículas coloidais de carga negativa possuem pouca tendência de adsorção sobre superfícies molhadas de lignocelulose, enquanto espécies positivamente carregadas têm uma forte tendência para adsorverem em fibras de celulose úmidas (PELTON, 2009). Assim, a adição de ROD previamente à adição de Pb(II) deve promover interações do tipo ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos do papel e os oxigênios de ROD. Este tipo de interação é fraca o suficiente para ser rompida, ou parcialmente rompida, com adição de Pb(II) para formação de PbROD.

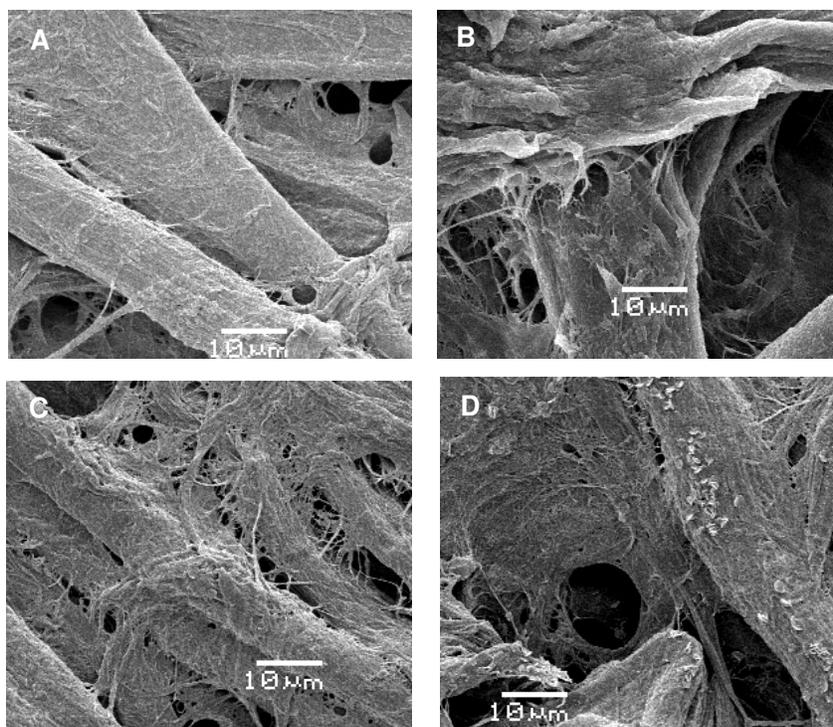


Figura 16. MEV da superfície do μ PAD com aumento de 1000 vezes. **A** - Papel cromatográfico + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78.; **B** - Papel cromatográfico + 10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L^{-1} ; **C** - Papel cromatográfico + PbROD (10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L^{-1}); **D** - Papel cromatográfico + PbROD (10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L^{-1} , secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78).

Por outro lado, a adição de Pb(II) diretamente ao papel pode promover forte adsorção nas fibras de celulose, o que deve diminuir a disponibilidade do analito para reação com ROD e, por isso, prejudicar a formação de PbROD. Após se ligar aos grupos hidroxílicos do papel úmido, Pb(II) não fica completamente disponível para reagir com ROD, podendo ligar-se parcialmente a grupos hidroxílicos do papel e parcialmente ao oxigênio do ROD. A proposta desta reação incompleta está representada genericamente na Figura 17.

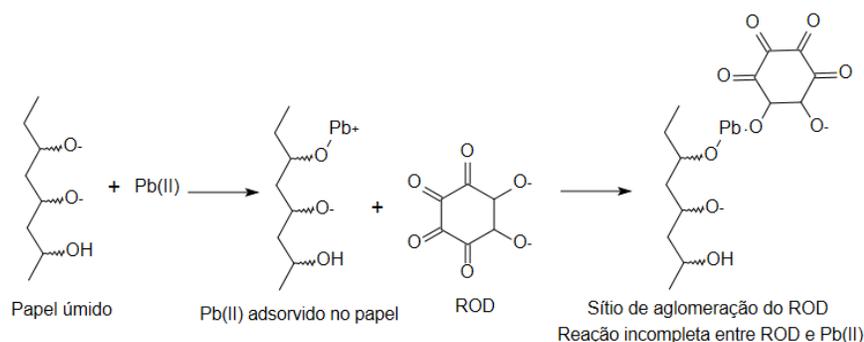


Figura 17. Representação genérica e simplificada da proposta da reação incompleta entre Pb(II) e ROD.

Com a saturação das fibras de celulose por Pb(II) o excesso de analito, que está totalmente disponível para reagir com ROD, migra, via fluxo lateral, para as bordas da barreira hidrofóbica da área de reação, o que justifica a formação de PbROD preferencialmente nesta região (Figura 14A, página 51).

Na Figura 18 estão representadas as imagens do μ PAD contendo os aglomerados de cristais de ROD parcialmente reagidos com Pb(II). Formados a partir da mistura de 10 μ L de solução de Pb(II) 0,50 mmol L⁻¹, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH 2,78.

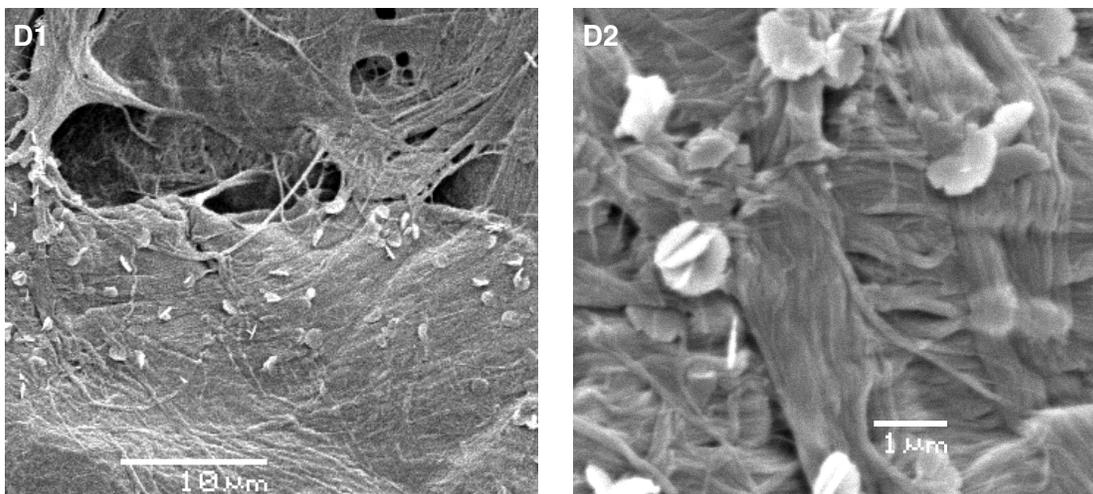


Figura 18. MEV da superfície do μ PAD contendo papel cromatográfico + (10 μ L de Pb(II) 0,50 mmol L⁻¹, secagem em fluxo de ar sem aquecimento + 10 μ L de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78). **D1:** aumento de 2000 vezes; **D2:** aumento de 10000 vezes.

Estes resultados, levaram a opção pelo uso de μ PAD como suporte reacional, adotando-se como procedimento para formação de PbROD a adição inicial de ROD, seguindo-se de secagem em fluxo de ar sem aquecimento, adição da solução de Pb(II) e nova etapa de secagem, estudada em duas condições.

Após estabelecidas as condições para reação entre Pb(II) e ROD, prosseguiu-se o estudo para a quantificação do PbROD utilizando-se análise digital de imagens.

4.2. Análise digital de imagens

4.2.1. Avaliação dos parâmetros do programa DIGIMAGE

A sequência de resultados apresentados a seguir refere-se aos procedimentos experimentais que foram conduzidos buscando as melhores condições para quantificação do analito.

As componentes B e G apresentaram maior variação de A_x em função do aumento da concentração de Pb(II) conforme pode ser observado na Figura 19.

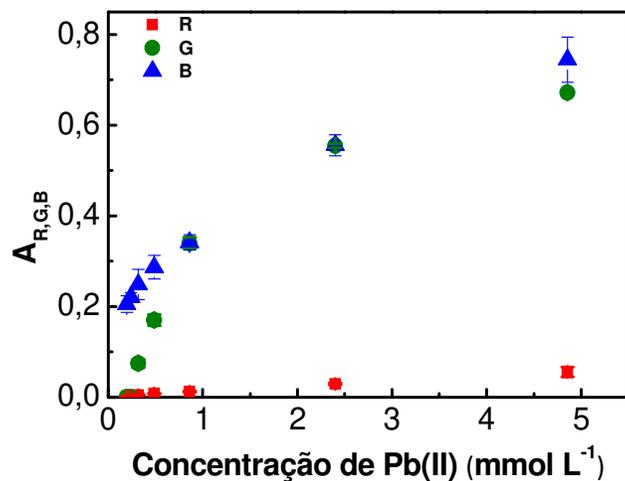


Figura 19. Variação de A_x a partir das componentes (■) R, (●) G e (▲) B para PbROD obtido a partir de diferentes concentrações de Pb(II) na condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer.

Foi observada variação no perfil dos resultados de A_x da componente B, enquanto que os resultados da componente G mantiveram a mesma tendência de variação, como pode ser observado pela Figura 20. Isso apontou que a resposta de A_x da componente G parece ser mais robusta, o que justificaria sua escolha para aplicação em propostas de quantificação.

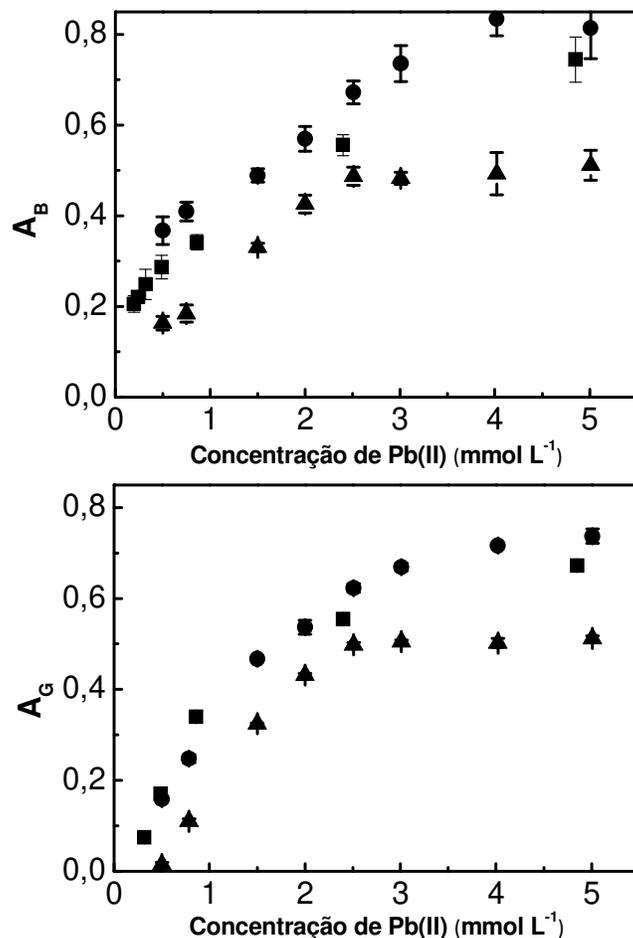


Figura 20. Variação de absorvância calculada (A_B e A_G) em função do aumento da concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μ l de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH 2,78) secagem sob fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de mesmo procedimento de secagem em três repetições, (■) Repetição 1, (●) Repetição 2 e (▲) Repetição 3, com intervalos de 240 dias. (A) A_B a partir da componente B e (B) A_G a partir da componente G. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.

Escolha do branco

Na Figura 21, estão apresentados os resultados de A_G a partir do uso do papel com e sem impregnação do ROD como branco.

Embora os resultados médios de absorvância sejam semelhantes, os desvios são maiores utilizando-se papel impregnado com rodizonato como branco. Isso fica destacado apenas na condição de secagem natural, que é menos uniforme e pode aumentar a distribuição irregular dos reagentes e do produto

formado sobre o papel. Portanto, a utilização do suporte como branco foi mais adequada para ambas as situações de secagem.

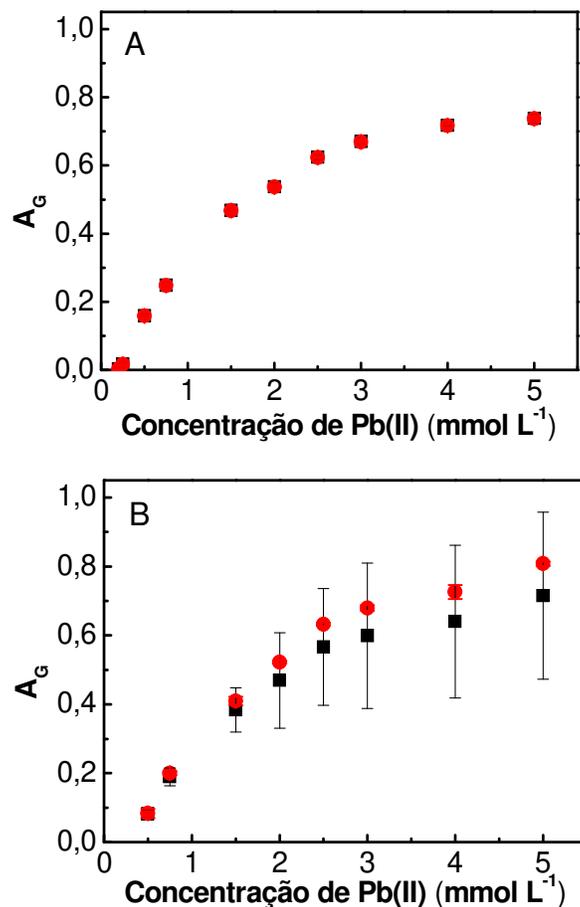


Figura 21. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de $10 \mu\text{l}$ de solução de ROD $9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ (em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,78) seca sob fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de secagem usando (■) papel e (●) papel com rodizonato como brancos (0% de absorvância). (A) Condição de secagem em fluxo de ar sem aquecimento. (B) Condição de secagem natural. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.

Do ponto de vista prático, o processo de secagem do papel sob fluxo de ar sem aquecer é mais vantajoso, pois, além de aumentar a velocidade analítica proporciona uma distribuição mais homogênea do complexo sobre o papel, o que diminui a dispersão dos resultados. Por outro lado, a secagem natural por ser mais simples, pode ser mais adequada em uma situação em campo. Além disso, o processo mais lento aumenta o período de interação entre os reagentes, o que

pode ser vantajoso para baixas concentrações de analito. Mais detalhes desta discussão estão apresentados na segunda parte desta tese.

Área delimitada para varredura dos dados

SCHIMIDT (1997) avaliou a precisão das medidas de intensidade de cor com o DIGIMAGE, aplicando corante violeta ácido em cromatografia em papel. Ele concluiu que a precisão diminui com o aumento da área de seleção, devido à heterogeneidade do papel cromatográfico, que leva a um espalhamento de luz diferente para cada aquisição de uma nova imagem. O mesmo não foi observado na comparação dos resultados obtidos pela seleção de áreas com raios de 12 e 24 pixels nas zonas de reação, aplicando-se o teste F ($p < 0,05$), conforme indicam os resultados da Tabela 6. Provavelmente, a restrição física imposta pelas barreiras de cera que delimitam uma zona de reação menor no μ PAD representa um diferencial favorável em comparação com o resultado da cromatografia em papel.

Tabela 6. Médias de A_G de 49 medidas de cada concentração para raios de 12 e 24 pixels das áreas selecionadas nas zonas de reação.

Concentração de Pb(II) (mmol/L)	Raio de 12 pixels			Raio de 24 pixels			Teste F	
	A_G	σ	σ_r (%)	A_G	σ	σ_r (%)	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
0,15	0,16	0,03	16	0,17	0,03	17	0,73	4,28
0,20	0,17	0,03	19	0,18	0,03	18	1,07	
0,24	0,19	0,03	16	0,20	0,03	15	1,03	
0,32	0,23	0,04	16	0,24	0,04	18	0,71	
0,49	0,28	0,04	14	0,27	0,03	12	1,53	
0,86	0,35	0,03	8,7	0,36	0,08	22	0,14	
2,40	0,59	0,05	8,0	0,56	0,05	9,3	0,83	
4,85	0,8	0,1	14	0,74	0,09	12	1,53	

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo.

4.2.2. Avaliação dos parâmetros do *scanner*

A Figura 23 corresponde às imagens obtidas em *scanner* no dia da realização do ensaio. A distribuição das concentrações no μ PAD está de acordo com a descrição da Figura 3 (página 33) e os parâmetros para digitalização das imagens estão na Tabela 3 (página 32).

Nas condições VIII e IX descritas da Tabela 3, não foi possível obter imagens visíveis, o que comprometeu o estudo do conjunto do planejamento fatorial e a avaliação do efeito dos fatores nas medidas, por isso o planejamento fatorial foi abandonado. Optou-se, então pela avaliação individual das imagens obtidas, apresentadas na Figura 22, considerando-se como critérios para escolha da condição adequada resultados com desvios relativos menores (σ_r) que 15 % e maiores valores de A_G .

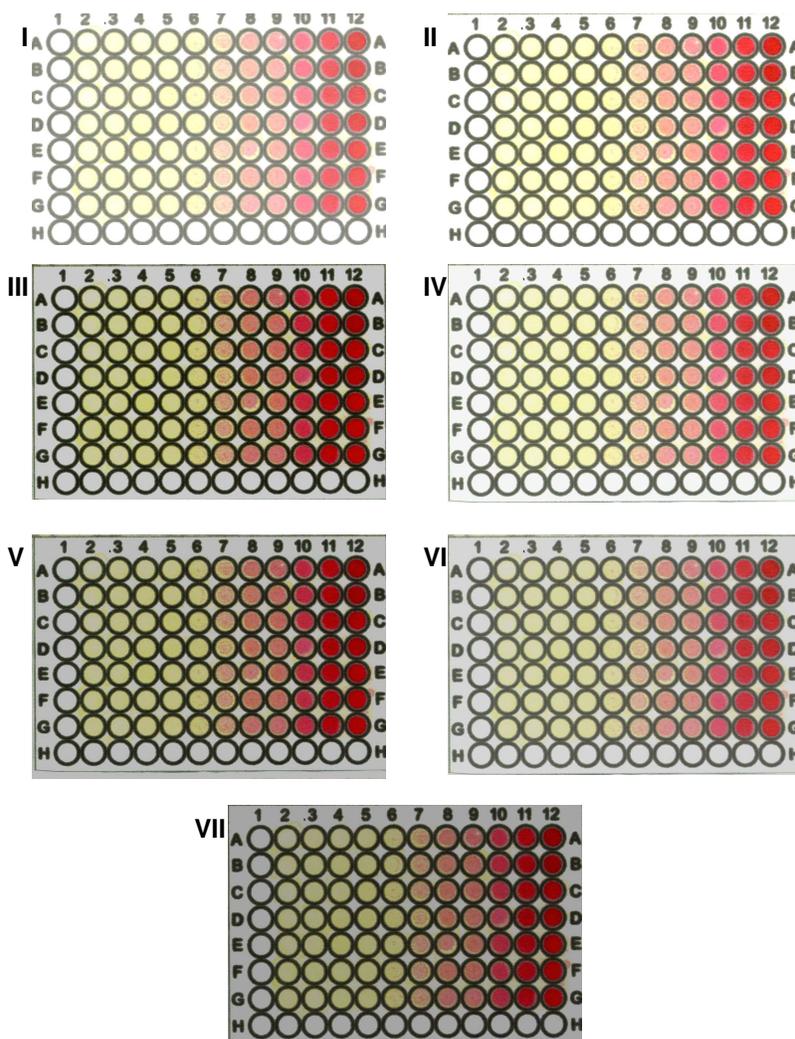


Figura 22. Imagens do μ PAD obtidas no dia da reação. Os números em algarismos romanos representam a condição de obtenção da imagem descritos na Tabela 3 (página 32). A distribuição das concentrações de Pb(II) no μ PAD seguem a descrição da Figura 3 (página 33).

Na Figura 23, pode-se observar que mantendo o brilho constante (Condições IV e VI) e modificando o contraste não há variação em A_G , enquanto que mantendo o contraste constante (Condições IV e V) e variando o brilho, A_G aumenta quando há redução no brilho (Condição V). Isto pode ser explicado devido ao brilho de cada pixel, assim como a cor, ser formado por um valor compreendido entre 0 e 255, quanto maior este valor mais claro o pixel aparecerá e quanto menor mais escuro (ANDREWS, 2002). Assim, ao se reduzir o brilho a imagem torna-se mais escura com os valores numéricos aproximando-se de 0 e de acordo com a Equação 1, valores numéricos menores, no termo I_x , resultam em maior resposta de A_G , o que justifica maiores valores de A_G para a condição V. Os resultados obtidos nas condições I e VI apresentaram $\sigma_r < 15\%$, sendo que os valores de A_G na condição VI foram maiores que aqueles obtidos na condição I, conforme pode ser observado na Figura 23. Os valores de σ_r na condição I foram 0,4 a 2,2% e 0,4 a 3,5% na condição VI, com 7 replicatas.

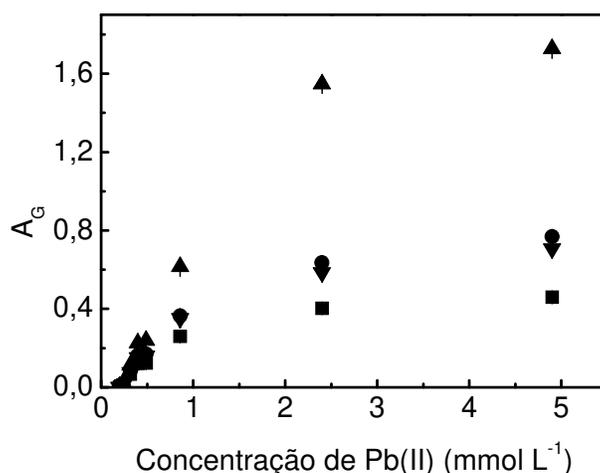


Figura 23. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μl de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de mesmo procedimento de secagem, adquiridas nas condições ▲ (Condição V: 25% de contraste e -25% de brilho), ● (Condição IV: 25% de contraste e -50% de brilho), ▼ (Condição VI: 0% de contraste e -25% de brilho) e ■ (Condição I: 0% de contraste e 0% de brilho). As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.

4.2.3. Avaliação da influência do envelhecimento do papel reagente e do complexo na absorvância calculada

Na avaliação da influência do envelhecimento do papel reagente na resposta da absorvância calculada, observou-se que entre os μ PADs armazenados por 24 horas (Tabela 4, página 34), apenas aqueles mantidos sob refrigeração e proteção contra a incidência de luz desenvolveram cor ao se adicionar Pb(II).

Solução de ROD é decomposta termicamente e em condições de luminosidade (IRACI e BACK, 1988; ZHAO e BACK, 1991) e constatou-se que a decomposição de ROD é acelerada, especialmente se o sal encontra-se distribuído nas fibras do papel, como relatado previamente por FIELG e SUTER (1942). Comparando os μ PADs utilizados imediatamente após a aplicação do reagente e estocado por 24 horas sob refrigeração e protegido da luz (Figura 24), observou-se a presença visual de PbROD a partir das concentrações de Pb(II) iguais a 0,28 e 0,43 mmol L⁻¹, respectivamente.

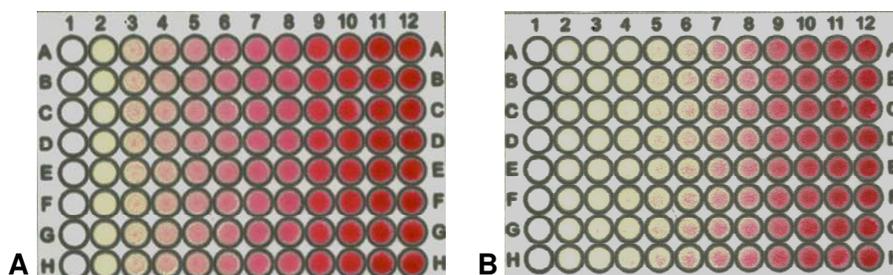


Figura 24. Comparação das imagens do μ PAD após diferentes tempos de envelhecimento do papel reagente. Ensaio para detecção de Pb(II) realizado na condição de secagem natural. A – Uso do μ PAD imediatamente após aplicação do reagente. B – Uso do μ PAD 24 horas após aplicação do reagente mantendo armazenamento sob refrigeração e protegido contra incidência de luz.

A Figura 25 corresponde às imagens obtidas em *scanner* do μ PAD após diferentes tempos de digitalização.

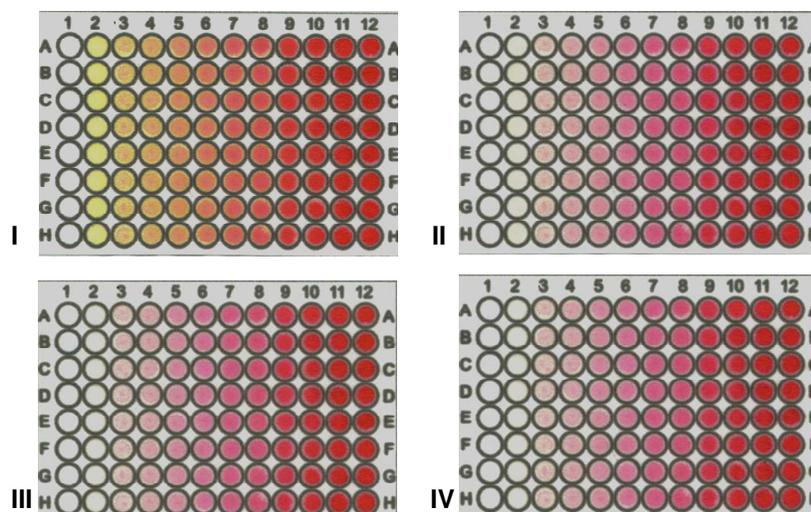


Figura 25. Imagens do μ PAD obtidas em diferentes tempos de digitalização para condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer. I – imediatamente após a realização do ensaio para determinação de Pb(II), II – 24 horas após o ensaio, III – 72 horas após o ensaio e IV – 96 horas após o ensaio.

Observou-se que não houve diferença nos resultados de A_G quando as imagens do PbROD, em μ PAD, foram obtidas imediatamente ou até em 96 horas após a secagem do papel, conforme ilustrado na Figura 26

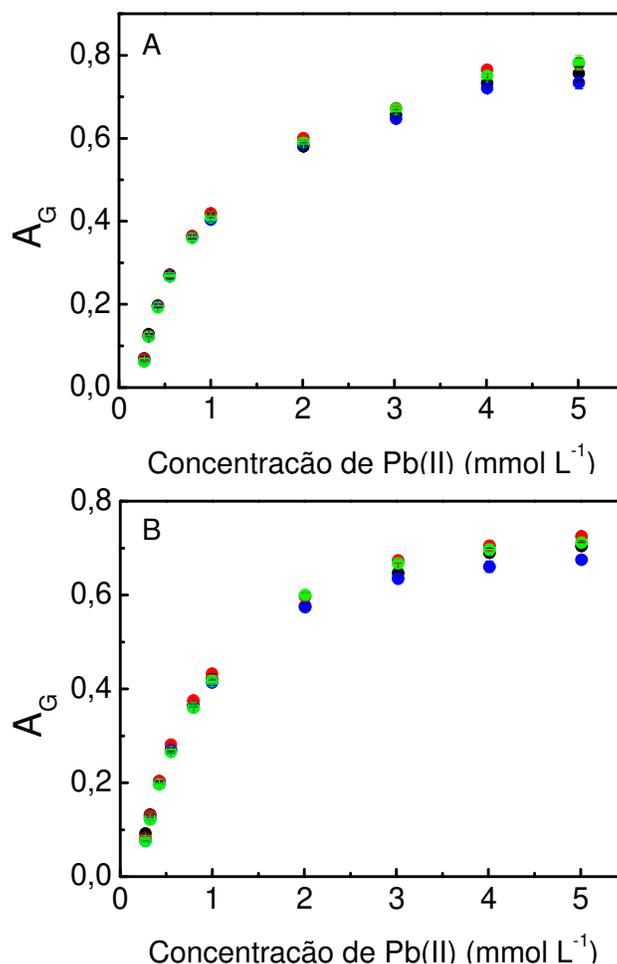


Figura 26. Variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μL de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de solução de Pb(II), seguido de secagem, com obtenção das imagens: (●) imediatamente após a secagem, (●) 24 horas após a secagem, (●) 72 horas após a secagem e (●) 96 horas após a secagem. (A) Condição de secagem natural. (B) Condição de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.

Estes resultados indicaram ser adequado digitalizar imagem em *scanner* com resolução de 200 dpi, 0 % de contraste e -25% de brilho, até 96 horas após a reação; com seleção de 12 pixels para leitura no DIGIMAGE; utilizando valores da componente G para cálculo de absorbância, considerando a intensidade de cor do suporte (papel) como branco (0% de absorbância).

4.3. Validação laboratorial e algumas figuras de mérito

Precisão

Não foi observado a formação da coloração vermelha do complexo PbROD para concentrações de Pb(II) reagente inferiores a $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, por isso foram utilizadas soluções de Pb(II) com concentração acima de $0,24 \text{ mmol L}^{-1}$ para a construção da curva de calibração. A curva de calibração usada na avaliação da precisão abrangeu as concentrações de Pb(II) em toda faixa de trabalho ($0,24$ a $4,85 \text{ mmol L}^{-1}$) tendo, portanto, um ajuste exponencial.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da A_G e os desvios-padrão de cada concentração da curva de calibração dos μ PADs preparados em um mesmo dia, bem como as equações da curva utilizadas para cálculo da concentração de uma amostra externa. Na Tabela 8, estão apresentados os resultados para os dispositivos preparados em três dias com um intervalo de dois dias entre cada ensaio.

Tabela 7. Dados das curvas de calibração a partir das medidas de A_G obtidas das imagens de três μ PADs preparados em um mesmo dia.

Curva de calibração									
$C_{\text{Pb(II)}}(\text{mmol L}^{-1})$	Dispositivo 1			Dispositivo 2			Dispositivo 3		
	A_G	σ	σ_r (%)	A_G	σ	σ_r (%)	A_G	σ	σ_r (%)
0,24	0,06	0,005	8	0,01	0,001	9	0,01	0,001	10
0,32	0,13	0,01	8	0,09	0,003	3	0,11	0,01	6
0,41	0,21	0,003	2	0,16	0,003	2	0,17	0,002	1
0,86	0,43	0,003	1	0,37	0,01	3	0,40	0,01	2
2,40	0,61	0,004	1	0,59	0,01	2	0,59	0,01	1
4,85	0,72	0,01	1	0,69	0,02	3	0,68	0,01	1
Equação da curva	$A_G = 0,63 - 0,92e^{-1,66C}$			$A_G = 0,65 - 0,93e^{-1,60C}$			$A_G = 0,67 - 0,86e^{-1,52C}$		
R^2	0,995			0,994			0,986		

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo; $n = 7$.

Uma solução de Pb(II) de $0,49 \text{ mmol L}^{-1}$ foi utilizada como amostra externa a A_G foi calculada de acordo com a Equação 1 e a concentração de Pb(II) calculada conforme as equações da curva apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 8. Dados das curvas de calibração a partir das medidas de A_G obtidas das imagens dos μ PADs preparados em três dias distintos.

Curva de calibração									
$C_{Pb(II)}$ (mmol L ⁻¹)	1º Dia			2º Dia			3º Dia		
	A_G	σ	σ_r (%)	A_G	σ	σ_r (%)	A_G	σ	σ_r (%)
0,24	0,02	0,001	5	0,02	0,003	18	0,01	0,001	10
0,32	0,09	0,002	3	0,10	0,01	9	0,11	0,01	6
0,41	0,14	0,01	4	0,18	0,004	2	0,17	0,002	1
0,86	0,34	0,01	4	0,37	0,003	1	0,40	0,01	2
2,40	0,55	0,02	3	0,55	0,004	1	0,59	0,01	1
4,85	0,64	0,01	2	0,65	0,004	1	0,68	0,01	1
Equação da curva	$A_G = 0,62 - 0,85e^{-1,43C}$			$A_G = 0,61 - 0,83e^{-1,45C}$			$A_G = 0,65 - 0,93e^{-1,60C}$		
R^2	0,993			0,994			0,986		

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo; $n = 7$.

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os resultados da concentração de Pb(II) da amostra externa e os desvios-padrão de cada dispositivo preparado em um mesmo dia e em três dias distintos, respectivamente. A precisão para a amostra externa foi $\sigma_r = 12\%$, com erro relativo = 10%, enquanto que a precisão intermediária foi $\sigma_r = 4\%$ e o erro relativo = 10%

Tabela 9. Dados da concentração de uma mostra externa calculada a partir das equações da curva da Tabela 7.

	$C_{calculadaPb(II)}$ (mmol L ⁻¹)	σ (n=7)	σ_r (%)
Dispositivo 1	0,51	0,007	1
Dispositivo 2	0,44	0,01	2
Dispositivo 3	0,38	0,01	2
$C_{calculada}$ média Pb(II) (mmol L ⁻¹)	0,44		
σ (n=21)	0,05		
σ_r (%)	12		
Erro relativo (%)	10		

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo.

Tabela 10. Dados da concentração de uma mostra externa calculada a partir das equações da curva da Tabela 8.

	$C_{\text{calculadaPb(II)}}(\text{mmol L}^{-1})$	$\sigma(n=7)$	σ_r (%)
Dispositivo 1 (1º Dia)	0,43	0,01	3
Dispositivo 2 (2º Dia)	0,46	0,003	1
Dispositivo 3 (3º Dia)	0,43	0,008	2
$C_{\text{calculadamédiaPb(II)}}(\text{mmol L}^{-1})$	0,44		
σ (n=21)	0,02		
σ_r (%)	4		
Erro relativo (%)	10		

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo.

Exatidão

Na avaliação da exatidão os resultados das concentrações encontrados pelo método de *spot test* foram comparados com os encontrados por ICP OES. A faixa de concentração para construção da curva de calibração em ICP OES atinge concentração máxima de $\text{Pb(II)} = 1,00 \text{ mmol L}^{-1}$, por isso optou-se por se preparar a curva e as amostras desconhecidas até o limite desta concentração.

A curva de calibração com ajuste linear está representada na Figura 27 assim como a equação da curva (Equação 4) que foi utilizada no cálculo da concentração de Pb(II) nas amostras desconhecidas.

$$A_G = -0,08 + 0,47 \times C_{\text{Pb}} \quad \text{Equação 4}$$

Embora, na faixa de concentração avaliada tenha sido possível encontrar bom ajuste linear ($R^2 = 0,979$), as curvas de calibração por reflectância (neste trabalho denominada como absorbância calculada para facilitar a compreensão da transformação dos dados de RGB) são tipicamente não lineares, devido à saturação da cor nas concentrações mais elevadas (CARRILHO *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2010), como pode ser observada na Figura 26 (página 64).

As concentrações de Pb(II) obtidas pelo método de *spot test* considerando-se o ajuste linear da curva de calibração foram comparadas com as obtidas por ICP OES. Os resultados indicados na Tabela 11 não têm diferença estatística (teste F, com 95 % de confiança), exceto a amostra B, que possui a menor concentração de Pb(II) . Tal resultado pode ser explicado pela falta de

homogeneidade do complexo em papel e, conseqüentemente, uma maior variância dos resultados.

Tabela 11. Médias de concentração de Pb(II) em mg L^{-1} , de amostras desconhecidas, obtidas por ICP OES e por *Spot test* a partir dos dados de A_G utilizados na equação da curva de calibração com ajuste linear (Figura 28)

Amostras	ICP OES			<i>Spot test</i>			Teste F		
	Pb(II)	σ (n=3)	σ_r (%)	Pb(II)	σ (n=8)	σ_r (%)	Erro (%)	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
A	79	0,3	0,4	84	1	1	-6	5,19	
B	66	0,3	0,4	52	1	3	22	21,63	
C	90	1,6	2	91	3	3	-1	3,22	19,35
D	110	1,8	2	110	1	1	0,5	0,10	
E	103	2,4	2	102	1	1	1,5	0,29	
F	156	0,5	0,3	170	2	1	-8	12,81	

σ = Desvio padrão; σ_r = Desvio-padrão relativo. *Concentração de Pb(II) em mg L^{-1} .

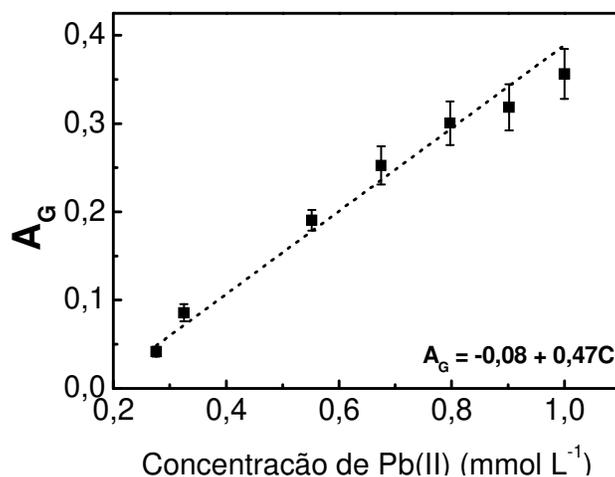


Figura 27. Curva de calibração com ajuste linear da variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μl de solução de ROD 9,96 mmol L^{-1} (em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de 10 μl de solução de Pb(II), seguido também de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.

Na Figura 28 está representado a correlação e o ajuste linear (linha tracejada) entre os resultados da concentração de Pb(II) em mg L^{-1} obtidas por ICP OES e por *spot test* a partir dos dados de A_G aplicado na equação da curva de calibração, com coeficiente de correlação = 0,9895, $R^2 = 0,966$ e coeficiente

angular = 0,77. Estes valores indicam o caráter quantitativo do método de *spot test*.

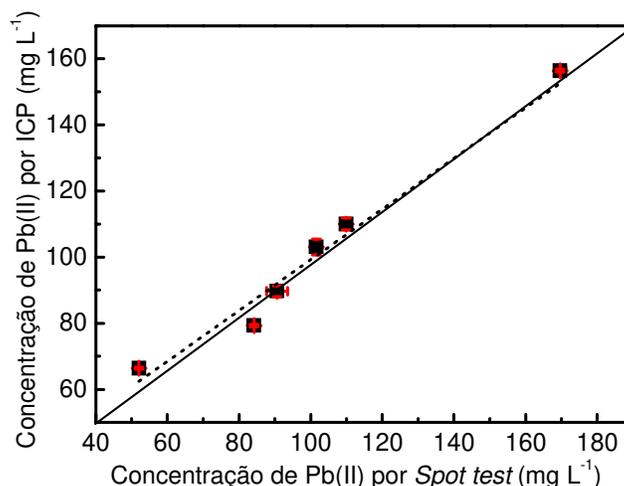


Figura 28. Correlação de Pearson entre os resultados da concentração de Pb(II) obtidas por ICP OES e por *Spot test*. As barras verticais correspondem ao desvio-padrão de 3 replicatas enquanto as horizontais ao desvio-padrão de 8 replicatas. A linha sólida diagonal representa a linha 1:1. A linha segmentada representa o ajuste linear cuja equação da reta é: $C_{Pb(ICP)} = 22,5 + 0,77C_{Pb(spot\ test)}$

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para cálculo do LD e LQ utilizaram-se os valores dos desvios-padrão do coeficiente linear e angular, 0,01 e 0,03, respectivamente, da curva de calibração da Figura 27. O LD e LQ foram calculados segundo as Equações 2 e 3 e os resultados estão representados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de LD e LQ para o método de determinação de Pb(II) por *spot test* calculados a partir das Equações 2 e 3.

		LD	LQ
		Pb(II) (mmol L ⁻¹)	Pb(II) (mmol L ⁻¹)
Equação 2	$\frac{k \times sd_B}{m}$	0,002	0,006
Equação 3	$\frac{k \times (sd_B^2 + sd_i^2 + (\frac{i}{m})^2 sd_m^2)^{1/2}}{m}$	0,07	0,24

Para LD, $k = 3$ e para LQ, $k = 10$; $sd_B = 0,0003$; $i = -0,081$; $sd_i = 0,01$; $m = 0,47$; $sd_m = 0,03$.

Long e Winefordner (1983) apresentaram um relatório discutindo aplicação de algumas definições e equações para cálculo do LD e apontaram que a aproximação da IUPAC (Equação 2) é válida somente se a maior fonte de erro for proveniente do branco, caso contrário esta aproximação em muitos casos pode resultar em falsos baixos valores de LD. Tais conclusões são consistentes com os resultados obtidos neste trabalho, visto que os valores de LD e LQ calculados com a Equação 2 apresentam resultados bem abaixo da menor concentração de Pb(II), na qual foi possível observar visualmente a coloração vermelha do complexo PbROD ($\text{Pb(II)} \approx 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$). Pela Equação 3, o LQ aproxima-se mais da menor concentração que permite observação visual.

Tais resultados são relevantes para levantar uma discussão de como proceder para calcular os valores de LD e LQ utilizando microfluídica em papel e digitalização de imagens, visto que diversos trabalhos da literatura envolvendo digitalização de imagens para a quantificação de produtos de reação coloridos utilizaram diferentes critérios para cálculo do LD e LQ. CARRILHO *et al.* (2009) apresentaram os valores de LD para detecção por absorvância e fluorescência usando um leitor de microplacas. Porém, os resultados com digitalização de imagens foram representados apenas com a curva de calibração (intensidade de cor x concentração do analito), sem menção à LD ou como calculá-lo. Outros autores (KOMPANY-ZAREH *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2010; ZAMORA *et al.*, 2011) apresentaram as curvas de calibração (intensidade de cor x concentração do analito) e utilizaram a equação da reta na determinação da concentração do analito, mas sem fazer referências a valores de LD ou LQ. Em alguns trabalhos, foi utilizada a relação $\text{LD} = 3 \times s_B$ (sendo s_B o desvio-padrão do branco) como critério para cálculo (TEASDLE *et al.*, 1999; LOPEZ-MOLINERO *et al.*, 2010), ou $\text{LD} = 2 \times s_B$ (LÖNNBERG e CARLISSON, 2001); também foi encontrado o uso da relação $\text{LD} = (3 \times s_B)/b$ (sendo s_B o desvio-padrão do branco e b o coeficiente angular) (APYARI *et al.*, 2008) o que pode levar a uma superestimação do LD como já discutido anteriormente. Isto aponta a falta de clareza para cálculo desses parâmetros com dados obtidos a partir de imagens digitais e a necessidade de discussão de critérios para estabelecê-los.

Portanto, os resultados desta pesquisa apontam a maior adequação da Equação 3 para cálculo de LD e LQ, visto que os valores obtidos são mais coerentes com as observações visuais. Assim, empregando a digitalização de imagens como ferramenta analítica, a quantificação é possível a partir da concentração que permite detecção visual do complexo.

Avaliação frente a interferentes

As imagens dos μ PADs utilizados para avaliação de interferentes estão representadas na Figura 29.

A curva de calibração das soluções de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e sua respectiva equação para cálculo da concentração de $\text{Pb}(\text{II})$ frente aos interferentes estudados encontram-se na Figura 30.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

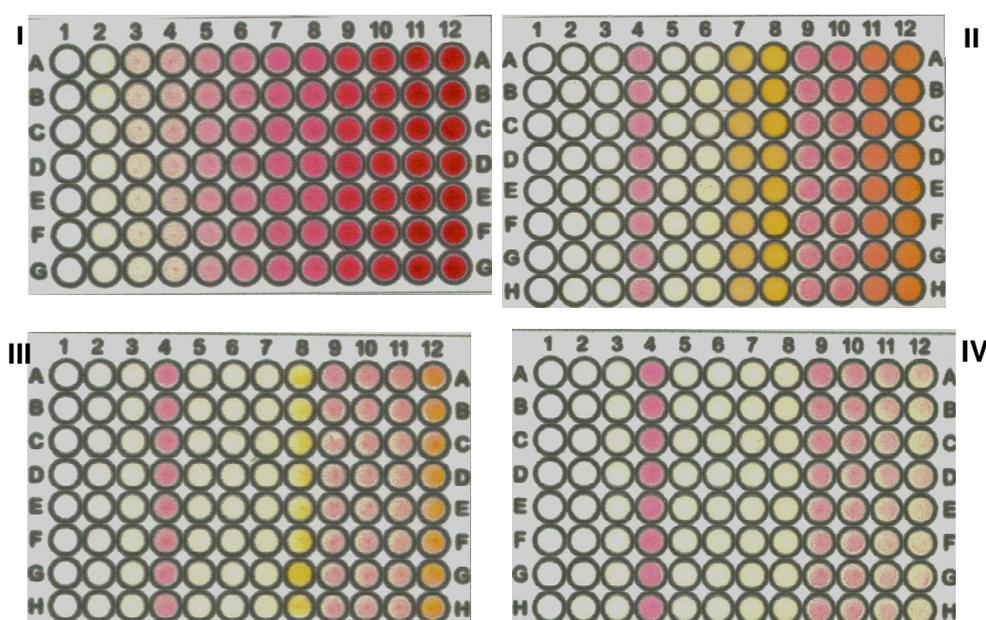


Figura 29. Imagens dos μ PADs utilizados para avaliação de interferentes para condição de secagem natural. I – μ PAD com as concentrações de $\text{Pb}(\text{II})$ utilizadas para construção da curva de calibração com formação de PbROD a partir da terceira coluna com as concentrações de $\text{Pb}(\text{II})$ 0,28; 0,33; 0,43; 0,55; 0,68; 0,80; 1,00; 2,00; 3,02; 4,01 mmol L^{-1} , II - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de $\text{Ba}(\text{II})$, III - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de $\text{Cd}(\text{II})$, IV - μ PAD utilizado para avaliação da interferência de $\text{Sr}(\text{II})$. A distribuição das soluções de $\text{Ba}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$ e $\text{Sr}(\text{II})$ utilizadas na avaliação de interferentes nas colunas do μ PAD está de acordo com a apresentação da Tabela 5 (página 37).

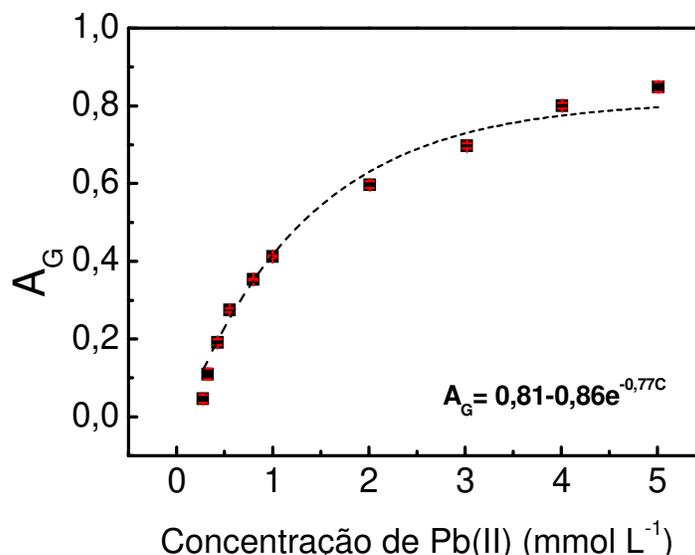


Figura 30. Curva de calibração da variação de A_G com a concentração de Pb(II) a partir dos dados das imagens obtidas pela reação de 10 μ l de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ (em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição de 10 μ l de solução de Pb(II), seguido também de secagem em fluxo de ar sem aquecer. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas.

Tabela 13. Concentrações de Pb(II) frente a diferentes proporções dos interferentes avaliados.

Misturas	M(II) = Ba(II)			M(II) = Cd(II)			M(II) = Sr(II)		
	*Pb(II)	σ (n=8)	σ_r (%)	*Pb(II)	σ (n=8)	σ_r (%)	*Pb(II)	σ (n=8)	σ_r (%)
Pb(II)	0,44	0,008	2	0,55	0,009	2	0,46	0,02	3
Pb(II):M(II) = (1:0,5)	0,45	0,024	5	0,32	0,02	5	0,25	0,02	6
Pb(II):M(II) = (1:1)	0,52	0,031	5	0,26	0,02	5	0,27	0,03	9
Pb(II):M(II) = (1:5)	0,37	0,002	0,4	0,17	0,023	10	0,26	0,04	10
Pb(II):M(II) = (1:10)	0,30	0,006	1	0,08	0,014	10	0,31	0,024	6

M(II) corresponde a Cd(II) ou Ba(II) ou Sr(II); Pb(II):M(II) indica a proporção da mistura entre analito e interferente.

*Concentração de Pb(II) em mmol L⁻¹ calculada a partir da equação da curva de calibração.

Na comparação dos resultados da concentração média de Pb(II) na ausência de interferentes e com diferentes proporções de cada interferente avaliado, o teste estatístico *t student* indicou que apenas para Pb(II) na presença de Ba(II) na proporção 1:0,5 não houve diferença significativa a 95% de confiança. Isso indica a forte interferência dos cátions estudados.

Embora os resultados encontrados apontem que a presença de Cd(II) e Sr(II) em qualquer proporção testada e de Ba(II) acima da proporção 1:0,5 de interferente prejudique a quantificação de Pb(II), vale ressaltar que qualitativamente pode-se observar a presença do complexo de coloração vermelha de PbROD em todas as proporções testadas, independentemente do interferente, excetuando para Ba(II) acima da proporção 1:5. Portanto se, qualitativamente, for possível observar a presença de interferentes, como no caso do Ba(II) acima da proporção 1:5, este tipo de informação pode direcionar o usuário para a necessidade de se empregar estratégias para minimizar a ação interferente ou até mesmo a buscar outras técnicas para quantificação de Pb(II).

Nesta parte do trabalho, conclui-se que:

- ✓ O preparo de ROD em solução tampão aumenta a estabilidade para um intervalo de tempo 24 vezes maior do que o preparo em água.
- ✓ Solução de tampão tartarato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,8$) é mais adequada do que tampão citrato para ser utilizado no preparo de solução ROD, pois não interage com Pb(II), não interferindo na formação de PbROD.
- ✓ A limitação física imposta pelas barreiras hidrofóbicas no μPAD viabiliza a quantificação de Pb(II), pois impede o fluxo lateral dos reagentes e proporciona manchas mais uniformes em uma área pré-definida.
- ✓ A falta de relatos na literatura sobre a constante de formação de PbROD e de sua fórmula estrutural dificulta o entendimento da reação de formação do complexo e conseqüentemente o estabelecimento de condições para controle da reação.
- ✓ A ordem de adição dos reagentes no μPAD afeta a detectabilidade de PbROD. Adição de Pb(II) no μPAD antes da solução de ROD, favorece interações de Pb(II) com os grupos hidroxílicos do papel impedindo que ocorra reação completa com ROD após sua adição, diminuindo assim, a formação de PbROD

- ✓ É adequado adicionar inicialmente solução de ROD, secar sob fluxo de ar sem aquecimento até o aparecimento da coloração amarelada, típica dos íons ROD, para posterior adição do analito.
- ✓ Na análise digital de imagens, dentre as componentes estudadas (R, G e B), os resultados de A_x a partir da componente G foram mais robustos o que justificou sua escolha para proposta de quantificação.
- ✓ O papel do μ PAD deve ser empregado para medidas do branco.
- ✓ Após adição do analito pode-se prosseguir com dois procedimentos de secagem, natural ou em fluxo de ar sem aquecimento.
- ✓ A secagem em fluxo de ar sem aquecimento é mais rápida e proporciona uma distribuição mais uniforme do PbROD sobre a zona de reação, enquanto a natural embora mais lenta e com distribuição do complexo menos uniforme, proporciona maior tempo de contato entre os reagentes podendo favorecer a formação de PbROD.
- ✓ Dentro de uma zona de reação do μ PAD o número de pixels selecionados para extração dos dados de RGB não influencia nos resultados de A_x .
- ✓ Após formação de PbROD a imagem do μ PAD pode ser obtida por um período de até 96 horas.
- ✓ A precisão do método avaliada em um mesmo dia com $n = 21$ foi de $\sigma_r = 12\%$, e a precisão intermediária foi de $\sigma_r = 4\%$.
- ✓ Na avaliação da exatidão os resultados da concentração de Pb(II) das amostras aquosas de $Pb(NO_3)_2$ não diferem estatisticamente dos resultados encontrados por ICP OES a 95% de confiança.
- ✓ A Equação 3
$$\frac{k \times (sd_B^2 + sd_i^2 + (\frac{i}{m})^2 sd_m^2)^{1/2}}{m}$$
 empregada no cálculo do LD ($k = 3$) e LQ ($k = 10$) forneceram resultados coerentes com as observações visuais e, portanto, devem ser empregadas quando se trabalha com análise digital de imagens como ferramenta para quantificação de compostos coloridos em μ PAD.
- ✓ A presença de Cd(II) e Sr(II) em qualquer proporção e de Ba(II) acima da proporção de 1:0,5 de interferente prejudica a quantificação de Pb(II),

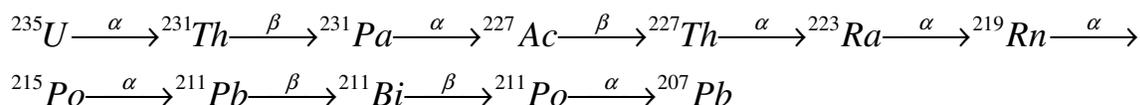
porém as informações qualitativas servem para detectar Pb(II) nas proporções estudadas e também identificar a presença de interferentes.

**Parte 2: Aplicação do método de *spot test* para
determinação de chumbo em solos**

Capítulo 5: Introdução

5.1. Chumbo nos solos e sua disponibilidade

O chumbo é um contaminante inorgânico de alta toxicidade, que ocupa a segunda posição no *ranking* da Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2011). Pode estar presente naturalmente em solos e em sistemas aquáticos superficiais e subsuperficiais, mesmo que não haja perturbação antrópica do ambiente (GUILHERME *et al.*, 2005). A origem natural de Pb nos solos provem, quase que totalmente, do decaimento da série radioativa a partir de urânio e tório. Proporções entre os isótopos U/Pb e Th/Pb podem ser utilizadas em datações de rochas (TOTEU *et al.*, 1987) e também como forma de diferenciar ocorrências naturais de Pb das de origem antropogênicas (NOTTEN *et al.*, 2008). A série de decaimento radioativo a ^{207}Pb a partir do ^{235}U ocorre conforme a sequência a seguir (modificado de CNEN, 2013):



A concentração natural de Pb no solo depende do material de origem e um valor médio é de 25 mg kg^{-1} , de acordo com KABATA-PENDIAS e PENDIAS (2001). Apesar dos teores naturais de Pb em solos serem, em geral, baixos e não apresentarem riscos à saúde humana, níveis mais elevados podem ser encontrados em diversas áreas, devido à dispersão deste elemento no ambiente, principalmente por meio de atividades antrópicas, tais como: mineração, reciclagem de baterias, uso como aditivos em combustíveis, tintas e pesticidas, além de outros usos industriais (MIELKE e REAGAN, 1998; MARKUS e MACKBRATNEY, 2001).

A dinâmica de Pb no ambiente e a exposição humana a este elemento ocorre por interações solo-ar-água-plantas-animais-homem. Devido à mobilidade relativamente baixa de Pb em solos, a exposição humana a este elemento ocorre principalmente por inalação e ingestão de solo e/ou material particulado, sendo que crianças estão mais suscetíveis aos efeitos toxicológicos do Pb, por estarem

em fase de desenvolvimento físico e neurológico, com maior eficiência de absorção de Pb (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Além disso, crianças tem maior exposição a Pb, devido ao hábito de brincarem no chão e em jardins, levando objetos e mãos à boca, o que pode levar à ingestão de quantidades significativas de solo e material particulado (HETTIARACHCHI e PIERZYNSKI, 2004).

O reconhecimento dos efeitos tóxicos da exposição a Pb resultou na introdução de restrições ao uso de compostos contendo Pb, na tentativa de tornar o ambiente, em geral, mais seguro e saudável (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Recentemente, a legislação brasileira estabeleceu valores genéricos de concentração de Pb e outros contaminantes, que representam diretrizes sobre as condições de qualidade de solo e de água subterrânea (CONAMA, 2009), os quais são utilizados no monitoramento ambiental e servem para distinguir áreas contaminadas ou em processo de contaminação. Esta legislação estabelece valores para uma área ser considerada contaminada por Pb em três cenários de exposição: agrícola (180 mg kg^{-1}), residencial (300 mg kg^{-1}) e industrial (900 mg kg^{-1}) (CONAMA, 2009). O cenário mais restritivo é o agrícola, devido à produção de alimentos, mas os cenários residencial e industrial são muito importantes, devido ao potencial de acúmulo de Pb nestes ambientes.

A determinação da concentração total de um elemento, apesar de amplamente utilizada para propósitos ambientais, não é suficiente para avaliar sua toxicidade, visto que apenas íons em solução podem ser absorvidos por organismos e são, portanto, denominados biodisponíveis (Di Toro et al., 2001). Tais íons à medida que são absorvidos são repostos pela fase sólida, num sistema de equilíbrio dinâmico. A reposição da fase sólida para a fase líquida do solo depende da forma em que o elemento está ligado ou complexado na fase sólida (PEIJNENBURG e JAGER, 2003).

Chumbo pode estar ligado a grupos funcionais da matéria orgânica dos solos (ex. carboxílicos, fenólicos, etc.) ou adsorvidos nas superfícies de minerais de argila e óxidos (Fe, Al e Mn). Além destas formas, este elemento também pode ocorrer como espécies iônicas dissolvidas tais como: Pb^{2+} , PbOH^+ , PbCl^+ , PbHCO_3^+ ou $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2^{2-}$. Os principais fatores relacionados com a especiação de

Pb em solos são: pH, quantidade de matéria orgânica e capacidade de troca de cátions (REDDY *et al.*, 1995). Todos estes fatores, juntamente com a forma mineral, tamanho de partículas e associação com outras fases minerais, afetam a especiação de Pb em solos e o potencial para sua solubilização, o que, por sua vez, pode influenciar sua biodisponibilidade e bioacessibilidade⁶ (RUBBY *et al.*, 1995).

O pH é um dos fatores mais importantes que afetam a sorção de Pb em solos (PIERANGELI *et al.*, 2001). O aumento na capacidade de sorção com o incremento do pH pode ser atribuído à desprotonação das superfícies de troca em solos de cargas variáveis e à consequente geração de cargas negativas, que ocorrem em valores de pH mais elevados (PIERANGELI *et al.*, 2009).

A capacidade de troca de cátions (CTC) de um solo pode ser definida como a quantidade de íons eletropositivos que um solo pode reter em determinadas condições (RAIJ e KUPPER, 1966), sendo que as cargas negativas são originadas na superfície dos componentes minerais e orgânicos dos solos. Com o aumento da CTC do solo pode haver aumento da retenção de Pb, no entanto, o mesmo permanece numa forma trocável, conforme foi observado por PIRES *et al.* (2007) em solos brasileiros. Os autores também verificaram que a adsorção de Pb foi mais estável quando ligado à matéria orgânica e aos óxidos de Fe e Al.

A matéria orgânica (MO) do solo é a principal responsável pela geração de cargas negativas nos solos tropicais (CIOTTA *et al.* 2003). A MO pode liberar formas de carbono orgânico dissolvido (COD) para a solução do solo, o qual pode formar complexos com íons metálicos, como Pb(II). COD geralmente consiste de moléculas orgânicas pequenas (ex. amino ácidos e açúcares) ou maiores, tais como os ácidos húmicos e fúlvicos (PEIJNENBURG e JAGER, 2003). A MO do solo é capaz de reter Pb em formas mais estáveis do que minerais do solo, óxidos de Fe ou precipitados de fosfato e carbonato (TAI *et al.* 2013).

Superfícies minerais dos solos possuem grupos funcionais que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de cargas superficiais e incluem

⁶ O termo bioacessível refere-se à fração que representa a quantidade máxima de contaminante do solo disponível para absorção pelo organismo humano pela via intestinal (OOMEN *et al.*, 2002).

grupos hidroxil inorgânicos ligados à superfície de óxidos de Fe, Al, Mn e de Si (Si-OH) ou Al (Al-OH) expostos nas bordas dos minerais de argila (SPARKS, 1999).

As superfícies dos óxidos de Mn e Fe são conhecidas por serem sítios de adsorção altamente ativos para a maioria das espécies de íons metálicos dissolvidos. A imobilização de íons metálicos nestas superfícies podem ocorrer por adsorção específica e coprecipitação (HETTIARACHCHI e PIERZYNSKI, 2004). A formação de complexos ternários (superfície de óxido—ligante—metal ou superfície de óxido—metal—ligante) também é possível (MCBRIDE, 1994; HETTIARACHCHI e PIERZYNSKI, 2004) e ambos os ligantes orgânicos e inorgânicos podem ser envolvidos na formação de tais complexos (HETTIARACHCHI e PIERZYNSKI, 2004).

Por último, fosfato pode reagir com Pb(II) e formar precipitados estáveis e pouco solúveis, sendo que a adição de fosfato aos solos é uma estratégia de remediação em áreas contaminadas por Pb (RYAN *et al.*, 2001; MELAMED *et al.*, 2003; BOSSO *et al.*, 2008). A solubilidade de fosfato de chumbo nos solos também é afetada por reações de superfície e pela matéria orgânica (SAUVÉ e MCBRIDE, 1998) e pelo pH, cuja solubilidade é favorecida em condições ácidas (pH < 5) (CAO *et al.*, 2008).

5.2. Métodos para determinação de chumbo em solos

Tradicionalmente técnicas de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES) são utilizadas em análises de solos, sendo que a necessidade de preparo das amostras e a utilização de padrões para cada elemento determinado podem tornar a análise de muitas amostras laboriosa e de alto custo (BURAVOK *et al.*, 2010).

Métodos de análise não destrutivos, que podem fornecer informações sobre os níveis de contaminantes de forma rápida e *in situ* podem ser muito úteis, facilitando a tomada de decisões "em tempo real" sobre avaliação da exposição e gestão de riscos (CLARCK *et al.*, 1999). Métodos que utilizam equipamentos portáteis de fluorescência de raio-x (XRF) (PEINADO *et al.*, 2010), espectroscopia

de plasma induzido por laser (LIBS) (BURAVOK *et al.*, 2010) e espectroscopia de reflectância combinado com análises estatística multivariada (BRAY *et al.*, 2009; PANDIT *et al.*, 2010) podem desempenhar um papel importante no monitoramento ambiental, pois fornecem uma análise direta, sem necessidade de preparo de amostras, permitindo uma varredura rápida de uma ampla área e, conseqüentemente, uma amostragem mais detalhada. Apesar dessas vantagens, tais equipamentos são relativamente caros e exigem rigorosos padrões de calibração (ex. LIBS) (BURAVOK *et al.*, 2010), ou ainda são muito sensíveis a variáveis tais como: tamanho de partículas, heterogeneidade da superfície, umidade e presença de elementos interferentes (ex. XRF) (PEINADO *et al.*, 2010), o que dificulta o seu uso em condições de campo.

Neste contexto, a utilização de kits para testes em campo, baseados em reações de *spot test* representam uma alternativa interessante. Alguns deles foram desenvolvidos inicialmente para detectar chumbo na pintura de edificações e em produtos de consumo humano, tais como cerâmica vidrada, joias e mini-persianas (KORFMACHER e DIXON, 2007) e são amplamente utilizados. Nestes kits, rodizonato e sulfeto são os reagentes colorimétricos mais utilizados na reação com Pb(II) (ROSSITER, 2000). Na reação de Pb(II) com sulfeto, a percepção na mudança de cor de cinza para preto é dificultada quando o analito está presente em baixas concentrações (SHEETS, 1998). Kits utilizando rodizonato como agente complexante foram empregados na avaliação da presença de Pb(II) em materiais particulados (ASHELEY *et al.*, 1996) e em poeira doméstica (KORFMACHER e DIXON, 2007), apontando um possível potencial para aplicação em solos.

PREER e MURCHISON (1986) adaptaram a reação de *spot test* entre rodizonato e Pb(II) para aplicação em solos como proposta qualitativa. Os autores observaram que Pb(II) é detectável na faixa de concentração de 400 a 700 mg kg⁻¹ em amostras de solo seco e a concentração detectada é dependente do método de extração utilizado.

As concentrações de chumbo e demais contaminantes inorgânicos estabelecidos nas tabelas de valores orientadores para solos no Brasil são baseadas nos métodos de extração 3050B e 3051A da USEPA. Estes métodos

utilizam ácidos HNO_3 e/ou HCl concentrados como extratores e indicam a concentração total ou pseudo-total de chumbo no solo com uso de ICP OES, Absorção Atômica por Chama (FLAA), Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAA) e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP MS) (USEPA, 2007; CONAMA, 2009).

Métodos para avaliar a biodisponibilidade de elementos metálicos em solos envolvem a extração do elemento da matriz do solo. A escolha do agente extrator depende dos objetivos específicos da investigação e tais extratores podem ser agrupados de acordo com a eficiência da extração de um elemento em uma determinada fração do solo (PEIJNENBURG *et al.*, 2007). A denominada fração reativa do solo refere-se à fração de íons ligados a sítios superficiais da matéria orgânica, óxidos amorfos e argila, sendo responsável pelo controle da concentração dos íons metálicos na solução, pelo equilíbrio de adsorção e dessorção dos íons entre a fase sólida e a solução do solo (RÖMKENS *et al.*, 2009). Procedimentos de extração da fração reativa podem envolver agentes complexantes fortes (ex. EDTA 0,05 ou 0,1 mol L^{-1}) e ácidos fortes diluídos (como HCl 0,1 mol L^{-1} ou HNO_3 0,43 mol L^{-1}) (PEIJNENBURG *et al.*, 2007).

O procedimento de extração com HNO_3 0,43 mol L^{-1} tem sido mais frequentemente utilizado para avaliar frações geoquimicamente reativas de elementos potencialmente tóxicos, como Cd, Zn, Cu, Ni, Cr e Pb, em solos (GOODDY *et al.*, 1995; TIPPING *et al.*, 2003; RÖMKENS *et al.*, 2004, 2009; PAMPURA *et al.*, 2007). Este método de extração é considerado rápido, fácil de testar e reprodutível (RÖMKENS *et al.*, 2004).

A adoção de extração com HNO_3 0,43 mol L^{-1} na avaliação da bioacessibilidade simplificaria muito o processo de avaliação de risco a elementos potencialmente tóxicos como o Pb, pois foi demonstrado que há uma relação próxima a 1:1 entre a quantidade de Pb extraída pelo método HNO_3 0,43 mol L^{-1} e a quantidade extraída pelo método oficial de avaliação da bioacessibilidade, o qual é um método de extração *in vitro* que simula a disponibilidade de metais no trato gastro intestinal humano (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Capítulo 6: Parte experimental

6.1 Equipamentos, materiais e reagentes.

6.1.1 Equipamentos

- Espectrômetro de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente, ICP OES, (OPTIMA 3000DV, Perkin Elmer);
- Impressora multifuncional com scanner (Photosmart C3180 All-in-One, HP);
- Mesa agitadora de movimento circular (fabricação própria do Instituto Agrônômico de Campinas - IAC);
- Conjunto para aquecimento em “banho-maria”.

6.1.2 Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório;
- Papel cromatográfico (Whatman nº 1);
- Micropipeta (5 a 50 µL, LABMATEsoft);
- Pipeta automática (1,00 a 5,00 mL, Biohit, Proline Plus);
- Ponteiras para pipeta automática;
- Secador de cabelo (ST 2800 super turbo, 1800 W, Mega Professional);
- Tubo de centrífuga, tipo Falcon, de 50 mL (Carlplast);
- Membrana de polietileno com filtro cromatográfico de 0,22 µm (Millex GV, Millipore);
- µPAD fabricado em papel cromatográfico (Whatman nº 1) com áreas circulares de 6,8 mm de diâmetro impressas com tinta sólida à base de cera (Xerox Phaser 8560N);
- Programa DIGIMAGE (SCHIMIDT, 1997);
- Programa Origin 8.0;
- Programa Pirouette.

6.1.3 Reagentes

- Água deionizada (deionizador MiliPore Mili-Q Plus);
- Rodizonato de sódio (VETEC);
- Nitrato de Pb(II) (ECIBRA);
- Ácido L (+) tartárico (Synth);
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Ácido Nítrico (Synth);

Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítico.

6.2 Solos

Os solos descritos na Tabela 14 fazem parte de um conjunto de 28 solos selecionados pela representatividade e distribuição no Estado de São Paulo, compondo um conjunto heterogêneo quanto aos parâmetros físicos, químicos e mineralógicos, estudados na tese de doutorado de Márcio Roberto Soares (SOARES, 2004).

Tabela 14. Principais classes de solos predominantes em todo o estado de São Paulo (adaptação de SOARES, 2004).

Solos	Quadrícula/Folha	Antiga Unidade/Observações
Latosolos		
1. Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA-1)	Araras/Conchal	Unidade Coqueiro/Horto Florestal Fazenda Campinha
2. Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA-2)	São Carlos/Itirapina	Unidade Três Barras/Serra de Itaquerí
3. Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA-3)	Araras/Conchal	Unidade Laranja Azeda
4. Latossolo Vermelho (LV-1)	São Carlos/São Carlos	Unidade Hortolândia
5. Latossolo Vermelho (LV-2)	Piracicaba/Piracicaba	Unidade Santo Antônio/Fazenda Capuava
6. Latossolo Vermelho Eutroférico (LVef)	Ribeirão Preto/Bonfim Paulista	Unidade Ribeirão Preto/Fazenda São Thomaz
7. Latossolo Amarelo (LA-1)	São Carlos/Itirapina	Unidade Itororó/Serra de Itaquerí
8. Latossolo Amarelo (LA-2)	São Carlos/Ibaté	Unidade Canchim/Distrito de Água Vermelha
9. Latossolo Amarelo Acriférico (LAwf)	Guaira/Miguelópolis	Unidade Ipuã
Argissolos		
10. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-1)	Piracicaba/São Pedro	Unidade Serrinha/Distrito de Ártemis
11. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-2)	Marília/Marília	-
12. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-3)	Americana/Cosmópolis	-
13. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-4)	Piracicaba/Capivari	Unidade Santa Cruz
13. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-5)	Piracicaba/Capivari	-
15. Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-6)	Piracicaba/Piracicaba	APTA Pólo Regional Centro-Sul de Piracicaba
16. Argissolo Vermelho (PV-1)	Marília/Gália	-
17. Argissolo Vermelho (PV-2)	Piracicaba/Ibitiruna	Unidade Campestre
Neossolos		
18. Neossolo Quartzarênico (RQ)	Piracicaba/São Pedro	-
19. Neossolo Litólico (RL)	Marília/Garça	-
20. Neossolo Regolítico (RR)	Marília/Alvinlândia	-
Nitossolos		
21. Nitossolo Háptico (NX)	Mogi Mirim/Espírito Sto do Pinhal	-
22. Nitossolo Vermelho Eutroférico (NVef)	Ribeirão Preto/ Ribeirão Preto	APTA Pólo Regional Centro Leste de Ribeirão Preto
Gleissolos		
23. Gleissolo Háptico (GX)	Pariquera Açu/Pariquera Açu	Unidade Mosqueada/APTA Pólo Regional Vale do Ribeira
24. Gleissolo Melânico (GM)	Piracicaba/Piracicaba	Distrito de Tanquinho
Cambissolos		
25. Cambissolo Háptico (CX)	Araras/Mogi-Guaçu	Unidade Sete Lagoas/Fazenda Sete Lagoas
Planossolos		
26. Planossolo Háptico (SX)	Piracicaba/Piracicaba	Distrito de Tupi
Luvisolos		
27. Luvisolo Crômico (TC)	Marília/Garça	-
Chernossolos		
28. Chernossolo Argilúvico (MT)	Descalvado/Analândia	Sopé do Morro do Camelo

Essas amostras correspondem à camada superficial (0 a 20 cm de profundidade).

Também foram analisadas amostras de solos provenientes de uma área de mineração, denominadas M1, M2 e M3 contendo Pb, respectivamente, nas concentrações de 2300, 2334, 556 mg kg⁻¹, que foram determinadas pelo método EPA3051 (solução de HNO₃ concentrado com extração em microondas e determinação por ICP OES).

Dopagem dos solos com Pb(II)

Doparam-se as amostras de solos indicadas na Tabela 14 com Pb(II) para atingir 300 mg kg⁻¹, que é o valor de intervenção para chumbo em solos em ambientes urbanos de acordo com a resolução do CONAMA (2009). Para isso, 10,00 mL de solução de Pb(NO₃)₂ 7,25 mmol L⁻¹ foram adicionados em 50,00 g de cada solo seco, posteriormente homogeneizados com agitação manual usando um bastão de madeira.

Por um período de quatro meses, manteve-se a umidade dos solos a 70% m/m da capacidade de retenção de água, com reposição de água destilada por pesagens, em média, a cada seis dias. Isso foi feito para promover um meio adequado para as reações de sorção do Pb(II) aos solos, semelhante ao procedimento descrito em PEREIRA *et al.* (2007) para incubação de Pb(NO₃)₂ em um Latossolo.

Extração de Pb(II) dos solos com solução de HNO₃ 0,43 mol L⁻¹

A escolha do método de extração baseou-se no fato de que a utilização de HNO₃ 0,43 mol L⁻¹ como extrator é considerado um método rápido, fácil de testar, reproduzível e, supostamente, extrai a fração reativa de Pb e outros metais no solo (RÖMKENS *et al.*, 2004). Além do mais, seguindo o procedimento proposto para reação de *spot test* (item 3.3.2, subtítulo: *Ajustes de condições para obtenção de PbROD*, página 27) a presença do ânion nitrato não provoca interferência na formação de PbROD.

O procedimento de extração seguiu o método descrito por VRIES e colaboradores (2003). Visando diminuir a quantidade de resíduo gerado, optou-se pela redução da quantidade de solo e solução extratora, porém mantendo-se a proporção massa/volume. Pesaram-se 4,0 g de solo em um tubo Falcon e adicionaram-se 20,00 mL de solução HNO_3 0,43 mol L^{-1} . Os tubos foram fechados e posicionados horizontalmente em uma mesa agitadora de movimento circular com 125 oscilações/minuto. Após 1 hora de agitação, o sobrenadante foi vertido em papel de filtro quantitativo. Em seguida, os extratos foram novamente filtrados em membrana de polietileno com filtro cromatográfico de 0,22 μm , usando uma seringa comercial. As concentrações de Pb nos extratos obtidos em triplicata e de alguns possíveis interferentes para o método *spot test* (Ba, Cd, e Sr) foram obtidas por ICP OES nas seguintes condições: 1300 W de potência incidente utilizando gás argônio de elevada pureza para geração do plasma, com posição axial para Ba, Cd e Pb e radial para Sr. Utilizou-se as linhas de emissão de Ba em 233,527 nm; Cd em 214,440 nm; Pb em 220,353 nm; e Sr em 407,771 nm.

Pré-concentração das amostras

Usando uma pipeta automática, tomou-se uma alíquota de 8,00 mL da solução de extrato do solo em um béquer e levou-se o conjunto para aquecimento em “banho-maria” até a completa evaporação da solução. Logo após, adicionou-se 1,00 mL de água deionizada e agitou-se manualmente com bastão de vidro até homogeneização da solução.

Reação de spot test

As reações de *spot test* entre Pb(II) e ROD foram realizadas nos μPADs desenvolvidos na primeira parte deste trabalho cuja descrição do procedimento de preparação se encontra no item 3.3.2, subtítulo: *Ajustes de condições para obtenção de PbROD*, página 27.

Em μPAD adicionaram-se 10 μL de solução de ROD (9,96 mmol L^{-1} em tampão tartarato 0,2 mol L^{-1} , pH = 2,78), seguindo-se de secagem completa sob

fluxo de ar sem aquecimento por cerca de 10 minutos, até aparecimento de coloração amarela intensa do rodizonato, adicionando-se, em seguida, 10 μL de solução extrato. Para cada extrato de solo foram preparados dois μPAD , diferindo no procedimento final de secagem: fluxo de ar sem aquecimento e secagem natural.

Na Figura 31 está representada a distribuição genérica das soluções pré-concentradas de extratos de solos no μPAD . Cada μPAD utilizado suportou três amostras de solos diferentes, sendo que para cada amostra de solo o procedimento de extração e pré-concentração foi realizado em triplicata.

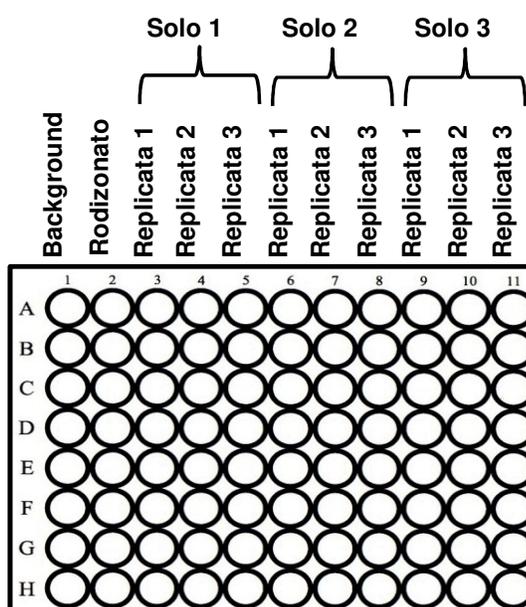


Figura 31. Distribuição genérica das soluções de extratos de solos pré-concentrados no μPAD .

As imagens do papel foram obtidas em *scanner* 24 horas após a adição da última solução no papel, nas condições de 0% de brilho e -25% de contraste.

Preparo das curvas de calibração

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas diluições de solução $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 5,01 mmol L^{-1} em água deionizada. Cada concentração foi

utilizada em 7 replicatas, conforme descrito na Tabela 15, que também indica a posição de cada solução no μ PAD.

Tabela 15. Concentrações de Pb(II) e posição das mesmas no μ PAD.

Coluna	Concentração de Pb(II) (mmol L ⁻¹)	Coluna	Concentração de Pb(II) (mmol L ⁻¹)
1	Branco (papel)	7	1,50
2	Rodizonato	8	2,00
3	0,20	9	2,50
4	0,25	10	3,00
5	0,50	11	4,00
6	0,75	12	5,01

Todo o procedimento de preparo da curva de calibração foi repetido, substituindo-se as soluções aquosas de Pb(II) por soluções preparadas em HNO₃ 0,43 mol L⁻¹. As concentrações finais das soluções de Pb(II) em HNO₃ 0,43 mol L⁻¹ obtidas após a pré-concentração, foram conforme a descrição na Tabela 15.

Análise estatística

Alguns resultados de SOARES (2004) foram utilizados para montagem da Tabela 16.

A escolha dos parâmetros para compor esta tabela baseou-se na possibilidade destes causarem limitações para aplicação quantitativa na determinação de Pb(II) pelo método de *spot test*, devido à ocorrência de reações indesejáveis de adsorção, complexação e precipitação.

Os resultados apresentados na Tabela 16, foram utilizados em análise de correlação de Pearson a fim de avaliar a influência de cada parâmetro nos resultados de concentração de Pb(II) obtidos pelo método de *spot test*. Além disso, utilizou-se a análise de componentes principais (PCA) para verificar a possibilidade de discriminação dos solos em grupos distintos, tendo sido utilizado o programa Pirouette® (INFOMETRIX INC., 2013).

Tabela 16. Alguns parâmetros físicos e químicos dos solos estudados (adaptação de SOARES, 2004).

Solos	pH ^a	P ^b mg kg ⁻¹	CTC ^c mmol _c kg ⁻¹	Argila ^d -----g kg ⁻¹	MO ^e	Fe _(DCB) ^f	Fe _(OX) ^g	Al _(OX) ^h	MnO ⁱ
LVA-1	4,46	2,0	12,3	181	12,4	19,3	1,7	0,8	0
LVA-2	4,23	3,9	15,5	221	29,9	13,6	0,9	0,5	0
LVA-3	4,31	2,1	11,3	202	16,5	21,3	1,6	1,1	0,1
LV-1	6,4	3,0	28,4	201	19,4	53,1	3,1	1,6	0,7
LV-2	4,55	5,8	30,6	530	38,1	86,6	6,4	4,0	1,6
LVef	7,25	49,2	60,4	684	95,6	185,2	14,9	8,6	13,1
LA-1	4,81	7,6	23,4	22	38,8	19,7	1,3	0,7	1,0
LA-2	4,44	2,0	10,5	342	20,1	42,2	3,5	2,6	0,3
LAWf	4,69	3,3	16,9	470	39,9	113,3	7,7	5,5	1,2
PVA-1	5,27	1,8	4,9	60	6,7	3,5	0,2	0,2	1,9
PVA-2	5,36	3,3	8,8	100	7,6	5,3	0,5	0,2	1,1
PVA-3	5,4	22,8	44,6	247	36,8	32,9	3,9	1,7	9,3
PVA-4	5,1	3,2	21,6	202	17,9	8,7	0,6	0,3	2,8
PVA-5	5,64	22,5	68,7	366	41,0	45,7	3,6	2,3	35,0
PVA-6	6,14	7,5	43,6	246	36,6	32,8	2,1	1,1	5,1
PV-1	5,28	1,6	9,4	100	6,8	8,5	0,8	0,3	2,0
PV-2	5,7	8,1	54,4	427	42,5	51,3	4,0	1,1	14,7
RQ	4,41	1,1	7,6	80	9,6	3,0	0,3	0,2	0,1
RL	5,85	6,7	33,0	142	26,2	7,5	0,8	0,4	2,5
RR	6,16	4,0	19,2	101	15,5	11,1	0,9	0,6	6,7
NX	6,13	9,4	66,9	345	54,3	84,5	8,3	5,5	1,4
NVef	5,51	10,3	61,1	658	65,6	192,2	15,3	9,9	27,4
GX	4,73	34,0	52,4	532	84,5	27,6	1,7	1,4	2,7
GM	4,91	14,8	50,4	476	213,4	4,9	0,3	0,8	0,2
CX	4,27	4,6	22,7	243	29,2	19,3	1,6	0,8	0,1
SX	5,62	3,0	23,9	204	21,6	18,6	2,3	1,8	3,7
TC	5,81	1,6	7,3	40	9,8	8,2	0,6	0,4	0,9
MT	5,78	19,2	105,5	543	57,8	113,3	7,2	5,1	12,0

^apH: medido em água; ^bP: fósforo extraído por resina trocadora de íons; ^cCTC: capacidade de troca catiônica; ^dArgila: teor de argila; ^eMO: matéria orgânica; ^fFe_(DCB): ferro extraído por ditionito-citrato-bicarbonato de sódio; ^gFe_(OX): ferro extraído por oxalato ácido de amônio; ^hAl_(OX): alumínio extraído por oxalato ácido de amônio; ⁱMnO: óxidos de Mn extraídos por hidrocloreto de hidroxilamina em meio ácido.

Capítulo 7: Resultados e discussão

7.1 Solos

Na Figura 32 são apresentadas as imagens dos μ PADs, para a condição de secagem natural, contendo o PbROD formado a partir da reação entre o Pb(II) presente nos extratos de solos e ROD.

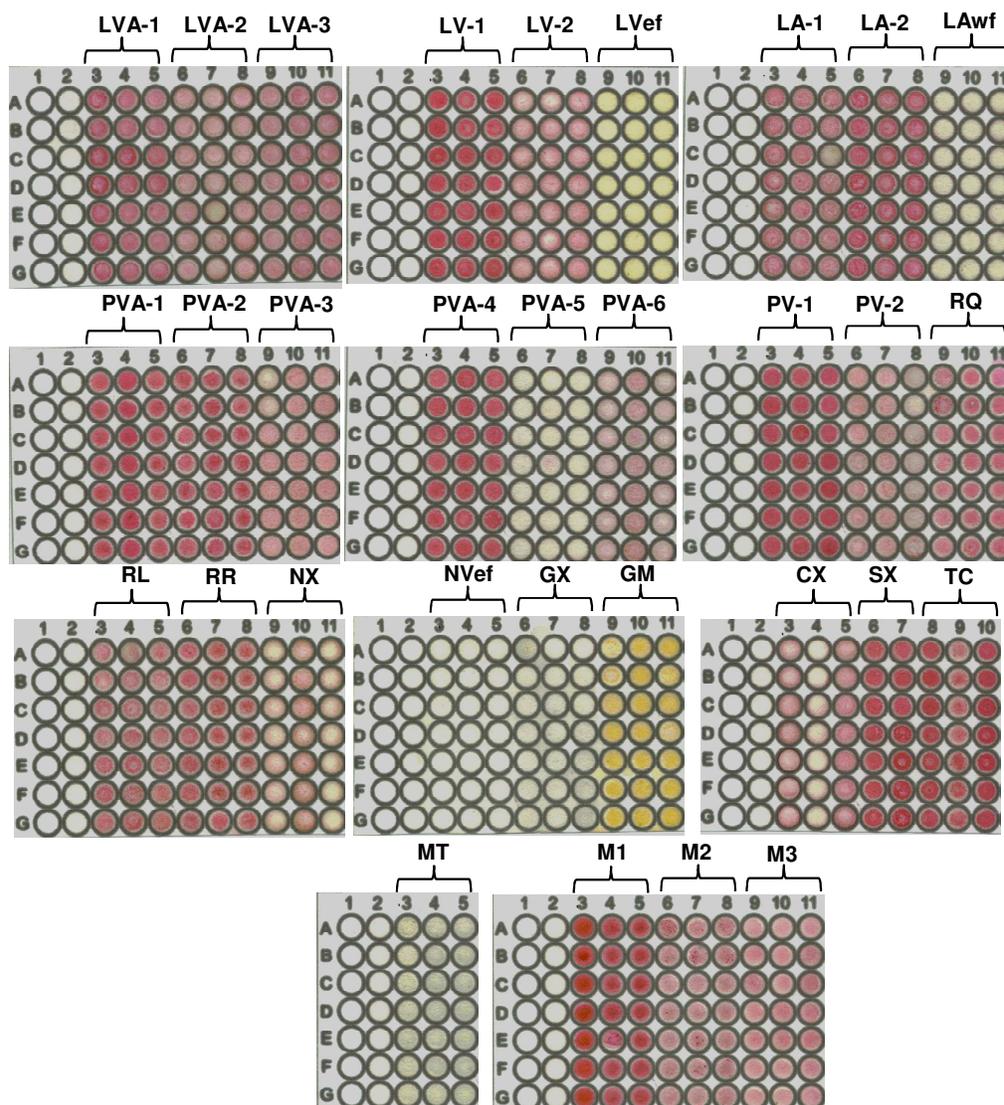


Figura 32. Imagens dos μ PADs, na condição de secagem natural, contendo a distribuição de PbROD formado a partir da reação de Pb(II) presente nos extratos de solos com ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$). A distribuição genérica das soluções de extratos de solos no μ PAD está de acordo com a representação da Figura 31 (página 93).

Na coluna 1 de cada μ PAD não foi adicionado reagentes (*background*) e na coluna 2 foi adicionado ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$).

Uma inspeção visual dos μ PADs indicou ausência da cor característica em sete amostras de solos (LVef, LAwf, PVA-5, NVef, GX, GM e MT) na condição de secagem natural (Figura 32), enquanto que na condição de secagem em fluxo de ar sem aquecimento este número aumentou para onze amostras, incluindo-se as amostras PVA-3, PV-2 e NX. Diante destes resultados, optou-se por apresentar neste trabalho apenas os resultados relacionados à secagem natural.

A condição de secagem natural, por ser mais lenta, proporciona maior tempo de contato entre os reagentes, favorecendo a reação em amostras com baixas concentrações de Pb(II) ou com presença de interferentes. Situação semelhante foi observada no trabalho de ROSSITER *et al.* (2000), sobre a avaliação de kits para avaliar a presença de Pb em tintas de parede. Os autores apontaram que na presença de compostos de Pb pouco solúveis o aumento do tempo de contato reagente-amostra de dois minutos para 24 horas, proporcionava resultados positivos para o teste.

Após a formação de PbROD nos μ PADs, os dados da intensidade da cor para a componente G (sistema RGB) obtidos pelo DIGIMAGE, foram utilizados na obtenção da absorbância calculada para esta componente (A_G), de acordo com a Equação 1 apresentada no item 3.4.1 página 31.

Com os dados de A_G construíram-se as curvas de calibração obtidas com as soluções de Pb(II) preparadas em água e em HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$, cuja as concentrações estão apresentadas na Tabela 15 (página 94). A curva de calibração para a condição de secagem natural após adição do analito está representada na Figura 33. A coincidência dos resultados levou à opção de adotar as curvas de calibração de Pb(II) a partir das soluções aquosas, devido a maior simplicidade do processo.

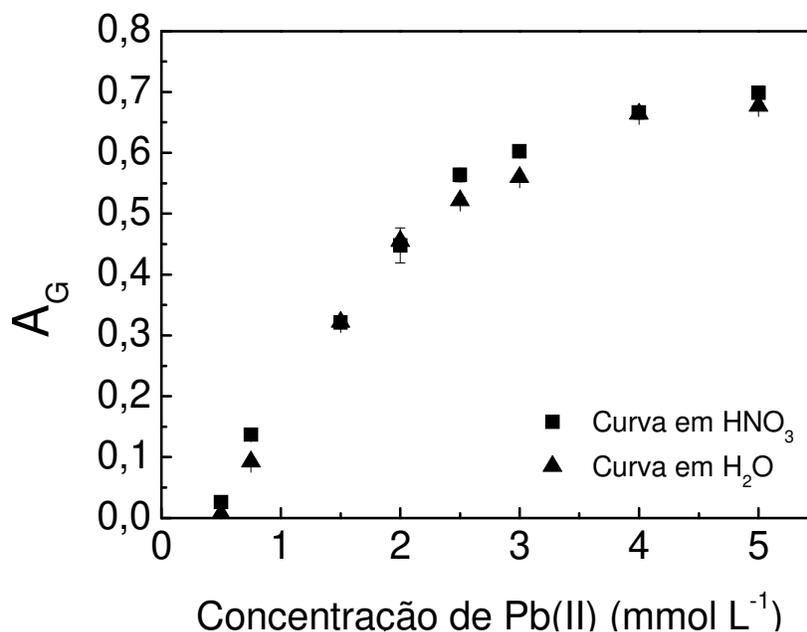


Figura 33. Curvas de calibração para Pb(II) preparada em (■) HNO₃ 0,43 mol L⁻¹ e em (▲) água deionizada com variação de A_G com a concentração de Pb(II). Formação de PbROD com procedimento de adição de 10 μL de solução de ROD 9,96 mmol L⁻¹ em tampão tartarato 0,2 mol L⁻¹, pH = 2,78, seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição 10 μL de solução de Pb(II), seguido de procedimento de secagem natural.

A faixa de estudo abrangeu soluções de Pb(II) nas concentrações 0,25 a 5,01 mmol L⁻¹, obtendo-se linearidade até 2,00 mmol L⁻¹. Na Figura 34, estão apresentadas a faixa de estudo e a faixa linear da curva de calibração de soluções aquosas de Pb(II), com secagem natural, descritas pelas Equações 5 e 6 respectivamente:

$$A_G = 0,76 - 0,99e^{-0,55C} \quad \text{Equação 5}$$

$$A_G = -0,06 + 0,26C, \quad \text{Equação 6}$$

A Equação 5 foi utilizada nos cálculos de concentração de Pb(II) nos extratos de solos. A partir da regressão linear (Figura 35B) e com valores dos desvios-padrão do coeficiente linear (0,002) e angular (0,005) da curva de calibração, empregou-se a Equação 3 apresentada no item 3.5 página 36 para calcular os limites de detecção e quantificação, tendo sido obtidos os valores 32 e 95 mg kg⁻¹, respectivamente.

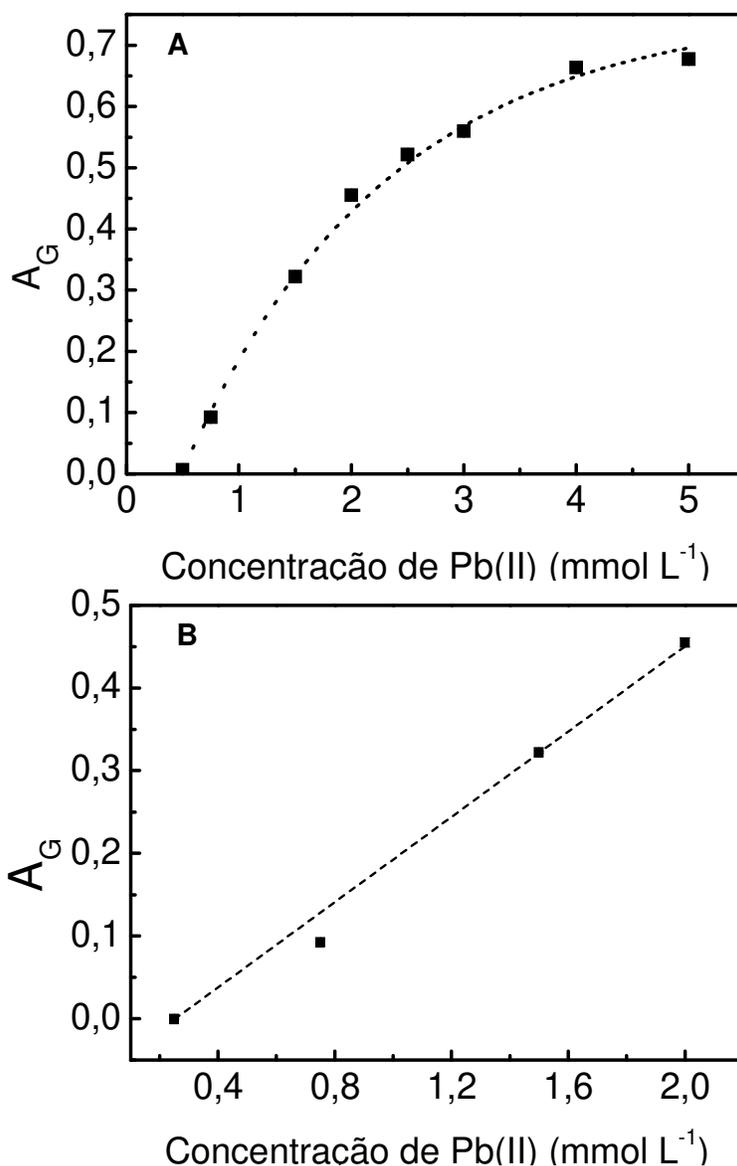


Figura 34. Curvas de calibração para Pb(II) preparada em água deionizada, com variação de absorbância da componente G (A_G), em função da concentração de Pb(II). Formação de PbROD com procedimento de adição de 10 μL de ROD ($9,96 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão tartarato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,78$) seguido de secagem em fluxo de ar sem aquecimento e adição 10 μL de solução de Pb^{2+} , seguido de procedimento de secagem natural. (A) Faixa de trabalho: 0,25 a 5,01 mmol L^{-1} , $A_G = 0,76 - 0,99e^{-0,55C}$, $R^2 = 0,998$; (B) Faixa Linear: 0,25 a 2,00 mmol L^{-1} , $A_G = -0,06 + 0,26C$, $R^2 = 0,999$. As barras representam a estimativa do desvio padrão para um conjunto de 7 replicatas e não podem ser visualizadas por serem menores que os pontos.

Na Tabela 17 estão apresentados os valores da concentração de Pb, Ba e Sr do conjunto de solos estudados, determinados por ICP OES, e também os resultados de Pb(II) obtidos pelo método de *spot test* empregando-se o

procedimento de secagem natural, além da porcentagem de Pb extraído com HNO_3 0,43 mmol L^{-1} e a relação entre as concentrações de Pb obtidas pelos dois métodos.

Tabela 17. Concentrações, em mg L^{-1} , de Pb, Ba e Sr nos solos obtidas pela extração com HNO_3 0,43 mol L^{-1} .

Solos	-----ICP OES ^a -----			Extração ^c	----Spot test ^b ----	
	Ba	Sr	Pb		Pb(II) --mg L ⁻¹ --	Spot test/ICP ^d
	-----mg L ⁻¹ -----					
LVA-1	1,0 ± 0,1	<LD	270 ± 5	90	173 ± 12	64
LVA-2	3,0 ± 0,6	<LD	249 ± 2	83	118 ± 6	47
LVA-3	1,0 ± 0,1	<LD	246 ± 8	82	147 ± 8	60
LV-1	8,0 ± 0,2	7 ± 0,2	235 ± 2	78	243 ± 31	103
LV-2	6,0 ± 0,3	2 ± 0,1	232 ± 8	77	96 ± 9	41
LVef	66 ± 2	34 ± 3	155 ± 3	52	63 ± 0	41
LA-1	9,0 ± 0,4	4 ± 0,2	240 ± 7	80	146 ± 9	61
LA-2	4,0 ± 3	1 ± 2	243 ± 6	81	178 ± 18	73
LAWf	7,0 ± 0,2	2 ± 0,07	226 ± 1	75	66 ± 1	29
PVA-1	3,0 ± 0,1	1 ± 0,003	246 ± 1	82	239 ± 28	97
PVA-2	9,0 ± 0,2	1 ± 0,02	236 ± 4	79	216 ± 16	92
PVA-3	55 ± 0,1	8 ± 0,09	201 ± 1	67	114 ± 17	57
PVA-4	38 ± 0,8	6 ± 0,1	242 ± 6	81	225 ± 12	93
PVA-5	124 ± 5	18 ± 0,9	170 ± 5	57	66 ± 2	39
PVA-6	27 ± 0,3	14 ± 0,6	231 ± 6	77	101 ± 16	44
PV-1	12 ± 0,4	1 ± 0,02	240 ± 9	80	254 ± 11	106
PV-2	53 ± 2	8 ± 0,4	209 ± 4	70	111 ± 12	53
RQ	1,0 ± 0,1	<LD	255 ± 18	85	166 ± 16	65
RL	18 ± 0,1	6 ± 0,06	226 ± 2	75	147 ± 8	65
RR	31 ± 1	2 ± 0,1	232 ± 10	77	195 ± 8	84
NX	13 ± 0,7	14 ± 0,9	223 ± 11	74	79 ± 14	35
NVef	82 ± 1	12 ± 0,08	146 ± 6	49	62 ± 0	42
GX	105 ± 2	19 ± 0,05	238 ± 6	79	67 ± 4	28
GM	39 ± 0,6	2 ± 0,02	223 ± 1	74	82 ± 5	37
CX	7,0 ± 0,3	1 ± 0,02	270 ± 2	90	80 ± 17	30
SX	39 ± 1	6 ± 0,2	249 ± 7	83	204 ± 62	82
TC	8,0 ± 0,2	1 ± 0,03	264 ± 8	88	254 ± 51	96
MT	363 ± 2	40 ± 0,2	145 ± 5	48	75 ± 3	52
M1	3 ± 0,1	<LD	415 ± 23	18	316 ± 34	76
M2	5 ± 1,3	1 ± 0,2	342 ± 5	15	148 ± 10	43
M3	2 ± 0,1	<LD	166 ± 4	30	131 ± 11	80

^a Média e desvios-padrão foram calculados para n = 3. ^b Média e desvios-padrão foram calculados para n = 21. ^c Porcentagem de extração em relação ao valor medido por ICP OES. ^d Relação porcentual entre as concentrações de Pb obtidas por *spot test* com secagem natural e ICP OES.

Os resultados indicam que a concentração de Pb determinada por ICP OES difere daquela encontrada por *spot test*. Isto pode ser explicado considerando-se que os dois métodos quantificam diferentes espécies químicas de Pb(II). As concentrações de Pb(II) determinadas pelo método de *spot test* referem-se exclusivamente a espécies de Pb(II) disponíveis para reagir com ROD. Portanto, apresentam concentração variável conforme a composição do extrato de solo obtido, ou seja, solos com maior teor de argila podem apresentar maior quantidade de partículas finas de argila ($< 0,2 \mu\text{m}$) dispersas em água, que, ao se ligarem ao Pb(II), tornam-no indisponível para reação de *spot test*. A mesma observação é válida para solos com maior teor de matéria orgânica, os quais liberam maior teor de compostos orgânicos ($< 0,2 \mu\text{m}$) que complexam Pb(II). Embora Pb(II) presente nos colóides inorgânicos e orgânicos não possam ser determinados pelo método de *spot test* podem ser quantificados por ICP OES, o que justifica as maiores concentrações de Pb(II) determinadas por esta técnica.

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostram que houve uma maior porcentagem de extração de chumbo nos solos que receberam a adição de Pb(II), em comparação aos solos naturalmente contaminados de área de mineração (M1, M2 e M3). Em média, 75% do Pb(II) adicionado aos solos foi extraído com HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ e nas amostras de área de mineração, M1, M2 e M3 foram extraídos, respectivamente, 18%, 15% e 30% do teor de Pb extraído por HNO_3 (65%) em forno de microondas (método USEPA 3051A). Estas diferenças ocorrem, pois no caso da adição de Pb(II) aos solos (dopagem) as reações de adsorção acontecem na superfície das argilas e colóides orgânicos do solo, assim, o Pb(II) permanece na fração reativa dos solos, sendo portanto extraído pelo HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ (RODRIGUES *et al.*, 2010). Por outro lado, nos solos de área de mineração uma parte considerável do Pb se encontra absorvida na matriz dos solos em uma fração denominada inerte e, portanto, não extraível pelo método utilizado (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Alguns solos (LVef, PVA-5, NVef e MT) apresentaram elevada capacidade de adsorção de Pb, visto que apenas metade do total adicionado foi extraído com HNO_3 $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 17). A maior capacidade destes solos em adsorverem

Pb, comparativamente aos demais, pode ser devida à maior capacidade de troca iônica (CTC), que reflete o maior teor de argila e matéria orgânica, e teor de ferro extraído por ditionito-citrato-bicarbonato de sódio (Fe_{DCB}) (Tabela 16). Estes resultados estão de acordo com PIRES *et al.* (2007), os quais verificaram uma maior afinidade do Pb com a matéria orgânica e óxidos de Fe e Al em solos da região de Curitiba-PR, Brasil.

Os resultados da correlação de Pearson entre a concentração de Pb(II) quantificado pelo método de *spot test* e os parâmetros dos 28 solos contaminados artificialmente são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Correlação de Pearson a 95% de confiança entre a concentração de Pb(II) quantificado pelo método de *spot test* e parâmetros dos 28 solos contaminados artificialmente.

Parâmetros	<i>spot test</i>	
	R	valor p
pH	0,0285	0,890
P	-0,5885	0,001
CTC	-0,6939	<0,001
Argila	-0,7727	<0,001
MO	-0,5832	0,001
$Fe_{(DCB)}$	-0,5788	0,001
$Fe_{(OX)}$	-0,5743	0,001
$Al_{(OX)}$	-0,5840	0,001
MnO	-0,4315	0,020

Os valores negativos de correlação (r) entre a concentração de Pb(II) quantificado pelo método de *spot test* e os parâmetros dos solos (exceto para pH), indicam uma correlação inversa, apontando que o aumento da concentração destes constituintes nos solos reduz a disponibilidade de Pb(II) para reação de *spot test*. Apesar de o pH apresentar influência nas reações de Pb no sistema solo, não foi obtida correlação deste parâmetro nas amostras estudadas com os resultados de concentração de Pb(II) obtidos pelo método de *spot test*. Desta forma, os resultados de pH não foram incluídos na análise de PCA (Figura 35).

Para análise de PCA, foram acrescentados os resultados de concentração de Ba e Sr extraídos dos solos com HNO_3 $0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ e determinados por ICP OES (Tabela 17) ao conjunto de dados da Tabela 16. Bário e estrôncio são elementos que competem por rodizonato e prejudicam a formação de PbROD (FIELG e

SUTER, 1942), como foi mostrado na primeira parte deste trabalho (item 4.3, subtítulo: *Avaliação frente a interferentes*, página 71).

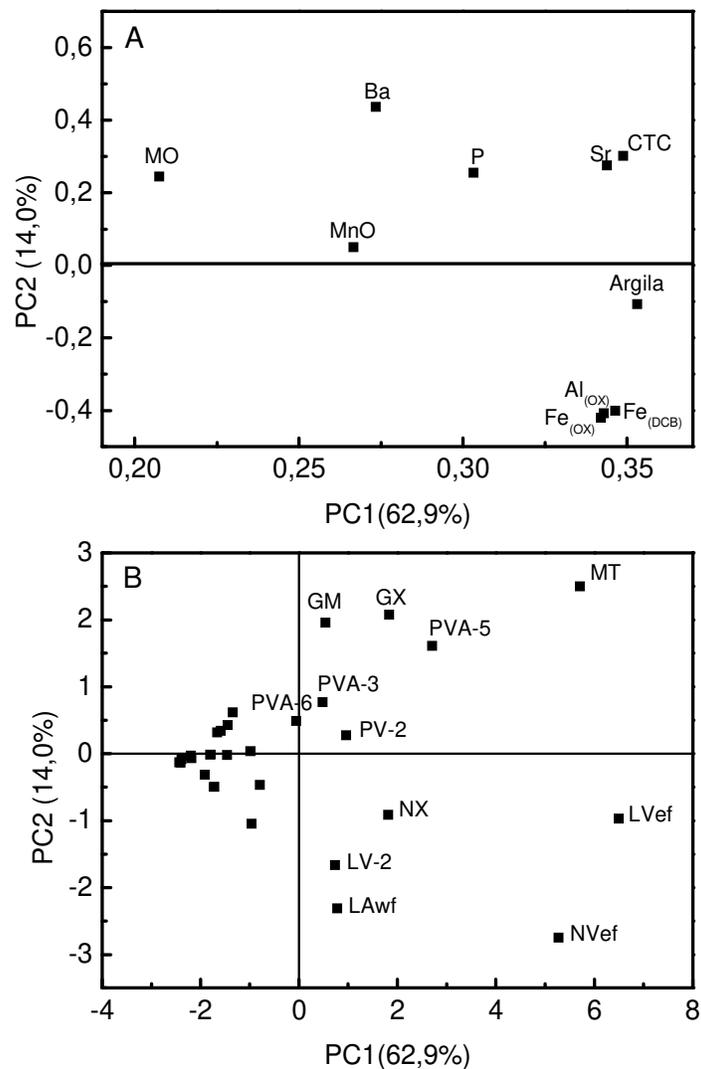


Figura 35. Agrupamento de solos semelhantes de acordo com PC1 × PC2. A-Gráfico do peso das variáveis (*loadings*); B-Gráfico da distribuição das amostras (*scores*).

Na Figura 35B omitiu-se a identificação do grupo de amostras situadas à esquerda da PC1 para facilitar a visualização das amostras que apresentaram comportamento estatístico diferenciado das demais.

Analisando os resultados das Tabelas 16 e 17 observa-se que, nas amostras de solos que não resultaram na formação de PbROD (Figura 32), pelo menos um dos parâmetros dos solos apresentados nestas tabelas está presente

em maior concentração. Esta observação é concordante com os resultados obtidos pela análise de PCA (Figura 35).

As componentes PC1 e PC2 juntas explicaram 76,9% da variância e permitem agrupar duas classes de amostras distintas: aquelas que produziram PbROD (17 amostras à esquerda) e os que não produziram PbROD (11 amostras à direita). Foi observada a formação de PbROD nas amostras PVA-3, PV-2, NX e LV-2 e estas amostras não apresentavam os mais expressivos valores de concentração dos parâmetros dos solos relacionados como variáveis na análise de PCA (Tabelas 19 e 20). Considerando-se as concentrações obtidas pelo método de *spot test* destas amostras, juntamente com os desvios (Tabela 20) estes valores encontram-se próximos ao LQ do método (95 mg kg^{-1}). Isso pode explicar a localização da amostra PVA-6 próxima a interface da linha divisória da PC1.

Os resultados desta parte do trabalho levam às seguintes conclusões:

- ✓ A curva de calibração pode ser obtida diretamente a partir de soluções aquosas de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.
- ✓ Os valores de LD e LQ do método de *spot test* para Pb(II) em solos foram 32 e 95 mg kg^{-1} de solo, respectivamente.
- ✓ As concentrações de Pb determinadas por ICP diferem daquelas encontradas por *spot test*, uma vez que os diferentes métodos podem quantificar diferentes espécies químicas de Pb(II).
- ✓ Os parâmetros dos solos responsáveis pela adsorção de Pb(II), complexação e precipitação afetam os resultados do método de *spot test*, assim como a presença de Ba(II) e Sr(II), que atuam como interferentes, impedindo ou dificultando a formação de PbROD.
- ✓ A análise de PCA indicou duas classes de amostras de solos estudadas: as que geraram PbROD e as que não geraram o produto colorido, o que pode estar associando com elevadas concentrações de alguns parâmetros do solo que reduzem a disponibilidade de Pb(II) para reação de *spot test*.

- ✓ O método de *spot test* para Pb(II) em solos indica que se houver a formação típica da coloração vermelha de PbROD pode-se estimar que a concentração de Pb(II) está acima de 95 mg kg^{-1} de solo.

Capítulo 8: Considerações Finais

O sistema químico Pb(II)/rodizonato é desafiador pois apesar de sua ampla aplicação qualitativa, não se encontram informações na literatura sobre a constante de formação de PbROD e nem sobre a fórmula estrutural do complexo. Por isso, algumas adequações propostas neste trabalho para o estabelecimento de condições para a formação do complexo resultaram de extensas avaliações experimentais.

A proposta de aplicação quantitativa do método de *spot test* para determinação de Pb(II) em solos apresenta limitações, devido à grande heterogeneidade dos solos e aos complexos mecanismos de adsorção e dessorção dos íons que influenciam na disponibilidade destes para a análise. Por outro lado, os resultados encontrados apontam boas perspectivas para aplicação do método desenvolvido para testes de *screening* previamente a análises de custo mais elevado e para elevado número de amostras. Sua aplicação pode servir como uma análise exploratória de Pb(II) em áreas de solos contaminados, inclusive para uso direto em campo, após alguns ajustes, sendo possível também expandi-las para outras matrizes.

Na literatura são encontrados diferentes critérios para cálculo de LD e LQ quando se emprega análise digital como ferramenta analítica para quantificação de compostos coloridos. Neste estudo, propõem-se o emprego da Equação 3 (página 36), porém um estudo mais aprofundado empregando outros sistemas colorimétricos é recomendável para validar seu uso.

O uso de sistemas microfluídicos em papel e da análise digital de imagens para quantificação da resposta do analito em função da concentração, introduziu uma nova linha de pesquisa para o Grupo de Pesquisas em Química Analítica e Educação (GPQUAE). Assim, além do presente trabalho já foi desenvolvido o projeto “*Determinação de alguns parâmetros de qualidade da água por spot test em papel microflúidico*” pelo Programa de Iniciação Científica Júnior (PIC-Jr). Além disso, no momento estão sendo desenvolvidas duas dissertações de mestrado e uma tese de doutorado para detecção de outros analitos em diferentes matrizes.

Capítulo 9: Tratamento de Resíduos

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados de acordo com as normas da Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

Soluções de Pb(II), Cd(II), Ba(II) e Sr(II) foram precipitados na forma de hidróxidos seguindo-se as recomendações descritas nas referências:

- ✓ Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, Committee of Hazardous Substances in the Laboratory, Washington D.C., National Academy Press, **1983**.

- ✓ Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual, Japan, International Technical Information Institute, **1982**.

Os resíduos de solos contaminados e os precipitados de Pb(II), Cd(II), Ba(II) e Sr(II) foram submetido à Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP, para enviá-los para incineração.

Capítulo 10: Referências

ABE, K.; KOTERA, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 885–893, 2010.

ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. *Analytical Chemistry*, 80, 6928–6934, 2008.

ALIMELLI, A.; FILIPPINI, D.; PAOLESSE, R.; MORETTI, S.; CIOLFI, G.; D'AMICO, A.; LUNDSTRÖM, I.; DI NATALE, C. *Analytica Chimica Acta*, 597, 103–112, 2007.

ANDREWS, P. *Adobe photoshop elements: introdução à fotografia digital*. Rio de Janeiro: Campus, 2002.

APYARI, V. V.; DMITRIENKO, S. G.; OSTROVSKAYA, V. M.; ANAEV, E. K.; ZOLOTOV, Y. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1977-1982.

ASHLEY, K.; FISCHBACH, T. J.; SONG, R. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 57, 161-165, 1996.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. C.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. *Epidemiologia Serviço de Saúde*, 17, 107-116, 2008.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. C.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. *Epidemiologia Serviço de Saúde*, 17, 107-116, 2008.

ATSDR, AGÊNCIA PARA REGISTRO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS E DOENÇAS. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>, acessado em 20/11/2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. 3ª ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007.

BARTSCH, M. R.; KOBUS, H. J.; WAINWRIGHT, K. P. *Journal of Forensic Science*, 41, 1046-1051, 1996.

BLICHARZ, T. M.; RISSIN, D. M.; BOWDEN, M.; HAYMAN, R. B.; DICESARE, C.; BHATIA, J. S.; GRAND-PIERRE, N.; SIQUEIRA, W. L.; HELMERHORST, E. J.; LOSCALZO, J.; OPPENHEIM, F. G.; WALT, D. R. *Clinical Chemistry*, 54, 1473–1480, 2008.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER J. *Química Nova*, 31, 394-400, 2008.

BRAY, J. G. P.; ROSSEL, R. V.; MCBRATNEY, A. B. *Australian Journal of Soil Research*, 47, 433–442, 2009.

BURAKOV, V. S.; RAIKOV, S. N.; TARASENKO, N. V.; BELKOV, M. V.; KIRIS, V. V. *Journal of Applied Spectroscopy*, 77, 595-608, 2010.

CAO, X.; MA, L. Q.; SINGH, S. P.; ZHOU, Q. *Environmental Pollution*, 152, 184-182, 2008.

CARRILHO, E.; PHILLIPS, S. T.; VELLA, S. J.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. *Analytical Chemistry*, 81, 5990-5998, 2009.

CHALMERS, R. A.; TELLING, G. M.A. *Mikrochimica Acta*, 6, 1127-1135, 1967.
CIOTTA, M. N.; BAYER, C.; FONTOURA, S. M. V.; ERNANI, P. R.; ALBUQUERQUE, J. A. *Ciência Rural*, 33, 1161-1164, 2003.

CLARK, S.; MENRATH, W.; CHEN, M.; RODA, S.; SUCCOP P. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 6, 27-32, 1999.

CLEGG, D. L. *Analytical Chemistry*, 22, 49-59, 1950.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf>, acessado em 03/07/2013.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA # 420, que dispõe sobre o estabelecimento de critérios e valores orientadores referentes à presença de substâncias químicas, para a proteção da qualidade do solo e sobre diretrizes e procedimentos para o gerenciamento de áreas contaminadas. 28/12/2009 Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>, acessado em 09/07/2010.

DUNGCHAIA, W.; CHAILAPAKULA, O.; HENRYC, C. S. *Analytica Chimica Acta*, 674, 227–233, 2010.

ELLERBEE, A. K.; PHILLIPS, S. T.; SIEGEL, A. C.; MIRICA, K. A.; MARTINEZ, A. W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G. M. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 8447–8452.

FEIGL, F.; ANGER, V. Spot tests in Inorganic Analysis, 6th ed. Amsterdam: Elsevier, 1972.

FEIGL, F.; ANGER, V. Spot tests in Organic Analysis, 7th ed. Amsterdam: Elsevier, 1975.

FEIGL, F.; BRAILE, N. *Anais da Associação Química do Brasil*, 3, 1-5, 1944a.

FEIGL, F.; BRAILE, N. *Anais da Associação Química do Brasil*, 3, 6-7, 1944b.

FEIGL, F.; SUTER, H. A. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 14, 840-842, 1942.

FENTON, E. M.; MASCARENAS, M. R.; LÓPEZ, G. P.; SIBBETT, S. S. *Applied Materials & Interfaces*, 1, 124-129, 2009.

GAIÃO, E. N.; MARTINS, V. L.; LYRA, W. S.; ALMEIDA, L. F.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U. *Analytica Chimica Acta*, 570, 283–290, 2006.

GANZERLI, M. T. V.; CARAMELLA, L. M. V. C. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 221, 105-108, 1997a.

GANZERLI, M. T. V.; CARAMELLA, L. M. V. C. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 221, 109-113, 1997b.

GELORMINAIN, O.; ARTZ, N. E. *Journal American Chemical Society*, 52, 2483–2494, 1930.

GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E.; OLIVEIRA, S. B. *Química Nova*, 31, 1485-1489, 2008.

GOODDY, D.C.; SHAND, P.; KINNIBURGH, D.G.; VAN RIEMSDIJK, W.H. *European Journal of Soil Science*, 46, 265–285, 1995.

GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, D. Q.; CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. *Tópicos em Ciências do Solo*, 4, 345-390, 2005.

HETTIARACHCHI, G. M.; PIERZYNSKI, G. M. *Environmental Progress*, 23, 78-93, 2004.

INFOMETRIX INC. Pirouette®, Multivariate Data Analysis, Version 4.0, 1990-2007 (Manual do Software, cuja versão de demonstração está disponível gratuitamente em www.infometrix.com/software/pirouette.html, acessado em 15/08/2013).

IRACI, G.; BACK, M. H. *Canadian Journal of Chemistry*, 66, 1293-1294, 1988.

JAYAWARDANE, B. M.; MCKELVIE, I. D.; KOLEV, S. D. *Talanta*, 100, 454–460, 2012.

JUNGREIS, E.; NECHAMA, M. *Microchemical Journal*, 34, 219-221, 1986.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3^a.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.

KLASNER, S. A.; PRICE, A. K.; HOEMAN, K. W.; WILSON, R. S.; BELL, K. J.; CULBERTSON, C. T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1821–1829, 2010.

KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAEI, F. *Analytica Chimica Acta*, 471, 97-104, 2002.

KORFMACHER, K. S.; DIXON, S. *Environmental Research*, 104, 241-249, 2007.

- LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. *Biomicrofluidics*, 6, 1-13, 2012.
- LI, X.; TIAN, J.; SHEN, W. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 495–501, 2010.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. *Analytical Chemistry*, 55, 712-724, 1983.
- LÖNNBERG, M.; CARLSSON, J. *Analytical Biochemistry*, 293, 224-231, 2001.
- LOPEZ-MOLINERO, A.; LIÑAN, D.; SIPIEIRA, D.; FALCON, R. I. *Microchemical Journal*, 96, 380-385, 2010.
- LU, Y.; WEIWEI, S.; LEI, J.; JIANHUA, Q.; BINGCHENG, L. *Electrophoresis*, 30, 1497–1500, 2009.
- MARKUS, J.; MCBRATNEY, A. B. *Environment International*, 27, 399–411, 2001.
- MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 1318-1320, 2007.
- MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 19606-19611, 2008b.
- MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; CARRILHO, E. *Analytical Chemistry*, 82, 3-10, 2010.
- MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G.; FLASH, M. *Lab on Chip*, 8, 2146–2150, 2008a.
- MCBRIDE, M.B. *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University, 1994..
- MELAMED, R.; CAO, X.; CHEN, M.; MA, L. Q. *The Science of the Total Environment*, 305, 117–127, 2003.
- MENTELE, M. M.; KIRSTEN KOEHLER, J. C.; VOLCKENS, J.; HENRY, C. S. *Analytical Chemistry*, 84, 4474-4480, 2012.
- MIELKE, H. W.; REAGAN, P. L. *Environmental Health Perspectives*, 106, Supplement 1, 217-228, 1998.
- MÜLLER, R. H.; CLEGG, D. L. *Analytical Chemistry*, 21, 1123-1125, 1949.
- NOTTEN, M.J.M.; WALRAVEN, N.; BEETS, C.J.; VROON, P.; ROZEMA, J.; AERTS, R. *Applied Geochemistry*, 23, 1581–1593, 2008.
- OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. VAN.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M.; WIJNEN, J. H. VAN. *Environmental Science and Technology*, 36, 3326-3334, 2002.

- PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS, R. C.; GANNERMAND, D. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 156-161, 2006.
- PAMPURA, T.; GROENENBERG, J.E.; LOFTS, S.; PRIPUTINA, I. *Water Air Soil Pollution*, 184, 217–234, 2007.
- PANDIT, C. M.; FILIPPELLI, G. M.; LI, L. *International Journal of Remote Sensing*, 31, 4111-4123, 2010.
- PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZABLOTSKAJA, M.; VIJVER, M.G. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 163–179, 2007.
- PEIJNENBURG, W.J.G.M.; JAGER, T. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 63–77, 2003.
- PEINADO, F. M.; RUANO, S. M.; GONZÁLEZ, M. G. B.; MOLINA, C. E. *Geoderma*, 159, 76–82, 2010.
- PELTON, R. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 925-942, 2009.
- PEREIRA, B. F. F.; ABREU, C. A. D.; ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. E. A.; PAZ-GONZÁLEZ A. *Scientia Agricola*, 64, 52-60, 2007.
- PIERANGELI, M. A. P.; GUILHERME, L. R. G.; CURI, N.; SILVA, M. L. N.; OLIVEIRA, L. R.; LIMA, J. M. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25, 269–277, 2001.
- PIERANGELI, M. A. P.; NÓBREGA, J. C. A.; LIMA, J. M.; GUILHERME, L. R. G.; ARANTES, S. A. C. M. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 4, 42-47, 2009.
- PIRES, A. C. D.; MELO, V. F.; MOTTA, A. C. V.; LIMA, V. C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 183-192, 2007.
- PREER, J. R.; MURCHISON JR, G. B. *Environmental Pollution (Series B)*, 12, 1-13, 1986.
- REDDY, K.J.; WANG, L.; GLOSS, S.P. *Plant and Soil*, 171, 53-58, (1995).
- RICE, E. W. *Industrial and Engineering Chemistry*, 4, 229-229, 1912.
- RODRIGUES, S. M. HENRIQUES, B.; SILVA, E. F.; PREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; RÖMKENS, P.F.A.M. *Chemosphere*, 81, 11, 1549-1559, 2010.
- RODRIGUES, S. M.; CRUZ, N.; COELHO, C.; HENRIQUES, B.; CARVALHO, L.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; RÖMKENS, P. F. A. M. *Environmental Pollution*, 1-9, 2012.
- RÖMKENS, P. F.; GUO, H.; CHU, C.; LIU, T.; CHIANG, C.; KOOPMANS, G. F. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 216–228, 2009.

RÖMKENS, P.F.A.M., GROENENBERG, J.E., BRIL, J., VRIES, W. *Alterra-rapport 305*, 2004.

ROSSITER JR, W. J.; VANGEL, M. G.; MCKNIGHT, M. E.; DEWALT, G. *NISTIR 6398*, 2000.

RUBY, M. V.; SCHOOF, R.; BRATTIN, W.; GOLDADE, M.; POST, G.; HARNOIS, M.; MOSBY, D. E.; CASTEEL, S. W.; BERTI, W.; CARPENTER, M.; EDWARDS, D.; CRAGIN, D.; CHAPPELL, W. *Environmental and Science Technology*, 33, 3657-3705, 1999.

RYAN, J. A.; ZHANG, P.; HESTERBERG, D.; CHOU, J.; SAYERS, D. E. *Environmental Science & Technology*, 35, 3798-3803, 2001.

SAPSFORD, K. E.; FRANCIS, J.; SUN, S.; KOSTOV, Y.; RASOOLY, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 499–505, 2009.

SAUVÉ, S.; MCBRIDE, M. *Environmental Science & Technology*, 32, 388-393, 1998.

SCHIMIDT, F. Desenvolvimento de um programa computacional para tratamento de imagens digitalizadas e sua aplicação em química analítica. 1997, 82 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SCURI, A. E. Disponível em:

<http://www.inf.ufes.br/~thomas/graphics/www/apostilas/CIV2801ScurilmgDigital.pdf> acessado em 21/11/2012.

SHEETS, R. W. *The Science of the Total Environment*, 219, 13-19, 1998.

SOARES, M. R. Coeficiente de distribuição (K_d) de metais pesados em solos do estado de São Paulo. 2004, 202 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Solos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP), Piracicaba.

SPARKS, D. L. *Soil physical chemistry*. 2.ed. New York: CRC Press, 1999.

TAI, Y.; MCBRIDE, M. B.; LI, Z. *Talanta*, 107, 183-188, 2013.

TEASDALE, P. R.; HAYWARD, S.; DAVISON, W. I. *Analytical Chemistry*, 71, 2186-2191, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. *Pure Applied Chemistry*, 74, 835-855, 2002.

TIPPING, E.; RIEUWERTS, J.; PAN, G.; ASHMORE, M.R., LOFTS, S.; HILL, M.T.R.; FARAGO, M.E.; THORNTON, I. *Environmental Pollution*, 125, 213–225, 2003.

TOTEU, S.F.; MICHARD, A.; BERTRAND, J.M.; ROCCI, G. *Precambrian Research*, 37, 71-87, 1987.

USEPA, AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>, acessado em 21/11/2012.

VAITSMAN, D. S.; CALDAS, A.; MIRANDA, D. P. *Revista de Química Industrial*, 317, 29-30, 1979.

VAN RAIJ, B.; KÜPPER, A. *Bragantia*, 25, 327-336, 1966.

de VRIES, W.; GROENENBERG, J.E.; MURÁNYI, A.; CURLIK, J.; ŠEFCÍK, P.; RÖMKENS, P.F.A.M.; REINDS, G. J.; BRIL, J.; MODIN, A. K.; SVERDRUP, H. U.; ALLOWAY, B. J. *Alterra-repport 816*, 2003.

WANG, W.; WU, W.; WANG, W.; ZHU, J. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3896–3899, 2010.

YAGODA, H. *Industrial and Engineering Chemistry*, 9, 79-82, 1937.

ZAMORA, L. L.; LÓPEZ, P. A.; FOS, G.M. A.; ALGARRA, R. M.; ROMERO, A.M. M.; CALATAYU, J. M. *Talanta*, 83, 1575–1579, 2011.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. *Química Nova*, 31, 731-734, 2008.

ZHAO, B.; BACK, M. H. *Canadian Journal of Chemistry*, 69, 528-532, 1991.

ZWEIG, G.; SHERMA, J. *Paper chromatography and electrophoresis*. V.2. Academic press, 1971.