

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Gláucio Gualtieri Honório

**QUANTIFICAÇÃO DE COBRE, CÁDMIO, CHUMBO E  
ZINCO EM MEL POR VOLTAMETRIA DE PULSO  
DIFERENCIAL COM ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO**

Orientador: Renato Camargo Matos

Juiz de Fora

2013

Gláucio Gualtieri Honório

QUANTIFICAÇÃO DE COBRE, CÁDMIO, CHUMBO E  
ZINCO EM MEL POR VOLTAMETRIA DE PULSO  
DIFERENCIAL COM ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Juiz de Fora

2013

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

Honório, Gláucio Gualtieri.

Quantificação de cobre, cádmio, chumbo e zinco em mel por voltametria de pulso diferencial com eletrodo de diamante dopado com boro / Gláucio Gualtieri Honório. -- 2013.  
120 f. : il.

Orientador: Renato Camargo Matos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

1. mel. 2. metais pesados. 3. voltametria de redissolução anódica. 4. eletrodo de diamante dopado com boro. I. Matos, Renato Camargo, orient. II. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

UFJF  
Pós-Graduação  
em Química

A presente dissertação, intitulada "**Quantificação de cobre, cádmio, chumbo e zinco em mel por voltametria de pulso diferencial com eletrodo de diamante dopado com boro**" de autoria de Gláucio Gualtieri Honório, submetida à Comissão Examinadora abaixo assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA** em 08 de março de 2013.

Juiz de Fora, 08 de março de 2013.

Prof. Dr. Renato Camargo Matos  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Felipe Silva Semaan  
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Júlio César José da Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS:**

A Deus, por mais essa conquista.

Aos meus pais, Nilva e Dario, pelo apoio, paciência, dedicação e carinho de sempre.

A minha tia Nilda (*in memorian*), pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos meus amigos, principalmente Jionn pelo apoio e companheirismo.

Ao Renato, pela orientação, dedicação, paciência e pela confiança.

Ao professor Marcone, que me auxiliou na parte estatística do trabalho.

Ao professor Rafael, que me auxiliou na etapa de tratamento da amostra.

Ao Gustavo, do NUPIS, pela ajuda na construção da célula eletroquímica.

À Aparecida, do NUPIS, pela ajuda com as medidas de absorção atômica.

A todos os professores do Departamento de Química da UFJF pelos ensinamentos.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

*Dedicado aos meus  
pais, familiares e  
amigos, pelo carinho,  
incentivo e  
dedicação.*

## RESUMO

Dependendo da sua origem, o mel pode ter uma mistura de diferentes componentes, principalmente carboidratos, que conferem sabor adocicado ao produto. A concentração mineral é baixa, e depende do ambiente onde o mel é produzido, sendo afetada pela composição do solo, pela geologia e pelas condições geográficas locais. Por ser resultado de um processo de bioacumulação, o mel pode ser utilizado para obter informações a respeito do ambiente em que as abelhas produtoras vivem. O presente trabalho desenvolveu uma metodologia para extração e quantificação de Cu, Pb, Cd e Zn em mel com eletrodo de diamante dopado com boro, por voltametria de pulso diferencial.

A metodologia foi otimizada por meio de planejamento de experimentos, com obtenção de modelos de previsão, após um estudo detalhado a cerca da ativação da superfície do eletrodo. O uso de ferramentas estatísticas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Variância e superfícies de resposta auxiliaram na obtenção de condições ótimas de análise para os metais com o eletrodo proposto. Para análise de Cu, Pb e Cd utilizou-se o potencial de deposição de  $-0,95\text{ V vs Ag|AgCl}$  por 240 segundos, em ácido clorídrico  $0,1\text{ molL}^{-1}$ . A análise de Zn foi realizada em tampão acetato  $0,5\text{ molL}^{-1}$  com um potencial de deposição de  $-1,5\text{ V vs Ag|AgCl}$  por 240 segundos. Por se tratar de uma matriz heterogênea e rica em matéria orgânica, um tratamento de digestão da amostra foi necessário. A mineralização do mel em chapa de aquecimento foi o procedimento mais adequado para tratamento da amostra. O método otimizado apresentou seletividade, boa sensibilidade, precisão, exatidão e robustez. A concentração dos analitos encontrados variaram entre  $0,242$  e  $1,378\text{ mgL}^{-1}$  para o Cu;  $0,129$  e  $0,918\text{ mgL}^{-1}$  para o Pb e  $0,819$  e  $2,492\text{ mgL}^{-1}$  para o Zn. O Cd não foi detectado em nenhuma das amostras. As medidas obtidas foram comparadas com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, e os resultados encontrados não diferiram estatisticamente, sendo analisados por Análise de Variância.

**Palavras chave:** mel, metais pesados, voltametria de redissolução anódica, eletrodo de diamante dopado com boro.

## ABSTRACT

Depending on the origin, honey can be a mixture of different components, mainly carbohydrates, which give a sweet taste to the product. The mineral concentration is low and depends on the environment where the honey is produced, being affected by soil composition, geology and by the respective geographical locations. Being the result of a process of bioaccumulation, honey can be used to collect information about of environment in which bees live. This study developed a methodology for the extraction and quantification of Cu, Pb, Cd and Zn in honey with boron-doped diamond electrode, by differential pulse voltammetry.

The methodology was optimized through design of experiments, obtaining prediction models, after a detailed study concerning the activation of the electrode surface. The use of statistical tools such as Principal Components Analysis, Analysis of variance and response surfaces assisted in obtaining optimum conditions for the analysis of metals with such electrode. For analysis of Cu, Pb and Cd was used the deposition potential of  $-0.95\text{ V}$  vs Ag|AgCl for 240 seconds, hydrochloric acid  $0.1\text{ molL}^{-1}$ . Zn analysis was performed in acetate buffer  $0.5\text{ mol L}^{-1}$  with a deposition potential of  $-1.5\text{ V}$  vs Ag|AgCl for 240 seconds. Because it is a heterogeneous matrix, rich in organic matter, treatment of digestion of the sample was necessary. The mineralization of honey on heating plate was the most appropriate for treatment of the sample. The optimized method showed selectivity, good sensitivity, precision, accuracy and robustness. The concentration of analytes ranged between  $0.242$  and  $1.378\text{ mgL}^{-1}$  for Cu,  $0.129$  and  $0.918\text{ mgL}^{-1}$  for Pb and  $0.819$  and  $2.492\text{ mgL}^{-1}$  for Zn. The Cd was not detected in any sample. The measurements obtained were compared with glassy carbon electrode modified with mercury film and atomic absorption spectrometry with graphite furnace, and the results did not differ statistically, by Analysis of variance.

**Keywords:** honey, heavy metals, stripping anodic voltammetry, boron-doped diamond electrode.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da difusão de substâncias presentes no ambiente.....	4
<b>Figura 2.</b> Processos industriais de contaminação do mel.....	6
<b>Figura 3.</b> (a) Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial e, (b) Voltamograma de um experimento de voltametria de pulso diferencial, $\Delta i = i_2 - i_1$ .....	10
<b>Figura 4.</b> Etapas envolvidas na voltametria de redissolução anódica.....	12
<b>Figura 5.</b> Intervalo de potencial de aplicação aproximado para os eletrodos de platina, mercúrio, carbono vítreo e diamante dopado com boro.....	15
<b>Figura 6.</b> Fotografias mostrando a montagem da cela eletroquímica.....	22
<b>Figura 7.</b> Disposição dos pontos no planejamento Box-Behnken para $k=3$ .....	26
<b>Figura 8.</b> Fluxograma representando a mineralização ácida em chapa de aquecimento.....	30
<b>Figura 9.</b> Efeito do tipo de pré-tratamento na resposta eletroquímica do BDD em solução aquosa $1 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .....	34
<b>Figura 10.</b> Efeito do tipo de pré-tratamento na resposta eletroquímica do BDD em solução aquosa $1 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ após o pré-tratamento catódico.....	36
<b>Figura 11.</b> Voltamogramas para o (a) ensaio 7 e para o (b) ensaio 8 no planejamento fatorial para determinação de Cu, Cd e Pb com BDD.....	39
<b>Figura 12.</b> Gráfico de escores PCA para otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.....	43
<b>Figura 13.</b> Gráfico de loadings PCA para otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.....	46
<b>Figura 14.</b> Superfícies de respostas para determinação de Pb com BDD.	48
<b>Figura 15.</b> Superfícies de respostas para determinação de Cd com BDD.	49
<b>Figura 16.</b> Superfícies de respostas para determinação de Cu com BDD.	51
<b>Figura 17.</b> Voltamogramas para (a) o melhor ensaio e (b) o pior ensaio no planejamento fatorial para determinação de Cu, Cd e Pb com eletrodo	

de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	54
<b>Figura 18.</b> Voltamogramas para o (a) ensaio 4 e para o (b) ensaio 3 no planejamento fatorial para determinação de Zn.....	57
<b>Figura 19.</b> Superfície de resposta para determinação de Zn com BDD.....	59
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas para (a) o ensaio 3 e (b) o ensaio 5 no planejamento fatorial para determinação de Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	62
<b>Figura 21.</b> Voltamograma exibindo sinais analíticos para Cu, Pb e Cd com adição de padrão para uma das amostras, exibindo a seletividade do método.....	68
<b>Figura 22.</b> Curvas analíticas para Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD.	69
<b>Figura 23.</b> Curvas analíticas para (a) Cu (b), (c) Cd e (d) Zn com eletrodo de carbono vítreo.....	70
<b>Figura 24.</b> Representação da avaliação da exatidão de um método analítico.....	73
<b>Figura 25.</b> VPD de Cd, Pb e Cu em 2,00 mL de de HCl 0,1molL <sup>-1</sup> com 500 µL de amostra e adições de b) Cu e c) Pb na faixa de 11 a 33 µgL <sup>-1</sup> .....	78
<b>Figura 26.</b> (a) VPD de Zn em 2,00 mL de tampão acetato 0,5 molL <sup>-1</sup> com 250 µL de amostra e (b) adições de Zn na faixa de 11 a 33 µgL <sup>-1</sup> .....	80
<b>Figura 27.</b> VPD de Cd, Pb e Cu em 2,00 mL de de HCl 0,1molL <sup>-1</sup> com 500 µL de amostra e adições de b) Cu e c) Pb na faixa de 11 a 33 µgL <sup>-1</sup> .....	83
<b>Figura 28.</b> (a) VPD de Zn em 2,00 mL de tampão acetato 0,5 mol L <sup>-1</sup> com 250 µL de amostra e (b) adições de Zn na faixa de 11 a 33 µg L <sup>-1</sup> com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio.....	85
<b>Figura 29.</b> Curvas analíticas para determinação de Cu, Cd, Pb e Zn por GFAAS.....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química aproximada do mel.....	3
<b>Tabela 2.</b> Faixa de concentração de metais em amostras de mel em diferentes regiões de origem, em $\mu\text{g g}^{-1}$ .....	5
<b>Tabela 3.</b> Algumas propriedades fundamentais do diamante.....	14
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre as principais propriedades do BDD e do eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	16
<b>Tabela 5.</b> Origem geográfica e botânica das amostras analisadas.....	20
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros eletroquímicos fixados para a realização do planejamento fatorial para Cu, Pb e Cd.....	27
<b>Tabela 7.</b> Níveis avaliados para os parâmetros no planejamento fatorial para Cu, Pb e Cd.....	27
<b>Tabela 8.</b> Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização dos parâmetros na análise de Cu, Pb e Cd.....	27
<b>Tabela 9.</b> Níveis avaliados para o planejamento fatorial de Zn.....	28
<b>Tabela 10.</b> Massas de mel para o preparo de soluções aquosas 50 % (m/m) em água.....	29
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros utilizados nas etapas de operação e aquecimento para as determinações de Cu, Cd, Pb e Zn em mel.....	32
<b>Tabela 12.</b> Correntes obtidas da matriz planejamento para a determinação simultânea de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.....	39
<b>Tabela 13.</b> Valores dos efeitos e seus respectivos erros da matriz planejamento para a determinação simultânea de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.....	40
<b>Tabela 14.</b> Quadro ANOVA para avaliação dos modelos obtidos para análise de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.....	42
<b>Tabela 15.</b> Parâmetros selecionados para análise simultânea de Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.....	52
<b>Tabela 16.</b> Matriz planejamento fatorial para Cu, Pb e Cd com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	53
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros selecionados para análise simultânea de Cu, Pb e	

Cd com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	55
<b>Tabela 18.</b> Matriz do planejamento 3 <sup>2</sup> e os resultados obtidos para o Zn..	56
<b>Tabela 19.</b> Valores dos efeitos e seus respectivos erros da matriz planejamento para a determinação de Zn com eletrodo de BDD.....	58
<b>Tabela 20.</b> Quadro ANOVA para avaliação dos modelos obtidos para análise de Zn com eletrodo de BDD.....	59
<b>Tabela 21.</b> Parâmetros selecionados para análise de Zn com eletrodo de BDD.....	60
<b>Tabela 22.</b> Matriz planejamento fatorial para Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	61
<b>Tabela 23.</b> Parâmetros selecionados para análise de Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio.....	63
<b>Tabela 24.</b> Limites de Detecção (L.D.) para Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD e carbono vítreo modificado com mercúrio, em µgL <sup>-1</sup> .....	72
<b>Tabela 25.</b> Limites de Quantificação (L.Q.) para Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD e carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, em µgL <sup>-1</sup> .....	72
<b>Tabela 26.</b> Valores de recuperação (%) de Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD.....	74
<b>Tabela 27.</b> Características e massas das soluções de mel analisadas.....	76
<b>Tabela 28.</b> Tolerância máxima de Cu, Cd, Pb e Zn em mel de acordo com a Resolução Normativa nº 9 da ANVISA de 1978.....	77
<b>Tabela 29.</b> Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb e Cd em amostras de mel com eletrodo de BDD.....	79
<b>Tabela 30.</b> Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Zn em amostras de mel com eletrodo de BDD.....	81
<b>Tabela 31.</b> Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb e Cd em amostras de mel com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	84
<b>Tabela 32.</b> Valores encontrados com os respectivos desvios-padrão para as concentrações Zn em amostras de mel com eletrodo de carbono vítreo	

modificado com filme de mercúrio.....	86
<b>Tabela 33.</b> Valores encontrados com os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb, Cd e Zn com GFAAS.....	89
<b>Tabela 34.</b> Valores de concentração de Cu nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e GFAAS, em $\text{mgL}^{-1}$ .....	90
<b>Tabela 35.</b> Quadro ANOVA para as concentrações de Cu encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.....	91
<b>Tabela 36.</b> Valores de concentração de Pb nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e GFAAS, em $\text{mgL}^{-1}$ .....	92
<b>Tabela 37.</b> Quadro ANOVA para as concentrações de Pb encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.....	93
<b>Tabela 38.</b> Valores de concentração de Zn nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e GFAAS, em $\text{mgL}^{-1}$ .....	94
<b>Tabela 39.</b> Quadro ANOVA para as concentrações de Zn encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APACAME	Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíferas Europeias
b	inclinação da curva analítica
BDD	diamante dopado com boro (do inglês boron-doped diamond)
$C_f$	concentração do analito na amostra fortificada;
$C_{nf}$	concentração do analito na amostra não fortificada;
$C_t$	concentração do analito adicionado a amostra fortificada.
CVD	deposição de vapor químico (do inglês chemical vapor deposition)
DME	eletrodo gotejante de mercúrio (do inglês drop Mercury electrode)
E	Potencial
$E_{cond}$	potencial de condicionamento
$E_d$	potencial de deposição
$E_{lim}$	potencial limite
FAAS	espectrometria de absorção atômica por chama (do inglês flame atomic absorption spectrometry)
GFAAS	espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (do inglês graphite furnace atomic absorption spectrometry)
gl	graus de liberdade
HDME	eletrodo de gota pendente de mercúrio (do inglês hanging drop Mercury electrode)
ICP-MS	espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês mass spectrometry with inductively coupled plasma)
ICP-OES	espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (do inglês emission spectroscopy with inductively coupled plasma)
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MFE	eletrodo de filme de mercúrio (do inglês Mercury film electrode)
MQ	Média quadrática

MQ <sub>ep</sub>	Média quadrática de erro puro
MQ <sub>faj</sub>	Média quadrática de falta de ajuste
ND	Não detectado
PCA	Análise dos componentes principais (do inglês Principal components analysis)
PNCR	Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos
R	recuperação;
s	desvio-padrão do intercepto da curva analítica
SQ	Soma quadrática
SQ <sub>ep</sub>	Soma quadrática de erro puro
SQ <sub>faj</sub>	Soma quadrática de falta de ajuste
t <sub>cond</sub>	tempo de condicionamento
t <sub>d</sub>	tempo de deposição
t <sub>equi</sub>	tempo de equilíbrio
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VPD	voltametria de pulso diferencial

## SUMÁRIO:

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1.O MEL.....	1
1.2. MEL COMO INDICADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	4
1.3. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MEL.....	7
1.4. A VOLTAMETRIA NA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	8
1.4.1 A Voltametria de pulso diferencial (VPD).....	9
1.5. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	11
1.6. O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD).....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	18
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	18
3.2 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS.....	19
3.3 AMOSTRAS.....	20
3.4 ELETRODOS E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS.....	20
3.5 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	23
3.5.1 Controle da contaminação .....	23
3.5.2 Ativação da superfície do BDD.....	23
3.5.3 Otimização das condições de análise.....	24
3.5.3.2 Otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd.....	26
3.5.3.2 Otimização das condições de análise para Zn.....	28
3.5.4 Mineralização das amostras.....	28
3.5.4.1 Diluição da amostra.....	29
3.5.4.2 Solubilização em banho de ultrassom.....	29
3.5.4.3 Mineralização ácida em chapa de aquecimento.....	30
3.5.5 Determinação de Cu, Pb, Cd e Zn por VPD.....	31
3.5.6 Determinação de Cu, Pb, Cd e Zn por GFAAS.....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	33
4.1 ATIVAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO BDD.....	33
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE.....	37



4.2.1 Otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd.....	38
4.2.2 Otimização das condições de análise para Zn.....	55
4.3 MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	63
4.3.1 Diluição da amostra (análise direta).....	64
4.3.2 Solubilização em banho de ultrassom.....	64
4.3.3 Mineralização ácida em chapa de aquecimento.....	66
4.4 FIGURAS DE MÉRITO.....	67
4.4.1 Seletividade /especificidade.....	67
4.4.2 Linearidade /Faixa de trabalho.....	68
4.4.3 Limite de Detecção / Limite de Quantificação.....	71
4.4.4 Exatidão.....	73
4.4.5 Robustez.....	75
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR VPD COM ELETRODO DE BDD.....	76
4.5.1 Quantificação de Cu, Pb e Cd em mel por VPD com eletrodo de BDD.....	77
4.5.2 Quantificação de Zn em mel por VPD com eletrodo de BDD.....	80
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR VPD COM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM FILME DE MERCÚRIO.....	82
4.6.1 Quantificação de Cu, Pb e Cd em amostras de mel por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	82
4.6.2 Quantificação de Zn em amostras de mel por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.....	84
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR GFAAS.....	87
4.8 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR VPD E GFAAS.....	90
4.8.1 Cobre.....	90
4.8.2 Chumbo.....	92
4.8.3 Zinco.....	94
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

<b>7. ANEXOS</b> .....	103
<b>ANEXO 1:</b> Tabela de Distribuição F a 95 % de confiança.....	103
<b>ANEXO 2:</b> Tabela de Distribuição F a 99 % de confiança.....	104

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. O MEL:

O mel é uma substância doce e viscosa produzido pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir do néctar de diferentes flores e de secreções de partes vivas das plantas, ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas que as abelhas recolhem, combinam com substâncias específicas próprias e deixam maturar nos favos da colméia. [1] O mel pode ser classificado segundo sua origem botânica e seu procedimento de obtenção. De acordo com sua origem botânica, o mel pode ser: [2]

- Mel floral: é o mel obtido principalmente do néctar das flores.

Distingue-se em: [2]

- mel unifloral ou monofloral: quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias,
- mel multifloral ou polifloral: é o mel obtido a partir de diferentes origens florais.
- mel de melato: é o mel obtido primordialmente a partir de secreções das partes vivas das plantas e das excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas.

Segundo o procedimento de obtenção, o mel pode ser: [2]

- mel escorrido: é o mel obtido por escorrimento dos favos desoperculados, sem larvas;
- mel prensado: é o mel obtido por prensagem dos favos sem larvas;
- mel centrifugado: é o mel obtido por centrifugação dos favos desoperculados, sem larvas, e
- mel filtrado: é o que foi submetido a um processo de filtração sem alterar o seu valor nutritivo.

Devido ao seu sabor, o mel é usado como um substituinte do açúcar, e é um dos alimentos mais populares do mundo.[3] Além de ser um alimento apreciado pelo homem desde a antiguidade, o mel tem importante papel na

medicina tradicional por apresentar propriedades antioxidantes, bactericidas, antifúngicas, dentre outras. [4] O mel é uma fonte energética possuindo grande valor nutricional, além de propriedades profiláticas. [3]

As reservas florais brasileiras podem proporcionar milhares de toneladas de mel, fazendo do Brasil um grande exportador do produto. Segundo dados da APACAME (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíferas Européias) as estatísticas sobre a cadeia apícola revelam que, em 2003, existiam 80.000 apicultores, dos quais 85% eram considerados pequenos (10 a 20 colméias) e praticavam a apicultura fixa e os 15% restantes eram considerados apicultores profissionais (média de 400 colméias) e praticavam a apicultura migratória. As 1.600.000 colméias habitadas pelas abelhas africanizadas produziam 35.000 toneladas de mel/ano. Hoje, 10 anos depois, as exportações brasileiras de mel triplicaram e o mercado atual dos produtos apícolas no país é de aproximadamente US\$ 360 milhões. Apesar desse sucesso, em 2006 a União Europeia suspendeu a importação do mel devido a não implementação dos compromissos anteriormente firmados em relação ao monitoramento da qualidade do produto. Dentre estes compromissos está a implantação de um Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCR) desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Este plano visa dar garantias de controle dos resíduos e contaminantes dos produtos pecuários brasileiros destinados à exportação e ao mercado interno, o que inclui o monitoramento de resíduos de vários antibióticos e de contaminantes inorgânicos. [5,6]

Dependendo da origem das plantas e da composição química do néctar produzido por elas, o mel pode ter uma mistura de diferentes carboidratos (monossacarídeos e dissacarídeos) (Tabela 1), incluindo frutose (27,3-44,3%), glicose (22,0-40,8%), maltose (2,7-16,0%), demais açúcares (0,1-8,5%), proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais [7], traços de ácidos orgânicos, enzimas, pigmentos, pólen, cera, dentre outros, que são adicionados pelas abelhas ou se devem a manipulação e maturação do mel. [8] Todos os componentes são dissolvidos em água (13,4-22,9%), o que confere ao produto diferentes cores e texturas. A contribuição dos minerais geralmente é baixa, em torno de 0,1-0,2%. [9] Desse modo, a concentração de elementos metálicos

geralmente é maior no mel de melato que no mel floral. [4] A concentração de metais contidos no mel deriva do ambiente em que ele é produzido. Eles são transportados para as plantas diretamente pela raiz, passam para o néctar e finalmente para o mel produzido pelas abelhas [10]. A composição dos metais no mel, principalmente os majoritários (Ca, K, Mg, Mn, Na), é afetada pela composição do solo, determinada pela geologia e condições geográficas locais (existência de atividade vulcânica ou hidrotermal, clima, vegetação) [8]. O tipo de flor, a composição do néctar e do pólen também são responsáveis pela variação da concentração dos metais contidos no mel. Dessa forma, a concentração dos metais pode ser um indicativo da origem geográfica e botânica das amostras de mel [11]. O metal mais abundante no mel é o K (45-85%). Outros metais presentes em grandes quantidades são Na, Ca e Mg. Em quantidades intermediárias são encontrados Cu, Fe, Zn e Mn. Em quantidades traço ( $<1 \mu\text{gg}^{-1}$ ) estão Al, Cd, Co, Cr, Ni, Pb. Os metais podem influenciar em algumas características do mel, como por exemplo, a cor. Mel mais escuro apresenta uma maior quantidade de Cd, Fe e Pb, enquanto cores mais claras está associada a presença de Al e Mg. [12]

Tabela 1. Composição química aproximada do mel [8,9].

<b>Composto</b>	<b>Concentração</b>
frutose	27-44% (m/m)
glicose	22-40% (m/m)
maltose	2,5-16% (m/m)
isomaltose	0-2% (m/m)
sacarose	0-1% (m/m)
outros açúcares	0-8% (m/m)
água	15-20% (m/m)
Prolina	200-500 $\mu\text{gg}^{-1}$
$\alpha$ -aminoácidos	400-900 $\mu\text{gg}^{-1}$
hidroximetilfurfural	1-25 $\mu\text{gg}^{-1}$
sódio	300-500 $\mu\text{gg}^{-1}$
potássio	400-1200 $\mu\text{gg}^{-1}$
cálcio	150-300 $\mu\text{gg}^{-1}$
magnésio	40-80 $\mu\text{gg}^{-1}$
ferro	5-40 $\mu\text{gg}^{-1}$
outros elementos	0-1 % (m/m)

## 1.2. MEL COMO INDICADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL:

O mel é resultado de um processo de bioacumulação. Dessa forma, tal matriz pode ser usada para obter informações relacionadas ao ambiente em que as abelhas vivem. [13,14] A cada dia, de 10000 a 25000 abelhas operárias fazem uma média de 10 viagens para explorar aproximadamente 7 km<sup>2</sup> nas áreas que cercam seu *habitat*, entrando em contato não somente com o ar, mas também com a água e o solo dessa região (Figura 1), recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante esse processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por elas e ficam retidos nos pelos do seu corpo ou são inalados no seu aparelho respiratório, fazendo com que o mel seja produzido com algum nível, ainda que pequeno, de contaminação. [5]

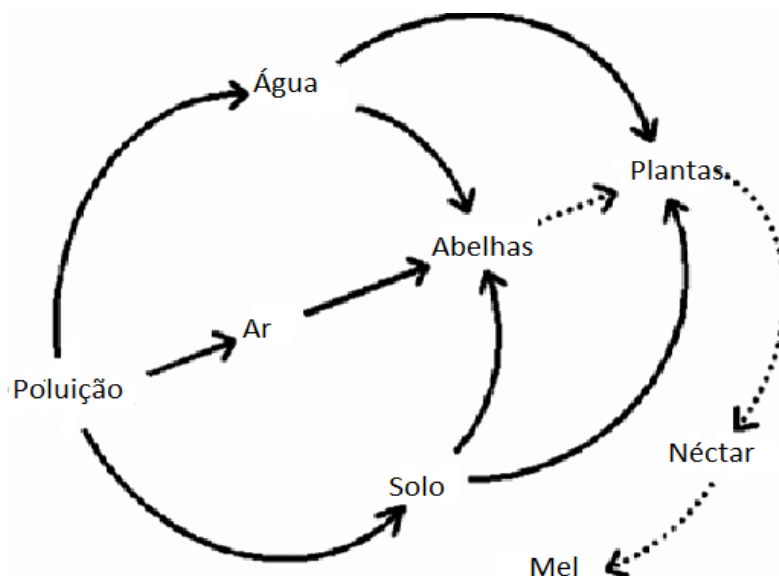


Figura 1. Representação da difusão de substâncias presentes no ambiente.[12]

Aparentemente, o mel produzido perto de áreas urbanas e industriais possui um aumento na concentração de certos metais, evidenciando que a investigação de metais traço no mel pode ajudar no estudo da qualidade do ar em diferentes regiões e cidades (Tabela 2). [12] Experimentos realizados na Polônia mostraram grandes flutuações nos teores de metais pesados em amostras de mel, sendo que grandes quantidades de metais pesados foram

encontradas em méis de colmeias situadas próximas a siderúrgicas. [15] Pesquisadores italianos encontraram grandes quantidades de Zn, Cd e Pb em méis, sendo detectada uma relação linear entre a quantidade de Cd que foi encontrada no mel com outros marcadores biológicos, como, por exemplo, flores de *Trifolium pratense*, sendo, portanto, possível que o conteúdo de metais pesados no mel possa ser útil para avaliar a presença de contaminantes ambientais. [15]

O mel também pode ser contaminado por metais pesados durante o processo industrial (Figura 2), devido ao contato com equipamentos metálicos usados para produção e preparação do mel (extração, centrifugação, maturação, sedimentação e armazenamento) [12,16] A acidez natural do mel (pH entre 3,5-4,8) e seu efeito corrosivo aumentam as chances de contaminação por metais durante o processo industrial [12]. Os metais também podem ser introduzidos em substâncias utilizadas na nutrição das abelhas, tais como xaropes. [17]

Tabela 2. Faixa de concentração de metais em amostras de mel em diferentes regiões de origem, em  $\mu\text{gg}^{-1}$ . [12]

<b>Origem</b>	<b>K</b>	<b>Na</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>
Brasil	167-3353	139-509	7-237	ND-373	ND- 14	ND	ND
Egito	213-15550	378-2550	ND	102-1325	5-9.3	0,01-0,5	ND
França	ND	ND	3-108	1,4-110	0,04-5,96	ND	ND
Itália	147-4136	6,10-232	9,10-409	3,9-159	0,6-3,66	0,001-0,305	0,003-0,620
Espanha	14-6785	11-1221	13,8-341	3,6-230	0,07-19,1	<0,001-0,365	ND-1,20
Turquia	143-6029	9,3-172	3,3-900	2-111	ND-20,2	<0,001-0,340	ND-1,20

ND: não detectado

<b>PROCESSO</b>	<b>FONTE DE CONTAMINAÇÃO</b>
Remoção ↓	solo, matérias de plantas, ambiente
Extração ↓	extratores, tanques, umidade, poeira
Filtração ↓	filtros, maturadores, peneiras, decantadores, aquecedores
Sedimentação ↓	recipientes, umidade, poeira, altas temperaturas
Armazenagem	máquinas de engarrafamento, recipientes, umidade, poeira, altas temperaturas.

Figura 2. Processos industriais de contaminação do mel [12].

Além do monitoramento ambiental, a determinação de espécies inorgânicas potencialmente tóxicas (como os metais pesados) é interessante para o controle da qualidade do mel e dos aspectos nutricionais. [18] Os íons metálicos (dentre eles, o Cu e o Zn) são necessários para muitas das funções vitais do organismo humano. A falta ou o excesso de metais ou de quaisquer outros elementos químicos pode ser prejudicial à saúde, ou seja, um desequilíbrio na concentração de alguns destes elementos pode levar a pessoa à morte. Alguns metais e semi-metais, por sua vez, quando presentes no organismo humano, podem causar intoxicações, como, por exemplo, o Cd e o Pb. [19]

Apesar do Zn ser essencial ao organismo, contribuindo para o bom funcionamento hormonal, sensibilização do paladar e do olfato e auxiliar no processo de cicatrização [20], sua ingestão em excesso pode causar danos à saúde, tais como anemia, diferentes anormalidades durante a gestação, além de deficiência no crescimento de indivíduos em desenvolvimento. [21] Já o cobre é essencial para incorporar o ferro do organismo a hemoglobina. [22] Porém, em grandes quantidades, pode causar problemas como a presença de sabor metálico na boca, náusea, diarreia, icterícia, hemoglobinúria, hematúria e



oligúria. Além disso, existem problemas genéticos causados pelo excesso de cobre, exemplificado pela ocorrência da doença de Wilson. [23,24]

Dentre os metais que causam sérios distúrbios ao organismo humano mesmo em baixas concentrações, podemos citar o cádmio e o chumbo. O cádmio, bastante citado em noticiários por fazer parte da composição de baterias de telefones celulares, pode causar problemas gastrintestinais e respiratórios, além de ser comprovadamente um agente carcinogênico. [25] O chumbo, pode causar intoxicação através da absorção pelo sistema gastrointestinal e pelas vias respiratórias, causando alterações no aspecto cognitivo, neurocomportamental e neurofisiológico, além de ser carcinogênico. Causa encefalopatia, irritabilidade, cefaléia, tremor muscular, alucinações, perda de memória e da capacidade de concentração, lenta e progressiva deficiência renal. [19,26]

### 1.3. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MEL:

A literatura descreve a determinação de impurezas metálicas em mel utilizando técnicas e métodos diversos. [12, 27-31] Porém, as técnicas espectroscópicas são as mais utilizadas para esse tipo de determinação, incluindo espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e forno de grafite (ET-AAS) e espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). [12] Outras técnicas podem ser utilizadas, como espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [27-29], cromatografia de íons [30], espectrometria de raio-X [31], além de técnicas eletroquímicas.

Dentre os estudos envolvendo a eletroanalítica, encontra-se o de Muñoz *et al.* [3] que determinaram os metais no mel através da redissolução potenciométrica com fluxo contínuo. Outro trabalho de destaque é o de Sanna *et al.* [32] que utilizaram a voltametria de redissolução anódica com uso de microeletrodos. Alguns estudos mostram o uso de outros eletrodos na análise de metais pesados, como o uso de eletrodos modificados com filmes de mercúrio [33], polianilina sulfonada [34] e bismuto. [35]

Sabe-se que o mel é uma matriz heterogênea, devido principalmente à presença de resíduos de cera, própolis e materiais orgânicos insolúveis em

água em sua composição. Além disso, o mel verdadeiro (não adulterado) cristaliza com o passar do tempo, o que faz da amostragem uma etapa muito importante na determinação de espécies que podem estar na forma de complexos nesta amostra. Com isso, um tratamento da amostra antes da determinação dos metais é necessário, eliminando a matriz para obter as espécies de interesse livres em solução.

Durante a seleção de um método de preparo de amostra algumas características são desejadas: simplicidade, robustez, baixo custo, frequência analítica elevada, aplicação multielementar, baixa acidez residual e geração da menor quantidade possível de resíduos. [6] É necessário que o tratamento selecionado reúna essas características, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Sanna *et al.* [32] utilizaram a mineralização assistida por micro ondas para pré-tratar a amostra e compararam os resultados com a amostra analisada sem pré-tratamento, obtendo uma melhor resposta para a amostra mineralizada. Muñoz *et al.* [3] utilizaram a dissolução da amostra para determinação dos metais por potenciometria de redissolução com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e por ICP-MS. Alguns trabalhos utilizam a solubilização em banho de ultrassom, como o de Paes *et al.* [6] na determinação de cobre, manganês e cádmio por GFAAS.

#### 1.4. A VOLTAMETRIA NA DETERMINAÇÃO DE METAIS:

A voltametria é uma técnica eletroquímica na qual as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica, constituída de pelo menos 2 eletrodos, sendo usados mais comumente sistemas com 3 eletrodos (eletrodo de trabalho, auxiliar e referência). O potencial é aplicado entre os eletrodos de trabalho e referência em forma de varredura, isto é, variando-o a uma taxa constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma. [36]

A voltametria desenvolveu-se a partir da polarografia, que é um método que utiliza um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho. No final da década de 50, a polarografia clássica encontrou uma série de dificuldades que a tornaram obsoleta frente as técnicas espectroscópicas. Entre essas dificuldades, pode ser citada os altos limites de detecção, devido principalmente a corrente capacitiva. Essa corrente limita a sensibilidade e a exatidão em determinações de baixas concentrações, onde a corrente capacitiva é usualmente maior que a faradaica (corrente originada dos processos de oxi-redução das espécies presentes em solução), dificultando a interpretação dos resultados obtidos. [22]

Em 1958, Barker propôs a aplicação de impulsos de potencial na célula eletroquímica, medindo a corrente no final de cada pulso. [37] Devido ao desempenho muito melhorado, as técnicas de pulso suplantaram a polarografia clássica. Essas técnicas visam diminuir os limites de detecção das medições, principalmente por aumentar a relação entre as correntes faradaica e capacitiva, permitindo a quantificação de concentrações abaixo de  $10^{-8}$  molL<sup>-1</sup>. Após a aplicação do pulso de potencial, a corrente capacitiva decai rapidamente para um valor desprezível, enquanto a corrente faradaica decai mais lentamente. [38] Os primeiros trabalhos confiáveis apareceram na literatura apenas na década de 70, e somente na década de 90 houve um progresso substancial no desenvolvimento das instrumentações de pulso, relacionado com a introdução de microprocessadores e softwares avançados. [39] Dentre os métodos de pulso, podem ser destacados a voltametria de pulso normal, a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial.

#### 1.4.1. Voltametria de pulso diferencial (VPD):

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica muito utilizada para a determinação de traços de espécies orgânicas e inorgânicas. Uma série de pulsos de amplitudes constantes são superpostos a um potencial crescente. A corrente é medida duas vezes: antes da aplicação do pulso e no final do pulso. A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença entre elas é plotada em função do potencial aplicado (Figura 3). Como trata-se de uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, ou seja, em forma de pico, cuja altura é diretamente

proporcional a concentração dos analitos estudados. Uma das principais importâncias da VPD nas análises químicas é sua capacidade de eliminar a corrente capacitiva, o que permite detectar analitos a concentrações abaixo de  $0,5 \mu\text{molL}^{-1}$ . [22,38,40]

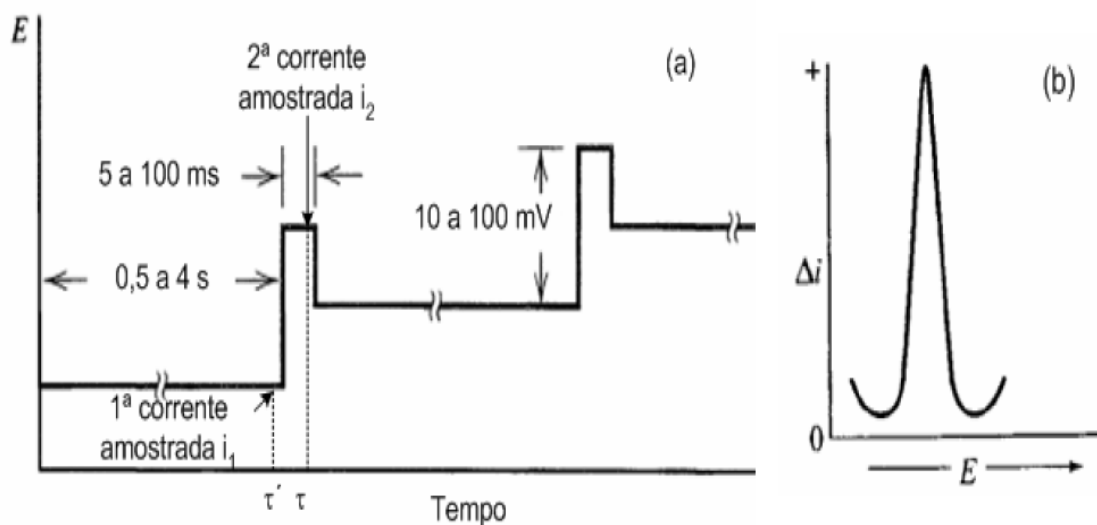


Figura 3. (a) Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial e, (b) Voltamograma de um experimento de voltametria de pulso diferencial,  $\Delta i = i_2 - i_1$ . [38]

A seleção de alguns parâmetros é muito importante na VPD. Um deles é a amplitude do pulso a ser usado. Geralmente, escolhe-se um valor entre 10 e 100 mV; valores típicos são de 25 mV para sistemas com um elétron e 50 mV para sistemas com 2 elétrons. Aumentando a amplitude do pulso, aumenta também a corrente de pico, entretanto aumenta a largura do pico, reduzindo assim a resolução. Dois picos adjacentes não podem ser resolvidos ao menos que a amplitude do pulso seja bem menor do que a separação entre os dois potenciais de pico. A escolha da amplitude deve ser um compromisso entre o aumento da sensibilidade e a perda de resolução. Daí usar de um modo geral os valores típicos mencionados de 25 mV para sistemas com um elétron e 50 mV para sistemas com dois elétrons. [38,41]

Outro parâmetro importante a ser escolhido é a velocidade de varredura. O valor típico é de  $5 \text{ mVs}^{-1}$ . Se forem usadas velocidades de varreduras maiores que  $10 \text{ mVs}^{-1}$  as etapas de potencial serão muito longas e elas até mesmo poderão "pular" o pico, dependendo dessa velocidade. Nesses casos, haveria, portanto uma perda de resolução, de modo que ou não haverá

registros de corrente em pontos importantes dos picos voltamétricos ou, até mesmo, esses picos poderão não ser registrados. [38,41]

### 1.5. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO:

A polarografia ganhou novo impulso com a descoberta da possibilidade de pré-concentrar espécies eletroativas na gota de um eletrodo de mercúrio, conferindo um grande aumento de sensibilidade. [42] Esse processo de pré-concentração pode ser estendido a outros eletrodos com ganhos em sensibilidade na ordem de 1000 vezes e diminuição do limite de detecção em 3 ordens de magnitude, chegando a concentrações abaixo de  $10^{-10}$  molL<sup>-1</sup>. Essa técnica é conhecida por análise de redissolução (*Stripping Analysis*). O desenvolvimento de instrumentação portátil, simples e de baixo custo, aliado a sensibilidade e seletividade da técnica, tornaram-na popular dentro da química analítica. [43]

Os métodos de redissolução possuem uma etapa inicial característica (etapa de deposição). Nesta etapa, o analito é depositado no eletrodo de trabalho, a partir de uma solução sob agitação. Depois de um determinado período, a eletrólise é interrompida, cessa-se a agitação e há um tempo de equilíbrio. Em seguida, inicia-se a varredura de potencial para determinação do analito por meio de um dos métodos voltamétricos existentes. Nesta etapa, o analito é redissolvido e retirado do eletrodo de trabalho. A etapa de deposição equivale a uma pré-concentração eletroquímica do analito, pois a concentração deste na superfície do eletrodo é maior que na solução, o que faz com que os métodos de redissolução melhorem ainda mais a sensibilidade dos métodos voltamétricos. [44]

Para determinação de metais, usa-se a voltametria de redissolução anódica, onde o eletrodo de trabalho funciona como ânodo na etapa de redissolução. Esta envolve uma sequência de medição com duas etapas: [45]

- eletrorredução dos íons em um potencial negativo para depositar os metais na superfície do eletrodo, pré-concentrando os analitos;
- eletrooxidação de cada metal no potencial de varredura lenta para potenciais positivos.

Durante a etapa de eletrorredução, os íons são reduzidos a metal na superfície do eletrodo de trabalho, e após essa etapa a agitação é cessada e o potencial de eletrólise removido do eletrodo de trabalho. Este começa a descarregar e o potencial cai até o potencial limite estipulado. Quando o potencial do eletrodo atinge o potencial redox para um par metal-íon metálico, os metais são reoxidados e redissolvidos para a solução. [45,46] Um exemplo do uso da voltametria de redissolução anódica é a determinação de Cd e Cu, conforme esquematizado na figura 4. [38]

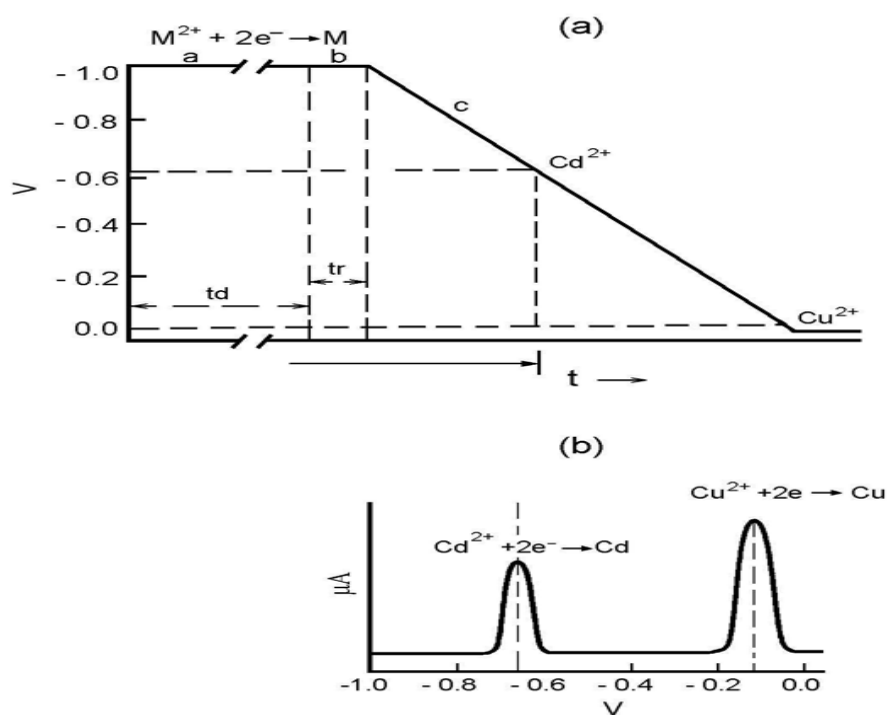


Figura 4 Na Figura 4a: etapas envolvidas na voltametria de redissolução anódica. (a) programação E vs t mostrando o tempos de deposição ( $T_d$ ); e potenciais de deposição  $E_d$ , para  $Cd^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . (b) Tempo de repouso ( $T_r$ ). (c) Etapa de redissolução. Na Figura 4b: Voltamogramas hipotéticos obtidos na etapa da redissolução para  $Cd^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . [38]

Os principais tipos de interferências nos métodos de redissolução incluem a proximidade dos potenciais de oxidação das espécies analisadas formando picos sobrepostos, a presença de compostos orgânicos tensoativos que adsorvem na superfície do eletrodo de trabalho inibindo a deposição de metal, principalmente para o mercúrio, e a formação de compostos intermetálicos (por exemplo Cu-Zn) que afeta tanto o tamanho quanto a posição do pico. O

conhecimento dessas interferências é importante para que possam ser prevenidas, por meio de uma atenção adequada a constituição da amostra analisada. [38] O uso de métodos voltamétricos em análise de traços envolve cuidados experimentais do mesmo modo que outros métodos analíticos utilizados nessas análises. Assim, é importante realizar a limpeza do material utilizado, evitar contaminações, perda do analito durante os processos de tratamento da amostra, etc. Todos esses fatores mencionados afetam a exatidão e a confiabilidade da análise e devem ser minimizados. [41]

Além da voltametria de redissolução anódica, também são conhecidas a voltametria de redissolução catódica, a redissolução adsortiva, a redissolução abrasiva e a potenciometria de redissolução. [38]

#### 1.6. O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD):

O desempenho dos métodos voltamétricos depende fortemente do material do eletrodo de trabalho. Dois fatores são importantes na escolha: o comportamento redox da substância a ser analisada na superfície do eletrodo e a corrente de fundo sobre a região de potencial necessária para a medição. [38]

No passado, o mercúrio era largamente utilizado como eletrodo de trabalho, por causa da renovação da superfície da gota, do baixo ruído da corrente, da ampla janela de potencial catódico e da alta reprodutibilidade. Os eletrodos de mercúrio existentes são: eletrodo gotejante de mercúrio (DME), eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) e, mais frequentemente usado, o eletrodo de filme de mercúrio (MFE). O MFE geralmente é preparado sobre a superfície do carbono vítreo, através de deposição catódica a partir de uma solução de mercúrio. Entre as principais desvantagens dos eletrodos de mercúrio estão a limitação em trabalhar com potenciais anódicos (devido a oxidação do mercúrio) e a toxicidade. [38,47] O mercúrio possui ação neurotóxica, provocando inibição da síntese proteica, febre, calafrios, dispneia, cefaleia, diarreia, câibras abdominais, diminuição da visão, complicações como pneumotórax, enfisema, gengivite, salivação, estomatite, tremor e alterações psicológicas, podendo levar a morte. [19] Hoje em dia é altamente recomendado o uso de outros tipos de eletrodo, cuja toxicidade é baixa ou

nula. [47] Alguns suplentes do eletrodo de mercúrio foram investigados, como o Ir [48], Bi [49], Au [50], Ag [51] e grafite. [52] A deposição de uma camada de metal em eletrodos sólidos é um processo mais complicado que no caso da formação de uma amálgama de mercúrio (deposição de um metal dentro de um volume de Hg). [45] Eletrodos de carbono tem sido usados como grafite [52,53], carbono vítreo [54], eletrodo de pasta de carbono [55] e eletrodo de carbono impresso [56], demonstrando grande eficiência em análises de redissolução.

Recentemente, o diamante tem sido utilizado em diversas aplicações analíticas. Filmes ultrafinos de diamantes são dopados com boro, que possui alto valor de condutividade, por deposição de vapor químico (CVD) em um substrato inerte, como o silício por exemplo. O boro é proveniente do gás trimetil-boro, numa concentração que varia de 10 a 20000 mgKg<sup>-1</sup>, fornecendo ao material características de um semicondutor ou de um semimetal, dependendo da concentração de dopante utilizada. O substrato a ser escolhido deve possuir boa resistência mecânica e coeficiente de dilatação parecido com o do filme de diamante, para não ocorrerem eventuais rachaduras após a dopagem. [57-59] A tabela 3 exhibe as principais propriedades do diamante. [59]

Tabela 3. Algumas propriedades fundamentais do diamante. [59]

Alta dureza	ca. 10000 kp m <sup>-2</sup>
Alta condutividade térmica	20W cm <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> a 300 K
Transparência óptica (sem dopagem)	2.5 µm a 230 nm
Índice de refração	2,42 a 546 nm
Constante dielétrica	5,6
Ponto de fusão	4027 K
densidade	3,52 gcm <sup>-3</sup>
Superfície quimicamente inerte	Até 850K no ar Até 2000K no vácuo

Apesar do diamante ser inerte, o diamante dopado com boro (BDD) possui propriedades muito úteis para medições eletroquímicas. O BDD tem uma grande eletroatividade em água, permitindo o estudo de espécies difíceis de reduzir ou oxidar, e produz uma baixa corrente de fundo (*background*), numa magnitude menor do que a gerada pelo eletrodo de carbono vítreo. [57]



Além disso, a robustez química e mecânica o torna adequado para trabalhar em meio corrosivo, bem como em meios ricos em surfactantes, além de sua resistência a ultrassom. [60,61] Ele possui cinética favorável à transferência eletrônica e inércia da superfície, o que resulta em alta resistência à desativação. Possui transparência óptica nas regiões do UV/Vis e IV. O eletrodo em si é resistente à incrustação (pois não adsorve compostos orgânicos) e pode ser reutilizado várias vezes. O BDD possui uma ampla janela de potencial de trabalho em meio aquoso, entre -3V e +3V (vs Ag|AgCl), refletindo numa alta sobretensão de oxigênio e de hidrogênio. Neste eletrodo, o desprendimento de hidrogênio começa em -1,5 V e o desprendimento de oxigênio começa em + 2,5 V (vs Ag|AgCl). [38,62,63] A figura 5 mostra como a janela de potencial do BDD é muito maior que a dos outros eletrodos comumente utilizados. [63]

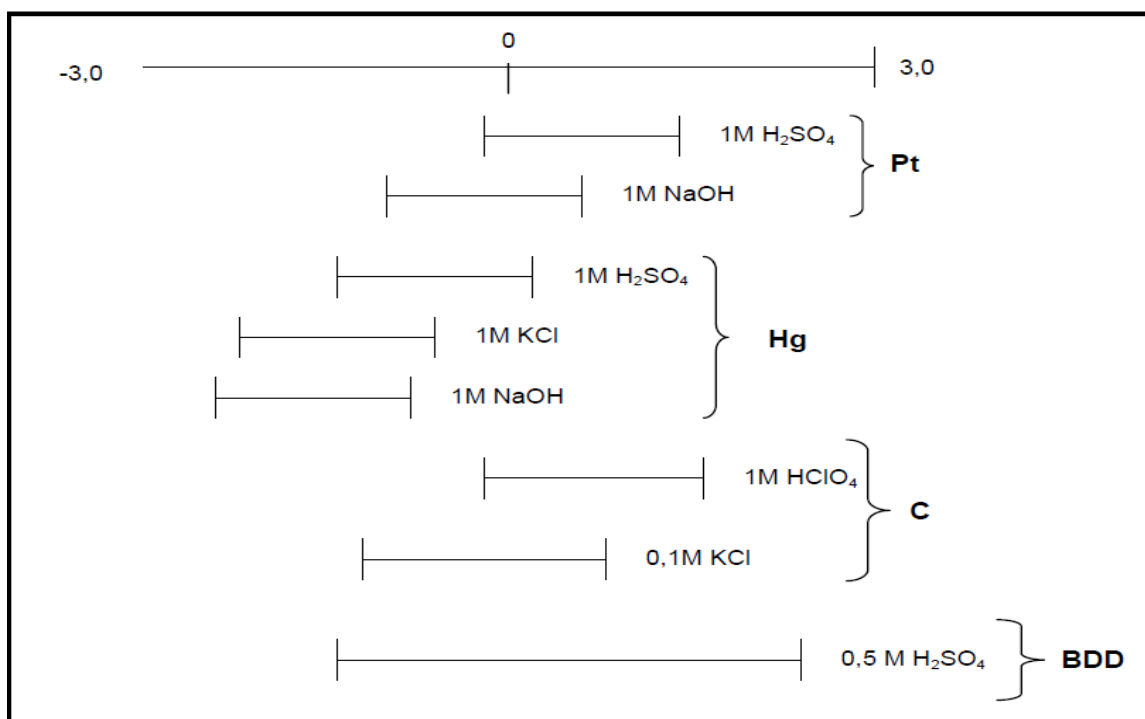


Figura 5. Intervalo de potencial (em volts, vs Ag|AgCl) de aplicação aproximado para os eletrodos de platina, mercúrio, carbono vítreo e diamante dopado com boro. [63]

O BDD se tornou uma excelente alternativa aos eletrodos modificados, principalmente o eletrodo de mercúrio, pois, além das propriedades que possui, não produz resíduos tóxicos. Uma comparação entre as principais

propriedades do BDD e dos eletrodos modificados com mercúrio podem ser analisadas na tabela 4. [64]

Tabela 4. Comparação entre as principais propriedades do BDD e do eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de Hg. [64]

BDD	Hg
Ampla janela de potencial	Ampla janela de potenciais catódicos
Baixa corrente de fundo	Alta corrente de fundo
Boa sensibilidade	Boa sensibilidade
Quimicamente inerte	Interação com Cl <sup>-</sup>
Superfície não reutilizável (pré-tratamento necessário)	Superfície facilmente renovada
Não tóxico	Tóxico
Não volátil	Volátil

Como a superfície do eletrodo de BDD não é reutilizável, um pré-tratamento é necessário. Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, os eletrodos são submetidos principalmente a tratamentos anódicos e catódicos. Os tratamentos anódicos consistem em oxidar a superfície do BDD, tornando-a hidrofílica. Até o ano de 2004, esse era o único pré-tratamento utilizado. O pré-tratamento catódico consiste na redução da superfície do BDD, deixando-a rica em terminações hidrogênio. [58]

Em função de suas qualidades, o eletrodo de diamante é cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos em diversas matrizes, tanto para compostos orgânicos quanto compostos inorgânicos. Oliveira e Brett [65] utilizaram o BDD na oxidação de bases de DNA por voltametria de pulso diferencial. Zhao et al [66] desenvolveram um método para determinação simultânea de triptofano e tirosina com BDD, obtendo um limite de detecção de  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ , respectivamente, também com o uso da voltametria de pulso diferencial. Dragoie et al [67] utilizaram o BDD para determinação de chumbo em água de torneira utilizando voltametria de redissolução anódica, chegando a um limite de detecção de  $2 \times 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ . Babyak e Smart [68] estudaram a interferência entre diversos eletrólitos suporte na medida de chumbo e cádmio em água de rio com BDD por voltametria de onda quadrada. Svorc et al [69] determinaram paracetamol e penicilina também

por voltametria de onda quadrada com BDD, atingindo concentrações abaixo de  $\mu\text{MolL}^{-1}$ . Outros estudos mostram a utilização de BDD na determinação de pesticidas como 4-nitrofenol e 4-clorofenol, e também de compostos orgânicos como captopril, dopamina, ácido úrico, poliaminas, histaminas e serotoninas, entre outros. [63]

Entretanto, vale ressaltar que nenhum trabalho que utilize o eletrodo de BDD na determinação de metais pesados em amostras de mel foi encontrado na literatura, sendo esta uma das grandes motivações para a realização deste trabalho. Com a utilização do eletrodo de BDD elimina-se a etapa de modificação da superfície do eletrodo, sendo que essa pode constituir um problema durante a análise, principalmente por nem sempre se mostrar reprodutível, além do tempo gasto durante esta etapa. O uso do BDD também não produz resíduos tóxicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

- O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e implantação de uma metodologia analítica para a avaliação de metais pesados em mel usando um eletrodo de diamante dopado com boro e a voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar o efeito da polarização catódica e anódica do BDD na análise de metais;
- Desenvolver um método adequado para tratamento da amostra de mel para análise por VPD;
- Otimizar uma metodologia analítica para a determinação de metais (Zn, Cd, Pb e Cu) em de mel usando eletrodo de diamante dopado com boro em substituição ao eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio;
- Aplicar o procedimento otimizado nas amostras reais, quantificando o nível de Cu, Cd, Pb e Zn em mel de diferentes origens (floral e melato);

- Comparar o desempenho do BDD com o eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio;
- Utilizar a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para validar o método proposto;
- Utilizar os dados obtidos para uma possível avaliação das condições ambientais dos locais de origem da amostra de mel.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL:

#### 3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES:

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Milli-Q Quantum EX) com resistividade aproximadamente  $18\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$ , sendo esta mesma utilizada para a limpeza de toda vidraria empregada. As soluções analíticas dos metais foram preparadas a partir de diluições das soluções-padrão  $1000\text{ mgmL}^{-1}$  (Vetec) dos metais Cu, Cd, Pb e Zn em meio de ácido nítrico 5% v/v. Uma solução estoque de Hg  $1000\text{ mgL}^{-1}$  (Vetec) foi utilizada para a modificação eletroquímica na superfície do eletrodo de carbono vítreo. Uma solução de Ga  $1,00\text{ mgL}^{-1}$  foi preparada a partir de uma solução estoque  $1000\text{ mgL}^{-1}$  (Vetec) para evitar a formação do composto intermetálico Zn-Cu nas análises de Zn.

HCl supra-puro (37% v/v – Vetec) foi utilizado para preparação do eletrólito-suporte para análise de Cu, Pb e Cd. Para a preparação de 100 mL de HCl  $0,1\text{ molL}^{-1}$  diluiu-se  $833\text{ }\mu\text{L}$  de HCl  $12\text{ molL}^{-1}$  em água deionizada.

Ácido acético glacial (Vetec) e acetato de sódio triidratado (Vetec) foram utilizados para a preparação do tampão ácido acético-acetato pH 4,8  $0,5\text{ molL}^{-1}$  para a determinação de Zn. Para a preparação de 100 mL do tampão dissolveu-se  $6,804\text{ g}$  de acetato de sódio triidratado e  $2,86\text{ mL}$  de ácido acético em água deionizada.

$\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (Vetec) foi utilizado para preparação da solução de ativação do BDD. Para o preparo de 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5\text{ molL}^{-1}$  diluiu-se  $2,72\text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $18\text{ molL}^{-1}$  em água deionizada.

HNO<sub>3</sub> (69% v/v – Vetec) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v – Vetec) foram utilizados durante a etapa de tratamento das amostras.

Álcool etílico foi utilizado na limpeza do eletrodo BDD.

Ferricianeto de potássio (Vetec) foi utilizado para a avaliação das propriedades eletroativas do BDD. Para o preparo de 1,00 mL de solução 50 mmolL<sup>-1</sup> dissolveu-se 0,01646 g de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em água deionizada.

KCl (Vetec) foi utilizado para a confecção do eletrodo de referência Ag|AgCl.

Soluções de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Perkin Elmer) e de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Perkin Elmer) foram utilizadas como modificadores químicos nas análises de Zn e Pb no espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite.

### 3.2. INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS:

Para a realização das medidas eletroquímicas foi usado um potenciostato μ-Autolab (EcoChemie, Utrech, Holanda), inserido em gaiola de Faraday (Metrohm Autolab, Holanda) interfaceado a um microcomputador.

Um banho ultrassônico T28110 (Unique, Brasil) operando a frequência de 25 KHz e potência de 120 W, foi utilizado para promover a homogeneização das amostras, bem como limpeza das vidrarias e superfície do eletrodo.

A agitação do sistema foi realizada utilizando um agitador magnético (IKA-lab Disc, Alemanha) com barras magnéticas de 5 mm de diâmetro x 15 mm de comprimento (*Stir bar*), e fixada para todas as análises em torno de 1500 rpm.

A aquisição e tratamento dos dados foram realizados pelos programas Oringin 8.0, Microsoft Excel, Statistica e GPES.

Com o intuito de validar o método proposto, um espectrômetro de Absorção Atômica com forno de grafite (GF95, Thermo Scientific, China) e amostrador automático (FS95, Thermo Scientific, China) utilizando lâmpadas de cátodo oco monoelemento (Photron Lamps, Austrália) foi utilizado para a determinação de Cu, Pb, Cd e Zn.

### 3.3. AMOSTRAS:

A maioria das amostras de mel foi adquiridas no comércio local e analisadas após procedimento de abertura proposto neste trabalho. Foram analisadas 10 amostras de mel, sendo estes de diferentes origens, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Origem geográfica e botânica das amostras analisadas.

Amostra	origem botânica		
	predominante	classificação	local
1	Eucalipto	floral	Coronel Pacheco/MG
2	Jataí	floral	Campinas/SP
3	Manuka	floral	Nova Zelândia
4	Rengue	floral	Japão
5	Laranjeira	floral	Japão
6	Silvestre	floral	Tabuleiro/MG
7	Bracatinga	melato	Teresópolis/RJ
8	Assa peixe	melato	Domingo Martins/ES
9	Morro de Candeia	melato	Teresópolis/RJ
10	Velame	melato	Santa Bárbara/MG

### 3.4. ELETRODOS E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS:

A célula eletroquímica foi constituída de um eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro, um eletrodo de Ag|AgCl como eletrodo de referência e um eletrodo de platina adquirido da METROHM como auxiliar.

Foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo com 2 mm de diâmetro modificado com filme de mercúrio como eletrodo de trabalho para a comparação dos resultados. Para a formação do filme de mercúrio, o eletrodo foi imerso em uma solução de mercúrio  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  por 300 segundos, com um potencial constante de  $-0,7 \text{ V vs Ag|AgCl}$ . Tal arranjo foi combinado no interior de uma cela com volume final de 10 mL.

O eletrodo de referência miniaturizado de Ag|AgCl foi construído no próprio laboratório, através da inserção de um fio de prata no interior de uma ponteira de micropipeta de 10 a 100  $\mu\text{L}$ , vedada com uma membrana semi permeável e preenchida com uma solução saturada de KCl, de acordo com o proposto na literatura. O fio de prata, de aproximadamente 3,5 cm, foi previamente polido com uma lixa fina, e imerso em uma solução saturada de KCl, e oxidado por 60 segundos a um potencial constante de + 1,0 V vs Ag|AgCl, afim de formar uma fina camada de AgCl. [70]

A célula eletroquímica foi desenvolvida no próprio laboratório, em um compartimento de nylon com capacidade para 10 mL, com um adaptador para fixar o BDD a célula. Este ficou preso com o auxílio de um O-ring de borracha, que definia uma área exposta à solução de aproximadamente 0,6  $\text{cm}^2$ . O contato elétrico foi estabelecido por uma placa de cobre pelo lado do substrato de silício, fixada através de parafusos. Esta célula continha também um pequeno compartimento para a barra magnética responsável pela agitação do sistema, de modo que esta barra não entrasse em contato com o BDD. Na Figura 6 são apresentadas fotografias onde é mostrada a montagem da célula eletroquímica, bem como os eletrodos utilizados. A montagem dessa célula contribuiu para a não formação de bolhas na superfície do eletrodo, graças a sua posição durante a análise, e dessa forma as amostras não precisaram ser deaeradas.

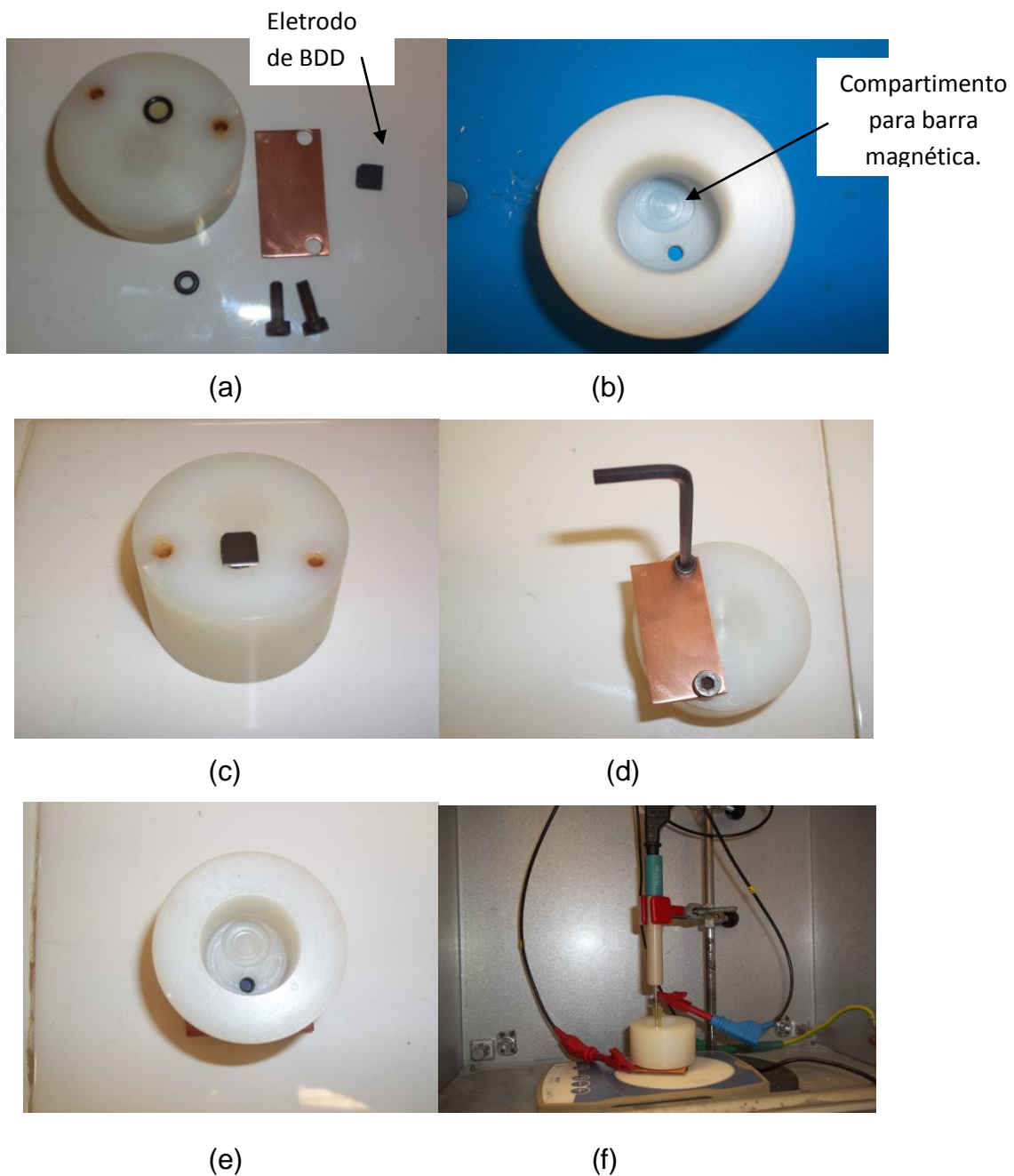


Figura 6. Montagem da célula eletroquímica: (a) peças da cela e eletrodo de BDD, (b) compartimento de nylon utilizado como célula eletroquímica, (c) eletrodo de BDD colocado no adaptador, (d) placa de cobre sendo colocada para o contato elétrico, (e) célula eletroquímica montada e (f) em operação contendo os eletrodos auxiliar e de referência.



### 3.5. METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 3.5.1. Controle da contaminação:

A fim de evitar a contaminação das amostras durante as etapas de digestão e análise, foi seguido um rigoroso procedimento de limpeza, assim como o descrito por CAMPOS e VIEL. [71]

Após o uso, toda a vidraria utilizada, bem como as ponteiras das pipetas e também as barras magnéticas foram lavadas com detergente em ultrassom por 300 s e, logo após, foram lavadas em água ultra pura também no ultrassom por 300 s. Após a lavagem, todo o material foi enxaguado em água ultra pura e deixado de molho em banho de  $\text{HNO}_3$  10 % (v/v) por 12 horas.

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em balões volumétricos previamente descontaminados e armazenadas em tubos Falcon, também descontaminados pelo procedimento descrito acima.

Após a realização das análises, o eletrodo de trabalho foi limpo com água ultra pura e, no caso do eletrodo de carbono vítreo, foi polido com uma suspensão de alumina em uma superfície porosa e submetido a um potencial de 0,5 V por 300 s para promover a oxidação de qualquer impureza adsorvida. Já o eletrodo de diamante, após limpeza em água ultra pura, foi levado ao ultrassom por 300 s e ainda borrifado etanol em sua superfície, a fim de promover o polimento do mesmo. Ocasionalmente, o eletrodo é deixado em banho de  $\text{HNO}_3$  10 % (v/v) por 12 horas para promover sua descontaminação, principalmente em relação a matéria orgânica.

#### 3.5.2. Ativação da superfície do BDD:

Sabe-se que a polarização do BDD é uma maneira simples e rápida de ativar a superfície do diamante. [65] Assim, foi estudada a diferença na resposta do BDD após as polarizações catódica e anódica e comparadas com a resposta do eletrodo sem nenhum pré-tratamento. Para essa comparação, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica em uma solução de ferricianeto de potássio  $0,6\text{mmolL}^{-1}$ , entre os potenciais de -0,2 V e + 1,0 V (vs  $\text{Ag|AgCl}$ ), como já descrito por Salazar et al. [62] Foram observadas as respostas dos

picos de potencial anódico e catódico para o par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  após cada pré-tratamento e também para o eletrodo sem nenhum tratamento prévio.

Foram realizados dois diferentes procedimentos de pré-tratamento na superfície do eletrodo, já descritos na literatura: [65]

- pré-tratamento anódico: um potencial positivo ( $E = +3,0 \text{ V}$ ) foi aplicado por 1800 s, oxidando a superfície do eletrodo;
- pré-tratamento catódico: um potencial negativo ( $E = -3,0 \text{ V}$ ) é aplicado por 1800 s, reduzindo a superfície do eletrodo, que fica com altas concentrações de  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

Os procedimentos foram realizados tanto em solução tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  pH 4,6 quanto em solução de ácido sulfúrico  $0,5 \text{ molL}^{-1}$ , a fim de se estudar a influência do pH nos tratamentos realizados. Após o tempo de pré-tratamento, foram aplicados 15 ciclos voltamétricos entre  $-1,5 \text{ V}$  e  $+1,5 \text{ V}$  na própria solução de ativação, afim de se estabilizar a superfície do BDD.

### 3.5.3. Otimização das condições de análise:

A otimização das condições eletroquímicas foi realizada com o intuito de se obter uma melhor sensibilidade para as medidas. Os parâmetros foram otimizados para VPD em duas etapas distintas. Primeiramente foi feita a avaliação de cobre, chumbo e cádmio simultaneamente, e, posteriormente, avaliou-se o zinco. Foram feitos estudos em separado pois já foi reportado na literatura uma grande influência do pH nas análises desses metais onde, para análise de cobre, chumbo e cádmio, uma determinação mais eficiente é obtida em  $\text{pH} \leq 2$ , enquanto que para o zinco os melhores resultados são obtidos em pH entre 4 e 5. [72] Assim, foi escolhido o HCl como eletrólito suporte na análise de Cu, Pb e Cd, e tampão acetato pH 4,6 na análise de Zn. Além disso, já foi reportado na literatura a formação de um composto intermetálico entre Cu-Zn, quando ambos são eletrodepositados, [73] o que acaba interferindo nos sinais analíticos das duas espécies. Para evitar a formação deste complexo é necessária a adição de quantidade suficiente de solução de gálio para que este forme um composto intermetálico com cobre, Cu-Ga, que é mais estável que o formado com Zn. Dessa forma, o Zn fica livre em solução podendo ser então determinado.

As respostas obtidas nos sistemas eletroquímicos são influenciadas por diversos parâmetros, sendo os mais importantes o potencial de deposição ( $E_d$ ) e o tempo de deposição ( $t_d$ ), que irão agir diretamente na etapa de pré-concentração da espécie metálica na superfície do eletrodo e consequentemente na sensibilidade do método. Existem também os parâmetros que agem diretamente na etapa de condicionamento e equilíbrio do eletrodo de trabalho, como o potencial e o tempo de condicionamento ( $E_{cond}$  e  $t_{cond}$ ), o tempo de equilíbrio ( $t_{equi}$ ) dos metais na superfície do eletrodo e o potencial limite ( $E_{lim}$ ), que é o potencial onde se finaliza a análise. [74]

Visando a otimização para as análises, foi elaborado um planejamento fatorial para a otimização de algumas condições de eletrodeposição. Nesta etapa do estudo, foram escolhidos os parâmetros que agem diretamente na etapa de pré-concentração dos metais, que são o potencial e o tempo de deposição, além de otimizar também a concentração do eletrólito suporte (HCl) nas análises de cobre, chumbo e cádmio. Estudos preliminares mostraram que não foi necessário otimizar a concentração do eletrólito suporte (tampão acetato) para análise de zinco. Os outros parâmetros foram fixados em valores específicos, visto que eles não estão diretamente ligados a etapa de pré-concentração dos metais.

Foi utilizado um planejamento fatorial  $3^3$  do tipo Box-Behnken para a análise de cobre, chumbo e cádmio; e um planejamento fatorial completo  $3^2$  para o zinco, com a obtenção de modelos de resposta para cada um dos metais. Os dados obtidos foram tratados utilizando o pacote de ferramentas estatísticas EXCEL e o programa STATISTICA. As concentrações dos metais utilizadas para estes testes foi de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os planejamentos de Box-Behnken diferem dos planejamentos de composição central de duas maneiras. Primeiro, apenas três níveis para cada fator são empregados. Segundo, os planejamentos Box-Behnken não têm pontos de vértices (Figura 7), sendo assim, por vezes, preferidos ao invés de planejamentos de composição central, pois quando há restrições físicas ou econômicas, eles impedem a utilização de pontos de vértices, ou seja, quando todos os níveis dos fatores estão em um extremo. Este planejamento está baseado em experimentos com blocos incompletos balanceados. Nele, fixa-se uma variável em 0 e um planejamento completo  $2^2$  é realizado com as

outras variáveis. Neste planejamento, existe informação suficiente para realizar um teste de falta de ajuste. [75]

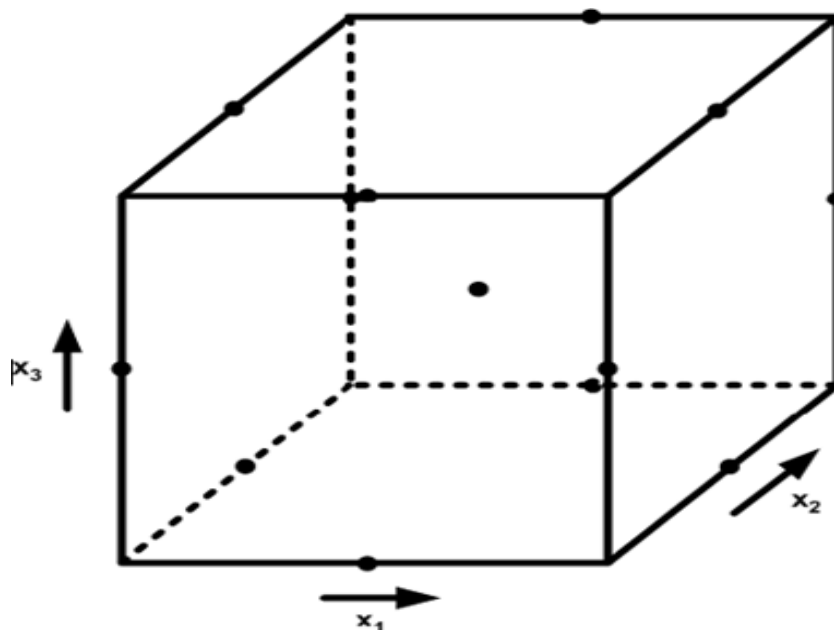


Figura 7. Disposição dos pontos no planejamento Box-Behnken para  $k=3$ .

#### 3.5.3.1. Otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd:

Para a determinação de cobre, chumbo e cádmio com o eletrodo de diamante dopado com boro, foram otimizados o potencial e o tempo de deposição ( $E_d$  e  $t_d$ ), além da concentração do eletrólito suporte HCl. Como os dados estão sendo comparados com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, foi realizado um planejamento  $2^3$  para este caso, com os mesmos parâmetros estudados, sem a preocupação de obter modelos matemáticos, chegando apenas a uma condição favorável para a análise.

Os parâmetros eletroquímicos relacionados ao condicionamento e equilíbrio do eletrodo de trabalho foram fixados de acordo com a Tabela 6. Na Tabela 7, encontram-se os parâmetros estudados através do planejamento fatorial Box-Behnken. A Tabela 8 exibe a matriz do planejamento Box-Behnken com os parâmetros estudados. Todos os ensaios foram realizados de modo aleatório.

Tabela 6. Parâmetros eletroquímicos fixados para a realização do planejamento fatorial para Cu, Pb e Cd.

Parâmetros	Valores adotados
$E_{\text{cond}} / \text{V (vs Ag AgCl)}$	0,50
$t_{\text{cond}} / \text{s}$	20
$t_{\text{equi}} / \text{s}$	15
$E_{\text{lim}} / \text{V (vs Ag AgCl)}$	0,05

Tabela 7. Níveis avaliados para os parâmetros no planejamento fatorial de Cu, Pb e Cd.

Nível	$E_d / \text{V}$	$t_d / \text{s}$	$[\text{HCl}] / \text{mmol L}^{-1}$
Alto (+1)	-0,75	300	100
Médio (0)	-0,85	240	75
Baixo (-1)	-0,95	180	50

Tabela 8. Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização dos parâmetros na análise de Cu, Pb e Cd.

Ensaio	$E_d / \text{V}$	$t_d / \text{s}$	$[\text{HCl}] / \text{mmol L}^{-1}$
1	-0,95	180	75
2	-0,95	300	75
3	-0,75	180	75
4	-0,75	300	75
5	-0,95	240	50
6	-0,75	240	50
7	-0,95	240	100
8	-0,75	240	100
9	-0,85	180	50
10	-0,85	180	100
11	-0,85	300	50
12	-0,85	300	100
13	-0,85	240	75
14	-0,85	240	75
15	-0,85	240	75

### 3.5.3.2. Otimização das condições de análise para Zn:

Para a determinação de Zn, os testes foram realizados com uma solução de tampão acetato, na concentração  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 4,6. Essa concentração foi escolhida devido a acidez da amostra, que estava interferindo no pH final da solução. Como o Zn deve ser analisado em pH 4,6 optou-se por esta concentração para que esse pH fosse mantido. Foi utilizado um planejamento fatorial completo  $3^2$ , com os níveis fixados de acordo com a Tabela 9. Os parâmetros eletroquímicos fixados foram os mesmos utilizados para a análise de Cu, Pb e Cd, com exceção do potencial limite que, neste caso, foi de  $-0,5 \text{ V}$  vs Ag|AgCl. Vale ressaltar que os experimentos foram realizados de modo aleatório. Tal como na análise de Cu, Pb e Cd, foi realizado um planejamento fatorial  $3^2$  para a análise com o eletrodo de carbono vítreo, afim de se obter uma condição favorável de análise.

Tabela 9. Níveis avaliados para o planejamento fatorial de Zn.

Nível	$E_d / \text{V}$	$t_d / \text{s}$
<b>Alto (+1)</b>	-1,3	300
<b>Médio (0)</b>	-1,4	240
<b>Baixo (-1)</b>	-1,5	180

### 3.5.4. Mineralização das amostras:

Como foi dito anteriormente, o mel verdadeiro (não adulterado) cristaliza com o passar do tempo, fazendo da amostragem uma etapa muito importante na determinação de espécies que podem estar na forma de complexos nesta amostra, como os metais pesados. Neste trabalho o mel foi submetido a aquecimento em banho-maria a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e solubilizado em banho de ultrassom por 20 minutos sempre que o mesmo apresentou-se cristalizado. Para facilitar a manipulação da amostra, 2,5 g de mel foram usados para preparar uma solução aquosa 50 % (m/m), diminuindo assim a viscosidade e facilitando o manuseio, conforme dados da Tabela 10.

Tabela 10. Massas de mel para o preparo de soluções aquosas 50 % (m/m).

<b>Amostra</b>	<b>massa de mel/g</b>	<b>massa de água/g</b>	<b>% (m/m)</b>
1	2,5044	2,5243	49,80
2	2,541	2,5099	50,31
3	2,5793	2,5725	50,07
4	2,6188	2,6427	49,77
5	2,5512	2,6884	48,69
6	2,5042	2,556	49,49
7	2,5615	2,587	49,75
8	2,5606	2,5701	49,91
9	2,5204	2,7095	48,19
10	2,5298	2,6408	48,93

Diferentes procedimentos de tratamento da amostra foram analisados, com o intuito de se encontrar um procedimento simples, rápido, com a menor manipulação da amostra possível fornecendo resultados precisos e exatos. Tais procedimentos envolveram tanto a mineralização ácida quanto apenas a solubilização do mel, antes de sua análise por VPD.

A fim de se avaliar a exatidão do método proposto, as amostras de mel foram fortificadas com os metais antes do procedimento de pré-tratamento ser realizado, para efetuar testes de recuperação. Foram adicionados a amostra alíquotas dos metais de modo que, durante as análises, realizadas todas as diluições necessárias, a concentração dos metais fosse igual a 30  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

#### 3.5.4.1. Diluição da amostra

Foi preparada uma solução de mel 50 % (m/m) conforme descrito anteriormente; essa solução foi acidificada com HCl até pH=1 e depois analisada.

#### 3.5.4.2. Solubilização em banho de ultrassom

Transferiu-se 1 g da solução de mel 50 % (m/m), para balão de 10,00 mL, adicionou-se 0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  2 % (v/v), e submeteu a solução ao banho de ultrassom por 20 minutos. Este procedimento já foi proposto por Mendes *et al.* para análise de metais em mel por ICP-OES. [76]

### 3.5.4.3 Mineralização ácida em chapa de aquecimento

Esse procedimento foi proposto no próprio laboratório. Em um béquer de 10 mL, pesou-se 1 g de solução de mel (50 % m/m) previamente preparada, adicionou-se 2 mL de HNO<sub>3</sub> 69 % (v/v), e deixou em repouso por 12 horas, para uma etapa de pré-digestão. Após esse tempo, adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v) e aqueceu-se à ebulição por aproximadamente 1 hora. No resíduo restante foram adicionados 2 mL de HNO<sub>3</sub> 69 % (v/v) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v) e levado novamente à ebulição a 90°C por aproximadamente 1 hora. Durante o aquecimento, foi observado o rápido desprendimento de vapores marrons, relacionados a reatividade da mistura além da eliminação de matéria orgânica. O procedimento foi repetido até que não fosse mais observada a liberação destes vapores em grande quantidade. A solução resultante foi adicionada a um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume completado com solução do eletrólito suporte utilizado. Um fluxograma com as etapas do tratamento pode ser observado na Figura 8.

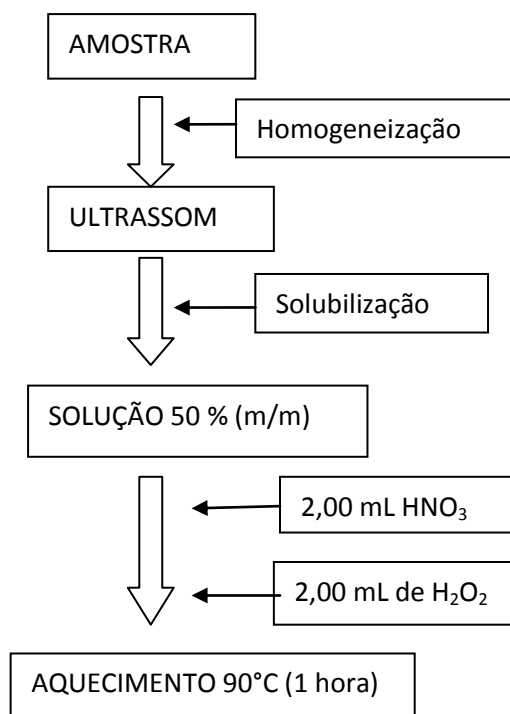


Figura 8. Fluxograma representando a mineralização ácida em chapa de aquecimento.



### 3.5.5. Determinação de Cu, Pb, Cd e Zn por VPD

Uma vez que os parâmetros ideais foram obtidos, bem como o melhor procedimento de tratamento da amostra foi escolhido, realizou-se as análises simultânea de Cu, Pb e Cd e a análise de Zn utilizando a VPD e o eletrodo de BDD. Os ensaios foram realizados em células eletroquímicas contendo 2,00 mL de eletrólito suporte e 0,50 mL de amostra para a determinação de cobre, chumbo e cádmio; e 0,25 mL de amostra para a determinação de Zn. A análise foi realizada através de adição de padrão, onde foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de solução padrão dos metais 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Antes de cada análise, a amostra foi sonicada por 5 minutos, a fim de homogeneizá-la.

Os dados obtidos com o eletrodo BDD foram comparados com dados obtidos com o eletrodo de carbono vítreo. Os ensaios foram realizados da mesma forma para os 2 métodos.

### 3.5.6. Determinação de Cu, Pb, Cd e Zn por GFAAS

A fim de validar parcialmente o método proposto foi realizada a determinação de Cu, Pb, Cd e Zn nas amostras de mel por GFAAS, utilizando lâmpadas de catodo oco monoelementar, visto que esse é um método bem estabelecido na análise de metais traço. Foram construídas curvas de calibração através da diluição de padrões 1,00  $\mu\text{g l}^{-1}$  dos metais. O volume final da gota foi de 20  $\mu\text{L}$  para as análises de Cu e Cd e de 30  $\mu\text{L}$  para as análises de Pb e Zn, devido a utilização de 10  $\mu\text{L}$  de modificador químico. Os parâmetros utilizados nas análises encontram-se na Tabela 11. Os parâmetros foram escolhidos de acordo com o manual do usuário do aparelho.

Tabela 11. Parâmetros utilizados nas etapas de operação e aquecimento para as determinações de Cu, Cd, Pb e Zn em mel.

Parâmetros instrumentais				
	Cu	Cd	Pb	Zn
$\lambda$ (nm)	324,8	228,8	217	213,9
resolução espectral (nm)	0,5	0,5	0,5	0,2
corrente da lâmpada (Ma)	4	3	4	5
Parâmetros de aquecimento para o atomizador				
Etapa		temperatura (°C)	Tempo (s)	Vazão do gás (L/min)
Secagem	Cu	100	30	0,2
	Cd			
	Pb			
	Zn			
Pirólise	Cu	950	20	0,2
	Cd	500		
	Pb	1200		
	Zn	800		
Atomização	Cu	2100	3	-
	Cd	800		
	Pb	1000		
	Zn	1100		
Limpeza	Cu	2500	3	0,2
	Cd			
	Pb			
	Zn			

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os resultados obtidos encontram-se agrupados em 5 partes distintas: estudo das polarizações anódica e catódica para ativação da superfície do BDD; influência dos parâmetros eletroquímicos na quantificação dos metais, otimizando as condições de análise por planejamento de experimentos; tratamento da amostra a fim de extrair os analitos; avaliação do método proposto com a utilização de figuras de mérito e determinação de Cu, Cd, Pb e Zn por VPD com BDD, eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e GFAAS.

### 4.1. ATIVAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO BDD:

Inicialmente, foram estudados os efeitos de dois diferentes pré-tratamentos na superfície do eletrodo de BDD encontrados na literatura, e esses pré-tratamentos foram comparados com o BDD sem nenhum tratamento prévio. Para essa avaliação, foram realizados os pré-tratamentos anódico e catódico, ambos em soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  e tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ , estudando assim não apenas os efeitos da polarização eletroquímica, mas também a influência do pH nessas polarizações. Após os tratamentos, aplicou-se a voltametria cíclica em uma solução de ferricianeto de potássio  $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$  em meio ácido, afim de se verificar a reversibilidade do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . A Figura 9 apresenta todos os voltamogramas cíclicos obtidos com os pré-tratamentos em diferentes ácidos, além do voltamograma cíclico obtido com o BDD sem nenhum tratamento prévio.

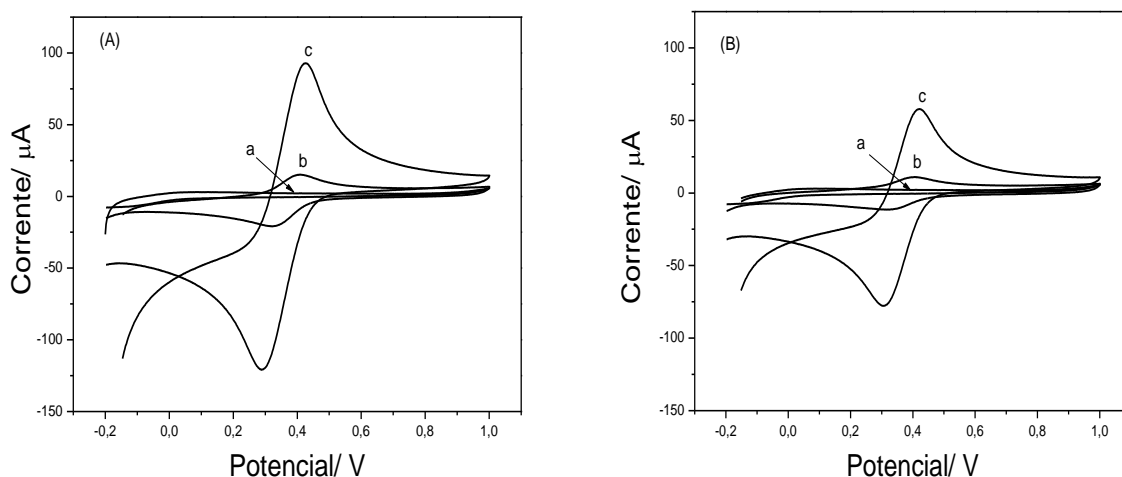


Figura 9. Efeito do tipo de pré-tratamento na resposta eletroquímica do BDD em solução aquosa  $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em (A)  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  e (B) tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ; sendo (a): BDD sem tratamento, (b): BDD após tratamento anódico e (c): BDD após tratamento catódico.

Observando a figura 9, pode-se perceber que não houve resposta eletroquímica evidenciável para o par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  com o eletrodo BDD sem nenhum pré-tratamento. Tanto para o pré-tratamento catódico quanto para o pré-tratamento anódico pode-se observar um pico de oxidação em aproximadamente  $+0,4 \text{ V}$  e um pico de redução em aproximadamente  $+0,3 \text{ V}$ .

Os resultados comparativos mostram que o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente apresenta uma melhor resposta eletroquímica para o par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , facilitando a reação redox em ambas as soluções utilizadas se comparado ao BDD sem nenhum tratamento prévio. Esse tipo de pré-tratamento reduz a superfície do eletrodo de BDD, deixando-a rica em terminações hidrogênio. Salazar et al [58] mostraram que esse hidrogênio “próximo a superfície” é o responsável pela resposta quase reversível do par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . Esse hidrogênio superficial provoca um aumento da camada de adsorção sobre a superfície do BDD, deixando-a aparentemente mais condutora, em comparação com o eletrodo sem pré-tratamento. O pré-tratamento catódico, apesar de aumentar as terminações hidrogênio na superfície do BDD, mantém suas características físicas e químicas originais.

Por outro lado, o pré-tratamento anódico oxida a superfície do eletrodo de BDD, formando radicais hidroxila, tornando-a hidrofílica. [58,65] Assim, suas características químicas são modificadas, e a presença desses radicais hidroxila deixam a superfície do BDD muito reativa, podendo estar envolvido em reações paralelas, tais como a formação de peróxido de hidrogênio, oxidação do eletrólito suporte e corrosão do BDD. Com isso, a superfície do BDD não é completamente inerte. A figura 9 mostra que esse pré-tratamento forneceu uma melhora na resposta eletroquímica para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  se comparado ao eletrodo sem nenhum tratamento, mas a resposta é menor comparado ao BDD pré-tratado catodicamente em ambos os eletrólitos. A alta reatividade dos radicais hidroxila pode ser a responsável por deixar a superfície do BDD menos condutora em comparação com a superfície rica em terminações hidrogênio. Com isso, a cinética da reação é desfavorecida.

Estudos realizados na análise dos metais de interesse por VPD mostraram que o eletrodo sem tratamento não forneceu resposta eletroquímica. Os eletrodos pré-tratados catodicamente e anodicamente produziram respostas semelhantes. Porém, o pré-tratamento catódico mostrou-se mais reprodutível que o pré-tratamento anódico, provavelmente pelo fato de, no tratamento anódico, a superfície do eletrodo não ser inerte.

Os resultados mostram que o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente tem uma grande melhora na resposta eletroquímica quando comparado ao eletrodo pré-tratado anodicamente e sem nenhum tratamento, tanto para a reversibilidade do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  quanto para análise dos metais de interesse. Portanto, esse tipo de tratamento é o mais indicado para este trabalho.

Com o pré-tratamento escolhido, estudou-se a influência do eletrólito suporte nessa polarização. Como mencionado, foram utilizados dois eletrólitos: tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  pH 4,6 e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos obtidos para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  após o pré-tratamento catódico com os dois eletrólitos suporte são apresentados na Figura 10.

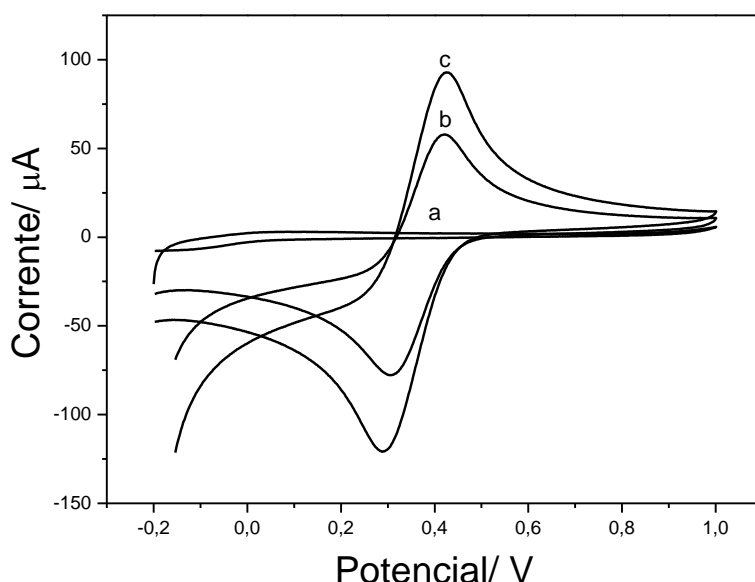
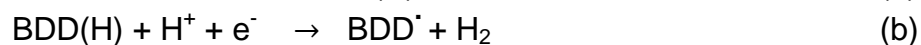


Figura 10. Efeito do tipo de pré-tratamento na resposta eletroquímica do BDD em solução aquosa  $0,6 \text{ mmolL}^{-1}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  após o pré-tratamento catódico (a) sem pré-tratamento, (b) tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  pH 4,6 e (c) com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$ .

A figura 10 mostra uma boa resposta eletroquímica para o tratamento realizado nos dois eletrólitos, porém, a resposta é maior quando o pré-tratamento é realizado em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$ . Como foi mencionado, o pré-tratamento catódico reduz a superfície do BDD, deixando-a rica em terminações hidrogênio, responsáveis pelo aumento da camada de adsorção, tornando-a aparentemente mais condutora. Com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  como eletrólito, a concentração de  $\text{H}^+$  é muito maior do que com o uso de tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ . De acordo com Oliveira et al. [65] o próton  $\text{H}^+$  favorece a produção de  $\text{H}_2$  na superfície do eletrodo, de acordo com as equações:



Quando o ácido sulfúrico é utilizado no tratamento, as reações (a) e (b) são deslocadas para a direita, favorecendo a produção de  $H_2$ , devido a elevada concentração de  $H^+$ . [65] Com o tampão acetato como eletrólito, a concentração de  $H^+$  é menor, conseqüentemente a produção de  $H_2$  diminui.

Testes realizados em soluções com os metais de interesse, por VPD, mostraram que quando o tratamento é realizado com  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  obtém-se uma boa resposta eletroquímica em um intervalo de tempo maior, o que aumenta a frequência analítica, comparado com a análise após o tratamento com tampão acetato. O eletrodo pré-tratado em solução de  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  apresentou estabilidade por até uma semana exposto ao ar, enquanto que o eletrodo pré-tratado com tampão acetato apresentou estabilidade por apenas algumas horas na análise dos metais de interesse. Assim, o pré-tratamento catódico realizado em solução de  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  foi o mais eficaz para a análise de Cu, Cd, Pb e Zn.

#### 4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE:

A otimização das condições de análise foi importante para estudar a influência dos parâmetros eletroquímicos na quantificação de Cu, Cd, Pb e Zn com eletrodo de BDD. Os parâmetros escolhidos para o estudo foram os que agem diretamente na etapa de deposição (pré-concentração) dos metais na superfície do eletrodo, o potencial de deposição ( $E_d$ ) e o tempo de deposição ( $t_d$ ), além da concentração do eletrólito suporte. Como nesta etapa a concentração de metais na superfície do eletrodo é maior que na solução, a sensibilidade do método foi aumentada. Conforme mencionado anteriormente (item III.5.3), a análise de Zn foi realizada separada dos demais metais, pois já foi reportado uma grande influência do pH na deposição dos metais de interesse. Enquanto Cu, Cd e Pb são eletrodepositados com mais eficiência em valores baixos de pH (geralmente abaixo de 2), o valor ótimo de pH para eletrodeposição do Zn é entre 4 e 5. Além disso, existe a possibilidade de formar uma espécie intermetálica entre Cu e Zn (Cu-Zn), quando ambos são eletrodepositados, o que afeta tanto a posição quanto a magnitude do sinal analítico. Desse modo, foi feito um planejamento para otimização dos

parâmetros eletroquímicos para análise simultânea de Cu, Cd e Pb e outro planejamento para otimizar os parâmetros eletroquímicos para análise de Zn por VPD com eletrodo de BDD. Como os dados foram sendo comparados aos obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio, foi feito planejamento para encontrar uma boa condição de análise com este eletrodo, porém, como este já constitui um método bem estabelecido, os resultados foram usados apenas para comparação com as condições utilizadas com o eletrodo de BDD.

#### 4.2.1. Otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd:

Para a determinação de Cu, Pb e Cd com o eletrodo de BDD, foram otimizados o potencial e o tempo de deposição ( $E_d$  e  $t_d$ ), além da concentração do eletrólito suporte (HCl) através de um planejamento fatorial  $3^3$  do tipo Box-Behnken, e os dados foram analisados com o pacote de ferramentas estatísticas EXCEL e o programa STATISTICA. Os parâmetros estudados para o eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio foram os mesmos. Os ensaios foram realizados de modo aleatório, com os metais na concentração de  $40 \mu\text{gL}^{-1}$ . Os valores de corrente obtidos para cada ensaio com o planejamento realizado encontram-se na Tabela 12. A Figura 11 exibe os voltamogramas para 2 condições testadas: a condição 7 e a condição 8, mostrando o melhor e o pior resultado obtido com o planejamento.



Tabela 12. Correntes obtidas da matriz planejamento para a determinação simultânea de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.

Ensaio	$E_d/V$	$t_d/s$	$[HCl]/$ $mmol L^{-1}$	$i_{Cu}/\mu A$	$i_{Pb}/\mu A$	$i_{Cd}/\mu A$
1	-0,95	180	75	0,237	0,267	0
2	-0,95	300	75	0,146	0,203	0
3	-0,75	180	75	0,435	0,337	0,104
4	-0,75	300	75	0,187	0,232	0
5	-0,95	240	50	0,144	0,148	0,085
6	-0,75	240	50	0,136	0,149	0
7	-0,95	240	100	0,234	0,267	0,507
8	-0,75	240	100	0,092	0,2	0
9	-0,85	180	50	0,106	0,114	0
10	-0,85	180	100	0,165	0,145	0,039
11	-0,85	300	50	0,106	0,196	0,133
12	-0,85	300	100	0,186	0,196	0,351
13	-0,85	240	75	0,211	0,231	0,019
14	-0,85	240	75	0,389	0,269	0,012
15	-0,85	240	75	0,224	0,23	0,012

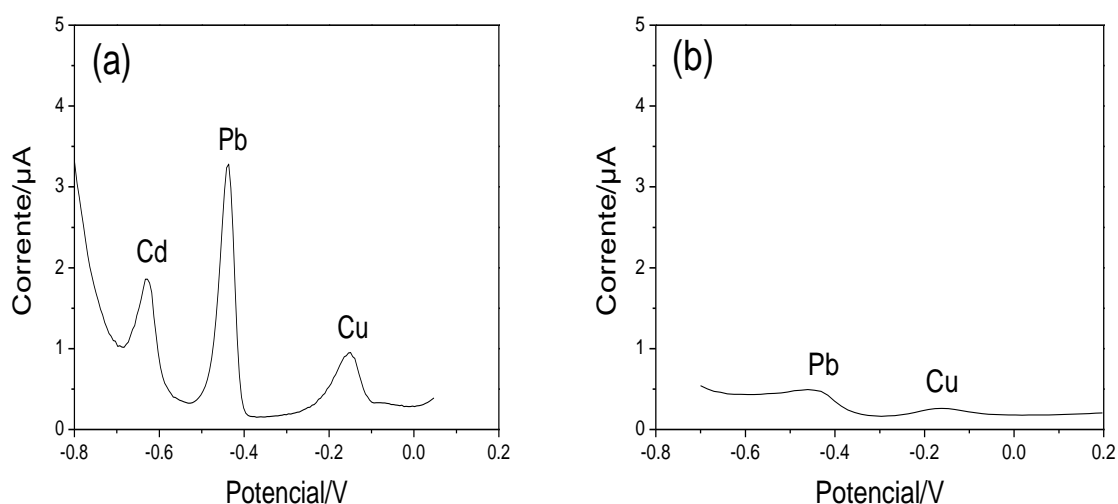


Figura 11. Voltamogramas para o (a) ensaio 7 e para o (b) ensaio 8 no planejamento fatorial para determinação de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.

Com esses dados, foi possível estudar o efeito de cada parâmetro eletroquímico, bem como a interação entre eles na análise de cada metal, além de obter um modelo de previsão, em forma de equações, que pode descrever de forma matemática a análise dos metais. Os valores dos efeitos de cada parâmetro eletroquímico para os metais estudados são descritos na Tabela 13. Para avaliação de cada efeito, observa-se o intervalo em que ele se encontra, com o auxílio do erro experimental. Se esse intervalo possuir o valor zero, o efeito em questão pode assumir tanto valores positivos quanto valores negativos. Dessa forma o efeito do parâmetro estudado não é significativo, ou seja, ele não interfere na análise. O estudo da significância dos efeitos é uma etapa importante na avaliação do modelo de previsão obtido por meio do teste ANOVA.

Tabela 13. Valores dos efeitos e seus respectivos erros da matriz planejamento para a determinação simultânea de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.

	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>
<b>Média</b>	0,2726 ± 0,129	0,2985 ± 0,0067	0,1056 ± 0,0026
<b>E<sub>d</sub></b>	-0,1222 ± 0,427	-0,0337 ± 0,0222	-0,1549 ± 0,0102
<b>t<sub>d</sub></b>	0,0945 ± 0,427	0,0325 ± 0,0222	0,0902 ± 0,0102
<b>[HCl]</b>	0,0168 ± 0,427	0,0507 ± 0,0222	0,2539 ± 0,0102
<b>E<sub>d</sub><sup>2</sup></b>	0,4028 ± 0,427	0,4757 ± 0,0222	0,01765 ± 0,0102
<b>t<sub>d</sub><sup>2</sup></b>	0,392 ± 0,427	0,4225 ± 0,0222	0,0213 ± 0,0102
<b>[HCl]<sup>2</sup></b>	0,2923 ± 0,427	0,3787 ± 0,0222	0,2271 ± 0,0102
<b>E<sub>d</sub> x t<sub>d</sub></b>	-0,0392 ± 0,427	-0,0102 ± 0,0222	-0,0520 ± 0,0102
<b>E<sub>d</sub> x [HCl]</b>	-0,0334 ± 0,427	-0,0420 ± 0,0222	0,2492 ± 0,0102
<b>t<sub>d</sub> x [HCl]</b>	0,0052 ± 0,427	-0,0077 ± 0,0222	0,0895 ± 0,0102

Como pode ser observado na Tabela 13, nenhum dos efeitos foi significativo na determinação de Cu, o mesmo ocorrendo com as interações.

Na determinação de Pb, todos os efeitos são significativos, porém a única interação significativa ocorre entre o potencial de deposição e a concentração do eletrólito suporte. Analisando cada efeito, deve-se levar em consideração o intervalo encontrado. De acordo com os dados, a diminuição do

potencial de deposição melhora o sinal analítico. O valor encontrado para o efeito foi negativo, portanto mais próximo do nível -1 do planejamento (ver Tabela 7), mostrando que uma diminuição neste parâmetro aumenta a resposta obtida. O mesmo raciocínio é utilizado para avaliar os demais efeitos. Portanto, podemos considerar que o aumento do tempo de deposição e da concentração do eletrólito suporte aumentam a resposta obtida. As interações foram estudadas através de superfícies de respostas.

Na determinação de Cd, os efeitos de todos os parâmetros foram significativos, bem como os efeitos de todas as interações. Assim como ocorreu para o Pb, uma diminuição do potencial de deposição aumenta a resposta obtida, enquanto um aumento no tempo de deposição e na concentração de HCl também aumentam o sinal analítico.

Partindo dos efeitos de cada parâmetro foi possível, com o auxílio do pacote de ferramentas estatísticas EXCEL, obter modelos de previsão para cada um dos metais, em forma de equações matemáticas. Esses modelos foram avaliados através da ANOVA, para verificar se são modelos ajustados. Os modelos matemáticos são apresentados pelas equações abaixo:

$$\begin{aligned} \underline{\text{Cu}^{2+}}: dt/dE(s/V) = & 0,2746(\pm 0,0056) - 0,0611(\pm 0,0035)E_d + 0,0472(\pm 0,0035)t_d \\ & + 0,0084(\pm 0,0035)[\text{HCl}] - 0,0063(\pm 0,0051)E_d^2 - 0,0171(\pm 0,0051)t_d^2 - \\ & 0,1168(\pm 0,0051)[\text{HCl}]^2 - 0,0392(\pm 0,0049)E_d \times t_d - 0,0334(\pm 0,0049)E_d \times [\text{HCl}] - \\ & 0,0053(\pm 0,0049)t_d \times [\text{HCl}] \end{aligned} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$\begin{aligned} \underline{\text{Pb}^{2+}}: dt/dE(s/V) = & 0,2433(\pm 0,0003) - 0,0169(\pm 0,0002)E_d + 0,0163(\pm 0,0002)t_d \\ & + 0,0254(\pm 0,0002)[\text{HCl}] + 0,0350(\pm 0,0003)E_d^2 - 0,0184(\pm 0,0003)t_d^2 - \\ & 0,0622(\pm 0,0003)[\text{HCl}]^2 - 0,0102(\pm 0,0002)E_d \times t_d - 0,0420(\pm 0,0002)E_d \times [\text{HCl}] - \\ & 0,0078(\pm 0,0002)t_d \times [\text{HCl}] \end{aligned} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$\begin{aligned} \underline{\text{Cd}^{2+}}: dt/dE(s/V) = & 0,0065(\pm 0,5773) - 0,0774(\pm 0,3535)E_d + 0,0451(\pm 0,3535)t_d \\ & + 0,1179(\pm 0,3535)[\text{HCl}] + 0,0088(\pm 0,5204)E_d^2 - 0,0107(\pm 0,5204)t_d^2 - \\ & 0,1135(\pm 0,5204)[\text{HCl}]^2 - 0,0260(\pm 0,500)E_d \times t_d - 0,1246(\pm 0,5000)E_d \times [\text{HCl}] - \\ & 0,0448(\pm 0,5000)t_d \times [\text{HCl}] \end{aligned} \quad \text{(Equação 3)}$$

A validação do modelo foi testada por meio da Análise de Variância (ANOVA) para um nível de 95% de confiança. Os dados encontram-se na tabela 14, e o valor calculado do teste foi comparado ao valor tabelado de acordo com a tabela F (anexo 1), considerando os graus de liberdade de forma adequada (neste caso, 3 para o numerador e 2 para o denominador). O valor tabelado é 19,16. Para um modelo ajustado, o valor calculado do teste deve ser menor que o valor tabelado.

Tabela 14. Quadro ANOVA para avaliação dos modelos obtidos para análise de Cu, Cd e Pb com eletrodo de BDD.

	<b>SQ<sub>faj</sub></b>	<b>SQ<sub>ep</sub></b>	<b>MQ<sub>faj</sub></b>	<b>MQ<sub>ep</sub></b>	<b>F<sub>calc</sub></b>
<b>Cu</b>	0,00625	0,01969	0,00208	0,00985	0,2114
<b>Pb</b>	0,00623	0,00099	0,00208	0,00049	4,1977
<b>Cd</b>	0,02445	0,00815	0,00021	0,00011	77,8496

Analisando a tabela 14, e comparando com o valor de F tabelado para um nível de 95 % de confiança, pode-se perceber que os modelos matemáticos obtidos para o Cu e para o Pb foram perfeitamente ajustados, porém não foi bem ajustado para o Cd. Isso não quer dizer que a análise não pode ser realizada, e sim que este não foi um bom modelo de previsão para a análise de Cd a 95% de confiança. Manivannan et al [78] mostraram em um estudo que pode existir uma interação entre Cd e Pb na superfície do BDD quando ambos são eletrodepositados, pois a deposição do Pb pode impedir a deposição de baixas concentrações de Cd, o afetando o sinal analítico do metal. Essa pode ser a provável causa de, em alguns ensaios do planejamento, a corrente do Cd ter sido igual a zero, causando essa falta de ajuste do modelo a um nível de 95% de confiança. Desse modo, o ajuste do modelo a um nível de 99% de confiança foi verificado, com o auxílio da tabela F para esse nível (anexo 2). O valor de F tabelado para 99% de confiança é 99,16, e, neste caso, não existe falta de ajuste no modelo para o Cd, o que mostra que este foi um bom modelo de previsão a um nível de 99% de confiança. Como já era esperado, os modelos de previsão para análise de Cu e Pb também foram ajustados para um nível de 99% de confiança.

Com o auxílio do programa STATISTICA, foi possível construir um gráfico de escores (Figura 12) com a ferramenta quimiométrica PCA (Análise de Componentes Principais), que fornece informações a respeito da análise simultânea dos metais.

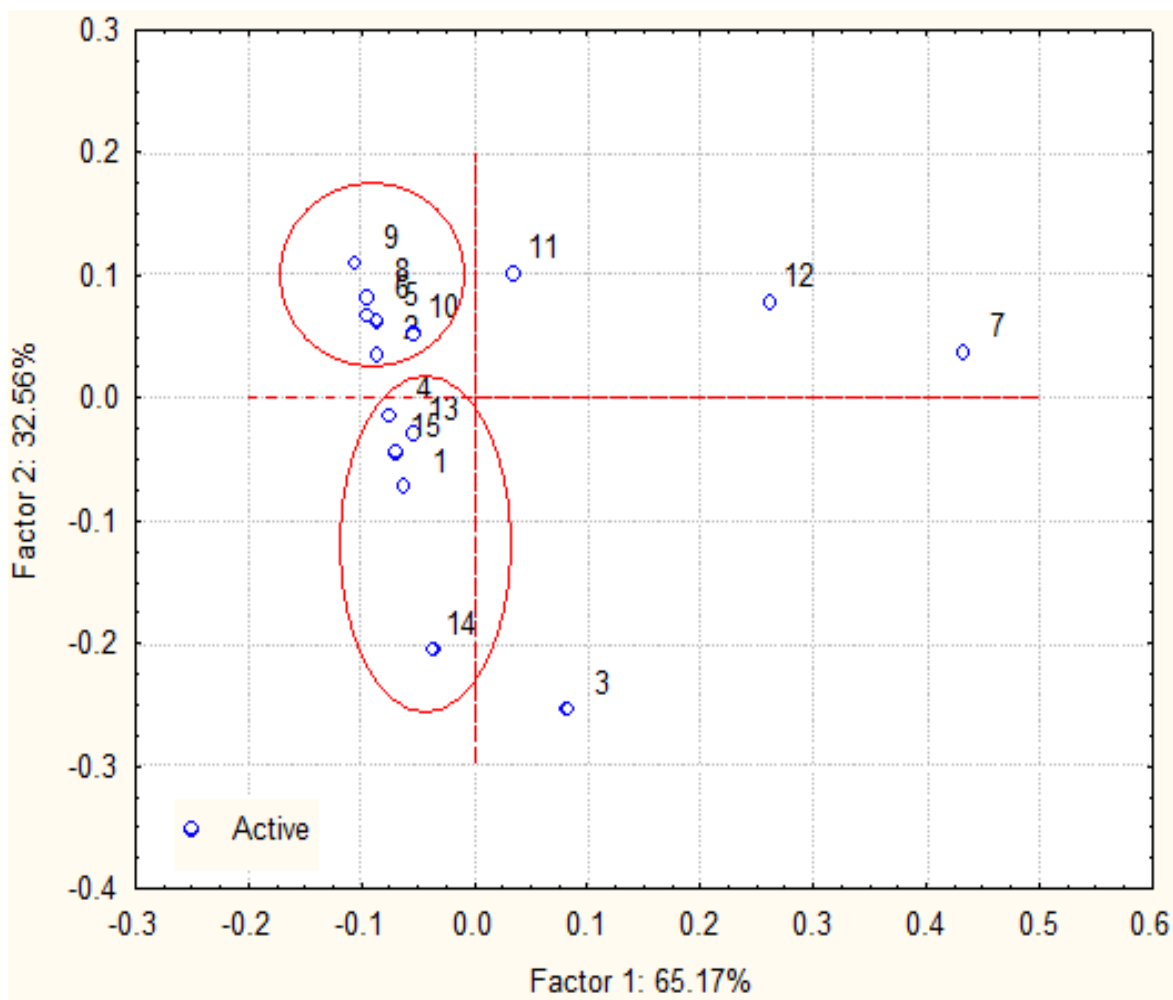


Figura 12. Gráfico de escores PCA para otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) é uma ferramenta quimiométrica que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas podem ser amostras e as colunas

variáveis. Neste sentido, com a PCA foi possível efetuar uma simplificação, redução da dimensão original dos dados, modelamento, detecção de amostras anômalas, seleção de variáveis importantes em determinado sistema, classificação e previsão. [79]

Na PCA, os dados são agrupados de acordo com as similaridades encontradas. Os dados são projetados através de combinações lineares, formando as componentes principais. [80] O gráfico de escores mostrado na Figura 12 mostra um modelo com as componentes principais agrupadas. O estudo desses grupamentos de componentes permitiu chegar a uma conclusão quanto a condição ótima de análise. Para melhor avaliação do gráfico de escores, este deve ser analisado em conjunto com os dados obtidos na Tabela 12.

Primeiramente, observa-se um grupamento onde se encontram os ensaios 1, 4, 13, 14 e 15. As respostas para esses ensaios são similares, por isso formam um bloco no gráfico de escores. Importante salientar que os ensaios 13, 14 e 15 são referentes ao ponto central. Os ensaios desse grupamento favorecem a análise de Cu e Pb, porém, em todos eles, a resposta para o Cd tende para zero. Entre os ensaios desse grupamento, o mais interessante parece ser o correspondente a condição 1, pois neste o tempo de deposição encontra-se no nível baixo (180 segundos), o que aumenta a frequência analítica. Mas deve-se salientar que as respostas foram satisfatórias somente para Cu e Pb.

Em um segundo grupamento encontra-se os ensaios 2, 5, 6, 8, 9 e 10. Esse conjunto experimental forneceu valores baixos de corrente para análise dos metais, tanto individualmente quanto simultaneamente, se comparadas as respostas do primeiro bloco. Além disso, as respostas para Cd tendem a zero. Nos ensaios 2, 5 e 9, pode-se inferir que as respostas são menores quando comparadas ao primeiro bloco devido a baixa concentração do eletrólito suporte HCl. Conforme já foi mencionado, o pH tem uma grande influência na análise desses metais, e quanto mais baixo o valor do pH da solução analisada, melhor é a resposta obtida. As interações entre os parâmetros avaliados também podem ser responsáveis pelo baixo desempenho desses ensaios.

Em um terceiro momento, encontra-se os ensaios 3, 7, 11 e 12. Esses ensaios não encontram-se agrupados, e sim separados, mostrando que eles não possuem similaridades com nenhum outro ensaio, portanto devem ser avaliados separadamente. Os ensaios 11 e 12 diferem pela concentração de HCl utilizado como eletrólito suporte. Apesar da concentração de HCl no ensaio 11 estar no nível baixo, as respostas obtidas para Cu e Pb são bastante similares em relação ao ensaio 12. Porém, para o Cd há um aumento significativo na resposta para o ensaio 12, que possui uma concentração de HCl no nível alto. O experimento 3 mostra-se interessante para a análise dos metais, apresentando as maiores respostas individuais para Cu e Pb, além de uma resposta razoável para o Cd. Considerando a análise simultânea apenas de Cu e Pb, esse foi o melhor ensaio. Contudo, o experimento 7 mostrou-se o melhor para a análise dos 3 metais simultaneamente, pois, além de apresentar a maior resposta para o Cd, apresentou respostas satisfatórias para Cu e Pb. Comparado aos outros ensaios, a condição do experimento 7 é a que forneceu a melhor resposta para análise simultânea dos metais. A Figura 13 mostra o gráfico de *loadings*. Através dele é possível obter informações a respeito das variáveis estudadas no planejamento, bem como a interferência de cada parâmetro otimizado na análise.

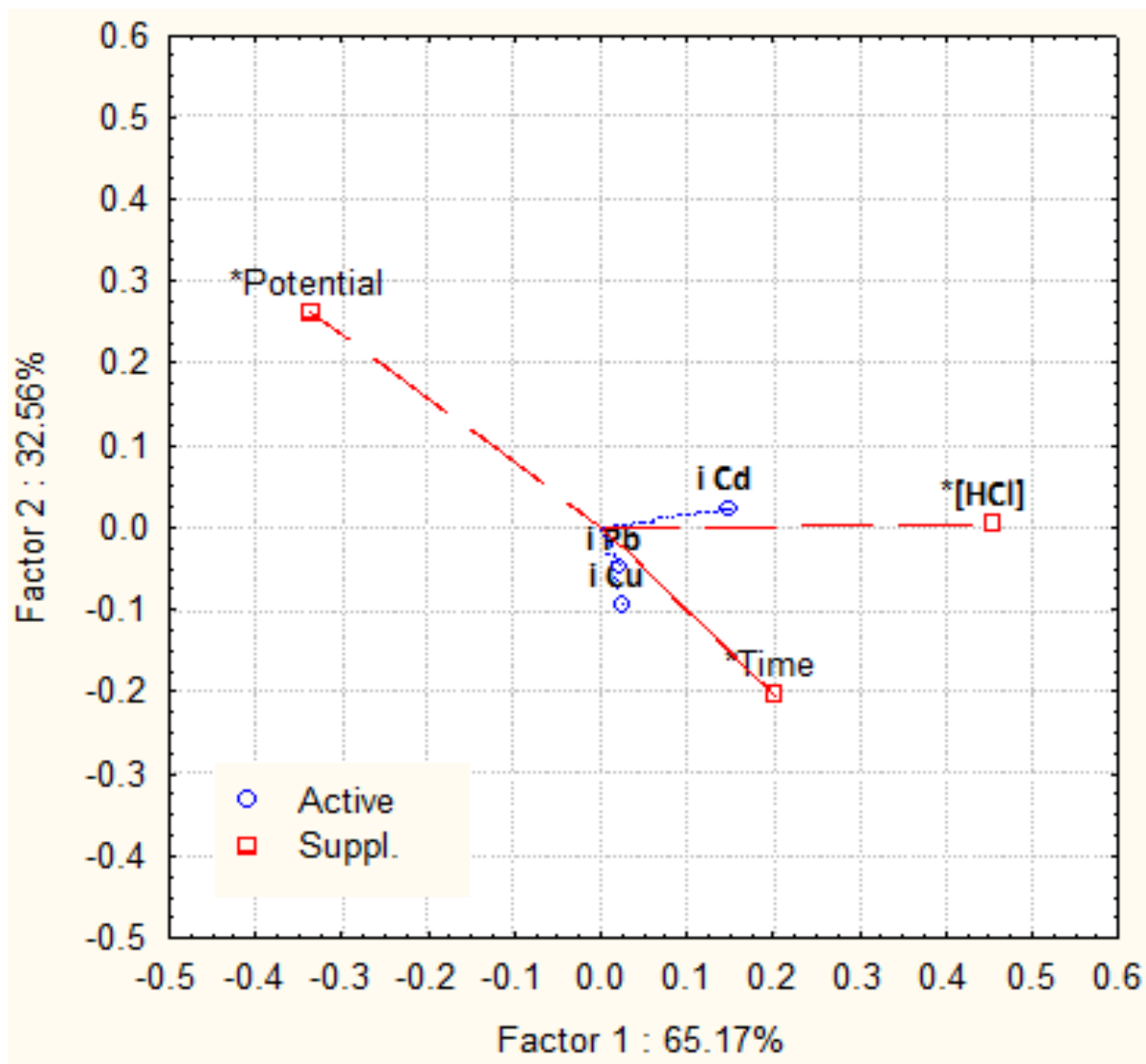


Figura 13. Gráfico de *loadings* PCA para otimização das condições de análise para Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.

No gráfico de *loadings*, deve-se levar em consideração as variáveis ativas (representadas pelas respostas eletroquímicas dos analitos estudados) e as variáveis suplementares (representadas pelos parâmetros estudados: potencial de deposição, tempo de deposição e [HCl]). Observando o gráfico, pela localização das variáveis ativas, notamos que o parâmetro de maior influência na análise dos metais é o tempo de deposição, principalmente na resposta de Cu e Pb. A concentração do eletrólito suporte HCl tem uma maior influência na resposta do Cd, além de influenciar também nas respostas de Cu e Pb. O potencial é o parâmetro que menos influenciou na otimização das condições de análise. Uma melhor compreensão do gráfico de *loadings* se dá



quando este é analisado juntamente com o gráfico de scores e com o estudo dos efeitos dos parâmetros do modelo (vide Tabela 13).

Os dados obtidos pela PCA podem ser confrontados com as superfícies de resposta obtidas com o planejamento de experimentos realizado. Para construção das superfícies, foi levado em consideração a interação entre os parâmetros 2 a 2, mantendo o outro fixo de acordo com o seu efeito. Assim, obteve-se 3 superfícies de resposta para cada metal, que auxiliam na escolha da melhor condição de análise. As Figuras 14, 15 e 16 exibem as superfícies de respostas para os metais Pb, Cu e Cd, respectivamente. Os parâmetros fixados estão de acordo com a significância de cada efeito, ou seja, enquanto a concentração de HCl e o tempo de deposição estão fixados no nível +1, o potencial de deposição foi fixado no nível -1. Esses valores foram escolhidos de acordo com o estudo realizado e exibido na Tabela 13. Observando as superfícies de resposta, chega-se a algumas conclusões a respeito da análise de Pb com BDD. Mantendo a concentração de HCl fixa no ponto +1 (a), nota-se que um aumento no tempo de deposição e uma diminuição no potencial de deposição aumentam a resposta obtida. Quando o tempo de deposição é fixado em +1 (b), pode-se dizer que o aumento da concentração de HCl aumenta a resposta eletroquímica. Em (c), onde o potencial de deposição foi fixado, nota-se uma melhor resposta nas imediações do ponto central. Esses dados são condizentes com os dados obtidos com o PCA.

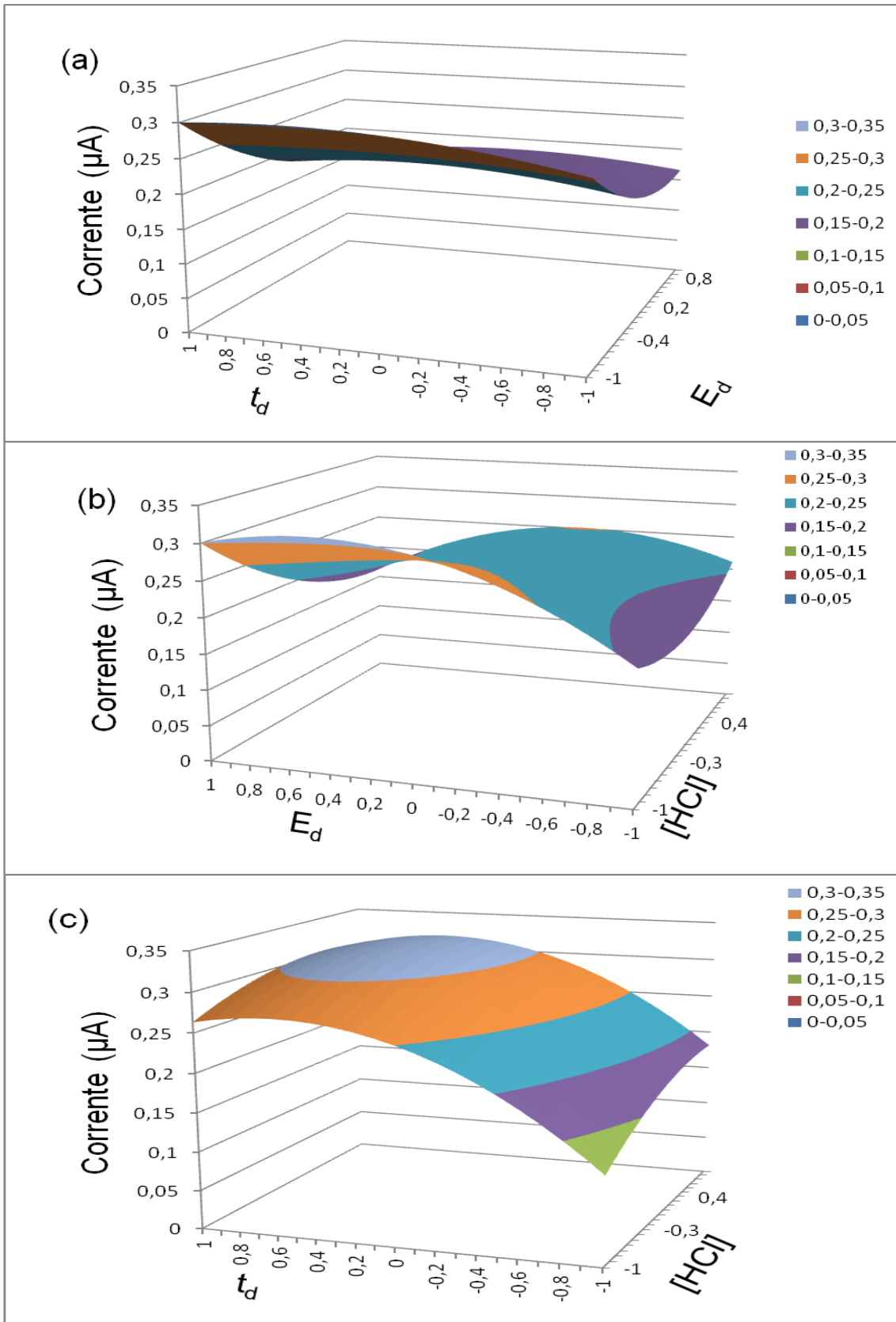


Figura 14. Superfícies de respostas para determinação de Pb com BDD para (a) concentração de HCl fixa no ponto +1, (b) tempo de deposição fixo no ponto +1 e (c) potencial de deposição fixo no ponto -1.

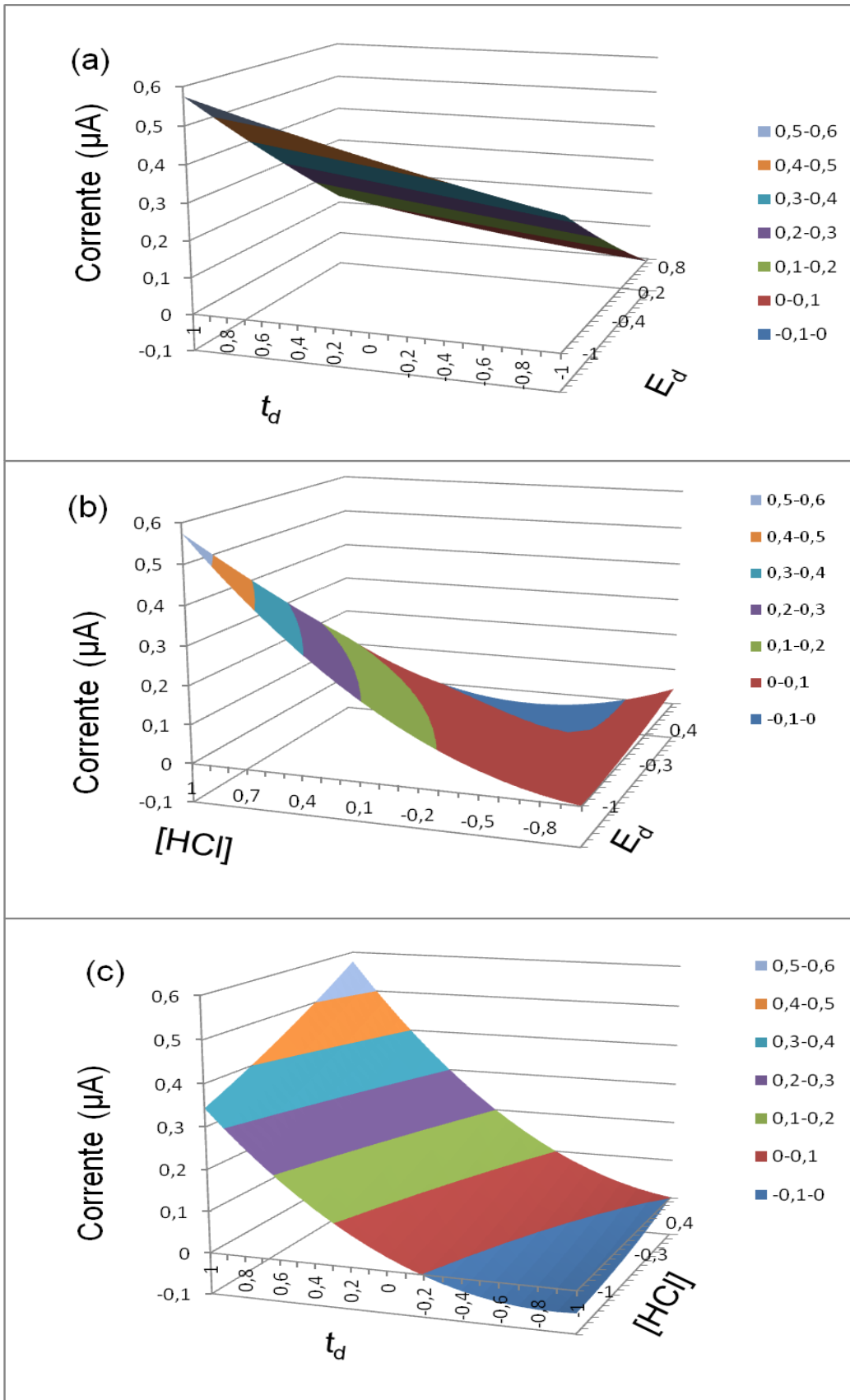


Figura 15. Superfícies de respostas para determinação de Cd com BDD para (a) concentração de HCl fixa no ponto +1, (b) tempo de deposição fixo no ponto +1 e (c) potencial de deposição fixo no ponto -1.

De acordo com as superfícies de resposta obtidas para o Cd (Figura 15), pode-se notar que as melhores condições são parecidas com as obtidas para o Pb. Mantendo a concentração de HCl fixa em +1 (a), a resposta eletroquímica foi melhor com um aumento no tempo de deposição e uma diminuição no potencial de deposição. Com o tempo de deposição fixo em +1 (b) um aumento na concentração de HCl e uma diminuição no potencial de deposição aumentam a corrente obtida. Mantendo o potencial de deposição fixo no nível -1 (c) nota-se que a melhor resposta foi obtida com a concentração de HCl no nível alto e o tempo de deposição no ponto central. Tal como aconteceu na análise de Pb, os dados para análise de Cd são condizentes com os obtidos pelo PCA.

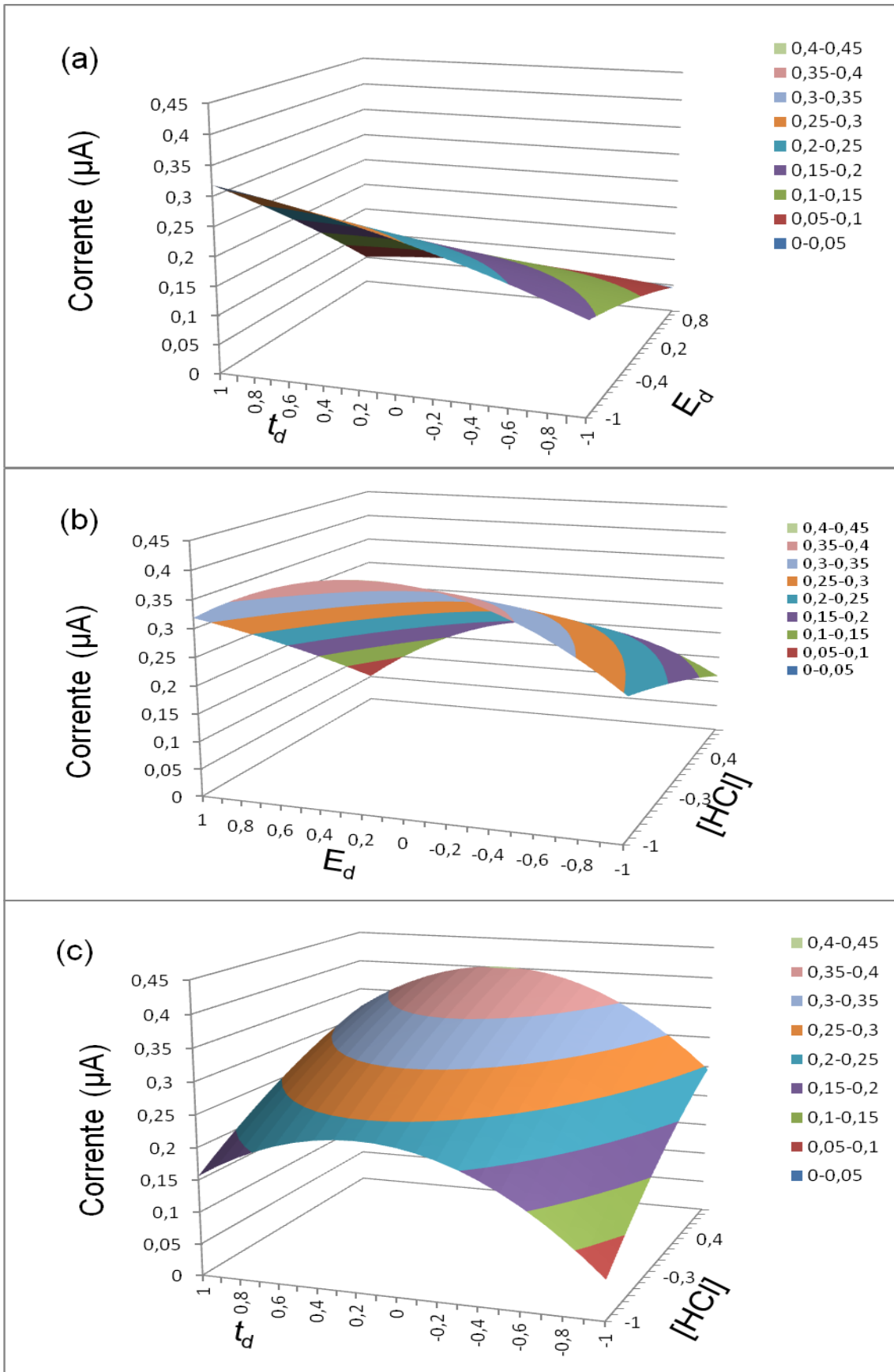


Figura 16. Superfícies de respostas para determinação de Cu com BDD para (a) concentração de HCl fixa no ponto +1, (b) tempo de deposição fixo no ponto +1 e (c) potencial de deposição fixo no ponto -1.

Apesar de nenhum parâmetro ter sido significativo para a determinação de Cu, as superfícies de resposta para esse metal foram construídas de acordo com as superfícies para o Pb e o Cd, por se tratar de uma análise simultânea. Mantendo a concentração de HCl fixa em +1 (a), nota-se que a corrente obtida foi melhor com um potencial de deposição mais baixo e um tempo de deposição maior. Quando o tempo de deposição foi fixo em +1, uma resposta melhor é obtida com a concentração de HCl mais elevada e o potencial de deposição menor. Mantendo o potencial de deposição fixo em -1, percebe-se que nas imediações do ponto central a resposta eletroquímica foi maior. Tal como ocorreu para o Pb e o Cd, as superfícies de resposta para o Cu chegam a mesma conclusão obtida com o PCA.

Com a análise estatística feita, pode-se fixar os parâmetros para análise simultânea de Cu, Pb e Cd, de acordo com as superfícies de resposta e com o PCA. Assim fixou-se o potencial de deposição no nível baixo, o tempo de deposição no nível médio e a concentração de HCl no nível alto, de acordo com a Tabela 15. Esses parâmetros foram fixados visando uma melhora na sensibilidade aliada a uma melhor frequência analítica.

Tabela 15. Parâmetros selecionados para análise simultânea de Cu, Pb e Cd com eletrodo de BDD.

$E_d$ (V)	$t_d$ (s)	[HCl] (mmolL <sup>-1</sup> )
-0,95	240	100

Conforme já mencionado, os metais foram analisados também com o eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio, para confirmação dos resultados. Para tal análise, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com os mesmos parâmetros utilizados na otimização das condições de análise com o BDD. Como a determinação de metais com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio já é um método bem estabelecido, não foi realizada uma análise estatística dos dados, mas esses foram utilizados para comparar com as melhores condições obtidas para a análise com o BDD. Os dados do planejamento encontram-se na Tabela 16. O planejamento foi realizado com os metais na concentração de 40 µgL<sup>-1</sup> e de modo aleatório. A

Figura 17 exibe os voltamogramas com a melhor e a pior resposta obtidas (ensaios 7 e 4, respectivamente).

Tabela 16. Matriz planejamento fatorial para Cu, Pb e Cd com eletrodo de carbono-vítreo modificado com mercúrio.

<b>Ensaio</b>	<b>E<sub>d</sub>(V)</b>	<b>T<sub>d</sub> (s)</b>	<b>[HCl] mmolL<sup>-1</sup></b>	<b>iCu/μA</b>	<b>iPb/μA</b>	<b>iCd/μA</b>
<b>1</b>	-0,95	180	50	0,678	2,271	0,817
<b>2</b>	-0,75	180	50	0,892	4,08	0,46
<b>3</b>	-0,95	300	50	1,465	2,03	0,01
<b>4</b>	-0,75	300	50	1,081	1,445	0
<b>5</b>	-0,95	180	100	1,605	2,685	1,008
<b>6</b>	-0,75	180	100	1,238	2,971	0,508
<b>7</b>	-0,95	300	100	4,337	3,696	1,338
<b>8</b>	-0,75	300	100	3,061	2,755	0,905
<b>9</b>	-0,85	240	75	0,706	2,918	0,943
<b>10</b>	-0,85	240	75	1,381	2,369	0,267
<b>11</b>	-0,85	240	75	2,554	2,876	0,892

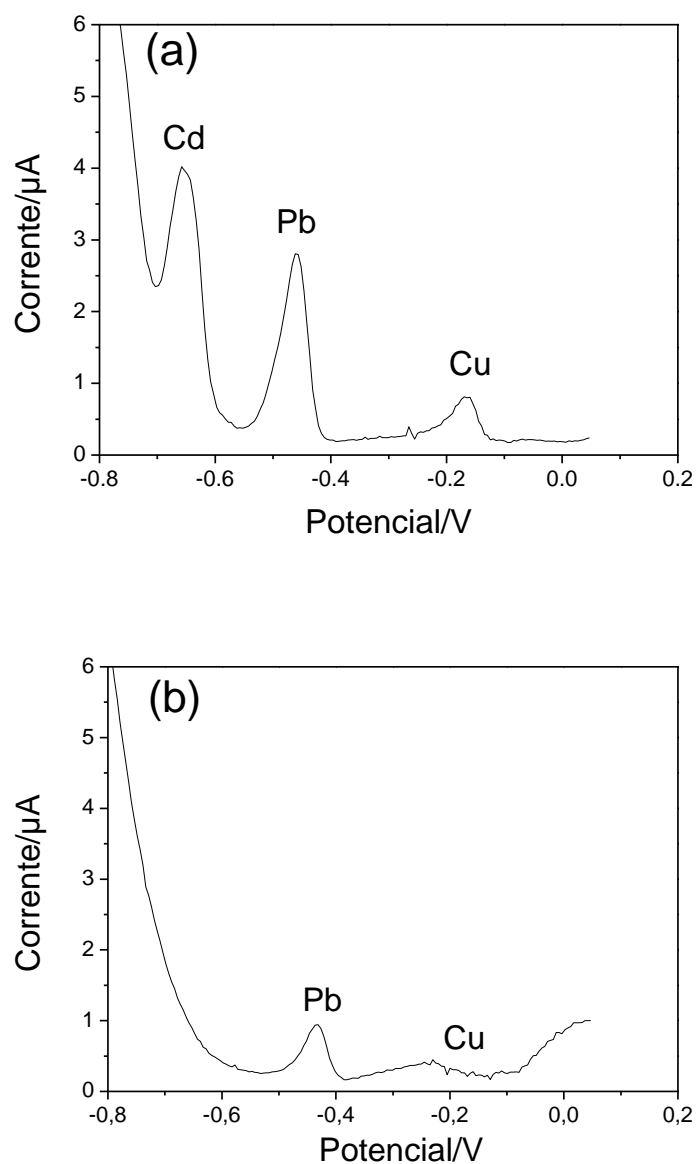


Figura 17. Voltamogramas para (a) o melhor ensaio e (b) o pior ensaio no planejamento fatorial para determinação de Cu, Cd e Pb com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

Analisando os dados obtidos e expostos na Tabela 16, além dos voltamogramas da Figura 17, nota-se que o melhor ensaio realizado foi o de número 7, ou seja, com o potencial de deposição no nível baixo, e o tempo de deposição e concentração de HCl no nível alto (Tabela 17).



Tabela 17. Parâmetros selecionados para análise simultânea de Cu, Pb e Cd com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio.

$E_d$ (V)	$t_d$ (s)	[HCl] ( $\text{mmolL}^{-1}$ )
-0,95	300	100

A observação das Tabelas 15 e 17 permite notar que os parâmetros selecionados para a análise com o eletrodo de BDD e para a análise com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio são semelhantes, com diferença apenas no tempo de deposição, que está no nível alto para o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, enquanto para o BDD encontra-se no nível médio. Cabe ressaltar que aqui o ponto central não foi estudado, sendo utilizado apenas para obtenção do erro experimental. Assim, os níveis estudados foram apenas o nível alto e nível baixo. Por ser um método bem estabelecido, a análise de metais pesados já é realizada com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, assim o planejamento foi realizado apenas para mostrar a similaridade entre as condições deste método com o método proposto.

#### 4.2.2. Otimização das condições de análise para Zn:

Para a determinação de Zn com o eletrodo de BDD, foram otimizados o potencial e o tempo de deposição ( $E_d$  e  $t_d$ ) através de um planejamento fatorial completo  $3^2$  do tipo *screening*, e os dados foram analisados com o pacote de ferramentas estatísticas EXCEL e o programa STATISTICA. O eletrólito suporte utilizado foi o tampão acetato pH 4,6 na concentração  $0,5 \text{ molL}^{-1}$ , pois testes preliminares com outras concentrações não forneceram bons resultados, devido principalmente a acidez da amostra. Conforme mencionado, o pH ótimo para análise de Zn é entre 4 e 5, e com o eletrólito suporte em baixas concentrações, ao adicionar a amostra, o pH não se manteve nessa faixa, prejudicando a obtenção do sinal analítico. Com o tampão acetato na concentração  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  o sinal analítico apresentava muito ruído, e em concentrações abaixo de  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  não foram obtidos sinais. Os parâmetros estudados para o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio

foram os mesmos, estudando aqui também a influência do eletrólito suporte. Os ensaios foram realizados de modo aleatório, com o Zn na concentração de  $40 \mu\text{gL}^{-1}$ . Os valores de corrente obtidos para cada ensaio com o planejamento realizado encontram-se na Tabela 18. A Figura 18 exibe os voltamogramas para 2 condições testadas: a condição 4 e a condição 3, mostrando o melhor e o pior resultado obtido com o planejamento, respectivamente.

Tabela 18. Matriz do planejamento  $3^2$  e os resultados obtidos para o Zn.

<b>Ensaio</b>	<b><math>E_d / V</math></b>	<b><math>t_d / s</math></b>	<b><math>i_{zn} / \mu A</math></b>
1	-1	-1	0,794
2	0	-1	0,366
3	1	-1	0,117
4	-1	0	1,99
5	0	0	1,04
6	1	0	0,212
7	-1	1	1,46
8	0	1	1,08
9	1	1	0,188
10	0	0	1,07
11	0	0	1,15

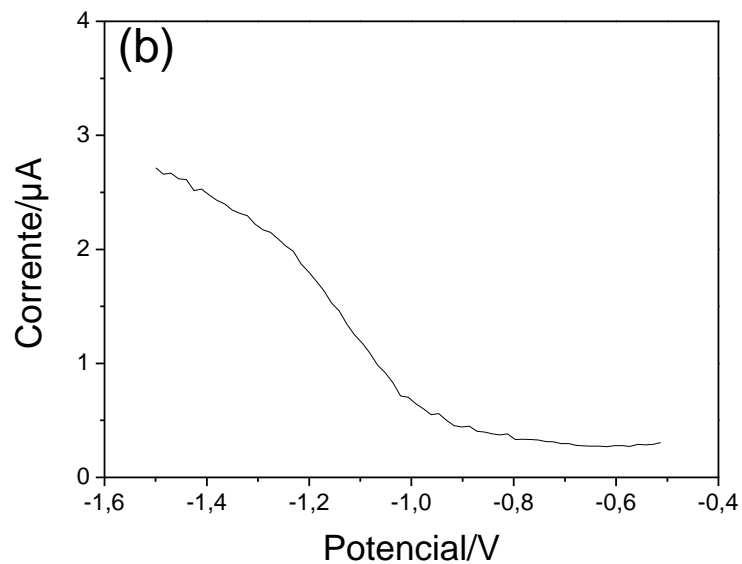
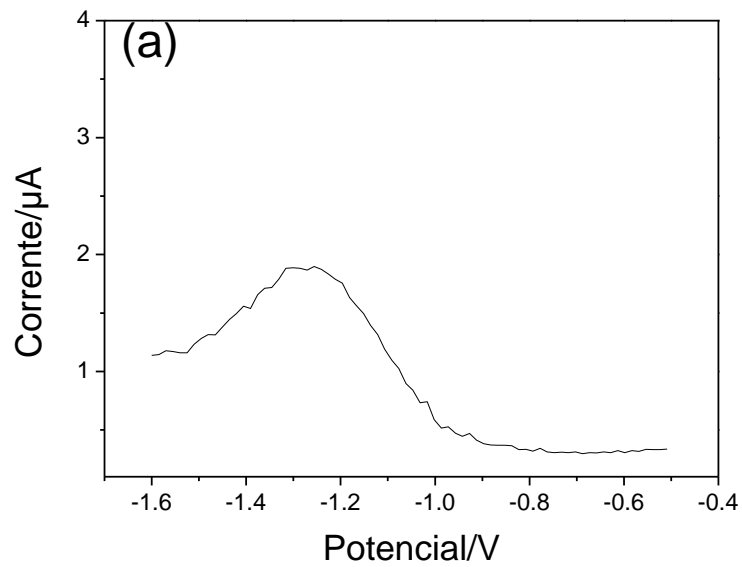


Figura 18. Voltamogramas para o (a) ensaio 4 e para o (b) ensaio 3 no planejamento fatorial para determinação de Zn.

Do mesmo modo que foi feito para o Cu, Pb e Cd, foi possível estudar o efeito de cada parâmetro eletroquímico para a análise de Zn, bem como a interação entre eles, além de obter um modelo de previsão, em forma de equação, que pode descrever de forma matemática a análise do metal. Os valores dos efeitos de cada parâmetro eletroquímico para os metais estudados são descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Valores dos efeitos e seus respectivos erros da matriz planejamento para a determinação de Zn com eletrodo de BDD.

<b>Média</b>	1,4633 ± 0,0215
<b>E<sub>d</sub></b>	-2,2515 ± 0,0569
<b>t<sub>d</sub></b>	0,3375 ± 0,0569
<b>E<sub>d</sub><sup>2</sup></b>	2,7685 ± 0,0569
<b>t<sub>d</sub><sup>2</sup></b>	2,3905 ± 0,0569
<b>E<sub>d</sub> x t<sub>d</sub></b>	0,0905 ± 0,0569

Com a observação da tabela 19, pode-se notar que todos os efeitos foram significativos, bem como a interação entre eles. Uma análise dos dados sugere que uma diminuição do potencial de deposição (ou seja, próximo ao nível -1) interfere aumentando o sinal analítico. Já o tempo de deposição interfere na análise aumentando a resposta quando próximo ao nível alto do planejamento, ou seja um aumento no tempo de deposição aumenta a resposta eletroquímica.

Partindo dos efeitos de cada parâmetro e das interações existentes, foi possível, com o auxílio do pacote de ferramentas estatísticas EXCEL, obter um modelo de previsão para cada análise de Zn com BDD, em forma de equação matemática. Esse modelo foi avaliado através da ANOVA, para verificar se é ou não um modelo ajustado. O modelo matemático é apresentado pela equação abaixo:

$$dt/dE(s/V)=1,0664(\pm 0,0016) - 0,7505(\pm 0,0013)E_d + 0,1125(\pm 0,0013)t_d + 0,0651(\pm 0,0020)E_d^2 - 0,0313(\pm 0,0020)t_d^2 + 0,0452(\pm 0,0016)E_d \times t_d$$

(Equação 4)

A validação do modelo foi testada por meio da Análise de Variância (ANOVA) para um nível de 99% de confiança, pois a 95% de confiança o modelo não foi bem ajustado. Os dados encontram-se na Tabela 20, e o valor calculado do teste foi comparado ao valor tabelado de acordo com a tabela F (anexo 2), considerando os graus de liberdade de forma adequada (neste caso, 3 para o numerador e 2 para o denominador). O valor tabelado é 99,16. Para um modelo ajustado, o valor calculado do teste deve ser menor que o valor

tabelado. Analisando a Tabela 20, e comparando com o valor de F tabelado para um nível de 99% de confiança, pode-se perceber que o modelo matemático obtido para a análise de Zn com BDD foi perfeitamente ajustado.

Tabela 20. Quadro ANOVA para avaliação dos modelos obtidos para análise de Zn com eletrodo de BDD.

$SQ_{faj}$	$SQ_{ep}$	$MQ_{faj}$	$MQ_{ep}$	$F_{calc}$
0,2427	0,0065	0,0601	0,0032	25,03

Os dados obtidos com a matriz planejamento permitiu a obtenção de uma superfície de resposta que auxiliou no entendimento e na obtenção das melhores condições de análise para o Zn com eletrodo de BDD. A superfície de resposta encontra-se na Figura 19.

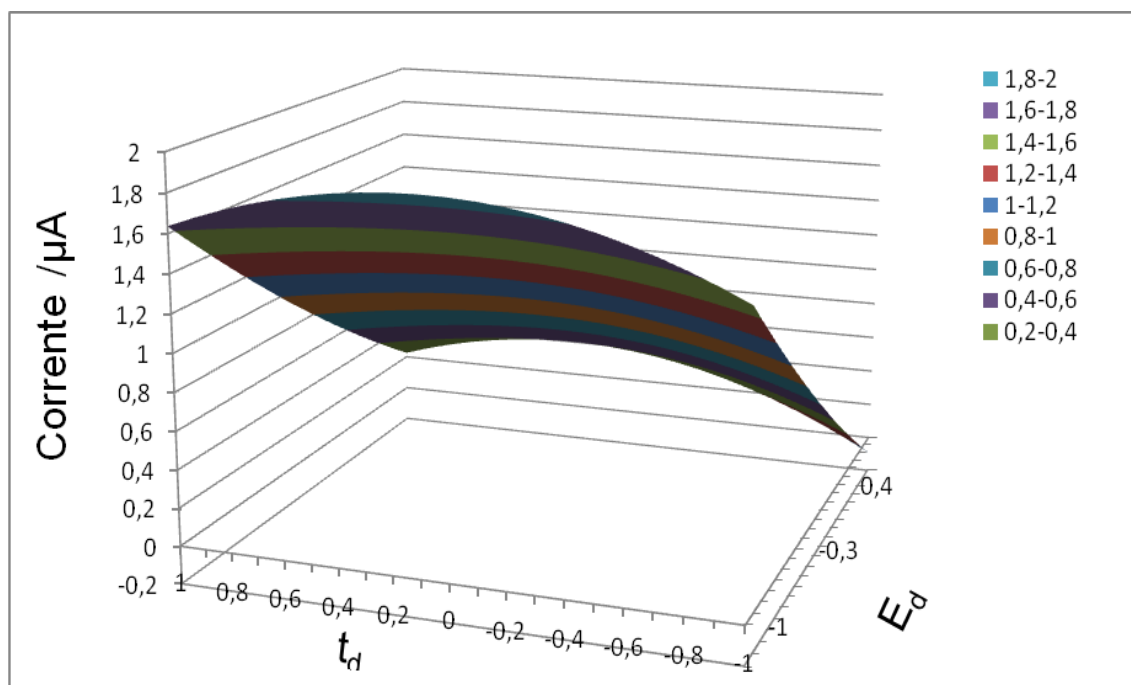


Figura 19. Superfície de resposta para determinação de Zn com BDD.

Observando a superfície de resposta, chega-se a algumas conclusões a respeito da análise de Zn com BDD. Nota-se uma melhora na resposta eletroquímica com a diminuição do potencial de deposição (próximo ao nível baixo do planejamento) e com o tempo de deposição nas imediações do ponto central. É preciso ter cuidado ao diminuir o potencial de deposição, pois, em potenciais abaixo de -1,5 V, pode-se ocorrer liberação de hidrogênio (devido a

elevada taxa de redução  $H^+/H_2$  no meio) e formação de bolhas na superfície do eletrodo, portanto, deve-se adequar a resposta obtida às condições eletroquímicas da análise.

Os dados obtidos com a superfície de resposta são condizentes com a análise dos efeitos de cada parâmetro do planejamento. Assim, chegou-se a uma condição ótima para análise de Zn com eletrodo de BDD, fixando os parâmetros de acordo com a Tabela 21, mantendo o potencial de deposição no nível baixo do planejamento e o tempo de deposição no nível médio, buscando assim uma melhora na resposta eletroquímica aliada a uma alta frequência analítica.

Tabela 21. Parâmetros selecionados para análise de Zn com eletrodo de BDD.

$E_d$ (V)	$t_d$ (s)
-1,5	240

Conforme já mencionado, os metais foram analisados também com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, para confirmação dos resultados. Para tal análise, foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  com os mesmos parâmetros utilizados na otimização das condições de análise com o BDD, estudando também a influência da concentração do eletrólito suporte. Tal como para a análise de Cu, Cd e Pb, não foi realizada uma análise estatística dos dados para a análise de Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio, mas esses foram utilizados para comparar com as melhores condições obtidas para a análise com o BDD. Para otimização da concentração do tampão acetato, os níveis estudados foram:

- Alto:  $500 \text{ mmol L}^{-1}$
- Médio:  $350 \text{ mmol L}^{-1}$
- Baixo:  $100 \text{ mmol L}^{-1}$

Os dados do planejamento encontram-se na Tabela 22. O planejamento foi realizado com os metais na concentração de  $40 \mu\text{gL}^{-1}$  e de modo aleatório. A Figura 20 exibe os voltamogramas com a melhor e a pior resposta obtidas

(ensaios 3 e 5, respectivamente). Esses dados foram comparados aos obtidos com o planejamento para o eletrodo de BDD.

Tabela 22. Matriz planejamento fatorial para Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

<b>Ensaio</b>	<b><math>E_d / V</math></b>	<b><math>t_d / s</math></b>	<b><math>[tamp\tilde{a}o] / mmol L^{-1}</math></b>	<b><math>i_{zn} / \mu A</math></b>
<b>1</b>	-1,5	180	500	1,128
<b>2</b>	-1,3	180	500	0,37
<b>3</b>	-1,5	300	500	1,922
<b>4</b>	-1,3	300	500	0,566
<b>5</b>	-1,5	180	100	0,067
<b>6</b>	-1,3	180	100	0,12
<b>7</b>	-1,5	300	100	0,146
<b>8</b>	-1,3	300	100	0,108
<b>9</b>	-1,4	240	350	0,905
<b>10</b>	-1,4	240	350	0,523
<b>11</b>	-1,4	240	350	0,931

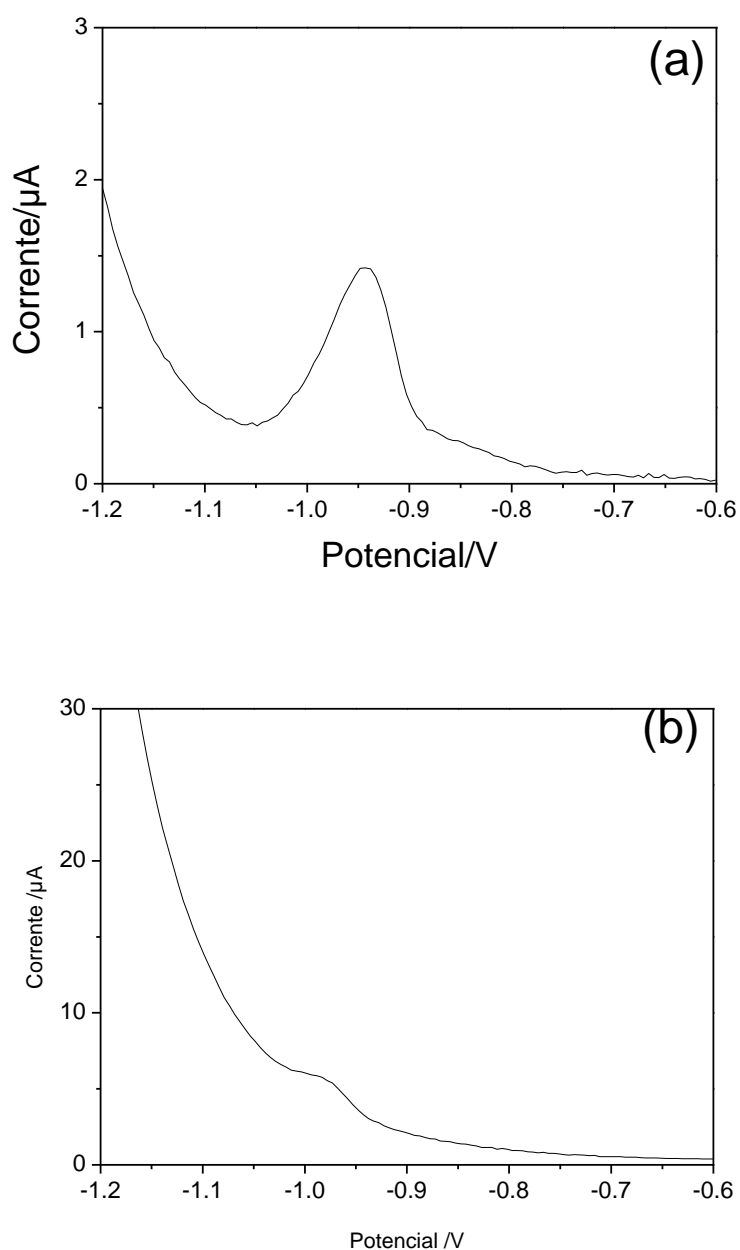


Figura 20. Voltamogramas para (a) o ensaio 3 e (b) o ensaio 5 no planejamento fatorial para determinação de Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

Analisando os dados apresentados e expostos na Tabela 22, além dos voltamogramas da Figura 20, nota-se que o melhor resultado foi obtido para o ensaio 3, onde tem-se o menor potencial (-1,5 V vs Ag|AgCl ) e o maior tempo de deposição (300 s). Neste ensaio a concentração utilizada para o tampão



acetato foi de  $500 \text{ mmolL}^{-1}$  (Tabela 23). O potencial de deposição e a concentração de tampão acetato coincidem com os obtidos para a análise com o eletrodo de BDD (ver tabela 21). O tempo de deposição para a análise com o eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio foi maior, mostrando que o eletrodo de BDD permite uma maior frequência analítica, exibindo mais uma vantagem no uso do eletrodo de BDD.

Tabela 23. Parâmetros selecionados para análise de Zn com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio.

$E_d$ (V)	$t_d$ (s)	[HCl] ( $\text{mmolL}^{-1}$ )
-1,5	300	500

#### 4.3. MINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS:

Conforme mencionado (item III.5.4), a amostragem é uma etapa muito importante na determinação de espécies metálicas que podem estar na forma de complexos na amostra de mel, devido principalmente à presença de resíduos de cera, própolis e materiais orgânicos insolúveis em água em sua composição. Assim, a eliminação da matriz se faz necessária, obtendo os metais livres em solução. Por se tratar de uma amostra muito viscosa e heterogênea, o mel foi submetido a aquecimento em banho-maria a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e solubilizado em banho de ultrassom por 20 minutos sempre que o mesmo apresentou-se cristalizado. Para facilitar a manipulação da amostra 2,5 g de mel foram usados para preparar uma solução aquosa 50 % (m/m) (ver Tabela 10). Na busca de um procedimento simples, rápido, com a menor manipulação da amostra possível que fornecesse resultados confiáveis foram testados três métodos de tratamento da amostra de mel: diluição da amostra, solubilização da amostra em banho de ultrassom, mineralização da amostra em chapa de aquecimento. Após os procedimentos foram realizados testes de recuperação dos 4 metais estudados, avaliando a exatidão do procedimento proposto, através da fortificação das amostras com padrões dos metais Cu, Cd, Pb e Zn,

de forma que, realizadas todas as diluições necessárias, a concentração dos metais durante a análise fosse de  $30 \mu\text{gL}^{-1}$ .

#### 4.3.1. Diluição da amostra (análise direta):

Neste procedimento, uma solução de mel 50 % (m/m) foi preparada e analisada diretamente no eletrólito suporte, sem nenhum tratamento prévio. Foram utilizados 0,50 mL de amostra em 2,00 mL de eletrólito suporte. As tentativas para realização de determinações diretas na solução de mel não foram bem sucedidas, pois nenhum sinal significativo foi obtido, para nenhum dos metais analisados. Esses resultados podem ser atribuídos a alta capacidade complexante da matriz (devido principalmente a matéria orgânica), visto que os íons presentes na solução encontram-se na forma de complexos muito estáveis. Outra explicação pode estar na viscosidade muito elevada do mel (mesmo após a diluição), que faz com que o coeficiente de difusão das espécies potencialmente eletroativas seja muito baixo, e a corrente resultante seja indetectável, mesmo com tempos de deposição maiores. Mesmo diluindo ainda mais a amostra (75% m/m), diminuindo assim a viscosidade do mel, foram observados sinais analíticos apenas para o Cu. A explicação pode estar no fato de, diluindo muito a amostra, os metais Cd, Pb e Zn podem ter ficado abaixo do limite de detecção, e o Cu foi detectado por ser encontrado em uma concentração elevada na amostra. Outra explicação pode estar no fato de os complexos de cobre com a matéria orgânica existentes ser pouco estáveis, deixando assim o metal livre em solução quando a viscosidade diminui. O fato é que não foi possível realizar análise direta nas soluções de mel por voltametria de pulso diferencial. Assim, partiu-se para a tentativa de determinação dos metais de interesse através de procedimentos de digestão da amostra.

#### 4.3.2. Solubilização em banho de ultrassom:

Neste procedimento, transferiu-se 1 g da solução de mel 50 % (m/m) previamente preparada para um balão volumétrico de 10,00 mL, adicionou-se

0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  2 % (v/v), e submeteu a solução ao banho de ultrassom por 20 minutos.

Não foram observados sinais analíticos para nenhum dos metais estudados, devido a alta capacidade complexante da matriz. Mesmo com a amostra mais diluída (75% m/m), não foram observados sinais analíticos para Cd, Pb e Zn. Tal como na análise direta, com a diluição da amostra foi obtido sinal apenas para o Cu, provavelmente pelas razões já mencionadas (alta concentração na amostra e menor estabilidade dos complexos formados com a matéria orgânica). Foram avaliadas algumas modificações no tempo de sonicação da amostra, variando-se entre 5 e 30 minutos. Em tempos inferiores a 20 minutos, não foram obtidos sinais analíticos para os metais, comportamento já esperado. Com os tempos de 25 e 30 minutos, foram observados sinais para os metais estudados, porém com recuperações inferiores a 10%. Além disso, observou-se uma variação aleatória da concentração e do desvio-padrão, mostrando que o método foi pouco reprodutivo. O aumento do tempo de sonicação aumentou o desvio-padrão para os quatro metais. Os testes foram realizados também com a amostra mais diluída (75% m/m), e não foram observadas alterações nos resultados.

Outra modificação avaliada foi na concentração da solução de  $\text{HNO}_3$  utilizada, trabalhando com  $\text{HNO}_3$  10% e  $\text{HNO}_3$  0,4%. O uso de  $\text{HNO}_3$  0,4% não alterou os resultados obtidos anteriormente. O  $\text{HNO}_3$  10% diminuiu o desvio-padrão da análise, mas não alterou as recuperações dos metais, continuando inferiores a 10%. Mesmo em amostras mais diluídas os resultados não foram alterados.

Também foi acrescentado  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v/v (20  $\mu\text{L}$ ) a amostra antes da sonicação (além do  $\text{HNO}_3$ ). Tal como ocorreu quando apenas  $\text{HNO}_3$  foi acrescentado, não foram observados sinais analíticos para os metais estudados. Assim, este procedimento de digestão da amostra foi descartado.

#### 4.3.3. Mineralização ácida em chapa de aquecimento:

Neste procedimento, 1g de solução de mel 50% (m/m) previamente preparada foi deixada em etapa de pré-digestão com 2,00 mL de HNO<sub>3</sub> 69% (v/v) por 12 horas (*overnight*), e depois levada à ebulição com adição de 2,00 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v), por 1 hora. Durante a ebulição da mistura, observou-se o rápido desprendimento de vapores marrons, comportamento esperado, devido a alta reatividade envolvida. Esses vapores estão relacionados com a eliminação de matéria orgânica, e o procedimento foi repetido até que não se observasse mais a eliminação desses vapores, sendo necessários 3 ciclos. A mineralização prosseguiu até redução do volume da amostra para aproximadamente 0,5 mL. Após o aquecimento, a amostra foi deixada em repouso em temperatura ambiente para ser resfriada, e diluída nas soluções do eletrólito suporte (HCl 0,1 molL<sup>-1</sup> e tampão acetato 0,5 molL<sup>-1</sup>) em balões volumétricos de 10,00 mL.

Os testes realizados para a determinação de Cu, Cd, Pb e Zn após esse procedimento forneceram sinais analíticos para os 4 metais estudados, todos com recuperações superiores a 70%, tanto com o eletrodo de BDD quanto com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio. Nas análises de Cu, Cd e Pb, a acidez residual da amostra não representou problemas na análise, e as recuperações se mantiveram em torno de 108% para o Cu, 82% para o Pb e 109% para o Cd (valores médios). Na análise de Zn, a acidez residual constituiu um problema, pois este metal tem sua melhor resposta em pH entre 4 e 5. Porém, a diluição da amostra em solução do eletrólito suporte utilizado (tampão acetato 0,5 molL<sup>-1</sup>) contornou este problema, e a análise pode ser facilmente realizada. A recuperação média do Zn nas amostras foi de 97 %. Além disso, foi observado um baixo desvio-padrão nas medidas para todos os metais estudados, mostrando que o método foi reprodutivo.

Um dos motivos do sucesso deste procedimento de digestão residiu no fato da matriz de mel ser constituída basicamente por açúcares, e a eliminação desses açúcares libera os metais na solução, sendo assim facilmente detectados por VPD em baixas concentrações. Com isso, dos três procedimentos de tratamento da amostra realizados, a mineralização ácida em chapa de aquecimento mostrou-se ser mais eficaz, pois além de fornecer sinais

analíticos para os quatro metais estudados com recuperações elevadas, mostrou-se ser um método bastante reprodutível, devido ao baixo desvio-padrão obtido durante as análises.

#### 4.4. FIGURAS DE MÉRITO:

A fim de proporcionar uma maior confiabilidade aos resultados, algumas figuras de mérito foram estudadas, como a especificidade e seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Os resultados aqui observados foram comparados com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

##### 4.4.1. Seletividade /especificidade:

É a capacidade do método em determinar com exatidão o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na amostra. [81] Ou seja, a amostra fornece sinais para vários analitos, mas é possível identificar o analito de interesse.

Durante as análises, não foram observadas variações significativas entre os valores de potencial redox observados para cada um dos metais, não havendo assim interação entre os analitos, visto que o potencial redox para os metais estudados são bem definidos: aproximadamente -0,18 V para o Cu; -0,45 V para o Pb; -0,62 V para o Cd e -0,98 V para o Zn (vs Ag|AgCl). A adição de padrões dos metais de interesse durante as análises, com respectivo aumento da resposta eletroquímica, mostrou ser este um método específico e seletivo, conforme mostra a Figura 21. Os testes foram realizados tanto com o eletrodo de BDD quanto com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

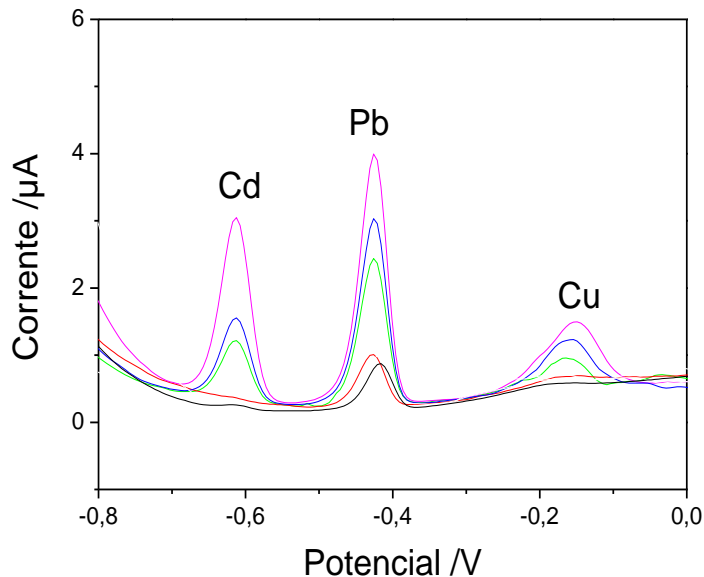


Figura 21. Voltamograma exibindo sinais analíticos para Cu, Pb e Cd com adição de padrão para uma das amostras, exibindo a seletividade do método.

#### 4.4.2 Linearidade /Faixa de trabalho:

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa de trabalho é a faixa de concentração na qual o analito em questão pode ser determinado com precisão aceitável. [81]

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas para os quatro metais com o eletrodo de BDD (Figura 22). As equações da curva foram:

$$\text{Cu: } i (\mu\text{A}) = (0,280 \pm 0,012) + (0,012 \pm 0,002) [\text{Cu}] \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Pb: } i (\mu\text{A}) = (0,013 \pm 0,018) + (0,009 \pm 0,002) [\text{Pb}] \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{Cd: } i (\mu\text{A}) = (0,279 \pm 0,021) + (0,090 \pm 0,006) [\text{Cd}] \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Zn: } i (\mu\text{A}) = (0,216 \pm 0,017) + (0,051 \pm 0,004) [\text{Zn}] \quad (\text{Equação 8})$$

Os valores de  $R^2$  obtidos foram 0,998 para o Cu, 0,991 para o Pb, 0,993 para o Cd e 0,999 para o Zn.

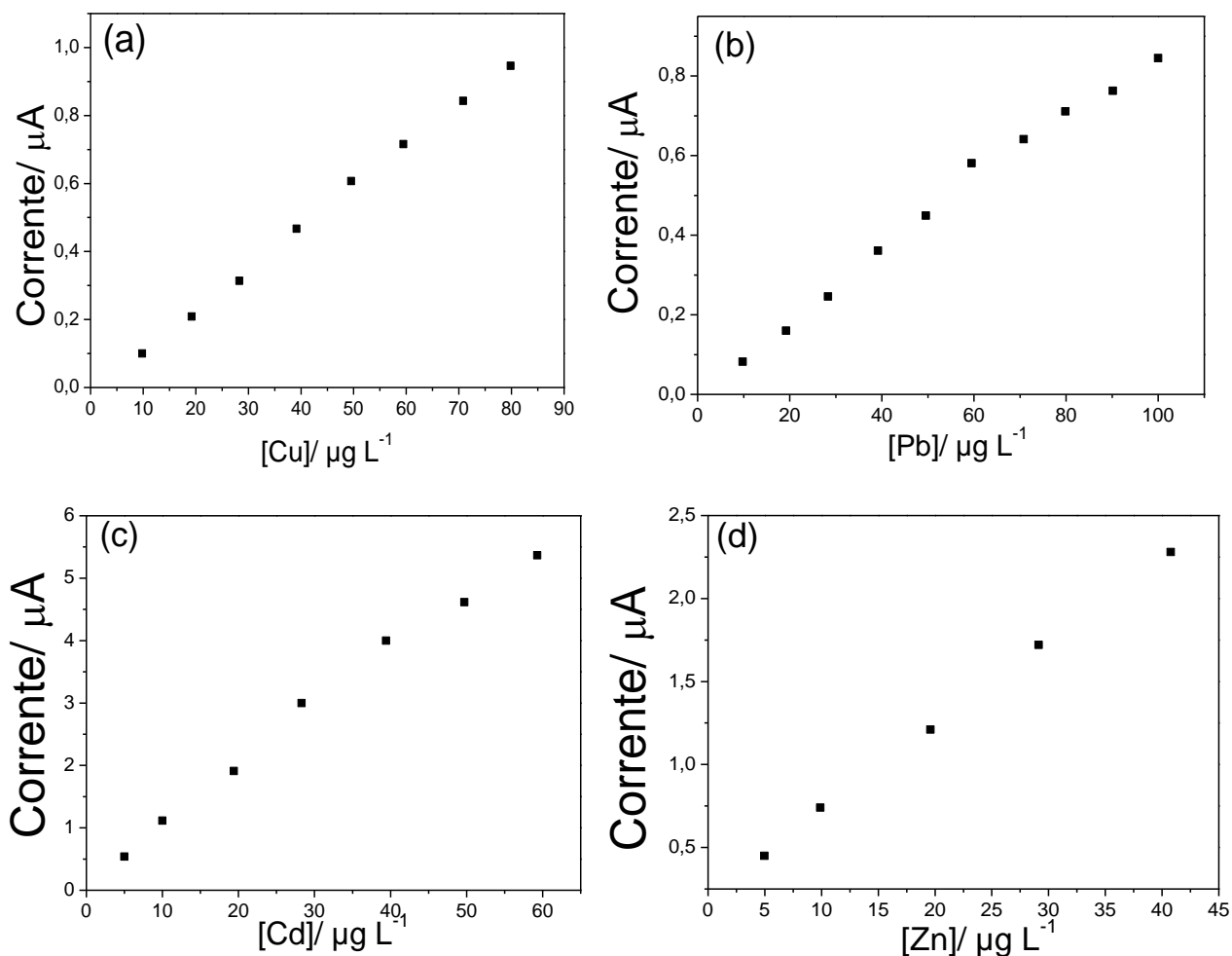


Figura 22. Curvas analíticas para (a) Cu na faixa de 8,30 a 80,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (b) Pb na faixa de 9,80 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (c) Cd na faixa de 4,97 a 59,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (d) Zn na faixa de 4,97 a 40,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  com eletrodo de BDD.

Na Figura 22, nota-se que o método se mostrou linear em uma ampla faixa de trabalho para os quatro metais estudados:

- Cu: de 8,30 a 80,0  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Pb: de 9,80 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Cd: de 19,4 a 59,3  $\mu\text{g L}^{-1}$
- Zn: de 4,97 a 40,8  $\mu\text{g L}^{-1}$

A linearidade também foi avaliada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio. As curvas analíticas encontram-se na Figura 23.

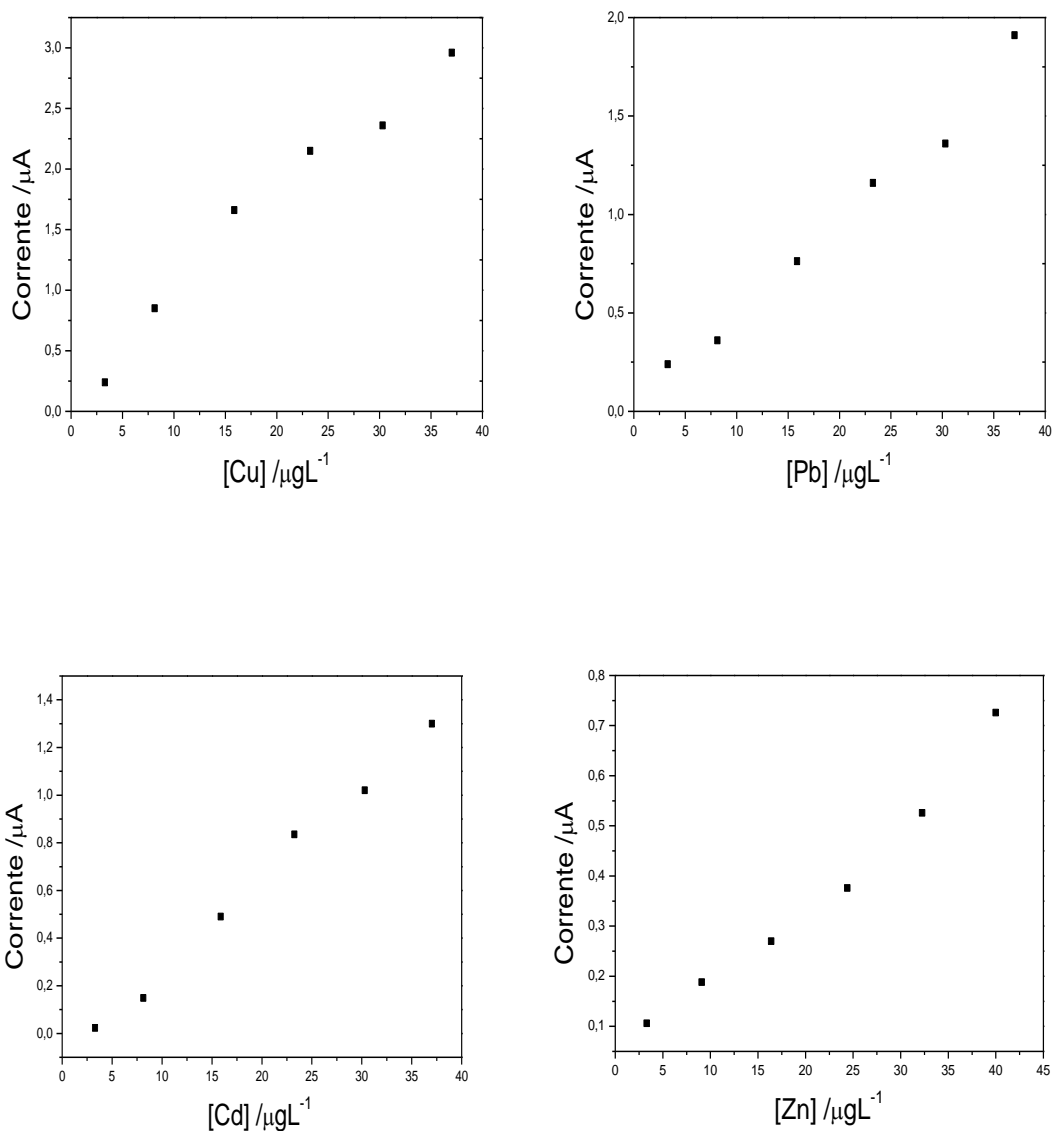


Figura 23. Curvas analíticas para (a) Cu (b), (c) Cd e (d) Zn na faixa de 3,00 a 40,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio.

Observando a Figura 23, nota-se que a análise dos metais com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio mostrou-se linear para os quatro metais na faixa de trabalho de 3,00 a 40,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As curvas obtidas para os 4 metais apresentaram as seguintes equações:

$$\text{Cu: } i (\mu\text{A}) = (0,248 \pm 0,063) + (0,364 \pm 0,001)[\text{Cu}] \quad (\text{Equação 9})$$

$$\text{Pb: } i (\mu\text{A}) = (0,446 \pm 0,033) + (0,104 \pm 0,009)[\text{Pb}] \quad (\text{Equação 10})$$

$$\text{Cd: } i (\mu\text{A}) = (0,279 \pm 0,021) + (0,090 \pm 0,006)[\text{Cd}] \quad (\text{Equação 11})$$

$$\text{Zn: } i (\mu\text{A}) = (0,652 \pm 0,427) + (0,082 \pm 0,010)[\text{Zn}] \quad (\text{Equação 12})$$



Os valores de  $R^2$  obtidos foram 0,996 para o Cu, 0,989 para o Pb, 0,995 para o Cd e 0,996 para o Zn.

#### 4.4.3. Limite de Detecção / Limite de Quantificação:

Limite de Detecção (L.D.) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, independentemente de ruído. As principais formas de determinação é através de avaliação do branco da amostra, avaliação visual (análise de várias amostras com diferentes concentrações de analito), relação sinal/ruído e avaliação do desvio padrão e inclinação da curva analítica.

Limite de Quantificação (L.Q.) é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis. As principais formas de determinação é através de avaliação visual, relação sinal/ruído, avaliação do desvio padrão e inclinação da curva analítica e a partir do L.D. [81]

Neste trabalho, os valores de L.D. e L.Q. foram obtido através da avaliação do desvio padrão e da inclinação da curva analítica, de acordo com as equações abaixo:

$$LD=3.s/b \quad \text{(Equação 13)}$$

$$LQ=10.s/b \quad \text{(Equação 14)}$$

Onde: LD é o limite de detecção;

LQ é o limite de quantificação;

b é a inclinação da curva analítica;

s é o desvio-padrão do intercepto da curva analítica.

As Tabelas 24 e 25 apresentam os valores obtidos de L.D. e L.Q., respectivamente, tanto para o eletrodo de BDD quanto para o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme mercúrio.

Tabela 24. Limites de Detecção (L.D.) para Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD e carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, em  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

	<b>BDD</b>	<b>CV</b>
<b>Cu</b>	0,37	0,71
<b>Pb</b>	0,40	0,71
<b>Cd</b>	1,28	0,77
<b>Zn</b>	0,16	0,76

Como se observa na Tabela 24, o eletrodo de BDD obteve menores limites de detecção para os metais estudados (com exceção do Cd) mostrando que este método é mais sensível que a análise com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio. O L.D. do Cd mostrou-se mais alto provavelmente devido a interação que ocorre entre este metal e o Pb na superfície do BDD [78], o que pode interferir na detecção de concentrações muito baixas de Cd. Apesar dessa interferência, o método ainda se apresentou muito sensível para o Cd, com L.D. de  $1,28 \mu\text{gL}^{-1}$ .

Tabela 25. Limites de Quantificação (L.Q.) para Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD e carbono vítreo modificado com filme de mercúrio, em  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

	<b>BDD</b>	<b>CV</b>
<b>Cu</b>	1,24	2,37
<b>Pb</b>	1,34	2,37
<b>Cd</b>	4,27	2,56
<b>Zn</b>	0,55	2,54

Os valores de L.Q. (Tabela 25) sugerem a mesma análise feita para os valores de L.D., mostrando que os metais podem ser quantificados em concentrações mais baixas com o eletrodo BDD do que o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio (com exceção do Cd). Interessante ressaltar que, no caso do Zn, o eletrodo de BDD mostrou-se capaz de quantificar na ordem de  $\text{ngL}^{-1}$ .

#### 4.4.4. Exatidão:

Exatidão é o grau de concordância entre o valor medido e o valor de referência (geralmente uma amostra certificada, quando disponível). É verificada através da avaliação dos erros aleatórios e sistemáticos. A exatidão pode ser definida como uma combinação entre recuperação e precisão (figura 24). [81]

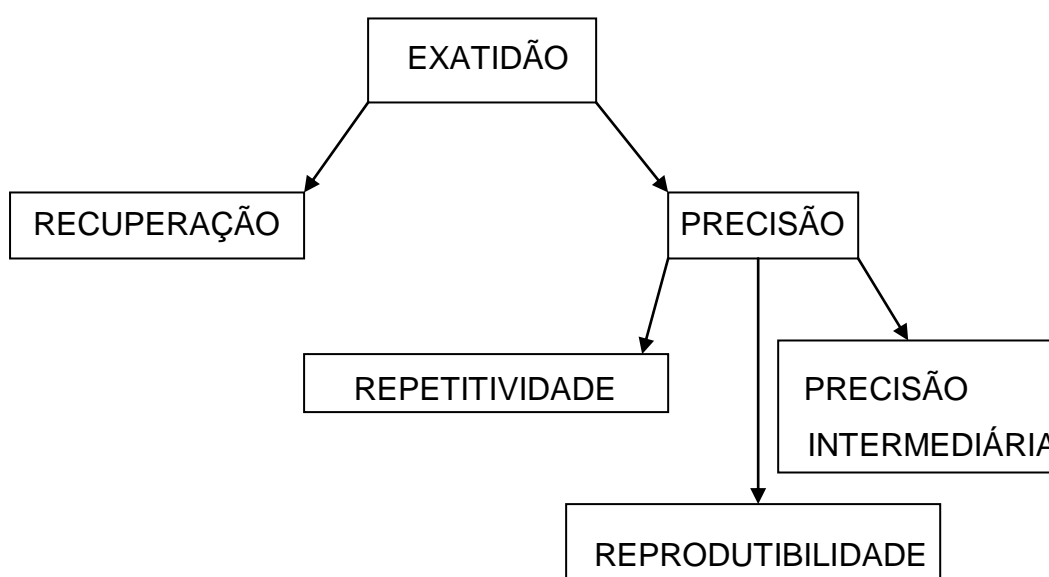


Figura 24. Representação da avaliação da exatidão de um método analítico.

#### (A) Recuperação:

Avaliou-se a exatidão através da adição e recuperação dos analitos. A recuperação (R) dos analitos pode ser calculada de acordo com a equação 6:

$$R (\%) = [(C_f - C_{nf}) / C_t] \times 100 \quad \text{(Equação 15)}$$

Onde: R = recuperação;

$C_f$  = concentração do analito na amostra fortificada;

$C_{nf}$  = concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_t$  = concentração do analito adicionado a amostra fortificada.

As amostras de mel foram fortificadas com os metais antes da etapa de digestão ser realizada. Foram adicionados a amostra 300 µL de cada um dos metais na concentração de 5 mgL<sup>-1</sup>, de modo que, durante as análises, realizadas todas as diluições necessárias, a concentração dos metais estudados fosse igual a 30 µgL<sup>-1</sup>. O procedimento de adição e recuperação dos analitos em todas as amostras foi realizado apenas para o eletrodo de BDD, já que a análise com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio constitui um método bem estabelecido.

As recuperações para os metais se mantiveram acima de 70 %, obtendo um valor médio de 108% para o Cu, 82% para o Pb, 109% para o Cd e 97% para o Zn. Os valores das recuperações dos metais de todas as amostras analisadas encontram-se na Tabela 26, bem como seus valores médios.

Tabela 26. Valores de recuperação (%) de Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD.

<b>Amostra</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>	<b>Zn</b>
<b>1</b>	128	79	120	111
<b>2</b>	115	83	97	77
<b>3</b>	118	77	125	103
<b>4</b>	109	77	120	82
<b>5</b>	114	72	118	110
<b>6</b>	97	79	95	94
<b>7</b>	72	94	95	89
<b>8</b>	124	75	105	99
<b>9</b>	101	90	96	103
<b>10</b>	107	98	117	102
<b>Média</b>	108	82	109	97

(B) Precisão:

A precisão expressa o grau de dispersão de uma série de medidas e deve ser considerada de acordo com a repetitividade, precisão intermediária e

reprodutibilidade. Pode ser expressa em termos de desvio padrão ( $s$ ), desvio padrão relativo ( $s_r$ ), intervalo de confiança e coeficiente de variação. [81]

A repetitividade é a estimativa da previsão quando a mesma amostra é analisada pelo mesmo procedimento, instrumento e analista em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária é quando a mesma amostra é analisada em diferentes intervalos de tempo e/ou por instrumentos e analistas diferentes. É fortemente recomendado o uso de planejamento de experimentos. A reprodutibilidade envolve condições de medidas que podem incluir diferentes laboratórios, analistas, sistemas de medição e instrumentos, estabelecendo a eficiência de um método e certificando materiais de referência. [81]

Alguns desses procedimentos foram efetuados, e foram observados baixos desvio padrões nas medidas (abaixo de 5%), mostrando bons resultados para a repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Com isso, pode-se dizer que a análise dos metais estudados com eletrodo de BDD tem boa precisão.

Levando em consideração os resultados observados para a recuperação e para a precisão do método, pode-se afirmar que a análise de Cu, Pb, Cd e Zn com eletrodo de BDD constitui um método com boa exatidão e precisão.

#### 4.4.5. Robustez:

É a medida da capacidade de um método permanecer inalterado com pequenas variações em seus parâmetros, mostrando a confiabilidade da análise. [81] A robustez foi avaliada durante a fase de otimização da metodologia analítica (através do planejamento de experimentos) e do processo de ativação da superfície do BDD, mostrando a confiabilidade da análise em relação as variações a que o método está exposto.

Com a avaliação das figuras de mérito estudadas (especificidade e seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez) podemos concluir que o método desenvolvido é adequado para a análise de Cu, Pb, Cd e Zn em amostras de mel.

#### 4.5. QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR VPD COM ELETRODO DE BDD:

Uma vez realizado todo o procedimento de ativação da superfície do eletrodo de BDD, otimização da metodologia analítica, processo de digestão das amostras de mel e verificação das principais figuras de mérito, foram feitas as análises para quantificação de Cu, Pb, Cd e Zn nas amostras de mel por voltametria de pulso diferencial com eletrodo de BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio. As medidas foram confirmadas através da técnica de absorção atômica com forno de grafite.

Como anteriormente mencionado, todas as análises foram realizadas com soluções de mel 50 % m/m (ver Tabela 10, pag. 30). A massa analisada dessas soluções encontram-se expostas na Tabela 27.

Tabela 27. Características e massas da soluções de mel analisadas.

Amostra	Origem	[solução] /	massa
		(%m/m)	analisada / g
1	floral	49,8	1,0259
2	floral	50,3	1,1045
3	floral	50,1	1,1021
4	floral	49,8	1,1283
5	floral	48,7	1,0218
6	floral	49,5	1,1058
7	floral	49,8	1,0288
8	melato	49,9	1,0750
9	melato	48,2	1,0964
10	melato	48,9	1,0444

Todos os ensaios foram realizados na célula eletroquímica contendo 2,00 mL de eletrólito suporte e 0,50 mL de amostra para a determinação de cobre, chumbo e cádmio e 0,25 mL de amostra para a determinação de Zn. Nas análises para determinação de Zn, foram adicionados 100 µL de Ga

1000  $\mu\text{gL}^{-1}$ , a fim de se evitar a formação do complexo Cu-Zn, prejudicial na análise desses metais, como anteriormente descrito.

Os teores dos metais estudados em mel são regulamentados pela Resolução Normativa nº 9 da ANVISA de 1978 [82], e a tolerância máxima desses metais em méis e açúcares encontra-se na Tabela 28.

Tabela 28. Tolerância máxima de Cu, Cd, Pb e Zn em mel de acordo com a Resolução Normativa nº 9 da ANVISA de 1978. [82]

<b>Tolerância máxima</b>	
<b>metais</b>	<b>(<math>\text{mgKg}^{-1}</math>)</b>
Cobre	15
Cádmio	0,2
Chumbo	0,5
Zinco	25

#### 4.5.1. Quantificação de Cu, Pb e Cd em mel por VPD com eletrodo de BDD:

Os metais Cu, Cd e Pb foram analisados simultaneamente nas amostras de mel. Os parâmetros eletroquímicos para análise desses metais foram mostrados na Tabela 15 (página 50). Utilizou-se o potencial de deposição de -0,95 V por 240 segundos em uma solução de HCl 100  $\text{mmolL}^{-1}$  como eletrólito suporte. A análise foi realizada através da construção de curvas de adição de padrão para os 3 metais, com a adição de alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de soluções 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$  de Cu, Pb e Cd. Foram realizadas 3 adições de padrão para cada amostra. O potencial de redução desses metais foi de aproximadamente -0,18 V para o Cu, -0,45 V para o Pb e -0,62 para o Cd (vs Ag|AgCl). A Figura 25 exibe o voltamograma da análise de uma das amostras, com as respectivas curvas de adição de padrão.

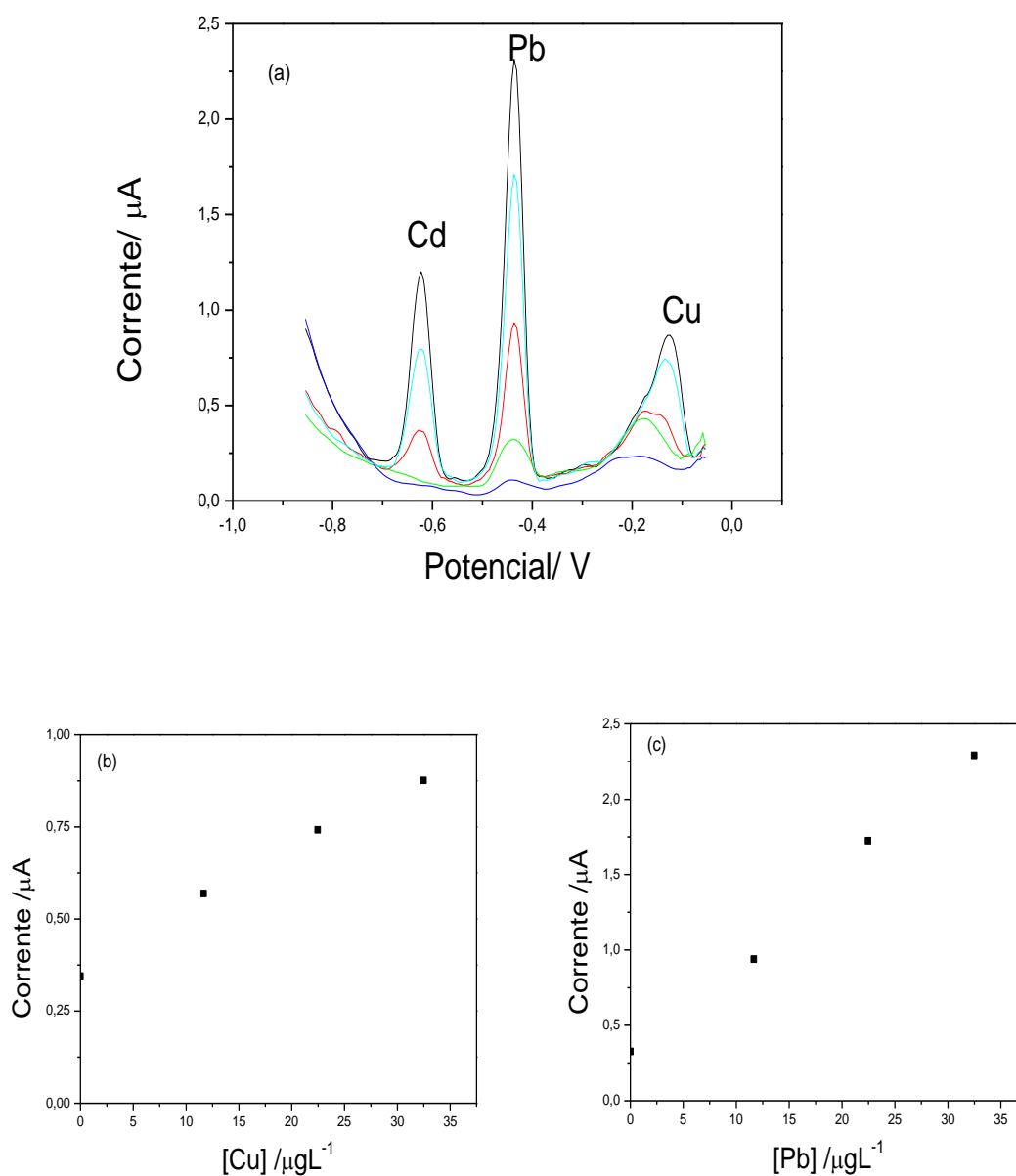


Figura 25. a) VPD de Cd, Pb e Cu em 2,00 mL de de HCl 0,1 molL<sup>-1</sup> com 500  $\mu\text{L}$  de amostra e adições de b) Cu e c) Pb na faixa de 11 a 33  $\mu\text{gL}^{-1}$ . O Cd não foi detectado.

O voltamograma da Figura 25 mostra picos com boa resolução e excelente sensibilidade. Os resultados obtidos com as análises dos metais com eletrodo de BDD encontram-se na Tabela 29. O Cd não foi detectado em nenhuma das amostras. As equações obtidas para as curvas de adição de padrão foram:



$$\text{Cu: } i(\mu\text{A}) = (0,360 \pm 0,019) + (0,016 \pm 0,009)[\text{Cu}] \quad (\text{Equação 16})$$

$$\text{Pb: } i(\mu\text{A}) = (0,293 \pm 0,055) + (0,061 \pm 0,003)[\text{Pb}] \quad (\text{Equação 17})$$

Tabela 29. Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb e Cd em amostras de mel com eletrodo de BDD.

<b>Amostra</b>	<b>[Cu] / mgL<sup>-1</sup></b>	<b>[Pb] / mgL<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	0,567 ± 0,011	0,220 ± 0,001
<b>2</b>	0,495 ± 0,003	0,129 ± 0,006
<b>3</b>	0,723 ± 0,009	0,144 ± 0,005
<b>4</b>	0,242 ± 0,005	0,156 ± 0,006
<b>5</b>	1,378 ± 0,015	0,114 ± 0,001
<b>6</b>	0,469 ± 0,002	0,302 ± 0,007
<b>7</b>	0,455 ± 0,006	0,246 ± 0,001
<b>8</b>	0,349 ± 0,004	0,081 ± 0,017
<b>9</b>	0,625 ± 0,026	0,918 ± 0,003
<b>10</b>	0,942 ± 0,026	0,448 ± 0,005

O Cd não foi detectado.

De acordo com a Tabela 29, nota-se que o Cd não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Os teores de Cu variaram entre 0,242 e 1,378 mgL<sup>-1</sup>. Esses valores não ultrapassam os permitidos pela Anvisa (ver tabela 28). Os teores de chumbo variaram entre 0,129 e 0,918 mgL<sup>-1</sup>, estando a amostra 9 com valor acima do permitido. Essa amostra é referente a um mel de melato, onde geralmente se encontram maiores quantidades de constituintes inorgânicos. Esses valores foram posteriormente confirmados por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e com GFAAS.

#### 4.5.2. Quantificação de Zn em mel por VPD com eletrodo de BDD:

Os parâmetros eletroquímicos para análise de Zn encontram-se na tabela 21 (página 60). O potencial de deposição utilizado foi de  $-1,5\text{ V}$  vs Ag|AgCl durante 240 segundos. As análises foram realizadas em tampão acetato  $500\text{ mmolL}^{-1}$ . As análises foram realizadas através da construção de curvas de adição de padrão, com a adição de alíquotas de  $30\text{ }\mu\text{L}$  de solução de Zn  $1000\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ . Foram realizadas 3 adições de padrão para construção da curva. O potencial de redução do Zn foi de aproximadamente  $-0,98\text{ V}$  vs Ag|AgCl. A Figura 26 exibe o voltamograma da análise de uma das amostras, com a respectiva curva de adição de padrão.

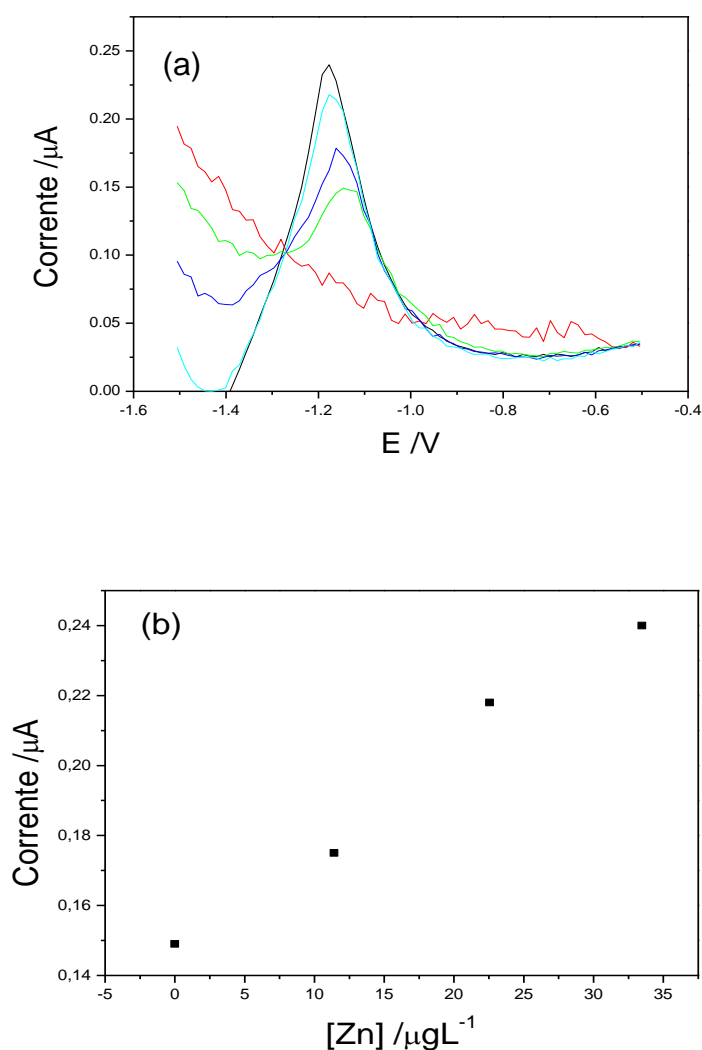


Figura 26. (a) VPD de Zn em  $2,00\text{ mL}$  de tampão acetato  $0,5\text{ molL}^{-1}$  com  $250\text{ }\mu\text{L}$  de amostra e (b) adições de Zn na faixa de  $11\text{ a }33\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ .

Os dados obtidos com a análise encontram-se expostos na tabela 30, com seus respectivos valores de desvio padrão. A equação obtida para a curva de adição de padrão foi:

$$i(\mu A) = (0,148 \pm 0,004) + (0,020 \pm 0,001)[Zn] \quad (\text{Equação 18})$$

Tabela 30. Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Zn em amostras de mel com eletrodo de BDD.

<b>Amostra</b>	<b>[Zn] / mgL<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	2,492 ± 0,001
<b>2</b>	1,880 ± 0,001
<b>3</b>	1,684 ± 0,004
<b>4</b>	2,370 ± 0,001
<b>5</b>	1,272 ± 0,001
<b>6</b>	2,399 ± 0,001
<b>7</b>	0,819 ± 0,006
<b>8</b>	1,061 ± 0,008
<b>9</b>	1,457 ± 0,002
<b>10</b>	1,203 ± 0,002

Observando a Tabela 30, nota-se que o teor de Zn nas amostras de mel variou entre 0,819 e 2,492 mgL<sup>-1</sup>. Esses valores encontram-se dentro do limite estipulado pela ANVISA, e mostram que o mel pode ser utilizado como uma boa fonte nutritiva de Zn, essencial ao organismo. As medidas foram confirmadas por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e por GFAAS.

#### 4.6. QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR VPD COM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM FILME DE MERCÚRIO:

As análises realizadas para com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio serviram para comparação com os dados obtidos para a análise com eletrodo de BDD. As condições eletroquímicas foram as mesmas, com exceção do tempo de deposição. Conforme planejamento de experimentos realizado, o tempo de deposição dessas análises foi de 300 segundos. Os valores encontrados foram comparados através da realização do teste estatístico ANOVA.

##### 4.6.1. Quantificação de Cu, Pb e Cd em amostras de mel por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio:

As análises para determinação desses metais foram realizadas utilizando um potencial de deposição de  $-0,95\text{ V vs Ag|AgCl}$  durante 300 segundos, em meio de ácido clorídrico  $0,1\text{ molL}^{-1}$ , e os metais foram quantificados através adição de padrão, com a adição de alíquotas de  $30\text{ }\mu\text{L}$  de soluções  $1000\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$  de Cu, Pb e Cd. Foram realizadas 3 adições de padrão para construção das curvas (tal qual análise com eletrodo de BDD). A Figura 27 exibe o voltamograma de uma das amostras analisadas com as respectivas curvas de adição de padrão. As concentrações obtidas encontram-se expostas na Tabela 31. As equações obtidas para as curvas de adição de padrão foram:

$$\text{Cu: } i(\mu\text{A}) = (0,079 \pm 0,004) + (0,008 \pm 0,002)[\text{Cu}] \quad (\text{Equação 19})$$

$$\text{Pb: } i(\mu\text{A}) = (0,268 \pm 0,041) + (0,094 \pm 0,002)[\text{Pb}] \quad (\text{Equação 20})$$

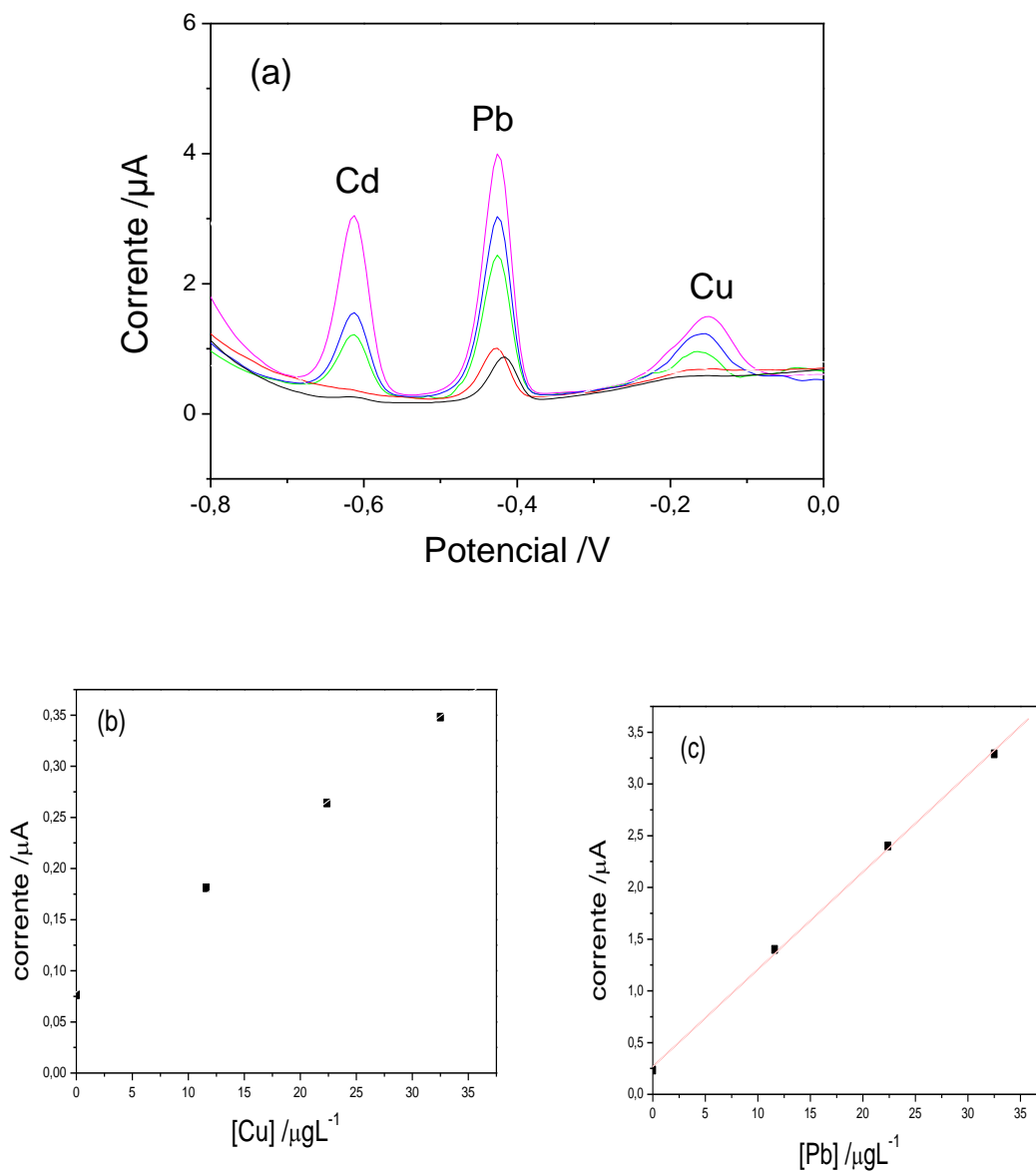


Figura 27. a) VPD de Cd, Pb e Cu em 2,00 mL de de HCl 0,1 molL<sup>-1</sup> com 500  $\mu\text{L}$  de amostra e adições de b) Cu e c) Pb na faixa de 11 a 33  $\mu\text{gL}^{-1}$ . O Cd não foi detectado.

Tabela 31. Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb e Cd em amostras de mel com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

<b>Amostra</b>	<b>[Cu] / mgL<sup>-1</sup></b>	<b>[Pb] / mgL<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	0,550 ± 0,003	0,189 ± 0,005
<b>2</b>	0,485 ± 0,001	0,133 ± 0,008
<b>3</b>	0,714 ± 0,006	0,148 ± 0,002
<b>4</b>	0,222 ± 0,002	0,159 ± 0,002
<b>5</b>	1,363 ± 0,022	0,123 ± 0,003
<b>6</b>	0,475 ± 0,002	0,308 ± 0,001
<b>7</b>	0,465 ± 0,001	0,225 ± 0,002
<b>8</b>	0,337 ± 0,004	0,079 ± 0,002
<b>9</b>	0,622 ± 0,009	0,879 ± 0,012
<b>10</b>	0,938 ± 0,019	0,463 ± 0,007

O Cd não foi detectado.

De acordo com a Tabela 31, a variação do teor de cobre nas amostras de mel variou entre 0,222 e 1,363 mgL<sup>-1</sup>, enquanto o teor de chumbo variou entre 0,079 e 0,879 mgL<sup>-1</sup>. O Cd não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Apesar dos valores de concentração estar visualmente coincidindo com os obtidos para o eletrodo de BDD, os resultados foram comparados através de análise de variância (ANOVA).

#### 4.6.2. Quantificação de Zn em amostras de mel por VPD com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio:

As análises para determinação de Zn foram realizadas utilizando um potencial de deposição de -1,50 V durante 300 segundos, em tampão acetato 0,5 molL<sup>-1</sup>, e o metal foi quantificado através de construção de curva de adição de padrão, com a adição de alíquotas de 30 µL de soluções 1000 µgL<sup>-1</sup> de Zn. Foram realizadas 3 adições de padrão para construção das curva. A Figura 28 mostra o voltamograma de uma das amostras analisadas com a respectiva curva de adição de padrão. As concentrações obtidas encontram-se na Tabela 32. A Equação da curva de adição de padrão foi:

$$i(\mu\text{A}) = (3,916 \pm 0,410) + (0,131 \pm 0,018)[\text{Zn}]$$

(Equação 21)

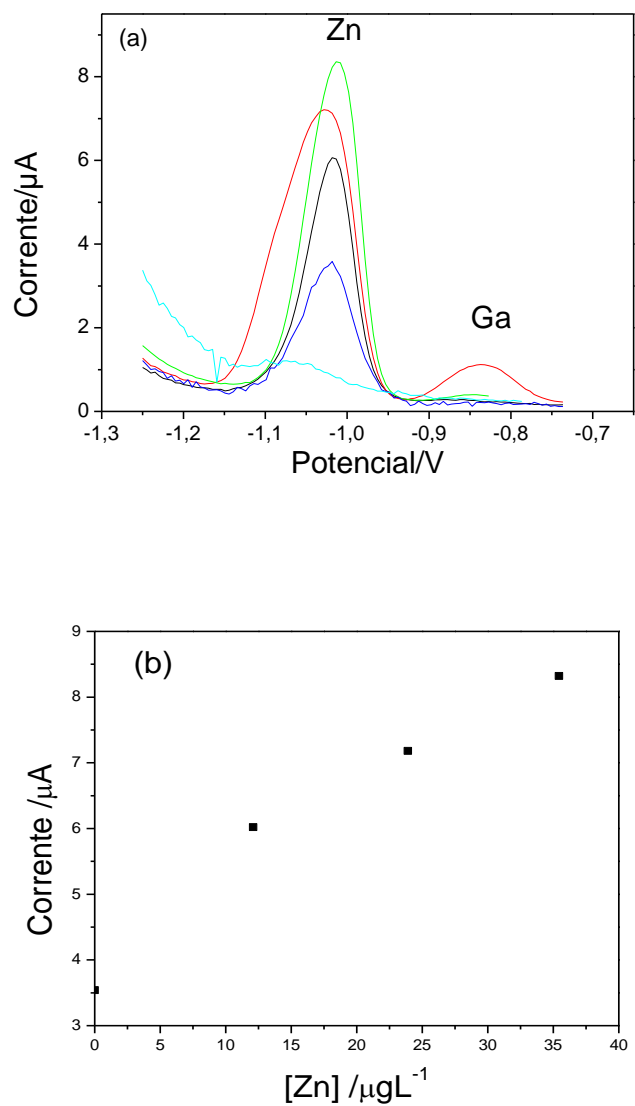


Figura 28. (a) VPD de Zn em 2,00 mL de tampão acetato  $0,5 \text{ molL}^{-1}$  com 250  $\mu\text{L}$  de amostra e (b) adições de Zn na faixa de 11 a 33  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

Tabela 32. Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações Zn em amostras de mel com eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio.

<b>Amostra</b>	<b>[Zn] / mgL<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	2,499 ± 0,003
<b>2</b>	1,881 ± 0,011
<b>3</b>	1,754 ± 0,002
<b>4</b>	2,341 ± 0,002
<b>5</b>	1,259 ± 0,002
<b>6</b>	2,383 ± 0,005
<b>7</b>	0,806 ± 0,018
<b>8</b>	1,091 ± 0,153
<b>9</b>	1,455 ± 0,818
<b>10</b>	1,223 ± 0,275

De acordo com a Tabela 32, a variação do teor de zinco nas amostras de mel variou entre 0,806 e 2,499 mgL<sup>-1</sup>. Apesar dos valores de concentração estar visualmente coincidindo com os obtidos para o eletrodo de BDD, os resultados foram comparados através de análise de variância (ANOVA).



#### 4.7. QUANTIFICAÇÃO DE CU, PB, CD E ZN EM AMOSTRAS DE MEL POR GFAAS:

As amostras de mel foram analisadas por absorção atômica com forno de grafite para comparação com os resultados obtidos pelas técnicas eletroquímicas, visto que esta é uma das técnicas recomendadas para análise de Cu, Pb, Cd e Zn. Os parâmetros de análise foram escolhidos de acordo com o manual do usuário e foram mostrados na tabela 11 (página 33). Os resultados foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). Para análise dos metais, foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco monoelementar. O volume final da gota foi de 20  $\mu\text{L}$  para as análises de Cu e Cd e de 30  $\mu\text{L}$  para as análises de Pb e Zn, devido a utilização de 10  $\mu\text{L}$  de modificador químico.

Para quantificação de Cu, Cd, Pb e Zn, foram construídas curvas analíticas através da diluição de padrões 1,00  $\mu\text{gL}^{-1}$  dos metais, seguindo instruções do manual do usuário. As curvas variaram de 3 a 19  $\mu\text{gL}^{-1}$  para o Cu, 2,5 a 20  $\mu\text{gL}^{-1}$  para o Pb, 0,5 a 4  $\mu\text{gL}^{-1}$  para o Cd e 0,5 a 2  $\mu\text{gL}^{-1}$  para o Zn. As curvas analíticas para os 4 metais estudados são mostradas na figura 29. As equações das curvas analíticas foram:

$$\text{Cu: } i(\mu\text{A}) = (3,08 \pm 2,74) + (1,80 \pm 0,23)[\text{Cu}] \quad (\text{Equação 22})$$

$$\text{Cd: } i(\mu\text{A}) = (4,22 \pm 0,68) + (1,83 \pm 0,32)[\text{Cd}] \quad (\text{Equação 23})$$

$$\text{Pb: } i(\mu\text{A}) = (4,62 \pm 2,51) + (5,83 \pm 2,71)[\text{Pb}] \quad (\text{Equação 24})$$

$$\text{Zn: } i(\mu\text{A}) = (5,83 \pm 3,17) + (3,95 \pm 2,27)[\text{Zn}] \quad (\text{Equação 25})$$

Os valores de  $R^2$  obtidos foram 0,999 para o Cu, 0,992 para o Pb, 0,993 para o Cd e 0,992 para o Zn.

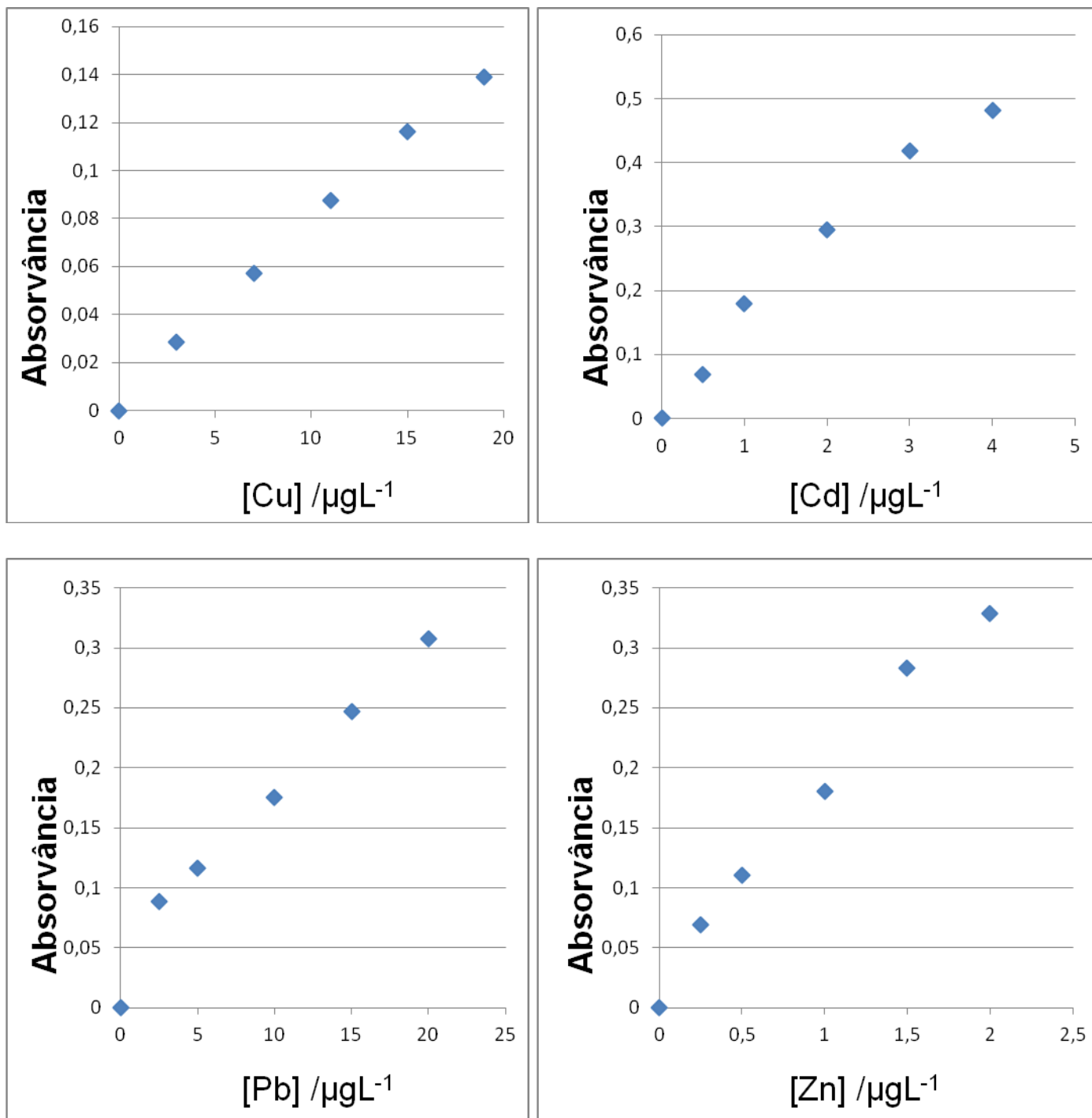


Figura 29. Curvas analíticas para determinação de Cu, Cd, Pb e Zn por GFAAS.

Com a construção das curvas analíticas para cada um dos metais, foi possível quantificar Cu, Cd, Pb e Zn nas amostras de mel, e fazer a comparação com os resultados eletroquímicos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33. Valores encontrados como os respectivos desvios-padrão para as concentrações de Cu, Pb, Cd e Zn com GFAAS.

<b>Amostra</b>	<b>Cu /mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Pb /mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Zn /mgL<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	0,547 ± 0,010	0,204 ± 0,001	2,518 ± 0,001
<b>2</b>	0,475 ± 0,001	0,122 ± 0,005	1,817 ± 0,003
<b>3</b>	0,732 ± 0,001	0,150 ± 0,002	1,705 ± 0,006
<b>4</b>	0,212 ± 0,001	0,162 ± 0,013	2,333 ± 0,003
<b>5</b>	1,365 ± 0,001	0,131 ± 0,004	1,247 ± 0,001
<b>6</b>	0,472 ± 0,002	0,302 ± 0,015	2,392 ± 0,002
<b>7</b>	0,447 ± 0,001	0,235 ± 0,002	0,812 ± 0,004
<b>8</b>	0,347 ± 0,002	0,089 ± 0,023	1,071 ± 0,010
<b>9</b>	0,638 ± 0,001	0,896 ± 0,020	1,455 ± 0,002
<b>10</b>	0,925 ± 0,001	0,457 ± 0,015	1,203 ± 0,006

O Cd não foi detectado.

Observando a tabela acima, notamos que o Cd não foi detectado. O teor de Cu variou entre 0,212 e 1,365 mgL<sup>-1</sup>, para o Pb a variação foi entre 0,089 e 0,896 mgL<sup>-1</sup>, e para o Zn foi entre 0,812 e 2,518 mgL<sup>-1</sup>. Apesar dos valores coincidirem visualmente com os valores obtidos pelas técnicas eletroquímicas, a comparação dos resultados foi feita através da análise de variância (ANOVA), comparando os resultados para cada um dos metais. Não foi feita a análise de variância para o Cd, pois este metal não foi detectado nas amostras por nenhuma das técnicas de análise utilizadas neste trabalho.

#### 4.8. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR VPD E GFAAS:

A fim de validar as medidas obtidas com o eletrodo de BDD, foram realizadas análises com o eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de mercúrio e por de absorção atômica com forno de grafite. Os resultados foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), através dos valores de concentração observados para cada um dos metais estudados.

##### 4.8.1. Cobre:

Na Tabela 34 são observados os valores encontrados para a concentração de Cu nas amostras de mel, pelos 3 métodos de análise. O teste estatístico ANOVA foi realizado com a ajuda do programa Microsoft EXCEL, e na Tabela 35 encontra-se o quadro referente ao teste.

Tabela 34. Valores de concentração de Cu nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e GFAAS, em  $\text{mgL}^{-1}$ .

Amostra	VPD		
	EBDD	CV	GFAAS
1	0,567	0,550	0,547
2	0,495	0,485	0,475
3	0,723	0,714	0,732
4	0,242	0,222	0,212
5	1,378	1,363	1,365
6	0,469	0,475	0,472
7	0,455	0,465	0,447
8	0,349	0,337	0,347
9	0,625	0,622	0,638
10	0,942	0,938	0,925

Tabela 35. Quadro ANOVA para as concentrações de Cu encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	10	6,171	0,6171	0,107622
Coluna 2	10	6,245	0,6245	0,108163
Coluna 3	10	6,16	0,616	0,108882

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000427	2	0,000214	0,001975	0,998027	3,354131
Dentro dos grupos	2,921999	27	0,108222			
Total	2,922427	29				

Observando a Tabela 35, nota-se que o valor de F calculado é 0,001975; enquanto o valor de F crítico é de 3,354131. Como o valor de F calculado é menor que o valor de F crítico, pode-se afirmar que os resultados não diferem estatisticamente. Outra maneira de analisar o quadro ANOVA é através do p-valor. Um p-valor acima de 0,5 mostra que as médias são estatisticamente iguais. Nesse caso, o p-valor obtido foi de 0,998027. Desse modo, podemos afirmar que os resultados obtidos para o cobre por VPD com eletrodo de BDD é equivalente aos resultados obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e com GFAAS.

#### 4.8.2. Chumbo:

As concentrações de Pb obtidas através dos 3 métodos utilizados encontram-se na Tabela 36. A Tabela 37 exhibe o quadro ANOVA para essas medidas.

Tabela 36. Valores de concentração de Pb nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e GFAAS, em  $\text{mgL}^{-1}$ .

<b>VPD</b>			
<b>Amostra</b>	<b>EBDD</b>	<b>CV</b>	<b>GFAAS</b>
1	0,220	0,189	0,204
2	0,129	0,133	0,122
3	0,144	0,148	0,150
4	0,156	0,159	0,162
5	0,114	0,123	0,131
6	0,302	0,308	0,302
7	0,246	0,225	0,235
8	0,081	0,079	0,089
9	0,918	0,879	0,896
10	0,448	0,463	0,457

Tabela 37. Quadro ANOVA para as concentrações de Pb encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	10	2,706	0,2706	0,058024
Coluna 2	10	2,758	0,2758	0,062685
Coluna 3	10	2,748	0,2748	0,059252

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000152	2	$7,61 \times 10^{-5}$	0,001269	0,998732	3,354131
Dentro dos grupos	1,619652	27	0,059987			
Total	1,619804	29				

Observando a Tabela 37, nota-se que o valor de F calculado é 0,001269; enquanto o valor de F crítico é de 3,354131. Seguindo o mesmo raciocínio adotado para o Cu, como o valor de F calculado é menor que o valor de F crítico, pode-se afirmar que os resultados não diferem estatisticamente. Fazendo a análise através do p-valor, chega-se a mesma conclusão, pois o p-valor obtido foi 0,998732, maior que 0,5. Desse modo, podemos afirmar que os resultados obtidos para o chumbo por VPD com eletrodo de BDD é equivalente aos resultados obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e com GFAAS.

#### 4.8.3. Zinco:

As concentrações de Pb obtidas através dos 3 métodos utilizados encontram-se na Tabela 38. A Tabela 39 exibe o quadro ANOVA para essas medidas.

Tabela 38. Valores de concentração de Zn nas amostras de mel por VPD com BDD e eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e GFAAS, em  $\text{mgL}^{-1}$ .

VPD			
Amostra	EBDD	CV	GFAAS
1	2,492	2,499	2,518
2	1,880	1,881	1,817
3	1,684	1,754	1,705
4	2,37	2,341	2,333
5	1,272	1,259	1,247
6	2,399	2,383	2,392
7	0,819	0,806	0,812
8	1,061	1,098	1,071
9	1,457	1,455	1,455
10	1,203	1,223	1,203



Tabela 39. Quadro ANOVA para as concentrações de Zn encontradas nas amostras de mel por VPD e GFAAS.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	10	16,699	1,6699	0,354007
Coluna 2	10	16,637	1,6637	0,361996
Coluna 3	10	16,553	1,6553	0,359871

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001074	2	0,000537	0,001497	0,998504	3,354131
Dentro dos grupos	9,682869	27	0,358625			
Total	9,683943	29				

Observando a Tabela 39, nota-se que o valor de F calculado é 0,001497; enquanto o valor de F crítico é de 3,354131. Seguindo o mesmo raciocínio adotado para o Cu e para o Pb, como o valor de F calculado é menor que o valor de F crítico, pode-se afirmar que os resultados não diferem estatisticamente. Fazendo a análise através do p-valor, chega-se a mesma conclusão, pois o p-valor obtido foi 0,998504, maior que 0,5. Desse modo, podemos afirmar que os resultados obtidos para o zinco por VPD com eletrodo de BDD é equivalente aos resultados obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e com GFAAS.

Desse modo, após a realização do teste ANOVA, verificou-se que os valores de concentração obtidos para os metais estudados se equivalem estatisticamente para os 3 métodos de análise utilizados neste trabalho.

## 5. CONCLUSÕES:

Buscou-se por meio deste trabalho desenvolver uma metodologia eficaz para a determinação de Cu, Pb, Cd e Zn em amostras de mel por voltametria de pulso diferencial utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro, estudando as diversas propriedades do eletrodo de BDD, bem como utilizando ferramentas estatísticas para desenvolver um planejamento de experimentos que ajudasse no desenvolvimento da metodologia proposta.

Quanto as propriedades do BDD, pode-se dizer que o eletrodo pré-tratado catodicamente foi mais eficaz na análise dos metais de interesse do que o eletrodo pré-tratado anodicamente ou sem nenhum tratamento prévio, fornecendo melhores respostas tanto para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  quanto para estabilidade do sinal analítico para os metais estudados. O pH do meio influencia na eficácia do pré tratamento. O eletrodo pré-tratado em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ molL}^{-1}$  apresentou uma boa resposta eletroquímica em um intervalo de tempo maior, o que aumentou a frequência analítica, comparado com a o tratamento realizado em tampão acetato  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ . Isso porque quando o ácido sulfúrico foi utilizado no tratamento a produção de  $\text{H}_2$  foi favorecida, devido a elevada concentração de  $\text{H}^+$ . Com o tampão acetato como eletrólito, a concentração de  $\text{H}^+$  foi menor, conseqüentemente a produção de  $\text{H}_2$  também foi menor.

As condições de análise foram otimizadas através de planejamento de experimentos, sendo realizado um planejamento fatorial Box-Behnken para análise de Cu, Pb e Cd e um planejamento fatorial completo  $3^2$  para a análise de Zn com eletrodo de BDD. Com o auxílio de ferramentas estatísticas, foi possível obter modelos de previsão para a análise dos 4 metais em estudo. Os modelos de previsão foram avaliados através do teste ANOVA, e os dados obtidos no gráfico PCA foram confrontados com superfícies de respostas para os metais de interesse, chegando a uma condição ótima de análise. Para comparação com os parâmetros obtidos para análise dos metais com eletrodo de BDD, foi realizado um planejamento fatorial para análise dos metais com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio. Os dados mostraram que para o eletrodo de BDD a análise pode ser realizada em um tempo menor, aumentando a frequência analítica.

Quanto à digestão da amostra três procedimentos foram testados: análise direta dos metais na solução de mel, solubilização da amostra em banho de ultrassom, e mineralização da amostra em chapa de aquecimento. A mineralização da amostra em chapa de aquecimento mostrou ser o procedimento mais adequado na análise dos metais, devido ao bom desempenho analítico, fornecendo ótimas respostas eletroquímicas e baixo desvio padrão. A solubilização em banho de ultrassom e a análise direta não forneceram resultados satisfatórios. Por se tratar de uma matriz heterogênea e bastante viscosa, optou-se por trabalhar com soluções de mel 50 % m/m.

O estudo de algumas figuras de mérito proporcionam uma maior confiabilidade da metodologia, principalmente se comparado a outros métodos eletroquímicos bem estabelecidos. O método mostrou-se seletivo para os quatro metais estudados, não observando variações significativas entre os valores obtidos para cada um dos analitos. O método mostrou-se linear em uma ampla faixa de trabalho para os quatro metais estudados. Foram observados baixos limites de detecção e de quantificação para a análise dos metais com eletrodo de BDD, principalmente quando os valores foram comparados à análise com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio. Os resultados obtidos foram bastante precisos, fornecendo baixos valores de desvio padrão, exibindo boa repetitividade e reprodutibilidade. Testes de adição e recuperação de analitos foram realizados, fornecendo uma recuperação média de 108 % para o Cu, 82 % para o Pb, 109 % para o Cd e 97 % para o Zn. Levando em consideração os resultados observados para a recuperação e para a precisão do método, pode-se afirmar que constitui um método com boa exatidão. Por fim, o método mostrou-se robusto e adequado para a análise de Cu, Pb, Cd e Zn em amostras de mel.

Os valores de concentração dos analitos de interesse nas amostras de mel variaram entre 0,242 e 1,378 mgL<sup>-1</sup> para o Cu; 0,129 e 0,918 mgL<sup>-1</sup> para o Pb e 0,819 e 2,492 mgL<sup>-1</sup> para o Zn. O Cd não foi detectado em nenhuma das amostras. Os valores foram comparados aos limites estipulados pela ANVISA, e em apenas uma das amostras o teor de Pb encontra-se acima do limite permitido.

Os resultados obtidos para a análise de Cu, Pb, Cd e Zn em amostras de mel com eletrodo de BDD foram comparados com outros dois métodos:

análise dos metais com eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e espectrometria absorção atômica com forno de grafite. Para comparação dos métodos, foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA). Foi observado que não há diferenças significativas nos resultados obtidos entre os três métodos, ou seja, os resultados das análises se equivalem estatisticamente. Assim, pode-se dizer que a metodologia foi desenvolvida de modo satisfatório.

Os resultados obtidos fornecem informações sobre a constituição mineral do mel, podendo ser úteis para a formação de uma base de dados e um posterior estudo das condições ambientais das áreas produtoras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] Campos, G. R. C.; Della-Modesta, T. J.; Silva, K. E.; Baptista, M. F.; Gomides, R. L.; Godoy, R. L., *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23 (2003) 1.
- [2] Reis, V. D. A.; *Mel Orgânico: Oportunidades e Desafios para a Apicultura no Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, 2003.
- [3] Munoz, E.; Palmero, S.; *Food Chem.* 94 (2006) 478.
- [4] Lachman, J.; Kolihová, D.; Miholová, D.; Kosata, J.; Titera, D.; *Kult K; Food Chem.*, 101 (2007) 973.
- [5] Risato, S. R.; Galhiane, M.S; Knoll, F.R.N.; Andrade, R.M.B; Almeida, M.V, *Quim. Nova* 29 (2006) 950.
- [6] Paes, L.C., *Determinação de Cobre, Manganês e Cádmio em Mel por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite*, Dissertação de Mestrado (2007) disponível em <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha76262.htm>
- [7] Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P.; *Food Chemistry*, 2004 pp. 88–891.
- [8] Abu-Tarboush, H. M.; Al-Kahtani, H. A.; El-Sarrage, M. S.; *Food Chem.* 46 (1993) 13.
- [9] Hernandez, O. M.; Fraga, J. M. G.; Jimenez, A. I.; Jimenez, F.; Arias, J.J.; *Food Chem.* 93 (2005) 449.
- [10] Stankovska, E.; Stafilov, T.; Sajin, R.; *Environ. Monit. Assess.* 142 (2008) 117.
- [11] Torres, R.F.; Bernal, J.L.P.; Lopez, M. A. B.; Mochon, M.C.; Sanchez, J. C. J.; Perez, A. G.; *Talanta* 65 (2005) 686.
- [12] Pohl, P.; *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 117.
- [13] Anklan, E.; *Food Chem.*, 63 (1998) 549.
- [14] Ioannidou, M. D.; Zachariadis, G. A.; Anthemidis, A.N.; Stratis, J.A.; *Talanta*, 65 (2005) 92.
- [15] Przybytowski, P.; Wilczynska, A.; *Food Chem.* 74 (2001) 289.
- [16] Caroli, S.; Forte, G.; Iamiceli, A.L.; Galoppi, B.; *Talanta* 50 (1999) 327.
- [17] Rashed, M. N.; Soltan, M. E.; *J. Food Compos. Anal.* 17 (2004) 725.
- [18] Miller-Ihli, N. J.; *J. Food Comp. Anal.*, 9 (1996) 301.
- [19] Massabni, A. C.; disponível em: [http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica\\_viva\\_\\_os\\_metais\\_e\\_a\\_saude\\_humana](http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica_viva__os_metais_e_a_saude_humana)
- [20] Elia, M.; disponível em: [http://www.olharvital.ufrj.br/2006/index.php?id\\_edicao=061&codigo=3](http://www.olharvital.ufrj.br/2006/index.php?id_edicao=061&codigo=3)
- [21] Smith, S. E.; Larson, E. J.; Zinc toxicity in rats- Antagonist effects of Cooper and liver; disponível em: <http://www.jbc.org/content/163/1/29.full.pdf>
- [22] Oliveira Filho, W. P.; *Utilização da Voltametria de Redissolução Anódica para o Estudo da Interação de 3 Fragmentos Peptídicos Sintéticos da Proteína Prion com os Íons Cobre (II)*, Dissertação de Mestrado (2006) disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=186706&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22OLIVEIRA%20FILHO,%20W.%20P.%20de%22&qFacets=autoria:%22OLIVEIRA%20FILHO,%20W.%20P.%20de%22&sort=&pagina=1>
- [23] Chuttani, H. K.; Gupta, P. S.; Gulati, S.; *Am. J. Med.* 39 (1965) 849.
- [24] Bull, P. C.; Thomas, G. R.; Rommens, J. M.; Forbes, J.R.; Cox, D. W.; *Nat. Genet.* 5 (1993) 327
- [25] Albert, L. A.; *Curso básico à toxicologia ambiental*, México, Ed. Limusa S.A., 1988.

- [26] Bellinger, D. C.; Needleman, H. L.; Leviton, A.; Watemaux, C.; Rabinowitz, M. C.; Nichols, M. L.; *Neurobehav. Toxicol. Teratol* 6 (1984) 387.
- [27] Caroli, S.; Forte, G.; Iamiceli, A.L.; Galoppi, B.; *Talanta* 50 (1999) 327.
- [28] Caroli, S.; Forte, G.; Alessandrelli, M.; Cresti, R.; Spagnoli, M.; Llio, S.D.; Pauwels, J.; Kramer, G.N.; *Microchem.J.*67(2000)227.
- [29] Bogdanov, S.; Haldimann, M.; Luginbuhl, W.; Gallman, P.; *J. Apic. Res. Bee World* 46 (2007) 269.
- [30] Buldini, P. L.; Cavalli, S.; Mevoli, A.; Sharma, J. L.; *Food Chem.*, **73**, 2001, 487-495.
- [31] Kump, P.; Necemer, M.; Snajder, J.; *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 499.
- [32] Sanna, G.; Pilo, M. I.; Pin, P. C.; Tapparo, A.; Seeber, R.; *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 165.
- [33] Martiniano, L. C.; *Validação de um método para determinação de metais em microemulsões de combustíveis por voltametria de redissolução* Tese de Doutorado (2009) disponível em: [http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/Tese\\_Lorena\\_Martiniano.pdf](http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/Tese_Lorena_Martiniano.pdf)
- [34] Fungaro, D. A.; *Eclética Química* 29 (2004) 63
- [35] Bernadelli, J. K. B.; *Preparo e Caracterização de Eletrodos Compósitos a Base de Carbono, Bismuto e Poliuretano para Determinação de Metais* (2009) disponível em [http://www.btdtd.ndc.uff.br/tde\\_arquivos/8/TDE-2011-05-02T121712Z2895/Publico/Julie%20Barnes.pdf](http://www.btdtd.ndc.uff.br/tde_arquivos/8/TDE-2011-05-02T121712Z2895/Publico/Julie%20Barnes.pdf)
- [36] SKOOG et al., D. A.; *Principles of Instrumental Analysis*. 5. ed. Filadélfia: Saunders College Publishing, 1998.
- [37] Barker, G. C.; Gardner, A. W.; AEREC/R 2297, HMSO, London; Osteryoung RA, Osteryoung J, *Phil Trans R Lond A* 302 :315.
- [38] WANG, J.; *Analytical Electrochemistry* 3<sup>rd</sup> ed Wiley-VCH, 2006
- [39] SCHOLZ, F.; *Electroanalytical Methods*, Ed Scholz, 2002.
- [40] Bilewicz, R.; Wikiel, K.; Osteryoung, J.; *Anal Chem* 1(1989) 965
- [41] Mamani, M. C. V.; *Determinação qualitativa e quantitativa de metais em plantas medicinais por fluorescência de raios x e voltametria de redissolução anódica* Dissertação de Mestrado (2003) disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000294015>
- [42] Barker, G. C.; Jenkins, I. L.; *Analyst* 77 (1952) 685.
- [43] Wang, J.; Tian, B.; Lu, J.; Olsen, C.; Yarnitzky, C.; Olsen, K.; Hammerrstrom, D.; Bennet, W.; *Anal. Chim. Acta* 429 (1999) 385.
- [47] Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods- Fundamentals and Applications* 2<sup>nd</sup> ed John Wiley and Sons 2001
- [45] Sonthalia, P.; McGaw, E.; Show, Y.; Swain, G.; *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 35.
- [46] Nobre, A. L. R.; Mazo, L. H.; *Quim. Nova* 20 (1997) 4.
- [47] Wang, J.; *Analytical Electrochemistry*, VCH Pushers inc 91 (1994).
- [48] Nolan, M. A.; Kounaves, S. P.; *Anal. Chem.* 71 (1999) 3567.
- [49] Hutton, E. A.; Ogorevc, B.; Hocevar, S. B.; Weldon, F.; Smyth, M. R.; Wang, J.; *Electrochem. Commun.* 3 (2001) 707.
- [50] Feeney, R.; Kounaves, S. P.; *Anal. Chem.* 72 (2000) 2222.
- [51] Bonfil, Y.; Kirowa-Eisner, E.; *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 285.
- [52] Brainina, K. Z.; Malakhova, N. A.; Ivanova, A. V.; NATO ASI Ser., Ser. 2: Environ. 38 (1997) 255.

- [53] Moreno-Baron, L.; Merçoçi, A.; Alegret, S.; *Electrochim. Acta* 48 (2003) 2599.
- [54] Van Staden, J. F.; Matoetoe, M. C.; *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 201.
- [55] Zhan, Y.; Lu, X.; Zhu, K.; Wang, Z.; Kang, J.; *Anal. Lett.* 35 (2002) 369.
- [56] Wang, J.; Tian, B.; *Anal. Chem* 64 (1992) 1706.
- [57] Granger, M. C.; Xu, J.; Strojek, J. W.; Swain, G. M.; *Anal. Chim. Acta* 397 (1999) 145.
- [58] Salazar Banda, G. R.; *Estudo da eletroquímica do diamante dopado com boro e da sua superfície modificada com catalisadores para a oxidação de metanol e etanol* Dissertação de Mestrado (2006) disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75131/tde-11042007-112625/pt-br.php>
- [59] Compton, R. G.; Foord, J. S.; Marken, F.; *Electroanalysis* 15 (2003) 1349.
- [60] Chen, Q.; Granger, M. C.; Lister, T. E.; Swain, G. M.; *J. Electrochem. Soc.* 144 (1997) 3806.
- [61] Declements, R.; Swain, G. M.; *J. Electrochem. Soc.* 144 (1997) 856.
- [62] Langeloth, M.; Chiku, M.; Einaga, Y.; *Electrochim. Acta* 55 (2010) 2824.
- [63] Medeiros, R. A.; *Determinação voltamétrica de aspartame em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro* Dissertação de Mestrado (2007) disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000600024&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000600024&script=sci_arttext)
- [64] McGaw, E. A.; Swain, G. M.; *Analytica Chimica Acta* 575 (2006) 180
- [65] Oliveira, S. C. B.; Oliveira-Brett, A. M.; *J. Electroanalytical Chemistry* 648 (2010) 60.
- [66] Zhao, G.; Qi, Y.; Tian, Y.; *Electroanalysis* 18 (2006) 830
- [67] Drago, D.; Spataru, N.; Kawasaki, R.; Manivannan, A.; Spataru, T.; Tryk, D.; Fujishima, A.; *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2437.
- [68] Babyak, C.; Smart, R. B.; *Electroanalysis* 16 (2004) 175
- [69] Svorc, L.; Sochr, J.; Tomcik, P.; Riejav, M.; Bustin, D.; *Electrochimica Acta* 68 (2012) 227
- [70] Pedrotti, J. J.; Angnes L.; Gutz, I. G. R.; *Electroanalysis* 8 (1996) 673
- [71] Campos, M. L. A. M.; Bendo, A.; Viel, F. C.; *Quim. Nova* 25 (2002) 808.
- [72] Saei-Dehkordi, S. S.; Fallah, A. A.; *Microchemical Journal* 98 (2011) 56
- [73] Copeland, T. R.; Osteryoung, R. A.; Skorgeboe, R. K.; *Analytical Chemistry* 46 (1974) 2093.
- [74] Cerqueira, M. R. F.; *Caracterização e avaliação da potabilidade da água de chuva na região da Zona da Mata Mineira*, Dissertação de Mestrado (2012)
- [75] Box, G. E. P.; Behnken, D. W.; *Some new three level designs for the study of quantitative variables* *Technometrics*, Washington, v. 2, p. 455-475, 1960.
- [76] Mendes, T. M. F. F.; Baccan, N.; Cadore, S.; *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 2006, 168.
- [77] Copeland, T. R.; Osteryoung, R. A.; Skorgeboe, R. K.; *Analytical Chemistry* 46 (1974) 2093.
- [78] Manivannan, A.; Kawasaki, R.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; *Electrochimica Acta* 49 (2004) 3313.
- [79] Matos, G. D.; Pereira Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z.; *Revista Analytica* 6 (2003) 38
- [80] de Souza, R. A.; Neto, W. B.; Poppi, R. J.; Baccan, N.; Cadore, S.; *Química Nova* 29 (2006) 654

[81] Orientação sobre validação de métodos analíticos – DOQ-GCRE-008; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO: 2008

[82] ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução Normativa nº9 de 1978 da ANVISA Acessado em 16 de junho de 2012; Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/09\\_78\\_doces.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/09_78_doces.htm)



## 7. ANEXOS:

ANEXO 1: Tabela de Distribuição F a 95 % de confiança:

gl denominador	gl/ numerador									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16
35	4,12	3,27	2,87	2,64	2,49	2,37	2,29	2,22	2,16	2,11
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08
45	4,06	3,20	2,81	2,58	2,42	2,31	2,22	2,15	2,10	2,05
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,03
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,10	2,03	1,97	1,93

**ANEXO 2:** Tabela de Distribuição F a 99 % de confiança:

gl denominador	gl numerador									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4052,2	4999,3	5403,5	5624,3	5764,0	5859,0	5928,3	5981,0	6022,4	6055,9
2	98,50	99,00	99,16	99,25	99,30	99,33	99,36	99,38	99,39	99,40
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69
17	8,40	6,11	5,19	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98
35	7,42	5,27	4,40	3,91	3,59	3,37	3,20	3,07	2,96	2,88
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80
45	7,23	5,11	4,25	3,77	3,45	3,23	3,07	2,94	2,83	2,74
50	7,17	5,06	4,20	3,72	3,41	3,19	3,02	2,89	2,78	2,70
100	6,90	4,82	3,98	3,51	3,21	2,99	2,82	2,69	2,59	2,50