



## **Aplicação de Planejamento Composto Central na otimização do procedimento de digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas para determinação multielementar em amostras de gramíneas por ICP OES**

Jullietty C. da Silva(IC)<sup>1\*</sup>; Marcos Levi C. M. dos Reis (PG)<sup>1</sup>; Caio S. A. Felix (PQ)<sup>1, 2</sup>; Rodolfo M. M. Santana(PQ)<sup>1</sup>; Rennan G. O. Araujo(PQ)<sup>1</sup>; Maria das Graças A. Korn (PQ)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus de Ondina, 40170-115, Salvador, BA, Brasil

<sup>2</sup> Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente—CIEnAm, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-110, BA, Brasil

**Palavras-Chave:** química verde, biomonitoramento, otimização multivariada.

### **Introdução**

O avanço das tecnologias limpas e sustentáveis, especificamente na área da Química Verde, enfrenta desafios significativos. A Química Analítica Verde (GAC) busca evitar impactos ambientais e riscos para operadores, abordando a produção de reagentes, consumo de trabalho e energia. Os objetivos essenciais incluem o uso de análises diretas, miniaturização, redução de reagentes e resíduos, automação, portabilidade, estratégias *in situ*, substituição de reagentes tóxicos, gestão eficaz de resíduos e melhor segurança para operadores.

Apesar disso, a adoção de metodologias alternativas sustentáveis ainda ocorre lentamente, e há um interesse crescente no desenvolvimento de métodos de referência mais verdes devido à sua ampla aplicabilidade em diversos laboratórios. A implementação dos '12 princípios de química analítica verde' propostos por Gałuszka *et al.* (2013) e a ênfase na importância da química analítica verde, conforme destacado por Chemat e De La Guardia (2019), indicam avanços significativos na busca por práticas analíticas mais sustentáveis.

Ambientes costeiros estão expostos a uma ampla variedade de poluentes, sendo que metais e metalóides têm alcançado cada vez mais diversos sistemas marinhos através de ações antrópicas. Os riscos ecológicos provocados por esses elementos são difíceis de serem avaliados devido ao seu comportamento complexo em águas marinhas. Em ecossistemas marinhos, eles podem ser encontrados nas fases coloidal, particulada e dissolvida, embora as concentrações de compostos dissolvidos sejam geralmente baixas.

O uso de espécies biológicas no monitoramento da qualidade ambiental marinha permite avaliar os níveis biologicamente disponíveis de contaminantes no ecossistema e os efeitos desses contaminantes nos organismos vivos. Biomonitoradores ideais, conforme definido por Rainbow (1995), devem ser sedentários, fáceis de identificar, abundantes, longevos, disponíveis para amostragem ao longo do ano, resistentes ao estresse causado por estudos laboratoriais, tolerantes às variações de parâmetros ambientais físico-químicos e possuir tecido suficiente para análise. Estes biomonitoradores fornecem medidas diretas da condição da biota e podem revelar problemas não detectados ou subestimados. As angiospermas marinhas (seagrasses), como *Halodule wrightii* na costa nordeste do Brasil, são consideradas adequadas para biomonitoramento de elementos traço devido às suas características e presença generalizada.

As gramíneas marinhas extraem metais da coluna d'água e dos sedimentos por meio de suas folhas e raízes, utilizando sua composição de parede celular rica em grupos de hidroxila, sulfato e carboxila para ligar efetivamente elementos traço. As interações entre elementos traço e gramíneas marinhas as tornam valiosas bioindicadoras ambientais para avaliar a acumulação de elementos em ecossistemas costeiros.

Dada a alta concentração de elementos traço potencialmente tóxicos na Baía de Todos os Santos (BTS), o estudo de Brito *et al.* (2016), que pretende-se otimizar, teve como objetivo



avaliar as concentrações de elementos traço em *H. wrightii* coletadas em locais influenciados por atividades industriais e urbanas na BTS, Bahia, Brasil. O objetivo era identificar possíveis fontes de contaminação inorgânica e determinar se variações na precipitação afetam a capacidade dessas amostras de concentrar os elementos estudados. A pesquisa, realizada em 2010, abrangeu diferentes condições climáticas na zona costeira da BTS, a segunda maior baía tropical do Brasil, com circulação predominantemente influenciada pelas marés e variação mínima ao longo do ano ou entre as estações úmida e seca.

Ainda nesse contexto, é importante ressaltar que o biomonitoramento das espécies é algo imprescindível e que desastres naturais como por exemplo, o derramamento de óleo que ocorreu em 2019, amplamente conhecido como o derramamento de óleo no nordeste do Brasil, que evidenciou ainda mais atenção necessária ao tema. Esse desastre ambiental, que afetou extensas áreas costeiras, teve como consequência imediata a contaminação de praias, manguezais e ecossistemas marinhos, resultando em danos irreparáveis à fauna e à flora locais. As implicações desse derramamento e dos diversos tipos de poluição que os ambientes marinhos sofrem devido à ação antrópica estão intrinsecamente ligadas à temática da preservação marinha e aos esforços para a implementação de práticas sustentáveis. O evento destacou a vulnerabilidade dos ecossistemas costeiros e a necessidade urgente de medidas eficazes para prevenção, resposta e recuperação de desastres ambientais dessa natureza.

Assim, o objetivo deste trabalho é propor estratégia para preparo de amostras de gramíneas marinhas, que minimizem o uso de reagentes, geração de resíduos e aumentem a produtividade analítica, visando determinação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

## Material e Métodos

Para cada experimento, foram utilizados cerca de 200 mg da amostra de gramínea *Brachiaria Brizantha* cv Marandu (RM-Agro E1001a), aos quais foram adicionados uma alíquota de ácido nítrico (de concentração 2 - 14 mol L<sup>-1</sup>) e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) que foi submetido à digestão e, posteriormente, à determinação no ICP OES.

Para avaliação do domínio experimental proposto descrito abaixo, foi utilizada a otimização multivariada. Este método consiste em variar de forma simultânea todos os fatores, permitindo a identificação das interações entre si. A principal vantagem dessa abordagem é a obtenção de informações analíticas com o número de experimentos reduzidos quando comparada a otimização univariada.

Para cada uma das espécies, respostas múltiplas foram calculadas, considerando seus percentuais de recuperação, de acordo com Ferreira (2015). As respostas múltiplas calculadas foram utilizadas para as análises estatísticas dos dados, por meio do software STATISTICA® 6.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, Tulsa, EUA).

## Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão mostradas as concentrações obtidas para cada um dos analitos nas soluções resultantes dos experimentos realizados.

**Tabela 1** - Resultados das concentrações das espécies estudadas nas soluções digeridas usando o P4.

| Experi-<br>mento             | Espécies químicas |             |               |                |                |            |         |              |              |                |              |
|------------------------------|-------------------|-------------|---------------|----------------|----------------|------------|---------|--------------|--------------|----------------|--------------|
|                              | As*               | Pb *        | Cd*           | Ca**           | Mg**           | Fe*        | Cu*     | Zn*          | Mn*          | P**            | K**          |
| 1                            | 2,10              | 4,88        | 17,14         | 6,00           | 1,61           | 70,25      | 3,22    | 8,24         | 71,41        | 0,68           | 12,88        |
| 2                            | 2,60              | 3,65        | 11,86         | 2,04           | 3,08           | 54,33      | 2,04    | 2,85         | 49,87        | 0,44           | 12,69        |
| 3                            | 1,92              | 4,79        | 17,13         | 5,89           | 1,59           | 80,04      | 3,19    | 8,52         | 71,34        | 0,68           | 12,52        |
| 4                            | 3,66              | 5,37        | 18,09         | 2,92           | 2,94           | 83,84      | 3,16    | 3,03         | 77,16        | 0,69           | 12,33        |
| 5                            | 1,87              | 4,40        | 16,07         | 5,58           | 1,54           | 74,22      | 2,97    | 7,93         | 66,52        | 0,66           | 11,95        |
| 6                            | 3,18              | 5,76        | 18,55         | 2,85           | 2,98           | 86,61      | 3,22    | 3,88         | 79,08        | 0,70           | 12,00        |
| 7                            | 1,75              | 4,49        | 15,79         | 5,54           | 1,57           | 73,57      | 2,92    | 7,58         | 65,55        | 0,66           | 12,36        |
| 8                            | 3,74              | 4,93        | 17,39         | 2,40           | 2,87           | 80,41      | 2,98    | 3,01         | 73,73        | 0,67           | 11,42        |
| 9                            | 1,74              | 4,69        | 16,39         | 5,63           | 1,57           | 74,46      | 3,02    | 7,71         | 67,84        | 0,69           | 12,25        |
| 10                           | 3,60              | 5,82        | 19,03         | 3,33           | 3,16           | 89,41      | 3,43    | 3,97         | 81,56        | 0,75           | 13,07        |
| 11                           | 2,41              | 5,35        | 17,37         | 5,00           | 2,56           | 79,40      | 3,07    | 6,22         | 72,52        | 0,74           | 13,41        |
| 12                           | 2,62              | 5,26        | 18,04         | 5,39           | 2,67           | 84,67      | 3,27    | 6,70         | 76,70        | 0,91           | 14,05        |
| 13                           | 2,39              | 5,37        | 17,95         | 5,41           | 2,68           | 83,83      | 3,26    | 8,43         | 76,22        | 0,76           | 14,17        |
| 14                           | 2,60              | 5,23        | 17,83         | 5,15           | 2,62           | 84,16      | 3,24    | 6,49         | 75,12        | 0,76           | 13,57        |
| 15                           | 2,44              | 5,13        | 17,22         | 5,09           | 2,59           | 82,40      | 3,18    | 10,89        | 73,00        | 0,75           | 13,49        |
| Valores<br>certifi-<br>cados | 1,69<br>± 0,7     | 4,0±<br>1,8 | 19,9 ±<br>5,1 | 4,37 ±<br>0,58 | 2,95 ±<br>0,44 | 91 ±<br>13 | 4 ± 0,7 | 9,9 ±<br>1,6 | 76 ±<br>18,5 | 0,65 ±<br>0,19 | 12 ±<br>12,4 |

Fonte: autoria própria.

\* valores em mg kg<sup>-1</sup>

\*\* valores em g kg<sup>-1</sup>

A concentração de arsênio (As) variou entre 1,74 e 3,74 mg kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações acima do valor certificado de 1,69 ± 0,7 mg kg<sup>-1</sup>. O experimento 9, com 1,74 mg kg<sup>-1</sup>, se aproximou mais do valor certificado para este elemento. As concentrações de chumbo (Pb) variaram de 3,65 a 5,82 mg kg<sup>-1</sup>. A maioria das observações está dentro da faixa certificada. Os experimentos 2 (3,65 mg kg<sup>-1</sup>), 3 (4,79 mg kg<sup>-1</sup>), e 7 (4,49 mg kg<sup>-1</sup>) demonstraram resultados que se aproximam do valor certificado, indicando que as condições investigadas foram adequadas para este elemento.

O elemento cádmio (Cd) apresentou concentrações variando entre 11,86 e 19,03 mg kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações abaixo do valor certificado de 19,9 ± 5,1 mg kg<sup>-1</sup>. O experimento 10, com 19,03 mg kg<sup>-1</sup>, se aproximou mais do valor certificado, sugerindo que as condições experimentais adotadas nesse caso foram mais adequadas para a determinação deste elemento.

Para cálcio (Ca), as concentrações variaram de 2,04 a 6,00 g kg<sup>-1</sup>. A maioria das observações foi superior ao valor certificado, sendo que as soluções digeridas nas condições dos experimentos 3 (5,89 g kg<sup>-1</sup>) e 10 (3,33 g kg<sup>-1</sup>) resultaram em valores mais próximos do valor certificado. As concentrações de magnésio (Mg) variaram de 1,54 a 3,16 g kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações dentro da faixa do valor certificado de 2,95 ± 0,44 g kg<sup>-1</sup>. O resultado do experimento 6 (2,98 g kg<sup>-1</sup>) está muito próximo

do valor certificado, indicando que as condições experimentais deste ensaio foram adequadas para determinação desse analito.

O ferro (Fe) apresentou concentrações que variaram entre 54,33 e 89,41 mg kg<sup>-1</sup>. Com a maioria das observações abaixo do valor certificado de 91 ± 13 mg kg<sup>-1</sup>, as condições do experimento 10 (89,41 mg kg<sup>-1</sup>) resultaram em valor mais próximo do valor certificado. Para cobre (Cu), as concentrações variaram de 2,04 a 3,43 mg kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações abaixo do valor certificado de 4 ± 0,7 mg kg<sup>-1</sup>. As concentrações das soluções digeridas nas condições dos experimentos 11 (3,07 mg kg<sup>-1</sup>) e 15 (3,18 mg kg<sup>-1</sup>) se aproximaram do valor certificado.

O Zinco (Zn) variou entre 2,85 e 10,89 mg kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações abaixo do valor certificado de 9,9 ± 1,6 mg kg<sup>-1</sup>. O experimento 15, com 10,89 mg kg<sup>-1</sup>, se aproximou do valor certificado, indicando que as condições experimentais deste experimento foram mais adequadas. As concentrações de Manganês (Mn) oscilaram entre 49,87 e 81,56 mg kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações dentro da faixa do valor certificado de 76 ± 18,5 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que o experimento 13 (76,22 mg kg<sup>-1</sup>) foi o mais próximo do valor certificado.

As concentrações de fósforo (P) variaram de 0,44 a 0,91 g kg<sup>-1</sup>. Com a maioria das observações acima do valor certificado de 0,65 ± 0,19 g kg<sup>-1</sup>, os experimentos 1 e 3 (0,68 g kg<sup>-1</sup>), 5 e 7 (0,66 g kg<sup>-1</sup>) e o experimento 9 (0,69 g kg<sup>-1</sup>) foram os que mais se aproximaram mais do valor certificado, demonstrando a adequação das condições experimentais escolhidas para determinação do P.

Para potássio (K), as concentrações variaram de 11,42 a 14,17 g kg<sup>-1</sup>, com a maioria das observações dentro da faixa do valor certificado de 12 ± 12,4 g kg<sup>-1</sup>. As condições dos experimentos 13 (14,17 g kg<sup>-1</sup>) e 15 (13,49 g kg<sup>-1</sup>) resultaram em concentrações mais próximas do valor certificado.

A partir do tratamento estatístico dos dados obtidos no P4, dispostos na tabela ANOVA (Tabela 2) e gráfico de Pareto (Figura 1), observou-se que a variável mais significativa foi a concentração de HNO<sub>3</sub>, com efeito positivo para RM.

**Tabela 2** - Análise de variância (ANOVA) utilizando resposta múltipla - P4

| Fator        | Soma dos quadrados | Grau de liberdade | Média dos quadrados | Valor - F | Valor - p |
|--------------|--------------------|-------------------|---------------------|-----------|-----------|
| (1)C HNO3(L) | 3,68449            | 1                 | 3,684490            | 12,97995  | 0,015498  |
| C HNO3(Q)    | 1,44857            | 1                 | 1,448572            | 5,10312   | 0,073443  |
| (2)P(W)(L)   | 0,19881            | 1                 | 0,198810            | 0,70038   | 0,440808  |
| P(W)(Q)      | 0,26423            | 1                 | 0,264229            | 0,93084   | 0,378955  |
| (3)t(min)(L) | 0,09409            | 1                 | 0,094090            | 0,33147   | 0,589738  |
| t(min)(Q)    | 0,09337            | 1                 | 0,093372            | 0,32894   | 0,591117  |
| 1L by 2L     | 0,82561            | 1                 | 0,825613            | 2,90852   | 0,148830  |
| 1L by 3L     | 0,21451            | 1                 | 0,214512            | 0,75570   | 0,424434  |
| 2L by 3L     | 0,83851            | 1                 | 0,838512            | 2,95396   | 0,146305  |
| Erro puro    | 1,41930            | 5                 | 0,283860            |           |           |
| Total        | 10,80253           | 14                |                     |           |           |

Fonte: autoria própria.

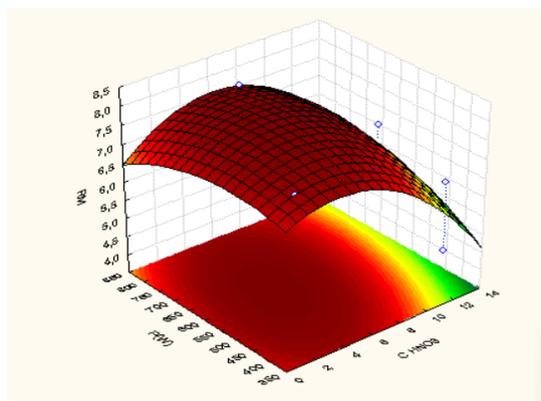
**Figura 1** - Gráfico de Pareto correlacionando a influência das variáveis com nível de confiança de 95% ( $p \leq 0.05$ ) - P



Fonte: autoria própria.

A partir do software Statistica, um gráfico de superfície de resposta foi gerado (Figura 6) e um modelo quadrático foi obtido (Eq. 1), a partir dos resultados dos experimentos com o Planejamento Composto central:

**Figura 6-** Superfície de resposta resultante do Planejamento 4.



Fonte: autoria própria.

$$RM = 7,9 - 1,2(C HNO_3)^2 + 0,3P - 0,6P^2 + 0,2t - 0,4t^2 + 0,6(C HNO_3)P + 0,3(C HNO_3)t - 0,6P * P * t \quad (\text{eq. 1})$$

A partir dessa equação, obtém-se as derivadas parciais em relação à concentração de  $HNO_3$ , potência e tempo, respectivamente:

$$\frac{\partial RM}{\partial C HNO_3} = -1,2 - 3(C HNO_3) + 0,6P + 0,3t \quad (\text{eq. 2})$$

$$\frac{\partial RM}{\partial C P} = +0,3 - 1,2P + 0,6(C HNO_3) - 0,6t \quad (\text{eq. 3})$$

$$\frac{\partial RM}{\partial C t} = 0,2 - 0,4t + 0,3(C HNO_3) - 0,6P \quad (\text{eq. 4})$$

A partir dessas equações, chega-se aos valores críticos de concentração de  $HNO_3$  de  $5 \text{ mol L}^{-1}$ , potência de 592 W e tempo de 26 min, que, considerando o tratamento estatístico, referem-se ao ponto onde a variável dependente, neste caso RM, apresenta valor máximo.

Além das informações matemáticas obtidas pelo software, é imprescindível a interpretação química dos dados. Sendo assim, a condição estabelecida como ótima para digestão da amostra foi a concentração de  $HNO_3$   $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ , potência de 400 W e tempo no patamar de aquecimento 35 min (Experimento 3). Nessas condições foram obtidos os seguintes percentuais de concordância entre os



valores obtidos e os encontrados do material de referência: As(114%), Cd(86%), Fe(88%), Zn(86%), Mn(94%), P(105%) e K(104%), mostrando boa exatidão.

### **Conclusões**

O procedimento de decomposição proposto para amostras de gramíneas, utilizando ácido nítrico diluído, mostrou-se eficiente para o processo de digestão de amostras de gramíneas marinhas, e apresenta como vantagens a minimização do uso de reagentes e na geração de resíduos, alinhando-se aos princípios da Química Verde. Este estudo destaca a importância de métodos analíticos sustentáveis no monitoramento ambiental, especialmente em regiões vulneráveis a desastres ambientais.

A condição ótima estabelecida foi a concentração de  $\text{HNO}_3$  1,8 mol  $\text{L}^{-1}$ , potência de 400 W e tempo no patamar de aquecimento 35 min (Experimento 3). Nessas condições foram obtidos os seguintes percentuais de concordância entre os valores obtidos e os encontrados do material de referência: As(114%), Cd(86%), Fe(88%), Zn(86%), Mn(94%), P(105%) e K(104%), mostrando boa exatidão.

### **Agradecimentos**

Ao Grupo de Pesquisa em Química Analítica (GPQA), CNPq, CAPES, PIBIC UFBA, Cienam e FAPESB.

### **Referências**

BRITO, G. B., de Souza, T. L., Costa, F. D. N., Moura, C. W.; Korn, M. G. A. KORN, Maria das Graças Andrade. Baseline trace elements in the seagrass *Halodule wrightii* Aschers (Cymodoceaceae) from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 104, n. 1-2, p. 335-342, 2016.

FERREIRA, Introdução às técnicas de planejamento de experimentos. Introdução às técnicas de planejamento de experimentos. Salvador: Vento Leste, 2015.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J.. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78-84, 2013.

CHEMAT, Farid; DE LA GUARDIA, Miguel. Editorial overview: Green analytical chemistry, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v.19, p.A1–A2, 2019.

RAINBOW, Philip S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 31, n. 4-12, p. 183-192, 1995.