UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ALEXANDRE MINAMI FIOROTO

**Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade
de As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais**

Versão corrigida da Tese defendida conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

27/10/2018

ALEXANDRE MINAMI FIOROTO

**Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade de
As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)*

*Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de
Oliveira*

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

F517a Fioroto, Alexandre Minami
Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade de
As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais /
Alexandre Minami Fioroto. - São Paulo, 2017.
134 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Oliveira, Pedro Vitoriano

1. Fertilizante mineral. 2. Mobilidade. 3.
Bioacessibilidade. 4. Fracionamento. 5. Especificação.
I. T. II. Oliveira, Pedro Vitoriano, orientador.

Aos meus pais, Alceu e Magali

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Pedro Vitoriano de Oliveira pela oportunidade de aprendizado durante o período de mestrado e doutorado sob sua orientação. Agradeço por todo o respeito, apoio e amizade.

Aos meus pais, Alceu e Magali, por todo amor e carinho, pois sem seu apoio e incentivo eu não teria conquistado tudo que consegui até hoje.

À minha irmã Kátia e ao meu cunhado Ademir por todo apoio e carinho.

Aos meus sobrinhos, Luana e Giovanni, que deixam a minha vida mais alegre. Obrigado por todo amor e carinho.

Aos meus padrinhos, Dirceu e Maria, pelo carinho, apoio e incentivo.

À minha amiga Karen por estar sempre ao meu lado. Agradeço pelas conversas e risadas, assim como, pelo apoio em todos os momentos que preciso.

Às minhas amigas Carol Conte e Carol Silva pelas conversas, apoio e carinho.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do GAPE (Grupo de análises e Pesquisas em Espectrometria): Flávio, Gabriel, Leandro, Ivo, Giselaine, Denise, Paulo, Vinícius, André, Marcos, Lucas, Guilherme, Maciel, Rodrigo, Valeska, Raquel e Bruno pela companhia, colaboração e amizade.

Aos amigos especiais do GAPE, Luiza, Gislayne, Aline, Alexandrina, Sandra, Daniel, Angerson, Vivian e Diego, pelos bons momentos que passamos juntos, conversas e risadas. Agradeço por toda a colaboração e apoio durante a realização deste trabalho e pela amizade que vai além da vida acadêmica.

Às professoras Cassiana Seimi Nomura e Juliana Naozuka pelas conversas, trocas de conhecimentos e amizade.

Aos professores Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Fábio Rodrigo Piovezani, Marina Franco Maggi Tavares, Lúcio Angnes, Jorge César Masini pela colaboração para a minha formação durante o período de pós-graduação.

Aos funcionários do IQ que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, às técnicas Luciana e Aline pelo auxílio no laboratório e pelas conversas e amizade.

Aos professores Marcos Yassuo Kamogawa e Fabio Rodrigues pela contribuição ao compor a banca de qualificação.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade e estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Luiz Sávio do LANAGRO por fornecer as amostras de fertilizante.

Ao Professor Marcos Yassuo Kamogawa por fornecer as amostras de solo.

À Danielle e Edson da SABESP por disponibilizarem o ICP OES e pelo auxílio para realização dos experimentos.

Ao professor Francisco Krug, à Lidiane e à técnica Liz do CENA-USP por disponibilizarem o forno de micro-ondas Ultrawave e pelo auxílio para realização dos experimentos.

Ao LNLS pela oportunidade de realizar os experimentos de especiação por XANES e ao professor Fabio Rodrigues pela colaboração neste trabalho.

As empresas ANACON, Agilent e Nova Analítica que disponibilizaram equipamentos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Muito obrigado.

RESUMO

Fioroto, A.M. **Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade de As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais.** 2017. 130p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fertilizantes minerais derivados de rochas fosfáticas podem ser uma fonte de contaminantes, como As, Cd, Cr, Pb e Hg. Além disso, resíduos de indústrias metalúrgicas e químicas podem ser adicionados à composição de fertilizantes para fornecer micronutrientes, atuando como uma fonte adicional de contaminantes. Desta forma, o controle de qualidade de fertilizantes e matérias-primas é importante para evitar danos ao meio ambiente e garantir uma produção segura de alimentos. Neste trabalho, procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas de um fertilizante mineral formulado e uma mistura de micronutrientes foram desenvolvidos para a determinação simultânea de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn por ICP OES, avaliando doze misturas ácidas contendo HNO_3 , HCl , H_3PO_4 , HF e H_3BO_3 . A PCA foi aplicada para auxiliar a escolha de três procedimentos de digestão que exibiram os resultados com maior exatidão. O protocolo de extração sequencial do BCR foi aplicado para investigar a mobilidade e a bioacessibilidade dos elementos. As e Cd foram extraídos principalmente na primeira etapa, portanto estão fracamente ligados à matriz e, conseqüentemente, estão mais móveis e bioacessíveis. O Cr permaneceu quase que completamente na fração residual. O Pb apresentou maior mobilidade e bioacessibilidade na mistura de micronutrientes do que no fertilizante mineral formulado, possivelmente, devido a precipitação de $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$, causado pela alta concentração de P no fertilizante. Os nutrientes (P, Ca, Mg, Cu, Mn e Zn) apresentaram boa bioacessibilidade, exceto Fe, que permaneceu quase totalmente na fração residual. Além disso, análises por DRX e MEV-EDS foram empregadas para caracterizar os resíduos sólidos das extrações, mostrando que os elementos podem ser cobertos por estruturas cristalinas (quartzo), que inibem a sua lixiviação e os tornam menos móveis e bioacessíveis. Um sistema de extração em fluxo foi proposto para avaliar a mobilidade e a bioacessibilidade de As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes, que foi mais eficiente que os procedimentos em batelada, pois o sistema em fluxo simula a constante lixiviação que ocorre no solo, com a infiltração das águas de chuva ou irrigação das plantações. Além disso, essas análises foram realizadas no modo transiente do ICP OES, que permitiu avaliar a cinética de extração dos elementos. O procedimento foi empregado para misturas de fertilizante com solo, onde foram observados sinais que demoravam a retornar a linha base, demonstrando a interação dos elementos com a matriz do solo. Um estudo de especiação por XANES também foi realizado e possibilitou a identificação das espécies As(V) , $\text{Fe}_{2-x}\text{Cr}_x\text{O}_3$ e PbCl_2 no fertilizante e na mistura de micronutrientes. Ensaios realizados com brotos de milho foram realizados para avaliar a translocação de As, Cd, Cr e Pb. Além disso, a partir das análises de especiação de As por HPLC-ICP-MS, foi observado que exsudatos promoveram a redução do As(V) para As(III) , sendo esta a espécie absorvida e translocada pela planta.

Palavras-chave: Fertilizante mineral, mobilidade, bioacessibilidade, fracionamento, especiação

ABSTRACT

Fioroto, A.M. **Evaluation of As, Cd, Cr and Pb mobility and bioaccessibility in mineral fertilizers.** 2017. 130p. Ph.D. Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mineral fertilizers derived from phosphate rocks can be a source of contaminants, such as As, Cd, Cr, Pb and Hg. In addition, metallurgical and chemical industry residues can be added to the fertilizer composition to provide micronutrients, acting as an additional source of contaminants. In this way, the quality control of fertilizers and raw materials is important to avoid damages to the environment and ensure a safe food production. In this work, microwave-assisted digestion procedures of a formulated mineral fertilizer and a mixture of micronutrients were developed for simultaneous determination of Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb and Zn by ICP OES, evaluating twelve acidic mixtures containing HNO₃, HCl, H₃PO₄, HF and H₃BO₃. PCA was applied to assist in the choice of three digestion procedures that exhibited the more accurate results more. The BCR sequential extraction protocol was applied to investigate the elements mobility and bioaccessibility. As and Cd were extracted mainly in the first step, thus they are weakly bound to the matrix and, consequently, are more mobile and bioaccessible. The Cr remained almost completely in the residual fraction. Pb presented higher mobility and bioaccessibility in the mixture of micronutrients than in the formulated mineral fertilizer, possibly due to the precipitation of Pb₃(PO₄)₂ caused by the high concentration of P in the fertilizer. The nutrients (P, Ca, Mg, Cu, Mn and Zn) presented good bioaccessibility, except Fe, which remained almost totally in the residual fraction. In addition, XRD and SEM-EDS analyzes were employed to characterize the solid residue from extractions, showing that the elements can be covered by crystalline structures (quartz), which inhibit their leaching and make them less mobile and bioaccessible. A flow extraction system was proposed to evaluate the mobility and bioaccessibility of As, Cd, Cr and Pb in fertilizers, which was more efficient than batch procedures, because the flow system simulates the constant leaching occurring in soil, with infiltration of rainwater or irrigation of plantations. In addition, these analyses were performed in the transient mode of ICP OES, which allowed evaluating the kinetics of elements extraction. The procedure was applied to mixtures of fertilizer with soil, where a slow return to baseline of signal was observed, demonstrating the interaction of the elements with the soil matrix. XANES speciation study was also carried and allowed the identification of the species As(V), Fe_{2-x}Cr_xO₃ and PbCl₂ in the fertilizer and mixture of micronutrients samples. Bioassays performed with maize sprouts were carried out to evaluate the translocation of As, Cd, Cr and Pb. In addition, from As speciation analysis by HPLC-ICP-MS, it was observed that exudates promoted the reduction of As (V) to As (III), being this the species absorbed and translocated by the plant.

Keywords: Mineral fertilizer, mobility, bioaccessibility, fractionation, speciation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMCSD: *The American Mineralogist Crystal Structure Database*

BCR: *Bureau Communautaire de Référence*

BEC: Concentração equivalente à radiação de fundo (do inglês, *Background Equivalent Concentration*)

CID: Dispositivo de injeção de carga (do inglês, *Charge Injection Device*)

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CV-AAS: Espectrometria de absorção atômica por vapor frio (do inglês, *Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy*)

DMA: Ácido dimetilarsínico (do inglês, *Dimethylarsinic Acid*)

DRX: Difração de Raio-X

EDS: Espectroscopia de energia dispersiva (do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*)

EXAFS: *Extended X-ray Absorption Fine Structure*

F AAS: Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*)

FAO: *Food and Agricultural Organization*

GAPE: Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria

HG-AAS: Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (do inglês, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy*)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

HR-CS GF AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite (do inglês, *High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Generation Atomic Absorption Spectroscopy*)

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

IFA: *International Fertilizer Industry Association*

IUPAC: União internacional de química pura e aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LANAGRO: Laboratório Nacional Agropecuário

LIBS: Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (do inglês, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*)

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MMA: Ácido monometilarsônico (do inglês, *Monomethilarsonic Acid*)

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

ORS: Sistema de reação por octapolo (do inglês, *Octapole Reaction System*)

PCA: Análise de componentes principais (do inglês, *Principal Components Analysis*)

PTFE: Politetrafluoretileno

RSD: Desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*)

SBR: Razão sinal / ruído (do inglês, *Signal-to-background Ratio*)

SRC: Câmara de reação única (do inglês, *Single Reaction Chamber*)

XAS: Espectrometria de absorção de raio-X (do inglês, *X-ray Absorption Spectrometry*)

XANES: Absorção de raios-X na região próxima à borda (do inglês, *X-ray Absorption Near Edge Structure*)

XRF: Fluorescência de Raio-X (do inglês, *X-Ray Fluorescence*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do funcionamento do forno de micro-ondas UltraWave™ (Milestone), baseado na tecnologia de câmara de reação única (<i>Single Reaction Chamber</i> - SRC).....	48
Figura 2. Sistema de extração em fluxo para avaliar mobilidade de As, Cd, Cr e Pb	54
Figura 3. Imagens dos frascos de vidro onde as sementes de milho foram germinadas, do primeiro (A) e do sexto dia (B), do broto retirado do algodão (C) e do Erlenmeyer para onde os brotos foram transferidos (D).	60
Figura 4. Raiz, cotilédone e folhas dos brotos de milho doce.....	61
Figura 5. Sistema para secagem a vácuo.	66
Figura 6. Gráfico 3D das três primeiras componentes da PCA.	68
Figura 7. Fracionamento dos elementos pelo procedimento de extrações sequenciais do BCR para a amostra de fertilizante.....	77
Figura 8. Fracionamento dos elementos pelo procedimento de extrações sequenciais do BCR para a mistura de micronutrientes.....	78
Figura 9. Fragmentos dos difratogramas do fertilizante e resíduos sólidos das extrações sequenciais nas regiões dos sinais atribuídos a monohidrogeno fosfato de potássio e amônio (KNH_4HPO_3), anidrita (CaSO_4), quartzo (SiO_2), dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) e magnetita (Fe_3O_4).	83
Figura 10. Fragmentos dos difratogramas da mistura de micronutrientes e resíduos sólidos das extrações sequenciais nas regiões dos sinais atribuídos a quartzo (SiO_2) e magnetita (Fe_3O_4).....	84

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sólido residual do fertilizante com os números destacando as regiões para obtenção do EDS.	86
Figura 12. Espectros de EDS dos pontos destacados na imagem obtida por MEV (Figura 11).....	86
Figura 13. Perfil do sinal monitorado no modo transiente para a calibração de Cd em meio de 0,10 mol L ⁻¹ de EDTA, com introdução de 2 mL das soluções de referência e vazão de 1,5 mL min (A) e curva de calibração das áreas integradas dos sinais em função das massas de analito presente nas soluções (B).	88
Figura 14. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de EDTA.....	91
Figura 15. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de ácido acético.	92
Figura 16. Perfis dos sinais de As monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L ⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L ⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min ⁻¹	93
Figura 17. Perfis dos sinais de Cd monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L ⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L ⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min ⁻¹	93
Figura 18. Perfis dos sinais de Cr monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L ⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L ⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min ⁻¹	94

Figura 19. Perfis dos sinais de Pb monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L ⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L ⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min ⁻¹	94
Figura 20. Porcentagens dos elementos extraídos do fertilizante mineral pelos procedimentos de extrações sequenciais em batelada (A) e em fluxo (B), utilizando água, EDTA (0,10 mol L ⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L ⁻¹) como extratores.	95
Figura 21. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de ácido cítrico.	97
Figura 22. Perfis dos sinais de As, Cd, Cr e Pb monitorados por ICP OES no modo transiente para as extrações com ácido cítrico (0,20 mol L ⁻¹) em fertilizante (0,5 g) e mistura de solo (5 g) com fertilizante (0,5 mg), com vazão de 1,5 mL min ⁻¹	98
Figura 23. Perfil dos sinais de Pb e P monitorados por ICP OES no modo transiente para a extração com ácido cítrico (0,20 mol L ⁻¹) em fertilizante (0,5 g) com vazão de 1,5 mL min ⁻¹	100
Figura 24. Espectros de XANES da borda K de As do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões.	101
Figura 25. Espectros de XANES da borda K de Cr do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões (A) e figura adaptada dos espectros de Cr obtida na literatura (García-Guaderrama <i>et al.</i> , 2015).	102
Figura 26. Espectros de XANES da borda L ₃ de Pb do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões (A) e figura adaptada dos espectros de Pb obtida na literatura (Takaoka <i>et al.</i> , 2005).	104

Figura 27. Imagens dos brotos de milhos cultivados nos três meios, controle, suspensão e extrato, no momento da transferência dos brotos para os Erlenmeyers (A) e após o período de 5 dias (B).	105
Figura 28. Concentração de As nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,07 mg kg ⁻¹	109
Figura 29. Concentração de Cd nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,01 mg kg ⁻¹	109
Figura 30. Concentração de Cr nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,08 mg kg ⁻¹	110
Figura 31. Concentração de Pb nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,02 mg kg ⁻¹	110
Figura 32. Cromatogramas dos padrões utilizados nas calibrações das espécies de As, arsenito (As (III)), arsenato (As (V)) e ácido dimetilarsínico (DMA).....	111
Figura 33. Cromatograma do extrato inicial preparado para ser adicionado aos brotos de milho (A) e cromatogramas dos extratos (B) e suspensões (C) coletados após o período de crescimento dos brotos (5 dias).....	113
Figura 34. Cromatogramas obtidos para cada parte dos brotos de milho cultivados em meio aos extratos e suspensões de fertilizante	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores empregados para calcular as concentrações admitidos de contaminantes por massa de fertilizante (mg kg^{-1}) e valores máximos admitidos.....	23
Tabela 2. Parâmetros instrumentais e comprimentos de onda adotados para as determinações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn por ICP OES.....	45
Tabela 3. Misturas ácidas testadas para digestão assistida por radiação micro-ondas.	47
Tabela 4. Parâmetros instrumentais adotados para identificar espécies de As, Cr e Pb no fertilizante mineral e na mistura de micronutrientes por XANES.....	58
Tabela 5. Programa de aquecimento para a digestão das partes do broto de milho em forno de micro-ondas com cavidade.	62
Tabela 6. Parâmetros instrumentais do ICP-MS para as determinações de As, Cd, Cr e Pb nos digeridos.	63
Tabela 7. Limites de detecção e quantificação para os procedimentos de digestão escolhidos	71
Tabela 8. Resultados da determinação elementar total no material de referência certificado SRM® 695 usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), $n=3$	72
Tabela 9. Resultados das determinações elementares totais no fertilizante mineral usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), $n=3$	74
Tabela 10. Resultados das determinações elementares totais na mistura de micronutrientes usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), $n=3$	75

Tabela 11. Regressão linear entre os resultados obtidos pelos procedimentos Dx _F , Dx _L e Fx _L para o fertilizante e a mistura de micronutrientes, após realizar normalização usando Log ₁₀ nas concentrações de cada elemento.	76
Tabela 12. Concentração total dos elementos determinados pelo procedimento L e porcentagens dos elementos que podem ser ou não provenientes da mistura de micronutrientes na formulação do fertilizante.	79
Tabela 13. Resultados da determinação elementar total nos materiais de referência certificados SRM® 1547 e 1573a, n=3.....	107
Tabela 14. Concentrações das espécies de As no extrato inicial preparado para ser adicionado aos brotos de milho e concentrações nos extratos e suspensões coletados após o período de crescimento dos brotos (5 dias).	114
Tabela 15. Concentrações totais de As determinadas a partir da digestão assistida por radiação micro-ondas, concentrações no extrato de água/metanol (1:1) e as porcentagens de As extraídas em relação às concentrações totais.....	115
Tabela 16. Concentrações das espécies de As nas partes dos brotos de milho cultivados em meio dos extratos e suspensões. Porcentagens das recuperações obtidas a partir da soma das concentrações das espécies determinadas por HPLC-ICP-MS em relação às concentrações totais de As determinadas por ICP-MS.	118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Determinação elementar total em fertilizantes minerais	25
1.2. Estudos de bioacessibilidade e mobilidade	28
1.2.1. Extrações de etapa única	29
1.2.2. Extrações sequenciais.....	30
1.2.3. Estudos de especiação por espectroscopia de absorção de raio-X	32
1.3. Absorção de elementos pelas plantas	34
2. OBJETIVO.....	37
2.1. Objetivos específicos:	37
3. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1. Instrumentação	38
3.2. Materiais, reagentes e soluções	41
3.3. Amostras.....	42
3.4. Procedimento experimental	44
3.4.1. Parâmetros instrumentais do ICP OES	44
3.4.2. Determinação elementar total.....	46
3.4.2.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas	46
3.4.2.2. Análise de Componentes Principais (PCA)	49
3.4.2.3. Análise do fertilizante e da mistura de micronutrientes.....	50
3.4.3. Fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais – BCR (1999)	50
3.4.3.1. Caracterização das amostras e resíduos sólidos por DRX.....	52
3.4.3.2. Caracterização do resíduo sólido do fertilizante por MEV-EDS.....	53
3.4.4. Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade por extrações em fluxo	53

3.4.4.1. Calibração do ICP OES para análise quantitativa usando o sistema de extração em fluxo	54
3.4.4.2. Estudo de mobilidade por extrações sequenciais em fluxo	55
3.4.4.3. Estudo de bioacessibilidade por extração de etapa única em fluxo	56
3.4.5. Especiação de As, Cr e Pb por XANES.....	57
3.4.6. Avaliação da biodisponibilidade de As, Cd, Cr e Pb utilizando broto de milho doce	59
3.4.6.1. Germinação do milho.....	59
3.4.6.2. Avaliação da translocação de As, Cd, Cr e Pb em broto de milho doce	61
3.4.6.3. Especiação de As nos extratos e no broto de milho por HPLC-ICP-MS.....	64
4. RESULTADOS	67
4.1. Desempenho analítico do ICP OES	67
4.2. Determinação elementar total	67
4.2.1. Características analíticas dos métodos	70
4.2.2. Análise das amostras de fertilizante	73
4.3. Fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais – BCR (1999)	77
4.3.1. Caracterização das amostras e resíduos sólidos por DRX.....	82
4.3.2. Caracterização do resíduo sólido de fertilizante por MEV-EDS.....	85
4.4. Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade por extrações em fluxo	87
4.4.1. Calibração do ICP OES para análise quantitativa usando o sistema de extração em fluxo	87
4.4.2. Estudo de mobilidade por extrações sequenciais em fluxo	89
4.4.3. Estudo de bioacessibilidade por extração de etapa única em fluxo	96
4.5. Especiação de As, Cr e Pb por XANES.....	100

4.6. Avaliação da biodisponibilidade de As, Cd, Cr e Pb utilizando broto de milho doce	105
4.6.1. Germinação do milho.....	105
4.6.2. Avaliação da translocação de As, Cd, Cr e Pb em broto de milho doce.....	106
4.6.3. Especificação de As nos extratos e partes do broto por HPLC-ICP-MS	111
5. CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS.....	122

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos, reflexo do crescimento populacional, está impulsionando as culturas agrícolas no sentido de produzir cada vez mais alimentos e com melhor qualidade (Tilman *et al.*, 2011). Entretanto, a expansão das áreas agriculturáveis é limitada e não acompanha essa demanda. Portanto, existe a preocupação com o aumento da produtividade das lavouras nas mesmas áreas de terra com potencial de cultivo. Segundo o levantamento feito em Agosto de 2017 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), é estimada uma produção recorde de grão para a safra de 2016/2017, chegando a 238,2 milhões de toneladas, que representa um crescimento de 27,7% em relação à safra anterior. Por outro lado, a estimativa da área de cultivo é de 60,66 milhões de hectares, apenas 4% maior que na safra de 2015/2016 (CONAB, 2017).

Estes dados deixam clara a importância do melhor aproveitamento das áreas de cultivo. O monitoramento realizado pela CONAB, durante os últimos 40 anos, demonstra que a produtividade brasileira de grãos teve um constante aumento, incluindo o cultivo de algodão, amendoim, arroz, feijão, milho, soja e trigo, que passou de cerca de 1250 kg ha⁻¹ para 3927 kg ha⁻¹. Este aumento da produtividade foi possível devido aos investimentos em tecnologia no campo, com o uso de máquinas, técnicas de cultivo, melhoria de sementes e uso de irrigação (CONAB, 2017).

Para aumentar a fertilidade do solo e, conseqüentemente, a produção de alimentos, os produtores têm utilizado variados tipos de fertilizantes, defensivos químicos e biológicos. Em uma definição geral, os fertilizantes (também chamados de adubos) são misturas de compostos químicos de natureza mineral ou orgânica,

natural ou sintética, que vão prover ao solo, nutrientes essenciais para as plantas (Rodella, 2005). Dessa forma, o uso de fertilizante é um investimento importante, pois essa prática associada à calagem (adição de calcário para corrigir a acidez do solo) é responsável por cerca de 50% dos ganhos de produtividade (Lopes e Guilherme, 2000).

Existem dois grandes grupos de fertilizantes: os minerais e os orgânicos. Os fertilizantes minerais são misturas de compostos inorgânicos, de natureza fundamentalmente mineral, extraídos de jazidas minerais e transformados em indústrias químicas por processos físicos ou químicos. Os fertilizantes orgânicos são produtos de natureza fundamentalmente orgânica, obtido por processos físicos, químicos ou bioquímicos, naturais ou controlados, a partir de matérias-primas de origem industrial, urbana ou rural, vegetal ou animal, enriquecido ou não de nutrientes minerais (Brasil, 2016). Na maioria das vezes o que se deseja é que os fertilizantes tenham os principais elementos essenciais para o crescimento das plantas que são: N, P e K, considerados os nutrientes primários; S, Mg, Ca e Na os nutrientes secundários; e B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn os micronutrientes. Portanto, a aplicação de fertilizantes tem como objetivo suprir essa necessidade, uma vez que o solo de cultivo pode se encontrar deficiente desses elementos (Lopes e Guilherme, 2000; Rodella, 2005).

Segundo a IFA (*International Fertilizer Industry Association*) e a FAO (*Food and Agricultural Organization*) o Brasil está entre os 5 países (China, Estados Unidos, Índia e Paquistão) maiores consumidores mundiais de fertilizantes para suplementação de N e/ou P. Ainda de acordo com IFA e FAO, nos últimos 50 anos, o crescimento do uso de suplementos a base de N aumentou 8 vezes e P aumentou 3 vezes por unidade de área cultivada (Lu e Tian, 2017).

Em contraste aos benefícios esperados pelo uso de fertilizantes, existe a preocupação de seu uso excessivo, o que pode causar, a médio e longo prazo diversos problemas ambientais e ecológicos, acidificação e degradação do solo, eutrofização da água, redução no rendimento de algumas culturas, que poderá prejudicar a sustentabilidade da produção de alimentos.

Adicionalmente a esses problemas, existe a possibilidade dos fertilizantes conterem elementos potencialmente tóxicos. Os fertilizantes minerais derivados de rochas fosfáticas podem ser uma fonte significativa de contaminantes, como arsênio, cádmio, cromo, chumbo e mercúrio (Macedo *et al.*, 2009; Mar e Okazaki, 2012; El-Sheikh *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014). Além disso, resíduos de indústrias metalúrgicas e químicas podem ser adicionados à composição de fertilizantes para fornecer micronutrientes, atuando como uma fonte adicional de contaminantes (Rodella, 2005; Husgafvel *et al.*, 2016).

Os elementos potencialmente tóxicos podem causar danos ao ambiente, prejudicar a produção agrícola e serem absorvidos pelas plantas durante o cultivo, contaminando alimentos que serão ingeridos pelos humanos (Aydin *et al.*, 2010). Desta forma, o controle de qualidade de fertilizantes e matérias-primas é extremamente importante para evitar danos ao ambiente e garantir uma produção segura de alimentos.

Segundo dados da Agência Nacional para Difusão de Adubos (ANDAs), somente no ano de 2016 foram fornecidos cerca de 34 milhões de toneladas de fertilizantes aos consumidores (ANDAs, 2017). Evidentemente, esses dados não se restringem somente aos fertilizantes minerais, porém, se o controle de qualidade em relação aos elementos potencialmente tóxicos não for rigoroso, as quantidades

desses elementos que estão sendo distribuídas nos solos agricultáveis podem chegar a milhares de toneladas.

No Brasil, a instrução normativa SDA nº 27 de 05 de junho de 2006 estabelece as concentrações máximas de elementos potencialmente tóxicos admitidas em fertilizantes minerais (Brasil, 2006). Estes valores variam de acordo com a sua composição, uma vez que a quantidade de fertilizante aplicada ao solo é dependente das concentrações dos nutrientes presentes em sua composição, portanto isso influencia a quantidade de contaminantes que poderão estar sendo introduzidos no ambiente. Na Tabela 1 estão apresentados os valores empregados para calcular as concentrações admitidas de contaminantes por massa de fertilizante (mg kg^{-1}).

Tabela 1. Valores empregados para calcular as concentrações admitidos de contaminantes por massa de fertilizante (mg kg^{-1}) e valores máximos admitidos.

Elemento	Valores admitidos por % P_2O_5 (mg kg^{-1})	Valores admitidos por % da somatória de micronutrientes (mg kg^{-1})	Valores máximos admitidos por massa total de fertilizante (mg kg^{-1})	
			Para o caso II	Para os casos III e IV
	Coluna A	Coluna B	Coluna C	Coluna D
As	2	500	250	4000
Cd	4	15	57	450
Pb	20	750	1000	10000
Cr	40	500	-	-
Hg	0,05	10	-	-

Também, para os cálculos devem ser considerados os percentuais de P_2O_5 ($\%P_2O_5$) e os percentuais da somatória de micronutrientes ($\%micronutrientes$) presentes nas amostras. Para cada classificação de fertilizante, de acordo com a sua composição, os valores de contaminantes admitidos são calculados de maneiras diferentes. As classificações dos fertilizantes e as formas de calcular estes valores estão apresentadas a seguir:

- (I) Fertilizantes minerais simples que contenham fósforo, por exemplo, fosfato monoamônio ($NH_4H_2PO_4$), fosfato diamônio ($(NH_4)_2HPO_4$), superfosfato simples ($Ca(H_2PO_4)_2 + CaSO_4$) e superfosfato triplo ($Ca(H_2PO_4)_2$).

$$\text{Valor admitido} = \%P_2O_5 \times \text{valor da coluna A}$$

- (II) Fertilizantes minerais fornecedores exclusivamente de micronutrientes (mistura de micronutrientes) ou fertilizantes que contenham macronutrientes secundários e micronutrientes.

$$\text{Valor admitido} = \%micronutrientes \times \text{valor da coluna B}$$

- (III) Fertilizantes mistos e complexos que contenham fósforo e micronutrientes

$$\text{Valor admitido} = (\%P_2O_5 \times \text{valor da coluna A}) + (\%micronutrientes \times \text{valor da coluna B})$$

- (IV) Fertilizantes mistos e complexos que contenham fósforo e não contenham micronutrientes

$$\text{Valor admitido} = \%P_2O_5 \times \text{valor da coluna A}$$

Além disso, existem valores máximos admitidos que não podem ser ultrapassados. Para o caso (II), as concentrações máximas de contaminante admitidas são limitadas aos valores da coluna D (Tabela 1) e para os casos (III) e (IV), os máximos são limitados aos valores da coluna C (Tabela 1).

1.1. Determinação elementar total em fertilizantes minerais

Muitas das técnicas analíticas empregadas para a determinação elementar em amostras de fertilizante, como a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), requerem a introdução de amostras líquidas, assim, torna-se necessário a dissolução dessas amostras. Entretanto, os fertilizantes minerais e as matérias-primas usadas para a sua produção são formados por matrizes complexas e, portanto, de difícil dissolução. Por este motivo, vários procedimentos de preparo são propostos para determinações elementares nestas amostras. Estudos demonstraram que a extração realizada por meio de digestão/lixiviação em banho de ultrassom pode ser suficiente para a determinação quantitativa de alguns elementos (El-Sheikh *et al.*, 2013).

Entretanto, às vezes, a dissolução total da amostra é necessária para permitir a determinação das concentrações de elementos fortemente ligados a estruturas cristalinas, por exemplo, quartzo. Normalmente, os procedimentos recomendados são aqueles baseados na dissolução usando ácidos minerais, sozinhos ou combinados, em altas temperaturas (Mar e Okazaki, 2012; El-Sheikh *et al.*, 2013). Além disso, condições fortemente oxidantes, utilizando misturas de HNO_3 e HClO_4 , têm sido empregadas para o preparo de amostras de fertilizantes minerais e rochas fosfáticas. Apesar disso, mesmo aplicando tais condições, a dissolução completa da amostra não pode ser garantida, sendo necessário realizar a separação de resíduos sólidos (Mar e Okazaki, 2012) ou a adição de ácido fluorídrico para a solubilização de silicatos. No entanto, os fluoretos podem se ligar a elementos da matriz formando compostos insolúveis (por exemplo, CaF_2 , MgF_2 , NaAlF_4 , MgAlF_5) e, nesses casos, o ácido bórico é empregado para solubilizá-los (Vieira *et al.*, 2005; Krug *et al.*, 2016).

A digestão assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado tem sido amplamente empregada para o preparo de amostras inorgânicas e orgânicas. Procedimentos que utilizam misturas ácidas contendo HNO_3 com ácidos complexantes, tais como HCl , HF e H_3PO_4 , e reagentes oxidantes (por exemplo, H_2O_2) têm sido propostos para dissolução ou extração de elementos em matrizes inorgânicas (Flores, 2014). O aquecimento por micro-ondas em frascos fechados é um modo de obter altas temperaturas em um curto espaço de tempo (Kane *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007; Shirisha *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 2014), que melhora a eficiência da digestão e possibilita o uso de ácidos diluídos. O ácido nítrico diluído combinado com peróxido de hidrogênio na digestão assistida por radiação micro-ondas foi também proposto para as determinações de As (Machado, Pereira-Filho, *et*

al., 2016; Machado, Virgilio, *et al.*, 2016) e B, P e S (Oliveira *et al.*, 2016) em fertilizantes minerais.

Geralmente, quando reagentes concentrados são usados para o preparo de amostra, uma alta concentração de ácido permanece nos digeridos e requerem uma diluição subsequente para reduzir a acidez excessiva, evitando interferências em algumas técnicas de detecção. Por outro lado, a alta diluição pode prejudicar a detectabilidade dos elementos. Uma maneira de superar essas desvantagens é o uso de soluções de ácido diluídos para digestão (Bizzi *et al.*, 2014). Além disso, o uso de ácido diluído para a decomposição da amostra é uma boa estratégia para minimizar o consumo de reagentes, geração de resíduos e valores dos brancos analíticos (Nóbrega *et al.*, 2012; Bizzi *et al.*, 2014; Machado, Pereira-Filho, *et al.*, 2016; Machado, Virgilio, *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016). No entanto, em alguns casos, essa abordagem pode ser limitada devido à perda de eficiência na decomposição da matriz de amostra (Nóbrega *et al.*, 2012). A eficiência deste procedimento é bem demonstrada para matrizes orgânicas, mas são dificilmente encontradas para aplicações em matrizes inorgânicas (Machado, Pereira-Filho, *et al.*, 2016; Machado, Virgilio, *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016).

Devido à complexidade da matriz, a dissolução total das amostras de fertilizantes minerais e suas matérias primas não é trivial. Deste modo, alguns estudos propõem a análise direta de sólidos realizando amostragem por suspensões. O HNO_3 , etanol e surfactantes foram utilizados como diluentes na determinação de Cd (Borges *et al.*, 2011) e Pb (Borges *et al.*, 2014) em fertilizantes por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS), pois auxiliam na extração parcial dos analitos das partículas sólidas e aumentam a estabilidade das suspensões. A

análise de suspensões também foi utilizada para a determinação de Hg (De Jesus *et al.*, 2013) e As (Macedo *et al.*, 2009) por espectrometria de absorção atômica de vapor frio (CV-AAS) e espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG-AAS), respectivamente. No entanto, é necessário que ocorra a extração total do analito durante a formação do hidreto ou vapor de mercúrio.

Alternativamente, existem propostas de análises direta de sólidos por fluorescência de Raio-X (XRF), uma técnica não destrutiva (Azzi *et al.*, 2017), e por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, *Laser-induced Breakdown Spectroscopy*), onde as amostras são analisadas na forma de pastilhas prensadas (Nunes *et al.*, 2014; Marangoni *et al.*, 2016).

1.2. Estudos de bioacessibilidade e mobilidade

A presença de elementos potencialmente tóxicos em fertilizantes minerais pode contaminar solos agrícolas, causando efeitos adversos para o ecossistema do solo, bem como aumentar os riscos para a saúde humana e animal (Lu e Tian, 2017). No entanto, o comportamento desses elementos no ambiente depende de suas espécies químicas. A forma que eles estão ligados à matriz sólida pode afetar a sua mobilidade, bem como, sua bioacessibilidade e biodisponibilidade para organismos vivos (Bacon e Davidson, 2008). Consequentemente, as informações obtidas a partir das determinações das concentrações totais, apesar de necessárias, não são suficientes para informações mais completas acerca dos efeitos que esses elementos podem causar ao ambiente e cultivos. Procedimentos de extração, fracionamento e a especiação química são importantes para prever a viabilidade de nutrientes e elementos potencialmente tóxicos serem absorvidos pelas plantas e

avaliar o impacto de eventuais contaminações ambientais (Bacon e Davidson, 2008; Yang *et al.*, 2013; Juhasz *et al.*, 2016).

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a bioacessibilidade é definida como o potencial de uma substância entrar em contato com um organismo vivo e talvez interagir com ele, com a possibilidade de ser absorvida. Portanto, o fato de uma substância estar em contato com um organismo não garante que ela será absorvida, entretanto a bioacessibilidade é um precursor da biodisponibilidade. A biodisponibilidade representa o potencial dessa substância ser efetivamente absorvida pelo organismo. Deste modo, estudos de biodisponibilidade, necessariamente, envolvem ensaios *in vivo* (Nordberg *et al.*, 2009).

A mobilidade, assim como a bioacessibilidade, pode ser estimada a partir de procedimentos de extração que representem as condições do ambiente. Entretanto, a diferença entre esses dois termos é dependente do contexto do estudo em que estão sendo empregados. O termo bioacessibilidade é empregado quando o estudo está relacionado à possibilidade dos elementos serem absorvidos pelas plantas. Enquanto a mobilidade é usada em estudos de lixiviação com o objetivo de avaliar o impacto ambiental causado por esses elementos (Bacon e Davidson, 2008).

1.2.1. Extrações de etapa única

Diversos extratores têm sido empregados para a avaliação da mobilidade e bioacessibilidade de elementos no solo. Soluções de sais são empregadas como extratores mais brandos, agindo apenas como trocadores iônicos, por exemplo, CaCl_2 , MgCl_2 , NH_4NO_3 , NaNO_3 e KNO_3 . Compostos com alta capacidade de

complexação de elementos, como EDTA e DTPA, são frequentemente usados e são capazes de extrair elementos ligados a carbonatos e a matéria orgânica. Ácidos orgânicos fracos, como ácido acético (CH_3COOH), ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) e ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), e ácidos minerais diluídos, como HCl , HNO_3 e H_2SO_4 , são usados para simular variações de pH do solo, que podem ser causadas por chuvas ácidas por exemplo. Além disso, os ácidos orgânicos e os complexantes, também são empregados para os estudos de bioacessibilidade para simular substâncias secretadas pelas raízes das plantas para absorção de nutrientes, o que ocorre durante o ciclo de crescimento (Sahuquillo *et al.*, 2003; Meers *et al.*, 2007; Hooda, 2010).

1.2.2. Extrações sequenciais

O fracionamento de elementos potencialmente tóxicos empregando métodos de extrações sequenciais tem sido utilizado para obter informações de bioacessibilidade e mobilidade. Uma série de reagentes é adicionada à mesma amostra sólida e as frações extraídas nas primeiras etapas são geralmente mais fracamente ligadas à matriz sólida, conseqüentemente, são mais móveis e bioacessíveis (Bacon e Davidson, 2008). O trabalho clássico de Tessier, Bizon e Campbell, publicado em 1979, propôs um método de extrações sequenciais para o fracionamento de elementos em cinco frações: trocável, ligada a carbonatos, ligada a óxidos de Fe-Mn, ligada a matéria orgânica e residual (Tessier *et al.*, 1979). No início da década de 1990, o BCR (*Bureau Communautaire de Référence*) estabeleceu um protocolo de extrações sequenciais em sedimentos, que difere do método Tessier pela substituição das duas primeiras frações por uma única etapa

(trocável, solúvel em água e ácido). Depois, o BCR recomendou um protocolo revisado em 1999, para melhorar sua reprodutibilidade. Posteriormente, esses procedimentos foram amplamente aplicados em amostras variadas de interesse ambiental (Rauret *et al.*, 1999; Gleyzes *et al.*, 2002).

Neste contexto, as pesquisas relacionadas à bioacessibilidade e mobilidade de elementos em amostras de fertilizantes, utilizando extrações sequenciais pelo protocolo do BCR, são predominantemente focadas em produtos residuais de diversas origens que são adicionados ao solo.

No entanto, a maioria destes produtos são resíduos orgânicos, por exemplo, resíduos de cana-de-açúcar (Akkajit *et al.*, 2013; Maqueda *et al.*, 2015), subprodutos de indústrias de papel (Wang *et al.*, 2005) e diferentes tipos de lodo (Turek *et al.*, 2005; Alvarenga *et al.*, 2007; Jamali *et al.*, 2008; Nemat *et al.*, 2009; Mäkelä *et al.*, 2012; Pathak *et al.*, 2014; Maqueda *et al.*, 2015). Esses trabalhos têm como objetivo, não apenas avaliar a extração de elementos contidos nos fertilizantes, mas também verificar o efeito que eles causam na bioacessibilidade e mobilidade dos elementos presentes nos solos (Wang *et al.*, 2005; Akkajit *et al.*, 2013; Maqueda *et al.*, 2015). A avaliação dos solos demonstra que as concentrações de elementos potencialmente tóxicos são geralmente mais altas e também mais móveis em solos agrícolas e a fertilização é uma das atividades agrícolas responsáveis por isso (Yang *et al.*, 2013).

O protocolo de extrações sequenciais do BCR também foi aplicado para avaliar a bioacessibilidade e mobilidade de elementos potencialmente tóxicos em amostras de características inorgânicas, como resíduos industriais reaproveitados e utilizados como fertilizantes (calcário, escória de dessulfuração e cinzas volantes) (Nurmesniemi *et al.*, 2010; Mäkelä *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013) e diretamente em amostras de fertilizantes fosfatados e compostos (Unsal *et al.*, 2014). Também, foi

aplicado para avaliar elementos presentes em rocha fosfáticas que são transferidos para subproduto da indústria de fertilizantes (Perez-Lopez *et al.*, 2007; Pérez-López *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que os procedimentos de extrações sequenciais apenas dividem os elementos de acordo com a solubilidade em condições particulares. Portanto, as informações obtidas são referentes apenas ao fracionamento dos elementos, não sendo possível garantir a identificação da forma química e a maneira como os mesmos estão ligados a minerais específicos da matriz. Para isso, é necessário realizar análise de especiação para confirmar e complementar essas informações (Bacon e Davidson, 2008).

Em conjunto aos estudos de extrações sequenciais, informações complementares sobre as espécies químicas dos elementos podem ser obtidas a partir de técnicas de raio-X, como difração de raio-X (DRX) e espectroscopia de absorção de raio-X (Bacon e Davidson, 2008).

1.2.3. Estudos de especiação por espectroscopia de absorção de raio-X

A espectroscopia de absorção de raio-X (XAS) tem sido uma importante ferramenta para estudos de especiação em amostras de interesse ambiental, como solos, sedimentos, minérios, tecidos vegetais, etc. (Gräfe *et al.*, 2014). Além disso, devido a possibilidade da análise de especiação diretamente na amostra sólida, apresenta a vantagem de preservar o estado físico e químico da amostra (Gräfe *et al.*, 2014). A espectroscopia de absorção de raio-X compreende duas técnicas: EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) e XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*). As análises por EXAFS podem fornecer informações sobre os

átomos vizinhos ao átomo central absorvedor, distâncias de ligação e número de coordenação. XANES proporciona informações sobre o estado de oxidação, estrutura cristalina em que está inserido o átomo absorvedor (Bunker, 2010).

No trabalho de Williams e colaboradores, técnicas de XAS foram empregadas para a especiação de As, Fe e Pb em resíduos de minérios usados na produção de fertilizantes. A partir da análise por EXAFS, foram determinadas as distâncias de ligação de As com átomos vizinhos (As-O e As-S), o que possibilitou a identificação de escorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e arsenopirita (FeAsS). A análise por XANES permitiu, a partir de uma combinação linear, estimar a proporção dessas duas espécies presentes na amostra. Da mesma forma, foi identificado que PbSO_4 seria a espécie majoritária de Pb. Além disso, esses estudos demonstraram a possibilidade da conversão de arsenopirita para outras espécies, o que poderia alterar a sua mobilidade e bioacessibilidade (Williams *et al.*, 2006). XANES também foi empregada no estudo de Luo e colaboradores para avaliar espécies de P em solos que passaram por longos períodos de fertilização e consecutivas culturas de trigo e milho. A análise por XANES confirmou as informações obtidas a partir de um procedimento de extração sequencial proposto para o fracionamento do P. Fosfato de ferro, fosfato de cálcio e espécies orgânicas de fósforo foram identificadas nas amostras. Nesse estudo, também foi demonstrado que a adição de esterco junto ao fertilizante mineral alterou a distribuição das espécies de P, favorecendo a sua bioacessibilidade (Luo *et al.*, 2017). Vogel e colaboradores realizaram um estudo sobre a produção de fertilizantes a partir da incineração de lodo de esgoto, no qual a análise de especiação por XANES foi empregada para avaliar o efeito do tratamento termoquímico sobre as espécies de Cr, S e Fe, com o objetivo de otimizar o

procedimento visando evitar a formação de espécies de maior toxicidade, como Cr (VI) (Vogel *et al.*, 2015).

1.3. Absorção de elementos pelas plantas

A absorção e a translocação de nutrientes ocorrem por mecanismos específicos da planta. Entretanto, elementos potencialmente tóxicos são absorvidos por esses mesmos mecanismos, devido a similaridades químicas com elementos essenciais (Tangahu *et al.*, 2011). Abedin e colaboradores avaliaram as espécies de As translocadas em arroz cultivado em solo com adições desse elemento. A presença de fosfato inibiu fortemente a absorção de arsenato. Por outro lado, o mesmo não foi observado para o arsenito. Isso demonstra que essas espécies de As apresentam diferentes mecanismos de absorção (Abedin, Mohammed Joinal *et al.*, 2002). O arsenato é absorvido pelas plantas por meio de transportadores de fosfatos, enquanto o arsenito é absorvido pela mesma via que o Si (Zhao *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014).

Condições climáticas, como a umidade relativa do ar, podem afetar a absorção de elementos pelas plantas. A liberação de vapor de água pelas folhas para a atmosfera, um processo chamado transpiração, em geral, é uma resposta passiva ao ambiente atmosférico, causada pelo gradiente de pressão de vapor entre o tecido normalmente saturado de água das folhas e a atmosfera seca. Desta maneira, a água e os elementos solúveis presentes no solo são absorvidos pelas raízes e translocados para as partes aéreas das plantas (Hillel, 2007; Tangahu *et al.*, 2011).

As plantas possuem mecanismos eficientes para obter nutrientes do ambiente, mesmo quando presentes em baixas concentrações e da mesma forma podem acabar favorecendo a absorção de contaminantes. As raízes das plantas secretam substâncias (exsudatos) que auxiliam na absorção desses nutrientes (Tangahu *et al.*, 2011). Os exsudatos são constituídos de compostos de alto peso molecular, como polissacarídeos e proteínas, e também de compostos de baixo peso molecular, por exemplo, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos. Entre os ácidos orgânicos, estão presentes os ácidos, cítrico, acético, butírico, láctico, oxálico e málico (Jones, 1998; Montiel-Rozas *et al.*, 2016). Todas essas substâncias desempenham um papel importante nos processos que ocorrem na rizosfera (região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato), podem agir como complexantes ou induzir mudanças de pH e reações de oxirredução, assim, são capazes de solubilizar os nutrientes presentes no solo (Tangahu *et al.*, 2011). Entretanto, a secreção dessas substâncias, bem como a absorção dos nutrientes, é dependente de condições do ambiente e da espécie da planta (Jones, 1998).

Uma avaliação da absorção de As por *Phaseolus vulgaris*, *Mentha aquatica* e *Pteris cretica* demonstra que o *Phaseolus vulgaris* tem seu crescimento afetado pela presença de As, enquanto as outras plantas foram mais tolerantes a essa contaminação. Além disso, diferentes espécies de planta podem absorver maiores ou menores concentrações dos elementos. *Pteris cretica* apresentou a maior capacidade de absorção e translocação de As, enquanto a *Mentha aquatica*, apesar de apresentar uma boa absorção, reteve o elemento nas raízes. Nesse estudo, também foi avaliado o solo onde essas plantas foram cultivadas, deste modo foi

observado que as plantas alteraram as espécies e a mobilidade do As nas regiões próximas às raízes (rizosfera) (Száková *et al.*, 2009).

No trabalho de Pessoa e colaboradores, o girassol apresentou-se tolerante a altas concentrações de Cd. A partir de imagens quantitativas da distribuição elementar obtidas por LA-ICP-MS das sementes de girassol cultivadas com diferentes adições de Cd, foi observado que esse elemento é translocado e estocado em altas concentrações nas sementes. Além disso, a presença de Cd afeta as concentrações e distribuição de micronutrientes (Cu, Mn e Fe) nas sementes (Pessoa *et al.*, 2017).

Como já mencionado anteriormente, diversos extratores têm sido empregados para a avaliação da mobilidade e bioacessibilidade de elementos, simulando condições do solo ou de substâncias excretadas pelas plantas. Meer e colaboradores, avaliaram a translocação de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em brotos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em 21 solos com composição e nível de contaminação distintas. Nesses solos, foram avaliados 12 procedimentos de extração para estimar a bioacessibilidade desses elementos. Então, foram avaliados quais extratores apresentaram melhor correlação com o estudo de translocação. Em geral, o procedimento de extração utilizando $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 foi o mais versátil, pois forneceu uma boa correlação com os resultados do estudo de translocação dos 5 elementos avaliados (Meers *et al.*, 2007).

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi estudar métodos para avaliar a mobilidade e bioacessibilidade de As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais, a partir da caracterização das formas cristalinas de elementos presentes nas amostras, métodos de extração simulando algumas condições de mobilidade e bioacessibilidade, fracionamento e especiação dos elementos e ensaios utilizando broto de milho doce para estudo de translocação.

2.1. Objetivos específicos:

- Desenvolver procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas para a determinação da concentração total dos elementos por ICP OES;
- Avaliar a mobilidade e bioacessibilidade de contaminantes e nutrientes a partir do fracionamento dos elementos utilizando o procedimento de extrações sequencial do BCR;
- Estudar a mobilidade e bioacessibilidade de As, Cd, Cr e Pb utilizando extrações em fluxo;
- Realizar a análise de especiação de As, Cr e Pb por XANES;
- Estudar a translocação de As, Cd, Cr e Pb em brotos de milho doce e especiação de As por HPLC-ICP-MS.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

Para as determinações elementares, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), modelo iCAP série 6000 (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Inglaterra), com vista axial e radial, detector CID (*Charge Injection Device*), com intervalo de trabalho de 166,25 a 847,0 nm, distância focal de 383 mm, policromador Echelle com 52,91 linhas mm^{-1} e fonte de rádio frequência de 27,12 MHz, que permite ajuste da potência aplicada de 750 a 1350 W. Argônio com pureza de 99,998% (v v^{-1}) (Oxilúmen, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para formar o plasma e purgar a ótica, permitindo a escolha de linhas de emissão na região do ultravioleta. Foi utilizado um sistema de introdução de amostra resistente ao ácido fluorídrico, tubo central de cerâmica, nebulizador *Burgener Mira Mist*[®] e câmara de nebulização ciclônica de Teflon. Este sistema de introdução de amostra foi utilizado em todas as análises por ICP OES, mesmo quando não havia HF.

Nos estudos de translocação e especiação, as determinações de As, Cd, Cr e Pb foram realizadas em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), modelo Agilent 7900 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), com fonte de radiofrequência de 27 MHz, permitindo ajuste da potência de 500 a 1600 W, profundidade de amostragem ajustável de 3 a 28 mm, cone de amostragem com orifício de 1 mm de diâmetro e *skimmer* com orifício de 0,45 mm (ambos de níquel), equipado com Sistema de Reação por Octapolo (ORS, *Octapole Reaction System*), utilizado no modo de

colisão com He (Oxilúmen), analisador de massas quadrupolar, com intervalo de trabalho de 2 a 260 u.m.a e resolução variável de 0,3 a 1 u.m.a e detector em arranjo de dinodos. Para introdução das amostras, foi utilizado nebulizador concêntrico de quartzo *MicroMist*, câmara de expansão de duplo passo refrigerada por sistema *Peltier* a -5 °C e tocha de quartzo com injetor de 2,5 mm de diâmetro interno, utilizando argônio com pureza de 99,998% (v v⁻¹) (Oxilúmen) para formação do plasma.

Para identificar estruturas cristalinas nas amostras de fertilizantes e resíduos sólidos de extrações, utilizou-se um difractômetro de raios-X (DRX), modelo Miniflex (Rigaku, Tóquio, Japão), que opera a 30 kV e radiação CuK α (1,5418 Å). Os dados foram coletados de 1,5 ° a 70 °, a uma taxa de 2 θ de 0,02 ° s⁻¹.

Um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo JSM-7401F (JEOL, Peabody, Massachusetts, EUA), que possui canhão de emissão de campo com tensão de aceleração de 0,1 kV a 30,0 kV, resoluções de 1,0 nm (15 kV) e 1,5 nm (1 kV) e magnificação máxima de 1 milhão de vezes, acoplado à técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopy*) (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para a análise do resíduo sólido resultante das extrações sequenciais.

O estudo de especiação utilizando espectroscopia por absorção de raios-X na região próxima à borda (XANES) foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-CNPem) em Campinas, São Paulo, utilizando a linha de Luz XAFS2, estação experimental dedicada a técnicas de espectroscopia por absorção de raios-X na região dos raios-X duros (3,5 a 17,0 keV), com feixe de dimensões de 450 x 250 μm^2 , fluxo de fótons de $2,78 \times 10^9$ fótons s⁻¹ (a 7 keV, 100 mA), resolução de $1,71 \times 10^{-4}$ (a 7 keV). Um detector de estado sólido de Ge com 15 elementos,

modelo G-15 SSD (Canberra, Connecticut, EUA), foi usado para medidas por fluorescência e uma fotomultiplicadora, modelo R928 (Hamamatsu, Hamamatsu, Japão), para medidas por transmitância.

Para o estudo de especiação de As, foi utilizado um cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com sistema de desgaseificação (DGU-20 A3), bombas de pistão recíprocas (LC-6 AD) e alça de amostragem de 100µL. A separação das espécies de As foi realizada em uma coluna de troca aniônica, modelo PRP X-100 (Hamilton, Reno, EUA).

A digestão do fertilizante, da mistura de micronutrientes e do material de referência foi realizada em um forno de micro-ondas de alta pressão, modelo UltraWAVE (Milestone, Connecticut, EUA), com pré-pressurização da cavidade com nitrogênio (Oxilúmen). Também foi utilizado um forno de micro-ondas, modelo ETHOS ONE (Milestone), para a digestão dos brotos de milho.

Para a pesagem das amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica (Ohaus Adventurer, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão de até 0,0001g.

Um pHmetro, modelo DM-20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil), foi utilizado para os ajustes de pH das soluções extratoras.

Um banho Dubnoff Microprocessado, modelo Q226M2 (Quimis®, Diadema, SP, Brasil), foi utilizado durante de aquecimento das extrações sequenciais.

Um banho ultrassônico com capacidade para 2 L e frequência de 40 kHz, modelo 75 D (VWR Scientific Instruments, Radnor, EUA), foi utilizado para a extração de As do broto de milho no estudo de especiação.

Uma mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis®), foi utilizada para promover a homogeneização e agitação das amostras durante as extrações.

Um agitador tipo Vortex, modelo Q220 (Quimis®), foi utilizado para auxiliar a solubilização do ácido bórico nos digeridos.

Uma centrífuga para tubos, modelo Q222TM (Quimis®), foi empregada na separação do sobrenadante das soluções.

Uma estufa, modelo Q317M (Quimis®) foi utilizada para a secagem das amostras de fertilizante e mistura de micronutrientes.

Para a secagem dos brotos de milho foi utilizado um liofilizador, modelo ModulyoD-115 (Thermo Fisher Scientific).

A germinação e cultivo dos brotos de milho foram realizados em uma câmara de vegetação R80S (HOMEbox, Berlin, Alemanha) de 130 mm de largura, 100 mm de profundidade e 150 mm de altura, com entradas de ar com tela de proteção contra mosquito de 700 μm .

3.2. Materiais, reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água de elevado grau de pureza (18,2 M Ω cm), obtida em um deionizador com sistema de ultra purificação Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

As soluções analíticas de referência foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de alumínio (AlCl₃), arsênio (As₂O₅), cálcio (CaCl₂), cádmio (CdCl₂), cromo (CrCl₃), cobre (CuCl₂), ferro (FeCl₃), magnésio (MgCl₂), manganês (MnCl₂), níquel (NiCl₂), fósforo (H₃PO₄) chumbo (Pb(NO₃)₂), zinco (ZnCl₂) e ródio (Rh(NO₃)₃) Titrisol® (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) em meio de 0,1% v v⁻¹ de ácido nítrico (Merck KgaA).

Ácidos nítrico, clorídrico, ortofosfórico, fluorídrico, sulfúrico e bórico e peróxido de hidrogênio (Merck KgaA) foram utilizados durante os procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas.

Ácido acético glacial, cloridrato de hidroxilamina, ácido nítrico, peróxido de hidrogênio, acetato de amônio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido cítrico (Merck KgaA) foram utilizados no preparo de soluções extratoras.

Padrões de Na_2HAsO_4 , NaAsO_2 , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, Cr_2O_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, Cr metálico, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e Pb metálico foram utilizados como referências nas análises por XANES.

Ácido ortofosfórico e hidróxido de amônio foram utilizados para o preparo da solução tampão utilizada como fase móvel na cromatografia de troca aniônica.

No estudo de especiação foi usado metanol (Merck KgaA) para a extração de As dos brotos de milho. Soluções de referência das espécies de As foram preparadas a partir dos padrões de ácido dimetilarsínico (DMA) e arsenito de sódio (Sigma Aldrich).

Papéis filtro de gramatura de 80 g, espessura de 0,2 mm e porosidade de 26 a 44 μm (Fitec, São Paulo, SP, Brasil) foram usados no sistema de extração em fluxo.

3.3. Amostras

Neste trabalho foi avaliada um fertilizante mineral multinutriente (NPK + Ca, Mg, S + micronutrientes), fortificado com 10% (m m^{-1}) de uma mistura de micronutrientes (matéria prima concentrada de micronutrientes). A mistura de micronutrientes utilizada na formulação deste fertilizante mineral também foi estudada. Este material é concentrado de micronutrientes como B, Co, Cu, Fe, Mn,

Mo, Ni e Zn, reunidos em um só produto, que entram na composição final dos fertilizantes, misturados aos macronutrientes primários (N, P e K) e secundários (Ca, Mg e S). A mistura de micronutrientes obtida não apresentava especificação quanto a sua origem. Entretanto, normalmente as mistura de micronutrientes são compostas de misturas de minérios ou sub-produtos industriais, que podem ser ou não previamente tratados com ácido sulfúrico para melhorar a sua solubilidade. Ambas as amostras foram fornecidas pelo LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário).

Material de referência certificado de fertilizante (SRM® 695 - *Trace elements in multi-nutrient fertilizer*) do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) foi utilizado durante o desenvolvimento dos procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas e avaliação da exatidão dos métodos propostos.

Um organossolo háplico, classificado como argiloso pela análise granulométrica (areia grossa de 1 a 0,5 mm: 70 g kg⁻¹; areia fina de 0,25 a 0,10 mm: 108 g kg⁻¹; silte: 309 g kg⁻¹; argila com dispersante: 512 g kg⁻¹), foi cedido pelo Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ-USP.

Foram usadas sementes de milho doce Topseed® (Agristar, São Paulo, SP, Brasil) para a germinação dos brotos utilizados nos bioensaios para os estudos de translocação e especiação.

Materiais de referência certificado de folhas de pêssego (SRM® 1547) e folhas de tomate (SRM® 1573a) do NIST foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos empregados para a análise dos brotos de milho.

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Parâmetros instrumentais do ICP OES

A escolha dos comprimentos de onda para as determinações multielementares por ICP OES foi realizada com base nas maiores intensidades, na não sobreposição de linhas espectrais de outros elementos e nas regiões com baixa intensidade de sinal de fundo (*background*). Para as determinações de Al, Ca e Mg optou-se por comprimentos de onda menos sensíveis devido à alta concentração desses elementos nas amostras. Os parâmetros instrumentais empregados na determinação de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn por ICP OES (Tabela 2) foram baseados no trabalho prévio desenvolvido pelo GAPE (Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria) (Kelmer, 2016)

A robustez do plasma foi verificada medindo as razões das intensidades das linhas de emissão iônica (280,270 nm) e atômica (285,213 nm) do magnésio de uma solução padrão (1,0 mg L⁻¹ de Mg) (Mermet e Poussel, 1995). Devido às medidas serem realizadas no modo de vista axial, as razões das intensidades de Mg (Mg II/ Mg I) foram multiplicadas por um fator (ϵ) para correção de desvios ópticos. Este fator foi calculado a partir da razão dos valores dos sinais de fundo (S_{fundo}) de ambas as linhas de magnésio ($\epsilon = S_{\text{fundo}}(280.270 \text{ nm}) / S_{\text{fundo}}(285.213 \text{ nm})$) (Stepan *et al.*, 2001). Um valor de razão acima de 8 indica que a análise por ICP OES não deve ser sensível aos efeitos de matriz, ou seja, o método tolera variações das matrizes das amostras sem alterar significativamente os sinais analíticos.

Tabela 2. Parâmetros instrumentais e comprimentos de onda adotados para as determinações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn por ICP OES.

Parâmetros instrumentais			
Potência de radiofrequência	1250 W		
Gás do plasma	12 L min ⁻¹		
Gás auxiliar	0,6 L min ⁻¹		
Gás de nebulização	0,5 L min ⁻¹		
Nebulizador	Burgener Mira Mist®		
Câmara de nebulização	Ciclônica resistente a HF		
Orientação da tocha	Axial		
Comprimentos de onda (nm)			
Al 309,271 nm (I)	Cr 283,563 nm (II)	Mg 285,213 nm (I)	P 177,495 nm (I)
As 189,042 nm (I)	Cu 324,754 nm (I)	Mn 259,373 nm (II)	Pb 220,353 nm (II)
Ca 318,128 nm (II)	Fe 259,940 nm (II)	Ni 341,476 nm (I)	Zn 213.856 nm (I)
Cd 226,502 nm (II)			
(I) Linhas atômicas e (II) Linhas iônicas			

Os limites de detecção (LD) foram calculados de acordo com a Equação 1, a partir dos desvios padrões relativos (RSD) de dez medidas do branco, concentração equivalente à radiação de fundo (BEC, *Background Equivalent Concentration*) (Equação 2) e razão sinal/fundo (SBR, *Signal-to-background Ratio*) (Equação 3), onde $C_{\text{padrão}}$ é a concentração de uma solução de referência, $I_{\text{padrão}}$ é a intensidade de emissão da solução de referência e I_{branco} a intensidade de emissão do branco. Os limites de quantificação (LQ) foram calculados a partir da multiplicação do LD por 10 (Naozuka *et al.*, 2011).

$$LD = \frac{3 \cdot BEC \cdot RSD}{100} \quad \text{Equação 1}$$

$$BEC = \frac{C_{\text{padrão}}}{SBR} \quad \text{Equação 2}$$

$$SBR = \frac{I_{\text{padrão}} - I_{\text{branco}}}{I_{\text{branco}}} \quad \text{Equação 3}$$

As unidades dos limites foram convertidas para frações de massas (mg kg^{-1}), considerando as massas de amostras pesadas inicialmente e os volumes finais das soluções.

3.4.2. Determinação elementar total

3.4.2.1. Digestão assistida por radiação micro-ondas

Cerca de 150 mg do material de referência certificado de fertilizante (SRM® 695) foram pesados em frascos de PTFE (politetrafluoretileno), colocados na câmara de reação única (SRC, *Single Reaction Chamber*) e digeridos no forno de micro-ondas UltraWAVE™, utilizando as combinações de ácidos apresentadas na Tabela 3. Um programa de aquecimento assistido por radiação micro-ondas foi empregado para todas as misturas ácidas testadas, usando 20 minutos de tempo de rampa, 30 min de patamar e temperatura de 250° C.

As combinações de ácidos testadas para a digestão continham apenas ácido nítrico ou ácido nítrico mais ácido fluorídrico, clorídrico ou ortofosfórico (Tabela 3). As misturas contendo ácido fluorídrico podem formar fluoretos insolúveis com alguns

elementos, portanto, a adição de ácido bórico também foi avaliada (Vieira *et al.*, 2005). Normalmente, o ácido bórico é adicionado após a digestão, como nos procedimentos I e J (Tabela 3). Nesse caso, foi necessário utilizar um agitador vortex para auxiliar na solubilização do ácido bórico. Neste trabalho, também foi proposta a adição de ácido bórico junto com os outros reagentes (procedimentos K e L), com o objetivo de diminuir e facilitar a manipulação da amostra. Além disso, ácidos diluídos também foram avaliados nos procedimentos B, D, F, H, J e L (Tabela 3).

Tabela 3. Misturas ácidas testadas para digestão assistida por radiação micro-ondas.

Procedimento	HNO ₃ (mL)	HCl (mL)	H ₃ PO ₄ (mL)	HF (mL)	H ₃ BO ₃ (g)	H ₂ O (mL)
A	4,5	-	-	-	-	-
B	3,0	-	-	-	-	3,0
C	4,5	1,5	-	-	-	-
D	3,0	0,5	-	-	-	2,5
E	4,5	-	1,5	-	-	-
F	3,0	-	0,5	-	-	2,5
G	4,5	-	-	1,5	-	-
H	3,0	-	-	0,5	-	2,5
I	4,5	-	-	1,5	1,0	-
J	3,0	-	-	0,5	0,5	2,5
K	4,5	-	-	1,5	0,5 ^a	-
L	3,0	-	-	0,5	0,2 ^a	2,5

^aH₃BO₃ adicionado junto aos outros reagentes antes da digestão assistida por radiação micro-ondas

A Figura 1 ilustra o funcionamento do forno de micro-ondas UltraWave™ (Milestone), baseado na tecnologia de câmara de reação única (SRC, *Single Reaction Chamber*). Os frascos de digestão contendo amostras e reagentes foram fechados com tampas de PTFE e colocados em um rack de 15 posições, que permaneceu parcialmente imerso em uma solução durante a digestão. Essa solução foi preparada com 130 mL de H_2O , 5 mL de H_2O_2 e 2 mL de H_2SO_4 e adicionados a um vaso de PTFE dentro da SRC. A função desta solução é melhorar a eficiência e a uniformidade do aquecimento e neutralizar eventuais vazamentos de gases promovidos pela digestão. Após o fechamento, a SRC foi pressurizado até 40 bar com nitrogênio. As tampas dos frascos de digestão possuem um orifício, portanto permanecem semi-abertos dentro da SRC, assim, a pressurização evita a ebulição das soluções e intercontaminação das amostras.

Figura 1. Ilustração do funcionamento do forno de micro-ondas UltraWave™ (Milestone), baseado na tecnologia de câmara de reação única (*Single Reaction Chamber* - SRC).

Após a digestão, o sistema foi resfriado até 40°C e a câmara foi despressurizada. As amostras digeridas foram transferidas para tubos de polietileno e diluídas com água deionizada de alta pureza para 15 mL, com exceção dos procedimentos I e J, aos quais foram adicionados H_3BO_3 e precisou ser diluído para

20 mL para promover uma melhor solubilização. Algumas digestões apresentaram resíduos sólidos, assim as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados por ICP OES. As soluções utilizadas para a calibração foram preparadas em meio às misturas ácidas dos procedimentos de digestão, a fim de minimizar efeitos de matriz.

3.4.2.2. Análise de Componentes Principais (PCA)

Ferramentas quimiométricas têm sido utilizadas para a otimização de programas de aquecimento e reagentes em procedimentos de preparo de amostras (Kokot *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 2009; De Jesus *et al.*, 2013; Machado, Pereira-Filho, *et al.*, 2016). Neste trabalho, devido ao grande número de resultados a serem considerados, a Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Components Analysis*) foi aplicada para facilitar a escolha do melhor procedimento de digestão. Para isso, foi utilizado o software STATISTICA versão 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As médias das concentrações obtidas pelos diferentes procedimentos de digestão assistidos por radiação micro-ondas e os valores certificados do SRM® 695 foram empregados como variáveis da PCA, gerando uma matriz de dados composta por 13 linhas (12 procedimentos de digestão + 1 valor certificado para cada elemento de interesse do SRM® 695) e 12 colunas (12 elementos avaliados).

Alguns elementos são macroconstituintes e outros microconstituintes das amostras analisadas. Consequentemente, as variáveis podem estar presentes em diferentes intervalos de concentração. Portanto, a matriz de concentração utilizada foi pré-processada usando um procedimento de auto-escalamento, que atribuí a cada variável a mesma variância, de modo que sejam igualmente importantes,

independentemente da magnitude ou da faixa de concentração. Um gráfico 3D das três primeiras componentes foi utilizado para avaliar quais procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas apresentam resultados mais próximos aos valores do SRM® 695, ou seja, que fornecem resultados mais exatos.

3.4.2.3. Análise do fertilizante e da mistura de micronutrientes

Após a otimização das misturas ácidas, foram escolhidos os procedimentos que possibilitaram determinar simultaneamente e com exatidão as concentrações dos 13 elementos (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn) por ICP OES. Então, estes procedimentos foram aplicados para a análise do fertilizante e da mistura de micronutrientes.

3.4.3. Fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais – BCR (1999)

O protocolo de extrações sequenciais estabelecido pelo BCR (*Bureau Communautaire de Référence*) foi empregado para o fracionamento de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Cr e Pb) e nutrientes (P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn) no fertilizante mineral e na mistura de micronutrientes. As etapas dos procedimentos utilizados para as extrações sequenciais estão descritos a seguir (Rauret *et al.*, 1999):

- (I) *Fração trocável, solúvel em água e ácido*: adicionaram-se 40 mL de ácido acético 0,11 mol L⁻¹ a aproximadamente 1 g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL. Em seguida, a amostra permaneceu sob agitação

em uma mesa agitadora (250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente.

- (II) *Fração reduzível*: foram adicionados 40 mL de cloridrato de hidroxilamina $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,5 – ajustado com HNO_3) ao resíduo sólido da etapa de extração anterior. Novamente, a amostra permaneceu em uma mesa agitadora (250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente.
- (III) *Fração oxidável*: foram adicionados 10 mL de peróxido de hidrogénio ao resíduo, o tubo foi levemente fechado, sem que a tampa fosse rosqueada, e a amostra foi digerida à temperatura ambiente durante 1 hora com agitação ocasional. Em seguida, aqueceu-se a 85°C num banho de água durante 1 hora. Posteriormente, o tubo foi aberto para redução do volume do sobrenadante até cerca de 3 mL. Novamente, foram adicionados 10 mL de peróxido de hidrogénio e a amostra foi aquecida a 85°C num banho de água. Após 1 hora, o tubo foi aberto para a redução do volume até cerca de 1 mL. Finalmente, foram adicionados 50 mL de acetato de amônio 1 mol L^{-1} (pH 2,0 – ajustado com HNO_3) e a amostra permaneceu sob agitação numa mesa agitadora (250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente.
- (IV) *Fração residual*: O protocolo BCR propõe a digestão da amostra com água régia pelo método ISO 11466. No entanto, neste trabalho, os resíduos sólidos foram transferidos para os frascos do forno de micro-ondas UltraWave™ (Milestone) e digeridos por um dos procedimentos utilizados para a determinação elementar total (procedimento L: 3 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H_3BO_3 + 2,5 mL de H_2O).

Entre as etapas de extração, o sólido residual foi lavado com 20 mL de água, agitando à 250 rpm durante 15 min. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Então, o sólido lavado foi reservado para a próxima etapa de extração.

Após cada extração, as misturas foram centrifugadas (3400 rpm) durante 20 min e os sobrenadantes foram transferidos cuidadosamente para outro tubo com uma pipeta. Então, esses extratos foram analisados por ICP OES.

As soluções de referência utilizadas para as calibrações das análises por ICP OES foram preparadas em meio às soluções extratoras para minimizar a possibilidade de interferências. Além disso, o efeito de matriz foi avaliado pelo teste de adição e recuperação em cada etapa do procedimento de extrações sequenciais.

3.4.3.1. Caracterização das amostras e resíduos sólidos por DRX

A análise por difração de raio-X (DRX) foi realizada para identificar estruturas cristalinas presentes nas amostras e resíduos das extrações sequenciais. Assim, foi possível avaliar os compostos que permaneceram insolúveis, após cada etapa do fracionamento. Para realizar a atribuição dos sinais obtidos e identificação dos compostos cristalinos, foi utilizada a base de dados do AMCSD (*The American Mineralogist Crystal Structure Database*) (Downs e Hall-Wallace, 2003).

Os sólidos residuais de cada etapa (I - Trocável, solúvel em água e ácido, II – Reduzível e III - Oxidável) foram coletados e secos em estufa a 60 °C, durante 48 horas, e homogeneizados em almofariz e pistilo. Então, as amostras foram preparadas em uma base de vidro e analisadas por DRX.

3.4.3.2. Caracterização do resíduo sólido do fertilizante por MEV-EDS

O sólido residual da última etapa das extrações sequenciais (sólido da fração residual que seria digerido no forno de micro-ondas) foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (EDS), visando o estudo da composição elementar das partículas presentes no sólido. A amostra sólida foi fixada ao porta-amostras do equipamento por uma fita adesiva de carbono, sem tratamento prévio.

3.4.4. Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade por extrações em fluxo

Para o estudo de mobilidade e bioacessibilidade foi desenvolvido um sistema de extração em fluxo (Figura 2) acoplado ao ICP OES, utilizando medidas no modo transiente. Foram empregados os mesmos parâmetros instrumentais utilizados para as análises em batelada (item 3.4.1). O sistema é composto de uma peça tubular que se encaixa em outra peça afunilada, ambas produzidas em PTFE. Entre essas peças, foi posicionado um papel filtro (Fitec) e sobre ele foi depositada uma massa de amostra. Um volume inicial de 5 mL de extrator foi adicionado sobre a coluna de amostra, para que todo material estivesse em contato com a solução. A bomba peristáltica do ICP OES foi utilizada para manter um fluxo constante de solução extratora gotejando sobre a amostra e aspiração do extrato para a introdução no sistema de nebulização do ICP OES, ambos com uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. Os sinais de As (189,042 nm), Cd (226,502 nm), Cr (283,563 nm) e Pb (220,353 nm) foram monitorados e procederam-se as extrações até que os sinais dos analitos retornassem a linha base.

Medidas das soluções extratoras passando pelo sistema sem amostra também foram realizadas e utilizadas como branco das análises. Todos os perfis de extração tiveram seus sinais subtraídos pela média dos sinais obtidos para o branco.

Figura 2. Sistema de extração em fluxo para avaliar mobilidade de As, Cd, Cr e Pb

3.4.4.1. Calibração do ICP OES para análise quantitativa usando o sistema de extração em fluxo

Para realizar a determinação dos elementos nos procedimentos de extrações em fluxo, foram realizadas calibrações também no modo transiente do ICP OES, introduzindo volumes fixos (2 mL) das soluções de referência preparadas em meio aos extratores utilizados. Estas soluções foram aspiradas diretamente pelo sistema de introdução do ICP OES, sem passar pelo sistema de extração. As curvas de

calibração foram construídas utilizando as áreas dos sinais em função das massas de analito presente nas soluções.

3.4.4.2. Estudo de mobilidade por extrações sequenciais em fluxo

O sistema de extração em fluxo possibilitou a realização de extrações sequenciais. O foco dessas extrações foi avaliar extratores que representem frações de alta mobilidade. Para isso, inicialmente, foram realizadas extrações sequenciais em batelada para fazer a otimização das concentrações dos extratores e também como método comparativo. As etapas de extrações foram as seguintes:

- (I) *Solúvel em água*: adicionaram-se 40 mL de água a aproximadamente 1 g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL. Em seguida, a amostra permaneceu sob agitação em uma mesa agitadora (250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente.
- (II) *Extraída por complexante*: foram adicionados 40 mL de EDTA ao resíduo sólido da etapa de extração anterior. Novamente, a amostra permaneceu em uma mesa agitadora (250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente. Neste caso, a concentração de EDTA foi otimizada variando de 0,01 a 0,20 mol L⁻¹. Então foi escolhida a melhor concentração para dar continuidade às extrações sequenciais
- (III) *Solúvel em ácido fraco*: foram adicionados 40 mL de ácido acético ao resíduo sólido da etapa de extração anterior com a concentração otimizada. Novamente, a amostra permaneceu em uma mesa agitadora

(250 rpm) durante 16 horas à temperatura ambiente. A concentração de ácido acético foi otimizada variando de 0,1 a 2,0 mol L⁻¹.

Entre as etapas de extração, o sólido residual foi lavado com 20 mL de água, agitando à 250 rpm durante 15 min. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Então, o sólido lavado foi reservado para a próxima etapa de extração.

Após cada extração, as misturas foram centrifugadas (3400 rpm) durante 20 min e os sobrenadantes foram transferidos cuidadosamente para outro tubo com uma pipeta, e os extratos foram analisados por ICP OES.

Finalizada a otimização pelo procedimento em batelada, foram utilizadas massas de 500 mg de fertilizante para realizar o procedimento de extrações sequenciais em fluxo, empregando as soluções com as concentrações escolhidas. Ao final de cada etapa, era cessado o fluxo da solução extratora e quando toda a solução presente no reservatório do sistema fosse aspirada, 5 mL do seguinte extrator eram adicionados.

3.4.4.3. Estudo de bioacessibilidade por extração de etapa única em fluxo

Extrações com ácido cítrico foram empregadas para o estudo de bioacessibilidade. Assim como no estudo anterior, a concentração de ácido cítrico foi otimizada em um procedimento de extração em batelada, utilizando 1 g de amostra de fertilizante e 40 mL de solução extratora. As misturas permaneceram sob agitação constante em mesa agitadora (250 rpm) durante 16h. As concentrações de ácido cítrico avaliadas foram de 0,01 a 0,20 mol L⁻¹.

Após a escolha da concentração ideal de ácido cítrico, foi realizada a extração em fluxo. Neste estudo, além da extração em fluxo do fertilizante (500 mg), também foi avaliada uma mistura de fertilizante com solo (500 mg de fertilizante + 5 g de solo).

Também foram obtidos perfis de extrações somente do solo para que esses fossem usados como branco e descontados dos perfis de extração das misturas de solo e fertilizante.

3.4.5. Especificação de As, Cr e Pb por XANES

XANES foi empregada para o estudo de especificação de As, Cr e Pb nas amostras sólidas de fertilizante e mistura de micronutrientes. Pastilhas de 300 mg de amostra foram preparadas e analisadas.

Padrões de Na_2HAsO_4 , NaAsO_2 , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, Cr_2O_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, Cr metálico, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e Pb metálico também foram analisados para que se obtivessem espectros de referência de cada espécie dos elementos. Para as medidas dos padrões, suspensões desses materiais em álcool isopropílico foram preparadas e filtradas em membrana de celulose, deste modo, uma fina camada do material foi depositada sobre a membrana que viria a ser analisada.

Para realizar calibração da energia de borda dos espectros, foram utilizadas medidas de referência de folhas metálicas dos próprios elementos (Cr e Pb), enquanto que para o As foi utilizada folha de ouro por apresentar borda de absorção próxima à deste elemento.

Na Tabela 4, encontram-se os parâmetros utilizados para as análises por XANES, onde estão apresentadas as energias das bordas, as respectivas transições

eletrônicas envolvidas, modo de detecção, incrementos e tempo de aquisição dos sinais por ponto. Os espectros dos padrões foram obtidos a partir da detecção por transmitância, enquanto as amostras, por apresentarem concentrações menores dos elementos, foram medidas com detector de fluorescência. Também, devido a essa baixa concentração, maiores tempos de aquisição de sinal foram empregados neste caso.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais adotados para identificar espécies de As, Cr e Pb no fertilizante mineral e na mistura de micronutrientes por XANES

Elemento	Energia da borda (eV)	Transição eletrônica	Amostra	Modo de detecção	Incrementos (eV)	Tempo de aquisição (s)
As	11867	K	Padrão	Transmitância	0,3	2
			Amostra	Fluorescência	0,3	5
Cr	5989	K	Padrão	Transmitância	0,3	2
			Amostra	Fluorescência	0,3	5
Pb	13038	L ₃	Padrão	Transmitância	0,3	2
			Amostra	Fluorescência	0,3	3

Por ser uma linha otimizada para medidas entre 3,5 e 17 keV, não foi possível realizar o estudo de especiação de Cd, cujas borda K e L apresentam energia em outras faixas.

Para o tratamento dos dados, foi utilizado o software *Athena: XAS Data Processing*, no qual, foram realizadas as calibrações dos espectros de acordo com as referências, normalização das absorbâncias e combinação dos gráficos a fim de obter um gráfico médio das replicatas (padrões n=2 e amostras n=3).

3.4.6. Avaliação da biodisponibilidade de As, Cd, Cr e Pb utilizando broto de milho doce

Para a realização dos ensaios de biodisponibilidade, foram utilizadas sementes de milho doce (*Zea mays L.*), um tipo de grão de grande importância para a agricultura brasileira. Neste estudo, foram avaliadas a translocação de As, Cd, Cr e Pb e também a análise de especiação de As na água utilizada para o crescimento do broto, na raiz, no cotilédono e nas folhas dos brotos de milho.

3.4.6.1. Germinação do milho

As sementes de milho doce (*Zea mays L.*) foram germinadas em algodão umedecido com água ultra pura, dentro de frascos de vidro inseridos em uma câmara de vegetação sem iluminação, por um período de 6 dias. Após a germinação, os brotos de milho foram separados e selecionados de acordo com o tamanho (8 - 12 cm). Os brotos, sem o algodão, foram transferidos para 30 Erlenmeyers de 50 mL (3 brotos para cada frasco) e imersos em diferentes meios, que foram divididos em três grupos: Controle (30 mL de água); Suspensão (30 mL de água + 10 mg de fertilizante); Extrato (30 mL de um extrato preparado na mesma proporção da suspensão, 100 mg de fertilizante para 300 mL de água e agitação por 2h). Os brotos permaneceram por 5 dias na câmara de vegetação, porém, sob iluminação natural.

Na Figura 3, encontram-se imagens do primeiro (Figura 3A) e do sexto (Figura 3B) dia de germinação das sementes de milho, o broto retirado do algodão (Figura 3C) e o Erlenmeyer para onde os brotos foram transferidos (Figura 3D).

Figura 3. Imagens dos frascos de vidro onde as sementes de milho foram germinadas, do primeiro (A) e do sexto dia (B), do broto retirado do algodão (C) e do Erlenmeyer para onde os brotos foram transferidos (D).

As massas de fertilizante usadas no preparo das suspensões e do extrato foram calculadas para que se tivesse uma concentração aproximada de 1 mmol L^{-1} de fosfato. Essa concentração foi baseada na solução nutritiva de Hoagland, utilizada para cultivos hidropônicos (Hoagland e Arnon, 1950). Entretanto, as massas de fertilizante foram estimadas apenas pelo teor total de fósforo determinado na amostra, sem considerar a solubilidade desse elemento.

Após o crescimento dos brotos, eles foram retirados dos frascos e lavados com água deionizada. Então, as raízes, cotilédones e folhas dos brotos (Figura 4) foram separados manualmente e liofilizados por 72 h. As partes dos brotos de cada grupo foram misturadas e submetidas à moagem criogênica. A moagem foi realizada manualmente em almofariz e pistilo com adições de nitrogênio líquido durante o procedimento.

Figura 4. Raiz, cotilédone e folhas dos brotos de milho doce.

3.4.6.2. Avaliação da translocação de As, Cd, Cr e Pb em broto de milho doce

Para a determinação das concentrações de As, Cd, Cr e Pb em cada parte dos brotos de milho, foi realizada a digestão assistida por radiação micro-ondas dessas amostras. Massas de aproximadamente 20 mg de raízes e 50 mg de cotilédones e folhas foram digeridas no forno de micro-ondas ETHOS ONE, utilizando uma mistura ácida diluída de 2,0 mL de HNO_3 + 1,0 mL de H_2O_2 + 7 mL de H_2O . A digestão de amostras orgânicas utilizando ácido diluído tem apresentado ótima eficiência, quando empregada em sistemas fechados com alta temperatura e pressão (Nóbrega *et al.*, 2012; Bizzi *et al.*, 2014). O programa de aquecimento usado encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Programa de aquecimento para a digestão das partes do broto de milho em forno de micro-ondas com cavidade.

Etapas	Temperatura	Rampa (min)	Patamar (min)
1	140° C	5	1
2	180° C	4	5
3	200° C	4	10

Após a digestão, as soluções foram quantitativamente transferidas para tubos de polipropileno, diluídas adequadamente e analisadas por ICP-MS. Os parâmetros instrumentais do ICP-MS e os isótopos empregados para as análises estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros instrumentais do ICP-MS para as determinações de As, Cd, Cr e Pb nos digeridos.

Parâmetros instrumentais				
Potência da radiofrequência (W)	1550			
Gás do plasma (L min ⁻¹)	15			
Gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,1			
Rotação da bomba (rps)	0,1			
Nebulizador	Concêntrico			
Câmara de expansão	Duplo passo (2 °C)			
Distância de amostragem (mm)	10			
Vazão do gás de diluição (L min ⁻¹)	-			
Tempo de aquisição (s)	0,5			
Célula de colisão				
Vazão de He (mL min ⁻¹)	10			
Energia de discriminação (V)	5			
Isótopos				
⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	⁵² Cr	²⁰⁸ Pb	¹⁰³ Rh*

* Padrão Interno

Para avaliar a exatidão do método, foram analisados materiais de referência certificados de folhas de pêssgo (SRM[®] 1547) e folhas de tomate (SRM[®] 1573a). Também foram realizados testes de adição e recuperação nas amostras de raízes, cotilédones e folhas para avaliar possíveis interferências de matriz durante a análise por ICP-MS.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as determinações efetuadas por ICP-MS foram calculados a partir do desvio padrão de 10 medidas do branco da digestão, de acordo com as Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{3 \cdot SD}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot SD}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 5}$$

3.4.6.3. Especificação de As nos extratos e no broto de milho por HPLC-ICP-MS

As análises de especificação de As por HPLC-ICP-MS foram aplicadas aos extratos e suspensões utilizadas para o crescimento dos brotos de milho e às partes dos brotos separadas em raízes, cotilédones e folhas. A separação das espécies foi realizada em uma coluna de troca aniônica (PRP X-100, Hamilton), utilizando alça de amostragem de 100µL e um tampão fosfato (30 mmol L⁻¹ - pH 6,0 ajustado com NH₄OH) como fase móvel, com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A saída da coluna foi conectada no nebulizador do ICP-MS, sendo que entre a coluna e o nebulizador, havia uma confluência por onde era introduzida a solução de Rh, utilizada como padrão interno. Os parâmetros instrumentais do ICP-MS para obtenção dos cromatogramas de As foram os mesmos utilizados no estudo de translocação (item 3.4.6.2), apresentados na Tabela 6. Além do isótopo ⁷⁵As, também foi monitorada a razão m/z 77, para verificar possíveis interferências de ArCl (Abedin *et al.*, 2002). Soluções contendo uma mistura de padrões de arsenato, arsenito e ácido dimetilarsínico (DMA) foram utilizadas para as calibrações da coluna cromatográfica, na faixa de 0,5 a 20 µg L⁻¹. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as determinações efetuadas por HPLC-ICP-MS foram calculados a partir do desvio padrão de 10 medidas do branco, de acordo com as mesmas equações utilizadas

para o cálculo dos LDs e LQs para as análises por ICP-MS (Equações 4 e 5, item 3.4.6.2).

Como descrito anteriormente, os brotos foram divididos em três grupos: controle (30 mL de água); suspensão (30 mL de água + 10 mg de fertilizante); extrato (30 mL de um extrato preparado na mesma proporção da suspensão). Uma alíquota do extrato de fertilizante, preparado para ser adicionado aos brotos de milho (extrato inicial), foi reservada para análise. Após o período de 5 dias, os extratos e suspensões remanescentes nos Erlenmeyers utilizados para o crescimento dos brotos de milho, foram coletados e centrifugados. Estas soluções foram analisadas por HPLC-ICP-MS para a determinação das espécies de As. Além disso, foi determinada a concentração total de As por ICP-MS. Deste modo, foi possível realizar o balanço de massas com a somatória das espécies identificadas.

Para a especiação do As nos brotos de milho, foram realizadas extrações com uma mistura de água/metanol (1:1 v/v), procedimento comumente empregado para o preparo de amostras vegetais (Nearing *et al.*, 2014). Foram utilizadas massas de cerca de 50 mg de raiz e 200 mg das demais partes do broto, com adição de 2,5 mL da mistura água/metanol às raízes e 5 mL aos cotilédones e folhas. Então, as amostras foram sonicadas em um banho de ultrassom por 10 min e centrifugadas. Esse procedimento foi repetido mais 3 vezes até juntar 10 mL e 20 mL de extrato para as raízes e demais partes do broto, respectivamente. Em seguida, os extratos foram submetidos à secagem a vácuo, a 35 °C, por 1 hora, para a eliminação do metanol (Figura 5). Então, os extratos foram avolumados com água deionizada para 10 mL (raízes) e 20 mL (cotilédone e folhas) e analisados por HPLC-ICP-MS.

Figura 5. Sistema para secagem a vácuo.

Para verificar se havia conversão de espécies de As durante o procedimento de extração com a mistura de água/metanol, foi realizada a adição de arsenato e arsenito ao branco de extração e às amostras de raízes, cotilédones e folhas do controle. As amostras adicionadas passaram por todo o procedimento de extração e foram analisadas por HPLC-ICP-MS

Os extratos das partes dos brotos de milho também foram analisados por ICP-MS para avaliar a eficiência de extração do procedimento.

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho analítico do ICP OES

O termo robustez corresponde à tolerância da resposta do plasma às mudanças nas condições de atomização e excitação. Quando o plasma opera em uma condição próxima do equilíbrio termodinâmico, a razão Mg II / Mg I é superior a 8 (Mermet e Poussel, 1995). As condições instrumentais apresentadas na Tabela 2 proporcionaram a razão Mg II / Mg I de 6,3. O valor do fator (ϵ) calculado a partir da razão dos valores dos sinais de fundo nos dois comprimentos de onda para corrigir o desvio óptico foi estabelecido em 1,7. Nessas condições, a razão de Mg II / Mg I multiplicada pelo fator ϵ foi igual a 10,7, representando o bom desempenho do ICP OES.

4.2. Determinação elementar total

Após as análises das soluções resultantes das várias misturas ácidas por ICP OES (Tabela 3), uma complexa matriz de dados foi obtida, constituindo-se de 12 misturas ácidas e resultados de 13 elementos. Assim, a PCA foi empregada para facilitar a interpretação dos dados e a escolha dos melhores procedimentos. As concentrações de fósforo não foram utilizadas como variáveis da PCA devido aos procedimentos que utilizaram H_3PO_4 . Um gráfico 3D das três primeiras componentes principais, explicando uma variância cumulativa de 90,5%, é mostrado na Figura 6. A PCA permitiu a identificação de um grupo de procedimentos que forneceu resultados mais semelhantes aos valores certificados (Tabela 3, procedimentos D, F, H, I, J, K e

L). Em todos esses procedimentos foram usadas misturas contendo HNO_3 e um ácido complexante, enquanto os procedimentos A e B (Tabela 3) que usaram apenas HNO_3 apresentaram os piores resultados, provavelmente devido à ausência de um ácido complexante. Por outro lado, o uso de ácido complexante não garantiu bons resultados, como nos procedimentos C, E e G (Tabela 3).

Figura 6. Gráfico 3D das três primeiras componentes da PCA.

Normalmente, o H_3BO_3 é adicionado após a digestão, a fim de obter a dissolução de fluoretos de elementos da matriz e para que haja redução de fluoretos livres em solução. No entanto, no gráfico da PCA (Figura 6), pode-se observar que ambos os métodos de adição de H_3BO_3 , após (Tabela 3, procedimentos I e J) ou antes (Tabela 3, procedimentos K e L) da digestão assistida por radiação micro-

ondas, apresentaram similaridades. Quando o H_3BO_3 foi adicionado após a digestão, foram necessários alguns minutos para obter a dissolução dos fluoretos. Por outro lado, sua adição nos frascos do forno de micro-ondas antes de iniciar a digestão facilitou o procedimento, reduzindo o manuseio da amostra.

Quando o H_3BO_3 é adicionado ao HF ocorre a formação de HBF_4 de acordo com as reações (Vieira *et al.*, 2005; Krug *et al.*, 2016):

Mesmo que o HF inicial tenha reagido com o H_3BO_3 , a digestão foi eficiente, pois ocorre o deslocamento do equilíbrio (2ª reação), conforme o HF é consumido durante a digestão da amostra.

Embora os resultados obtidos pelos procedimentos H (3,0 mL HNO_3 + 0,5 mL HF + 2,5 mL H_2O) e K (4,5 mL HNO_3 + 1,5 mL HF + 0,5 g H_3BO_3 + 2,5 mL H_2O) apresentarem similaridades com os valores certificados, eles não forneceram resultados satisfatórios para alguns elementos. Por exemplo, baixas recuperações para alumínio em relação aos valores certificados foram obtidas pelos procedimentos H (55%) e K (50%). A ausência (procedimento H) ou quantidade insuficiente (procedimento K) de H_3BO_3 nestes procedimentos podem ter provocado a precipitação de fluoreto de alumínio, resultando em baixas recuperações.

Portanto, os procedimentos D (3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H_2O), F (3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de H_3PO_4 + 2,5 mL de H_2O) e L (3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H_3BO_3 + 2,5 mL de H_2O) foram escolhidos para serem aplicados às amostras. É importante ressaltar que todas estas misturas continham

ácidos diluídos e que a adição de ácido bórico antes da digestão foi preferida. A dissolução da matriz do SRM[®] 695 não foi completa em nenhum procedimento de digestão. Observaram-se menos resíduos sólidos para o procedimento L (Tabela 3), em que apenas algumas partículas sólidas permaneceram no tubo, enquanto que em nos outros procedimentos D e F (Tabela 3), que não utilizavam HF + H₃BO₃, havia uma massa significativa de resíduo. Embora uma massa maior de resíduo sólido tenha permanecido nos procedimentos D e F, os resultados não foram comprometidos, demonstrando uma eficiente extração/lixiviação dos analitos durante a digestão assistida por radiação micro-ondas.

4.2.1. Características analíticas dos métodos

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para cada um dos procedimentos escolhidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Limites de detecção e quantificação para os procedimentos de digestão escolhidos

	Limites de detecção (mg kg ⁻¹)			Limites de quantificação (mg kg ⁻¹)		
	D	F	L	D	F	L
Al	100	20	4	1000	200	40
As	0,1	0,6	0,2	1	6	2
Ca	1	0,9	4	10	9	40
Cd	0,03	0,03	0,02	0,3	0,3	0,2
Cr	0,1	0,09	0,2	1	0,9	2
Cu	0,1	0,1	0,1	1	1	1
Fe	0,09	0,2	0,8	0,9	2	8
Mg	0,04	0,04	0,04	0,4	0,4	0,4
Mn	0,02	0,05	0,2	0,2	0,5	2
Ni	2	10	5	20	100	50
P	0,5	-	0,08	5	-	0,8
Pb	0,6	2	0,3	6	20	3
Zn	0,1	0,08	0,1	1	0,8	1

Procedimento D: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H₂O

Procedimento F: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de H₃PO₄ + 2,5 mL de H₂O

Procedimento L: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H₃BO₃ + 2,5 mL de H₂O

O SRM[®] 695 foi digerido utilizando os procedimentos D, F e L (Tabela 3) e analisados por ICP OES. As concentrações obtidas para a análise do SRM[®] 695 são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da determinação elementar total no material de referência certificado SRM[®] 695 usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), n=3.

Elementos (Unidades)	Valores encontrados			Valores certificados	Erros relativos (%) ^a		
	D	F	L		D	F	L
Al^b (% m m⁻¹)	0,537±0,005	0,593±0,009	0,58±0,02	0,61±0,03	-12	-3	-5
As (mg kg⁻¹)	173±2	196±4	185±5	200±5	-14	-2	-8
Ca (%m m⁻¹)	2,1±0,1	2,43±0,05	2,29±0,06	2,26±0,04	-7	+8	+1
Cd (mg kg⁻¹)	17,7±0,4	18,1±0,2	16,3±0,4	16,9±0,2	+5	+7	-4
Cr (mg kg⁻¹)	248±2	267±6	244±3	244±6	+2	+9	0
Cu (% m m⁻¹)	0,107±0,002	0,115±0,002	0,111±0,004	0,1225±0,0009	-13	-6	-9
Fe (% m m⁻¹)	3,73±0,05	4,30±0,1	3,4±0,5	3,99±0,08	-7	+8	-15
Mg (% m m⁻¹)	1,76±0,02	1,92±0,03	1,83±0,52	1,79±0,05	-2	+7	+2
Mn (% m m⁻¹)	0,321±0,005	0,330±0,009	0,321±0,004	0,305±0,005	+5	+8	+5
Ni (mg kg⁻¹)	122±2	134±5	131±3	135±2	-10	-1	-3
P^b (% m m⁻¹)	7,2±0,2	-	7,2±0,2	7,2±0,1	0	-	0
Pb (mg kg⁻¹)	269±7	286±7	277±8	273±17	-1	+5	+1
Zn (% m m⁻¹)	0,332±0,008	0,340±0,008	0,31±0,01	0,325±0,005	+2	+5	-1

^aErros relativos = (Valor encontrado – Valor certificado/ Valor certificado)x100

^bValores não certificados

Procedimento D: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H₂O

Procedimento F: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de H₃PO₄ + 2,5 mL de H₂O

Procedimento L: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H₃BO₃ + 2,5 mL de H₂O

Os erros relativos para os três procedimentos variam de -15% a +9% em relação aos valores certificados do SRM[®] 695. Portanto, estes métodos demonstram ser viáveis para a determinação elementar com exatidão em amostras fertilizantes.

4.2.2. Análise das amostras de fertilizante

Os resultados das análises do fertilizante minerais e da mistura de micronutrientes são apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Uma análise de regressão linear entre os procedimentos Dx_F, Dx_L e Fx_L para ambas as amostras foi realizada para comparar as concentrações obtidas para cada procedimento. Devido à grande variedade de concentrações dos elementos, os dados foram normalizados usando Log_{10} . As equações e coeficientes de determinação (R^2) das regressões lineares são mostrados na Tabela 11. Todos os valores demonstram uma boa correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes procedimentos. Não foram observadas variações significativas quanto aos resultados dos fertilizantes. No entanto, os coeficientes de determinação para a mistura de micronutrientes (Tabela 11) foram ligeiramente inferiores, devido a algumas concentrações discrepantes. Os resultados de Cr e Fe para os procedimentos F e Al para o procedimento L foram inferiores às concentrações obtidas pelos outros procedimentos.

Estes resultados discrepantes podem ser justificados pela diferença da composição da matriz da mistura de micronutrientes em comparação com o SRM[®] 695 usado na otimização das misturas ácidas para o preparo das amostras. As concentrações de Al, Cr e Fe são cerca de 7-10 vezes mais altas na mistura de micronutrientes do que no SRM[®] 695 e na amostra de fertilizante mineral. As menores concentrações obtidas para Cr e Fe no procedimento F, em comparação com outros procedimentos, podem estar relacionadas à formação de fosfatos insolúveis. O mesmo efeito foi observado para Al no procedimento L, provavelmente devido à insuficiência de H_3BO_3 para evitar a precipitação com fluoretos.

Tabela 9. Resultados das determinações elementares totais no fertilizante mineral usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), n=3.

Elementos (Unidades)	Valores encontrados		
	D	F	L
Al (% m m⁻¹)	0,429 ± 0,009	0,406 ± 0,007	0,46 ± 0,02
As (mg kg⁻¹)	69 ± 6	61 ± 2	61 ± 2
Ca (%m m⁻¹)	8,72 ± 0,07	8,3 ± 0,1	8,7 ± 0,2
Cd (mg kg⁻¹)	10,8 ± 0,1	10,0 ± 0,2	10,0 ± 0,3
Cr (mg kg⁻¹)	320 ± 2	301 ± 22	337 ± 19
Cu (% m m⁻¹)	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,03
Fe (% m m⁻¹)	2,06 ± 0,03	1,98 ± 0,02	2,09 ± 0,06
Mg (% m m⁻¹)	1,20 ± 0,02	1,12 ± 0,02	1,16 ± 0,03
Mn (% m m⁻¹)	0,63 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,66 ± 0,03
Ni (mg kg⁻¹)	128 ± 4	101 ± 4	104 ± 3
P (% m m⁻¹)	8,06 ± 0,03	-	8,4 ± 0,3
Pb (mg kg⁻¹)	622 ± 17	573 ± 15	598 ± 26
Zn (% m m⁻¹)	1,43 ± 0,01	1,34 ± 0,03	1,37 ± 0,03

Procedimento D: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H₂O

Procedimento F: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de H₃PO₄ + 2,5 mL de H₂O

Procedimento L: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H₃BO₃ + 2,5 mL de H₂O

Tabela 10. Resultados das determinações elementares totais na mistura de micronutrientes usando os três procedimentos de digestão escolhidos (D, F e L), n=3.

Elementos (Unidades)	Valores encontrados		
	D	F	L
Al (% m m⁻¹)	2,64 ± 0,04	2,33 ± 0,03	1,67 ± 0,05
As (mg kg⁻¹)	98 ± 17	80 ± 7	79 ± 5
Ca (%m m⁻¹)	4,50 ± 0,03	4,6 ± 0,2	4,75 ± 0,07
Cd (mg kg⁻¹)	89 ± 2	78 ± 4	87 ± 1
Cr (mg kg⁻¹)	3122 ± 51	1904 ± 306	3144 ± 74
Cu (% m m⁻¹)	1,49 ± 0,06	1,56 ± 0,08	1,61 ± 0,03
Fe (% m m⁻¹)	14,04 ± 0,04	7,4 ± 1,6	14,5 ± 0,2
Mg (% m m⁻¹)	1,50 ± 0,01	1,47 ± 0,06	1,41 ± 0,03
Mn (% m m⁻¹)	5,68 ± 0,03	5,4 ± 0,2	5,54 ± 0,21
Ni (mg kg⁻¹)	520 ± 21	519 ± 25	503 ± 6
P (% m m⁻¹)	0,160 ± 0,004	-	0,176 ± 0,009
Pb (mg kg⁻¹)	6771 ± 199	6408 ± 272	7065 ± 26
Zn (% m m⁻¹)	12,1 ± 0,1	11,7 ± 0,4	11,95 ± 0,05

Procedimento D: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H₂O

Procedimento F: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de H₃PO₄ + 2,5 mL de H₂O

Procedimento L: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H₃BO₃ + 2,5 mL de H₂O

Tabela 11. Regressão linear entre os resultados obtidos pelos procedimentos DxL, DxL e FxL para o fertilizante e a mistura de micronutrientes, após realizar normalização usando Log_{10} nas concentrações de cada elemento.

Amostra	Regressão linear		Coeficiente de determinação (R^2)
	entre os procedimentos	Equação	
Fertilizante	DxF	$y = 0,925 x^{0,995}$	1,000
	DxL	$y = 0,990 x^{0,990}$	0,999
	FxL	$y = 1,063 x^{0,996}$	1,000
Mistura de micronutrientes	DxF	$y = 0,937 x^{0,979}$	0,995
	DxL	$y = 0,955 x^{1,002}$	0,998
	FxL	$y = 0,997 x^{1,027}$	0,993

Procedimento D: 3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H_2O

Procedimento F: 3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de H_3PO_4 + 2,5 mL de H_2O

Procedimento L: 3,0 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H_3BO_3 + 2,5 mL de H_2O

Quando esses três procedimentos foram aplicados ao fertilizante mineral, não foi observada uma boa correlação entre os resultados obtidos por cada um. Portanto, os três procedimentos são adequados para esse tipo de amostra. No entanto, a análise da mistura de micronutrientes pelos procedimentos F e L mostraram alguns resultados discrepantes. Assim, estes procedimentos apresentam algumas restrições para fertilizantes minerais e matérias-primas que contenham altas concentrações desses elementos.

4.3. Fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais – BCR (1999)

Nos gráficos das Figuras 7 e 8 são apresentados os resultados do fracionamento dos elementos pelo protocolo de extrações sequenciais do BCR para o fertilizante e a mistura de micronutrientes, respectivamente.

O procedimento L (Tabela 3) foi selecionado para a digestão das frações residuais das extrações sequenciais, portanto, os resultados das determinações elementares totais realizadas por este procedimento (Tabelas 8 e 9) foram utilizados como base para os cálculos das porcentagens extraídas em cada etapa e para os balanços de massas.

Figura 7. Fracionamento dos elementos pelo procedimento de extrações sequenciais do BCR para a amostra de fertilizante.

Figura 8. Fracionamento dos elementos pelo procedimento de extrações sequenciais do BCR para a mistura de micronutrientes.

Ao avaliar as concentrações dos elementos nas amostras e a proporção da mistura de micronutrientes contida na formulação do fertilizante, é possível estimar o quanto desses elementos é proveniente ou não da mistura de micronutrientes, e assim melhorar a interpretação dos resultados das extrações sequenciais. A Equação 6 demonstra como esse cálculo foi realizado. $C_{\text{fertilizante}}$ e $C_{\text{mistura de micronutrientes}}$ são as concentrações totais dos elementos determinadas na amostra de fertilizante e na mistura de micronutrientes, respectivamente. O valor de 0,10 refere-se à porcentagem da mistura de micronutrientes contida na formulação do fertilizante (10%).

$$\% \text{ proveniente da mistura de micronutrientes} = \frac{C_{\text{mistura de micronutrientes}} \cdot 0,10}{C_{\text{fertilizante}}} \cdot 100\% \quad \text{Equação 6}$$

Por exemplo, as concentrações de As no fertilizante e na mistura de micronutrientes são 61 mg kg^{-1} e 79 mg kg^{-1} , respectivamente. Deste modo, ao

considerar que o fertilizante contém em sua formulação 10% da mistura de micronutrientes, 7,9 mg kg⁻¹ de As é proveniente deste material. Esta concentração corresponde a 13% da concentração total presente no fertilizante (61 mg kg⁻¹). Então, a diferença de 53,1 mg kg⁻¹ (87%) seria proveniente de outras fontes, como rochas fosfáticas. A Tabela 12 mostra as percentagens dos elementos que podem ser ou não provenientes da mistura de micronutrientes.

Tabela 12. Concentração total dos elementos determinados pelo procedimento L e percentagens dos elementos que podem ser ou não provenientes da mistura de micronutrientes na formulação do fertilizante.

		Fertilizante	Mistura de micronutrientes	Proveniente da mistura de micronutrientes	Proveniente de outras fontes
Contaminantes	As (mg kg ⁻¹)	61 ± 2	79 ± 5	13%	87%
	Cd (mg kg ⁻¹)	10,0 ± 0,3	87 ± 1	87%	13%
	Cr (mg kg ⁻¹)	337 ± 19	3144 ± 74	93%	7%
	Pb (mg kg ⁻¹)	598 ± 26	7065 ± 26	118%	-
Nutrientes	P (% m m ⁻¹)	8,4 ± 0,3	0,176 ± 0,009	-	100%
	Ca (% m m ⁻¹)	8,7 ± 0,2	4,75 ± 0,07	5%	95%
	Mg (% m m ⁻¹)	1,16 ± 0,03	1,41 ± 0,03	12%	88%
	Cu (% m m ⁻¹)	0,23 ± 0,03	1,61 ± 0,03	70%	30%
	Fe (% m m ⁻¹)	2,09 ± 0,06	14,5 ± 0,2	69%	31%
	Mn (% m m ⁻¹)	0,66 ± 0,03	5,54 ± 0,21	84%	16%
	Zn (% m m ⁻¹)	1,37 ± 0,03	11,95 ± 0,05	87%	13%

Procedimento L: 3,0 mL de HNO₃ + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H₃BO₃ + 2,5 mL de H₂O

Testes de adição e recuperação foram realizados para cada etapa do procedimento de extrações sequenciais para avaliar efeitos de interferência de matriz durante as análises por ICP OES. Foram obtidas boas recuperações para a maioria dos elementos adicionados aos extratos, variando de 80% a 120%.

Os balanços de massas calculados com base nas concentrações totais dos elementos variaram de 66% a 104% para o fertilizante e de 70% a 117% para a mistura de micronutrientes. Apesar de alguns balanços de massas estarem baixos, como no caso do ferro que apresentou a menor recuperação (66%), essas recuperações podem ser consideradas aceitáveis, devido ao procedimento possuir muitas etapas sujeitas a erros, principalmente por perdas. Deste modo, é possível realizar uma avaliação semi-quantitativa do fracionamento desses elementos e uma possível correlação com a bioacessibilidade e mobilidade dos mesmos.

Os resultados das extrações sequenciais para a amostra de fertilizante (Figura 7) mostraram que a maior concentração de As foi extraída na primeira etapa (47%), portanto, está fracamente ligado à matriz e, conseqüentemente, pode estar mais bioacessível e móvel. Por outro lado, durante a extração na mistura de micronutrientes, o As estava presente nas frações reduzíveis e residuais (Figura 8). Como já mencionado, 87% de As não é proveniente da mistura de micronutrientes, portanto, possivelmente é derivado de fontes como as rochas fosfáticas, por exemplo (Tabela 12).

As apatitas, principalmente as fluorapatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), são os minerais predominantes nas rochas fosfáticas, que são utilizadas na produção de fertilizantes fosfatados. Na produção de fertilizante, esses minerais são tratados com H_2SO_4 para aumentar a solubilidade do fosfato, um nutriente primário (Perez-Lopez *et al.*, 2007; Pérez-López *et al.*, 2010). Nesses minerais pode ocorrer, naturalmente, a

substituição de PO_4^{3-} por AsO_4^{3-} , devido às suas similaridades estruturais e eletrônicas (Gianfagna *et al.*, 2014). Essas informações justificam a semelhança entre os perfis de fracionamento de As e P (Figura 7) e a provável alta bioacessibilidade dos mesmos. Por isso, pode ser demonstrado que o As pode ser proveniente das rochas fosfáticas.

A Tabela 12 também mostra que a mistura de micronutrientes é a principal fonte de contaminação de Cd, Cr e Pb na formulação final do fertilizante. Os perfis de fracionamento de Cd e Cr observados para a mistura de micronutrientes foram semelhantes aos perfis obtidos para o fertilizante. Enquanto o Cd foi extraído na primeira etapa e apresenta uma maior bioacessibilidade e mobilidade, nenhuma fração significativa de Cr foi extraída em qualquer etapa, permanecendo quase que completamente na fração residual.

O Pb da mistura de micronutrientes foi predominantemente extraído durante a segunda etapa (45%) e apenas 19% foi extraída na etapa mais bioacessível e móvel (Fração 1). Entretanto, embora essa fração pareça ser baixa, ela equivale a 1290 mg kg^{-1} , portanto, é um risco significativo de contaminação para o meio ambiente.

Como o Pb parece ser totalmente proveniente da mistura de micronutrientes (Tabela 12), eram esperados perfis de fracionamento similares em ambas as amostras (Figuras 7 e 8), no entanto, a primeira etapa, que representa a fração de maior bioacessibilidade e mobilidade, diminuiu de 19% para 1% no fertilizante. A alta concentração de P ($8,4\% \text{ m m}^{-1}$) no fertilizante poderia ter diminuído a mobilidade do Pb, devido à precipitação de $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio de ácido acético.

Além do fracionamento de contaminantes, alguns nutrientes também foram investigados para avaliar bioacessibilidade dos mesmos no fertilizante. P, Ca e Mg apresentaram uma grande fração extraída do fertilizante na primeira etapa, 58%,

42% e 22%, respectivamente. Como esses elementos são nutrientes primários (P) e secundários (Ca e Mg) era esperado que eles apresentassem boa bioacessibilidade para fornecer nutrientes às plantas de forma eficaz.

A mistura de micronutrientes é uma matéria-prima adicionada ao fertilizante para melhorar a concentração de micronutrientes. Assim, elementos, tais como Cu, Fe, Mn e Zn, são majoritariamente provenientes desta mistura (Tabela 12).

O Fe permaneceu quase totalmente na fração residual em ambas as amostras (Figuras 7 e 8), portanto, esta mistura foi uma fonte de Fe de baixa bioacessibilidade. O Mn também não apresentou alta bioacessibilidade. Apenas 16% de Mn foi extraído da mistura de micronutrientes na primeira etapa. No entanto, a mesma fração obtida para o fertilizante aumentou para 26%. Não é possível confirmar se este elemento interagiu com a matriz do fertilizante, melhorando sua solubilidade, ou se esse aumento da fração de Mn foi fornecido de outras matérias primas presentes na formulação do fertilizante, pois este elemento não é 100% proveniente da mistura. Por outro lado, Cu e Zn apresentaram boa bioacessibilidade, 55% e 70% para o fertilizante e 55% e 52% para a mistura de micronutrientes, respectivamente.

4.3.1. Caracterização das amostras e resíduos sólidos por DRX

Os resultados das análises por DRX do fertilizante e da mistura de micronutrientes estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Para melhor visualização dos resultados, os difratogramas foram divididos em fragmentos, apresentando apenas os sinais de maior intensidade de cada estrutura cristalina identificada nas amostras.

Na amostra de fertilizante foram identificados os compostos de monohidrogeno fosfato de potássio e amônio (KNH_4HPO_3), anidrita (CaSO_4), quartzo (SiO_2), dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) e magnetita (Fe_3O_4). Na mistura de micronutrientes, apenas quartzo e magnetita foram encontrados. Pode se considerar que poucas estruturas cristalinas foram identificadas nessas amostras, possivelmente, grande parte de suas composições tenham características amorfas.

Figura 9. Fragmentos dos difratogramas do fertilizante e resíduos sólidos das extrações sequenciais nas regiões dos sinais atribuídos a monohidrogeno fosfato de potássio e amônio (KNH_4HPO_3), anidrita (CaSO_4), quartzo (SiO_2), dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) e magnetita (Fe_3O_4).

Figura 10. Fragmentos dos difratogramas da mistura de micronutrientes e resíduos sólidos das extrações sequenciais nas regiões dos sinais atribuídos a quartzo (SiO_2) e magnetita (Fe_3O_4).

Os resíduos sólidos coletados para a análise por DRX foram pesados para estimar a massa de amostra solubilizada durante cada etapa de extração. Durante o fracionamento na amostra de fertilizante, 80% da massa inicial havia sido solubilizada na primeira etapa de extração, 92% na segunda etapa e 94% na terceira. Para a mistura de micronutrientes, a porcentagem solubilizada em cada uma das etapas foi de 42%, 56% e 58%, respectivamente. Devido à solubilização parcial da amostra, os compostos cristalinos insolúveis permanecem mais concentrados nos resíduos sólidos. Assim, pode-se observar um aumento gradual dos sinais DRX para cada etapa de extração (Figuras 9 e 10).

Estruturas de quartzo e magnetita foram identificadas em ambas as amostras e mantiveram-se presentes nos resíduos sólidos de todas as etapas. De acordo com o procedimento BCR, era esperado que os óxidos de ferro fossem solubilizados na

etapa reduzível, entretanto, uma parte ou todo esse composto manteve-se insolúvel durante todo o processo. Essas informações concordam com os resultados obtidos para a análise dos extratos por ICP OES (Figuras 7 e 8).

A primeira etapa do fracionamento visa extrair cátions trocáveis e solúveis em água e ácido, portanto carbonatos deveriam ser solubilizados. No entanto, a dolomita foi completamente solubilizada apenas na etapa reduzível. Possivelmente a concentração de ácido acético não foi suficiente e parte do carbonato somente seria solubilizada na etapa reduzível, onde o extrator encontra-se em um meio ácido mais concentrado.

A anidrita também foi identificada na amostra de fertilizante e, assim como a dolomita, somente foi solubilizada por completo na segunda etapa de extração, o que explica a fração de 29% de Ca extraída nessa etapa (Figura 7).

Monohidrogeno fosfato de potássio e amônio, fonte de nutrientes primários (NPK), foi solubilizado logo na primeira etapa. Portanto, apresentam boa bioacessibilidade.

4.3.2. Caracterização do resíduo sólido de fertilizante por MEV-EDS

A imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sólido residual após a extração da fração oxidável está apresentada na Figura 11. Nesta imagem podem ser observadas partículas de formas bem definidas. Os dois pontos destacados indicam as regiões onde foram realizadas as medidas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Os espectros destas regiões estão apresentados na Figura 12.

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sólido residual do fertilizante com os números destacando as regiões para obtenção do EDS.

Figura 12. Espectros de EDS dos pontos destacados na imagem obtida por MEV (Figura 11).

A análise por MEV-EDS possibilitou a avaliação da composição elementar diretamente nas partículas do sólido residual. Al e Si foram identificados nas

mesmas partículas que Fe, Mg, Mn e Zn. Esses elementos poderiam estar incorporados às estruturas cristalinas e, portanto de difícil dissolução, como o quartzo ou minerais de aluminossilicatos, assim, dificilmente seriam lixiviadas e solubilizadas durante as extrações. Deve ser destacado que os sinais de C e O podem não fazer parte da composição da amostra, pois a mesma foi fixada ao porta-amostras por uma fita adesiva de carbono.

Esta informação explica o que foi observado no estudo empregando as análises por DRX (item 4.3.1) que demonstrou que algumas espécies poderiam não ser solubilizadas nas etapas correspondentes. Como no caso da magnetita que permaneceu insolúvel em todas as etapas (Figuras 9 e 10), ocasionando a baixa bioacessibilidade de Fe (Figuras 7 e 8).

4.4. Avaliação da mobilidade e bioacessibilidade por extrações em fluxo

4.4.1. Calibração do ICP OES para análise quantitativa usando o sistema de extração em fluxo

O sistema de extração em fluxo apresentado na Figura 2 (item 3.4.4.) foi utilizado para a avaliação da mobilidade e bioacessibilidade dos elementos na amostra de fertilizante.

Para realizar a quantificação dos elementos foram introduzidos volumes fixos de 2 mL das soluções de referência. Deste modo, o sinal monitorado tinha maior intensidade assim que se iniciava a introdução da solução, formando um platô enquanto a solução era aspirada. Com o término da introdução do volume de solução estabelecido o sinal retornava à linha base, conforme mostrado na Figura

13A, onde se encontra representado o perfil do sinal monitorado para a calibração de Cd em meio de EDTA.

Na aquisição de sinais no modo transiente, mais especificamente na aplicação da extração em fluxo proposta, se tem um gradiente de concentração durante o tempo de análise, portanto, não seria possível realizar a calibração apenas pela intensidade do sinal em função da concentração, como é realizado nas medidas convencionais do ICP OES durante análises em batelada, mas sim utilizando a área dos picos.

Figura 13. Perfil do sinal monitorado no modo transiente para a calibração de Cd em meio de 0,10 mol L⁻¹ de EDTA, com introdução de 2 mL das soluções de referência e vazão de 1,5 mL min (A) e curva de calibração das áreas integradas dos sinais em função das massas de analito presente nas soluções (B).

Portanto, foi proposta a calibração utilizando a área integrada dos sinais obtidos em função das massas de analito. O gráfico da curva de calibração para o Cd em meio de EDTA encontra-se na Figura13. A calibração de todos os outros elementos, nos diferentes meios, apresentaram comportamentos semelhantes e boa linearidade.

4.4.2. Estudo de mobilidade por extrações sequenciais em fluxo

Neste estudo foram realizadas extrações sequenciais visando extratores que representam frações de alta mobilidade de elementos presentes no fertilizante, representando a chuva, presença de matéria orgânica complexante no solo e variações no pH (1ª solúvel em água; 2ª extraída por complexante (EDTA); 3ª solúvel em ácido fraco (ácido acético)). Inicialmente, foram realizadas extrações sequenciais em batelada para fazer a otimização das concentrações dos extratores e também como método comparativo.

A primeira etapa estudada representa a fração de maior mobilidade, onde foi utilizada água como extrator. Nesta fração, foram detectadas concentrações de $12,7 \pm 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de As e $1,29 \pm 0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd que representam 21% e 13% da concentração total presente na amostra de fertilizante, respectivamente. Os demais elementos não foram detectados nessa fração (LQ: As = 1 mg kg^{-1} ; Cd = $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$; Cr = $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$; Pb = 3 mg kg^{-1}).

A extração com EDTA foi empregada para simular ação complexante de substâncias presentes nos solos. Após a etapa de extração com água, foi realizada a otimização da concentração de EDTA. Os resultados da otimização estão apresentados na Figura 14, onde se tem as concentrações e as porcentagens dos elementos extraídos. As porcentagens são baseadas nos resultados das determinações elementares totais (Tabela 9) utilizando a mistura ácida de $\text{HNO}_3 + \text{HF} + \text{H}_3\text{BO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (procedimento L).

Para concentrações acima de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA não foram observados aumentos significativos nas extrações dos analitos, portanto essa concentração de

EDTA foi escolhida para dar continuidade às extrações sequencias e ser aplicada nas extrações em fluxo.

O ácido acético, assim como no procedimento de extrações sequenciais do BCR, representa uma fração de maior mobilidade, onde são extraídos elementos trocáveis, solúveis em água e ácido. Entretanto, neste caso, após as extrações com água e EDTA, o ácido acético foi utilizado para verificar se ainda havia alguma fração móvel remanescente. Então, foram realizadas as extrações com diferentes concentrações de ácido acético. Os resultados das otimizações dessa etapa, contendo as concentrações e as porcentagens dos elementos extraídos com ácido acético, estão apresentadas na Figura 15. As frações extraídas com ácido acético foram baixas para todos os elementos, menores que 2,5%. Portanto, as extrações com água e EDTA foram efetivas na extração das frações de alta mobilidade. A concentração de ácido acético escolhida para aplicação no sistema em fluxo foi de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 14. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de EDTA.

Figura 15. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de ácido acético.

Nas Figuras 16, 17, 18 e 19, estão apresentados os perfis das extrações sequenciais em fluxo de As, Cd, Cr e Pb, respectivamente. A extração em fluxo permitiu o estudo de mobilidade dos elementos, simulando a constante lixiviação que podem ocorrer no solo fertilizado, com as infiltrações de águas de chuva ou irrigação das plantações. Portanto, o mecanismo de extração realizado em batelada pode não representar o que ocorre efetivamente no solo, pois o sistema pode entrar em equilíbrio após um determinado período, enquanto que as soluções do solo são constantemente renovadas.

Figura 16. Perfis dos sinais de As monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido acético ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 17. Perfis dos sinais de Cd monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido acético ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 18. Perfis dos sinais de Cr monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min⁻¹.

Figura 19. Perfis dos sinais de Pb monitorados no modo transiente para as extrações sequenciais em fluxo, utilizando água, EDTA (0,10 mol L⁻¹) e ácido acético (2,0 mol L⁻¹) como extratores, massa de 500 mg de fertilizante mineral e vazão de 1,5 mL min⁻¹.

As áreas integradas dos sinais obtidos durante as extrações em fluxo foram usadas para a quantificação das frações extraídas. Na Figura 20 estão apresentados os resultados das extrações realizadas em batelada (Figura 20A) e em fluxo (Figura 20B). No procedimento em batelada, apenas o As e Cd foram extraídos com água, entretanto, quando o procedimento foi realizado em um sistema em fluxo, houve um aumento dessas frações. Além disso, também foi obtida uma fração de 3% de Pb sendo extraída nessa mesma etapa. Durante as extrações em fluxo, ocorreu um aumento da fração de As extraída com EDTA em relação ao procedimento em batelada (de 18% para 34%). Enquanto os demais elementos apresentaram frações extraídas com EDTA semelhantes em ambos os procedimentos.

Figura 20. Porcentagens dos elementos extraídos do fertilizante mineral pelos procedimentos de extrações sequenciais em batelada (A) e em fluxo (B), utilizando água, EDTA ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido acético ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) como extratores.

4.4.3. Estudo de bioacessibilidade por extração de etapa única em fluxo

O ácido cítrico, assim como outros ácidos de baixo peso molecular (ácido acético, láctico, oxálico, málico, fumárico, etc.) são substâncias que fazem parte da composição dos exsudados secretados pelas raízes das plantas (Jones, 1998).

Extrações com ácido cítrico são utilizadas para estudos de bioacessibilidade, simulando o microambiente de contato entre as raízes das plantas e solo (rizosfera), inclusive, são empregadas nos procedimentos de fiscalização pelos laboratórios do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para avaliar os teores de micronutrientes solúveis (B, Fe, Zn, Co, Mo e Ni) seguindo a instrução normativa nº 46, de 22 de Novembro de 2016 (Brasil, 2016).

Previamente ao estudo de extração em fluxo, a concentração de ácido cítrico foi otimizada em um procedimento de extração em batelada. As concentrações e as porcentagens dos elementos extraídos com ácido cítrico estão apresentadas na Figura 21. As porcentagens de As e Cd extraídas foram praticamente constantes a partir da concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cítrico, enquanto a extração de Cr e Pb ainda apresentaram um pequeno acréscimo. Portanto a concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para a realização das extrações em fluxo.

Figura 21. Concentrações e porcentagens de As, Cd, Cr e Pb extraídos em diferentes concentrações de ácido cítrico.

Na Figura 22 estão apresentados os perfis de As, Cd, Cr e Pb das extrações em fluxo com ácido cítrico em fertilizante e em uma mistura de solo com fertilizante. Além das informações quantitativas das frações, o monitoramento dos sinais transientes possibilita a avaliação da cinética de extração dos elementos. Elementos que apresentam sinais que retornam rapidamente para a linha base demonstram que são facilmente extraídos, portanto tendem a ser mais bioacessíveis e com maior mobilidade.

Figura 22. Perfis dos sinais de As, Cd, Cr e Pb monitorados por ICP OES no modo transiente para as extrações com ácido cítrico ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$) em fertilizante ($0,5 \text{ g}$) e mistura de solo (5 g) com fertilizante ($0,5 \text{ mg}$), com vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

É possível observar que o perfil de extração do Cr apresenta um sinal mais alargado, que demora a retornar a linha base, demonstrando uma forte interação desse elemento com a matriz da amostra. Portanto, mesmo que a extração com ácido cítrico represente uma fração bioacessível, pode-se concluir que o Cr presente nessa fração, não é tão bioacessível quanto os outros elementos. Neste experimento, foi utilizando um organossolo háplico, que contem alto teor matéria orgânica, que pode justificar a alta interação com os elementos estudados.

No perfil de extração de Pb na amostra de fertilizante, nota-se uma inflexão do sinal. Em um primeiro instante se tem uma cinética de extração mais rápida, enquanto, a partir dos 50 s, o sinal tem um decaimento mais lento. Este comportamento poderia estar relacionado à existência de espécies de Pb com bioacessibilidade diferente ou deslocamentos de equilíbrios decorrente da solubilização de componentes da matriz.

Como já foi mencionado anteriormente no estudo de fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais do BCR (item 4.3), a alta concentração de P (8,4% m m⁻¹) no fertilizante poderia diminuir a mobilidade do Pb, devido à precipitação de Pb₃(PO₄)₂ em meio de ácido fraco. Entretanto, ao observar o perfil de extração de P (Figura 23), pode-se observar que o início da queda do sinal coincide com a inflexão observada no perfil de extração do Pb. Portanto, a diminuição da concentração de P no meio tende a deslocar o equilíbrio de precipitação, solubilizando o Pb₃(PO₄)₂ formado.

Figura 23. Perfil dos sinais de Pb e P monitorados por ICP OES no modo transiente para a extração com ácido cítrico ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$) em fertilizante ($0,5 \text{ g}$) com vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Deve ser destacado, que esta é uma proposta inicial para o procedimento de extração em fluxo visando à avaliação de mobilidade e bioacessibilidade. Portanto, devem ser realizados estudos posteriores para avaliar as interações dos elementos presentes no fertilizante com o solo, avaliando diferentes tipos de solo e procedimentos de incubação, uma vez que as extrações demonstradas neste trabalho foram realizadas logo após o preparo da mistura do solo com o fertilizante.

4.5. Especificação de As, Cr e Pb por XANES

As análises por XANES possibilitaram o estudo de especificação de As, Cr e Pb nas amostras sólidas de fertilizante e mistura de micronutrientes.

Na Figura 24 estão apresentados os espectros de XANES da borda K de As do fertilizante e da mistura de micronutrientes, bem como dos padrões de Na_2HAsO_4 (As(V)) e NaAsO_2 (As(III)). Nota-se que ambas as amostras possuem espectros

similares ao do padrão de Na_2HAsO_4 , portanto, é possível supor que As(V) é a espécie predominante nas amostras.

Figura 24. Espectros de XANES da borda K de As do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões.

Nas Figuras 25 e 26 estão apresentados os espectros de XANES da borda K do Cr e da borda L_3 do Pb, respectivamente. Diferente do As, que normalmente encontra-se ligado a átomos de oxigênio, Cr e Pb apresentam maiores variações nos espectros, devido a maior diversidade de átomos vizinhos. Uma variedade de padrões de Cr e Pb foi analisada com objetivo de identificar as espécies desses

elementos. Entretanto, nenhum espectro de padrão coincidiu com os espectros das amostras, então, como alternativa, foi realizada a comparação dos espectros obtidos para o fertilizante e a mistura de micronutrientes com espectros encontrados em trabalhos da literatura.

Figura 25. Espectros de XANES da borda K de Cr do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões (A) e figura adaptada dos espectros de Cr obtida na literatura (García-Guaderrama *et al.*, 2015).

Hematita (Fe_2O_3) e eskolaite (Cr_2O_3) são minerais isoestruturais, e podem formar a solução sólida de $\text{Fe}_{2-x}\text{Cr}_x\text{O}_3$, nessas estruturas Fe^{3+} e Cr^{3+} apresentam raios iônicos próximos, 0,0645 nm e 0,0615 nm, respectivamente, portanto, uma ampla gama de composição pode ser obtida (Grygar *et al.*, 2003; García-Guaderrama *et al.*, 2015). García-Guaderrama e colaboradores realizaram a síntese desse composto utilizando diferentes proporções de Fe e Cr. Os espectros de XANES da borda K de Cr desses materiais estão apresentados na Figura 25B. Nota-se que estes espectros coincidem com os espectros de Cr obtidos para o fertilizante e a mistura de micronutrientes (Figura 25A), indicando que essa seria a espécie majoritária do elemento presente nas amostras. Durante os estudos de fracionamento pelo protocolo de extrações sequenciais do BCR (item 4.3) foi demonstrado que o Fe apresentava baixa bioacessibilidade e mobilidade devido a sua associação com estruturas de difícil dissolução. A identificação dessas espécies de FeCrO_3 sugerem que o mesmo deve ter acontecido com o Cr (García-Guaderrama *et al.*, 2015).

No espectro do padrão de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Figura 25A), pode ser observada a pré-borda característica de espécies de Cr(VI), estado de oxidação em que este elemento apresenta maior toxicidade. Portanto, é importante destacar que não foram encontrados indícios de que haja espécies de Cr(VI) no fertilizante e na mistura de micronutrientes.

Na Figura 26B estão apresentados os espectros de XANES da borda L_3 de Pb obtidos na literatura, em um trabalho de especiação em cinzas volantes (*fly ash*) de incineradoras municipais (Takaoka *et al.*, 2005), onde foram identificadas as espécies de PbCl_2 (*fly ash* 1, 2 e 3) e PbO (*fly ash* 4) nas amostras. Os espectros obtidos para o fertilizante e a mistura de micronutrientes (Figura 26A), coincidem

com as amostras 1, 2 e 3 de cinzas e com o padrão de PbCl_2 (Figura 26B). Portanto, essa seria a espécie de Pb majoritária presente nas amostras.

Figura 26. Espectros de XANES da borda L₃ de Pb do fertilizante, mistura de micronutrientes e padrões (A) e figura adaptada dos espectros de Pb obtida na literatura (Takaoka *et al.*, 2005).

4.6. Avaliação da biodisponibilidade de As, Cd, Cr e Pb utilizando broto de milho doce

4.6.1. Germinação do milho

Na Figura 27, estão apresentadas as imagens dos brotos de milho cultivados nos três meios, controle, suspensão e extrato, no momento da transferência dos brotos para os Erlenmeyers (Figura 27A) e após 5 dias (Figura 27B). Neste período, não foi observada diferença no desenvolvimento dos brotos entre os três grupos.

Figura 27. Imagens dos brotos de milhos cultivados nos três meios, controle, suspensão e extrato, no momento da transferência dos brotos para os Erlenmeyers (A) e após o período de 5 dias (B).

4.6.2. Avaliação da translocação de As, Cd, Cr e Pb em broto de milho doce

Para avaliar a exatidão do método, materiais de referência certificados de folhas de pêssago (SRM® 1547) e folhas de tomate (SRM® 1573a) foram digeridos e analisados por ICP-MS, realizando os mesmos procedimentos empregados para as amostras. Na Tabela 13, encontram-se as concentrações totais de As, Cd, Cr e Pb determinadas nesses materiais. Os erros relativos para os dois materiais de referência certificados variam de -28% a -8%. Não foi possível determinar a concentração de Cd para o SRM® 1547, pois o mesmo encontrava-se menor que o limite de quantificação. Considerando a pequena massa de material utilizado (20 a 50 mg) o uso de ácido diluído e peróxido de hidrogênio para a digestão das amostras (2,0 mL de HNO₃ + 1,0 mL de H₂O₂ + 7 mL de H₂O) favoreceu a detectabilidade do método, pois o uso de maiores concentrações de ácido requeria maiores diluições das amostras para serem introduzidas ao ICP-MS.

Tabela 13. Resultados da determinação elementar total nos materiais de referência certificados SRM® 1547 e 1573a, n=3.

SRM® 1547 (<i>Peach leaves</i>)				SRM® 1573a (<i>Tomato leaves</i>)		
	Valor certificado	Valor Obtido	Erro relativo ^a	Valor certificado	Valor Obtido	Erro relativo ^a
As (mg kg ⁻¹)	NC	0,17±0,02	-	0,112±0,004	0,099±0,006	-12%
Cd (mg kg ⁻¹)	0,0261±0,0022	< LQ	-	1,52±0,04	1,40±0,03	-8%
Cr (mg kg ⁻¹)	NC	0,54±0,01	-	1,99±0,06	1,44±0,05	-28%
Pb (mg kg ⁻¹)	0,869±0,018	0,70±0,03	-19%	NC	0,44±0,04	-

^a Erros relativos = (Valor encontrado - Valor certificado/ Valor certificado)x100

NC: não consta valor de referência

LQs =As: 0,07 mg kg⁻¹; Cd: 0,01 mg kg⁻¹; Cr: 0,08 mg kg⁻¹;Pb: 0,02 mg kg⁻¹

Também foram realizados testes de adição e recuperação nas amostras de raízes, cotilédones e folhas para avaliar possíveis interferências de matriz durante a análise por ICP-MS. As recuperações de As, Cd, Cr e Pb nas amostras foram de 94% a 118%, os quais foram considerados valores satisfatórios.

Nas Figuras 28, 29, 30 e 31 estão apresentados os gráficos das concentrações de As, Cd, Cr e Pb determinadas nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho cultivados em meio às suspensões e extratos de fertilizante. Um grupo de controle também foi cultivado sob as mesmas condições, porém utilizando água deionizada no lugar da suspensão ou extrato, para avaliar se haviam contaminações dos elementos estudados que não fossem provenientes do fertilizante. Os quatro elementos apresentaram concentrações menores que o LQ em todas as partes dos brotos de milho do grupo controle.

As concentrações de As, Cd e Pb determinadas nas folhas dos brotos de milho variaram de 0,06 a 0,30 mg kg⁻¹. É possível observar que o Cr foi o único elemento que não foi translocado para as partes aéreas do broto (Figura 30). Nos estudos anteriores (item 4.4.2), foi demonstrado que o Cr não era extraído em água, o mesmo meio utilizado para o preparo das suspensões e extratos, o que explica o fato de não ser observada absorção desse elemento pelos brotos de milho cultivado no extrato. Entretanto, Cr foi determinado nas raízes em meio às suspensões. No item 4.4.3, foi observado que o Cr era extraído com ácido cítrico, uma das substâncias presentes nos exsudatos secretados pelas raízes das plantas. Portanto, possivelmente, exsudatos (e.g. ácido cítrico) liberados pelos brotos de milho favoreceram a extração e sorção do elemento presente no sólido da suspensão.

No estudo apresentado no item 4.4.2, a concentração de Pb extraída em água também encontrava-se abaixo do LQ. Entretanto, foram determinadas concentrações de Pb nos brotos de milho cultivados nos extratos (Figura 31). No estudo anterior, a análise dos extratos foi realizada por ICP OES, enquanto os brotos foram analisados por ICP-MS que possibilitou a detecção de concentrações menores. Além disso, possivelmente, o Pb foi absorvido e ficou mais concentrado nos brotos.

Também, nota-se a tendência de que nas suspensões, os elementos foram mais absorvidos pelos brotos, demonstrando que as substâncias liberadas pelas plantas favoreceram a extração e absorção dos elementos.

Figura 28. Concentração de As nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,07 mg kg⁻¹.

Figura 29. Concentração de Cd nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,01 mg kg⁻¹.

Figura 30. Concentração de Cr nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,08 mg kg⁻¹.

Figura 31. Concentração de Pb nas raízes, cotilédones e folhas dos brotos de milho dos grupos controle, suspensão e extrato. LQ = 0,02 mg kg⁻¹.

4.6.3. Especificação de As nos extratos e partes do broto por HPLC-ICP-MS

Na Figura 32 estão apresentados os cromatogramas dos padrões utilizados nas calibrações das espécies de As. Observa-se que o método possibilitou a separação das espécies inorgânicas, arsenito (As (III)) e arsenato (As (V)), bem como a espécie orgânica ácido dimetilarsínico (DMA).

Figura 32. Cromatogramas dos padrões utilizados nas calibrações das espécies de As, arsenito (As (III)), arsenato (As (V)) e ácido dimetilarsínico (DMA).

As análises de especificação de As por HPLC-ICP-MS foram aplicadas aos extratos e suspensões utilizados para o crescimento dos brotos de milho. Na Figura 33A, está apresentado o cromatograma do extrato inicial preparado para ser adicionado aos brotos de milho. Foi identificada apenas a espécie de As (V) neste extrato. Esta informação é coerente com o que foi observado no estudo de especificação por XANES (item 4.5), onde foi verificado que esta seria a espécie de As predominante no fertilizante.

Nas Figuras 33B e 33C, encontram-se os cromatogramas dos extratos e suspensões coletados após o período de crescimento dos brotos de milho (5 dias). Observa-se que ocorreu a redução parcial do As (V) para As (III) em ambos os casos. Na Tabela 14 estão apresentadas as concentrações das espécies de As determinadas.

Além disso, foram realizadas as determinações das concentrações totais de As nos extratos e suspensões por ICP-MS. Deste modo, foi possível comparar a concentração total com a soma das espécies de As determinadas por HPLC-ICP-MS. As porcentagens das recuperações obtidas a partir da soma das espécies também se encontram na Tabela 14.

Figura 33. Cromatograma do extrato inicial preparado para ser adicionado aos brotos de milho (A) e cromatogramas dos extratos (B) e suspensões (C) coletados após o período de crescimento dos brotos (5 dias).

Tabela 14. Concentrações das espécies de As no extrato inicial preparado para ser adicionado aos brotos de milho e concentrações nos extratos e suspensões coletados após o período de crescimento dos brotos (5 dias).

	Extrato inicial	Extrato após crescimento do broto	Suspensão após crescimento do broto
As (III) $\mu\text{g L}^{-1}$		3,51	3,75
As (V) $\mu\text{g L}^{-1}$	9,98	4,10	8,37
Soma $\mu\text{g L}^{-1}$	9,98	7,61	12,12
As total $\mu\text{g L}^{-1}$	11,6 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,1	10,8 $\pm$ 0,2
Recuperação*	86%	105%	112%

* Porcentagens das recuperações obtidas a partir da soma das concentrações das espécies determinadas por HPLC-ICP-MS em relação às concentrações totais de As determinadas por ICP-MS.

Para a especiação do As nos brotos de milho, foram realizadas extrações com uma mistura de água/metanol (1:1). As concentrações de As nestes extratos foram determinadas por ICP-MS a fim de avaliar a eficiência de extração do procedimento. Na Tabela 15 estão apresentadas as concentrações totais de As determinadas a partir da digestão assistida por radiação micro-ondas (item 4.6.2), as concentrações no extrato de água/metanol e as porcentagens de As extraídas em relação às concentrações totais em cada parte dos brotos de milho cultivados em meio aos extratos e suspensões de fertilizante.

As porcentagens de As extraídas das raízes, cotilédones e folhas variaram de 12% a 60%. Extrações com mistura de água/metanol são comumente empregadas para o preparo de amostras em estudos de especiação de As e normalmente, a eficiência de extração para amostras vegetais não passam de 50%. Procedimentos

mais agressivos podem favorecer a eficiência de extração, entretanto, podem causar a conversão de espécies (Nearing *et al.*, 2014).

Tabela 15. Concentrações totais de As determinadas a partir da digestão assistida por radiação micro-ondas, concentrações no extrato de água/metanol (1:1) e as porcentagens de As extraídas em relação às concentrações totais.

	As total (mg kg⁻¹)	As extraído em água/metanol (mg kg⁻¹)	Porcentagem de As extraído em água/metanol
Raízes (suspensão)	3,7±0,8	1,82±0,08	50%
Raízes (extrato)	3,1±0,7	1,83±0,06	60%
Cotilédone (suspensão)	0,16±0,03	0,052±0,004	33%
Cotilédone (extrato)	0,1388±0,0003	0,017±0,001	12%
Folhas (suspensão)	0,124±0,005	0,0263±0,0009	21%
Folhas (extrato)	0,111±0,008	0,054±0,001	49%

Na Figura 34, estão apresentados os cromatogramas obtidos para cada parte dos brotos de milho cultivados em meio aos extratos e suspensões de fertilizante. As concentrações das espécies de As obtidas a partir desses cromatogramas se encontram na Tabela 16.

As duas espécies, As (III) e As (V), foram determinadas nas raízes, porém a concentração de As (III) foi predominante na amostra, sendo cerca de 10 vezes maior que a outra espécie. Nas demais partes dos brotos, apenas As (III) foi identificado.

O mecanismo de absorção de arsenato em plantas é por meio de transportadores de fosfatos. Em meios com altas concentrações de fosfatos, esses transportadores apresentam maior afinidade pelos fosfatos, diminuindo a

biodisponibilidade do arsenato. O arsenito, por sua vez, costuma apresentar uma maior biodisponibilidade e é absorvido pela mesma via que o Si, pois o ácido silícico e o ácido arsenioso apresentam pKas próximos e estruturas tetraédrica de tamanhos similares (Zhao *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014).

O As inicialmente se encontrava na forma de As (V) no fertilizante e no extrato proveniente do mesmo. Portanto, parte do arsenato pode ter sido absorvida, mesmo que em pequenas concentrações, devido ao alto teor de fosfato do meio, o que explica a presença de As (V) presente nas raízes dos brotos. Além disso, depois de absorvido, o arsenato pode ser reduzido rapidamente nas células vegetais (Zhao *et al.*, 2009).

Como foi observado, ocorreu a redução do As (V) para As (III) nos extratos e suspensões coletados após o período de crescimento dos brotos de milho, indicando que substâncias liberadas pelas raízes podem ter convertido as espécies de As (V) do meio para As (III) que é mais absorvida por não sofrer competição pelo fosfato (Zhao *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014). Adicionalmente, o processo de respiração da planta nos períodos de ausência de luz consome o oxigênio dissolvido na água e consequentemente aumenta o potencial de redução do meio (Thomson e Greenway, 1991). Deste modo, a redução do oxigênio dissolvido no meio poderia facilitar a redução do As (III) a As (V) pelos exsudatos. Cabe acrescentar que não foi feita a determinação do oxigênio dissolvido nas soluções iniciais ou após o crescimento dos brotos de milho.

A metilação do As pode ocorrer em estudos de longa duração formando ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA) (Zhao *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014). Neste estudo não foram identificadas espécies orgânicas de As, possivelmente, devido ao curto período de crescimento dos brotos de milho.

Figura 34. Cromatogramas obtidos para cada parte dos brotos de milho cultivados em meio aos extratos e suspensões de fertilizante

Na Tabela 16, também estão apresentadas as porcentagens de recuperações obtidas a partir da soma das concentrações das espécies determinadas em relação às concentrações totais de As determinadas por ICP-MS nos extratos de água/metanol. Boas recuperações foram obtidas (108% - 117%), com exceção dos cotilédones nos extratos e folhas nas suspensões, pois as concentrações encontravam-se abaixo do LQ.

Tabela 16. Concentrações das espécies de As nas partes dos brotos de milho cultivados em meio dos extratos e suspensões. Porcentagens das recuperações obtidas a partir da soma das concentrações das espécies determinadas por HPLC-ICP-MS em relação às concentrações totais de As determinadas por ICP-MS.

	As (III) (mg kg ⁻¹)	As (V) (mg kg ⁻¹)	Soma (mg kg ⁻¹)	As extraído em água/metanol (mg kg ⁻¹)	Recuperação
Raízes (suspensão)	1,92	0,17	2,10	1,82±0,08	115%
Raízes (extrato)	1,83	0,15	1,98	1,83±0,06	108%
Cotilédone (suspensão)	0,060	<LQ	0,060	0,052±0,004	114%
Cotilédone (extrato)	<LQ	<LQ	-	0,017±0,001	-
Folhas (suspensão)	<LQ	<LQ	-	0,0263±0,0009	-
Folhas (extrato)	0,064	<LQ	0,064	0,054±0,001	117%

LQ = 0,11 mg kg⁻¹ para raízes e 0,055 mg kg⁻¹ para cotilédones e folhas

Para verificar se havia conversão de espécies de As durante o procedimento de extração com a mistura de água/metanol, foi realizada a adição de arsenato e arsenito ao branco de extração e às amostras de raízes, cotilédones e folhas do controle. As recuperações de As (III) foram de 85% a 94% e de As (V) de 89% a 106%, indicando não ter ocorrido conversão entre essas espécies.

5. CONCLUSÕES

A digestão assistida por radiação micro-ondas mostrou bom desempenho para a determinação simultânea de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Zn em fertilizantes minerais e na matéria prima (mistura de micronutrientes) por ICP OES. Os resultados indicaram que três misturas ácidas apresentaram boa exatidão em relação aos valores certificados do SRM[®] 695. Além disso, a proposta de adicionar H_3BO_3 antes da digestão foi empregada com sucesso para a dissolução do fertilizante para a determinação elementar. Assim, o procedimento L (Tabela 3, 3 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HF + 0,2 g de H_3BO_3 + 2,5 mL de H_2O) foi escolhido porque a adição de H_3BO_3 antes da digestão torna mais fácil, mais rápido e reduz o manuseio da amostra em comparação aos procedimentos em que o H_3BO_3 é adicionado após a digestão. Alternativamente, podem também ser empregados os procedimentos D (Tabela 3, 3 mL de HNO_3 + 0,5 mL de HCl + 2,5 mL de H_2O) e F (Tabela 3, 3 mL de HNO_3 + 0,5 mL de H_3PO_4 + 2,5 mL de H_2O), que também proporcionaram baixos erros relativos durante a análise do SRM[®] 695, mostrando que os elementos podem ser extraídos e determinados, mesmo sem dissolução total.

Quando esses três procedimentos foram aplicados ao fertilizante mineral, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos por cada um. No entanto, os procedimentos F e L aplicados para análise da mistura de micronutrientes mostraram resultados discrepantes de Al, Cr e Fe. Assim, estes procedimentos não são recomendados para fertilizantes minerais e matérias-primas que contenham altas concentrações desses elementos. Por outro lado, o procedimento D é apropriado para o preparo de amostras de fertilizantes minerais e matérias-primas para a determinação de vários elementos pelo ICP OES.

A partir das extrações sequenciais pelo protocolo do BCR (1999), foram obtidas informações importantes para entender a composição do fertilizante mineral e suas matérias-primas. Foi possível estimar o desempenho desses materiais em relação à bioacessibilidade e mobilidade de contaminantes e nutrientes, podendo desse modo, evitar danos ao meio ambiente, garantir a produção segura de alimentos e garantir que o fertilizante forneça nutrientes para suprir as necessidades das culturas. Além disso, os resultados do fracionamento dos elementos pelo protocolo do BCR e as análises por DRX e MEV-EDS mostraram que não só as formas químicas afetam a mobilidade e bioacessibilidade dos elementos, como também a maneira pela qual eles são distribuídos em partículas da amostra. Os elementos podem ser cobertos por estruturas cristalinas, que inibem a sua lixiviação e, conseqüentemente, os tornam menos móveis e bioacessíveis.

A extração em fluxo proposta para a avaliação da mobilidade e bioacessibilidade dos elementos em fertilizantes demonstrou-se mais eficiente que os procedimentos em batelada, pois o sistema em fluxo simula a constante lixiviação que ocorre no solo, com a infiltração das águas de chuva ou irrigação das plantações. Portanto, o mecanismo de extração realizado em batelada pode não representar o que ocorre efetivamente no solo, pois o sistema pode entrar em equilíbrio após um determinado período, enquanto que as soluções do solo são constantemente renovadas. Além disso, a análise no modo transiente permitiu avaliar a cinética de extração dos elementos. No experimento em que eram utilizadas misturas de fertilizante com solo, foram observados sinais mais alargados, que demoravam a retornar a linha base, demonstrando a interação dos elementos com a matriz do solo.

O estudo de especiação de As, Cr e Pb por XANES possibilitou a identificação das espécies As(V), $\text{Fe}_{2-x}\text{Cr}_x\text{O}_3$ e PbCl_2 no fertilizante e na mistura de micronutrientes. Essas informações foram coerentes e confirmaram as interpretações dos resultados dos procedimentos de extrações. Devido à possibilidade de realizar as análises de especiação diretamente nas amostras sólidas, é possível garantir a preservação das espécies. Deste modo, a identificação do estado de oxidação do As por XANES auxiliou nas interpretações dos estudos de translocação e especiação desse elemento nos brotos de milho.

Os ensaios de biodisponibilidade realizados com brotos de milho cultivados em meio de extratos e suspensões de fertilizante, avaliando a translocação de As, Cd, Cr e Pb, demonstraram que exsudados liberados pelos brotos de milho favoreceram a extração e absorção dos elementos presentes no sólido da suspensão. Além disso, a partir das análises de especiação de As nos extratos, suspensões e partes dos brotos de milho por HPLC-ICP-MS, foi possível explicar o mecanismo de absorção de As pela planta. Os exsudatos promoveram a redução do As(V) para As(III), uma espécie que foi mais facilmente absorvida e translocada pela planta.

De forma geral, neste trabalho foram utilizadas diversas técnicas e procedimentos analíticos que proporcionaram informações importantes para entender os fatores que afetam a mobilidade, bioacessibilidade e biodisponibilidade dos elementos (espécies químicas, estruturas cristalinas, cinética de extração, distribuição nas partículas e ação dos exsudatos) presentes nos fertilizantes minerais.

REFERÊNCIAS

ABEDIN, M. J.; CRESSER, M. S.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J.; COTTER-HOWELLS, J. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 5, p. 962-968, 2002.

ABEDIN, M. J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 1120-1128, 2002.

AKKAJIT, P.; DESUTTER, T.; TONGCUMPOU, C. Short-term effects of sugarcane waste products from ethanol production plant as soil amendments on sugarcane growth and metal stabilization. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 5, p. 947-954, 2013.

ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A.; FERNANDES, R.; CUNHA-QUEDA, A.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 505-513, 2007.

ANDA. Estatística: Principais indicadores do setor de fertilizantes. 2017. Disponível em: < <http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por> >. Acesso em: 23 de Outubro de 2017.

AYDIN, I.; AYDIN, F.; SAYDUT, A.; BAKIRDERE, E. G.; HAMAMCI, C. Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazidag, SE Anatolia, Turkey). **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 247-251, 2010.

AZZI, V.; KAZPARD, V.; LARTIGES, B.; KOBEISSI, A.; KANSO, A.; EL SAMRANI, A. G. Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 45, n. 1, 2017.

BACON, J. R.; DAVIDSON, C. M. Is there a future for sequential chemical extraction? **Analyst**, v. 133, n. 1, p. 25-46, 2008.

BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; OLIVEIRA, J. S.; SCHMIDT, L.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica chimica acta**, v. 837, p. 16-22, 2014.

BORGES, A. R.; BECKER, E. M.; DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 92, p. 1-8, 2014.

BORGES, A. R.; BECKER, E. M.; LEQUEUX, C.; VALE, M. G. R.; FERREIRA, S. L. C.; WELZ, B. Method development for the determination of cadmium in fertilizer samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 7, p. 529-535, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº 27 de 05 de junho de 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 22 de novembro de 2016

BUNKER, G. **Introduction to XAFS: a practical guide to X-ray absorption fine structure spectroscopy**. Cambridge University Press, 2010.

CONAB. acompanhamento da safra brasileira de grãos. 2017. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2> >. Acesso em: 16 de Setembro de 2017.

DE JESUS, R. M.; SILVA, L. O. B.; CASTRO, J. T.; DE AZEVEDO NETO, A. D.; DE JESUS, R. M.; FERREIRA, S. L. C. Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 106, p. 293-297, 2013.

DOWNS, R. T.; HALL-WALLACE, M. The American Mineralogist crystal structure database. **American Mineralogist**, v. 88, n. 1, p. 247-250, 2003.

EL-SHEIKH, A. H.; AL-DEGS, Y. S.; SWEILEH, J. A.; SAID, A. J. Separation and flame atomic absorption spectrometric determination of total chromium and chromium (III) in phosphate rock used for production of fertilizer. **Talanta**, v. 116, p. 482-487, 2013.

FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. Newnes, 2014.

GARCÍA-GUADERRAMA, M.; MONTERO-CABRERA, M. E.; MORÁN, E.; ALARIO-FRANCO, M. A.; FUENTES-COBAS, L. E.; MACÍAS-RÍOS, E.; ESPARZA-PONCE, H. E.; FUENTES-MONTERO, M. E. Long-and Short-Range Structure of Ferrimagnetic Iron–Chromium Maghemites. **Inorganic chemistry**, v. 54, n. 23, p. 11200-11208, 2015.

GIANFAGNA, A.; MAZZIOTTI-TAGLIANI, S.; CROCE, A.; ALLEGRINA, M.; RINAUDO, C. As-RICH APATITE FROM MT. CALVARIO: CHARACTERIZATION BY MICRO-RAMAN SPECTROSCOPY. **The Canadian Mineralogist**, v. 52, p. 799-808, 2014.

GLEYZES, C.; TELLIER, S.; ASTRUC, M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 451-467, 2002.

GRÄFE, M.; DONNER, E.; COLLINS, R. N.; LOMBI, E. Speciation of metal (loid) s in environmental samples by X-ray absorption spectroscopy: A critical review. **Analytica chimica acta**, v. 822, p. 1-22, 2014.

GRYGAR, T.; BEZDICKA, P.; DEDECEK, J.; PETROVSKY, E.; SCHNEEWEISS, O. Fe_2O_3 Cr_2O_3 system revised. **CERAMICS SILIKATY**, v. 47, n. 1, p. 32-39, 2003.

GUPTA, D.; CHATTERJEE, S.; DATTA, S.; VEER, V.; WALTHER, C. Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. **Chemosphere**, v. 108, p. 134-144, 2014.

HILLEL, D. **Introduction to environmental soil physics**. Academic press, 2007.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HOODA, P. **Trace elements in soils**. John Wiley & Sons, 2010.

HUSGAFVEL, R.; KARJALAINEN, E.; LINKOSALMI, L.; DAHL, O. Recycling industrial residue streams into a potential new symbiosis product—The case of soil amelioration granules. **Journal of Cleaner Production**, v. 135, p. 90-96, 2016.

JAMALI, M.; KAZI, T.; ARAIN, M.; AFRIDI, H.; MEMON, A.; JALBANI, N.; SHAH, A. Use of sewage sludge after liming as fertilizer for maize growth. **Pedosphere**, v. 18, n. 2, p. 203-213, 2008.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25-44, 1998.

JUHASZ, A. L.; SCHECKEL, K. G.; BETTS, A. R.; SMITH, E. Predictive Capabilities of in Vitro Assays for Estimating Pb Relative Bioavailability in Phosphate Amended Soils. **Environmental science & technology**, v. 50, n. 23, p. 13086-13094, 2016.

KANE, P. F.; HALL, W. L.; BOLES, R. Determination of arsenic, cadmium, cobalt, chromium, lead, molybdenum, nickel, and selenium in fertilizers by microwave digestion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry detection: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 6, p. 1447-1466, 2006.

KELMER, G. A. R. Propostas de métodos para determinações de As, Cd, Cr (III), Cr (VI), Hg, Ni, Pb e Se em fertilizantes minerais por AAS e ICP OES. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2016.

KOKOT, S.; KING, G.; KELLER, H. R.; MASSART, D. L. Microwave Digestion - an Analysis of Procedures. **Analytica Chimica Acta**, v. 259, n. 2, p. 267-279, 1992.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; GUERRA, M. B. B.; ROCHA, F. R. P.; MATIAS, T. B. Solubilização e decomposição de sólidos inorgânicos. **Métodos de preparo de amostra para análise elementar**. KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. São Paulo, SBQ: 224-252, 2016.

LOPES, A.; GUILHERME, L. Uso Eficiente de Fertilizantes e Corretivos Agrícolas: Aspectos Agronômicos. São Paulo, Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2000. **Boletim Técnico**, n. 4, 2000.

LU, C.; TIAN, H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. **Earth System Science Data**, v. 9, n. 1, p. 181, 2017.

LUO, L.; MA, Y.; SANDERS, R. L.; XU, C.; LI, J.; MYNENI, S. C. Phosphorus speciation and transformation in long-term fertilized soil: evidence from chemical fractionation and P K-edge XANES spectroscopy. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 107, n. 2, p. 215-226, 2017.

MACEDO, S. M.; DE JESUS, R. M.; GARCIA, K. S.; HATJE, V.; DE S. QUEIROZ, A. F.; FERREIRA, S. L. C. Determination of total arsenic and arsenic (III) in phosphate fertilizers and phosphate rocks by HG-AAS after multivariate optimization based on Box-Behnken design. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 974-979, 2009.

MACHADO, R. C.; PEREIRA-FILHO, E. R.; NOGUEIRA, A. R. A. Strategy of sample preparation for arsenic determination in mineral fertilizers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1273-1278, 2016.

MACHADO, R. C.; VIRGILIO, A.; AMARAL, C. D.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of inductively coupled plasma tandem mass spectrometry for determination of As in agricultural inputs with high REE contents.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 27, n. 11, p. 2076-2081, 2016.

MACKEY, E. A.; CRONISE, M. P.; FALES, C. N.; GREENBERG, R. R.; LEIGH, S. D.; LONG, S. E.; MARLOW, A. F.; MURPHY, K. E.; OFLAZ, R.; SIEBER, J. R.; REARICK, M. S.; WOOD, L. J.; YU, L. L.; WILSON, S. A.; BRIGGS, P. H.; BROWN, Z. A.; BUDAHN, J.; KANE, P. F.; HALL, W. L., JR. Development and certification of the new SRM 695 trace elements in multi-nutrient fertilizer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 7, p. 2401-2409, 2007.

MÄKELÄ, M.; HARJU-OKSANEN, M.-L.; WATKINS, G.; EKROOS, A.; DAHL, O. Feasibility assessment of inter-industry solid residue utilization for soil amendment—Trace element availability and legislative issues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 67, p. 1-8, 2012.

MAQUEDA, C.; MORILLO, E.; LOPEZ, R.; UNDABEYTIA, T.; CABRERA, F. Influence of organic amendments on Fe, Cu, Mn, and Zn availability and clay minerals of different soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 5, p. 599-613, 2015.

MAR, S. S.; OKAZAKI, M. Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 17-21, 2012.

MARANGONI, B. S.; SILVA, K. S.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; CABRAL, J. S.; VILLAS-BOAS, P. R.; SILVA, C. S.; TEIXEIRA, P.; NOGUEIRA, A. R. A.; BENITES, V. M. Phosphorus quantification in fertilizers using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a methodology of analysis to correct physical matrix effects. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 78-82, 2016.

MEERS, E.; SAMSON, R.; TACK, F.; RUTTENS, A.; VANDEGEHUCHTE, M.; VANGRONSVELD, J.; VERLOO, M. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 385-396, 2007.

MERMET, J. M.; POUSSEL, E. ICP EMISSION SPECTROMETERS 1995 ANALYTICAL FIGURES OF MERIT. **Applied Spectroscopy**, v. 49, n. 10, p. A12-A18, 1995.

MONTIEL-ROZAS, M.; MADEJÓN, E.; MADEJÓN, P. Effect of heavy metals and organic matter on root exudates (low molecular weight organic acids) of herbaceous species: an assessment in sand and soil conditions under different levels of contamination. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 273-281, 2016.

NAOZUKA, J.; CARVALHO VIEIRA, E.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1667-1672, 2011.

NEARING, M. M.; KOCH, I.; REIMER, K. J. Complementary arsenic speciation methods: a review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 99, p. 150-162, 2014.

NEMATİ, K.; BAKAR, N. K. A.; ABAS, M. R. Investigation of heavy metals mobility in shrimp aquaculture sludge—comparison of two sequential extraction procedures.

Microchemical Journal, v. 91, n. 2, p. 227-231, 2009.

NÓBREGA, J.; PIROLA, C.; FIALHO, L.; ROTA, G.; DE CAMPOS JORDÃO, C.; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272-276, 2012.

NORDBERG, M.; TEMPLETON, D. M.; ANDERSEN, O.; DUFFUS, J. H. Glossary of terms used in Ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 5, p. 829-970, 2009.

NUNES, L. C.; ARANTES DE CARVALHO, G. G.; SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J. Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 97, p. 42-48, 2014.

NURMESNIEMI, H.; PÖYKIÖ, R.; WATKINS, G.; DAHL, O. Total and extractable heavy metal, phosphorous and sulfur concentrations in slaker grits from the causticizing process of a pulp mill for use as a soil amendment. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 22, n. 2, p. 87-97, 2010.

OLIVEIRA, T. C. D.; RAMPAZZO, R. T.; FERRÃO, M. F.; POZEBON, D. Method development and total uncertainty estimation for boron, sulfur and phosphorus determination in mineral fertilizer using ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 11, p. 2021-2033, 2016.

PATHAK, A.; KOTHARI, R.; DASTIDAR, M.; SREEKRISHNAN, T.; KIM, D. J. Comparison of bioleaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulfur and iron-oxidizing microorganisms: Continuous stirred tank reactor studies. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 49, n. 1, p. 93-100, 2014.

PEREZ-LOPEZ, R.; ALVAREZ-VALERO, A. M.; NIETO, J. M. Changes in mobility of toxic elements during the production of phosphoric acid in the fertilizer industry of Huelva (SW Spain) and environmental impact of phosphogypsum wastes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 3, p. 745-750, 2007.

PÉREZ-LÓPEZ, R.; NIETO, J. M.; LÓPEZ-COTO, I.; AGUADO, J. L.; BOLÍVAR, J. P.; SANTISTEBAN, M. Dynamics of contaminants in phosphogypsum of the fertilizer industry of Huelva (SW Spain): From phosphate rock ore to the environment. **Applied Geochemistry**, v. 25, n. 5, p. 705-715, 2010.

PESSÔA, G. D. S.; JÚNIOR, C. A. L.; MADRID, K. C.; ARRUDA, M. A. A quantitative approach for Cd, Cu, Fe and Mn through laser ablation imaging for evaluating the translocation and accumulation of metals in sunflower seeds. **Talanta**, v. 167, p. 317-324, 2017.

RAURET, G.; LOPEZ-SANCHEZ, J.; SAHUQUILLO, A.; RUBIO, R.; DAVIDSON, C.; URE, A.; QUEVAUVILLER, P. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 1, n. 1, p. 57-61, 1999.

RODELLA, A. A. Regulation of contaminant contents in fertilizers: a case study. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 5, p. 797-801, 2005.

SAHUQUILLO, A.; RIGOL, A.; RAURET, G. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 152-159, 2003.

SHIRISHA, K.; SAHRAWAT, K. L.; DEVI, B. P.; WANI, S. P. Simple and accurate method for routine analysis of heavy metals in soil, plant, and fertilizer. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 45, n. 16, p. 2201-2206, 2014.

STEPAN, M.; MUSIL, P.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Matrix-induced shift effects in axially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 4, p. 443-453, 2001.

SZÁKOVÁ, J.; TLUSTOŠ, P.; GOESSLER, W.; FINDENIG, S.; RICHTROVÁ, E.; BALÍK, J. A comparison of arsenic mobility in *Phaseolus vulgaris*, *Mentha aquatica*, and *Pteris cretica* rhizosphere. **Central European journal of biology**, v. 4, n. 1, p. 107-116, 2009.

TAKAOKA, M.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, N.; OSHITA, K.; URUGA, T. Direct speciation of lead, zinc and antimony in fly ash from waste treatment facilities by XAFS spectroscopy. **Physica Scripta**, v. 2005, n. T115, p. 943, 2005.

TANGAHU, B. V.; SHEIKH ABDULLAH, S. R.; BASRI, H.; IDRIS, M.; ANUAR, N.; MUKHLISIN, M. A Review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, 2011.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical chemistry**, v. 51, n. 7, p. 844-851, 1979.

THOMSON, C. J.; GREENWAY, H. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1294-1301, 1991.

TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

TUREK, M.; KOROLEWICZ, T.; CIBA, J. Removal of heavy metals from sewage sludge used as soil fertilizer. **Soil & Sediment Contamination**, v. 14, n. 2, p. 143-154, 2005.

UNSAL, Y. E.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Sequential extraction procedure for the determination of some trace elements in fertilizer samples. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 4, p. 1034-1038, 2014.

VIEIRA, E. C.; KAMOGAWA, M. Y.; LEMOS, S. G.; NOBREGA, J. D.; NOGUEIRA, A. R. D. Microwave-assisted decomposition of soil samples: Strategies to avoid formation of insoluble fluoride salts. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, v. 29, n. 4, p. 547-553, 2005.

VOGEL, C.; RADTKE, M.; REINHOLZ, U.; SCHÄFERS, F.; ADAM, C. Chemical state of chromium, sulfur, and iron in sewage sludge ash based phosphorus fertilizers. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 10, p. 2376-2380, 2015.

WANG, S.; ZHANG, S.; SHAN, X.; MU, H. Phyto-availability and speciation change of heavy metals in soils amended with lignin as micro-fertilizer. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 48, n. 1, p. 142-149, 2005.

WEBB, S.; BARTOS, J.; BOLES, R.; HASTY, E.; THUOTTE, E.; THIEX, N. J. Simultaneous determination of arsenic, cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, iron, lead, magnesium, manganese, molybdenum, nickel, selenium, and zinc in fertilizers by microwave acid digestion and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry detection: single-laboratory validation of a modification and extension of AOAC 2006.03. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 3, p. 700-711, 2014.

WILLIAMS, A. G.; SCHECKEL, K. G.; TOLAYMAT, T.; IMPELLITTERI, C. A. Mineralogy and characterization of arsenic, iron, and lead in a mine waste-derived fertilizer. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 16, p. 4874-4879, 2006.

YANG, S.; ZHOU, D.; YU, H.; WEI, R.; PAN, B. Distribution and speciation of metals (Cu, Zn, Cd, and Pb) in agricultural and non-agricultural soils near a stream upriver from the Pearl River, China. **Environmental Pollution**, v. 177, p. 64-70, 2013.

ZHAO, F.; MA, J.; MEHARG, A.; MCGRATH, S. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, v. 181, n. 4, p. 777-794, 2009.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Minami Fioroto

Local e data de nascimento: São Caetano do Sul, 30 de Agosto de 1989.

EDUCAÇÃO

- Faculdades Oswaldo Cruz (FOC), São Paulo - SP, 2010.

Bacharelado em Ciências com Habilitação em Química.

- Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2013.

Mestrado em Ciências (Química).

Título: Estudo de métodos para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Minicurso: “Micro-ondas para o preparo de amostras” (carga horária: 8h).

Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2011.

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- FIOROTO, A M; KELMER G A R; ALBUQUERQUE L G R; PAIXÃO T R L C; OLIVEIRA, P V. Microwave-assisted digestion with a single reaction chamber for mineral fertiliser analysis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectroscopy Letters**, v. 50, p. 550-556, 2017.
- ALBUQUERQUE L G R; FIOROTO, A M; PAIXÃO T R L C; OLIVEIRA, P V. Evaluation of multi-mixtures of acids for the sample preparation of organic soil amendments for multi-element determination by ICP OES. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 48, p. 2210-2217, 2017.
- ARANTES, C G G; KONDAVEETI, S; PETRI, D F S; FIOROTO, A M; ALBUQUERQUE, L G R; OLIVEIRA, P V. Evaluation of calcium alginate beads for Ce, La and Nd preconcentration from groundwater prior to ICP OES analysis. **TALANTA**, v. 161, p. 707-712, 2016.
- FIOROTO, A M; NASCIMENTO, A N; OLIVEIRA, P V. In Vitro Evaluation of Cu, Fe, and Zn Bioaccessibility in the Presence of Babassu Mesocarp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p.6331-6337, 2015.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- FIOROTO, A.M.; ALBUQUERQUE, L.G.R.; KELMER, G.A.R.; SILVA, D.G.; COUTO, R.A.A.; OLIVEIRA, P.V. Avaliação do protocolo de extração sequencial do BCR para o fracionamento de As, Cd, Cr e Pb em fertilizantes minerais. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.

- FIOROTO, A.M.; ALBUQUERQUE, L.G.R.; CARVALHO, G.G.A.; SILVA, F.F.; LORENCATTO, R.; OLIVEIRA, P.V. Diluição de aerossol como estratégia para a determinação de La, Ce, Sm, Eu, Gd, Yb, Th e U em fertilizante mineral por ICP-MS. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.
- ALBUQUERQUE, L.G.R.; FIOROTO, A.M.; OLIVEIRA, P.V. Fracionamento elementar por tamanho de partícula em fertilizantes orgânicos. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.
- ALBUQUERQUE, L.G.R.; FIOROTO, A. M.; CARVALHO, G.G.A.; SILVA, F.F.; LORENCATTO, R.; OLIVEIRA, P.V. Determinação de terras-raras em castanhas-do-Pará por ICP-MS. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.
- FIOROTO, A.M.; ALBUQUERQUE, L.G.R.; OLIVEIRA, P.V. Application of sequential extractions methods to investigate availability of potentially toxic elements in fertilizers by ICP OES. 2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Tucson, Arizona, EUA, 2016
- ALBUQUERQUE, L.G.R.; FIOROTO, A.M.; PAIXAO, T.R.L.C.; OLIVEIRA, P.V. Multi-elements determination in organic fertilizer using microwave-diluted acid digestion and ICP OES. 2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Tucson, Arizona, EUA, 2016
- FIOROTO, A.M.; KELMER, G.A.R.; ALBUQUERQUE, L.G.R.; PAIXAO, T.R.L.C.; OLIVEIRA, P.V. Avaliação de misturas ácidas para a digestão de fertilizantes inorgânicos em forno de micro-ondas para determinação elementar por ICP OES. 4º Congresso Analítica Latin America, São Paulo, SP, Brasil, 2015.
- ALBUQUERQUE, L.G.R.; FIOROTO, A.M.; PAIXAO, T.R.L.C.; OLIVEIRA, P.V. Determinação elementar em fertilizantes orgânicos por ICP OES e GF AAS. 4º Congresso Analítica Latin America, São Paulo, SP, Brasil, 2015.

- MATEO, B.S.O.; FIOROTO, A.M.; OLIVEIRA, P.V.; NAOZUKA, J. Efeito do cozimento de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.) na bioacessibilidade de elementos essenciais. 4º Congresso Analítica Latin America, São Paulo, SP, Brasil, 2015.
- FIOROTO, A.M.; ALBUQUERQUE, L.G.R.; KELMER, G.A.R.; PAIXAO, T.R.L.C.; OLIVEIRA, P.V. Evaluation of acid mixtures for inorganic fertilizer microwave-assisted digestion for elements determination by ICP OES. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Merida, Yucatan, México, 2014.
- ALBUQUERQUE, L.G.R.; FIOROTO, A.M.; PAIXAO, T.R.L.C.; OLIVEIRA, P.V. Determination of elements in organic fertilizer by ICP OES. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Merida, Yucatan, México, 2014.
- FIOROTO, A.M.; KELMER, G.A.R.; OLIVEIRA, P.V. Microwave-assisted digestion procedures for elements determination in inorganic-based fertilizers by ICP OES. 2014 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Amelia Island, Florida, EUA, 2014.
- FIOROTO, A.M.; CAMPOVILA, B.A.; KELMER, G.A.R.; OLIVEIRA, P.V. Avaliação da disponibilidade de Cd em fertilizantes minerais utilizando métodos de extrações sequenciais (Tessier e BCR). 17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2013.
- FIOROTO, A.M.; NASCIMENTO, A.N.; OLIVEIRA, P.V. Avaliação da disponibilidade de Fe, Cu e Zn em leite integral em pó na presença de mesocarpo de babaçu. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2013.
- KELMER, G.A.R.; FIOROTO, A.M.; ARMELIN, M.J.A.; OLIVEIRA, P.V. Avaliação dos procedimentos USEPA 3051 e 3052 para determinação de As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb em fertilizantes minerais por ICP OES. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2013.
- FIOROTO, A.M.; OLIVEIRA, P.V. Evaluation of Fe(III), Cu(II) and Zn(II) interaction with mesocarp of babassu using extraction procedures and F AAS for bioavailability

studies. 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2012.

- FIOROTO, A.M.; NASCIMENTO, A.N.; OLIVEIRA, P.V. Estudo de método para avaliar a biodisponibilidade de Fe, Zn e Cu em presença de mesocarpo de babaçu. 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2011.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- 18º Encontro Nacional de Química Analítica. 2016.
- 2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. 2016.
- XI Workshop sobre Preparo de Amostras. 2016.
- 4º Congresso Analítica Latin America. 2015.
- 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. 2014.
- Seminário de Análise de Contaminantes em Fertilizantes e Corretivos. 2014.
- Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. 2014.
- Workshop sobre laser em Química Analítica. 2014.
- 17º Encontro Nacional de Química Analítica. 2013.
- 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. 2012.
- II Congresso Institucional. 2012.
- IX Workshop sobre Preparo de Amostras. 2012.
- 16º Encontro Nacional de Química Analítica. 2011.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Coordenação da prática “Análises por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) ICAP 7400 Duo Thermo Scientific” no XI Workshop sobre Preparo de Amostras, Piracicaba, SP, Brasil, 2016.

- Palestra de “Avaliação de diferentes misturas ácidas para determinação de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes base mineral por ICP OES” no Seminário de análise de contaminantes em fertilizantes e corretivos, LANAGRO, Jundiaí, SP, Brasil, 2014.
- Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE): disciplina de Química Analítica II (QFL4220), Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ USP) com supervisão da Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura, 2014.
- Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE): disciplina de Química Analítica Instrumental (QFL2242), Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ USP) com supervisão da Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura, 2013.
- Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE): disciplina de Química Analítica Instrumental (QFL2242), Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ USP) com supervisão da Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura, 2012.
- Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE): disciplina de Princípios Química Analítica (QFL2241), Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ USP) com supervisão da Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira, 2012.