



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Química Fundamental

Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROANALÍTICOS
APLICADOS À QUÍMICA FORENSE E ALIMENTOS**

Maria José de Filgueiras Gomes

Recife-PE
Junho/2010



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Química Fundamental

Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROANALÍTICOS
APLICADOS À QUÍMICA FORENSE E ALIMENTOS**

Maria José de Filgueiras Gomes*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadores: Prof. Ana Paula Silveira Paim (DQF)

Prof. Maria Fernanda Pimentel (DEQ)

Co-orientador: Dr. Ricardo Saldanha Honorato

Bolsista CAPES

Recife-PE

Junho/2010

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Gomes, Maria José de Filgueiras.

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à química forense e alimentos / Maria José de Filgueiras Gomes. - Recife: O Autor, 2010.
xii, 121 f.: fig. tab.

Orientador: Ana Paula Silveira Paim.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2010.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Química legal. 2. Mercúrio. 3. Armas de fogo – legislação. 4. Cocaina. I. Paim, Ana Paula (orientadora). II. Título.

614.12 (22. ed.)

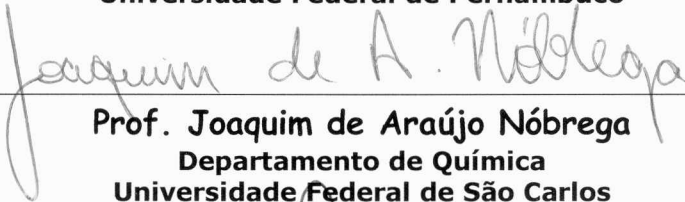
FQ 2011-035

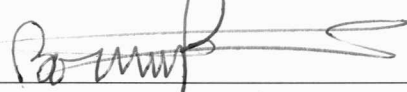
Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

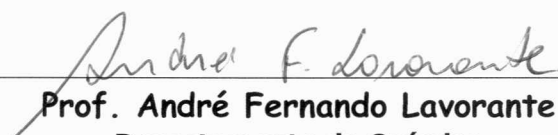
Aprovada:

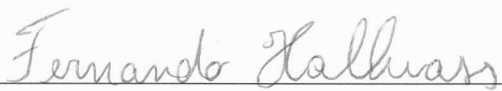

Prof^a Ana Paula Silveira Paim
(Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco


Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega
Departamento de Química
Universidade Federal de São Carlos


Prof. Boaventura Freire dos Reis
Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Universidade de São Paulo


Prof. André Fernando Lavorante
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Fernando Hallwass
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

**"Desenvolvimento de Métodos Espectroanalíticos
Aplicados à Química Forense e Alimentos"**

por

Maria José Filgueiras Gomes

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife - PE - Brasil
07 de Junho de 2010

*“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível.
Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, é a oportunidade”.*

Victor Hugo

DEDICATÓRIA

*À minha família, principalmente a minha mãe e o
meu esposo, por todo
amor, dedicação e apoio durante mais
esta etapa da minha vida.*

Agradecimentos

- À Deus que se não fosse por Ele a história de minha vida não existiria;
- Ao meu esposo por ter sido um companheiro presente nos momentos mais difíceis;
- A toda minha família, pela educação, apoio e incentivo durante toda minha vida;
- As minhas orientadoras. Dr. Ana Paula Paim e Maria Fernanda Pimentel, pela orientação e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho;
- Minha profunda gratidão ao Prof. Dr. Ricardo Honorato, por sua amizade e co-orientação;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida;
- À Universidade Federal da Pernambuco pelo apoio institucional;
- Ao Prof. Dr. Célio Pasquini, pelo acolhimento no Grupo de Instrumentação e Automação (GIA-UNICAMP) durante a missão de estudo; e pela sua contribuição e colaboração neste trabalho;
- Aos professores Maria Luiza Cervera e Miguel de La Guardia pela orientação durante o doutoramento sandwich em Valência- Espanha e a amizade;
- Ao Sidney e Professor Fábio Rocha (CENA) pelas amostras de arroz concedidas gentilmente ;
- Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) da CAPES, pelo auxílio financeiro durante a missão de estudo realizada na UNICAMP em 2007;
- Ao CNPq pela bolsa Sandwich concedida;
- Ao INCTAA - Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas;
- Aos amigos Elaine, Paula, Glória, Jose, Solange, Michele, Maurício, Bete, Lidiane, Lourdes, Juliana, Robson, Ladjane, João, Fernando, Dimas, Andréa, Mariela, pelo companheirismo e apoio nas horas difíceis;
- Ao Professor Antônio Carlos Pavão pelo apoio e amizade;
- Aos amigos Marisete e Valdir pelo carinho e amizade;
- A todos aqueles da Central analítica do Departamento de Química Fundamental;
- Aos Professores Mohan e Marcelo Navarro pela orientação na iniciação e no mestrado;
- Aos secretários da pós- graduação Maurílio e Patrícia pela ajuda e amizade durante o período do doutorado;
- Agradeço aos membros da banca por terem aceitado avaliar esta tese;
- As bibliotecárias Ana e Joana pelo apoio e amizade;
- Finalmente aos professores Benício, Paulo, Osvaldo Serra, Bosco, Madalena, e todos aqueles que com seus ensinamentos contribuíram na minha formação e a concretizar esse sonho.

RESUMO

Este trabalho está dividido em três partes. As duas primeiras tratam do desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados a problemas químico e a terceira aborda a determinação do teor de mercúrio presente em arroz. Na primeira parte é apresentado um método desenvolvido para determinação de cocaína empregando um sistema de análise por injeção seqüencial acoplado a fluxo-batelada com detecção espectrofotométrica, usando tiocianato de cobalto como reagente complexante. Nessa reação duas fases são encontradas: a superior (rosa) contendo um excesso da solução de tiocianato de cobalto e uma fase orgânica (azul) contendo o complexo de cocaína- tiocianato de cobalto em clorofórmio. Amostras e reagentes são inseridas empregando uma válvula de injeção seqüencial entre duas bolhas de ar dentro de uma câmara reacional. Uma fibra óptica conectada à câmara registrou o sinal de absorbância em 630 nm. Os limites de detecção e quantificação foram de 29,4 mg L⁻¹ e 98 mg L⁻¹, respectivamente. O desvio padrão relativo foi de 4,9% para a solução contendo 400 mg L⁻¹ (n = 10), com linha de base estável. A frequência analítica foi de 12 determinações por hora e resposta linear de 100 a 1000 mg L⁻¹. Na segunda parte, a espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) foi empregada para a detecção de resíduos de disparo de arma de fogo (GSR) nas mãos de indivíduos que realizaram ou não disparos. Para desenvolver o procedimento, 115 amostras foram obtidas pressionando um pequeno pedaço de fita adesiva contra a região dorsal das mãos de não-atiradores, atiradores após o disparo e de atiradores após terem lavado as mãos com sabão e água. As fitas foram analisadas diretamente em um equipamento LIBS baseado em um policromador *echelle* com resolução temporal construído em laboratório. Os espectros foram obtidos a partir da aplicação de um único pulso de laser em 20 locações diferentes, espalhadas uniformemente sobre a superfície da fita, para assegurar uma amostragem eficiente na detecção de resíduos de disparo. Os espectros mostram uma assinatura com linhas de emissão características de bário e chumbo. Quando os dados espectrais foram submetidos à técnica de reconhecimento de padrão SIMCA (Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe), atiradores e não-atiradores foram corretamente classificados. O método baseado em LIBS e SIMCA demonstrou ser não-destrutivo da evidência do crime e permitiu discriminar as amostras coletadas de voluntários não-atiradores e atiradores, mesmo após a lavagem das mãos. Na terceira parte do trabalho foi desenvolvido um método para determinação de mercúrio em amostras de arroz utilizando a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS). O método é baseado na digestão prévia das amostras em forno de micro-ondas com HNO₃ e H₂O₂ seguida de uma diluição com água contendo KBr/KBrO₃ e hidroxilamina e o redutor SnCl₂ em HCl usando calibração externa. A interferência dos vapores óxidos nitrosos foi avaliada usando uma amostra de referência certificada. O limite de detecção do método foi 0,9 ng g⁻¹ com percentual de recuperação de 95 ± 4% para uma adição de concentração de 5 ng g⁻¹. A concentração de mercúrio encontrado nas 24 amostras de arroz de diferentes origens estava em uma faixa de 1,3 a 7,8 ng g⁻¹. A faixa dinâmica foi de 0,025 a 0,2 ng L⁻¹.

Palavras-chave: mercúrio, resíduos de disparo de arma de fogo, cocaína, vapor frio

ABSTRACT

This work consists of three parts. The first two present the development of spectroanalytical methods for forensic applications and the third part deals with the determination the mercury content in rice. In the first part, a sequential injection analysis system coupled the flow-batch procedure for the spectrophotometric determination of cocaine using cobalt thiocyanate as a complexing reagent was developed. In this reaction, two phases are formed: the superior (pink) contains an excess of cobalt thiocyanate solution and the organic layer (blue) contains the complex cocaine-cobalt thiocyanate in chloroform. Samples and reagent are inserted employing a sequential-injection valve between two air bubbles inside a reaction chamber. An optical fiber sensor connected to the chamber recorded the absorbance at 630 nm signal. The detection and quantification limits were 29,4 mg L⁻¹ and 98 mg L⁻¹, respectively. Relative standard deviations were 4,9% for solutions containing 400 mg L⁻¹ (n =10), with stable baselines. The analytical throughput was 12 determinations per hour and linear range 100 a 1000 mg L⁻¹. In the second part, laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) is further developed for the detection of gunshot residue (GSR) on the hands of a suspected shooter. To develop the procedure, 115 samples were obtained by pressing small piece of adhesive tape against the dorsal region of the hands of non-shooters, of shooters just after firing a weapon, and of shooters after washing their hands with soap and water. The tapes were analyzed directly in a time-resolved *echelle* based LIBS system, assembled in the laboratory, and 20 single laser pulses, spread uniformly on the tape surface, were shown to be enough to ensure the detection of true positives. The spectra obtained by LIBS from the tape present a signature with emission lines that are attributed to barium and lead. After the spectral data was submitted to a pattern recognition method SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), shooters and non-shooters were corrected classified. The method based on LIBS and SIMCA has been demonstrated to be non-destructive of crime evidence and enabled discrimination between the samples collected from non-shooter volunteers and shooter volunteers before and after washing their hands. In the third part of this work a cold vapor atomic fluorescence spectrometry method (CV-AFS) has been developed for the determination of Hg in rice samples at a few ng g⁻¹ concentration level. The method is based on the previous digestion of samples in a microwave oven with HNO₃ and H₂O₂ followed by dilution with water containing KBr/KBrO₃ and hydroxylamine and reduction with SnCl₂ in HCl using external calibration. The matrix interferences of nitrogen oxide vapors have been evaluated and using a certified reference material. The limit of detection of the method was 0.9 ng g⁻¹ with a recovery percentage of 95 ± 4% at an added concentration of 5 ng g⁻¹. The concentration level of Hg found in 24 natural rice samples from different origin ranged between 1.3 and 7.8 ng g⁻¹ and linear range of 0,025 a 0,2 ng L⁻¹.

Keywords: mercury, cocaine, residue shoot, cold vapor.

Sumário

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
APRESENTAÇÃO	xii
Capítulo I: Determinação Espectrofotométrica de Cocaína Eempregando Análise por Injeção Sequencial Acoplado a um Sistema Fluxo-batelada*	1
I.1. INTRODUÇÃO	2
I. 1.1. COCAÍNA	2
I.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS E TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA.....	8
I.1.3. ANÁLISE EM FLUXO	10
I.2.OBJETIVO	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
I.3. PARTE EXPERIMENTAL	18
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	18
I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
I.5. CONCLUSÃO	28
I.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
Capítulo II: Detecção de Resíduos de Disparo de Armas de Fogo por meio de Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS)*	35
II. 1. INTRODUÇÃO.....	36
II. 1.1. RESÍDUOS DEIXADOS POR ARMA DE FOGO	36
II. 1.2. A ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO EM PLASMA INDUZIDO POR LASER.....	43
II.1.3. TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS	54
II.2. OBJETIVO	58
2.1. Objetivos Geral	58
2.2. Objetivos Específicos.....	58
II.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	59
II. 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	59
II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
II.5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	75
II.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
Capítulo III. Determinação de mercúrio em arroz utilizando Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Vapor Frio (CV-AFS)*	83
III.1 INTRODUÇÃO	84
III.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MERCÚRIO	84
III.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO	90
III.1.3. DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA EM SISTEMA FECHADO.....	94

III.1.4. INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE Hg POR CV-AFS	96
II.2 OBJETIVOS.....	98
2.1. Objetivo Geral.....	98
2.2. Objetivos Específicos.....	98
III.3. MATERIAIS E MÉTODOS	99
III.3.1. SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E REAGENTES	99
III. 3.2. INSTRUMENTAÇÃO.....	100
III.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
III.4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E INTERFERENTES.....	106
III. 5. CONCLUSÃO	115
III.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
TRABALHOS PUBLICADOS.....	121

Índice de Figuras

Figura.1 -Estrutura da cocaína metil-1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo [3,2,1]-octano-2-carboxilato	2
Figura. 2 - Fórmulas estruturais: (a) Base livre (b) Cloridrato de cocaína	3
Figura. 3 – Esquema dos principais produtos da biotransformação da cocaína	7
Figura.4 - Etapas do método Scott (a) $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ e cocaína; (b) adição de HCl e (c) adição de CHCl_3	9
Figura.5 Diagrama do sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) acoplado ao fluxo-batelada CHCl_3 ; fluido transportador, $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ reagente colorimétrico, B: bomba seringa com vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$, BR: Bobina de reação (300 cm), A: amostra, L: Descarte, C: câmara reacional fluxo-batelada (cuja dimensões está descrita no texto).	19
Figura.6 - Imagem do sistema em fluxo-batelada empregado na determinação de cocaína.....	20
Figura.7 -Câmara reacional (a) “corte transversal” (b) vista frontal (tampa conectada). S = entrada e saída da solução; M = volume interno da câmara (51 mm comprimento e 8 mm de diâmetro interno); L = orifício de entrada da radiação; CCD = orifício de saída da radiação conectada a um dispositivo de carga acoplada, R = reagente colorimétrico; C = complexo formado entre a cocaína e o tiocianato	21
Figura.8 - Espectro do complexo cocaína-tiocianato na fase orgânica, na região visível (390 a 710 nm)	24
Figura.9 - Curva analítica obtida para determinação de cocaína empregando a análise por Injeção Sequencial associado a análise em fluxo-batelada na faixa de 100 a 1000 mg L^{-1}	25
Figura.10 - Esquema geral da composição interna de uma munição.....	36
Figura.11 -Número de publicações na área de LIBS de 1983 a 2009, baseado no banco de dados da Web of Science, consultado em abril de 2010.	44
Figura.12 -Diagrama do princípio de transição atômica do Nd:YAG	47
Figura.13 . Diagrama esquemático de um sistema LIBS .(a) fonte de energia; (b) laser; (c) espelho; (d) lente; (e) amostra; (f) lente; (g) fibra óptica; (h) sinal do Q-switched; (i) espectrômetro echelle; (j) detector ICCD; (k) microcomputador.	48
Figura 14 – Interpretação do gráfico de Coolman	55
Figura.15 Interpretação do gráfico Si vs Hi	56
Figura 16 – Interpretação do gráfico Si/So vs Hi	56
Figura.17 - Montagem do sistema LIBS (a) laser; (b) espelho; (c) lente; (d) fibra óptica; (e) amostra	61
Figura.18 - Dispositivo que coleta a radiação do plasma: (a) suporte, (b) lente de 30 mm (c) placa retangular de alumínio, (d) fibra óptica, (e) lente focalizadora de 10 cm.	62
Figura.19 Diagrama esquemático da distância foco-amostra e distância focal	62
Figura.20 : Sistema de detecção da empresa Andor Technology : (a) detector ICCD (b) policromador echelle.....	63
Figura.21 -Esquema do suporte (a) moldura de plástico e (b) fita adesiva.....	64
Figura.22 - Espectro de emissão representativo de um branco predominam linhas de emissão atribuídas a Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm; Na (I) 588,99 nm e K (I) 769,89 nm.....	66
Figura.23 - Espectro de emissão representativo de um teste positivo de GSR após 5 disparos. Predominam linhas de emissão que são atribuídas a Ba (II) 413,06 nm; Ba (II) 455,40 nm; Ba (II) 493,40 nm; Ba (I) 553,54 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e Pb (I) 405,75 nm.....	67
Figura.24 . Espectro de emissão representativo do mesmo indivíduo da figura 23 após lavar as mãos com água e sabão. Predomina linhas de emissão que são atribuídas, principalmente, a raia de Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm; Ba (II) 455,4 nm; Ba (II) 493,40 nm e Pb (I) 405,75 nm.....	67

Figura.25- Imagem (a) e espectro de EDS de uma “única” partícula GSR Ba-Sb (b) encontrada em uma amostra de uma pistola .380 AUTO, depois de realizar 5 disparos	68
Figura.26 . Espectro de emissão representativo das mãos de um mecânico. Predominam linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ba (II) 455,40 nm e Ba (II) 493,40 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e raias de Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm.	69
Figura.27 Espectro de emissão representativo das mãos de um mecânico após lavar as mãos. Predominam linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ba (II) 455,40 nm e Ba (II) 493,40 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm.....	69
Figura.28- Espectro de emissão representativo de um indivíduo 16 horas depois de ter realizado disparos com arma de fogo. Predomina linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm e algumas raias de Ba (II) 455,40 nm; Ba (II) 493,40 nm, Ba (II) 614,17 nm e Pb (I) 405,75 nm.....	70
Figura. 29 - PC1 x PC2 dos indivíduos que não atiraram (azul); os outros casos estudados (verde).	71
Figura. 30 Loadings para a primeira componente principal	72
Figura.31– SIMCA - gráfico (Si/S0) vs (Hi) para o conjunto de validação. Amostras retiradas das mãos de: indivíduos que nunca atiraram (N), atiradores após disparos com a arma de fogo (D), atiradores após lavarem as mãos (L) e mecânico (M).	73
Figura.32 Configuração óptica de um espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio.....	93
Figura.33- Espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio. a) Bomba peristáltica 1; b) Bomba peristáltica 2; c) porta de saída do gás carregador conectada ao separador gás-líquido; d) entrada do vapor de Hg ⁰ no sistema de secagem; e) porta de saída do sistema de secagem; f) porta de entrada da amostra para o detector.	100
Figura.34- Esquema do arranjo experimental do sistema em fluxo contínuo usado na geração de vapor frio.....	100
Figura.35- Forno de microondas modelo Ethos Sel utilizado nas digestões das amostras de arroz.	101
Figura.36 - Avaliação do efeito matriz com o método de adição de analito em quatro amostras distintas, comparada com a calibração externa (HNO ₃ 5% (v/v) KBr/KBrO ₃ e hidroxilamina). ..	109
Figura.37 Avaliação do efeito matriz para diferentes volumes de amostra digerida.	110

Índice de Tabelas

Tabela.1 – Apreensões de cocaína (kg) e seus derivados feitas pela Polícia Federal Brasileira	5
Tabela 2 - Tempo de ação da droga para as diferentes vias de administração.....	6
Tabela.3 -Seqüência da análise para determinação de cocaína em amostras apreendidas empregando análise por injeção sequencial-fluxo batelada.....	22
Tabela.4 -Comparação dos parâmetros analíticos obtidos na determinação de cocaína usando o método de referência (GC-MS) e o sistema proposto fluxo-batelada e outros método descrtios na literatura.	26
Tabela. 5. Concentração de cocaína (%m/m) em amostras confiscadas pela Policia Federal de Pernambuco obtidas pelo procedimento proposto (SIA-FB) e o método de referência (CG-MS)	27
Tabela.6 - Evolução do plasma induzido por laser a partir de um material alvo.	51
Tabela 7 -Experimentos realizados com diferentes disparos, munições e atiradores	60
Tabela 8 - Conjunto de treinamento e validação externa.....	64
Tabela 9 -Resultado da avaliação da preservação de evidência após a primeira análise LIBS.	74
Tabela 12: Avaliação do procedimento de limpeza para determinação de Hg por CV-AFS	106
Tabela 13: Avaliação do efeito matriz em diferentes condições, a equação da reta para as medidas realizadas por calibração externa e pelo Método de adição de analito e a razão entre as inclinações das duas curvas, na determinação de Hg em amostras de arroz por CV-AFS.....	107
Tabela 14: Estudo da estabilidade das amostras digeridas.....	110
Tabela 15 – Estudo da dependência do efeito de matriz com a variação do fator de diluição	111
Tabela.16 - Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de Hg em arroz empregando CV-AFS.....	112
Tabela 17: Determinação de Hg total na amostra certificada NIST-SRM 1568a rice flour.....	113
Tabela 18: Teor médio e desvio padrão encontrados em amostras de arroz de diferentes origens empregando CV-AFS.....	114

APRESENTAÇÃO

A Química Forense assume um importante papel para a sociedade na investigação de crimes e delitos, de forma a fornecer a justiça indícios e provas científicas conclusivas. Nesse contexto, o presente trabalho aborda duas linhas de atuação voltadas para o desenvolvimento de métodos analíticos aplicados à química forense.

A primeira linha trata da determinação de cocaína, considerada uma das drogas ilícitas com maior consumo, que está vinculada ao aumento da criminalidade e violência nos grandes centros urbanos. A determinação do teor de cocaína em amostras apreendidas permite avaliar a pureza, contribuindo na identificação da sua origem, que por sua vez é relevante no sentido de desenvolver políticas de segurança mais eficazes no combate ao narcotráfico. O primeiro capítulo deste trabalho apresenta o método desenvolvido para determinação de cocaína, baseado em um sistema de análise em fluxo-batelada com detecção espectrofotométrica.

A segunda linha consiste na análise residuográfica, que tem contribuído substancialmente na elucidação de diversos crimes, a qual procura detectar resíduos de disparo de arma de fogo (GSR) presentes em mãos de pessoas suspeitas de terem efetuado disparos. No segundo capítulo desta tese é mostrado o desenvolvimento de um método *screening*, empregando a espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) e a técnica quimiométrica de classificação SIMCA - modelagem independente e flexível por analogia de classes (do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*). A técnica LIBS foi aplicada para detecção de resíduos de disparo de arma de fogo (GSR), com a finalidade de identificar atiradores e não-atiradores.

Uma outra área de destaque na química analítica é a determinação de metais traço em produtos alimentícios, considerada uma das principais fontes de exposição aos metais tóxicos. O mercúrio apresenta um caráter potencialmente tóxico, mesmo em baixos níveis de concentração, podendo vir a causar graves doenças aos seres humanos. Dentre os alimentos, o arroz tem recebido especial atenção, visto que este é o segundo alimento mais consumido no mundo. Para que não haja nenhum risco de contaminação quando ingerido através da dieta, é de fundamental importância que a concentração de mercúrio esteja de acordo com os valores estabelecidos pela legislação em vigor. Assim, a terceira parte deste trabalho (Capítulo III) apresenta o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de mercúrio em arroz, utilizando a espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).

Capítulo I: Determinação
Espectrofotométrica de Cocaína
Empregando Análise por Injeção
Seqüencial Acoplado a um Sistema
Fluxo-batelada*

* Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis
Maria José da Silva, Edijane V. dos Anjos, Ricardo S. Honorato, Maria Fernanda Pimentel, Ana Paula S. Paim,
Analytica Chimica Acta 629 (2008) 98–103

I.1. INTRODUÇÃO

I. 1.1. COCAÍNA

A cocaína, metilbenzilecgonina, é uma substância de origem vegetal, encontrada nas folhas da coca, plantas do gênero *Erythroxylon*. Estando presente em um teor de 0,5% a 1%.

A cocaína é classificada como alcalóide, substância que contém em sua composição uma base nitrogenada cíclica, capaz de formar sais na presença de ácidos inorgânicos com atividade farmacológica definida [1]. O cultivo das plantas de coca existe há mais de 300 anos, em regiões de clima tropical da América do Sul, em particular os Andes, onde viviam os povos incas, que mascavam folhas de coca para uso em rituais religiosos, sociais e curativos medicinal. Era conhecida como a “planta divina dos incas [2].

A extração do princípio ativo, só ocorreu em 1855 e foi realizada por Friedrich Gaedecke, após 4 anos foi isolada por Albert Nieman, e denominada de cocaína. A substância, cuja estrutura é mostrada na Figura 1, apresentou atividade farmacológica, como agente simpatomimético, estimulando a liberação de noradrenalina e inibindo sua recaptação nas terminações nervosas adrenérgicas. [3].

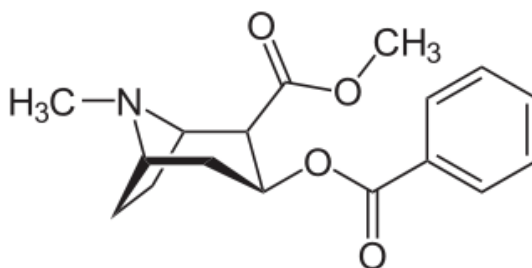


Figura.1-Estrutura da cocaína metil-1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo [3,2,1]-octano-2-carboxilato

A partir do século XIX, a droga teve seu uso difundido na Europa, como um energético indicado para o tratamento de depressão, fadiga, neurastenia e dependência de derivados do ópio. A cocaína passou a ser vendida sob várias formas, nas farmácias, como medicação, além de ser encontrada em bares, na forma de vinho e refrigerante [1,4,5]. Durante a Segunda Guerra Mundial, o uso da cocaína se tornou mais freqüente sendo considerada uma droga potencialmente abusiva com efeito estimulante no Sistema Nervoso Central (SNC), propiciando dependência aos usuários. A droga pode ser aspirada, fumada ou injetada [6]. Até 1903, a Coca-Cola® era um xarope preparado à base de cocaína. Nessa época, os fabricantes, preocupados com o risco de dependência, retiraram a cocaína da fórmula, substituindo-a por cafeína. Em 1914, a venda e o uso de cocaína

foram proibidos. Houve períodos de grande consumo desta droga no passado, mas depois que foram demonstrados os seus efeitos prejudiciais ao organismo, o consumo quase desapareceu, retornando a partir dos anos 1960. Hoje em dia, vive-se o pico de uma nova epidemia [7].

I.1.1.1 As Diferentes Formas de Apresentação da Cocaína

A folha da coca pode ser consumida de diferentes formas. O "vinho de coca", preparado à base da planta, foi considerado na Europa uma bebida muito reconfortante e de grande uso social. O Papa Pio XI agraciou o principal fabricante deste vinho. A cocaína foi usada como medicamento até o início do século XX [8].

A planta da coca também pode ser usada sob a forma de chá, legal em alguns países da América do Sul, como Peru e Bolívia. Sob a forma de chá, o teor de cocaína que é extraída da folha é muito baixo. Após sua ingestão por via oral a cocaína é ainda metabolizada no organismo, destruindo boa parte da cocaína antes de chegar ao cérebro.

A cocaína se apresenta basicamente em três diferentes formas: pasta base, crack e cocaína pó. A pasta de coca é um produto grosseiro, obtido das primeiras fases de extração de cocaína das folhas da planta. Sua obtenção é realizada empregando técnicas rudimentares de extração, onde as folhas secas de cocaína são maceradas em querosene ou gasolina. A seguir, os fragmentos são separados por filtração. Ao filtrado, adiciona-se uma solução diluída de ácido sulfúrico, e a cocaína protonada na forma de um sal é extraída na fase aquosa, por partição, onde boa parte dos demais produtos de extração mantém-se na fase orgânica. Separadas as fases, adiciona-se um álcali (ex: NH_4OH), até obter-se um pH neutro. Essa pasta contém muitas impurezas tóxicas e é fumada em cigarros chamados “basukos” [9].

Para a obtenção da pasta base de cocaína, os fabricantes se baseiam nas propriedades físico-químicas, em particular na diferença de solubilidade entre seu sal (cloridrato de cocaína) que é bastante solúvel em água e a forma de base livre solúvel em solventes orgânicos [10] (Figura 2).

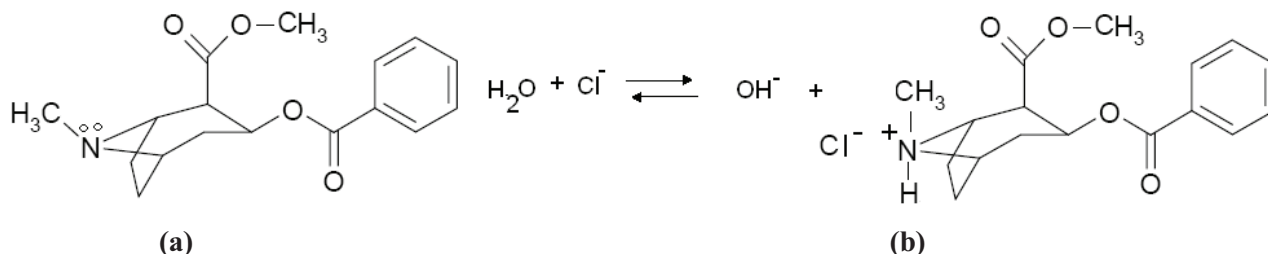


Figura. 2- Fórmulas estruturais: (a) Base livre (b) Cloridrato de cocaína

Com esse procedimento, o sulfato de cocaína retorna à forma de base livre e precipita. Após a filtração, descarta-se o filtrado e obtém-se a pasta base. Com mais algumas etapas químicas a cocaína é purificada e comercializada na forma de base livre (20 a 85% de pureza) ou na forma de sal (30 a 98% de pureza). Após adição de HCl, produzindo o cloridrato de cocaína, que se apresenta como pó branco, amargo e inodoro, popularmente conhecido como “pó”, “farinha”, “neve” ou “branquinha”[11]. Pode ser aspirado ou injetado na veia, por ser solúvel em água, mas devido a sua volatilidade não pode ser fumada [6,11].

Quando o cloridrato de cocaína é tratado com $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ou NaHCO_3 , se obtém uma nova forma de apresentação da cocaína, o “crack”, que na verdade é a cocaína, na forma de base livre, combinada com outros sub-produtos. O “crack” recebeu este nome devido ao som que ocorre com a queima da droga, enquanto é fumada, ocorrendo decomposição do carbonato ou bicarbonato [12]. Esta forma causa uma maior dependência química, devido o pulmão ter uma grande capacidade de absorção e a cocaína entrar na corrente sanguínea instantaneamente, atingindo o cérebro rapidamente [13].

I.1.1.2. Consumo de Cocaína no Brasil e no Mundo

Atualmente existe uma grande preocupação no âmbito da saúde pública, já que segundo dados da Organização das Nações Unidas a cocaína é a segunda droga ilícita mais consumida em todo mundo, atingindo cerca de 14,3 milhões de pessoas de todas as classes sociais. O tráfico, o comércio ilícito e o consumo desta substância contribuem significativamente para as altas taxas de criminalidade verificadas nos locais de circulação da droga [14,15].

Segundo o relatório anual do Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC) os países que lideram a produção de cocaína são a Colômbia (48,3%), seguida do Peru (33,5%) e Bolívia (17%) Entre os maiores consumidores estão os Estados Unidos, Dinamarca, Espanha, Irlanda, Itália e Reino Unido. O Brasil está entre os países mais citados na rota de tráfico da cocaína. A droga sai da América do Sul com destino à Europa via Oeste da África e tem o Brasil como principal rota, devido aos laços culturais, lingüísticos, comerciais e geográficos com os países da África [16].

Embora o Brasil não esteja entre os maiores consumidores, o número de usuários tem crescido a cada ano, estima-se que 870 mil consumidores fazem uso da cocaína, cerca de 0,7% da população brasileira com idades entre 15 e 64 anos [17].

Segundo a Junta Internacional Fiscalizadora de Entorpecentes (JIFE) em 2009 [18] os índices de apreensão de cocaína nos Países da América Latina aumentaram consideravelmente em relação

ao ano de 2007. Comparativamente, os índices tiveram aumentos de 100%, 57% e 45% no Peru, Colômbia e Bolívia, respectivamente.

Uma evolução das apreensões de cocaína no período de 2001 a 2009 demonstra que o consumo da droga em suas diferentes formas no Brasil tem aumentado consideravelmente, conforme mostra a Tabela 1, o que contribuiu para o aumento do consumo da droga e de seus derivados no país. Em 2008, as apreensões totalizaram 19,7 toneladas, um aumento de cerca de, 15% em relação ao ano anterior. As apreensões de cloridrato de cocaína vêm apresentando aumento significativo quando se comparam as apreensões realizadas nos anos de 2001 a 2009. Com relação ao crack e à pasta base, suas apreensões permaneceram relativamente estáveis de 2001 a 2006, mas depois desse período aumentou significativamente o número de apreensões. As apreensões de pasta base de cocaína, também aumentaram de 2008 para 2009 em cerca de 180 % [18]

Tabela.1 – Apreensões de cocaína (kg) e seus derivados feitas pela Polícia Federal Brasileira

Droga	Ano								
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Cocaína pó	8.326	9.144	9.503	7.199	15.656	14.000	17.000	19.700	18.800
Crack	109	156	136	100	125	45	578	92	537
Pasta base	676	281	380	573	302	320	1100	500	1400

*Fonte: United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2001-2009

I.1.1.3. Vias de Administração e Farmacocinética

Existe uma estreita relação entre a via de administração, a concentração plasmática no sangue e a duração e intensidade dos efeitos da cocaína no organismo. Em geral, quanto maior a absorção da droga, mais rápido e intenso serão os efeitos farmacológicos, porém apresentam curta duração. A Tabela 2 descreve a concentração plasmática de cocaína em diferentes vias de administração associada ao tempo de duração do efeito da droga [19,20,21]

Via oral (folhas de coca mascadas ou na forma de chá) – É a menos nociva por produzir baixos níveis de concentrações e por ser absorvida lentamente pelo organismo. Isso ocorre porque a cocaína é ionizada no estômago, sendo absorvida só quando atinge o intestino delgado, onde predomina a forma não ionizada. No fígado a maior parte da droga é absorvida e metabolizada, alcançando o cérebro apenas 25% da cocaína ingerida, após um longo período [22].

Respiratória (cocaína em pó ou pedras) – A cocaína quando utilizada por aspiração nasal na forma de pó, produz baixos níveis de concentrações plasmáticas, devido à baixa velocidade de absorção. As principais causas para isso são as propriedades vasoconstritoras e a baixa difusão pelas membranas nasofaríngeas. A cocaína quando fumada na forma de pedras de “crack” origina além da cocaína, outros produtos de pirólise que são absorvidos rapidamente pelo pulmão, com efeito farmacológico intenso, porém curto. Entre todas as vias de administração é a que gera maior dependência aos usuários e está mais disponível para os consumidores, devido ao baixo custo [23].

Endovenosa (injetada na forma cocaína em pó dissolvida em água) – A cocaína é absorvida, imediatamente, pela corrente sanguínea, produzindo um efeito rápido e intenso. É considerada a via mais nociva, pois favorece grande risco de transmissão de infecções (AIDS e hepatite) [24].

Tabela 2- Tempo de ação da droga para as diferentes vias de administração

Via	Administração Apresentação	Dose da droga mg kg ⁻¹	Duração do efeito (min)	Concentração plasmática (ng mL ⁻¹)	Biodisponibilidade (% absorvida)
Oral	Folhas de coca	2	60	60	20
Intranasal	Cocaína em pó	106	30	220	20-30
Intravenosa	Cocaína diluída em água	200	< 5	500-1100	100
Pulmonar	Pasta base e “crack”	40	< 5	50-350	60-70

I.1.1.4. Produtos de Biotransformação e Eliminação do Organismo

A cocaína pode se decompor no organismo pela reação parcial de hidrólise dos grupos ésteres, formando principalmente o éster benzoilecgonina (C₁₆H₁₉NO₄) e éster metilecgonina (C₁₀H₁₇NO₃), além dos produtos minoritários da degradação da cocaína, a norcocaína (C₁₆H₁₉NO₄) e ecgonina (C₉H₁₅NO₃). Outros metabólitos podem ser gerados, como o cocaetilen (C₁₈H₂₃NO₄) proveniente da transesterificação da cocaína pelo uso do etanol e o anidroecgonina (C₉H₁₃NO₂) formado pela hidrólise de um dos produtos da pirólise da cocaína (“crack”), o éster metil anidroecgonina (C₁₀H₁₅NO₂) [10].

Caso a hidrólise ocorra através das enzimas plasmática e hepática sobre o grupo benzoil da cocaína haverá a formação do éster metilecgonina. Quando o grupo metil éster da cocaína é hidrolisado dois mecanismos possíveis podem ocorrer para produzir a benzoilecgonina. O primeiro

não enzimático em pH fisiológico e o segundo através das enzimas carboxilesterases do fígado e do plasma.

Após a rápida metabolização da cocaína pelo fígado, apenas 3% da forma original é eliminada do organismo pelos rins, tendo como produto majoritário o metabólito benzoilecgonina (15-50%) com o tempo de meia vida biológica que pode durar de 5 a 8 h. Em seguida aparece a éster metilecgonina (15-35%), a ecgonina (1-8%) e a norcocaína (2-6%) que apresenta atividade biológica semelhante à cocaína. A Figura 3 descreve os principais produtos da biotransformação da cocaína [25,26].

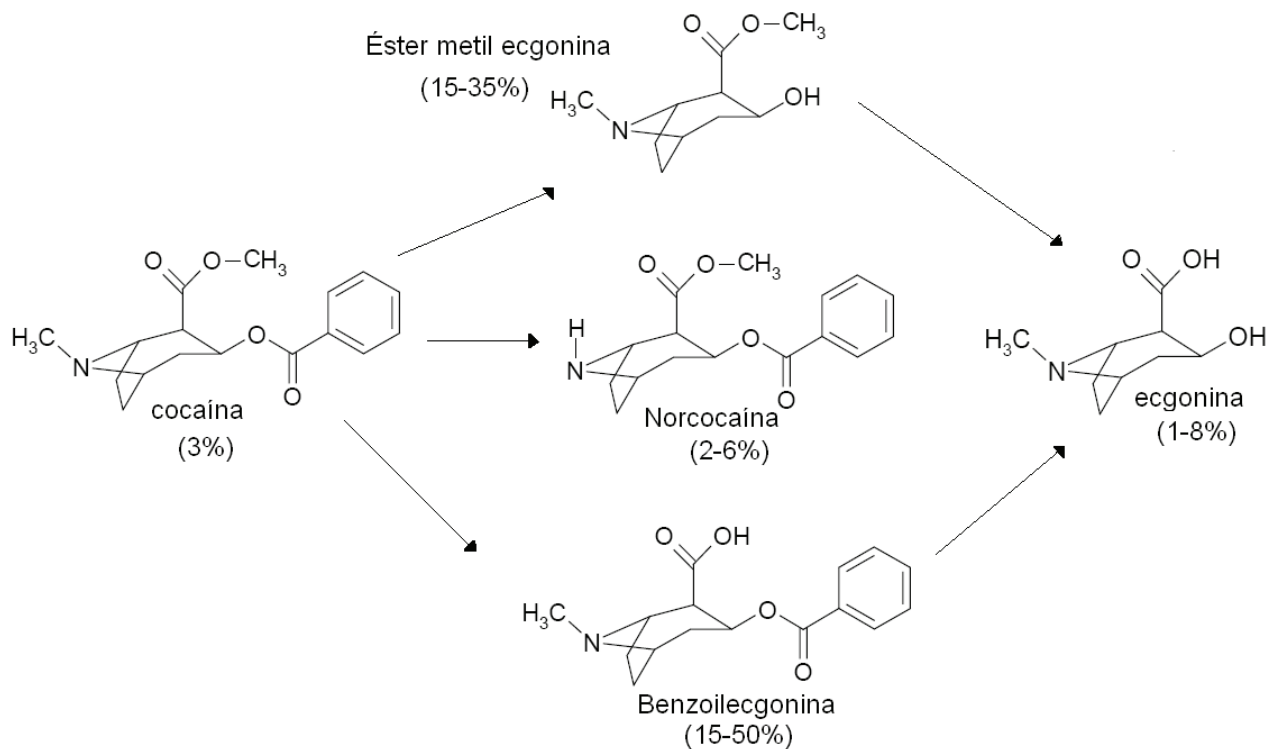


Figura. 3– Esquema dos principais produtos da biotransformação da cocaína

I.1.1.5. Mecanismo de Ação e Efeitos Causados pelo uso da Cocaína

A cocaína está entre as drogas de abuso com maiores potenciais, devido sua propriedade anestésica local e estimulante sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), proporcionando uma sensação intensa de prazer, euforia e poder. Isso ocorre porque a sinapse, região de comunicação entre os neurônios, possui vários neurotransmissores. Entre eles a dopamina, um precursor natural da adrenalina e da noradrenalina, que são hormônios que tem atividade estimulante.

Devido ao fato da cocaína inibir a recaptura da dopamina, aumenta assim sua biodisponibilidade no SNC, que em excesso provoca a maioria dos efeitos farmacológicos da cocaína. Para minimizar esse acúmulo de dopamina, o organismo envia receptores que diminuem a sua síntese e liberação, ocasionando ao usuário fadiga e depressão. O desequilíbrio provocado pela

presença de cocaína no SNC é o principal responsável pela busca de doses mais elevadas da droga e o uso mais freqüente para registrar o mesmo nível de prazer experimentado durante a sua utilização inicial, caracterizando uma maior dependência [27, 28].

A administração repetida de cocaína por um período de tempo longo, pode acarretar aos usuários irritabilidade, tremores, vertigem, contrações musculares, crises de ansiedade e pânico, apatia sexual, transtornos alimentares (bulimia e anorexia nervosa), diminuição da memória e da concentração. Podem ainda experimentar a chamada "psicose da cocaína", similar à psicose esquizofrênica, com idéias delirantes de tipo persecutório e alucinações auditivas e/ou visuais [29].

Altos teores de cocaína no organismo podem provocar complicações irreversíveis como acidentes vasculares cerebrais, convulsões, e até mesmo a morte por paralisia do sistema respiratório. Entretanto, a quantidade necessária para provocar uma overdose depende bastante do grau de pureza da droga, forma de administração e da susceptibilidade da pessoa. Embora a dose letal encontre-se entre 0,2 e 1,5 g de cocaína pura, quantidades inferiores podem levar a morte súbita ou mesmo superiores podem não levar a morte. Segundo dados do NIDA (Instituto Nacional do Abuso de Drogas dos EUA) os internamentos de urgência por overdose de “crack” aumentaram substancialmente nos últimos anos [30].

Outro grande problema encontrado pelos usuários de cocaína é a adulteração. A cocaína é comercializada por peso, diversas substâncias são acrescentadas ao produto inicial com o objetivo de aumentar o lucro dos traficantes. Assim a droga chega ao consumidor final com grande percentual de impurezas.

Os mais variados produtos são usados no preparo da cocaína, tais como, soda cáustica, solução de bateria de carro, água sanitária, cimento, pó de vidro, pó de mármore, açúcares, amido, sais de baixo custo, talco, cafeína, lidocaína, xilocaína, benzocaína e procaína [31,32]. Estes aditivos ocasionam uma variação do teor de cocaína entre 15% e 90%, sendo difícil à determinação segura da dose de cocaína. Além disso, a variabilidade na concentração de cocaína é um fator de risco adicional, já que doses maiores que as habituais podem ser empregadas inadvertidamente, podendo ser letais [33].

I.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS E TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA

Durante os últimos anos, foram propostas várias técnicas para determinação de cocaína em amostras biológicas, tais como urina [34], cabelo [35], sangue [36], saliva [37] e em amostras de cocaína apreendidas [31,38]. Dentre as técnicas mais empregadas estão: Cromatografia Gasosa (GC) [39], Eletroforese capilar (EC) [39], Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [40], Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS) [41],

Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) [42], Espectrometria de Absorção Atômica em forno de grafite [43], Cromatografia Gasosa Capilar [44] e Voltametria Cíclica [45]. A metodologia recomendada pela maioria dos órgãos internacionais para determinação da cocaína baseia-se em Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (GC-FID) [46] e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de massa (GC-MS) [39,47], as quais são largamente empregadas por serem poderosas técnicas de separação. Outras técnicas semelhantes como Cromatografia Líquida com Espectrometria de massa (LC-MS) [39,48] também é empregada.

Embora as técnicas cromatográficas sejam amplamente empregadas, em geral consomem tempo e são complexas, requerendo do analista, experiência para operar o instrumento e interpretar os resultados. Além disso, a escassez de instrumentos analíticos em laboratórios forenses devido ao custo operacional ainda tem sido um grande problema. Assim, para identificar a presença de cocaína em uma amostra, muitas vezes faz-se necessário passar por uma sistemática que envolve uma série de testes de constatação preliminar.

Alguns reagentes são usados para indicar a presença de diversas drogas, enquanto outros são mais específicos para constatação preliminar de cocaína [49,50]. Entre os testes mais empregados, o teste Scott tem se destacado entre os métodos qualitativos para identificar cocaína por ser considerado um teste bastante rápido e simples. Desenvolvido por Scott, em 1973 [51], após alguns anos o teste passou a ter uma melhor seletividade [52].

O método, conforme mostra a Figura 4, consiste em três etapas, cada uma envolvendo a adição de um reagente que na presença de cocaína resulta em uma mudança de coloração. Na primeira etapa, o tiocianato de cobalto $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ é adicionado numa solução contendo cocaína e forma um precipitado de coloração azul. Na segunda etapa, o ácido clorídrico é adicionado e o precipitado azul desaparece completamente. Por fim, na última etapa o clorofórmio é adicionado, formando-se imediatamente duas fases, reaparecendo a cor azul na fase inferior que contém o clorofórmio [53].

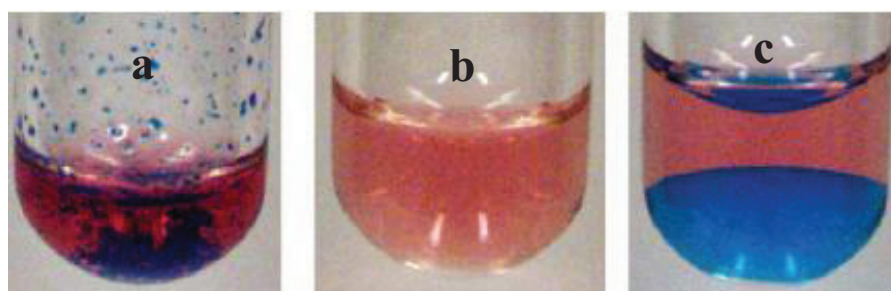
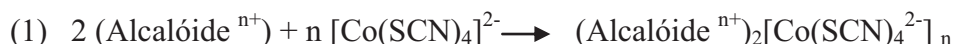


Figura.4- Etapas do método Scott (a) $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ e cocaína; (b) adição de HCl e (c) adição de CHCl_3

A reação entre a cocaína e o $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ em meio ácido é conhecida como teste de Scott. Consiste na protonação do átomo de nitrogênio presente na cocaína, facilitando a formação do íon par. O mecanismo da reação entre o tiocianato de cobalto e alcalóides de uma forma geral foi

proposto por Nerin [54] e que está na descrita na equação 1. Entretanto a estrutura exata do complexo formado pela reação entre a cocaína e o tiocinato de cobalto, ainda não foi elucidada.



Stainier em 1974 [55] propôs que o mecanismo da reação dependerá do meio reacional e do metal que irá se ligar ao alcalóide, podendo formar dois complexos possíveis. Para o tiocianato de cobalto que foi utilizado neste trabalho, em meio básico, formará o complexo (alcalóide-H)₂[[Co(SCN)₄] de coloração azul, solúvel em clorofórmio e insolúvel água. Em meio ácido, o tiocianato de cobalto reage com a cocaína gerando o complexo [Co(alcaloide)₂](SCN)₂, solúvel em água e clorofórmio, de coloração rosa ou marrom avermelhado. Em 1998 Elsherbini realizou um estudo da cocaína em meios ácido e básico, além de descrever métodos específicos para separar a cocaína base e adulterantes presentes e métodos para identificar e quantificar a cocaína base [56]

Trabalhos relatam a falta de especificidade do teste. Alguns tipos de drogas e medicamentos, os quais podem produzir resultados semelhantes aos da cocaína [57]. No entanto, estudos realizados com 105 substâncias mostraram que em nenhum dos testes realizados apresentou a mesma sequência de cores, sendo considerado por vários autores como um teste confiável para identificar cocaína, amplamente usado em laboratórios forenses em que a análise é requerida e que não possuem os equipamentos adequados para tal análise [58].

Existe uma preocupação cada vez maior, no campo das ciências analíticas, em aumentar a eficiência e melhorar os parâmetros de desempenho (precisão, exatidão, frequência analítica, redução do volume de resíduos gerados e diminuição da intervenção humana nas análises) dos métodos analíticos. Nesse contexto, a análise em fluxo tem ocupado um papel importante na química, investindo menos tempo e recursos para se realizar as determinações.

I.1.3. ANÁLISE EM FLUXO

A análise em fluxo surgiu em 1957 e foi proposta por Skeggs. O sistema se baseava no fluxo contínuo segmentado (SFA) e era usado para realizar a monitorização contínua dos parâmetros analíticos em um sistema onde as soluções dos reagentes e da amostra eram bombeados em direção a um detector [59].

Em 1975 surgiu a análise por injeção em fluxo (FIA), proposta por Ruzicka e Hansen [60], neste sistema, pequenos volumes de amostra eram introduzidos de forma intermitente/discreta num fluido transportador e direcionados até o detector. Durante sua trajetória, a alíquota da amostra se

dispersava na solução transportadora, gerando uma variação temporal de concentração a qual era monitorada no detector.

Alguns anos depois, em 1985 surgiu a análise em fluxo monossegmentado (MSFA) proposta por Pasquini e Oliveira [61]. Consiste em isolar a zona reacional (soluções de amostra e reagente) entre duas bolhas de ar, evitando a dispersão da solução da amostra com o fluido transportador e minimizando a contaminação e a diluição e aumentando a sensibilidade do método.

Em 1990, Ruzicka e Marshall [62] propuseram um sistema de análise por injeção seqüencial (SIA), como alternativa aos procedimentos FIA, onde as soluções de amostra e reagentes são seqüencialmente aspiradas para uma bobina de armazenamento, através de uma válvula de seleção. Após a rotação desta válvula e a reversão do fluxo, a mistura é bombeada em direção ao detector. Sua principal característica é a possibilidade de reversão do sentido do fluxo. Assim, estes sistemas apresentam como grande vantagem, a flexibilidade na execução de procedimentos analíticos, com apenas a mudança da programação do fluxo sem ser necessário reconfigurar todo o sistema. Apresentam também simplicidade instrumental, facilidade de automação, baixo consumo de reagentes, além de ser muito empregado para determinações sequenciais de vários analitos [63].

Uma nova estratégia de inserção de soluções denominada multicomutação em fluxo [64], surge em 1994. Consiste na utilização de um conjunto de dispositivos de inserção que podem ser válvulas solenóides, mini-bombas solenóide ou válvulas de estrangulamento (pinch ou clamp valves). Estes dispositivos formam um número variado de linhas de fluxo, atuando cada uma delas como um comutador independente, através das quais soluções de amostras e reagentes sofrem diferentes operações analíticas (mistura, separação, concentração etc.) antes de atingirem o detector. Com características similares ao sistema SIA, como reversão do sentido do fluxo e mudança na programação.

Posteriormente, foi desenvolvido em 1999, o sistema de análise fluxo-batelada, que se caracteriza por explorar estratégias inerentes a sistemas em fluxo e em batelada (discreto) [65]. Nesse sistema, a amostragem e o transporte das soluções dos reagentes e amostra ocorrem em fluxo. Todavia, diferentemente dos sistemas em fluxo tradicionais, os reagentes são bombeados para uma câmara, onde se desenvolve a reação sem fluxo e só após a completa reação, o fluxo retorna e o produto resultante é enviado ao detector.

Em algumas variações, o detector é inserido na própria câmara [66], o que potencializa o universo de aplicações. Os sistemas de análise em fluxo são conhecidos mundialmente como um meio eficaz para o gerenciamento de soluções, onde seu uso tem crescido exponencialmente em laboratórios de rotina. O uso cada vez mais freqüente de sistema em fluxo nos laboratórios, deve-se ao fato de diferentes e eficientes estratégias para separação de interferentes, concentração/diluição

do analito, transformação química da amostra e adição de reagentes, e também são facilmente implementados. Além de apresentarem, em geral, alta frequência analítica, simplicidade e baixo consumo de reagentes e custo instrumental [67].

Fernández-Abedul e García em 1996 [68] descreveram a determinação de cocaína em amostras confiscadas pelas autoridades, empregando sistema FIA com detecção amperométrica, em pH alcalino. O método consiste na oxidação da cocaína, onde um elétron proveniente do par de elétrons do átomo de nitrogênio é perdido, seguido da hidrólise, formando uma amina secundária e uma cetona como produto. O volume de amostra injetado foi de 200 μL e o limite de detecção de $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtido com a faixa linear de 2×10^{-7} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo (RSD) de 1,7% foi obtido com a concentração de $6,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A inclinação da curva analítica foi de $3,8 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ e o coeficiente de correlação de 0,999. A frequência analítica foi de 60 análises/hora. Para validação do método os resultados foram comparados com a técnica de cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica na região ultravioleta (UV). O método apresenta como inconveniente, a adsorção na superfície do eletrodo após sucessivas análises, o qual reduz sua atividade e promove uma diminuição do sinal analítico. Em altos potenciais é necessário submeter o eletrodo de carbono a um pré-tratamento devido à evolução de oxigênio. Outro inconveniente é o maior consumo de reagentes, quando comparado com o sistema SIA.

Valcárcel e colaboradores relatam em três trabalhos [69-71] a determinação indireta de cocaína, baseado na precipitação mediante a reação entre a cocaína e diferentes sais inorgânicos. O complexo formado para quaisquer alcalóide é descrito como $(\text{alcalóide } n^+)(\text{BiI}_4^-)_n$. A técnica empregada foi a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) acoplada a Análise por Injeção em Fluxo (FIA).

O primeiro trabalho Eisman e colaboradores [69] desenvolveram em 1992 um trabalho baseado na reação entre os reagentes inorgânicos $[\text{Ni}(\text{SCN})_4]^{2-}$; $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$; $[\text{BiI}]^{4-}$; $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ e $\text{C}_4\text{CrN}_7\text{S}_4$ com a cocaína e seus metabólitos, resultando na formação de diferentes pares iônicos. O método proposto consistiu em uma extração (líquido-líquido), realizada em fluxo contínuo. Foram realizados experimentos para avaliar a eficiência destes reagentes na determinação da cocaína. Os reagentes $[\text{BiI}]^{4-}$ e $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ apresentaram maior sensibilidade e o $[\text{Ni}(\text{SCN})_4]^{2-}$ não se mostrou adequado para extração da cocaína, com um coeficiente de regressão ($R = 0,997$). A maior seletividade foi obtida com o reagente $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$. Neste caso o limite de detecção variou de 0,2 a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 8$) e a faixa linear variou de 1 a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaína e a frequência analítica foi de 20-30 análises hora⁻¹. Entretanto, o método não permitiu a identificação dos metabólitos metilésterecgonina e benzoilecgonina individualmente. Quando a cocaína é administrada via oral, intranasal ou endovenosa, apenas 4 a 10 % da substância é excretada pela urina. A maior parte,

cerca de 50 a 60 % é excretada como metilésterecgonina e benzoilecgonina. Além disso, o método não foi aplicado em amostras reais.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa [70] realizaram um método de precipitação em fluxo, utilizando como reagente o Dragendorff's $[\text{BiI}]^{4-}$. A reação de precipitação ocorreu entre cocaína, papaverina e estricnina. O método proposto foi aplicado em amostras farmacêuticas (ampolas injetáveis) de papaverina. O método consistiu na determinação da concentração da cocaína após a precipitação com o reagente de Dragendorff's $[\text{BiI}]^{4-}$. A concentração era diretamente proporcional à diminuição da absorbância. O método apresentou uma frequência analítica de 100 análises hora^{-1} , um limite de detecção de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a cocaína, faixa linear de 6 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaína e o RSD de 1,1% ($n = 11$). Comparando o método de precipitação em fluxo com o método de extração em fluxo, citado anteriormente por Valcárcel, verificou-se que a sensibilidade para a cocaína foi 10 vezes maior pelo método de extração. Entretanto, a frequência analítica para o método de precipitação foi cinco vezes superior. A cocaína apresentou maior seletividade em meio ácido (HCl) com pH 3, embora não fosse esta a condição em que se obtivesse melhor sensibilidade. O método foi aplicado em amostras de produtos farmacêuticos de uso oral e injetável, mas apenas para a determinação de papaverina. A precisão e exatidão foram equivalentes aos valores certificados.

No último trabalho em 1994, Eisman e colaboradores [71] determinaram papaverina e cocaína usando um sistema de precipitação em fluxo reversível com o reagente de Reinecke's ($\text{C}_4\text{CrN}_7\text{S}_4$). A extração do complexo ocorreu em pH 5 para evitar a interferência de outras drogas que poderiam precipitar juntamente com o analito. O método proposto foi aplicado em amostras de produtos farmacêuticos. Entretanto não foi possível aplicar o método direto para duas amostras, devido à recuperação ter sido inferior a 80% em relação aos valores de referência. Para determinar cocaína e papaverina nessas amostras foi usado o método de adição de analito. A frequência analítica foi de 150 análises hora^{-1} , limite de detecção de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaína e o RSD de 3,2% ($n = 11$). Comparando o método de precipitação com o método de extração citado anteriormente, pode-se inferir que a afinidade pela cocaína foi maior utilizando o método de extração. A sensibilidade foi maior para a cocaína quando o método aplicado foi de extração. As faixas lineares foram de 10 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de 50 a $850 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaína para o método de extração e de precipitação, respectivamente. A seletividade foi semelhante para ambos os métodos, embora no sistema onde foi utilizado a extração, houvesse a interferência de lidocaína, amilocaína e bromexina. A frequência analítica foi 5 vezes maior em comparação ao método de extração. Em todos esses trabalhos citados, empregando espectroscopia absorção atômica em chama (FAAS), havia a necessidade de uma fase extratora no sistema e a presença de um filtro, o que tornava o sistema mais complexo.

Não foram encontrados na literatura, trabalhos envolvendo análise por injeção sequencial (SIA) para a determinação de cocaína. Mas é possível citar alguns trabalhos em outras aplicações, para matrizes distintas.

Galhardo e Masini em 2001 [72] realizaram o monitoramento *in situ* de Fe(II), Fe(III), NO_3^- e NO_2^- em águas naturais na presença de sedimentos. A amostragem foi realizada com o uso de um filtro tangencial e a redução do nitrato e Fe (III) ocorreu em uma coluna redutora conectada a válvula de seleção. Posteriormente o nitrito foi determinado de acordo com a reação de Griess-Ilosvay e o Fe (II) através da complexação com a 1,10-fenantrolina. O RSD foi de 0,8% ($n = 85$) e a frequência analítica de 20 determinações por hora. A faixa linear avaliada variou de 0,01 a 1 mg L^{-1} considerando todas as espécies. O limite de quantificação variou de 0,01 a 0,1 mg L^{-1} .

Também foi realizado um trabalho por Silva e Masini em 2002 [73], envolvendo Análise em Fluxo Monosegmentado (MSFA) combinado com o SIA, cujo objetivo foi determinar ferro em suplementos alimentares. O método realizou diluição em linha e adição de padrão. Para determinação de Fe (II) apenas um padrão foi usado, com diferentes diluições do mesmo. O procedimento consistiu em misturar o padrão e amostra em uma pequena câmara, para homogeneizar a mistura. Devido à completa mistura entre os reagentes e as zonas da amostra, não houve dispersão da zona de reação. As diluições foram realizadas com o azul de bromotimol, explorando a reação entre Fe (II) e 1,10-fenantrolina, com detecção espectrofotométrica. O limite de detecção foi de 0,025 mg L^{-1} e a frequência analítica de 30 amostras h^{-1} .

O SIA também mostrou ser eficiente para a determinação de carbono inorgânico e orgânico total, dissolvido em água doce, de acordo com Tue-Ngeun e colaboradores em 2005 [74]. O sistema consistia em aspirar alternadamente alíquotas de soluções de amostra e de ácido peroxidissulfato em direção à bobina reacional, formando no total 10 zonas de amostra para cada análise realizada.

O produto foi enviado para um fotoreator de radiação ultravioleta (UV) a fim de digerir o carbono orgânico dissolvido (DOC). Em seguida para determinar o teor de carbono inorgânico (DIC) alíquotas de soluções de amostra e ácido sulfúrico novamente foram inseridas na bobina reacional.

O DIC foi convertido em CO_2 e este foi bombeado através de uma unidade de difusão a gás que contém uma membrana de politetrafluoretileno e absorvido após reação com um fluxo acetor do indicador básico vermelho de cresol. O produto formado foi enviado para o detector e o sinal de absorbância foi registrado. A presença do CO_2 ocasionou uma diminuição no sinal de absorbância. Para determinar o teor de (DIC+DOC), apenas alíquotas das soluções amostra/reagente foram introduzidas e enviadas para o fotoreator. O teor de DOC foi calculado pela diferença entre os teores de (DIC+DOC) e DIC. A faixa linear para ambos foi de 0,05 a 5,0 mg L^{-1} e os RSD ($n = 3$)

obtidos foram menores que 7%. O limite de detecção ($b + 3\sigma$) encontrado foi de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ e a frequência analítica de 8 determinações por hora.

Segundo e Rangel em 2003 [75] empregaram o sistema SIA e detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido málico em vinhos. O método foi baseado na detecção da desidrogenase (NADH) formada na reação catalisada pela malatodesidrogenase (MDH) e NAD^+ . As etapas de fluxo consistiam em aspirar soluções de amostra e NAD^+ seqüencialmente para a bobina reacional e após reversão de fluxo enviar a mistura para o detector. Depois um determinado período de tempo, o fluxo foi interrompido e foi realizada a aquisição de sinais. Em seguida a bomba foi reativada e a célula de fluxo foi lavada. O estudo da cinética de reação mostrou que a ordem de inserção da amostra e reagente interferiu nos resultados. Logo, a melhor resposta foi obtida iniciando com a inserção da solução da amostra, para minimizar a diluição. Além disso, foi inserida uma solução de glicina para manter o pH. A consolidação dessa metodologia automatizada se deve principalmente ao baixo consumo de soluções de reagentes e amostras e à simplicidade do instrumento, capaz de ser facilmente adaptado a um ensaio particular, sem a necessidade de modificação do sistema de análise. A faixa linear foi de $0,01$ a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido málico e o limite de detecção de $0,009 \text{ g L}^{-1}$, o RSD variou de 4,5 a 13,8% ($n = 16$). A equação $C_{\text{proposto}} = -0,02(\pm 0,13) + 1,00(\pm 0,06)C_{\text{referência}}$ para um limite de confiança de 95%. A frequência analítica foi de 22 determinações hora^{-1} .

Carneiro e colaboradores no ano de 2002 [76] realizaram a determinação catalítica de Fe (III) em águas de estuários com alta variação de salinidade, usando sistema FB e detecção espectrofotométrica a 554 nm. Como a salinidade das amostras variava, solução de NaCl foi adicionada a cada amostra para permitir um ajuste individual de condutância, proporcionando assim melhores condições de reprodutibilidade. O método baseava-se no efeito catalítico do Fe (III) sobre a oxidação do dicloreto N,N-dimetil-*p*-fenilenodiamino (DMPD) com H_2O_2 . O sistema empregou uma válvula de seleção de 8 portas, as quais eram conectadas a uma porta central. Não foi necessária uma etapa prévia de concentração/separação. O método proposto foi comparado com o método GFAAS. A frequência analítica foi de 30 determinações h^{-1} e o RSD foi menor que 1,5 % ($n = 5$). O limite de detecção calculado foi de $5 \mu\text{L}^{-1}$, a faixa de concentração variou de 15 a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ e o $R = 0,999$.

Almeida e colaboradores em 2003 [77] implementaram o método automático de adição de analito para determinação de ferro em bebidas alcoólicas (cachaça) produzidas no Brasil, usando FB e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama como detecção. A adição de analito foi utilizada devido à composição das amostras de cachaça serem significativamente diferentes, causando efeitos de matriz. As amostras analisadas não necessitaram de qualquer tratamento prévio.

O RSD obtido foi menor que 1% ($n = 6$) e o LOD de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para uma faixa linear de 1 a 7 mg L^{-1} de Fe. A frequência analítica foi de 70 determinações por hora.

Honorato e colaboradores em 2001 [78] determinaram alumínio em plantas utilizando um sistema FB com detecção espectrofotométrica. A metodologia consiste na reação entre o reagente cromogênico, cianina eriocromo R, que reage com alumínio em meio ácido (pH 2-3) produzindo um complexo colorido com o máximo de absorção em 535 nm. Nestas condições, o reagente apresenta uma absorvidade molar alta. Após a formação do complexo e redução do Al(III) pelo ácido ascórbico em condições ácidas, o pH da solução foi ajustado para 6 com solução tampão, visto que a absorção do reagente é fortemente reduzida e assim se obtém condições adequadas para a medida do sinal analítico. O sistema proposto apresentou frequência analítica de 15 amostras h^{-1} R.S.D. 1,0% ($n = 6$). A correlação obtida foi de 0,999 para uma faixa linear de 250 a $6000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de alumínio. Os resultados foram comparados com Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

Recentemente um sistema fluxo-batelada foi proposto por Pasquini e colaboradores [79] para realizar a titulação coulométrica com detecção biamperométrica. A estratégia foi aplicada para a determinação do índice e o número de bromo em uma série de frações típicas do hidrocarboneto da indústria petroquímica (nafta, xilenos, tolueno, p-xileno e benzeno). O fluxo foi direcionado para uma célula de titulação, a qual apresentava dois eletrodos de Pt, formando Br_2 no anodo e H_2 no catodo. O desempenho do sistema de fluxo-batelada foi avaliado a partir de testes de recuperação e a exatidão foi avaliada comparando os resultados obtidos pelo método com o método padrão da ASTM (do inglês, American Society for Testing and Materials). A precisão do sistema proposto variou de 0,5 a 6% para os diferentes hidrocarbonetos estudados ($n = 10$). Os resultados dos testes de recuperações variaram de 92 a 123%.

I.2.OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia eficiente e de baixo custo para determinação do teor de cocaína em amostras resultantes das apreensões por órgãos policiais.

2.2. Objetivos específicos

Desenvolver um sistema de análise em fluxo, explorando as estratégias de análise por injeção sequencial e fluxo-batelada, bem como detecção espectrofotométrica.

Utilizar um método clássico empregado por órgãos policiais envolvendo reação colorimétrica entre a cocaína e o tiocianato de cobalto (II) em meio ácido, onde há a formação de duas fases: a fase superior que contém o reagente tiocianato de cobalto (coloração rosa) e a fase inferior com o complexo cocaína-tiocianato de cobalto (coloração azul).

Realizar etapas de separação bifásica, extração e detecção em um sistema de análise em fluxo-batelada.

I.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

I.3.1.2. Reagentes e solventes

Todas as soluções foram preparadas com reagente grau P.A (Synth), bem como os padrões usados nas análises por cromatografia pureza (Merck). A água ultrapura, com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

I.3.1.3 Soluções padrão e amostras

A solução $0,29 \text{ mol L}^{-1} [\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ em ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada dissolvendo 6,8 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Synth) e 4,3 g de NH_4SCN (Synth) em água e completando o volume para 100 mL.

A solução estoque de 5000 mg L^{-1} de cocaína foi preparada, a partir de um padrão com 93,6% (m/m), o qual foi purificado pelo Instituto Nacional de Criminalística (INC) do Departamento de Polícia Federal (DPF) utilizando o método padrão recomendado pela Divisão de Drogas e Narcóticos das Nações Unidas (*United Nations Division of Narcotic Drugs* [80]). A sua concentração foi determinada por um padrão certificado da Ceillant analytical Reference Standard. As soluções de referência foram preparadas a partir de diluição adequada da solução estoque de 5000 mg L^{-1} e a concentração variou de 100 a 1000 mg L^{-1} de cocaína.

Após alguns testes com outros solventes (éter, etanol, acetona e água), o clorofórmio foi o solvente que permitiu uma maior solubilidade. Logo, as amostras reais foram preparadas dissolvendo 0,07 g da amostra de cocaína em 100 mL de clorofórmio (Merck), o qual foi o melhor solvente para obtenção de uma mistura bifásica. Todos os experimentos foram realizados no Setor Técnico-Científico da Superintendência Regional do Departamento de Polícia Federal em Pernambuco - SETEC/DPF/PE sob a orientação do perito Dr. Ricardo Saldanha Honorato.

I.3.1.4 Materiais e Equipamentos

Para o sistema em fluxo foi utilizado o instrumento FIALab 3000 (Bellevue, WA, EUA), o qual contém: uma bomba seringa de $2500 \mu\text{L}$, uma válvula seqüencial de seis portas (Valco Instruments Co., Houston, TX) que permite a inserção de soluções de amostra e reagentes; e uma bobina de reação de tubo de Teflon[®] com 300 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,8 mm. Um

microcomputador equipado com uma interface PCL 711S, controlado pela porta USB, foi empregado para realizar a aquisição de dados e para controlar o sistema analítico.

O sistema de detecção utilizado foi um espectrofotômetro com fibra óptica multi-canal PC 2000 (Ocean Optics), o qual apresenta uma fonte de luz de tungstênio-halogênio (LS-1, Ocean Optics Inc.) e um conversor A/D (SAD-500, Ocean Optics Inc.) para acoplar o espectrômetro no computador. O acoplamento óptico se faz por fibras ópticas, responsáveis pelo transporte da radiação da fonte que atravessa a cela de fluxo (câmara reacional), até o sistema de detecção (*charge coupled device* - CCD).

O software do próprio equipamento FIALab foi usado para controlar os volumes de soluções de reagentes e amostra no sistema em fluxo, assim como para realizar a aquisição de dados. Uma válvula de injeção seqüencial foi empregada para inserir soluções de reagentes, amostras e ar diretamente na câmara reacional construída em Teflon®. A Figura 5 apresenta um diagrama do sistema de análise por injeção seqüencial acoplado a câmara reacional fluxo batelada.

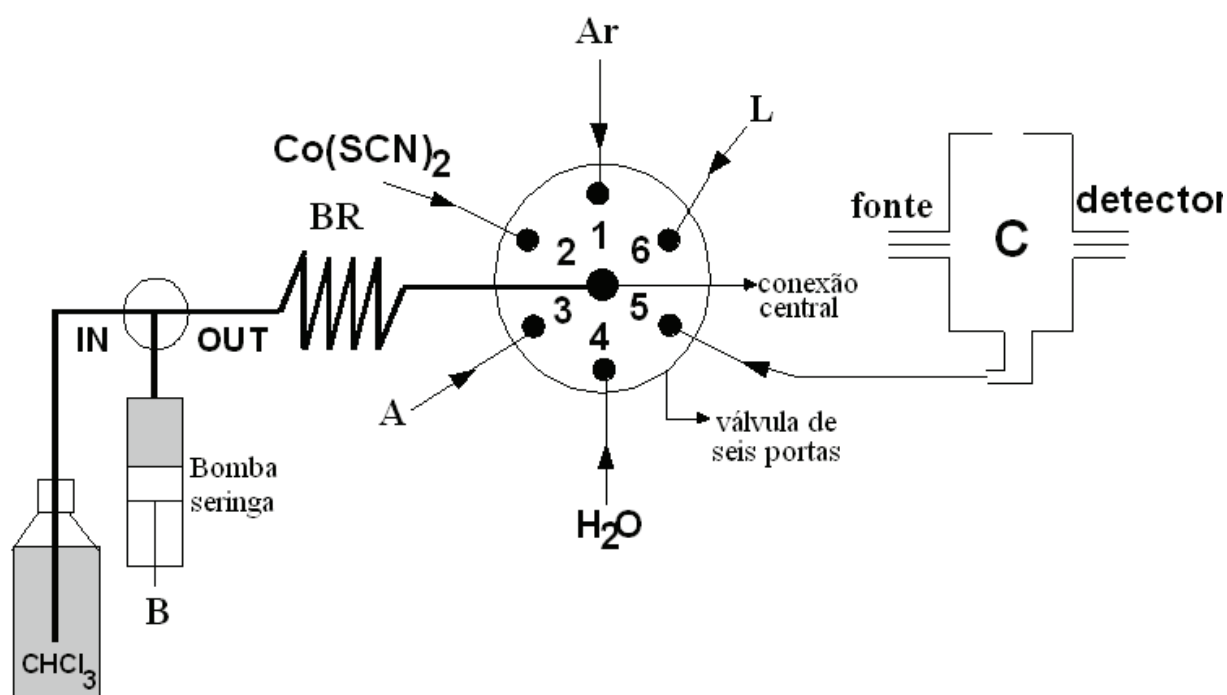


Figura.5 Diagrama do sistema de Análise por Injeção Seqüencial (SIA) acoplado ao fluxo-batelada CHCl_3 , fluido transportador, $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ reagente colorimétrico, B: bomba seringa com vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$, BR: Bobina de reação (300 cm), A: amostra, L: Descarte, C: câmara reacional fluxo-batelada (cuja dimensões está descrita no texto).

I.1.3.5. Sistema Fluxo-batelada

Uma imagem do sistema em fluxo está apresentado na Figura 6.

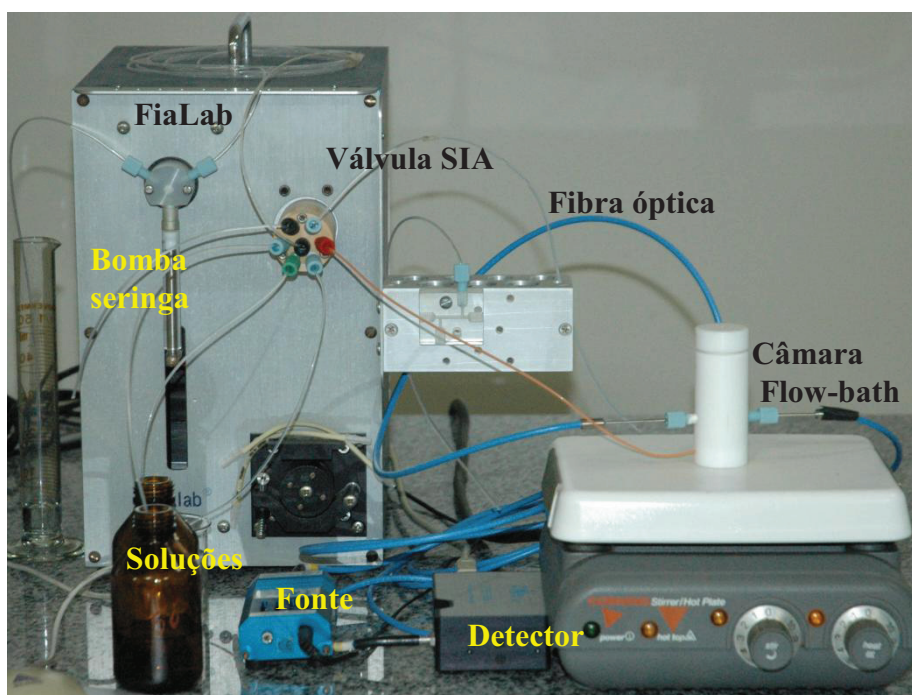


Figura.6- Imagem do sistema em fluxo-batelada empregado na determinação de cocaína

A câmara reacional fluxo-batelada, que também funciona como cela de detecção, conforme mostra a Figura 7, foi construída em Teflon®, com forma cilíndrica de comprimento total de $51,0 \pm 0,5$ mm e diâmetro interno de 8 mm. Bolhas de ar foram introduzidas na base da câmara reacional (S) para promover a mistura das soluções de reagente e amostra que estão em fases diferentes. Na abertura L a fibra óptica incide a radiação na amostra e na abertura CCD a radiação é transmitida ao detector.

Uma abertura na parte inferior da câmara (S) permite a entrada e saída das soluções. Embora o volume total da câmara tenha sido de $2,59 \pm 0,36$ mL, apenas 600 μ L do volume foi preenchido, sendo 200 μ L de solução de reagente e 400 μ L de solução de amostra. Esses volumes foram suficientes para que a fase clorofórmio, onde se encontra o produto da reação, ficasse acima do orifício L e CCD. As soluções e o ar foram inseridos e aspirados, através de um tubo de polietileno (0,8 mm de diâmetro interno) conectado ao orifício S, situado na base da câmara.

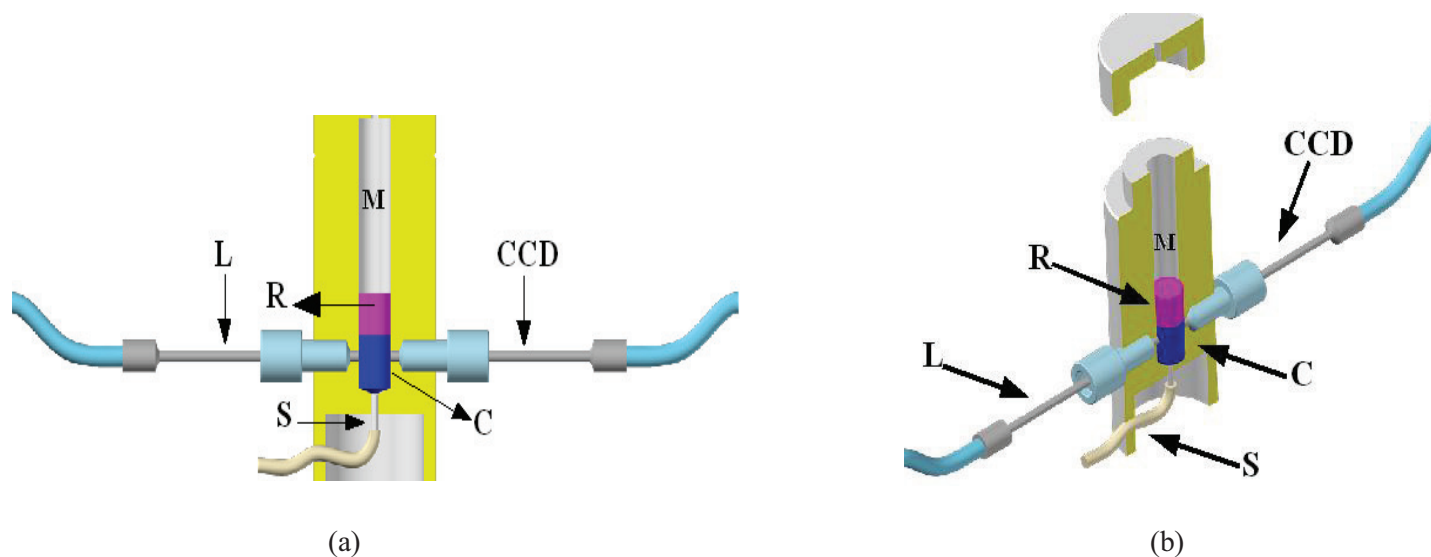


Figura.7-Câmara reacional (a) “corte transversal” (b) vista frontal (tampa conectada). S = entrada e saída da solução; M = volume interno da câmara (51 mm comprimento e 8 mm de diâmetro interno); L = orifício de entrada da radiação; CCD = orifício de saída da radiação conectada a um dispositivo de carga acoplada, R = reagente colorimétrico; C = complexo formado entre a cocaína e o tiocianato

I.3.1.6. Procedimento analítico

Antes de iniciar a análise, o reagente $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ e o clorofórmio foram enviados para a câmara reacional para a aquisição do sinal do branco. Na Tabela 3 estão descritas todas as etapas para a determinação de cocaína empregando análise por injeção sequencial e fluxo-batelada.

Na sequência são aspirados, em direção à bobina de reação (BR), 500, 200 e 400 μL de ar, soluções de reagente e de amostra, respectivamente (etapa 1-3), que em seguida são enviados para a câmara reacional (etapa 4) respectivamente. De fato são adicionados apenas 10 μL de ar à câmara, os 90 μL remanescentes preenchem o tubo de Teflon® entre a válvula sequencial e a câmara. Para facilitar a mistura dentro da câmara reacional foram inseridos mais 460 μL de ar (etapa 5).

O bombeamento de ar gera bolhas, que promovem a agitação adequada para a difusão de espécies químicas entre as duas fases. Em seguida, o fluxo é interrompido e a aquisição do sinal analítico é realizada durante um intervalo de tempo pré-estabelecido (etapa 6). Subseqüentemente, o fluxo é reativado e esvazia-se a câmara reacional (etapa 7), sendo o resíduo enviado para posterior tratamento (etapa 8). A bomba seringa, contendo apenas o fluido transportador (CHCl_3), é acionada para preenchimento de seu volume, 2000 μL (etapa 9). Para a limpeza da câmara, são adicionados, à câmara, clorofórmio e água. Inicialmente, são aspirados 300 μL de água, em direção a bobina de reação (BR) (etapa 10), revertendo, em seguida, o sentido do fluxo, dispensando na câmara reacional, a alíquota de água e 900 μL de clorofórmio, o fluido transportado (etapa 11). Na sequência, são aspirados 350 μL de ar (etapa 12), que são bombeados em direção à câmara (etapa 13), para que a formação de bolhas de ar torne mais eficiente a limpeza da câmara.

Após essa etapa, a câmara é esvaziada de forma que nenhum resíduo permaneça no seu interior (etapa 14). Em seguida são enviados para o descarte 2300 µL, para garantir que toda a bobina de reação esteja preenchida somente com a solução transportadora (etapa 15). Para iniciar uma nova análise, a bomba seringa é preenchida com o volume de 1200 µL de CHCl₃ e só então repete-se esse mesmo procedimento para as demais amostras (etapa 16). Em cada análise foram gerados 4140 µL de resíduo.

A curva analítica para quantificação de cocaína foi obtida por regressão linear, traçando um gráfico com os valores máximos de absorbância obtidos para cada solução de referência de cocaína em função das concentrações. A análise das soluções de referência, bem como das soluções de amostras foi feita em triplicata e o sinal analítico foi monitorado em 630 nm.

Tabela.3-Seqüência da análise para determinação de cocaína em amostras apreendidas empregando análise por injeção sequencial-fluxo batelada

Etapa	Válvula 3 vias	Válvula 6 portas	Bomba	Volume (µL)	Descrição
0		Ar	Desligada	0	Início
1		Ar	Aspira	500	
2		[Co(SCN) ₄] ²⁻	Aspira	200	Bolhas de ar, reagente e amostra
3		Amostra	Aspira	400	
4	Sistema em fluxo	Câmara	Dispensa	700	Adição na câmara de Amostra/reagente
5		Ar	Dispensa	460	Mistura com bolhas de ar na presença de reagente e amostra
6		Câmara	Desligada	-	Aquisição do sinal analítico
7		Câmara	Aspira	710	Esvaziar a câmara
8		Descarte	Dispensa	1850	Produto formado enviado para o descarte
9	Fluido transportador	-	Aspira	2000	Completar a seringa com solução carregadora
10		Água	Aspira	300	
11		Câmara	Dispensa	900	Limpeza da câmara
12		Ar	Aspira	350	
13	Sistema fluxo	Câmara	Dispensa	430	
14		Câmara	Aspira	970	Esvaziar a câmara
15		Descarte	Dispensa	2300	Mistura proveniente da limpeza da câmara
16	Fluido transportador	-	Aspira	1200	Encher a seringa

I.3.1.7. Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Para efetuar a comparação dos resultados obtidos com o sistema em fluxo, as amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A CG/EM é o método oficial recomendado [80] para determinação de cocaína em amostras apreendidas.

Foi utilizado o cromatógrafo em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG/EM) da Agilent Technologies 6890N com detector seletivo de massas MS (operando a 70 eV) Agilent Technologies 5973- Inert (500-40 m/z), coluna DB-5MS (0,2 mm x 25 m x 0,33 µm). A temperatura inicial do forno foi de 200 °C e a final de 300 °C. A temperatura do injetor foi de 280 °C e o volume da solução de cocaína injetado foi de 5 µL.

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente uma câmara de fluxo-batelada confeccionada de vidro (pipeta de Pasteur) foi usada nesse trabalho. Devido à aderência do clorofórmio nas paredes da câmara, a limpeza ficou comprometida, reduzindo assim a sensibilidade e a reprodutibilidade do sistema. A fim de solucionar esse problema, uma câmara de Teflon® foi construída com dois orifícios para conexão da fibra óptica, conforme mostrada na Figura 7. Para promover a homogeneização do reagente com a cocaína, bolhas de ar foram inseridas na câmara e observou-se que a mistura foi eficiente, não sendo necessário o uso de barra e agitador magnético.

Para obtenção do sinal analítico, foi necessário que houvesse um volume mínimo de 250 μL de solução no interior da câmara. Assim, foi possível garantir que a fase contendo o analito ficasse acima do orifício indicado por onde passa o feixe de radiação (L e CCD). Todavia, estudos preliminares mostraram que o uso de volume de solução de amostra inferior a 400 μL , resultava em baixa reprodutibilidade, devido à variação do menisco. Com isso, foi selecionado o volume de 400 μL de amostra para a determinação de cocaína. O pequeno volume de clorofórmio que foi empregado no sistema (2 mL) além de proporcionar um baixo consumo de amostra, também gerou menor volume de resíduo tóxico.

A solução 0,29 mol L^{-1} de tiocianato de cobalto teve sua concentração estabelecida de acordo com o recomendado pelo teste de Scott [80]. Estudos empregando diferentes volumes foram realizados e observou-se que o melhor sinal analítico foi obtido com 200 μL de tiocianato de cobalto e 400 μL de cocaína. Foram realizadas varreduras de 380 a 710 nm para avaliar em que região do espectro se obtinha maior sinal de absorbância. De acordo com o espectro mostrado na Figura 8. Observa-se que em 630 nm o sinal de absorbância é máximo para o complexo cocaína-tiocianato de cobalto em 5 μL de CHCl_3 .

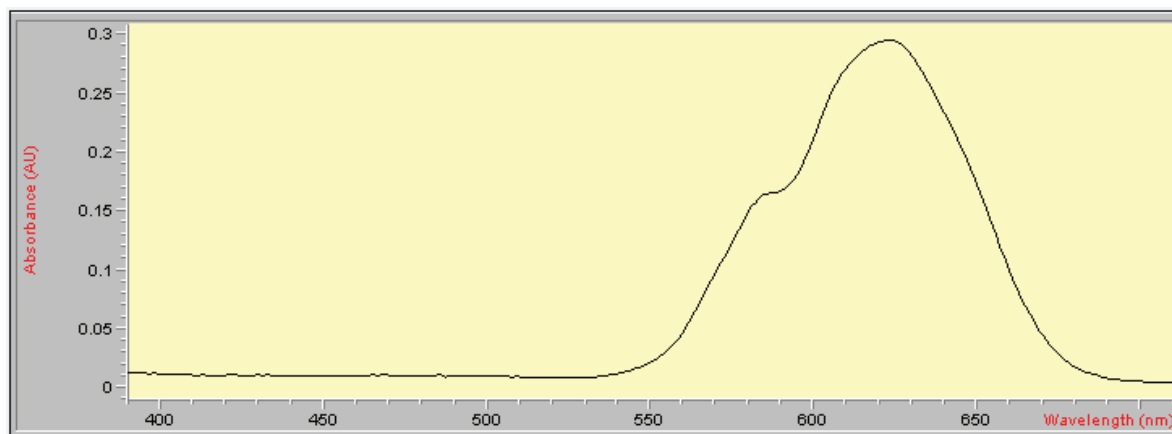


Figura.8 - Espectro do complexo cocaína-tiocianato na fase orgânica, na região visível (390 a 710 nm)

Além do clorofórmio, outros solventes orgânicos tais como álcool etílico, éter e acetona foram testados na preparação das soluções de amostras e soluções referência de cocaína. Entretanto, apenas com clorofórmio se obteve um sinal que variava linearmente com a concentração de cocaína. Experimentos adicionais foram realizados a fim de estabelecer a faixa dinâmica linear e o limite de detecção. A curva analítica, mostrada na Figura 9, foi construída utilizando a média dos sinais medidos ($n = 3$), obtidos para as soluções de referência na faixa de 100 a 1000 mg L^{-1} de cocaína

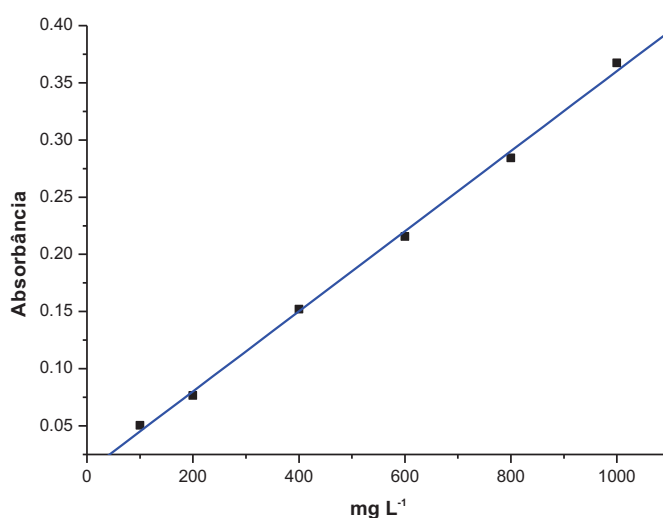


Figura.9- Curva analítica obtida para determinação de cocaína empregando a análise por Injeção Seqüencial associado a análise em fluxo-batelada na faixa de 100 a 1000 mg L^{-1}

A equação obtida foi $A = (3,500 \times 10^{-4} \pm 0,079 \times 10^{-4}) \% \text{Cocaina} + (0,0101 \pm 0,0048)$, com coeficiente de correlação de 0,9989. O limite de detecção (LD) foi de 29,4 mg L^{-1} sendo estimado pela equação $LD = 3s_b/S$, em que S_b é o desvio padrão do branco ($n = 8$) e S a sensibilidade (inclinação da reta) [81]. O LQ = $10 \times S_b/S$, foi de 98 mg L^{-1} . Os parâmetros analíticos encontrados no sistema proposto foram comparados com o método de referência, baseado em Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa, como mostra a Tabela 4.

Tabela.4-Comparação dos parâmetros analíticos obtidos na determinação de cocaína usando o método de referência (GC-MS) e o sistema proposto fluxo-batelada e outros método descrtios na literatura.

Parâmetros	Método de referência	SIA-FB	Ref [68]	Ref [69]	Ref [70]	Ref [71]
Faixa linear (mg L ⁻¹)	não avaliado	100-1000	3-30	6-100	50-850	0,06-3
R.S.D. (%)	14,6	5,3	4-3	1,1	3,2	1,7
Consumo de amostra (μL)	5	400	150	120	não avaliado	200
Frequência analítica/hora	5	12	30	100	150	60
Consumo de Reagente (μL)	-	3800	-	-	-	-
Volume de resíduo (μL)	-	4100	-	-	-	-

O desvio padrão relativo (RSD) obtido para o método de referência, usando 10 amostras da solução de referência de 400 mg L⁻¹, foi de 14,6%, ou seja, cerca de 2,7 vezes maior que o encontrado pelo sistema fluxo-batelada (5,3%). O consumo de amostra foi 80 vezes maior para o sistema fluxo-batelada (400 μL) quando comparado com o método GC-MS (5 μL), mas apenas duas vezes maior em relação ao método FIA com detecção amperométrica [68].

Entretanto, a frequência analítica do método fluxo-batelada foi 2,5 vezes maior quando comparada com a técnica GC-MS com injeção manual (de 5 determinações/hora). Portanto, esse procedimento possui características importantes para ser implementado em laboratórios que realizam análises forenses.

Comparando com os métodos propostos na literatura [68-71] o método SIA-FB é de 2,5 a 12,5 mais lento, no entanto o procedimento FIA não é completamente automatizado e por isso requer a presença de um analista para injetar soluções de amostras e reagentes.

As principais desvantagens dos métodos para determinação de cocaína descritos na literatura são o uso de equipamentos relativamente caros e susceptíveis a ruídos, como espectrométrico de absorção atômica em chama e amperometria. Por outro lado o método SIA-FB, apresenta desempenho similar e pode ser utilizando com equipamento mais barato, como espectrofotômetro na região do visível.

O desempenho do sistema foi avaliada em amostras de cocaína confiscadas pela Policia Federal de Pernambuco. Os resultados obtidos com o sistema SIA-FB foram comparados com o método de referência conforme mostra a Tabela 5.

Para avaliar se há diferença estatística entre os dois métodos utilizados, realizamos o teste t e comparando-se o valor crítico de t para o nível de confiança de 95% e 5 graus de liberdade ($t_{crit.} = 2,57$) e o t calculado para os métodos ($t_{calc} = 0,80$). Uma vez que o t_{calc} é menor que o $t_{crit.}$, isto

confirma a hipótese nula e concluímos que os dois métodos fornecem resultados estatisticamente semelhantes.

Tabela. 5. Concentração de cocaína (%m/m) em amostras confiscadas pela Polícia Federal de Pernambuco obtidas pelo procedimento proposto (SIA-FB) e o método de referência (GC-MS)

Amostras	SIA-FB (% m/m)	GC-MS (% m/m)
1	32,3 ± 2,6	30,1 ± 5,2
2	85,5 ± 7,7	79,4 ± 14,4
3	74,5 ± 11,3	74,5 ± 12,1
4	77,2 ± 7,0	80,8 ± 6,3
5	63,7 ± 1,7	64,6 ± 8,0
6	67,1 ± 11,8	65,1 ± 12,0

Os dados da Tabela 5, evidenciam a presença de cocaína em concentrações que variam de 32 a 85% (m/m). O desvio padrão relativo encontrado para o método proposto variou de 2,7 a 17,6 % quando comparado com o método de referência, os resultados variaram de 7,8 a 18,4 % . Em média, o valor do RSD foi de 10,4% para o método fluxo-batelada e para o GC-MS em que a injeção era realizada manualmente foi de 15,2 %. Estes valores embora elevados justificam o sistema devido à complexidade da amostra.

As estimativas dos coeficientes angular e linear da reta construída com os valores obtidos da tabela 5, não diferem estatisticamente (95% de confiança) de *um* e *zero*, respectivamente, indicando uma boa concordância entre os dois métodos, $C_{SIA-FB} = 2,6 (\pm 5,9) + 0,97 (\pm 0,08)C_{GC-MS}$. O coeficiente de correlação para o GC-MS foi de $R^2 = 0.969$.

As análises utilizando o método GC-MS foram realizadas com injeção manual, certamente o uso de dispositivo automático de injeção aumentaria a reprodutibilidade desses resultados.

I.5. CONCLUSÃO

A metodologia proposta que combina análise por injeção seqüencial e a estratégia fluxo-batelada (SIA-FB) utiliza como detector um espectrofotômetro portátil que possui fibra óptica acoplada na câmara fluxo-batelada, tornando o método simples, robusto e versátil. Apresenta como vantagens em relação ao método de referência para análise de amostras de cocaína (GC-MS) a frequência analítica e o baixo custo da análise e da manutenção dos equipamentos.

O uso de uma câmara fluxo-batelada no sistema SIA permitiu a realização on-line das etapas analíticas de separação bi-fásica, extração e detecção. Além disso, todas as operações foram controladas por um computador, resultando em praticidade experimental e segurança nos resultados. A presença da câmara reacional no sistema proposto facilita a mistura contato entre as soluções e principalmente, a aquisição do sinal analítico em uma única fase do meio bifásico.

Considerando as vantagens oferecidas pelo método proposto, a implantação em laboratórios forenses para análise de amostras de cocaína é viável, visto que existe uma necessidade de novos métodos de análises, que sejam simples, de baixo custo e confiáveis.

Uma futura aplicação seria a determinação de adulterantes na cocaína, tais como, os fármacos cafeína, lidocaína e procaina, presentes em muitos casos [32]. Este tem sido um dos problemas de interesse da Polícia Federal, no sentido de identificar a origem desta droga, uma vez que acredita-se que drogas de diferentes regiões do Brasil, assim como de outros Países apresentam perfis (composição) químicos distintos.

I.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Crits-Christoph, P.; Newberg, A.; Wintering, N.; Ploessl, K.; Gibbons, M.B.C.; Ring-Kurtz, S.; Gallop, R.; Present, J. Dopamine transporter levels in cocaine dependent subjects. **Drug and Alcohol Dependence**, v.98, p.70-76, 2008.
- [2] Silva, M.I.G., Cocaína – história, ações neurobiológicas do vício e recaída e perspectivas. **Acta Med.Port.**, v. 23, p.247-258, 2010.
- [3] Weiss, R. D.; Mirin S. M.; Bartel R. L. **Cocaine**. 2.ed. Washington-DC: American Psychiatric Press. 1994.
- [4] Cotrim. C. B: Movimentos e discursos contra as drogas: O caso da sociedade norte-americana. **Rev Bras Psiquiatr. Associ Psiquiatri Am Latin**; v.17, p. 93-101, 1995.
- [5] Bahls, F.C.; Bahls S.C.; Cocaína: origens, passado e presente, **Interação em Psicologia**, v. 177, p.181, 2002.
- [6] Platt, J.J.; **Cocaine addiction: theory, research and treatment**. Harvard University Press, 1997. 269p.
- [7] Bailey, B.J, **Looking back at a century of cocaine – use and abuse**. Laryngoscope, 1996. 681p.
- [8] Weiss, R.D.; Mirin, S.M.; Bartel, R.L.; **Cocaine**. 2.ed. Washington-American Psychiatric Press, 1994.
- [9] <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/> acessado em março de 2010
- [10] Hatsukami, D. K.; Fischman, M. W., Crack Cocaine and Cocaine Hydrochloride, **JAMA**, v. 276, p.1580-1588, 1996.
- [11] Cox, T.; Jacobs, M.; Leblanc, A.; Marshman J.; **Drugs and drug abuse: a reference text**, Toronto: Addiction Research Foundation Press, 1983. 220p
- [12] Pottier, A. E.; Tressel, P.A.; Inciardi, J.A, Rosales T.A: Cocaine use patterns and overdose. **J Psychoactive Drugs**; v.24, p. 399-410, 1992.
- [13] Lambert K., Kinsley C. H., Neurociência clínica, as bases neurobiológicas da saúde mental, Porto Alegre, **artmed** 2006.
- [14] Dunwiddie, T.V.; Proctor, W.R.; Tjy, A. J., Local anaesthetic actions of cocaine: effects on excitatory and inhibitory synaptic responses in the hippocampus in vitro. **Br. J. Pharmacol**, v.95, p. 1117-24, 1988.
- [15] Hanson, G.R.; Jensen, M.; Johnson, M., White S: Distinct features of seizures induced by cocaine and amphetamine analogs, **Eur J Pharmacol**. v.377, p.:167-173, 1999.
- [16] http://www.unodc.org/pdf/research/wdr07/WDR_2007.pdf. acessado em janeiro de 2010.

- [17] Dunwiddie, T.V.; Protocor, W.R.; Tyma J.; Local anaesthetic actions of cocaine: effects on excitatory and inhibitory synaptic responses in the hippocampus in vitro. **Br. J. Pharmacol**; v. 95, p.1117, 1988.
- [18] <http://www.unodc.org/brazil/pt/relatorio-jife-2009.html> acessado em janeiro de 2010.
- [19] Drummer, O.H.; Odell, M., **The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse**; London, U.K.; 2001.
- [20] Cone, E.J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **J. Anal. Toxicol.** v.19, p.459–478, 1995
- [21] Jones, A.W.; Holmgren, A.; Kugelberg, F.C., Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden, **Forensic Sci. Int.**, v. 177, p.133-139, 2008.
- [22] Huestis, M. A., Cone, E. J. Alternative testing matrices, **Drug abuse handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 799p.
- [23] Filho, M. T.; Yen, C. C; Santos, U. P.; Muñoz, D. R.; Pulmonary alterations in cocaine users, **Med. J.** v..122, 2004.
- [24] Irwin, K. L., Edlin, B. R.; Faruque, S. H.; McCoy, V.; Word, C.; Serrano Y.; Inciardi J.; Bowser, B.enjamin, Crack cocaine smokers who turn to drug injection: characteristics, factors associated with injection, and implications for HIV transmission, **Drug and Alcohol Dependence**, v.42, P. 85-92, 1996.
- [25] Pavlova, V.; Mirčeski, V.; Komorsky-Lovri , Š.; Petrovska-Jovanovi'c ,S.; Mitrevski, B., Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry, **Anal. Chim. Acta** v. 512, p.49–56, 2004.
- [26] Cognard, E.; Rudaz, S.; Bouchonnet, S.; Staub, C., Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. **J Chromatogr.B**, v.826, p.17–25, 2005.
- [27] Axelrod, J.; Noradrenaline Fate and control of its biosynthesis. **Science**; v. 173, p.598-606,1971
- [28] Bhide, P. G.; Dopamine cocaine and the development of cerebral cortical cytoarchitecture: A review of current concepts The cardiovascular effects of cocaine, **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p. 395-402, 2009.
- [29] Ritz, M. C.; Cone, E. J.; Kuhar, M.J., Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. **Life, Science**. v. 46, p. 635, 1990.
- [30] Porrino, L. J.; Smith, H. R.; Nader, M. A.; Beveridge, T. J. R., The effects of cocaine: a shifting target over the course of addiction, **Progr. Neuropsych. Biol. Psy.** v.31, p. 1593, 2007.

- [31] Bernardo, N.P.; Siqueira, M. E. P.B; Paiva, M. J. N.; Maia, P. P., Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil, **Inter. Jour. Drug Policy**, v.14, p. 331–334, 2003.
- [32] Fucci, N., De Giovanni, N., Adulterants encountered in the illicit cocaine market **Forensic Sci. Int.**, v. 95, p. 247-252, 1998.
- [33] Noggle, E.T.; Clark, C.R.; Liquid chromatographic identification of cis- and trans-cinnamoylcocaine in illicit cocaine. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v.65, p. 756 ,1982.
- [34] Lu Y, O'Donnell R. M., Harrington P. B., Detection of cocaine and its metabolites in urine using solid phase extraction-ion mobility spectrometry with alternating least squares, **Forensic Science International**, v. 189, p.54 2009
- [35] Paterson S., Lee S., Cordero R., Analysis of hair after contamination with blood containing cocaine and blood containing benzoylecgonine, **Forensic Science International**, v. 194, p.94, 2010
- [36] Mercolini L., Mandrioli R., Gerra G., Raggi M. A., Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: A novel test for cocaine and alcohol intake, **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 7242, 2010.
- [37] Cognard, E.; Bouchonnet, S.; Staub, C., Validation of a gas chromatography--ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva, **J. Pharm.Biom. Anal.** v. 41, p. 925, 2006.
- [38] Barrio, G., Purity of cocaine seized in Spain,1985-1993: variations by weight, province and year of seizure, **Forensic Sci. Int.** v. 85, p.15-28, 1997.
- [39] Janicka M., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples, **TrAC Trends in Anal. Chem.**, v. 29, p. 209, 2010
- [40] Clauwaert, K. M., Bocxlaer, J. F.V.; Lambert, W.E.; Leenheer, A.P.D.; Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases, **Forensic Sci. Int.** v.110, p. 157, 2000
- [41] Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro A., Moreda-Piñeiro J., Bermejo-Barrera A., Effectiveness of palladium as a chemical modifier for direct silver and manganese determination in cocaine and heroin by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Talanta**, v. 43, p.1783, 1996.
- [42] Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Moreda-Piñeiro, J.; Bermejo-Barrera, A.; Determination of traces of chromium in cocaine and heroin by flameless atomic absorption spectrometry , **Talanta**, v.43, p.77, 1996.
- [43] Mohammadzaia I. U. Hinze W.L., Indirect Atomic Absorption Determination of Cocaine via Formation and Liquid-liquid Extraction of the Iron(III)-cocaine Complex, **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.51, p. 1297-1302, 2004

- [44] Donato, E.; Martin, C.C. S.; Martinis, B. S., Determination of cocaine in brazilian paper currency by capillary gas chromatography/mass spectrometry., **Quimica Nova**, v. 30, p. 1996, 2007.
- [45] Pavlova, V.; Mirčeski, V.; Komorsky-Lovrić, Š., Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry **Anal. Chim. Acta** v.512, p. 49–56, 2004.
- [46] Fernández, P.; Aldonza, M.; Bouzas, A.; Lema M.; Bermejo, A. M.; Tabernero, M. J.; GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor, **J. App. Toxic.** v.26, p.253 – 257, 2006.
- [47] Valente-Campos, S.; Yonamine, M.; Moreau, R. L. M.; Silva, O. A. Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass spectrometry., **Forensic Sci. Int.** v.159, p. 218–222, 2006.
- [48] Agerdeo, J. E.; Montgomery, M. A.; LeBeau, M. A.; Sibum, M., An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood. **J Chromatogr. B.**, v. 874, p.15-20, 2008.
- [49] United Nations, **Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse Manual for Use by National Narcotics Laboratories**, Division of Narcotic Drugs, Vienna, 1988. 41p
- [50] Swiatko, J., Forest, P.R.; Zedeck, M.S., Further studies on spot tests and microcrystal tests for identification of cocaine, **J. Foren. Sci.**,v. 48, p. 581–585, 2003.
- [51] Scott Jr, L. J., Specific field test for cocaine, **Microgram** v. 6, p.179–181, 1973.
- [52] Fasanello J.; Higgins P.; Modified Scott test for cocaine base or cocaine hydrochloride, **Microgram**, v. 19, p.137–138, 1986.
- [53] Tsumura, Y.; Mitome, T.; Kimoto, S., False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision, **Forensic Sci. Int.** v.155, p.158, 2005.
- [54] Nerin, C.; Garnica, A.; Cacho, Indirect determination of alkaloids and drugs by atomic absorption spectrometry, **J. Anal. Chem.**, v. 57, p. 34-38, 1986.
- [55] Stainier, C., "L'utilisation du thiocyanate de cobalt dans l'analyse des bases organiques", **Il Farmacco**, v. 29, p. 119 – 135, 1974.
- [56] Elsherbini SH: Cocaine base identification and quantification; **Forensic Sci Rev**, v. 10, p. 1-11, 1998.
- [57] Lorch, S.K., Specificity problem with the cocaine specific field test, and its solution, **Microgram**, v. 7, p.100–101, 1974.
- [58] Inoue, T.; Tanaka, K.; Niwase, T.; On site screening test for cocaine, Reports Natl. **Res. Inst. Police Sci.** v.41, p. 225–228, 1988.

- [59] Skeggs, L. T., An automatic method for colorimetric analysis. **Anal. Am. J. Clin. Pathol.** v. 28, p. 311, 1957.
- [60] Ruzicka, J.; Hansen, H E., Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, **Anal. Chim. Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- [61] Pasquini, C.; Oliveira W.A.; Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia and phosphorus, **Anal. Chem.** v.57, p. 2575, 1985.
- [62] Ruzicka J.; Marshall G. D., Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays **Anal. Chim. Acta** v. 237, p.329, 1990.
- [63] Trojanowicz, M.; Flow injection analysis instrumentation and applications, Singapura, editora 2000
- [64] Reis, B. F.; Giné, F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. S., Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: Concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests, **Anal. Chim. Acta**, v. 293, p.129, 1994.
- [65] Honorato, R.S.; Araújo, M.C. U.; Lima, R. A. C.; Zagatto, E. A. G.; A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search, **Anal. Chim. Acta**, v. 396, p. 91, 1999.
- [66] Carneiro, J. M. T.; Dias, A. C. B.; Zagatto, E.A.G.; Honorato, R.S., Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system, **Anal. Chim. Acta**, v. 455, p.327, 2002.
- [67] Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; Oliveira, C. C., evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis, **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 400, p. 249-256, 1999.
- [68] Fernández-Abedul, M.T.; García A.C., Flow injection analysis with amperometric detection of cocaine in confiscated samples, **Anal. Chim. Acta**, v. 328, p. 67, 1996.
- [69] Eisman, M.; Gallego M.; Valcárcel M., Automatic continuous-flow method for the determination of cocaine, **Anal. Chem.**, v. 64, p.1509–1512, 1992.
- [70] Eisman, M.; Gallego, M.; Valcárcel, M., Indirect flame atomic absorption spectrometric determination of papaverine, strychnine and cocaine by continuous precipitation with Dragendorff's reagent, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 8, p. 1117 – 1120, 1993.
- [71] Eisman, M.; Gallego, M.; Valcárcel, M., Determination of papaverine and cocaine by use of a precipitation system coupled on-line to an atomic absorption spectrometer, **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.12, p.179, 1994.
- [72] Galhardo, C. X.; Masini, J.C., Sequential injection analysis as a tool for in situ monitoring of Fe(II), Fe(III), NO₃⁻ and NO₂⁻ in natural and waste waters **Anal. Chim. Acta**, v. 438, p.39, 2001.

- [73] Silva, M.S.P., Masini, J.C., Exploiting monosegmented flow analysis to perform in-line standard additions using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures, **Analytica Chim. Acta**, v. 466, p. 345-352, 2002.
- [74] Tue-Ngeun, O.; Sandford, R.C.; Jakmunee, J.; Grudpan, K.; McKelvie, I. D.; Worsfold, P.J., Determination of dissolved inorganic carbon (DIC) and dissolved organic carbon (DOC) in freshwaters by sequential injection spectrophotometry with on-line UV photo-oxidation, **Anal. Chim. Acta**, v. 554, p.17, 2005.
- [75] Segundo M.A.; Rangel O.S.S., Kinetic determination of L(-)malic acid in wines using sequential injection analysis, **Anal. Chim. Acta**, v. 499, p. 99, 2003.
- [76] Carneiro, J.M.T.; Dias, A.C.B.; Zagatto, E.A.G.; Honorato, R.S., Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system, **Anal. Chim. Acta**, v.455, 327, 2002.
- [77] Almeida, L.F.; Martins, V.L.; Silva, E.C.; Moreira, P.N.T., Araújo, M.C.U.; Implementation of an automatic standard addition method in a flow-batch system: Application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, v. 486, p.143, 2003.
- [78] Honorato, R.S.; Carneiro, J.M.T; Zagatto E.A.G.; Spectrophotometric flow-batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism, **Anal. Chim. Acta**, v. 441, p. 309, 2001.
- [79] Pasquini, C.; Aquino, E.V.; Reboucas, M. V.; Gonzaga, F.B., Robust flow-batch coulometric/biamperometric titration system: Determination of bromine index and bromine number of petrochemicals, **Anal. Chim. Acta**, v. 600, p. 84, 2007.
- [80] **Manual for use by national narcotics laboratories**, Recommended methods for testing cocaine, United Nations, division de narcotic drugs, New York 1986.
- [81] Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, **Analyst**, v. 112, p.199, 1987.

Capítulo II: Detecção de Resíduos de Disparo de Armas de Fogo por meio de Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS)*

* Gunshot Residues: Screening Analysis by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy
Maria José Silva, Juliana Cortez, Celio Pasquini, Ricardo S. Honorato, Ana Paula S. Paim and Maria Fernanda Pimentel
J. Braz. Chem. Soc., 20 (2009) 1887-1894

II. 1. INTRODUÇÃO

II. 1.1. RESÍDUOS DEIXADOS POR ARMA DE FOGO

A ciência forense auxilia o sistema de justiça criminal, a partir de uma análise científica das evidências de um crime. Nas últimas décadas, a investigação criminal de resíduos deixados pelo disparo de arma de fogo (do inglês, *Gunshot residue* - GSR) tem sido uma das evidências físicas mais utilizadas na elucidação de crimes violentos envolvendo armas de fogo. Porém não pode ser considerada uma prova conclusiva, uma vez que outras situações precisam ser consideradas para se constatar a participação do suspeito [1].

Quando ocorre um disparo de arma de fogo, são expelidos diversos resíduos inorgânicos e orgânicos, além de produtos gasosos, como CO_2 , H_2O e óxidos de nitrogênio. Esses resíduos normalmente podem ser encontrados em nível traço ao redor do tambor da arma de fogo, podendo estes se depositar, na forma de aerossol, nas mãos, cabelos, face, roupas e objetos próximos [2,3].

Entretanto para que a presença de GSR nas mãos ou roupas de um suspeito seja uma prova significativa que ele atirou com uma arma de fogo, algumas informações devem ser consideradas antes de formar qualquer opinião. Entre elas estão: compreender como são produzidas e depositadas as partículas GSR, sua origem, persistência, meios de análise e como a evidência foi coletada [4].

II. 1.1.1. Componentes da Munição

A composição química da munição desempenha um papel importante na determinação de partículas GSR, além de atuar diretamente na expansão, no poder de penetração e na velocidade com que atinge o alvo. As principais partes que constituem uma munição estão descritas na Figura 10.

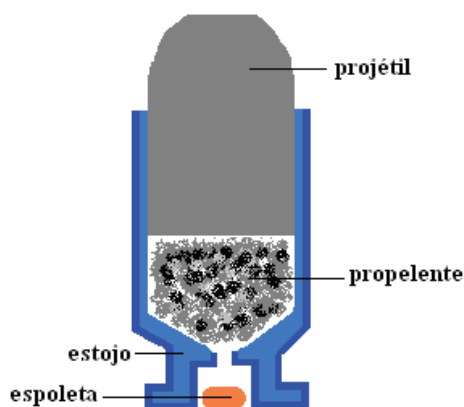


Figura.10 - Esquema geral da composição interna de uma munição

O propelente usado é a pólvora, que antigamente era constituída de 75% KNO_3 , 15% S e 10% carvão vegetal, denominada pólvora negra. O seu uso entrou em declínio, devido à liberação de uma quantidade excessiva de fumaça e resíduos, além de fornecer pouca pressão durante a reação de combustão. Atualmente compostos orgânicos (nitrocelulose, nitroglicerina, difenilamina e dietil-difenil-uréia) são comumente empregados [2,5].

Entretanto o que dá início à combustão da pólvora é a mistura iniciadora, a qual desencadeia o processo de queima, sendo de grande relevância na formação e detecção de GSR.

Os componentes da mistura iniciadora são [2,6]:

O iniciador - estifnato de chumbo $[\text{PbO}_2\text{H}(\text{NO}_2)_3]$, uma substância sensível ao choque mecânico;

O Oxidante - $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, que disponibiliza o seu oxigênio facilmente para queima do combustível;

O combustível - trissulfeto de antimônio (Sb_2S_3);

O sensibilizador – tetraceno ou silicato de alumínio, adicionado ao $[\text{PbO}_2\text{H}(\text{NO}_2)_3]$.

A espoleta é o recipiente que armazena a mistura iniciadora.

O projétil tem forma ogival e é composto de Pb ou Bi, podendo ser revestido por uma liga metálica (projétil encamisado), normalmente Cu/Zn, Cu/Ni ou aço; resina; nylon; grafite; Teflon ou outros materiais [7]. Em geral os projéteis encamisados oferecem um maior deslizamento no momento que é expelido, atingindo o alvo com maior velocidade, melhor precisão e alcance.

O projétil pode ser traçante, quando apresenta fósforo na base ou na ponta, muito utilizado nas forças armadas para alinhar a mira de artilharia pesada. Um outro tipo de projétil é o explosivo, que utiliza mercúrio ou glicerina na sua composição. O projétil sofre uma contração após o disparo e, apenas quando atinge o alvo, ocorre expansão, e saída do projétil, provocando uma fragmentação violenta [8].

A maioria dos projéteis e misturas iniciadoras é constituída por chumbo, e sua liberação no ambiente ocorre durante o disparo, devido ao rápido aquecimento e pressurização, que resultam na produção de vapores de chumbo. Estima-se que 5% do consumo global de chumbo estão vinculados ao uso em munições. Entretanto, a exposição constante em atmosfera rica em chumbo, freqüente para os militares, policiais, caçadores e instrutores de tiro, tem gerado uma preocupação crescente, pois pode ocasionar problemas de saúde devido ao efeito tóxico desse metal. O chumbo atua diretamente nas proteínas e enzimas do nosso organismo que afetam principalmente os sistemas reprodutivo e nervoso, causando falência do sistema digestivo [9].

Recentemente, Martiny e colaboradores em 2008 [9] avaliaram a concentração de Pb no sangue de policiais e instrutores de tiro que usam munições convencionais. Os resultados revelaram a alta incidência de chumbo no sangue, inclusive em alguns casos, o teor encontrado ultrapassou o limite de exposição permitida, que é de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$. Para solucionar esse problema, munições livre de chumbo (*Clean Range*), composta principalmente de $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, Sb_2S_3 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, Al, Si, K, Ca,

diazodinitrofenol e tetraceno foram fabricadas, podendo ser encontradas em muitos Países. Porém mesmo que já seja possível encontrar esse tipo de munição no Brasil, a Companhia Brasileira de Cartuchos (CBC) continua produzindo regularmente munições com chumbo.

II. 1.1.2. Fonte de Resíduos de Disparo de Arma de Fogo

A primeira etapa em um disparo de arma de fogo consiste em acionar o gatilho, que provocará uma deformação na espoleta, comprimindo a mistura iniciadora. O processo de combustão da pólvora é então iniciado com a produção de uma quantidade considerável de vapores quentes, que ocasionará a saída do projétil através do cano da arma.

As partículas GSR compostas principalmente pelos elementos Pb, Ba e Sb, são provenientes do $[\text{PbO}_2\text{H}(\text{NO}_2)_3]$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ e Sb_2S_3 que estão presentes na mistura iniciadora. Entretanto, além da presença predominante desses elementos, podem ser encontrados traços de outros elementos como: Cu, Si, Ca, Al, Fe, S, P (raro), K, Cl, Mg, Zn e Ni [2,10-12], assim como compostos orgânicos (cresol, resorcinol, triacetina, etc.) provenientes da cápsula e propelente, além de fragmentos do projétil, da espoleta e do cano da arma [2,3,13].

Quando a mistura iniciadora é detonada em fração de segundos (ms), a temperatura excede o ponto de ebulição do Pb (1620 °C), Sb (1380 °C) e Ba (1140 °C). Os vapores formados escapam pelas aberturas na arma e se condensam em forma de gotículas, estabelecendo um equilíbrio dinâmico da temperatura (1500 a 2000 °C) e pressão (9653 kPa) [6,14,15]. Essa condição específica de pressão e temperatura contribui para rápida condensação de elementos GSR e a formação de agregados com metais presentes em uma “única” partícula (Pb-Sb-Ba), exclusiva para resíduos de arma de fogo. Para minimizar sua área superficial e assim equilibrar as forças intermoleculares, essas partículas apresentam-se com diferentes características morfológicas [2,6,11,15]:

- Esféricas com forma regular e tamanhos que variam de 1 a 10 μm [16], podendo também encontrar partículas com tamanho de até 100 μm [4];
- Esféricas com forma nodular, devido à fusão entre partículas menores e maiores;
- Irregulares formadas com uma camada de Pb ao redor de um núcleo de Ba e Sb.

Em menor número pode-se formar também *cluster* e flocos irregulares, devido à solidificação de gotículas do material fundido no interior da superfície da arma [4].

Estudos realizados com dois revólveres (Colt Trooper .356 e S & W 1917-.45) e duas pistolas semi-automática (S&W MOD 39-9mm e Colt 1911A1-.45), carregadas com quatro munições (ICC, FED, REM, e WIN), revelaram que o tamanho e a forma podem variar com o tipo de arma. Para os revólveres 74% das partículas analisadas foram esféricas e o tamanho de 65% das partículas foram

inferiores a 3 μm . Para as pistolas semi-automáticas apenas 59% das partículas foram esféricas, e o tamanho de 48% das partículas analisadas foram inferiores a 3 μm [4]. Também podem variar com o calibre, que em geral quanto maior o calibre, maior será o tamanho. Além dos constituintes e heterogeneidade da espoleta, podendo ainda apresentar regiões com composições diferentes entre si [4,10,17].

II.1.1.3. Identificação de Partículas GSR

Geralmente, após o disparo com arma de fogo, a área com maior concentração de deposição GSR são as mãos, tais como a região da palma direita e esquerda, dorso, pinça palmar e principalmente na região da pinça dorsal. Entre os métodos de coleta de GSR nas mãos descritos na literatura, o uso da fita adesiva para coletar GSR nas mãos de suspeitos tem se destacado. As vantagens do seu uso são o menor tempo de coleta da amostra, redução do risco de perda da amostra e expansão do tempo para uma futura análise após a coleta.

O efeito da dispersão das partículas GSR nas mãos depende de vários fatores, como condições ambientais, os tipos de arma, munição, higiene pessoal e tempo após o disparo [2].

Estudos confirmaram também que uma variedade de ocupações profissionais e rotineiras (mecânico, eletricista automobilístico, operador de fogos de artifício, pintor, entre outras), pode contribuir para altos níveis de Pb, Ba e Sb nas mãos e podem levar a resultados falso-positivos [11,18,19]. Também pessoas que estiverem no mesmo local em que houve um disparo ou em ambientes onde exista alta concentração dessas partículas, podem apresentar um resultado falso-positivo, mesmo que não tenha efetuado um disparo com uma arma de fogo.

Para a justiça criminal, apenas é caracterizada a presença de GSR, quando for encontrada uma “única” partícula GSR com a combinação de Pb-Ba-Sb ou Sb-Ba [2,6,10,18,20]. A presença de um desses elementos numa amostra, não pode ser associada, de forma categórica, aos resíduos de arma de fogo, mas a um indicativo de que o suspeito disparou ou manipulou uma arma de fogo, como a ocorrência de (Pb- Sb); (Pb- Ba); (Ba-Ca- traço Silica- S); (Sb-Ba); Sb, (Pb-Ba-S), (Sb-S); (Pb-Sb-Sn) e (Sb-Sn), Pb e Ba [4,6,10,18].

Assim, uma vez encontradas essas partículas, o conhecimento da composição química, a morfologia das partículas e a atividade que o suspeito exercia antes de estar na cena do crime, ainda devem ser consideradas para que as evidências não sejam interpretadas erroneamente.

II. 1.1.4. Persistência de GSR nas Mãos

A persistência de GSR após o disparo é uma evidência importante em casos que o suspeito não é detido imediatamente após o crime. Estudos destacam que em um ambiente normal as partículas de GSR podem permanecer inalteradas por tempo indeterminado, mas que atividades rotineiras (lavagem das mãos com água e sabão, fricção das mãos sobre toalhas e roupas, colocar as mãos no bolso, contato com algemas) influenciam na remoção de GSR, e que essa perda está diretamente relacionada a fenômenos físicos e não a degradação química [20,21]. Por isso o ideal é que a coleta de GSR ocorra o mais rápido possível após o crime ter ocorrido.

O período sugerido na literatura é de 3 a 6 h após o incidente. Mas em alguns casos, partículas de GSR podem persistir por muito mais tempo, principalmente em roupas e indivíduos mortos. De acordo com Nesbitt e colaboradores a maior perda de GSR nas mãos ocorre na primeira hora após o disparo [22], mas em caso de suicídios o depósito de GSR pode durar mais tempo (48 h) devido ao fato das mãos ficarem imóveis [23]

Kilty e colaboradores no ano de 1975 reportaram a persistência temporal de GSR após o disparo. O estudo, que apenas restringiu os voluntários a não lavarem as mãos, concluiu que depois de 2 h do disparo, quantidades significativas de Sb e Ba foram removidas das mãos. Neste período a quantidade de Ba diminuiu por um fator de 10. Por outro lado, nenhuma evidência de resíduos GSR foi obtida, quando o indivíduo lavou as mãos com água e sabão e secou com papel toalha [24].

Outros trabalhos relataram o tempo máximo em que foi detectada partícula GSR variando entre 1- 48 h [25-27], empregando várias técnicas analíticas, como colorimetria, análise por ativação de nêutrons (NAA), espectrometria por absorção atômica (AAS), microscopia eletrônica de varredura. Microscopia Eletrônica de Varredura associada à técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (MEV/EDS - sigla usada a partir do nome em inglês *Energy Dispersive Spectroscopy*) e fotoluminescência.

Também há estudos que relatam a persistência de GSR nas mãos de indivíduos que exerciam atividades em laboratório em um período de tempo mais longo.

Rosenberg e Dockery em 2008 investigaram o tempo máximo em que pode ser detectada quantidade de Ba nas mãos de quem atirou. Constataram que após 126 h, não era mais possível detectar a presença deste elemento [28].

Romolo e Margot em 2001 investigaram a persistência de GSR nas mãos e concluíram que o número de partículas diminui em uma ordem de grandeza após 1 h do disparo [6].

Entretanto, muitos autores reconhecem que não se deve generalizar o período no qual os resíduos são removidos e que o tempo de permanência de GSR está diretamente relacionado às condições experimentais e à sensibilidade da técnica instrumental utilizada [2,4,20].

II.1.1.5. Técnicas Colorimétricas Utilizadas na Análise de GSR

O primeiro método analítico para análise de GSR foi usado em 1933, por Teodoro Gonzáles no México, com a finalidade de detectar a presença de nitrocompostos, conhecido como “*dermal nitrate test*” ou “*paraffin test*” [29,30]. Esse método consiste na retirada de GSR com a parafina, ocorrendo em seguida à reação entre os nitrocompostos e a difenilamina, em meio ácido (H_2SO_4). O produto formado apresenta coloração azul. Entretanto, os nitritos podem sofrer oxidação pelo oxigênio do ar, passando gradualmente a nitratos ou volatilizando-se como ácido nitroso, gerando resultados falso-negativos. Além disso, o *paraffin test* não é específico apenas para nitratos e nitritos, e por isso pode originar reações positivas com outros oxidantes (clorato, dicromato, iodatos, bromato) levando a resultados falso-positivos.

Um teste de identificação mais seletivo para nitritos foi desenvolvido por Harrison em 1959, conhecido como reagente de Griess [31], baseado na reação entre o ácido nitroso e ácido sulfanílico, formando o íon diazônio, que complexa com a α -naftilamina e produz uma coloração vermelha. Entretanto, este teste foi abandonado por não ser específico para nitritos oriundos de GSR, além de utilizar um reagente cancerígeno (α -naftilamina).

Um outro teste químico muito utilizado em laboratórios forenses até hoje, consiste na detecção de Pb, através da reação com rodizonato de sódio [32-34]. O complexo formado apresenta coloração azul-violeta, que pode ser estabilizado pela adição de uma solução tampão. Contudo, o desvanecimento comum de complexos coloridos pode ocorrer como consequência de um contato prolongado com o meio ácido. Além disso, com este teste não é possível distinguir resíduos ocupacionais e ambientais, podendo fornecer resultados falso-negativos e falso-positivos [35].

Estudos levantam dúvidas sobre a eficácia dos testes colorimétricos, pois não possuem sensibilidade para detectar Sb e Ba de forma confiável, principalmente devido à pequena quantidade de resíduos presentes nas mãos de um atirador. Um levantamento de dados realizado em Pernambuco, Bahia e Alagoas [35] revelaram um alto percentual de resultados falso-negativos (87%). Entretanto, os testes colorimétricos ainda são utilizados rotineiramente pelos peritos na Polícia Civil de alguns estados do Brasil, por ser um teste de baixo custo e de fácil execução.

II. 1.1.6. Técnica Padrão (MEV-EDS) Utilizado na Análise de GSR

Em laboratórios forenses a técnica padrão utilizada para análise de partículas GSR é a microscopia eletrônica de varredura associada à técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS). Esta técnica determina a presença simultânea de Pb, Ba e Sb e analisa a morfologia das partículas. Um guia padrão para a detecção e identificação de GSR foi produzido pela ASTM

(*American Society For Testing Materials*) e Norma E-1588-95 [36]. Este método especifica que se opere com uma voltagem de aceleração de 20 keV no mínimo. A morfologia das partículas GSR deve ter forma esférica ou discoidal com um diâmetro compreendido entre 0,5 e 5,0 μm . Para um pico ser considerado estatisticamente significativo, sua altura deve ser maior que três vezes o desvio padrão do sinal de fundo.

O princípio de funcionamento do MEV consiste na incidência do feixe de elétrons na superfície da amostra, o qual promove a emissão de elétrons secundários e retroespalhados. Os elétrons secundários, que provêm de interações inelásticas entre os elétrons e a amostra, fornecem uma imagem topográfica da superfície da amostra. Imagens de alta resolução são então obtidas.

Os elétrons retroespalhados, provêm de interações elásticas principalmente entre os elétrons e o núcleo, produzindo um contraste característico de variação da composição (número atômico). O MEV pode ser acoplado a um espectrômetro de raio-X por energia dispersiva (EDS) o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos, realizando um mapeamento da superfície [37].

A técnica MEV-EDS atualmente é considerada como a que melhor satisfaz a detecção de GSR, devido à capacidade de distinguir resíduos ocupacionais/ambientais das partículas GSR, através da morfologia e composição das partículas. Além disso, o sistema de detecção, que é por elétrons retroespalhados, é ideal para partículas com elementos de número atômico médio a elevado.

Entretanto, a técnica MEV-EDS apresenta algumas desvantagens, como o tempo gasto, que pode demandar muitas horas de investigação. Em equipamentos que a busca é manual, o tempo de análise pode variar de 8 a 12 h, por amostra. Em equipamentos MEV-EDS automatizados o período de tempo para encontrar partículas GSR pode ser de aproximadamente 2 h por amostra. Uma outra característica dos instrumentos MEV-EDS é o alto custo de manutenção e de análise, sendo por isso pouco disponibilizado em laboratórios forenses [4,38].

Logo, outras técnicas se revelaram úteis na detecção e caracterização de GSR, tais como: Análise por Ativação Neutrônica (NAA) [39], Espectroscopia de Absorção Atômica com Chama (FAAS) [40], Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) [41], Voltametria de Redissolução Anódica (ASV) [42], Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial (DPASV) [43], Emissão de Raio-X com Próton Induzido (PIXE) [44], Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES) [45], Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) [46], Eletroforese Capilar [47], Espectroscopia Fotoluminescente [22] e Microfluorescência de Raio-X [48].

Porém, ainda existe um grande interesse em técnicas alternativas capazes de fornecer análise simultânea elementar de alta especificidade, potencialmente rápida e sensível para GSR. A Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser (do inglês, *Laser Induced Breakdown*

Spectroscopy – LIBS), conhecida inicialmente por LIPS (*Laser Induced Plasma Spectroscopy*), aparece como uma ferramenta útil para análise *screening* de partículas GSR [49,50].

II. 1.2. A ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO EM PLASMA INDUZIDO POR LASER

O surgimento da técnica LIBS ocorreu paralelamente ao desenvolvimento e a construção de lasers em meados do século passado, após a descoberta da emissão estimulada e amplificação de radiação de microondas por emissão, mais conhecida por *maser* (do inglês, Microwave Amplification Stimulated), considerada um marco importante para a origem do laser [51]. Em 1958 Shawlow e Townes em 1958 [52] publicaram uma extensão da *maser* com lasers operando em frequência óptica. Theodore Maïaman em 1960 construiu então o primeiro laser com câmaras de ressonância que apresentava um sólido cristalino de rubi [53]. No ano seguinte, lasers constituídos de gases e semicondutores foram desenvolvidos (He-Ne e Nd:YAG), demonstrando um maior número de aplicações e um potencial em solucionar problemas. O uso da técnica LIBS para análise química ocorreu em 1962, quando Brech e Cross empregaram um laser de rubi como fonte de energia para vaporizar materiais metálicos e não-metálicos e uma fonte externa para excitar os átomos [54].

No mesmo ano que lasers com maior energia e pulsos de curta duração denominado *Q-switched* eram desenvolvidos, Debras-Guédon e Liodec publicaram a primeira análise espectroquímica com LIBS [55]. Posteriormente, em 1964, Maker e colaboradores foram os pioneiros na descoberta da ruptura das ligações (*breakdown*) opticamente induzida em um gás [56]. A partir dessa observação, o mesmo grupo de pesquisa prosseguiu os estudos, empregando LIBS não apenas como uma ferramenta para a ablação, mas também como uma fonte de excitação atômica. Foram detectadas emissões dos átomos de Cr e Ni em amostras de aço Ainda no mesmo ano, Runge e colaboradores relataram a primeira análise espectral direta em metais, com o uso de um laser de rubi pulsado [57]. No período de 1964 a 1967, Zeiss e Jarrell desenvolveram os primeiros instrumentos comerciais baseados na técnica LIBS [58]. No entanto, o elevado custo e o baixo desempenho não eram atrativos [59].

Durante a década de 70 o desenvolvimento continuou com importantes aplicações para a espectroquímica, como a ablação direta, excitação e *breakdown*. Todavia não houve um grande destaque a LIBS, devido às limitações tecnológicas dos lasers e dos sistemas de detecção da época.

Um maior interesse pela técnica LIBS se deu no final da década de 1980, após o desenvolvimento de lasers mais compactos, com maior potência e de menor custo [60]. O que impulsionou esse avanço na tecnologia de novos lasers foi o aprimoramento da indústria eletroeletrônica, com o desenvolvimento de detectores CCD (do inglês, *charge-coupled device*) e

policromadores echelle. O uso desses dispositivos possibilitou uma maior sensibilidade, alta resolução espectral e temporal e respostas mais rápidas [60,61].

Nos anos 90, fibras ópticas foram integradas ao sistema LIBS, com a finalidade de levar a emissão do plasma ao sistema de detecção. Entretanto, a LIBS ganhou maior evidência a partir de 1995, após a publicação de diversos artigos científicos com o objetivo de resolver problemas analíticos (monitoramento do meio ambiente, processos industriais, análise de explosivos, análise geoquímica, mineralógica, análise de metais, petróleo, objetos arqueológicos) [62-64].

Em Pisa, Itália, no ano de 2000 ocorreu o primeiro encontro mundial de LIBS, reunindo pesquisadores interessados em discutir o desenvolvimento e comercialização desta técnica. [55]. Nos últimos anos, a LIBS assume uma grande importância para comunidade científica e o número de publicações só tem crescido, constando, até o mês de abril de 2010, mil e duzentos trabalhos na área de LIBS. Isto evidencia o grande potencial de aplicações em química analítica e em diferentes áreas (missões espaciais, odontologia, arqueologia, microbiologia, oncologia e perícia criminal) [62,63,65]. O gráfico de evolução do número de artigos pode ser visto na Figura 11.

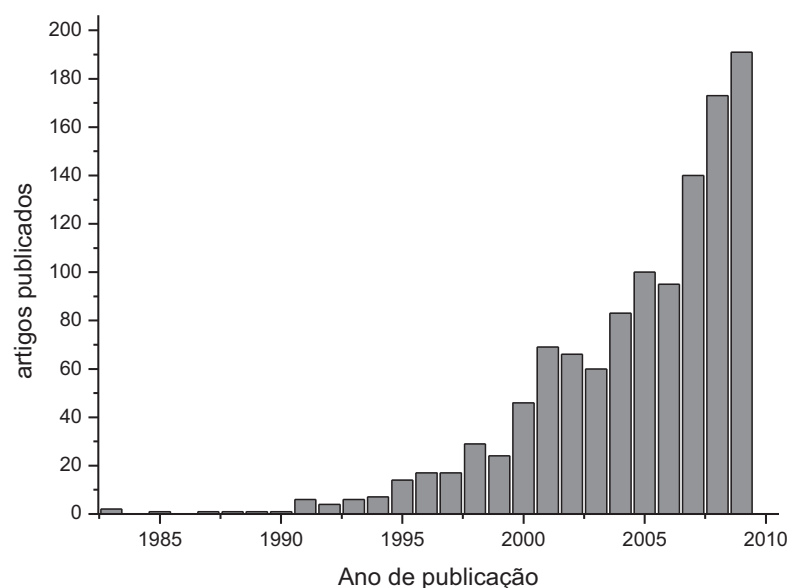


Figura.11-Número de publicações na área de LIBS de 1983 a 2009, baseado no banco de dados da Web of Science, consultado em abril de 2010.

Na literatura existem poucos trabalhos que relatam o uso da LIBS em análise elementar forense para identificar GSR. Entretanto, existem vários trabalhos envolvendo o uso do LIBS para detecção de Ba, Pb e Sb em outras matrizes, como o estudo de Eppler e colaboradores que determinaram a concentração de Ba e de Pb em matrizes de solo e areia [66].

A LIBS também tem sido usada extensivamente para identificação de ligas metálicas, as quais contêm metais GSR, como Ba, Pb e Sb [67]. Em 2002 Schmidt e colaboradores utilizaram a LIBS para determinar íons metálicos, incluindo Ba e Pb, em membrana polimérica de troca iônica [68].

O primeiro trabalho de LIBS para determinar quantidades traço de GSR (principalmente Ba e Pb) foi proposto por Dockery e Goode no ano de 2003. Neste trabalho uma fita adesiva foi pressionada sobre as mãos de um suspeito que atirou com um único tipo de arma de fogo e munição [69]. Nesse trabalho 6 indivíduos participaram da sessão de tiros, onde cada um realizou de um a cinco disparos. Os brancos foram obtidos com 20 indivíduos que não atiraram. A taxa de erro associada à identificação de pessoas que atiraram uma única vez por LIBS foi encontrada pela técnica de simulação matemática Monte Carlo. Neste trabalho um único pulso de laser foi empregado e 20 locações diferentes da fita adesiva foram analisadas. Os comprimentos de onda estudados foram selecionados de acordo com as raiais espectrais mais persistentes e intensas, sendo observadas sete raiais de Ba após o disparo. Para cada raia foi empregado o sinal máximo obtido entre as 20 locações, a fim de minimizar a presença de falso-positivo e falso-negativo. Para identificação dos atiradores, foram utilizados, para cada região de interesse, intervalos de confiança construídos a partir do conjunto de amostras de não-atiradores ($3 \times S_b$, onde S_b é o desvio padrão das medidas do branco). Caso um dos valores de emissão excedesse o intervalo de confiança, o indivíduo era considerado um atirador. Entre os testes realizados com os seis atiradores que praticaram apenas um disparo, considerando as sete raiais, o número de vezes que a amostra excedeu o intervalo de confiança foi igual a 12. Em todas as amostras pelo menos uma raia de Ba foi detectada. Para os atiradores que praticaram 5 disparos, o número de raiais de Ba detectada foi superior, excedendo o intervalo de confiança 40 vezes.

Na simulação Monte Carlo, foram simulados 2000 espectros provenientes de não atiradores e atiradores, sendo avaliados para cada região de interesse, dois intervalos de confiança ($1,5 \times S_b$) e ($3 \times S_b$). Para o intervalo de ($1,5 \times S_b$) foi considerado um resultado positivo para GSR quando excedia o valor limite em 4 raiais de Ba. Entre os atiradores, 99,9% das pessoas que atiraram foram identificadas corretamente e 41,9% das pessoas que não atiraram foram identificadas como possíveis atiradores (falso-positivo). Entretanto, para o intervalo de confiança de ($3 \times S_b$) o valor limite foi de 6 raiais de Ba, e entre os atiradores 69,7% foram identificadas corretamente e 99,9 % dos não atiradores foram identificados corretamente.

Recentemente o mesmo grupo de pesquisa de Dockery investigou a permanência de partículas GSR nas mãos de atiradores em intervalos de várias horas usando uma fita adesiva pressionada contra a pele para coleta das amostras [28]. O tempo máximo que as amostras foram coletadas foi de 192 h após o disparo com arma de fogo. Os atiradores foram instruídos a continuar suas atividades diárias normalmente, incluindo a lavagem das mãos e tomar banho. Foram utilizados 25

voluntários e um pulso de laser para cada locação da fita adesiva. Para cada amostra, 20 locações foram obtidas e um total de 500 espectros de emissão. Neste trabalho as amostras foram analisadas diretamente por LIBS em um espectrômetro comercial. A região de interesse selecionada consistiu no comprimento de onda em da raia de Ba que apresentou maior intensidade em relação às demais, sendo considerada a raia de emissão em 455,40 nm. O limite de detecção para o Ba foi determinado (intensidade de emissão média do branco + $3S_b$) e os resultados positivos e negativos foram atribuídos pela comparação com uma biblioteca composta de valores de intensidade referentes a 25 brancos (não-atiradores). Em alguns experimentos foi observada a presença de Pb, mas o Sb não foi detectado devido ao fato de que as linhas de emissão mais intensa se encontram na região UV. Para quantificar o tempo de vida, um modelo de decaimento exponencial foi ajustado aos dados. Resultados positivos para GSR foram obtidos até 126 h ou 5,27 dias após disparo de arma de fogo.

II. 1.2.1. Conceitos Básicos e Características do Laser Usado no LIBS

Laser cuja sigla em inglês significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, se baseia na amplificação da luz por emissão estimulada, no qual uma fonte de bombeamento externa (lâmpada pulsada, descarga elétrica, reação química, colisão com elétrons, outro laser) incide no meio ativo (composto sólido, líquido ou gasoso) promovendo os elétrons do estado fundamental para níveis excitados, cuja energia absorvida é liberada como fóton [37, 70].

No entanto, dependendo do meio ativo, alguns átomos podem apresentar níveis de energia, em que o elétron não consegue retornar espontaneamente para o estado fundamental. Estes níveis de energia são denominados de estados metaestáveis. O tempo de permanência dos elétrons no estado metaestável é relativamente longo quando comparado com a emissão espontânea (10^{-7} a 10^{-8} s), o que permite uma maior densidade de população em relação ao estado fundamental (inversão de população) [71,72]. O retorno ao estado fundamental pode ocorrer através da transferência de energia de elétrons localizados em níveis mais energéticos que o estado excitado metaestável, ou por colisão, desencadeando uma reação em cadeia, em que a emissão de novos fótons é estimulada. Estes possuem frequência, comprimento de onda, fase e polarização semelhantes a do fóton incidente.

Por último, a amplificação é aumentada devido à presença de espelhos, alinhados nas extremidades da cavidade óptica, que atuam como realimentação. Porém, só atingem os espelhos os fótons que se deslocam em linha paralela à cavidade, os demais saem para o exterior da cavidade ressonante. Os fótons refletidos se mantêm no sistema, interagindo, dessa forma, repetidas vezes com outros elétrons excitados do meio ativo. A emissão induzida dos níveis metaestáveis aos níveis

fundamentais continuará até que perdure a inversão de população. Porém, uma fração da energia total emitida do laser sai do sistema, devido a um dos espelhos ser parcialmente refletor (95%) [73].

O laser tem como principal característica a radiação monocromática, sendo muito útil e importante para espectroscopia. Isso é possível porque as energias do fóton estimulante e do fóton emitido são iguais. Além disso, a intensidade do feixe é alta, podendo atingir a potência de 10^{12} W em lasers pulsados. Esta alta potência permite que o laser seja utilizado em sistema LIBS [55].

A maior parte do feixe da radiação laser propaga-se na mesma direção, com pouca dispersão, sendo por isso bastante estreito, denominado colimado. Além disso, o laser é coerente, devido às ondas da radiação estar em fase e temporalmente coerentes.

Para uma melhor compreensão, o processo de emissão do meio ativo de (Nd:YAG) cristal contendo itrio-alumínio dopado com íons neodímio, está esquematizado na Figura 12. O íon neodímio absorve a luz da fonte de excitação, ocorrendo a passagem do estado fundamental E_1 para estados excitados E_4 . Em seguida por decaimento não-radiativo os elétrons passam rapidamente para o estado metaestável E_3 , que possui um tempo de vida longo. A emissão laser é gerada pela transição $E_3 - E_2$, liberando fótons na região de 1064 nm, decaindo então rapidamente para o estado fundamental E_1 [74].

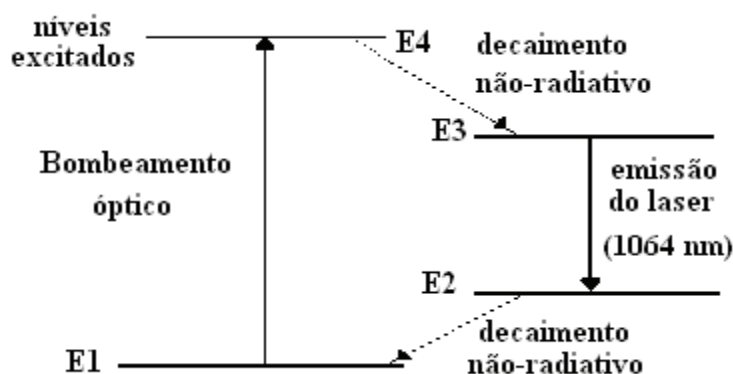


Figura.12-Diagrama do princípio de transição atômica do Nd:YAG

Laser Nd:YAG *Q-switched* é muito utilizado em sistema LIBS por produzir feixe de saída pulsado com alta potência e curta duração de tempo [75]. Um modulador dentro do ressonador óptico reduz as perdas e uma grande quantidade de energia é armazenada no meio ativo, favorecendo a inversão de população. Após o acúmulo de energia, ocorre o disparo de um pulso laser de alta intensidade.

Para separação de linhas espectrais emitidas, a LIBS utiliza normalmente um policromador

com rede echelle, um sistema de alta resolução que separa as radiações nas diferentes ordens, diminuindo a superposição espectral, e com isso, produz larguras de bandas mais estreitas [76]. A detecção do sistema LIBS pode ser realizada através de diferentes dispositivos, entre os mais usados, o ICCD- dispositivo de carga acoplada intensificado (do inglês, *intensified charge-coupled device*) tem se destacado em análises em que o sinal analítico é pouco intenso e o aumento na sensibilidade é requerida. Além do mais, possibilita uma maior velocidade e melhor resolução temporal nas medidas de emissão, variando de segundos até nanosegundos [77].

II. 1.2.2. Princípios Básicos da técnica LIBS

LIBS é uma técnica espectroanalítica que emprega um pulso de laser de alta energia, para vaporizar e excitar espécies presentes na amostra (átomos, íons ou moléculas) gerando um gás ionizado (plasma) [49]. A luz emitida pelo plasma é coletada por uma lente, enviada através de uma fibra óptica para um seletor de comprimento de onda, com faixa espectral que varia de 200 a 1000. nm e em seguida é detectada por um dispositivo ICCD, conforme já mencionado. Por fim o espectro de emissão produzido pelas espécies presentes no plasma é obtido. (Figura 13).

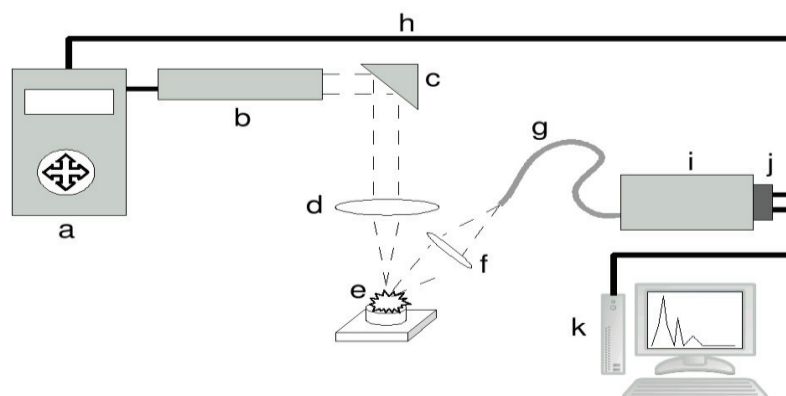


Figura.13. Diagrama esquemático de um sistema LIBS .(a) fonte de energia; (b) laser; (c) espelho; (d) lente; (e) amostra; (f) lente; (g) fibra óptica; (h) sinal do Q-switched; (i) espectrômetro echelle; (j) detector ICCD; (k) microcomputador.

O princípio da técnica LIBS é similar a outras técnicas convencionais em espectrometria de emissão em plasma, como espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Entretanto na LIBS a formação do plasma não requer sistemas de nebulização. Além disso, a amostra não precisa ser transportada em direção a fonte do plasma, já que o processo de ablação e excitação é feito por um pulso de laser, formando o plasma *in-situ* [49].

A LIBS apresenta algumas vantagens quando comparada com outras técnicas analíticas convencionais de determinação elementar, o que a torna versátil e atrativa [49,78, 79]:

- Medidas rápidas (0,5 min) em tempo real, com precisão e com alta sensibilidade analítica;
- Permite análise multielementar simultânea na mesma matriz, podendo determinar praticamente todos os elementos da tabela periódica com alta resolução;
- Análise local em microregiões oferece uma alta resolução espacial (1 a 100 μm);
- Vaporiza uma pequena quantidade de amostra (0,1 a 100 μg), por isso é pouco destrutiva;
- É uma técnica relativamente simples, que não requer nenhum pré-tratamento da amostra;
- Pode ser aplicada em análise de amostras sólidas, líquidas e gasosas, com propriedades condutora, semicondutora, isolante, refratária, orgânica e inorgânica;
- Apresenta uma boa sensibilidade para alguns elementos, como Cl e F, que são elementos difíceis de detectar por outros métodos convencionais de emissão;
- A instrumentação pode ser portátil (remota ou de campo) com o uso de fibras ópticas;
- Apresenta baixo custo de análise, quando comparada a outras técnicas.

Como qualquer técnica analítica, a LIBS apresenta também algumas limitações, tais como:

- Dificuldade de obtenção de padrões adequados para construir uma curva analítica, por essa razão a técnica deve ser considerada semi-quantitativa;
- Efeitos de interferência matricial quando aplicado a aerossóis, devido à variação do tamanho das partículas;
- Baixa precisão (5 a 10%) quando se trata de amostras não-homogêneas. A precisão depende da amostra e das propriedades de excitação do laser;
- A possibilidade de dano à visão causado pelos pulsos de alta energia. Este inconveniente pode ser solucionado com a utilização de óculos de proteção;
- Os limites de detecção (ppm) são em geral mais altos quando comparados com as técnicas que empregam soluções (ppb);
- Pode ocorrer alargamento de linhas de emissão, auto-absorção do plasma e intensa radiação de fundo;
- Os lasers de pulso de curta duração podem apresentar um custo muito elevado

Entretanto, já existem mecanismos para mitigar as limitações que foram destacadas acima [80,81], como:

- 1) A utilização de um padrão interno, o qual possibilita um sistema livre de flutuações ocasionadas pela oscilação do laser.
- 2) Incidir sobre a amostra um pulso duplo de laser, que levará a um aumento na precisão e na intensidade de emissão;

- 3) Empregar lasers de pulso de curta duração (10^{-12} e 10^{-15} s) com o propósito de diminuir os efeitos de interferências, aumentar a sensibilidade e a precisão. Porém esses lasers normalmente possuem um custo mais elevado.
- 4) A presença de gerador de atraso (sistema TRELIBS), que permite um tempo de atraso entre o pulso e a aquisição do espectro de emissão e o controle do tempo em que o sinal será integrado pelo detector, aumentando assim a sensibilidade

Embora a técnica LIBS apresente inúmeras aplicações, ainda não é considerada uma técnica consolidada de análise espectroscópica, sendo pouco difundida quando comparada com outras técnicas convencionais como ICP-MS e ICP-OES. Isso ocorre possivelmente devido à ausência de métodos bem estabelecidos ou que ainda estão em desenvolvimento. No entanto sua padronização quanto às características instrumentais é necessária, devido a sua relevância dentro da análise química [55, 64].

II. 1.2.3. Formação do Plasma

O plasma é um gás que apresenta ionização parcial e alta densidade de elétrons livres, cuja energia fornecida ao gás tem que ser suficiente para gerar íons. A quantidade de energia a ser fornecida dependerá do átomo a ser estudado. O plasma é formado quando a irradiância do laser excede o limite de ruptura (*breakdown*) da superfície sólida ($10^6 - 10^9$ W cm⁻²). Num primeiro instante, a energia radiante do laser interage com a superfície da amostra em poucos segundos e a estrutura atômica e molecular é quebrada. Ocorre um aquecimento, seguido da vaporização de uma pequena fração da amostra (ng; µg). A evaporação do material ocorre na faixa de 10^4 a 10^9 W cm⁻². Esse material vaporizado pode conter átomos livres, íons, fragmentos moleculares e elétrons livres [49]. Entretanto para irradiância na faixa de $10^4 - 10^7$ W cm⁻², o vapor resultante é formado por partículas poliatômicas. Posteriormente, o material ablado continua absorvendo a energia e se expande de forma adiabática com velocidade supersônica, produzindo um choque de ondas que se propaga da superfície da amostra para a atmosfera. As espécies excitadas emitem um plasma ($T > 10000$ K) que é visível a olho nu e logo em seguida a velocidade de propagação diminui devido à colisão com outros gases ao redor [49].

O plasma formado é denominado quase neutro devido à anulação da carga eletrônica total em função da distribuição local entre cargas elétricas dentro do plasma, blindando-o de interferências externas e criando uma nuvem denominada pluma. O intervalo de tempo necessário para ocorrer todo o processo de formação do plasma varia de cerca de décimos de µs a poucos ms. O mecanismo

de ablação do laser é complexo e não é ainda claramente definido. Cronologicamente o processo de ablação é mostrado na Tabela 6 [49].

Tabela.6- Evolução do plasma induzido por laser a partir de um material alvo.

Etapa	Processo de formação e finalização do plasma
I	Aquecimento do material
II	Evaporação do material
III	Dissociação das moléculas
IV	Absorção da radiação laser
V	Ignição do plasma
VI	Aquecimento do plasma por foto-ionização
VII	Blindagem da superfície do plasma
VIII	Expansão do plasma
IX	Expansão adiabática
X	Resfriamento do plasma
XI	Formação de aglomerados (<i>cluster</i>)

II. 1.2.4. Fatores que Afetam a Formação do Plasma

As características do laser afetam diretamente a formação do plasma, sendo mais indicado para sistema LIBS, os lasers pulsados de curta duração (nanosegundos, picosegundos ou femtosegundos), com altas densidades de potência do pulso focalizado (irradiância) e com energia por pulso na ordem de mJ (pulso de nanosegundos varia de 10 a 500 mJ). Fatores importantes para o processo de ablação são:

a) *Comprimento de onda (IV, UV e visível) do laser* – Está diretamente relacionado com o mecanismo térmico e não térmico do plasma. Para o processo térmico, elétrons absorvem diretamente a luz do laser, transferindo essa energia para o átomo, fundindo e vaporizando a amostra. Isso ocorre devido à diferença de calor latente de vaporização para diferentes elementos químicos. A massa vaporizada e o número de espécies atômicas neutras aumentam com a diminuição do comprimento de onda. Os lasers mais conhecidos para produzir o plasma são o de Rubi (694 nm), Nd:YAG (1064, 532, 355, 266 e 213 nm); CO₂-TEA (10,6 μm); N₂ (337 nm) e XeCl (308 nm) [72,75]. Entretanto, o laser mais utilizado em LIBS é Nd:YAG (1064 nm), por possibilitar o uso de geradores de harmônicos, além de existir em diversos tamanhos, potência, duração de pulso, com eficiência quântica de até 50% [82].

b) *Irradiância (IR)* – Está relacionada com a intensidade do laser, expressa em unidades de potência por área (GW cm^{-2}) e é responsável pela densidade de elétrons e íons, que são gerados por absorção da radiação do laser por espécies neutras, formando íons. Dependendo da energia que os elétrons ganham, normalmente para $I_f > 10^8 \text{ W cm}^{-2}$, podem ocorrer dois mecanismos [49]:

- 1) a ionização em cascata, devido a absorção da radiação laser por elétrons do plasma (*bremssstrahlung inverso*) ao colidirem com espécies neutras ($e^- + M \rightarrow 2 e^- + M^+$). Nesse caso há um aumento exponencial da concentração de elétrons com o tempo, frequente em pulsos de lasers de alto comprimento de onda.
- 2) a ionização multifotônica, que envolve a absorção simultânea de um número suficiente de fótons por um átomo ou molécula ($M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$), presente apenas quando se utiliza pulsos de pequenos comprimentos de onda, $\lambda < 1 \mu\text{m}$.

c) *Blindagem do plasma* – A blindagem é um fenômeno que ocorre durante a expansão do plasma, devido ao equilíbrio das cargas elétricas do plasma. Sua função é impedir que a energia restante do pulso de laser alcance a superfície da amostra, reduzindo e parando a ablação da amostra, após a indução do plasma. A blindagem também promove um aumento da temperatura do plasma, favorecendo a emissão das espécies. Mas, se a blindagem ocorrer muito rápido, pode acontecer da massa ablada não ser suficiente para a medida do sinal analítico, diminuindo assim a sensibilidade. A presença de um gás facilmente ionizado (por exemplo, Argônio), ou feixes de laser com pulsos longos ($\tau > 1 \text{ ns}$) podem provocar um aumento na densidade de elétron do plasma, que conseqüentemente intensifica a absorção do laser, favorecendo a blindagem do plasma. No entanto, para pulsos curtos ($\tau < 10 \text{ ps}$) não há blindagem e a energia cedida pelo feixe ao plasma é maior neste regime.

d) *Propriedades físicas da amostra* – As propriedades da amostra apresentam uma importante influência na forma e tamanho das marcas (crateras) que ficam na amostra após o pulso de laser atingi-la. Essas propriedades físicas são a densidade, pontos de fusão e ebulição, condutividade térmica, calor específico e reflectividade. Estudos mostram que o limite de ruptura aumenta com o aumento de temperatura do ponto de fusão e ebulição da amostra. Isso sugere que os efeitos térmicos são importantes na ablação, em escala de nanosegundos, para fluências (J/cm) próximas ao limite de ruptura.

e) *Condições ambientais* – O tipo de atmosfera e a pressão ambiente ao redor do plasma pode afetar diretamente a densidade do plasma. Tendo em vista que gases com baixos potenciais de ionização,

como o Ar por exemplo, podem gerar um alargamento das linhas de emissão e auto-absorção, além de um aumento na intensidade [49,80]

f) *Efeito da geometria de amostragem* – Fatores geométricos, incluindo a distância da amostra à lente, orientação da amostra em relação ao feixe do laser e o método de coleta da radiação emitida (lentes ou fibra óptica) estão diretamente relacionados à qualidade e à divergência do feixe laser. Esses fatores influenciam na formação do plasma (temperatura do plasma, intensidades de emissão atômica e massa ablada) e nos resultados analíticos .

g) *Duração do pulso de laser* – Em pulso de laser ultra-curto (10^{-15} seg) a temperatura de interação laser-amostra é alta, cujo principal mecanismo de ablação ocorre através da vaporização. Nesse caso a duração do pulso é menor que o esfriamento dos elétrons e íons. Isso ocasiona uma ablação não térmica, em que os elétrons não se encontram em equilíbrio térmico com o retículo. Em geral proporciona espectros com uma melhor relação sinal/ruído, com maior sensibilidade, precisão [83].

Durante a emissão do plasma observa-se inicialmente o espectro contínuo (100 ns), proveniente de recombinações entre as espécies presentes no plasma e da alta densidade de elétrons livres e íons. A emissão de fótons ocorre devido aos elétrons acelerados ou desacelerados por colisões, predominando o efeito *stark* (desdobramento de linhas espectrais), com poucas informações espectroscópicas [84].

No entanto, a emissão do contínuo do plasma, pode ser eliminada com o uso de sistema TRELIBS, que fornece o espectro de emissão do analito instantes após a formação do plasma, obtendo uma linha de base mais definida e um espectro com menos interferência. O intervalo de tempo utilizado dependerá das raiais de emissão características para cada amostra e da influência da radiação de fundo. Na modalidade TRELIBS são empregados o tempo de atraso ou *delay* (intervalo de tempo entre o disparo do pulso do laser e o início da leitura) e o tempo de integração (tempo de aquisição do sinal pelo detector) [80,83].

O *delay* (tempo de atraso) está diretamente relacionado com a sensibilidade, de forma que um alto *delay* pode promover a perda de algumas raiais de interesse, ou uma diminuição significativa da intensidade. Entretanto um baixo *delay* ocasiona uma grande interferência da emissão do contínuo, com um número alto de raiais espectrais e intensas, considerando que nos primeiros instantes a radiação de fundo é alta.

O tempo de decaimento do espectro contínuo é bem mais curto que o decaimento do espectro discreto, aparecendo em seguida os espectros de emissão iônica (0,25 a 3 μ s), o espectros de

emissão atômica (0,5 a 5 μs) e por fim com o decaimento do plasma, os espectros de átomos neutros e moléculas (2 a 100 μs) [85].

II.1.3. TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

Métodos estatísticos multivariados são úteis para tratamento de dados multidimensionais gerados por instrumentos modernos, que registram em um único espectro um número grande de variáveis. Dentre as técnicas quimiométricas, destacam-se as técnicas de reconhecimento de padrões, que são aplicadas para avaliar similaridades e dissimilaridades entre as amostras. Estas técnicas podem ser divididas em supervisionadas ou não supervisionadas. Técnicas não-supervisionadas são empregadas quando se deseja avaliar a existência de agrupamentos naturais, sem empregar informações sobre as classes dos objetos nos cálculos. Em contraste, nos métodos supervisionados há necessidade de um conjunto de amostras (conjunto de treinamento) no qual se sabe *a priori* a classe a qual cada amostra pertence. Esta informação é utilizada para construção de modelos para cada classe. Através destes modelos novas amostras podem ser classificadas [86,87].

A análise por componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA), uma técnica de reconhecimento de padrões não-supervisionada, é considerada uma ferramenta de grande utilidade na química para análise exploratória dos dados. Esta permite que a informação contida em muitas dimensões seja visualizada em gráficos bi e/ou tridimensionais, definidos por um novo sistema de eixos. Estes novos eixos (denominados de componentes principais) são ortogonais entre si, construídos através de combinações lineares das variáveis originais.

Os coeficientes da combinação linear, que indicam quanto cada variável original contribui para uma determinada componente, são denominados *loadings*. As novas coordenadas das amostras no novo sistema de eixos das componentes principais são denominadas de *scores* (projeções das amostras). Cada componente é uma combinação linear de máxima variância, calculadas em ordem decrescente de importância.

Na PCA, as variáveis são agrupadas por similaridades, a partir da correlação entre elas, preservando apenas as informações químicas relevantes, diminuindo desta forma a redundância e consequentemente a dimensionalidade do conjunto de dados. A literatura cita o uso de PCA para análise exploratória de dados provenientes de análises espectrométricas em diferentes matrizes.

A modelagem independente e flexível por analogia de classes (*Soft Independent Modeling of Class Analogy* - SIMCA) é uma técnica de reconhecimento de padrão supervisionada que consiste na construção de modelos independentes para cada classe, no espaço multidimensional, através do uso de componentes principais. Idealmente inclui PCs suficiente para descrever a maioria das

variações [86,87]. Nesse método de classificação novas amostras são preditivamente adicionadas a uma classe existente de amostras.

Para definir o número ótimo de PCs necessário para modelar bem uma classe, geralmente emprega-se a técnica de validação cruzada (*cross-validation*)[88]. A similaridade das características de objetos desconhecidos (série de teste) com uma das classes previamente modeladas (conjunto de treinamento) será determinante para classificá-los como pertencentes a uma, várias ou nenhuma das classes. Caso não pertença a quaisquer das classes, é possível ainda estabelecer uma nova classe.

Para classificar, o SIMCA utiliza diferentes medidas de distância para avaliar a que classe pertence um novo objeto [86,87], tais como:

- Distância do objeto i para o modelo (S_i)* – É a medida de quão longe está o objeto da classe modelada, calculada pela raiz quadrada da variância residual da amostra em relação à classe.
- Distância do objeto para o centro do modelo (H_i)* – É a medida de quão longe está o objeto do centro da classe modelada (distância da projeção da amostra para o centro do modelo).
- Distância média do modelo (S_0)* – Representa a variância residual total de uma determinada classe.

A partir dessas distâncias, diferentes ferramentas de diagnósticos permitem avaliar os modelos gerados pelo SIMCA, a qualidade da classificação e as distâncias entre os modelos e objeto-modelo. Entre as análises estão:

- Gráfico Coolman ($Si^A \times Si^B$)* – Apresenta a distância ortogonal de um objeto com relação a dois modelos (A e B) selecionados simultaneamente. Os objetos podem pertencer a uma classe, nenhuma ou ambas as classes, que significa próximo à origem (intersecção dos dois modelos). A Figura 14 apresenta a interpretação do gráfico de Coolman.

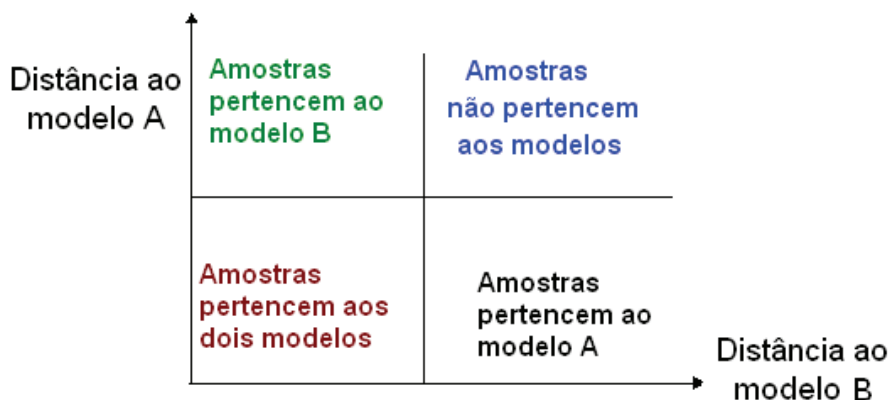


Figura 14 – Interpretação do gráfico de Coolman

- Gráfico Distância vs. Leverage ($Si \times Hi$)* – Informa o limite usado na classificação da distância do objeto para o modelo (desvio padrão residual) e a distância do objeto para o centro do

modelo, medidas para cada objeto. Significa que um objeto que se encontra dentro do limite para ambas as medidas, é provável que pertença a esta classe (modelo), com um nível de significância escolhido. A Figura 15 apresenta a interpretação do gráfico Si vs Hi

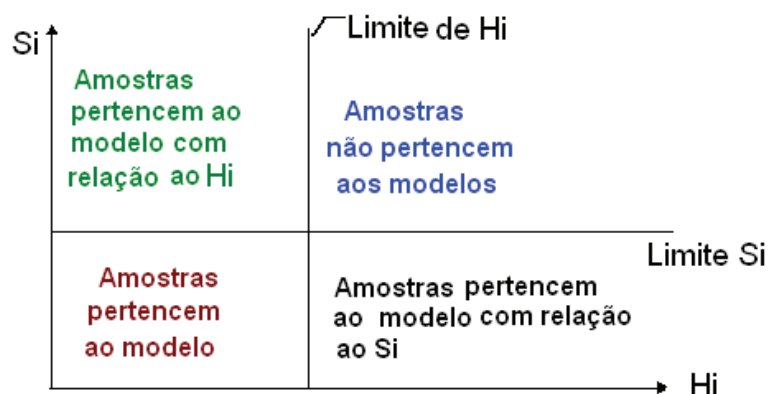


Figura.15 Interpretação do gráfico Si vs Hi

c) *Gráfico Si/S_0 vs. Hi* – Informa a distância relativa da amostra para o modelo (desvio padrão residual) e a distância da nova amostra para o centro do modelo. Tem a mesma interpretação que o gráfico $(Si \times Hi)$, a única diferença é que não utiliza valores absolutos, mas relativos (Si/S_0).

A Figura 16 apresenta a interpretação do gráfico Si/S_0 vs Hi



Figura 16– Interpretação do gráfico Si/S_0 vs Hi

A literatura descreve poucos trabalhos envolvendo quimiometria e a técnica LIBS. Entre os trabalhos citados, Sirven e colaboradores em 2009 [89] relataram o uso de LIBS associado às técnicas quimiométricas PCA e SIMCA com o intuito de discriminar 11 amostras de urânio em pó concentrado (*yellow cake*) usada para combustível nuclear, de diferentes origens geográficas. Os espectros foram processados por PCA e várias linhas de emissão no espectro selecionadas. Com a

PCA todas as amostras foram discriminadas, utilizando em seguida a técnica SIMCA para classificá-las. A taxa de acerto para as amostras identificadas foi de 100% para todas as classes. Um tratamento dos espectros foi realizado para uma reduzir os dados espectrais usados pelo modelo e diminuir a largura de banda espectral. A taxa de acerto ainda assim permaneceu elevada.

Um outro trabalho foi desenvolvido também por Sirven e colaboradores [90] com a finalidade de investigar a composição química de seis rochas de Marte empregando a técnica LIBS. Três métodos quimiométricos foram usados para classificar as rochas: PCA, SIMCA e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os espectros referentes a seis amostras foram analisados e a técnica SIMCA foi a menos sensível e a mais robusta para classes de rochas desconhecidas, além de ser mais capaz do que a PLS-DA para discriminar rochas com composição semelhante. Quando apenas a PLS-DA foi empregada 85,9% das amostras foram classificadas corretamente. Entretanto ao combinar PLS-DA e SIMCA 100% das amostras foram classificadas corretamente.

Coelho e colaboradores em 2009 desenvolveram uma nova metodologia para classificar solos brasileiros usando LIBS [91]. As técnicas SIMCA e Análise Discriminante Linear com seleção de variáveis pelo algoritmo de projeções sucessivas (SPA-LDA) foram usadas para classificar 149 amostras em diferentes tipos de solos (Argissolo, Latossolo e Nitossolo). Para diminuir a carga computacional associada à seleção de variáveis, foi utilizada um procedimento baseado na transformada wavelet. A melhor discriminação dos tipos de solo foi obtida com a SPA-LDA, que classificou corretamente 90% das amostras do conjunto de validação.

Recentemente Clegg e colaboradores realizaram em 2009 um estudo para classificar um conjunto de 18 tipos de rochas através de diferentes métodos quimiométricos, com o objetivo de demonstrar a diversidade geológica destas [92]. O método PLS foi empregado para criar um modelo de calibração capaz de prever a composição elementar das amostras. Para extrair informações sobre semelhanças químicas entre as amostras foi usada a PCA e para prever os tipos de rochas de um subconjunto de espectros LIBS tratados como desconhecidos foi utilizado o SIMCA. Os 104 espectros LIBS obtidos foram processados e normalizados para reduzir as flutuações espectrais. O percentual de acerto foi de 88,1%, sendo classificada erroneamente 3 amostras. Isso sugere que o conjunto de treinamento deve ser aumentado para construir um modelo mais preciso e preditivo.

II.2. OBJETIVO

2.1. Objetivos Geral

Este trabalho tem como objetivo empregar a espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) como uma técnica *screening* para detecção de resíduos de disparo de arma de fogo (GSR) nas mãos de indivíduos após disparos com armas de fogo, com a finalidade de identificar atiradores e não-atiradores.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a presença de GSR nas mãos de indivíduos: imediatamente após disparo com arma de fogo e após lavagem das mãos; que nunca tiveram contato com arma de fogo; após 16 h do disparo com arma de fogo; que trabalham com pastilha de freio em uma oficina mecânica
- Avaliar possíveis agrupamentos empregando PCA
- Construir um modelo SIMCA para a classe de atiradores e usar um conjunto de teste para avaliar a taxa de acertos.

II.3. PARTE EXPERIMENTAL

II. 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

II. 3.1.1. Testes de Tiros

As amostras foram obtidas por meio de 9 voluntários (peritos criminais da Polícia Federal e estudantes da UFPE), que se submeteram às sessões de tiros, executados na Associação de Tiros do Recife (ATIRE), em um estande de tiro aberto. Foi realizada uma sequência de 51 testes de tiros, utilizando revólveres e pistolas com diferentes projéteis (encamisados, semi-encamisados e sem encamisamento) e doze tipos de munições com calibres variáveis (de 9 mm Luger, .380 AUTO, .38 SPL e .357 Magnum). A maioria das munições usadas foi produzida pela Companhia Brasileira de Cartuchos (CBC) e apenas duas foram fabricadas pela FC (Federal Cartridge Co.) e WCC (Western Cartridge Co.). As armas e as mãos dos atiradores foram limpas antes do disparo, para evitar qualquer contaminação por partículas GSR, provenientes de disparos anteriores. Para avaliar o método proposto para detecção de GSR, em cada sessão variou-se o número de disparos por atirador, sendo realizados no máximo cinco disparos consecutivos, de acordo com a Tabela 7.

II. 3.1.2. Coleta das Amostras

Antes e após cada sessão de tiros, foi realizada a coleta das amostras na região da pinça (dorsal) das mãos (direita e esquerda) dos voluntários. As amostras foram coletadas em fita adesiva (3M Scotch). O suporte (moldura para slide) para a fita adesiva com cada amostra, consistia de uma base retangular com dimensões externa de 50 x 50 mm e interna de 23 x 35 mm (Figura 21). Foram usadas duas fitas com diferentes larguras (25 mm e 45 mm). Após cada sessão de tiros, a fita foi pressionada cerca de dez vezes em ambas as mãos dos voluntários. As amostras foram coletadas antes e após a lavagem das mãos com água e sabão, com o intuito de investigar a permanência de resíduos GSR.

Para seis amostras, em vez da fita adesiva, foi utilizada uma resina polimérica líquida a base de alginato, de fabricação nacional [92]. Essa resina foi espalhada nas mãos dos voluntários, com auxílio de uma haste flexível de algodão, com o objetivo de distribuir o polímero na área da pinça dorsal, considerada como a região mais eficiente para retirada de partículas GSR.

A resina antes da polimerização foi coberta com uma gaze e em poucos segundos retiradas das mãos e mantidas em um recipiente plástico para secar e posteriormente serem analisadas pelo LIBS.

Tabela 7-Experimentos realizados com diferentes disparos, munições e atiradores

Experimento	Atirador	Munição	Tipo de projétil	Arma	calibre	Nº de disparos
1	A	FC Luger	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	1
2	A	WCC 1988	Ogival	Aço Inoxidável	9 mm	1
3	B	WCC 1988	Ogival	Liga oxidável	9 mm	1
4	A	CBC +P	Ogival	Aço Inoxidável	9 mm	1
5	B	CBC +P	Ogival	Liga oxidável	9 mm	1
6	A	CBC Luger	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	1
7	A	CBC Luger	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	4
8	B	CBC Luger	Expo	Liga oxidável	9 mm	1
9	B	CBC Luger	Expo	Liga oxidável	9 mm	4
10	A	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	1
11	A	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	4
12	B	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	1
13	B	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	9 mm	5
14	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.380	1
15	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.380	5
16	C	CBC, Silver Point	Expo	Aço Inoxidável	.380	1
17	C	CBC, Silver Point	Expo	Aço Inoxidável	.380	5
18	C	CBC, +P, Gold point	Expo	Aço Inoxidável	.380	1
19	C	CBC, +P, Gold point	Expo	Aço Inoxidável	.380	5
20	D	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
21	D	CBC +P	Expo	Aço Inoxidável	.38 SPL	5
22	B	Magnum, CBC	Expo	Aço Inoxidável	.357	1
23	B	Magnum, CBC	Expo	Aço Inoxidável	.357	5
24	D	+P, Gold point	Expo	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
25	D	+P, Gold point	Expo	Aço Inoxidável	.38 SPL	5
26	D	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
27	D	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	5
28	D	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
29	D	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
30	D	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
31	E	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
32	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
33	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
34	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
35	C	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
36	F	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
37	F	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
38	F	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
39	F	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
40	F	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
41	G	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
42	G	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
43	G	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
44	G	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
45	B	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
46	B	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
47	B	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
48	B	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	1
49	H	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2
50	H	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	3
51	I	CBC	Ogival	Aço Inoxidável	.38 SPL	2

Também foram coletadas amostras em 15 indivíduos que nunca atiraram e que não participaram das sessões de tiro. Ainda selecionaram-se dois voluntários para realizar um estudo temporal, que consistiu em coletar resíduos das mãos direita e esquerda com fita adesiva, após 16 h de ter executado 1 e 2 disparos. Para investigar a possibilidade de resultado falso positivo de GSR, foram coletadas 3 amostras de um voluntário que exerce atividade de mecânico de automóvel, antes e após lavar as mãos.

II. 3.1.3. Instrumentação e Detecção de GSR

Os experimentos foram realizados no laboratório de Química Analítica do Instituto de Química-UNICAMP. O sistema empregado consiste em um laser pulsado *Q-switched* do tipo Nd:YAG, da marca Brio-Quantel com diâmetro do feixe de 4 mm, 110 mJ/pulso, FWHM 5,5 ns e 20 Hz. Esse sistema foi montado, conforme mostra a Figura 17.

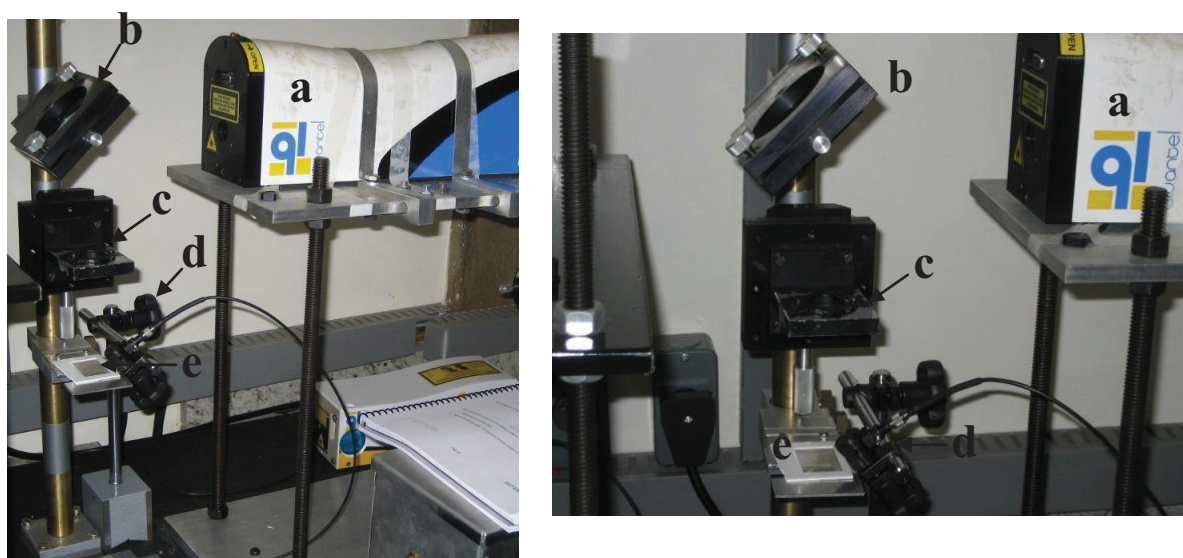


Figura.17 - Montagem do sistema LIBS (a) laser; (b) espelho; (c) lente; (d) fibra óptica; (e) amostra

Para atingir a superfície da amostra, o pulso de laser foi refletido por um espelho dicróico (Ealing Electro-optics, código: 45-6196-000) à 45° e direcionado verticalmente para uma lente bi-convexa de CaF₂ e BK7 (Ealing Electro-Optics), com distância focal de 10 cm. A radiação emitida pelo plasma foi coletada por uma lente de 30 mm de distância focal (Ocean Optics), que convergia a radiação emitida pelo plasma diretamente em uma fibra óptica (Ceram Optec) acoplada a lente, de 50 µm de diâmetro interno (Figura 18), enviando a radiação para o policromador e sistema de detecção (ICCD).

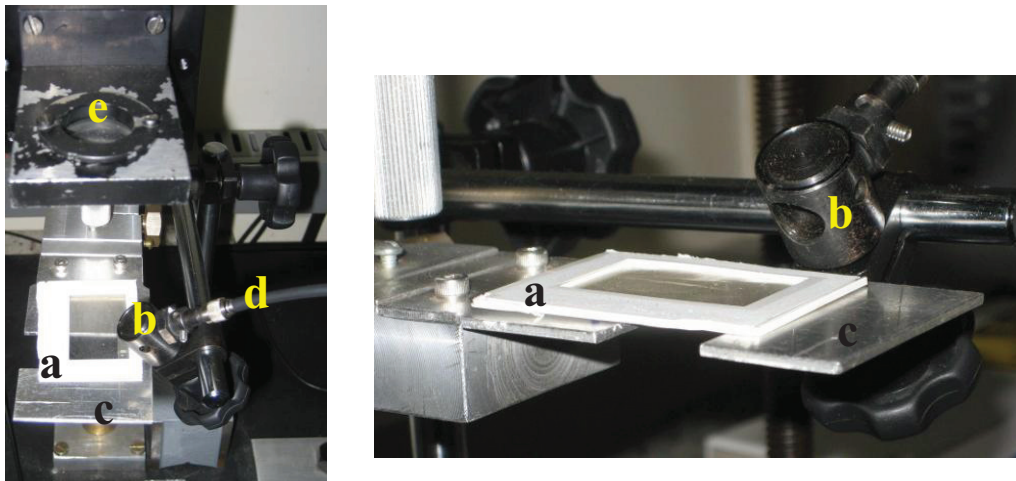


Figura.18 - Dispositivo que coleta a radiação do plasma: (a) suporte, (b) lente de 30 mm (c) placa retangular de alumínio, (d) fibra óptica, (e) lente focalizadora de 10 cm.

Uma placa retangular de alumínio (5 x 10 cm) com uma abertura lateral (1,7 x 3,5 cm), fixada numa haste metálica com altura regulável, foi empregada como anteparo para posicionar a amostra na distância com melhor ajuste focal. Para minimizar o *breakdown* do ar sobre a amostra e obter uma melhor relação sinal-ruído, o foco da lente foi ajustado 6 mm abaixo da superfície da amostra, de acordo com a Figura 19. Para fixação das partes do sistema, foram utilizados suportes magnéticos (Mitutoyo, modelo 7010SN).

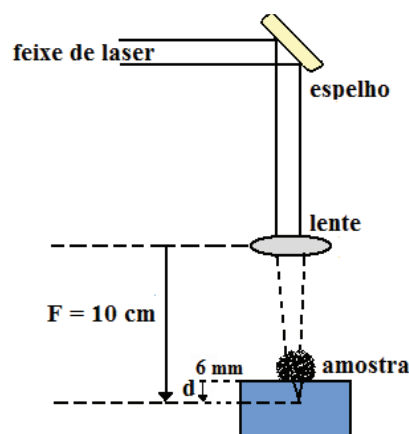


Figura.19 Diagrama esquemático da distância foco-amostra e distância focal

Um policromador echelle (Mechelle 5000, Andor Tehnology) e um detector ICCD (iStar DH734, Andor Technology) e sistema de detecção com resolução temporal (TRELIBS) foram usados, como ilustra a Figura 20. A temperatura do detector foi resfriado -10 °C e a irradiância máxima do sistema foi de $1,5 \times 10^{10} \text{ Wcm}^{-2}$. Os sinais de emissão foram identificados usando programa NIST Atomic Spectra [93].

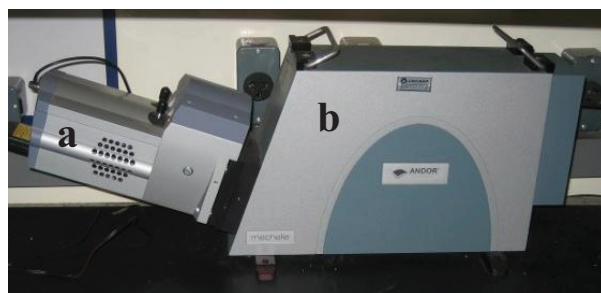


Figura.20: Sistema de detecção da empresa Andor Technology : (a) detector ICCD (b) policromador echelle

O espectro de emissão foi analisado usando o software Andor iStar versão 4.1.0.0 12C. Para evitar o efeito da radiação de fundo, foram usados um tempo de atraso de 3 μ s e tempo de integração de 30 μ s, já que esses parâmetros têm influência no perfil espectral. A escolha do tempo de atraso foi baseado nas características da raia de interesse assim como na região do espectro em que a raia ocorre e da sua persistência. Uma amostra foi analisada usando o MEV-EDS em acordo com a ASTM 1588-95 (Analysis of GSR by scanning electron microscopy energy-dispersive X-ray spectroscopy), empregando um instrumento modelo JEOL JSM-6360.

3.1.4. Procedimento de calibração

A calibração do policromador echelle foi realizada empregando uma lâmpada de Hg/Ar (Ocean Optics, HG-1, 253-922 nm) que foi posicionada por meio de uma fibra óptica na entrada do policromador. O programa de aquisição de dados adquirido juntamente com o echelle/ICCD (Andor iStar versão 4.1.0.0 12C) também foi empregado durante o procedimento de calibração. Um espectro da lâmpada de Hg/Ar para cada conjunto de linhas (1, 6, 10, 16 e 18) foi obtido e a partir da intensidade relativa das raia e o erro residual, foi possível saber a exatidão da posição da raia. Em caso de uma calibração inadequada, o programa automaticamente informa através de uma mensagem.

3.1.5. Procedimento de Amostragem no Sistema LIBS

A área exposta da fita adesiva ou resina foi submetida a 20 pulsos de laser, com um pulso em cada locação. As locações foram distribuídas de forma equidistantes, conforme mostra a Figura 21. Para evitar que uma mesma locação fosse atingida novamente por um pulso de laser, após a obtenção do espectro de emissão, mais 5 pulsos foram dados na mesma locação, apenas para tornar possível uma identificação visual. Esse procedimento evita que uma mesma locação da fita ou resina, seja analisada novamente num teste futuro por LIBS ou por outra técnica (MEV-EDS).

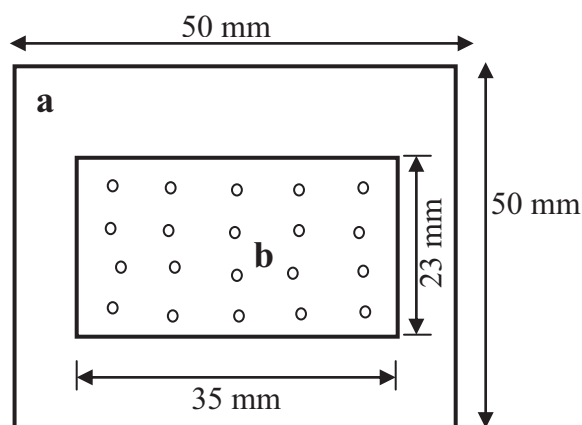


Figura.21-Esquema do suporte (a) moldura de plástico e (b) fita adesiva.

Duas amostras coletadas nas mãos de voluntários que atiraram, medidas previamente por LIBS, foram analisadas novamente, utilizando o mesmo procedimento descrito acima. Um conjunto adicional de 20 pulsos de laser foi adicionado à amostra em cada sessão, de forma que nenhuma localização foi atingida mais de uma vez por um pulso de laser. Estes experimentos foram empregados para demonstrar a preservação da amostra.

A técnica SIMCA foi empregada para classificar atiradores e não-atiradores usando os espectros obtidos por LIBS das amostras coletadas nas mãos de voluntários após atirarem com arma de fogo (D), atiraram e lavaram as mãos (L) e não atiraram ou não tiveram contato com arma de fogo no mínimo uma semana antes da coleta da amostra (N).

O modelo foi construído para uma única classe (atiradores). O conjunto de treinamento foi composto por amostras coletadas oriundas de voluntários que atiraram com arma de fogo (D) e amostras coletadas de indivíduos que atiraram e lavaram as mãos (L), totalizando 64 amostras

O número ótimo de PCs foi escolhido usando a validação cruzada. O conjunto de validação externa (ou teste) foi composto por 49 amostras, como descrito na Tabela 8.

Tabela 8- Conjunto de treinamento e validação externa

Amostras coletadas das mãos	Números de amostras	
	Conjunto de treinamento	Conjunto de validação
(D) Atiradores	35	15
(L) atiradores após lavarem as mãos	29	14
(P) atirador após 16 h do disparo	-	2
(M) Mecânico	-	3
(N) Voluntários que não atiraram	-	15

A matriz de dados foi composta pelo espectro médio obtido das 20 locações, para cada amostra. Cinco regiões espectrais (405,4219 a 406,5749 nm; 454,3076 a 456,1812 nm; 492,5487 a 494,1394 nm; 612,8567 a 614,9184 nm; e 649,2721 a 651,0392 nm) foram selecionadas, totalizando 264 variáveis espectrais. Estas regiões foram selecionadas de forma a incluir as raia de emissão mais intensas de Ba e Pb, conforme da base de dados NIST [93] e uma parte do sinal proveniente da radiação de fundo, que está próximo de cada pico. As raia intensas de Ba em 493,4 nm (iônica) e de Pb em 405, 75 nm (atômica) foram selecionadas para o estudo quimiométrico . Nenhuma correção no background foi necessária. A região espectral para o Sb não foi empregada, pois o sinal era pouco intenso, na maioria das amostras. Após essa seleção, o espectro resultante foi normalizado pela intensidade máxima.

II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II. 4.1 ESPECTROS

Inicialmente foram testados dois pulsos de laser na mesma região em todas as amostras, mas este procedimento não acrescentou informação relevante, já que os espectros de emissão são equivalentes. Logo, optou-se por empregar um único pulso de laser, que foi suficiente para vaporizar e excitar a amostra. Para cada amostra foram obtidos 20 espectros de emissão, provenientes de locais diferentes da fita adesiva e da resina polimérica.

A partir destes 20 espectros, foi obtido o espectro médio, bem como um espectro máximo para avaliar se a sensibilidade era afetada, conforme o trabalho de Dockery e Goode [69]. Este último foi composto usando o maior sinal para cada comprimento de onda de interesse dos 20 espectros individuais. A Figura 22 apresenta o espectro de emissão médio, obtido das mãos de um dos voluntários que não atirou com armas de fogo, no mínimo uma semana antes de coletar a amostra. As raia predominantes foram atribuídas as linhas de emissão de K, Na e Ca. Não foram observadas raia de Ba, Pb e Sb.

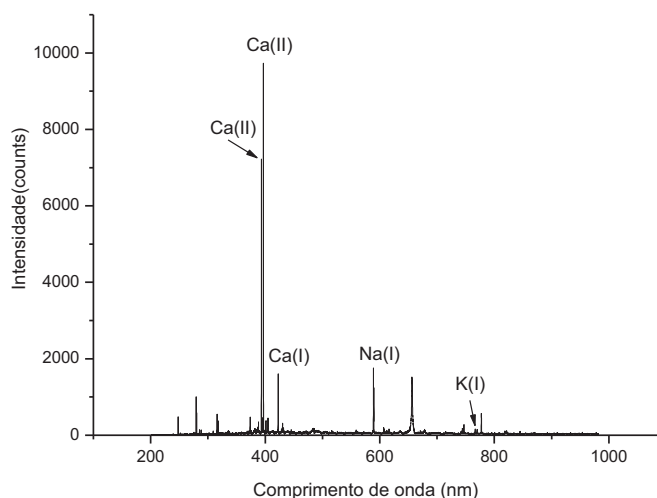


Figura.22- Espectro de emissão representativo de um branco predominam linhas de emissão atribuídas a Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm; Na (I) 588,99 nm e K (I) 769,89 nm

O espectro típico de uma amostra coletada com fita adesiva das mãos de um voluntário após 5 disparos (usando uma pistola .380 AUTO com munição fabricada pela CBC) é apresentado na Figura 23. Pode-se observar que predominam linhas de emissão de Ba e Pb.

Os testes realizados na coleta com resina polimérica mostraram ser eficientes para a retirada dos resíduos das mãos de pessoas que atiraram, assim como, a fita adesiva. No entanto, existem

dois inconvenientes: o tempo de polimerização da resina (cerca de 20 min) e a morfologia, que apresentava muita irregularidade, dificultando a análise.

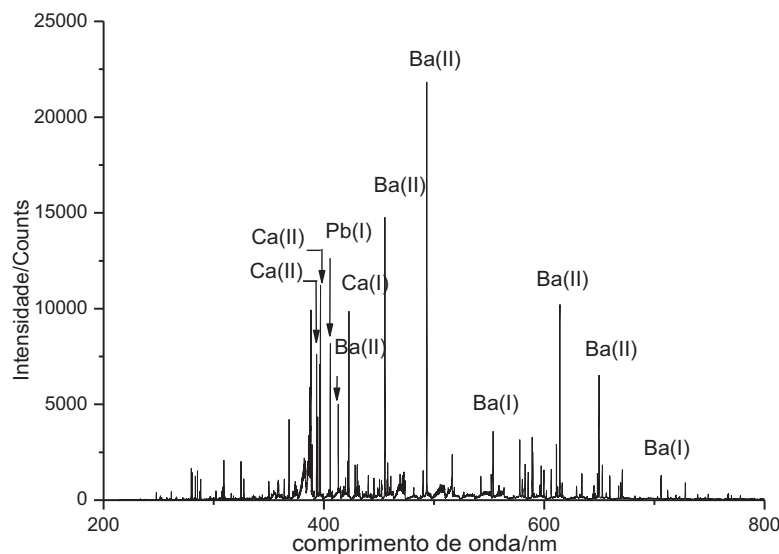


Figura.23- Espectro de emissão representativo de um teste positivo de GSR após 5 disparos. Predominam linhas de emissão que são atribuídas a Ba (II) 413,06 nm; Ba (II) 455,40 nm; Ba (II) 493,40 nm; Ba (I) 553,54 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e Pb (I) 405,75 nm

O espectro da amostra coletada das mãos do mesmo indivíduo, após lavar as mãos com sabão em barra de uso comum e água, é mostrado na Figura 24. É possível observar que raias de Ca voltam a predominar e raias de Na reaparecem no espectro. Porém, ainda são observadas raias intensas de Ba e Pb, típicas de GSR.

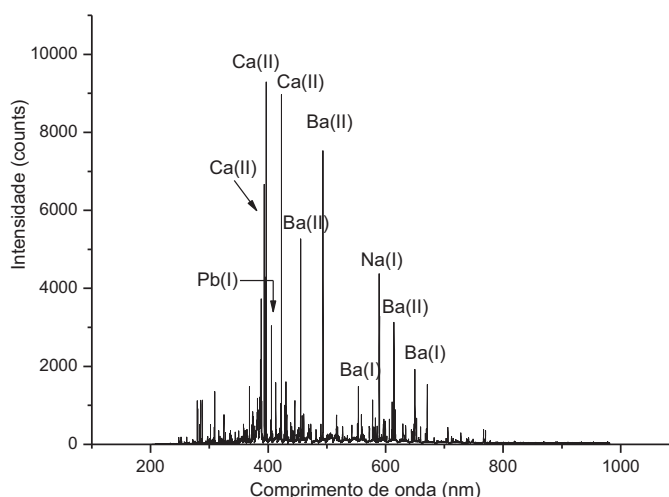


Figura.24 . Espectro de emissão representativo do mesmo indivíduo da figura 23 após lavar as mãos com água e sabão. Predomina linhas de emissão que são atribuídas, principalmente, a raias de Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm; Ba (II) 455,4 nm; Ba (II) 493,40 nm e Pb (I) 405,75 nm.

A amostra cujo espectro foi apresentado na Figura 23 foi analisada usando MEV-EDS, observando as condições de análise estabelecida na ASTM E 1588-95 [36]. A varredura foi realizada na superfície da amostra, e as partículas encontradas mostraram composição química e morfologia consistente com GSR. Constatou-se a presença dos dois elementos, Ba e Sb, assim como foram reconhecidos os elementos Ba-Sb numa “única” partícula de resíduo. A Figura 25 mostra a morfologia e composição dessa partícula.

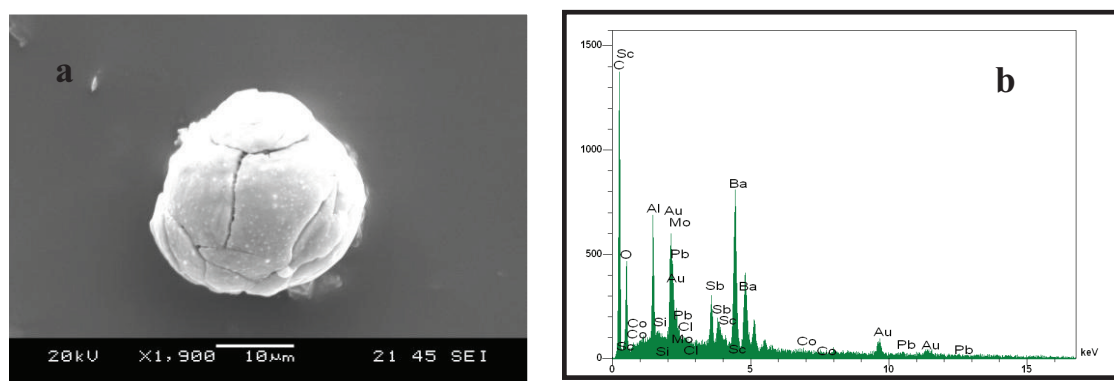


Figura.25- Imagem (a) e espectro de EDS de uma “única” partícula GSR Ba-Sb (b) encontrada em uma amostra de uma pistola .380 AUTO, depois de realizar 5 disparos

Também foram detectadas em outras amostras partículas de Pb-Sb, Ca, Si, S, Al e N, todas com morfologia irregular.

Sabe-se que algumas atividades profissionais podem levar a resultados falso-positivos. Por isso, foram realizadas análises de resíduos extraídos das mãos de um indivíduo que trabalha como mecânico de automóvel, que mais especificamente realiza atividades com pastilhas de freio de automóvel. Os espectros de emissão antes e após lavar as mãos com água e sabão são mostrados nas Figuras 26 e 27 respectivamente. Observou-se que predominam as linhas de emissão de Ca que são mais intensas e as de Ba menos intensa antes de lavar as mãos. No entanto, após lavar as mãos, ainda estão presentes linhas de emissão de Ba, mesmo com pouca intensidade (Figura 27).

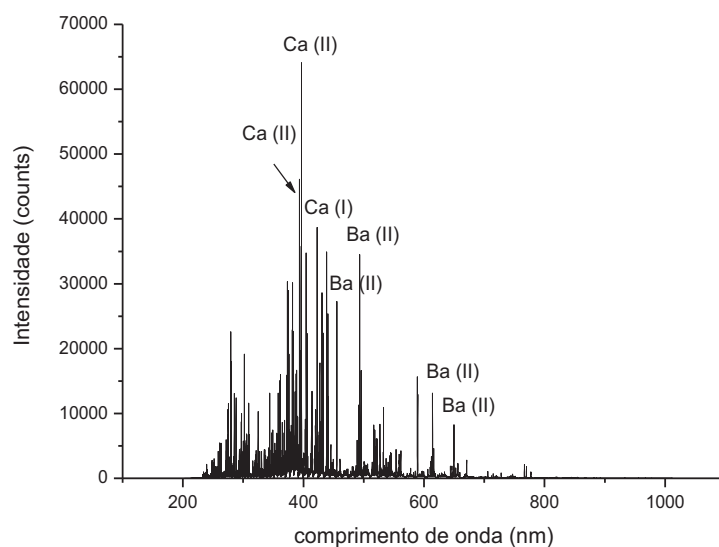


Figura.26 . Espectro de emissão representativo das mãos de um mecânico. Predominam linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ba (II) 455,40 nm e Ba (II) 493,40 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e raias de Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm.

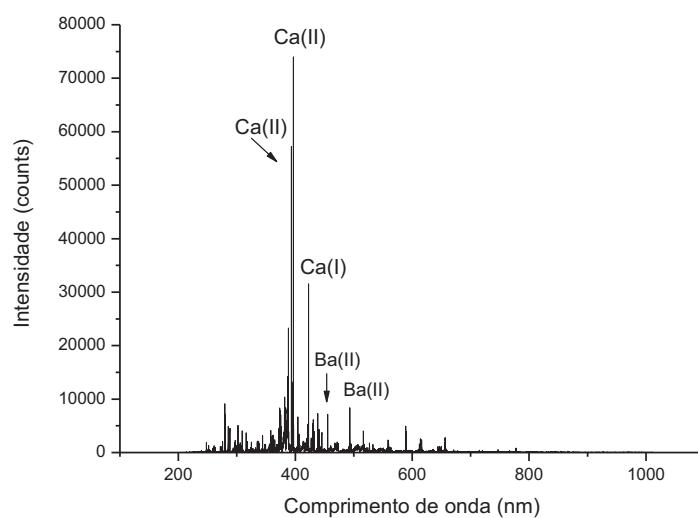


Figura.27 Espectro de emissão representativo das mãos de um mecânico após lavar as mãos. Predominam linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ba (II) 455,40 nm e Ba (II) 493,40 nm; Ba (II) 614,17 nm; Ba (II) 649,69 nm e Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm

Devido à existência de trabalhos que relatam a importância de determinar o tempo de permanência de GSR nas mãos depois de praticado o disparo, foi realizado um estudo temporal com dois voluntários. Como mostrado na Figura 28, mesmo após 16 h de praticado o disparo, ainda são encontradas, embora em menor quantidade, raias típicas relacionadas à GSR nas mãos do indivíduo.

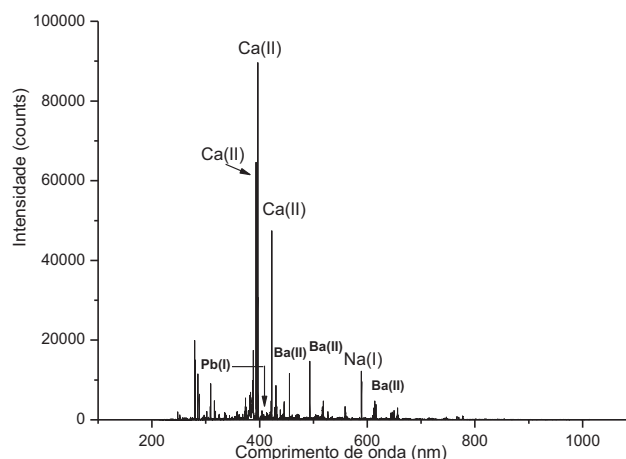


Figura.28-Espectro de emissão representativo de um indivíduo 16 horas depois de ter realizado disparos com arma de fogo. Predomina linhas de emissão que são atribuídas principalmente a Ca (I) 422,67 nm; Ca (II) 393,36 nm; Ca (II) 396,85 nm e algumas raia de Ba (II) 455,40 nm; Ba (II) 493,40 nm, Ba (II) 614,17 nm e Pb (I) 405,75 nm.

Devido à complexidade dos espectros de emissão obtidos, é possível diferenciar através de inspeção visual, apenas indivíduos que nunca atiraram dos demais indivíduos (atiradores e mecânico). Poranto se faz necessário o uso de ferramentas quimiométricas para buscar uma melhor discriminação entre os casos estudados.

II. 4.2 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A análise por componentes principais foi aplicada aos dados espectrais para avaliar a formação de possíveis agrupamentos. A matriz de dados foi composta pelos espectros médios obtidos nas 20 locações de regiões espectrais contendo picos de Ba e Pb. Os espectros resultantes foram normalizados pela intensidade máxima. O gráfico dos escores nas duas primeiras componentes é mostrado na Figura 29. A primeira componente (contendo 89 % da variância dos dados) discrimina os indivíduos que nunca atiraram, daqueles que atiraram (mesmo após lavagem das mãos).

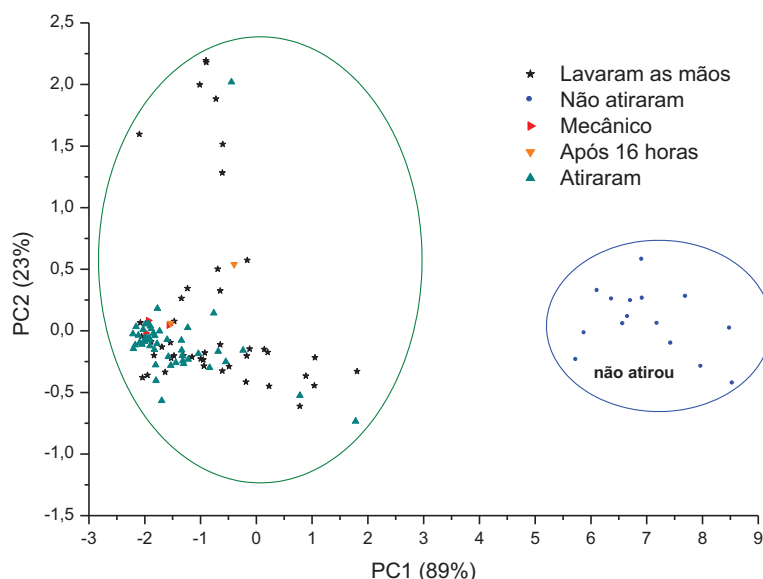


Figura. 29 - PC1 x PC2 dos indivíduos que não atiraram (azul); os outros casos estudados (verde).

Não foi possível distinguir as amostras coletadas das mãos logo após os disparos (D) daquelas obtidas nas mãos após lavagem com água e sabão (L), evidenciando que persistem GSR mesmo após lavagem. Também estão contidas no agrupamento L/D as amostras dos dois indivíduos obtidas 16 h após os disparos. As amostras coletadas nas mãos do mecânico estão contidas no agrupamento formado pelos indivíduos que atiraram, evidenciando o grave problema dos resultados falso-positivos. Foi também investigado se há algum tipo de agrupamento relacionado ao calibre da arma, quantidade de disparos, tipos de munições e arma, mas nenhum desses apresentou qualquer discriminação. A mesma análise de componentes principais foi realizada com os espectros “máximos”, e resultados semelhantes foram obtidos.

Os loadings (pesos) das variáveis na primeira componente principal são mostrados na Figura 30. As variáveis com menores valores indicam a sua relevância para a discriminação da classe de atiradores, que correspondem às linhas espectrais de Ba e Pb.

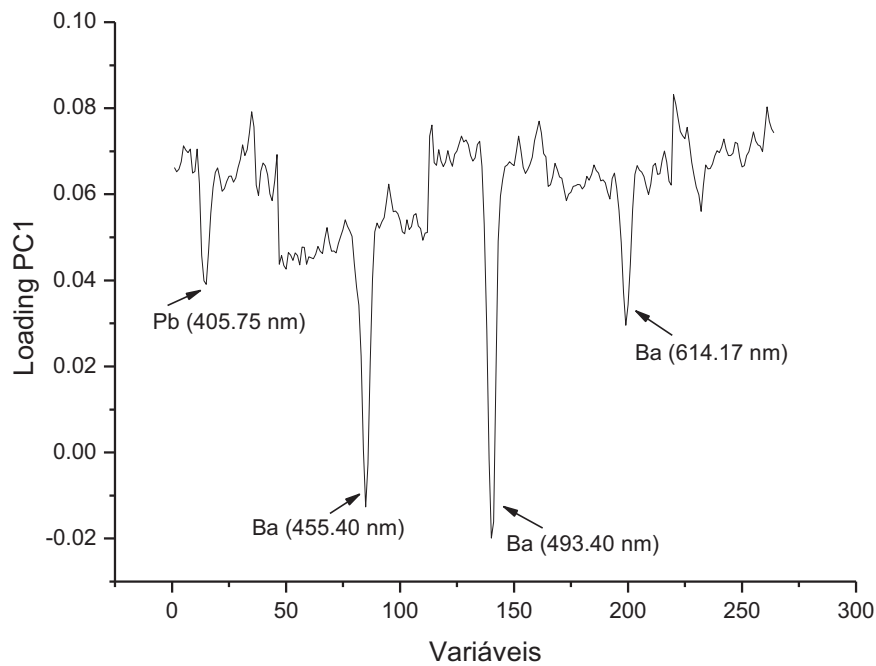


Figura. 30 Loadings para a primeira componente principal

Como a análise exploratória dos dados por componentes principais mostrou a formação de dois agrupamentos bem distintos: atiradores e não atiradores, o método de reconhecimento de padrões supervisionado SIMCA foi aplicado.

Foi construído um modelo para a classe de atiradores usando o conjunto de treinamento mostrado na Tabela 8. O número de componentes principais necessários para descrever esta classe foi 8. Após construção do modelo de classes (com nível de 5% de significância), as amostras do conjunto de teste foram usadas para validar o modelo.

A Figura 31 mostra o gráfico ($Si/S0$) vs (Hi). Pode ser visto que todas as amostras coletadas das mãos de quem disparou a arma (D) foram corretamente classificadas, mesmo após lavagem das mãos (L). As amostras coletadas das mãos dos dois voluntários, após 16 h do disparo (P), também foram corretamente classificadas, estando no mesmo grupo de atiradores (D/L). Nenhum resultado falso negativo foi encontrado. Uma das três amostras coletadas das mãos de um voluntário que trabalha como mecânico (M) também foi incluída na classe de atirador, evidenciando a questão do falso-positivo devido a aspectos relacionados a atividade ocupacionais. Duas amostras encontram-se fora do limite da classe para Hi , provavelmente devido a diferentes razões entre as intensidades das linhas espectrais dos elementos associados com GSR.

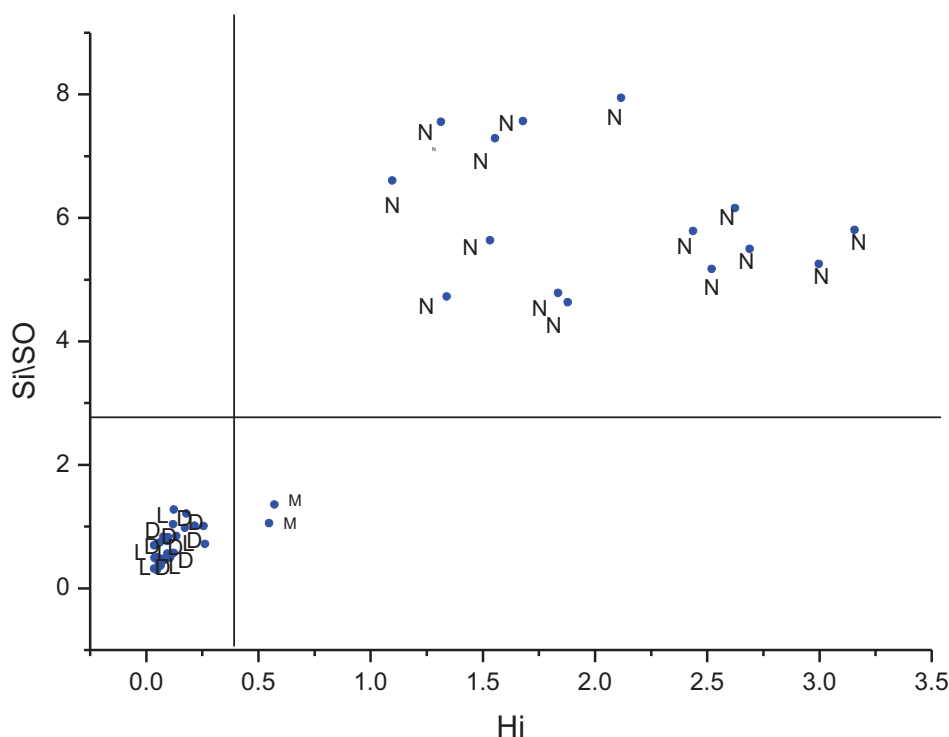


Figura.31– SIMCA - gráfico ($Si/S0$) vs (Hi) para o conjunto de validação. Amostras retiradas das mãos de: indivíduos que nunca atiraram (N), atiradores após disparos com a arma de fogo (D), atiradores após lavarem as mãos (L) e mecânico (M).

Todas as amostras que foram coletadas das mãos de quem não atirou (N) não foram classificadas como atiradores.

Conforme já mencionado, GSR é composta por pequenas esferas bem definidas. O número de partículas amostradas das mãos de um atirador depende do número de disparos executados. Todavia, o sinal analítico é composto apenas pelos pulsos de laser que atingem uma partícula de GSR. Neste trabalho foi demonstrado que 20 tiros de laser levaram a uma detecção correta em 100% das amostras com resultado positivo. Em alguns casos, no desenvolvimento deste trabalho verificou-se que amostras coletadas após um disparo apresentaram intensidade do sinal maior quando comparada com uma amostra coletada após cinco disparos. Isso pode ter ocorrido porque a intensidade é uma consequência do número estatisticamente definido de pulsos de laser que atingem uma partícula GSR.

Em resumo, esses resultados demonstram que é possível classificar os atiradores e não atiradores, mesmo depois de lavagem das mãos. Entretanto, o problema de possíveis resultados falso-positivos, decorrentes do tipo de atividade profissional também foi confirmado. O fato de não serem evidenciados resultados falso-negativos, torna viável o método proposto para análise *screening*. Nesse caso, apenas resultados positivos poderiam ser levados para análise por MEV-EDS.

Outro aspecto relevante de qualquer técnica de detecção GSR, tal como o proposto neste trabalho, está relacionado com a preservação das provas do crime. Um estudo temporal com duas amostras previamente analisadas pela técnica LIBS foi realizado, a fim de verificar se ocorreu vaporização e remoção das partículas GSR na fita adesiva, após um ano. Uma área da fita adesiva que não foi usada para análise, foi submetida novamente a duas análises adicionais, com 20 locações para cada teste. Neste caso, foram observadas em quantas locações (das 20 amostradas) podem ser encontradas linhas intensas de Ba e Pb. Os resultados obtidos com as amostra 1 e 2 estão apresentada na tabela 9, revelando que após um ano ainda são evidenciadas raias intensas de Ba e Pb. Assim, as áreas remanescentes, que não foram atingidas pelos 20 pulsos de laser, podem ser utilizadas para análises complementares e definitivas (usando o MEV por exemplo).

Tabela 9-Resultado da avaliação da preservação de evidência após a primeira análise LIBS.

Análise	Número de locações em foram detectados Ba e Pb		
	1 ^a	2 ^a (após um ano)	3 ^a (após um ano)
Amostra 1 - 16 h após o disparo	3 locações (Ba)	8 locações (Ba)	10 locações (Ba)
Amostra 2 – após 4 disparos	19 locações (Ba)	19 locações (Ba)	20 locações (Ba)
	16 locações (Pb)	16 locações (Pb)	19 locações (Pb)

II.5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados corroboram com os trabalhos de Goode e colaboradores [28,69], permitindo ampliar o estudo do GSR proveniente de diferentes tipos de armas e munições. Também foi avaliado o desempenho do LIBS na detecção de GSR, após os atiradores lavarem as mãos, logo após o evento e depois de 16 h. Verificaram-se resultados positivos para GSR nessas condições, com a presença de raias intensas de emissão.

Os espectros obtidos apresentaram uma “assinatura”, com linhas de emissão atribuídas principalmente ao bário e chumbo. A classificação SIMCA usando os dados espectrais mostraram que é possível discriminar as amostras coletadas de voluntários que não haviam disparado daquelas amostras coletadas nas mãos de atiradores, mesmo depois de lavar as mãos com água e sabão. O inconveniente do falso-positivo também foi confirmado, mas nenhum resultado falso-negativo foi encontrado. Assim, a metodologia proposta neste trabalho poderia ser usada como uma análise de *screening* para GSR.

O procedimento de *LIBS screening* proposto é considerado como pouco-destrutivo e a evidência é preservada. Isto permite que testes adicionais sejam realizados na mesma amostra (após um resultado preliminar do LIBS detectando a presença de GSR) como uma contra-prova.

A eficiência da técnica pode ser melhorada através do acoplamento do sistema LIBS a um microscópio óptico para identificar partículas GSR, auxiliando a localizar onde o pulso de laser deve ser direcionado sobre a amostra. Então, a informação obtida considerando a forma das partículas e sua composição química pode ser empregada, de forma complementar. Isto também poderá excluir resultados falso-positivos detectados pelo método (como no caso das mãos do mecânico).

O emprego da técnica LIBS forneceu resultados rápidos, diretos e eficazes tornando esta metodologia promissora como método *screening* na detecção de resíduos de tiro (GSR), para fins de investigação.

Estudos futuros podem revelar a potencialidade de LIBS para a detecção de GSR produzidos por munições sem chumbo procurando por impressões digitais relacionadas às intensidades dos elementos associados com o resíduo dos compostos orgânicos utilizados na munição (principalmente C, O, N). No entanto, o protocolo de amostragem e o substrato usados na coleta de GSR nas mãos dos suspeitos ainda precisam ser desenvolvidos.

II.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Wolten, G.M; Nesbitt, R.S; Calloway, A. R.; Particle analysis for the detection of gunshot residues. III: case record. **J Forensic Sci**; v.24, p. 864–869, 1979.
- [2] Meng, H. H; Caddy, B., Gunshot residue analysis -a review. **J. Forensic.Sci.**, v.42, p.553–5570. 1997.
- [3] MacCrehan, W.A; Layman, M.J.; Secl, J.D.; Hair combing to collect organic gunshot residues (OGSR). **Forensic Sci Int.**, v.135, p. 167–173, 2003.
- [4] Schwoeble AJ, Exline DL. **Current methods in forensic gunshot residue analysis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [5] Dalby ,O; Butler, D.; Birkett, J.W., Analysis of Gunshot Residue and Associated Materials—A Review, **J Forensic Sci.**, in Press, abril 2010.
- [6] Romolo F.S, Margot P. Identification of gunshot residue: a critical review. **Forensic Sci.Int.** v. 119, p. 195-211, 2001.
- [7] Meng, H. D.; Chen, Y., Energy dispersive X-ray analysis of bullets commonly encountered in Taiwan, **Forensic Sci. J.**; v.5, p. 21-34, 2006
- [8] **Revista científica do departamento da polícia técnica da segurança pública**, Bahia, ano 3, nº7, 2006.
- [9] Martiny A, Campos A.P.C, Sader M.S, Pinto M.A.L. SEM/EDS analysis and characterization of gunshot residues from Brazilian lead-free ammunition., **Forensic Sci Int** v. 177, p.9-17, 2008.
- [10] Wolten, G.M; Nesbitt, R.S; Calloway, A.R; Loper, G.L; Jones, P.F., Particle analysis for the detection of gunshot residue. I. Scanning electron microscopy energy dispersive X-ray characterization of hand deposits from firing. **J Forensic Sci.**, v. 24, p. 409-422, 1979.
- [11] Wolten, G.M; Nesbitt, R.S; Calloway, A.R; Loper, G.L.; Particle analysis for the detection of gunshot residue. II: occupational and environmental particles. **J Forensic Sci** v.24, p.423-430, 1979.
- [12] Miyauchi, H.; Kumihashi, M.; Shibayama, T., The contribution of trace elements from smokeless powder to post firing residues. **J Forensic Sci**, v. 43, p. 90-96, 1998.
- [13] Reardon, M.; MacCrehan, W.; Rowe, W.F.; Comparing the additive composition of smokeless gunpowder and its handgun-fired residues. **J Forensic Sci.**, v. 45, p.1232-1238, 2000.
- [14] Wolten, G.M.; Nesbitt, R.S., On the mechanism of gunshot residue particle formation. **J Forensic Sci.**,v.25, p.533–545,1980.
- [15] Basu S. Formation of gunshot residues. **J Forensic Sci.**,v. 27, p.72–91,1982.
- [16] Warlow, T.A. Firearms, the laws and forensic ballistics. United Kingdom: Routledge, 1996.

- [17] Schwoeble, A.J; Harrison, L.G., A study of gunshot residue particle air suspension to deposition time following discharge of a weapon. **Scanning**; v. 28, p.107, 2006.
- [18] Garofano, L; Capra, M.; Ferrari, F.; Bizzaro, G.P; Di Tullio, D.; Dell'Olio, M., Gunshot residue: further studies on particles of environmental and occupational origin. **Forensic Sci Int**; v. 103, p.1-21, 1999.
- [19] Cardinetti, B.; Ciampini, C.; D'Onofrio, C.; Orlando, G.; Gravina, L.; Ferrari, F., X-ray mapping technique: a preliminary study in discriminating gunshot residue particles from aggregates of environmental occupational origin. **Forensic Sci Int.**, v.143, p.1-19, 2004.
- [20] Jalanti, T.; Henchoz, P.; Gallusser, A.; Bonfanti, M.S.; The persistence of gunshot residue on shooters' hands. **Sci Justice**, v.39, p.48-52, 1999.
- [21] Fojtasek, L.; Kmjec, T., Time periods of GSR particles deposition after discharge—final results. **Forensic Sci Int.** v. 153, p. 132-135, 2005.
- [22] Nesbitt, R.S.; Wessel, J.E; Wolten, G.M.; Jones, P.F.; Evaluation of a photoluminescence technique for the detection of gunshot residue. **J Forensic Sci.**, v. 22, p.288-303, 1977.
- [23] Douse, J.M.F.; Dynamic headspace method for the improved clean up of gunshot residues prior to the detection of nitroglycerine by capillary column gas chromatography with thermal energy analysis detection. **J. Chromatog.**; v.464, p.178-185, 1989.
- [24] Kilty J.W. Activity after shooting and its effects on the retention of primer residue. **J Forensic Sci** v. 20, p.219–30, 1975.
- [25] Harrison H.C.; Gilroy R., Firearms discharge GSRs. **J Forensic Sci**; v.4, p.184-199, 1959
- [26] Heard, B.J., **Handbook of Firearms and Forensic Ballistics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 181-200p.
- [27] Krishnan S.S.; Detection of GSR on the hands by Neutron Activation and Atomic Absorption analysis. **J Forensic Sci**; v.19, p. 789-797, 1974.
- [28] Rosenberg G.M.B., Dockery C.R., Determining the Lifetime of Detectable Amounts of Gunshot Residue on the Hands of a Shooter Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, **Appl. Spectrosc**, v.62, p.1238-1241, 2008.
- [29] Cowan, M. E. and Purdon, P. L., A study of the paraffin test, **J. Forensic Sci.**, v.12 , p.19–36, 1967.
- [30] Maloney R.S, Thornton J.I. Color tests for diphenylamine stabilizer and related compounds in smokeless gunpowder. **J Forensic Sci**, v.27, p.318–329, 1982.
- [31] Steinberg, M., Leist, Y., Goldschmidt, P., Tassa, M., Spectrophotometric determination of nitrites in gunpowder residue on shooters' hands, **J. Forensic Sci.**, v.29, p. 464–470, 1984.

- [32] Tugcu H, Yorulmaz C, Karslioglu Y, Uner HB, Koc S, Ozdemir C, Image analysis as an adjunct to sodium rhodizonate test in the evaluation of gunshot residues—an experimental study. **Am J Forensic Med Pathol.**,v.27, p.296-299, 2006.
- [33] Bartsch M.R, Kobus HJ, Wainwright K.P. An update on the use of the sodium rhodizonate test for the detection of lead originating from firearm discharges. **J Forensic Sci.**, v.41, p.1046–51,1996.
- [34] Harrison H.C, Gilroy R. Firearms discharge residues. **J Forensic Sci.**, v.4, p.184–99,1959.
- [35] Melo A. J. G. Desenvolvimento de marcadores luminescentes para detecção de resíduos de tiro. Recife, 2009. Dissertação (Mestrado) –Departamento de Química, Universidade Federal de Pernambuco.
- [36] **Standard Guide for Gunshot Residue Analysis by Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive Spectroscopy**, ASTM E1588-95. 2001.
- [37] Skoog, D.A.; Holler, F.J. ;Nieman, T.A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5. ed., Porto Alegre/São Paulo, Artmed – Bookman, 2002, 836 p.;
- [38] Reis E. L. T., Sarkis J. E. S., Rodrigues C. Identificação de resíduos de disparos de arma de fogo por meio de espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo, **Quimica. Nova**, v.27, p. 409-413, 2004.
- [39] Rudzitis E, Wahlgren M. Firearm residue detection by instrumental neutron activation analysis. **J Forensic Sci**; v. 20, p.119–24, 1975.
- [40] Koons R.D, Havekost D.G, Peters C.A. Analysis of gunshot primer residue collection swabs using flameless atomic-absorption spectrophotometry; a reexamination of extraction and instrument procedures. **J Forensic Sci**, v.32,p.846–65, 1987.
- [41] Koons, R. D., Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of antimony and barium in gunshot residue collection swabs: a collaborative study, **Crime Lab. Digest.**, v.20, p.19–23, 1993.
- [42] Brihaye, C. I., Machiroux, R., and Gillain, G., Gunpowder residues detection by anodic stripping voltammetry, **Forensic Sci. Int.**, v. 20, p. 269–276, 1982.
- [43] Woolever, C. A., Starkey, D. E., Dewald, H. D., Differential pulse anodic stripping voltammetry of lead and antimony in gunshot residues, **Forensic Sci. Int.**, v.102, p. 45–50,1999.
- [44] Fischbeck, H. J., Ryan, S. R., and Snow, C. C., Detection of bullet residue in bone using proton-induced X-ray emission (PIXE) analysis, **J. Forensic Sci.**, v.31, 79–85,1986.
- [45] Koons R.D, Havekost D.G, Peters CA. Determination of barium in gunshot residue collection swabs using inductively coupled plasma-atomic emission-spectrometry. **J Forensic Sci**. v.33, p.35–41, 1988.

- [46] Koons, R. D., Analysis of gunshot primer residue collection swabs by inductively couple plasma-mass spectrometry, **J. Forensic Sci.**, v.43, p.748–754, 1998.
- [47] MacCrehan, W. A., Smith, K. D., Rowe, W. F., Sampling protocols for the detection of smokeless powder residues using capillary electrophoresis, **J. Forensic Sci.**, v.43, p.124–199, 1998.
- [48] Charpentier, B.;Desrochers, C., Analysis of primer residue from lead free ammunition by X-ray microfluorescence, **J. Forens. Sci.**, v. 45, p.447–452, 2000.
- [49] Sneddon, J.; Lee, Y-III; Song, K.; Advances in Atomic Spectroscopy, vol.7, Capitulo 6, p.287, 2002.
- [50] Noll, R., Terms and notations for laser-induced breakdown spectroscopy, **Anal. Bioanal. Chem.**,v.385, p.214, 2006.
- [51] Einstein, A.; **Phys. Z.** v. 18, p.121, 1917.
- [52] Shawlow A.L., Townes C.H., Infrared and optical masers, **Phys. Rev.** v.112, p.1940–1949, 1958.
- [53] Maiman T.H., Stimulated optical radiation in ruby, **Nature** v.187, p. 493–494, 1960.
- [54] Brech F., Cross L, Optical microoemission stimulated by a ruby laser, **Appl. Spectrosc.** v. 16, p.59, 1962.
- [55] Radziemski, L. J., Review -From LASER to LIBS, the path of technology development, **Spectrochim. Acta B** v.57, p.1109–1113, 2002.
- [56] Maker P. D., Terhune R.W., Savage C.M., Optical third harmonic generation, Proceedings of Third International Conference on Quantum Electronics, Paris, Columbia University Press, New York, v. 2, p.1559, 1964.
- [57] Runge, E. F; Minck, R.W, Bryan F.R., Spectrochemical analysis using a pulsed laser source,. **Spectrochim. Acta B**, v.20, p.733, 1964.
- [58]. Moenke H., Moenke-Blankenburg L., **Laser Micro-Spectrochemical Analysis**, Chapter 2, Crane, Russak, Co, New York, 1973.
- [59] Winefordner, J.D.; Gornushkin, I.B.; Correll, T.; Gibb, E.; Smith, B.W.; Omenetto; N.; Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star, **J .Anal. At. Spectrom.** v. 19, p.1061, 2004.
- [60] Zel'dovich, Y.B.; Raizer, Y.P.; Cascade ionization of a gas by a light pulse, **Sov. Phys. JEPT**, v.20, p.772, 1965.
- [61] Radziemski, L.J.; Loree, T.R.; Cremers, D.A.; Hoffman, N.M.; Time-Resolved Laser-Induced. Breakdown Spectrometry of Aerosols, **Anal. Chem.**, v.55, p.1246, 1983.
- [62] Pasquini C., Cortez J., L. Silva M. C., Gonzaga F. B., Laser Induced Breakdown Spectroscopy, **J. Braz. Chem. Soc.** v.18, p.463, 2007.

- [63] Harmon R. S., DeLucia F.C., McManus C.E., McMillan N. J., Jenkins T.F., Walsh M. E., Miziolek A., Laser-induced breakdown spectroscopy: an emerging chemical sensor technology for real-time field-portable, geochemical, mineralogical, and environmental applications **Appl. Geochem.**, v.21, p.730–747, 2006.
- [64] Song, K, Lee,Y. I., Sneddon J., Recent developments in instrumentation for laser induced breakdown J., **Appl. Spectrosc. Rev.** 2002, 37, 89.
- [65] Knight A. K., Scherbarth N L., Cremers D. A., Ferris M. J. Characterization of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for Application to Space Exploration **Appl. Spectrosc**, v.54, p.331-340, 2000.
- [66] Eppler A. S., Cremers D. A., Hickmott D. D., Ferris M. J., Koskelo A. C, Matrix effects in the detection of Pb and Ba in soils using laser-induced breakdown, **Appl. Spectrosc.** v.50, p.1175, 1996.
- [67] Goode S. R., Morgan S. L., Hoskins R., Oxsher A., Identifying alloys by laser-induced breakdown spectroscopy with a time-resolved high resolution echelle spectrometer, **J. Anal. At. Spectrom.** v.15, p.1133–1138, 2000.
- [68] Schmidt N. E., Goode S. R., Analysis of aqueous solutions by laser-induced breakdown spectroscopy of ion exchange membranes, **Appl. Spectrosc.** v.56, p.370–374, 2002.
- [69] Dockery C. R., Goode S. R., Laser-induced breakdown spectroscopy for the detection of gunshot residues on the hands of a shooter **Appl. Opt.** v.42, p.6153, 2003.
- [70] Milonni P.W.; Eberly, J.H. **Lasers**. New York, N.Y. Willey 1988.
- [71] Bogaerts, A.; Chen, Z.Y.; Effect of laser parameters on laser ablation and laser-induced plasma formation: A numerical modeling investigation **Spectrochim. Acta B**, v. 60, p. 1280, 2005.
- [72] Kleinbauer, J.; Knappe, R.; Wallenstein, R.; Principles of Ultrashort Pulse Generation, **Top. Appl. Phys.** v. 96, p.9, 2004.
- [73] Reid, G. D.; Wynne, K. In **Encyclopedia of Analytical Chemistry**; Meyers, R. A., ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2000. 13644p.
- [74] Paschotta R., **Field Guide to Laser Pulse Generation**, SPIE Press, Bellingham, WA, 2008.
- [75] Bordui, P. F.; Fejer, M. M.; norganic crystals for nonlinear optical frequency conversion.**Annu. Rev. Mater. Sci.**,v.23, p. 321, 1993
- [76] Sabsabi, M.; Héon, R.; St-Onge, L.; **Spectrochim. Acta, B**, v.60, p.1211, 2005.
- [77] Bauera H. E., Leisb F.;K. Niemax, Laser induced breakdown spectrometry with an échelle spectrometer and intensified charge coupled device detection, **Spectrochim. Acta B**: v. 53, p. 1815-1825, 1998.

- [78] Lee, Y. I.; Song, K.; Sneddon, J. **Laser-Induced Plasmas in Analytical Atomic Spectroscopy. In Lasers in Analytical Atomic Spectroscopy.** Publishers: New York, 1997. 197–236p.
- [79] Song, K.; Lee, Y. I.; Sneddon, J., Applications of Laser Induced Breakdown Emission Spectroscopy” **Appl. Spectrosc. Rev.**, v.32, p.187, 1997.
- [80] Russo, R.E; Mao, X.L.; Liu, C. e Gonzalez, J., **J. Anal. At. Spectrom.**, v.19, p.1084-1089, 2004.
- [81] Bolger, J.A., Semi-quantitative Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Mineral Drill Core, **Appl. Spectrosc.**, v. 54, p.181-189, 2002.
- [82] K. Kuhn, **Laser Engineering Prentice Hall**, Upper Saddle River, NJ, 1998.
- [83] Dudragne,L.; Adam,P.;Amoroux, J.,.Time-Resolved Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Application for Qualitative and Quantitative Detection of Fluorine, Chlorine, Sulfur, and Carbon in Air ,**Appl. Spectrosc.**, v.52, p.1321-1327,1998
- [84] Griem H.R., **Plasma spectroscopy**, New York, McGraw-Hill.1964.
- [85] Radziemski L. J., Cremers, D.A.; **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**, 1.ed. West Sussex England Wiley, 2006.
- [86] Beebe K.R., R.J. Pell and B. Seasholtz, Chemometrics – A pratical guide, Wiley, New York, 1998.
- [87] Esbensen K., Multivariate Data Analysis - **In Practice: An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design**, 5. ed. CAMO, Norway, 2004. 598p.
- [88] Bro R, Kjeldahl K, Smilde A.K, Kiers H.A. Cross-validation of component models: a critical look at current methods. **Anal Bioanal Chem.**, v. 390, p.1241-51, 2008.
- [89] Sirven J., Pailloux A., M’Baye Y., Coulon N., Alpettaz T.S. Gossé S.,Towards the determination of the geographical origin of yellow cake samples by laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics, **J. Anal. At. Spectrom.**, v.24, p.451-459, 2009.
- [90] Sirven J. Salle B., Mauchien P., Lacour J., Maurice S., Manhe G., Feasibility study of rock identification at the surface of Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods, **J. Anal. Atomic Spectrom.**, v. 22, p.1471–1480, 2007.
- [91] Coelho, M. J. P.; Cortez; J.J, Galvão, R. K. H.; Pasquini C.; Araújo M. C. U.; Coelho R. M.; Chibad M. K.; Abreu M. F.; Madarie B. E.; Classification of Brazilian soils by using LIBS and variable selection in the wavelet domain, **Anal. Chim. Acta** v.642, p.12-8, 2009.
- [92] Clegg S.M, Sklute E, Dyar M.D., Barefield J. E., Wiens R. C., Multivariate analysis of remote laser-induced breakdown spectroscopy spectra using partial least squares, principal component analysis, and related techniques, **Spectrochimica Acta Part B** v. 64 p. 79–88, 2009.

[93] http://www.peritocriminal.net/mambo/index2.php?option=com_content&do, acessado em maio de janeiro 2007

[94] <http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/index.html> Atomic spectral line database and NIST Atomic Spectroscopic Database, acessado em agosto 2008

Capítulo III. Determinação de mercúrio em arroz utilizando Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Vapor Frio (CV-AFS)*

* Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion
Maria José da Silva, Ana Paula S. Paim, Maria Fernanda Pimentel, M. Luisa Cervera, Miguel de la Guardia
Analytica Chimica Acta 667 (2010) 43-48

III.1 INTRODUÇÃO

III.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MERCÚRIO

O estudo de contaminantes ambientais tem despertado grande interesse da comunidade científica. Entre os metais pesados mais estudados, o mercúrio tem se destacado como um dos principais contaminantes no ambiente, cujas espécies químicas apresentam, no geral, alto potencial toxicológico ao homem e a outros organismos [1]. Uma das maiores preocupações no estudo da ecotoxicologia do mercúrio é a sua capacidade de persistir no ambiente, com forte tendência em bioacumular-se, seja através da ingestão de alimentos ou por processos de adsorção em corpos superficiais. O mercúrio sofre biomagnificação através de todos os níveis da cadeia alimentar, devido à elevada afinidade por mielina e membranas lipídicas [2].

O mercúrio é o único metal líquido a temperatura ambiente, com temperatura de ebulição abaixo de 650 °C, podendo ser encontrado principalmente nas formas inorgânicas, Hg^0 (vapor), íon mercúrico (Hg^{2+}) e mercurioso (Hg_2^{+2}), que pode ser facilmente oxidado a Hg^{2+} . O íon mercúrico (Hg^{2+}) é considerado a espécie com maior atividade biológica, com capacidade de formar complexos, tais como os compostos HgSH , HgOHSH e HgClSH . Também podem ser encontrados na forma de $\text{Hg}(\text{OH})_2$ e de diversos sais, sendo os principais: o cloreto de mercúrio (HgCl_2); calomelano (Hg_2Cl_2), usado em medicina; fulminato de mercúrio $\text{Hg}(\text{CNO})_2$, usado em explosivos; e o cinabrio HgS , usado em pigmentos [3,4].

Entre estas espécies, o Hg^{2+} , pode ser determinado pelo método colorimétrico e a espécie Hg^0 devido sua alta pressão de vapor à temperatura ambiente, pode ser obtido em forma gasosa e desta forma ser detectado diretamente, obtendo-se análise de alta sensibilidade, sendo este método conhecido como Geração de Vapor Frio.

No meio aquático e terrestre, alguns microorganismos, como as bactérias sulfato-redutoras na presença da enzima metilcobalamina, podem transformar o mercúrio inorgânico em orgânico. Isso ocorre devido à capacidade do íon Hg^{2+} em fazer ligação covalente com átomos de carbono, formando o metilmercúrio (CH_3Hg), uma das formas mais tóxicas para os organismos aquáticos. Outros compostos também podem ser encontrados, como: dimetil mercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$), fenilmercúrio e grupos ligantes contendo enxofre como a glutatona e cisteína [5].

No entanto a periculosidade dessas substâncias, sejam de origem inorgânica ou orgânica, está associada à eficiência de adsorção e acumulação no organismo, as quais dependerão da forma do metal, do tecido receptor e da fonte de exposição [6].

III.1.1.2. O Mercúrio no Ambiente.

O mercúrio é um elemento presente naturalmente na crosta terrestre, na água, na biota e na atmosfera. Aproximadamente 1/3 do mercúrio encontrado no ambiente é proveniente de processos naturais, como lixiviação e erosão das rochas, emissões de vulcões e evaporação de corpos aquáticos. Outros 2/3 são de processos antrópicos, como queima de combustíveis fósseis, veículos automotores, quebra de lâmpadas, incineração de resíduos urbanos e produção industrial. Esse mercúrio é liberado no ecossistema (atmosfera, hidrosfera, biosfera e litosfera) e pode interferir nos ciclos geoquímicos e participar diretamente das cadeias tróficas [7,8].

O enriquecimento de mercúrio (gasoso e particulado) na plantas apresenta bastante relevância para o ciclo do mercúrio, o qual ocorre principalmente por via de deposição úmida ou seca. A alta solubilidade do Hg^{2+} facilita sua absorção pelos tecidos foliares das plantas, que por processos químicos, fotoquímicos e/ou biológicos ainda não elucidados, poderá ser convertido na superfície das folhas para a forma reduzida Hg^0 [7,9].

Na atmosfera a maior parte do mercúrio está na forma reduzida (Hg^0), mas devido à presença de oxidantes como O_2 , O_3 , HClO , OH^- e HSO_3^- poderá formar o íon mercúrico (Hg^{2+}). Uma pequena fração do mercúrio divalente estará na forma de material particulado ($\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e HgSO_3) devido a adsorção em partículas atmosféricas. Através da deposição por via úmida principalmente do Hg^{2+} dissolvido ou por deposição seca do Hg particulado parte do mercúrio é removido da atmosfera e retorna para água, solo e vegetação [10,11]. Porém o mercúrio elementar, que é menos reativo e pouco solúvel ($2 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ a 25°C), permanece por um longo período de tempo na atmosfera, cerca de um ano, já que o processo de oxidação é muito lento.

O solo é onde se encontra a maior quantidade do mercúrio emitido por atividades antrópicas. Nele estão presentes as espécies Hg_2^{2+} e Hg^0 e a forma Hg^{2+} , que normalmente se encontra complexado com algum ligante. Em condições redutoras (solos mais profundos) podem-se originar os compostos HgSH , HgOHSH e HgClSH e em condições oxidantes (solos superficiais) $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})^+$, HgS e Hg^0 [12]. No entanto, a maior parte do mercúrio presente no solo está na forma Hg^{2+} adsorvido na matéria orgânica em solos ricos em ácidos húmicos e fúlvicos, ou por componentes inorgânicos, presentes em solos com caráter neutro ou básico. Os solos orgânicos também adsorvem, embora em menor quantidade a forma Hg^0 [11].

Nas superfícies das águas, grande parte do mercúrio está na forma oxidada (Hg^{2+}), associada a espécies orgânicas: MeHg , Me_2Hg e EtHg ; e inorgânicas: $[\text{Hg}(\text{OH})]^+$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$, $[\text{Hg}(\text{OH})_3]^-$, $[\text{HgCl}]^+$, HgClOH , HgCl_2 , $[\text{HgCl}_3]^-$, $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ e HgS (insolúvel). A presença de oxidantes (oxigênio, nitrato, nitrito, íons férrico, sulfato, enxofre) faz com que ocorra a diminuição do mercúrio gasoso dissolvido (Hg^0) no ambiente aquático. Entretanto, o mercúrio também é reduzido

a Hg^0 , através de processos fotoquímicos e biológicos, onde a radiação ultravioleta desempenha grande relevância para produção de Hg^0 . Em ambientes muito poluídos, a redução biológica (sulfato bactérias) é predominante [13-15].

A distribuição do mercúrio no ambiente é de aproximadamente, 95% no solo terrestre, 3% nas águas oceânicas superficiais e 2% na atmosfera. Com relação à exposição ao mercúrio, a concentração diária é cerca de 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ pelo ar, 2 $\mu\text{g}/\text{dia}$ pela água e 20 $\mu\text{g}/\text{dia}$ através dos alimentos [16,17].

II.1.1.3. Toxicidade do Mercúrio

O mercúrio é considerado um poluente de alto risco e mesmo em baixas concentrações pode causar sérios danos à saúde. Os efeitos decorrentes da exposição ao mercúrio são agravados porque a sua absorção ocorre com muita facilidade e a eliminação ocorre lentamente pelas fezes e urina, ocasionando seu acúmulo no cérebro, rins e fígado. Seus efeitos tendem a ser irreversíveis, principalmente no sistema nervoso central, reprodutivo, digestivo, renal, cardíaco, imunológico e respiratório [18].

Em uma exposição aguda, os vapores de Hg^0 são facilmente absorvidos através dos pulmões e passam rapidamente para o cérebro. No sangue, o mercúrio sofre oxidação pelos eritrócitos e rapidamente atinge outras áreas do corpo, que por ser altamente reativo pode se ligar à albumina e à hemoglobina. No trato gastrointestinal o Hg^0 pode ser lentamente absorvido (aproximadamente 0,01%) e não apresenta consequência toxicológica. Entretanto, uma vez dentro de uma célula, o Hg^0 é oxidado pela enzima catalase para Hg^{2+} , que tem maior absorção. Aproximadamente 15% do Hg^{2+} é absorvido pelo trato gastrointestinal [19].

Os sintomas associados à toxicidade por exposição ao mercúrio incluem tremor, vertigem, entorpecimento, dor de cabeça, cãibra, fraqueza, depressão, distúrbios visuais, dispnéia, tosse, inflamações gastrointestinais, queda de cabelo, náusea e vômitos [20].

Um dos fatores que contribui para a toxicidade é a velocidade de absorção do metal, a dose, o tempo de exposição e suas propriedades físico-químicas. Em vista disso, é de fundamental importância a quantificação de mercúrio total, a fim de monitorar sua concentração e com isso, reduzir os riscos derivados da exposição por mercúrio, que mesmo em baixas concentrações é tóxico para os mais diversos organismos.

III.1.1.4. Exposição ao Mercúrio

Uma das principais fontes de exposição humana ao mercúrio é a alimentação, cuja presença pode ser proveniente de uma contaminação na água ou no solo, devido a adição de fertilizantes, pesticidas e fungicidas, em excesso, nas plantações.

Um acidente ambiental mundialmente conhecido, causado diretamente pelo mercúrio em alimentos ocorreu na década 50 em Minamata, Japão. Sais de mercúrio (cloreto mercúrico e sulfato mercúrico) lançados no ambiente aquático oriundos da maior indústria de plásticos do Japão, contaminou peixes e pescados. Estima-se que durante 40 anos de atividade, cerca de 600 toneladas de mercúrio tenham sido lançados ao mar. A ingestão diária pela população chegou a níveis muito elevados, cerca de 5 a 100 $\mu\text{g/kg}$, durante meses e anos. Foram confirmados 12.578 casos de intoxicação, 656 mortes [21,22].

Outros acidentes de contaminação atribuídos ao mercúrio, envolvendo produtos alimentícios, além de peixes e animais aquáticos, também já foram registrados. Um caso de grande repercussão aconteceu no Iraque na década de 70, onde sementes de trigos e outros cereais foram contaminados com fungicidas mercuriais. A exposição ocorreu em decorrência do consumo de pães e outros alimentos, levando a morte de 459 pessoas [23].

Entre os alimentos, o arroz aparece como um importante componente da dieta de milhares de pessoas, em diferentes cidades do mundo, e pode contribuir substancialmente para a ingestão de mercúrio. A contaminação no arroz é proveniente da poluição ambiental e pode causar efeitos sobre à saúde, mesmo em baixas concentrações de mercúrio.

Os níveis de segurança toxicológica, estabelecido em 1978 pelo Comitê de especialistas em aditivos e contaminantes em alimentos (JECFA), determina que o limite máximo de ingestão semanal, tolerável para o mercúrio total, é de 5 $\mu\text{g/kg}$, equivalente a 43 $\mu\text{g/dia}$ para um indivíduo de 60 kg [24].

Lee e colaboradores em 2006 descreveram um estudo sobre a exposição de mercúrio através da dieta da população da Coreia [25]. Entre os alimentos analisados, o arroz cozido apresentou baixa concentração de mercúrio, cerca de 1 $\mu\text{g/kg}$ de arroz. Embora não apresente altos níveis de concentração, sua contribuição foi maior que 20% do mercúrio total ingerido, referente a uma pessoa que ingeriu 1,61 $\mu\text{g/dia}$. Isso porque o arroz é um alimento importante para os coreanos, presente constantemente na dieta.

Llobet e colaboradores em 2003 estudaram sobre a concentração de Hg em diferentes alimentos consumidos pela população da Catalunia, Espanha [26]. Os teores mais elevados foram encontrados nos peixes e mariscos com um valor médio de 0,097 $\mu\text{g/g}$, seguido dos cereais com níveis significativos de 0,03 $\mu\text{g/g}$. Os demais alimentos apresentaram concentrações mais baixas.

Entretanto, quando são consideradas faixas etárias distintas, os cereais lideram os alimentos que mais contribuem na ingestão de Hg na dieta de crianças (4-9 anos) e adolescentes (10-19 anos) com cerca de 6,02 µg/dia e 6,63 µg/dia, respectivamente. Entre os cereais, o arroz desempenha um papel importante na dieta de milhares de pessoas.

A determinação de mercúrio em diferentes matrizes tem sido realizada por muitos métodos, entretanto poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura aplicados a amostras de arroz.

A literatura descreve o trabalho desenvolvido por Li e Jiang em 2003 o qual utilizaram a técnica de vaporização eletrotérmica associado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV- ICPMS) para determinar Cr, Cu, Cd, Hg e Pb em duas amostras de arroz comercializadas em Taiwan [27]. Comparando os métodos de calibração externa e adição de analito verificou-se que as sensibilidades foram diferentes nas amostras de arroz, impossibilitando a quantificação desses elementos pela calibração externa. Os métodos adição de analito, diluição isotópica e nebulização pneumática foram empregados. As concentrações encontradas para Hg nas amostras de arroz comercializada variaram de 7,8 a 14 ng/g para e foram menores que o valor máximo permitida pela legislação da cidade de Taiwan (50 ng/g). O limite de detecção estimado a partir da adição de analito foi de 0,53 ng/g.

Jiang e colaboradores em 2002 desenvolveram um novo método para determinar Hg em amostras de água e materiais de referência de arroz. Foi empregado um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) [28]. A metodologia desenvolvida envolveu a formação on-line de cobre pirrolidina ditiocarbamato (Cu-PDC), o qual ficou adsorvido nas paredes internas do reator. A retenção seletiva do analito Hg^{2+} foi realizada através da reação de deslocamento on-line entre Hg^{2+} e o Cu-PDC adsorvido. Nenhum modificador foi usado para estabilizar o complexo Hg-PDC na fase de secagem. A etapa de pirólise não foi necessária devido à eliminação do efeito matriz. O analito retido foi posteriormente eluído com etanol e detectado por ETAAS. Nenhum modificador químico foi utilizado para estabilizar o mercúrio, devido a estabilidade do composto formado Hg-PDC. A curva analítica compreendia o intervalo de 0,05 a 10 µg/L de Hg com limite de detecção de 6,2 ng/L e o desvio padrão relativo (RSD, n = 13) de 1,1% e a recuperação variou de 97 a 102%.

Cao e colaboradores em 1999 utilizaram a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para determinar mercúrio total em material de referência de arroz (Rice flour GBW08502) [29]. Para obter uma maior intensidade do sinal, os compostos amônia, etilenodiamina e trietanolamina foram empregados. Verificou-se que a intensidade do sinal de Hg aumentou significativamente com a adição de pequenas quantidades de amônia aquosa, etilenodiamina ou trietanolamina. A intensidade normalizada (relação intensidade de sinal com amina e sem amina) de Hg aumentava à medida que a concentração de amônia aquosa,

etilenodiamina ou trietanolamina também aumentavam, mas o efeito da amônia foi menor que o da etilenodiamina e trietanolamina. A adição de etilenodiamina ou trietanolamina melhorou a eficiência do transporte de Hg, aumentando em dez vezes a sensibilidade. Os resultados das análises foram exatos quando comparados com os valores certificados e o limite de detecção variou de 6 a 64 ng/L.

Al-Saleh e colaboradores em 2001 investigaram se o consumo regular de arroz pode contribuir para a exposição ao Hg na Arábia Saudita [30]. O método de análise empregou digestão ácida (HNO_3) e a técnica espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV-AAS) para analisar 27 amostras de arroz importado de diferentes países (Índia, Tailândia, EUA, Austrália e Egito). O arroz importado desses países comumente consumido na Arábia Saudita, já que não há produção local de arroz. Uma solução de cloreto estânico em meio ácido (HCl) foi usada como redutor e a curva analítica foi preparada no intervalo de 0,5 a 8 mg/L de Hg, com um coeficiente de correlação de 0,9997. As amostras de arroz tiveram concentração média de 3,18 $\mu\text{g/kg}$ de Hg e os resultados obtidos com o material de referência (NIST Reference Rice Flour Standard) foram exatos. As concentrações de Hg tenham sido menor que o limite de tolerância provisório de ingestão semanal (Provisional Tolerance Weekly Intake - PTWI) recomendado pela Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization - FAO/WHO) de 43 $\mu\text{g Hg/dia}$. Entretanto os estudos foram baseados apenas para o consumo diário de arroz, podendo assumir valores maiores para os sauditas, se levarmos em consideração a contribuição de outros alimentos.

A literatura cita o trabalho de Navarro e colaboradores, desenvolvido em 1991, em que determinaram Hg em 51 amostras de alimentos de origem vegetal (banana, tomate, batata, alface, feijão verde, cana-de-açúcar e batata doce) obtidos diretamente a partir de horticulturas do sul da província de Granada (Espanha) [31]. O método de mineralização com digestão ácida (HNO_3) por microondas foi usado e o Hg determinado por espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV-AAS). Uma solução de KMnO_4 foi usada como oxidante e para redução do Hg^{2+} o NaBH_4 em meio básico foi empregado. A presença de interferentes foi avaliada com o método de adição de analito e se mostrou insignificante. O limite de quantificação encontrado foi equivalente a 0,59 ng/mL e o limite de detecção foi de 0,195 ng/mL. As concentrações das amostras variaram de 5 a 215 ng/g de Hg e para validação do método material de referência (NBS 1572 citrus leaves) foi analisado.

Ombaba em 1996 [32] determinou a concentração de mercúrio total em amostras certificadas de arroz (Rice flour 568a) empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV-AAS) com e sem pré-concentração. As amostras foram digeridas com ácido nítrico em forno de microondas e para redução do Hg foi empregado cloreto estânico em meio ácido. Na etapa

de pré-concentração, o vapor gerado foi coletado e concentrado em um tubo de amálgama de mercúrio recoberto com ouro, seguido de nova volatilização do vapor de Hg pelo aquecimento rápido do tubo a 500-800 °C. Os dois métodos foram comparados e os resultados obtidos com a pré-concentração apresentaram maior sensibilidade e se mostraram eficazes. A recuperação variou de 92 a 100% e o desvio padrão relativo foi menor que 10%

III.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

A literatura cita uma variedade de técnicas instrumentais que podem ser utilizadas na determinação de mercúrio total em amostras ambientais e biológicas [33], tais como, fluorometria, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (AFS-CV), espectrometria de emissão atômica com chama (AES), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), análise por ativação com nêutrons (NAA), cromatografia e espectrometria de emissão de próton induzido por raios-X (PIXE) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP MS).

Entretanto, antes mesmo do surgimento dessas técnicas a colorimetria foi considerada o método mais tradicional para determinação de mercúrio, sendo bastante utilizada durante a década de 60 devido a sua simplicidade, baixo custo e rapidez. Baseia-se na formação de um complexo colorido que absorve na região do visível (490 nm) após reação entre o Hg^{2+} e os reagentes ditizona ou difeniltiocarbazona. O complexo é extraído por um solvente orgânico, após todo o mercúrio presente na amostra ser convertido a Hg^{2+} através de uma digestão ácida. Em 1965, o método oficial de análises recomendado pela (*Association of Official Analytical Chemists International-AOAC*) empregou o procedimento no qual o complexo ditionato de mercúrio na fase do clorofórmio era extraído de uma solução aquosa de tiosulfato de sódio, sendo novamente extraído com ditizona em clorofórmio, após a decomposição do complexo mercúrio-tiosulfato [34].

Entretanto, este método é susceptível à interferência de outros metais, principalmente o cobre, exigindo várias etapas de separação. Além disso, a instabilidade do complexo de ditionato de Hg na presença da radiação ultravioleta foram fatores determinantes para que poucos laboratórios realizassem análises usando esse procedimento.

Na tentativa de obter melhores resultados, foram empregados outros reagentes colorimétricos, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com pré-coluna e detecção UV-visível. O método consistiu na complexação da ditizona, ditiocarbamato e seus derivados com HgCl_2 , MeHg , PhHgAc e Ph_2HgCl , seguida da separação por fase reversa. A técnica de eletroforese capilar com

detecção UV-visível empregando a reação com metilmercúrio e cisteína, também tem sido aplicada para determinação de mercúrio. Entretanto, a forma como a amostra é introduzida e a baixa sensibilidade, estão entre as principais desvantagens dessa técnica [35, 36].

A análise por ativação com nêutrons (NAA) aparece como um método alternativo que consiste no bombardeamento da amostra com nêutrons térmicos, seguida da emissão de raios gama referente a cada radioisótopo, com tempos de meia vida característicos de cada radioisótopo. Esta técnica permite manter a integridade da amostra, além de apresentar boa especificidade e sensibilidade para a quantificação de Hg, porém é considerada lenta e de alto custo [37].

Devido à busca constante por técnicas cada vez mais rápidas, exatas, sensíveis e seletivas, surge a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), a qual utiliza uma chama combustível/oxidante (acetileno/ ar) para vaporizar e atomizar o analito. Neste método uma fonte de radiação externa (lâmpada de catodo oco) incide sobre o vapor do analito, que absorve energia e os elétrons são promovidos de um estado fundamental para um estado excitado [38]. Embora a FAAS seja considerada uma técnica simples, apresenta como desvantagem, a baixa sensibilidade, presença de alguns interferentes espectrais, além da faixa linear de trabalho não ser ampla.

Poluektov e colaboradores em 1964 [39] observaram, que a adição de SnCl_2 à amostra em solução, contendo Hg provocava um aumento no sinal de absorbância. Isso ocorre devido à redução dos sais de mercúrio pelo SnCl_2 , promovendo a vaporização e atomização, não havendo portanto mais necessidade da utilização da chama e do nebulizador pneumático. Atendendo a esta necessidade e ao fato do mercúrio elementar (Hg^0) ser o único metal que apresenta uma alta pressão de vapor (18 mg m^{-3} de Hg, a 24°C), surge então uma técnica denominada de espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS).

No método que emprega a técnica CVAAS, átomos de mercúrio absorvem a radiação emitida por uma fonte de radiação (lâmpada de catodo oco ou lâmpada de vapor de Hg) no comprimento de onda de 253,7 nm, obtendo elevada intensidade de sinal. A amostra inicialmente digerida é reduzida, seguida da etapa de volatilização, sendo então arrastada por um gás inerte (Ar) até o caminho óptico na forma de vapor e detectado o teor de mercúrio. É de fundamental importância que os íons mercúrico e mercuroso sejam reduzidos à forma elementar Hg^0 , para garantir que todo mercúrio esteja presente numa única forma. Para isso os agentes redutores normalmente utilizados são: SnCl_2 , NaBH_4 , [40, 41].

Estudos realizados com uma lâmpada de catodo oco que emite na região ultra-violeta (184,9 nm) proporcionou um aumento na sensibilidade e o limite de detecção foi 30 vezes maior quando comparado a linha de ressonância de 253,7 nm [42]. Entretanto, embora a CVAAS seja muito empregada para determinação de Hg, esta técnica está sujeita a interferências causadas pela presença de NO_2 , SO_2 ou O_3 . Além disso, a medida do sinal está associada à atenuação da

intensidade de um feixe de radiação por uma espécie absorvente, sendo difícil a detecção em baixas concentrações, já que a atenuação será menor. Portanto para aumentar a sensibilidade e obter boa reprodutibilidade e limites de detecção desejáveis, muitas vezes é necessário que o sistema sofra algumas modificações. Entretanto, embora essa técnica analítica seja considerada uma das mais sensíveis para determinação de Hg em níveis traço, é necessário desenvolver métodos mais sensíveis, precisos e que possam ser aplicados para determinar uma ampla faixa de concentração de mercúrio em diferentes matrizes [43,44].

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) tem se destacado nas duas últimas décadas, como uma técnica seletiva porque combina as vantagens do mecanismo de absorção e emissão de fótons, que são processos quânticos discretos [45].

A literatura relata que em 1964 foi realizado o primeiro trabalho com espectrometria de fluorescência atômica (AFS) em 1964, desenvolvido por Winefordner e Vickers [46]. Desde então o número de publicações envolvendo esta técnica tem aumentado. Thompson e colaboradores descreveram a determinação dos elementos As, Sb, Se e Te a partir da geração de hidretos, após a redução com NaBH_4 , onde para atomização, uma chama composta da mistura hidrogênio e argônio foi empregada. Para produzir a fluorescência se fez uso de uma lâmpada de descarga sem eletrodos modulada [47].

O primeiro espectrômetro de fluorescência atômica de difusão foi usado por Tsujii e Kuga para determinar As com geração de hidreto, utilizando uma chama de hidrogênio-argônio, mas nesse caso o agente redutor usado foi o sistema Zn-HCl [48].

Outro trabalho com AFS associado à técnica de geração de hidretos para determinação de As, Bi, Sb, Se é relatado por Nakajara e colaboradores no ano de 1983 [49]. Neste trabalho eles mostraram que a temperatura da chama composta de hidrogênio-argônio é maior quando comparada com a chama de hidrogênio-nitrogênio é maior, aumentando em duas vezes a sensibilidade do método. Também observaram que o instrumento de fluorescência não-dispersivo proporcionava um aumento na sensibilidade de pelo menos uma ordem de grandeza, quando comparado ao sistema dispersivo.

A capacidade de volatilização do mercúrio e o fato da excitação e a fluorescência ocorrerem no mesmo comprimento de onda, faz com que o mercúrio seja apropriado para a fluorescência, possibilitando a detecção de Hg total, em níveis baixos de concentração. Uma outra característica da fluorescência é a medida do sinal de emissão que é realizada, com o detector posicionado a 90° da fonte de excitação, para evitar o mascaramento da luminescência pelo feixe de excitação que atravessa a amostra. Isto permite que a intensidade do sinal da amostra seja medida em relação ao sinal de valor zero, favorecendo um aumento significativo na sensibilidade [50].

A AFS é, portanto, uma das técnicas mais sensíveis para determinação de Hg, apresentando limites de detecção até três ordens de grandeza menores (normalmente na faixa de ng/g) quando comparada com AAS e com outras técnicas. É também uma técnica simples, com procedimento de análise rápido e equipamentos de baixo custo (filtros ópticos simples e lâmpada de mercúrio) com configuração adequada para automação analítica [51].

A técnica de fluorescência atômica consiste num processo de emissão, no qual átomos de mercúrio elementar (Hg^0) são excitados por uma fonte de radiação (lâmpada de mercúrio) com comprimento de onda de 253,7 nm, capaz de promover fótons para um nível mais energético. Para os átomos excitados por uma fonte de energia de alta temperatura, esta emissão de luz é normalmente chamada de emissão atômica ou óptica (espectroscopia de emissão atômica), e para átomos excitados com luz é chamada fluorescência atômica (espectroscopia de fluorescência atômica). À medida que os átomos retornam ao estado estável, a radiação ressonante emitida é detectada por tubos fotomultiplicadores e em seguida é amplificada e enviada a um dispositivo de leitura. O gás inerte mais empregado é o Argônio. A Figura 32 mostra a configuração de um instrumento de fluorescência.

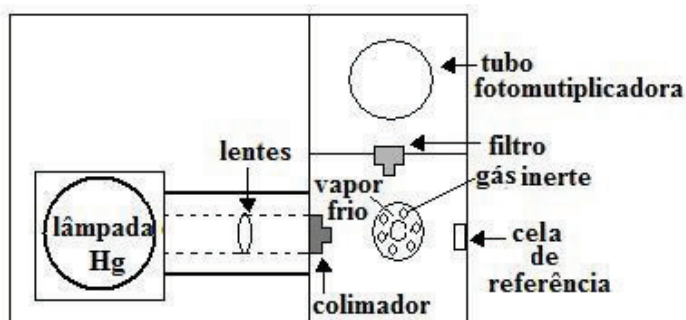
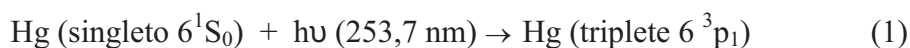


Figura.32 Configuração óptica de um espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio

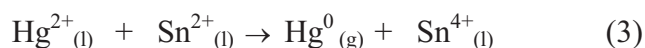
A desativação do estado excitado para níveis de menor energia ocorre com emissão de fótons, por uma combinação de etapas envolvendo, transições eletrônicas não-radiativas e radiativas. A fluorescência no mercúrio pode ser descrita pelas equações 1 e 2 [51,52].



Atualmente, a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) associada a geração de vapor frio vem sendo amplamente empregada para a determinação de concentrações traço de mercúrio, em uma grande variedade de matrizes. Nesta técnica, a atomização ocorre sem aquecimento, onde apenas mercúrio na forma elementar (vapor de Hg^0) é detectado. Há necessidade, portanto, de

converter os compostos de mercúrio presentes na matriz em íons Hg^{2+} para depois ocorrer a conversão em Hg^0 .

A primeira etapa a mineralização de amostra, ocorre em meio fortemente ácido e oxidante, seguida de uma redução em meio ácido dos íons mercúrico com adição de SnCl_2 , conforme a reação (3). O objetivo é separar a espécie de interesse da matriz, com posterior transporte do vapor Hg^0 para a cela de atomização, através de uma corrente de gás inerte (Ar) e finalmente o sinal de fluorescência ser detectado.



As vantagens em trabalhar com a geração de vapor frio, são melhor separação analito/matriz, redução de interferências, eficiência de transporte, vapor de Hg homogêneo, melhor precisão e seletividade, melhores limites de detecção (da ordem de ng/ L) e a possibilidade de acoplamento a diferentes técnicas (AFS, AAS, ICP-OES, ICP-MS, etc.).

III.1.3. DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA EM SISTEMA FECHADO

Nos últimos anos tem crescido a necessidade de quantificar concentrações extremamente baixas de diversos elementos (normalmente na faixa de ng/g), devido ao rigor no controle de qualidade dos produtos industrializados. Isto impulsionou o desenvolvimento de métodos de análise para matrizes complexas (alimentos, óleos, sedimentos, rochas etc.) que muitas vezes requer um tratamento prévio, visando sua preparação para as etapas subsequentes da análise.

Em análises espectroscópicas geralmente é necessário realizar, a destruição da matéria orgânica presente em matrizes alimentícias (carboidratos, proteínas e lipídeos), pois elevados teores de carbono residuais atuam como interferentes. Deste modo, grande parte dos métodos de preparo de amostra empregados destroem a matéria orgânica, permanecendo em solução apenas os constituintes inorgânicos de interesse, tornando possível sua análise [53,54].

Na determinação de mercúrio empregando AFS a decomposição da matéria orgânica é recomendada. Na decomposição, o elemento de interesse será convertido em cátions inorgânicos (saís). Isso contribuirá para que se possa determinar o analito quando presente em baixas concentrações. Os métodos convencionais de decomposição empregados (blocos digestores ou placas aquecedoras) são em geral, demorados, trabalhosos e necessitam de várias etapas durante o preparo da amostra. Também são susceptíveis a contaminações e a perda do analito, além de consumir grande quantidade de reagentes (ultra-puros) e de amostras [55]. Por outro lado, o custo destes equipamentos é baixo em comparação com outros equipamentos mais modernos.

A decomposição por via úmida é um procedimento que ocorre na presença de ácidos inorgânicos oxidantes concentrados (HNO_3 , HClO_4 e H_2SO_4) ou pela adição de oxidantes (H_2O_2 ,

KMnO₄, K₂Cr₂O₇, K₂S₂O₈, KBr/KBrO₃) combinados com ácidos fortes. Pode também ser implementados misturas de ácidos (HNO₃-H₂SO₄, HNO₃-HCl, HNO₃-HClO₄) [56].

A digestão assistida por micro-ondas em sistemas fechados tornou-se uma tendência no preparo de diversas amostras, principalmente orgânicas. O aquecimento assistido por microondas em frascos fechados possibilita aumento na pressão e na temperatura, obtendo uma melhor digestão da matriz sólida. Reduz também o tempo de digestão e a quantidade de reagentes, quando comparado com outros procedimentos convencionais. É um sistema seguro pelo fato de ter um controle da pressão, temperatura e potência. Apresenta menor risco de contaminação e não há perda do analito por volatilização, requisitos ideal para decomposição de amostras contendo mercúrio, o qual é altamente volátil [57].

A radiação micro-ondas permite uma rápida decomposição, sem que haja quebra da ligação química, já que não é ionizante. A interação da radiação eletromagnética com o solvente e os íons em solução é suficiente para provocar movimento nas espécies em solução (migração iônica e rotação de dipolos), devido à oscilação do campo eletromagnético e, desta forma, ocorre o aquecimento na amostra. A temperatura é controlada e medida normalmente com uma sonda de infra-vermelho acoplada a um computador digital que controla os parâmetros da digestão como: a potência das micro-ondas que aplicada fica concentrada na amostra a ser mineralizada, a temperatura e o tempo [58].

O uso do micro-ondas para o preparo de amostras biológicas foi relatado pela primeira vez em 1975 por Abu-Samra e colaboradores [59]. Na digestão foram empregados os ácidos HNO₃ e HClO₄ 4:1(v/v) e foi aplicada uma potência de 600 W em um intervalo de tempo de 5 a 15 min.

De maneira geral, nas últimas décadas, observa-se na literatura o crescente número de trabalhos envolvendo o uso de procedimentos assistidos por radiação micro-ondas para o preparo de amostras na química analítica, principalmente na determinação de mercúrio em amostras de alimentos.

Jeffrey e Barry em 2000 [60] determinaram mercúrio em pescados, através de dois métodos de digestão assistidos por micro-ondas. O primeiro usou uma mistura de 5 mL de HNO₃ conc., 1 mL H₂O₂ 30% (v/v) e 2 mL de H₂O. O segundo empregando 3 mL de HNO₃ conc., 1 mL de H₂O₂ 30% (v/v), 1 mL de HCl conc. e 2 mL de H₂O. A potência foi de 650 W e o tempo de 20 min. Os resultados foram satisfatórios na digestão da matéria orgânica, com completa oxidação e conversão de todo mercúrio para a sua forma inorgânica Hg²⁺. No entanto, a adição de HCl tornou a digestão mais vigorosa, produzindo mais óxidos nitrosos voláteis. A adição de uma solução de 5% (m/v) de ácido sulfônico após a digestão foi usada para reduzir e liberar os óxidos nitrosos dissolvidos, que interferem na determinação de Hg por CV-AAS. A concentração média obtida foi de 0,03 mg

Hg/kg em peixes, crustáceos e moluscos e em plantas a concentração média ficou abaixo de 0,05 mg Hg/kg.

Krystek e Ritsema em 2005 [61] empregaram a digestão por via úmida em microondas para determinar mercúrio total em carne de tubarão. Foi usado 7 mL de HNO₃ 10% (v/v) foi usada para digerir a matéria orgânica. A potência aplicada foi de 510 W o tempo de digestão de 100 min. Após a decomposição foi adicionada água, solução de brometo-bromato e HCl 37% para converter todas espécies de mercúrio, principalmente os organomercuriais, em Hg²⁺. O excesso de Br₂ foi eliminado pela adição de solução de cloridrato de hidroxilamina 12% (m/v). A concentração de mercúrio foi depois medida por CV-AFS e variaram de 0,9 a 3,6 µg/g.

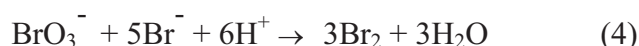
Hight e Cheng [62] no ano de 2005 avaliaram a concentração de mercúrio total em 11 amostras de frutos do mar. Para a digestão por via úmida foi usada a mistura de H₂O₂ e HNO₃ (1:10) (v/v) e tempo de aquecimento de 25 min com potência de 1200 W. A concentração obtidas das 11 variedades de frutos do mar variou de 15 a 1780 ng/g. O limite de quantificação para amostras de fruto do mar e material de referência foram 2,2 µg/g e 11 µg/g respectivamente.

III.1.4. INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE Hg POR CV-AFS

Um dos maiores problemas na determinação de traços de mercúrio em amostras alimentícias por CV-AFS é a presença de interferentes, que normalmente provêm da etapa de mineralização da amostra, da contaminação do ambiente do laboratório, reagentes, vidraria, ou ainda, de uma possível perda por volatilização. Uma outra fonte de interferentes pode ser decorrente de uma digestão parcial, em que compostos organomercuriais residuais permanecem estão presentes na amostra.

A adição de oxidantes como a mistura KBr/KBrO₃, tem sido uma alternativa para converter espécies orgânicas, que mesmo após a digestão não se oxidaram, para a forma inorgânica Hg²⁺. O procedimento é rápido e ocorre à temperatura ambiente, evitando perdas de mercúrio, devido à vaporização [56].

Na primeira etapa ocorre a oxidação do brometo e do BrO₃⁻ a bromo, o qual rapidamente quebra as ligações dos compostos organomercuriais, formando o complexo estável, HgBr₄²⁻, na etapa seguinte, de acordo com as equações 4 e 5.



Entre os interferentes relatados na literatura são os óxidos de nitrogênio voláteis NO, N₂O₄ e NO₂. Estes compostos podem estar presente nas amostras devido à redução do HNO₃, no final da

digestão, os quais podem resultar numa coloração marrom, principalmente devido à presença do nitrito em equilíbrio com moléculas de NO_2 . Normalmente esses interferentes têm um impacto desfavorável na redução do mercúrio com cloreto estanoso, além de atuarem no mecanismo de emissão, promovendo uma supressão do sinal (*quenching*) [63,64].

Deste modo, a remoção de qualquer excesso de $\text{Br}^-/\text{BrO}_3^-$ e dos óxidos voláteis de nitrogênio e íons nitrito, é necessária, para não interferirem na análise. Para isso, o uso de alguns agentes redutores têm sido utilizados, tais como: uréia, ácido benzóico e cloridrato de hidroxilamina.

Com relação a redução do Hg^{2+} para a forma Hg^0 , muitos trabalhos citam principalmente o uso do SnCl_2 ou NaBH_4 . Porém, o NaBH_4 é um agente redutor mais forte, capaz de reduzir além do Hg, outros metais presentes em solução (Cu, Ag, Au, Pd e Pt), formando micro-partículas que podem reter o mercúrio na forma de amálgama, o que diminuiria o sinal de fluorescência. Além disso, durante a redução com NaBH_4 são gerados grandes quantidades de gás H_2 (g) ocasionando uma maior dispersão do analito, que se encontra na forma de vapor e portanto pode acontecer uma diminuição da sensibilidade. Portanto o uso do SnCl_2 é preferível, por ser menos suscetível a interferências.

Fadini e Jardim em 2000 [65] descreveram com os detalhes os cuidados que se deve ter na descontaminação do material, quando se deseja trabalhar com mercúrio. Esta etapa é considerada uma das mais importantes para o sucesso nas determinações de Hg, principalmente em análises com níveis baixos de concentração, da ordem de ng/L. Visto que mínimas quantidade de mercúrio ou de algum outro interferente comprometem a confiabilidade dos resultados obtidos [12].

Um dos métodos mais empregados para contornar a presença de interferentes em matrizes complexas é o método de adição de analito. A curva analítica é traçada relacionando as quantidades do analito adicionado à amostra com as respectivas intensidades de fluorescência. As inclinações das curvas analíticas são então comparadas com os resultados obtidos empregando o método de calibração externa (apenas as soluções de referência). O comportamento paralelo entre as linhas de regressão ou as inclinações das curvas analíticas próximas mostra que não há efeito de matriz.

II.2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um método para determinar mercúrio total em amostras de arroz empregando a espectrometria de geração de vapor frio (CV-AFS).

2.2. Objetivos Específicos

- 3- Avaliar o efeito de interferentes nas digestões de amostras de arroz com diferentes agentes oxidantes e ácidos;
- 4- Investigar a presença de efeito matriz e para isso foi usado o método de adição de analito;
- 5- Estudar a estabilidade das amostras digeridas;
- 6- Determinar Hg em amostras de arroz para consumo humano provenientes de diferentes países.

III.3. MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1. SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza e as soluções foram preparadas em água destilada-deionizada purificada, com resistividade de 18,2 M Ω -cm, obtida de um sistema por Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA).

A solução 0,1 mol L⁻¹ de KBr foi preparada dissolvendo-se 5,95 g de KBr (Scharlau) em um béquer e, em seguida transferiu-se a solução para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água.

A solução 0,017 mol L⁻¹ KBrO₃ foi preparada dissolvendo-se 1,39 g de KBrO₃ (Scharlau) em béquer e em seguida a solução foi transferida para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água.

A solução formada pela mistura de volumes iguais de KBr e KBrO₃ foi utilizada nas digestões das amostras de arroz e foi preparada diariamente pela mistura de volumes iguais das duas soluções.

A solução de 1,73 mol L⁻¹ de cloridrato de hidroxilamina foi preparada pela dissolução de 12 g de NH₂OH·HCl (Scharlau) em 100 mL de água. Esta solução foi usada para garantir a conversão completa do excesso de Br⁻ a Br₂ e remover os óxidos nitrosos gerados durante a digestão.

A solução de 6,8 mmol L⁻¹ (2000 mg L⁻¹) de K₂Cr₂O₇ (Panreac) foi preparada pesando-se 0,50 g do sal e dissolvendo-o em água, em seguida o volume foi transferido para balão de 250 mL.

A solução 13 mmol L⁻¹ KMnO₄ (Panreac) foi preparada dissolvendo 0,50 g do sal em água e transferindo a solução para balão de 250 mL. A solução foi armazenada em frasco ambar.

A solução 0,67 mol L⁻¹ de uréia ((NH₂)₂CO) (Panreac Barcelona, Espanha) foi preparada dissolvendo 4,0 g do sal em 100 mL de água.

A partir de diluições adequadas da solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de Hg²⁺ (Merck) prepararam-se as soluções de referência na faixa de 0,025 a 0,2 ng mL⁻¹ de Hg²⁺. Estas soluções foram preparadas diariamente.

As soluções de referência e a solução carregadora foram preparadas no mesmo meio em que as amostras, onde todas continham HNO₃, KBr/KBrO₃ e cloridrato de hidroxilamina. Para as digestões das amostras, foram usados ácido nítrico 69% (m/v) e o peróxido de hidrogênio 35% (m/v), ambos da Scharlau. A solução 0,088 mol L⁻¹ SnCl₂·2H₂O (Merck) foi preparada dissolvendo 2,0 g do sal em 100 mL de solução 1,2 mol L⁻¹ HCl da Merck.

III. 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os trabalhos envolvendo as determinações de Hg foram realizadas no Departamento de Química Analítica da Universidade de Valência sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Luisa Cervera Sanz.

Foi utilizado um espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS) com sistema PSA, modelo 10.025 (Millennium Merlin Instrument, Orpington, Kent, UK), conforme mostra a Figura 33. Uma ilustração do arranjo experimental do sistema com fluxo contínuo de geração de vapor está apresentada na Figura 34 [66]. Como fonte de radiação específica para mercúrio foi utilizada uma lâmpada de catodo oco, com comprimento de onda de 253,7 nm.



Figura.33- Espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio. a) Bomba peristáltica 1; b) Bomba peristáltica 2; c) porta de saída do gás carregador conectada ao separador gás-líquido; d) entrada do vapor de Hg^0 no sistema de secagem; e) porta de saída do sistema de secagem; f) porta de entrada da amostra para o detector.

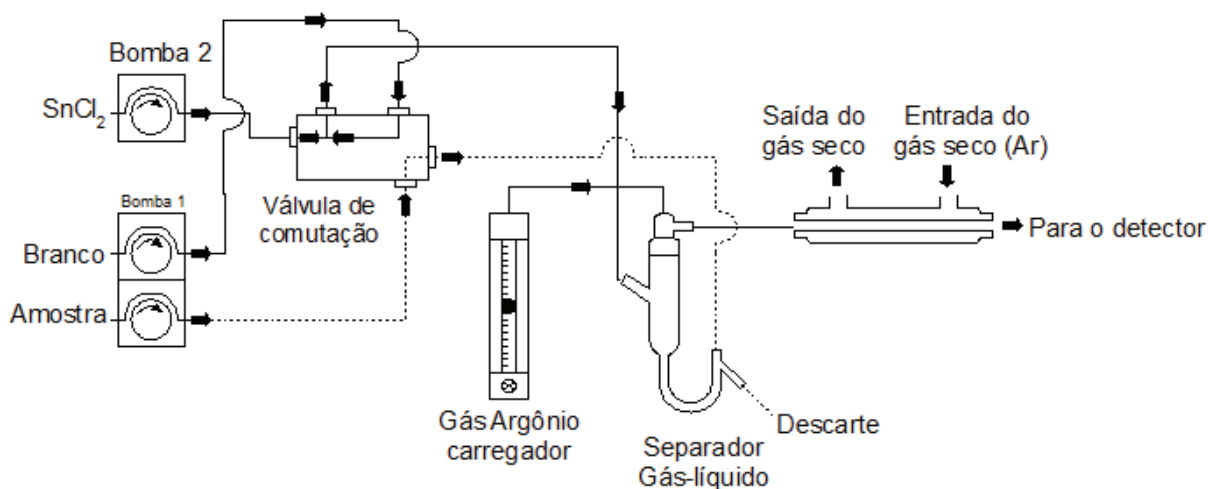


Figura.34-Esquema do arranjo experimental do sistema em fluxo contínuo usado na geração de vapor frio

III.3.3. PROCEDIMENTO DA DIGESTÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ARROZ

Considerando a baixa concentração de mercúrio em amostras de arroz, a limpeza das vidrarias e do material de Teflon deve ser cuidadosa. Com a finalidade de avaliar a eficiência de diferentes procedimentos de limpeza do material utilizado, quatro balões volumétricos foram submetidos a uma contaminação prévia, com solução $0,100 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg e os balões foram deixados em repouso por um final de semana.

Após este período, os frascos foram lavados com detergente e enxaguados com água para em seguida serem submetidos a diferentes procedimentos de limpeza :

- Imersão durante a noite em banho de 10% (v/v) HNO_3 ;
- Lavagem com uma solução de 2 g L^{-1} de KMnO_4 durante 15-30 min e imersão durante a noite em um banho de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ HCl ;
- Lavagem com HNO_3 durante 15-30 min e imersão durante a noite em um banho de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ HCl ;
- Lavagem com HNO_3 durante 15-30 min e imersão durante a noite em solução de 2 g L^{-1} de KMnO_4 .

Imediatamente após a limpeza, os balões volumétricos foram usados para a preparação de soluções padrão de $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração de mercúrio foi medida por CV-AFS. As amostras de arroz foram digeridas em forno de micro-ondas modelo Ethos Sel (Milestone, Sorisole, Itália) com uma potência máxima de 1000 W, equipado com carrossel contendo dez conjuntos de digestão, como mostra a Figura 35.



Figura.35-Forno de microondas modelo Ethos Sel utilizado nas digestões das amostras de arroz.

Os reatores de digestão (a) são constituídos de um Teflon modificado (TFM®) capaz de resistir a alta pressão e temperaturas de até 240 °C. O volume interno dos reatores é de 100 mL, mas o volume mínimo requerido para garantir o controle da temperatura mediante uma sonda é de 8 mL.

Os reatores de Teflon usados na digestão foram submetidos a um sistema de limpeza à vapor com HNO₃ concentrado (TraceClean system). Todo o material utilizado no trabalho foi lavado cuidadosamente com detergente neutro, seguido de água corrente e, por último, água desionizada. Para descontaminar os reatores, os mesmos permaneceram imersos, durante 1 h, em banho contendo solução 10 % (v/v) HNO₃ e durante 12 h em banho com solução 10% (v/v) HCl. Após esse período, o material foi enxaguado com água Milli-Q®. Na determinação de Hg, foram pesadas, em triplicata, 0,5 g ($\pm$ 0,1mg) de cada amostra de arroz moído diretamente nos reatores de TFM® do forno de micro-ondas. Em seguida adicionou-se 4 mL de ácido nítrico concentrado, 2 mL de peróxido de hidrogênio concentrado e 4 mL de H₂O. Para realizar a etapa de pré-digestão, um banho de ultrassom com capacidade de 350 mL (Selecta, Barcelona, Espanha) operando na potência de 50 W e 50 Hz de frequência, foi usado para sonicação da amostra, por 30 minutos, para posteriormente iniciar o procedimento de digestão por radiação micro-ondas. Em geral este procedimento é empregado para obter uma melhor digestão da amostra. Em seguida os reatores foram fechados cuidadosamente, para não haver perdas do analito, devido à alta volatilidade do mercúrio. Os reatores foram colocados no rotor do forno de microondas e a amostra foi submetida ao ataque ácido, utilizando o programa de aquecimento mostrado na Tabela 10. Para cada grupo de dez reatores inseridos no forno de micro-ondas, para realizar o procedimento de digestão, pelo menos três reatores continham soluções do branco e as demais soluções das amostras.

Tabela 10-Programa de aquecimento utilizado na digestão da amostras de arroz, em forno de micro-ondas modelo Ethos Sel da Millestone.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (° C)
1°	3	0	85
2°	9	85	145
3°	4	145	180
4°	15	180	180
5°	25	180	30

Os reatores foram abertos permanecendo em repouso por 12 h para saída de vapores de óxidos nitrosos remanescentes e para o resfriamento da solução.

A solução final foi transferida para balões volumétricos de 25 mL e o volume final foi completado com água Milli-Q ®. Nova diluição foi realizada, transferindo-se uma alíquota de 3,75 mL para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se então 1 mL da mistura KBr/KBrO₃ (0,1 mol L⁻¹ / 0,017 mol L⁻¹) e 30 µL de 1,73 mol L⁻¹ de cloridrato de hidroxilamina para a remoção do excesso de Br⁻/BrO₃⁻ e óxidos nitrosos. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de HNO₃ 0,7 mol L⁻¹.

Em seguida, o mercúrio contido na amostra foi reduzido a Hg⁰ com solução 0,088 mol L⁻¹ SnCl₂ e medidas no espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio. Para cada amostra foram realizadas três determinações de Hg. As concentrações médias determinadas nas soluções dos brancos foram descontadas das concentrações das amostras.

Durante o estudo, além da mistura KBr/KBrO₃ também foram avaliados outros agentes oxidantes tais como o KMnO₄, uréia e K₂Cr₂O₇, com e sem a adição de hidroxilamina.

III.3.3.1. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE UTILIZANDO CV-AFS

As soluções foram introduzidas no sistema por duas bombas peristálticas independentes e com auxílio de uma válvula controlada por computador, foi possível alternar entre a inserção da solução da amostra e do carregador. A inserção do carregador era realizada para que se obtivesse a medida do branco.

A redução do Hg²⁺ foi feita em linha com a solução 0,088 mol L⁻¹ SnCl₂ em meio ácido (10% de HCl). A solução redutora foi submetida a um fluxo de nitrogênio por 10 min, a fim de retirar o mercúrio livre na solução.

Após a reação de redução do mercúrio Hg²⁺ o vapor de mercúrio produzido é enviado para um separador gás-líquido. Em seguida passa por um sistema de secagem denominado perma Pure, pelo qual circula o gás argônio. Nas medidas de fluorescência essa etapa de secagem tem o objetivo de remover a umidade, um dos principais interferentes. O mercúrio reduzido (Hg⁰) é então arrastado pelo gás argônio em direção ao caminho óptico e o sinal de fluorescência analítico é detectado.

Como solução carregadora, foram usadas soluções contendo HNO₃ ou HCl, além da mistura KBr/KBrO₃ e hidroxilamina, de forma que para cada análise os mesmos reagentes presentes na solução carregadora, também estavam presentes na amostra. O argônio (Carburos Metálicos) foi empregado como gás de arraste (carregador) e como gás de secagem (gás seco).

A razão entre as vazões da solução do redutor, SnCl₂ em meio de HCl em relação à amostra e a solução carregadora foi sempre de 1:2:2 (v/v). Enquanto a amostra não era introduzida, a solução carregadora e redutora circulam, atuando como o branco nas análises.

Os mesmos ácidos adicionados nas amostras foram utilizados nas soluções padrão.

Todas as concentrações de mercúrio foram determinadas por calibração externa, baseado na altura do pico das medidas de fluorescência

As condições instrumentais, a vazão dos gases, das soluções de reagentes e amostra, bem como as concentrações empregadas nesse estudo para a determinação de Hg em amostras de arroz estão resumidas na Tabela 11.

Tabela 11-Condições empregada na determinação de mercúrio por CV-AFS

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda (nm)	253,7
Modo de medida	Altura do pico
replicatas	3
Tempo de atraso (s)	15
Tempo de análise(s)	40
Tempo de limpeza(s)	60
ganho	1000
SnCl ₂ (mol L ⁻¹)	0,088
HNO ₃ (mol/L ⁻¹)	0,7
Vazão do gás carregador (mL min ⁻¹)	250
Vazão do gás de secagem (mL min ⁻¹)	2,5
Vazão do carregador (mL min ⁻¹)	9
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	9
Vazão do SnCl ₂ .2H ₂ O(mL min ⁻¹)	4,5
Br/BrO ₃ / (mol L ⁻¹)	0,1/0,017
Hidroxilamina (mol L ⁻¹)	1,73

III.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1. DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

A digestão de amostras de arroz em forno de micro-ondas produz uma grande quantidade de gases o que leva a um aumento na pressão no interior do reator de Teflon, com um alto risco de perda do analito. Para evitar que isso ocorresse, foi implementada uma etapa de pré-digestão, onde as amostras foram sonicadas em banho de ultrassom em sistema aberto. Inicialmente foram adicionados nas amostras 4 mL de HNO_3 conc. (14 mol L^{-1}) permanecendo em repouso por 30 min. Após esse período, foi adicionado lentamente 1 mL de H_2O_2 , permanecendo em banho de ultrassom durante 15 min. Devido a adição de H_2O_2 produzir uma grande quantidade de espuma nas paredes do reator de Teflon, duas alíquotas de 1 mL de H_2O_2 foram empregadas em vez de adicionar diretamente os 2 mL de peróxido. A formação de espumas no interior do reator pode afetar diretamente o procedimento de digestão, já que estas podem favorecer a formação de aglomerados nas paredes do recipiente, absorvendo a radiação micro-ondas num ponto específico, tornando menos eficiente a digestão.

Por último, 4 mL de água foram adicionados, de forma que qualquer vestígio de amostra sólida nas paredes do reator fosse retirado. O procedimento empregado possibilitou a digestão de 0,5 g de amostra em condições seguras, fornecendo soluções incolores e levemente amarelas com nenhum resíduo.

III.4.2. AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

A contaminação geralmente pode ocorrer durante a etapa de preparação da amostra ou no decorrer da determinação analítica, gerando resultados indesejáveis. Essa fonte de erro pode ser minimizada quando todos os procedimentos analíticos são realizados com cuidado e atenção, de forma que os equipamentos estejam limpos e a água, reagentes e ácidos apresentem pureza adequada. Portanto antes do uso de toda vidraria a limpeza do material foi realizada com uma solução de HNO_3 e HCl a 10% (v/v).

De acordo com os resultados encontrados, observa-se na Tabela 12 que a imersão em HNO_3 durante a noite não foi suficiente para uma limpeza eficiente; já os demais procedimentos foram satisfatórios visto que resultaram em sinais de fluorescência próximos do valor de referência. Como o tratamento com HNO_3 seguido do HCl foi mais eficiente, então este foi selecionado para os experimentos posteriores.

Tabela 10: Avaliação do procedimento de limpeza para determinação de Hg por CV-AFS

Teste	Condições de limpeza	Sinal de fluorescência	Variação %
1	HNO ₃	56,75	14
2	KMnO ₄ + HCl	50,22	0,9
3	HNO ₃ + HCl	49,44	0,7
4	HNO ₃ + KMnO ₄	50,31	1,1
5	Valor de referência para solução 0,025 ng mL ⁻¹ de Hg	49,78	

III.4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E INTERFERENTES

A interferência causada pelo HNO₂ e pelos óxidos nitrosos na geração de vapor de Hg é bem conhecida, pois a digestão com HNO₃ gera resíduos de óxidos nitrosos na solução da amostra.

Para evitar essa interferência, as amostras foram diluídas e as medidas de fluorescência realizadas, com um ganho de 1000. A curva analítica foi construída na faixa de 0,025 a 0,2 ng mL⁻¹ de Hg. Entretanto, devido ao baixo teor de Hg presente nas amostras de arroz, não é viável utilizar um alto fator de diluição. Neste trabalho os fatores de diluição estudados foram 1:667; 1:333,5 e 1:250.

As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento recomendado no Manual de Informações Técnicas ao Cliente do equipamento AFS [66].

Para 50 mL de solução contendo 0,6 mol L⁻¹ HCl, 1 mL da solução KBr/KBrO₃, 30 µL de uma solução 1,73 mol L⁻¹ de cloridrato de hidroxilamina. Conforme mostra a Tabela 13, a equação da curva (condição 1) apresentou um declive para o método de adição de analito (2037,1 fluorescence ng⁻¹ mL) cerca de 35 % menor que o declive encontrado para a calibração externa (2740,3 fluorescence ng⁻¹ mL).

Tabela 11: Avaliação do efeito matriz em diferentes condições, a equação da reta para as medidas realizadas por calibração externa e pelo Método de adição de analito e a razão entre as inclinações das duas curvas, na determinação de Hg em amostras de arroz por CV-AFS

Testes	Condição	Calibração externa	Método de adição de analito	$S_{ad}/S_{ext} \times 100$
1	HCl 5% + 1 mL Br^-/BrO_3^- + 30 μ L hidroxilamina	$F = 2740,3C + 31,6$	$F = 2037,1C + 86,4$	74
2	HCl 5% + 25 μ L MnO_4^- + 10 μ L hidroxilamina	$F = 2193,9C - 4,7$	$F = 1341,2C + 41,4$	61
3	HCl 5% + 100 μ L $Cr_2O_7^{2-}$ + 50 μ L hidroxilamina	Não reprodutível	Não reprodutível	-
4	HCl 5% + 25 μ L MnO_4^-	$F = 3172,5C + 8,9$	$F = 2968,7C + 87,6$	94
5	HCl 5% + 100 μ L $Cr_2O_7^{2-}$	$F = 2993,6C + 13,9$	$F = 3055,7C + 43,5$	102
6	HCl 5% + 0.5 mL uréia	$F = 3174,9C + 11,5$	$F = 3104,3C + 73,9$	98
7	HCl 25%	$F = 1598,5C + 8,6$	$F = 1463,4C + 20,8$	92
8	HCl 25% + 1 mL Br^-/BrO_3^- + 30 μ L hidroxilamina	$F = 2036,3C + 21,9$	$F = 2050,5C + 31,5$	101
9	HCl 25% + 25 μ L MnO_4^-	$F = 2307C + 2,9$	$F = 2255,4C + 26,7$	98
10	HCl 25% + 100 μ L $Cr_2O_7^{2-}$	$F = 2064,6C + 14,6$	$F = 1861,4C + 31,4$	90
11	HNO ₃ 5%	$F = 3374,1C + 5,3$	$F = 2840,8C + 59,9$	84
12	HNO ₃ 5% + 1 mL Br^-/BrO_3^- + 30 μ L hidroxilamina	$F = 2069,8C + 30,6$	$F = 1934,5C + 53,4$	94
13	HNO ₃ 5% + 25 μ L MnO_4^-	$F = 3434C + 6,2$	$F = 3133,5C + 60,9$	91
14	HNO ₃ 5% + 100 μ L $Cr_2O_7^{2-}$	$F = 3321,1C + 23,7$	$F = 3210,8C + 45,4$	97

*Em todos os casos, o volume de amostra digerida foi de 3,75 mL diluído para 50 mL.

A fim de obter melhor sensibilidade e menor efeito de matriz ocasionado pelos interferentes, diferentes estratégias foram empregadas, como:

- i) A adição de uma quantidade mínima de oxidantes, ($KMnO_4$ e $K_2Cr_2O_7$, com e sem a presença do redutor cloridrato de hidroxilamina para eliminar da solução antes da medida (condição 2 e 3). Foram empregadas quantidades de oxidantes suficientes para provocar a

mudança de cor da solução, para rosa (KMnO_4) e amarelo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Observou-se que a adição de hidroxilamina resulta em efeito de matriz quando o oxidante é o KMnO_4 e quando se usa o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ os resultados obtidos não são reprodutíveis.

- ii) O aumento da concentração de HCl com e sem a presença de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, como sugerido por Cava e colaboradores [67] (condições 4,5,7-10). Quando a solução $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ (5 %, v/v) HCl foi usada (condição 4 e 5) com KMnO_4 os declives da calibração externa e da adição de analito foram diferentes, observa-se portanto, efeito de matriz. Com o uso da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (condição 5) observa-se que o resultado foi próximo, podendo esta ser uma condição favorável. Já os resultados com a solução 3 mol L^{-1} (25% v/v) HCl utilizada sem ou com a presença de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (condições 7 e 10), verificou-se efeito matriz. Porém com uso de KBr/KBrO_3 ou KMnO_4 (condição 8 e 9), as inclinações dos métodos de calibração externa e de adição de analito foram semelhantes. Nesse caso utilizou-se solução 3 mol L^{-1} HCl
- iii) A utilização de 4% (m/v) de uréia (condição 6), como solução oxidante para evitar interferências, conforme sugerido por Hac e Krechniak [68]. Diferentes volumes de solução de uréia foram estudados (0,5; 1; 2 e 3 mL). Entre os volumes estudados 0,5 mL foi selecionado, já que o sinal de fluorescência da amostra não variou. O valor do declive obtido com a calibração externa e com a adição de analito foram próximos, bem como a razão $S_{\text{ad}}/S_{\text{ext}}$, que se aproximou de 100
- iv) O uso de solução $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido HNO_3 (condição 11) que é o meio recomendado no manual do equipamento AFS [66] para avaliar a sensibilidade do equipamento. A avaliação é realizada através da medida da concentração equivalente da radiação de fundo (do inglês, Background Equivalent Concentration, BEC). A interferência do óxido nitroso foi persistente na presença de KMnO_4 (condição 13). Entretanto o uso de KBr/KBrO_3 e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (condição 12 e 14) produziram inclinações semelhantes para a curva de calibração externa e de adição de analito.

A partir dos resultados obtidos, tendo em vista, reprodutibilidade das medidas, coeficientes de correlação e discordância entre o declive da curva construída através da adição de analito e o sinal de fluorescência das amostras, foram selecionados dois meios para um estudo adicional: 3 mol L^{-1} (25% v/v) HCl e $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ (5% v/v) HNO_3 (condições 8 e 12). Ambas as condições com a adição das soluções KBr/KBrO_3 e hidroxilamina.

O método de adição de analito foi aplicado a quatro amostras de arroz digeridas em forno de micro-ondas, afim de avaliar o seu comportamento frente ao efeito de matriz. Embora essas duas condições estudadas não apresentassem efeito de matriz, pode-se considerar que o meio ácido proporcionado pela presença de HNO_3 , apresentou maior sensibilidade que o HCl . As inclinações

obtidas para as amostras variaram de 1832,5 1867, 1945,6 e 1953,3 e o valor da curva de calibração externa foi de 1992,5 de acordo com a Figura 36.

Entretanto, é importante esclarecer que não é adição do NO_3^- usado para acidificar as soluções diluídas que pode originar alguma interferência, mas sim os óxidos nitrosos formados após as digestões, conforme foi descrito previamente na literatura [63,64].

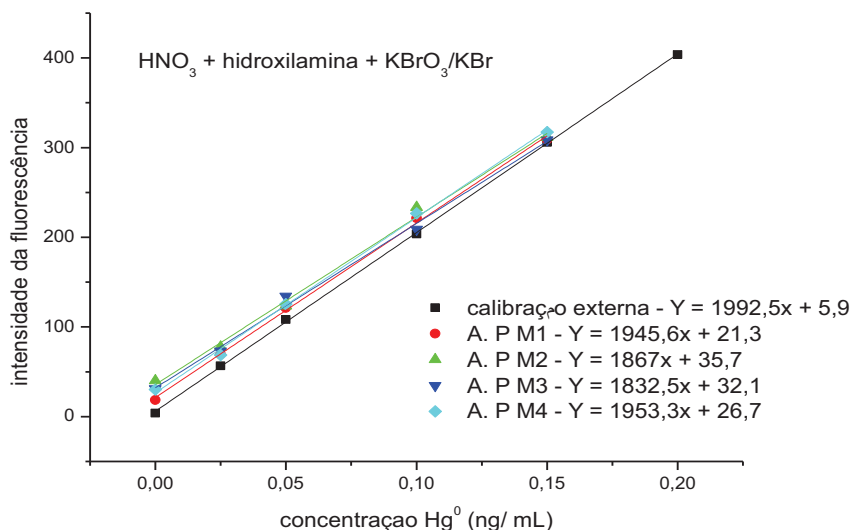


Figura.36 - Avaliação do efeito matriz com o método de adição de analito em quatro amostras distintas, comparada com a calibração externa (HNO_3 5% (v/v) KBr/KBrO_3 e hidroxilamina).

III.4.4. ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DIGERIDAS

Para avaliar a estabilidade das amostras digeridas, uma mesma amostra foi analisada em diferentes dias, após a digestão em forno de micro-ondas. Os resultados calculados com o uso da equação da curva obtida com a calibração externa e com a adição de analito estão apresentados na tabela 14. De acordo com os resultados, não existe diferença significativa entre as concentrações encontradas nas amostras, pelo método de calibração externa e adição de analito, ao longo dos 11 dias após a digestão. Entretanto, 4 dias após a digestão houve uma diminuição no sinal de fluorescência e consequentemente na concentração de Hg, passando de 31 ng g^{-1} para 21 ng g^{-1} . Após este período, a concentração permaneceu praticamente constante. Uma possível explicação para esse fenômeno é o fato do mercúrio ter adsorvido nas paredes de vidro, do balão volumétrico. Sendo assim é recomendado a análise rápida das amostras digeridas, de maneira que o intervalo entre a digestão e a análise das amostras não seja superior a 1 dia e a armazenagem dos digeridos em frascos de polietileno.

Tabela 12: Estudo da estabilidade das amostras digeridas

Dias após digestão	Calibração externa	Adição de analito	Concentração ng g ⁻¹	
			Calibração externa,	Adição de analito
1	F = 1955,3C + 6,0	F = 1866,4c + 88,8	30,8 ± 1,2	32,2 ± 1,6
4	F = 1743,7C + 6,1	F = 1659,5c + 67,2	23,4 ± 1,2	24,6 ± 0,5
6	F = 1884,4C + 4,1	F = 1811,3C + 63,9	21,4 ± 0,9	22,3 ± 0,5
10	F = 1877,5C + 3,7	F = 1844,1C + 62,6	20,7 ± 0,7	21,1 ± 0,8
11	F = 2049C + 0,3	F = 2012,6C + 73,2	22,1 ± 0,7	22,5 ± 0,8

*F= sinal de fluorescência e C: concentração

III.4.5. AVALIAÇÃO DO VOLUME DA AMOSTRA

Visto que baixos teores de Hg estão associados a amostras de arroz, o que corrobora com os resultados obtidos, é interessante aumentar a sensibilidade do método e diminuir o limite de detecção. Para isso, um fator de diluição menor foi avaliado. Os resultados encontrados com o volume de 3,75 mL de amostra digerida foram comparados com os volumes de 7,5 e 10 mL (Figura.37). As demais condições permaneceram inalteradas (HNO₃, KBr/KBrO₃ e hidroxilamina).

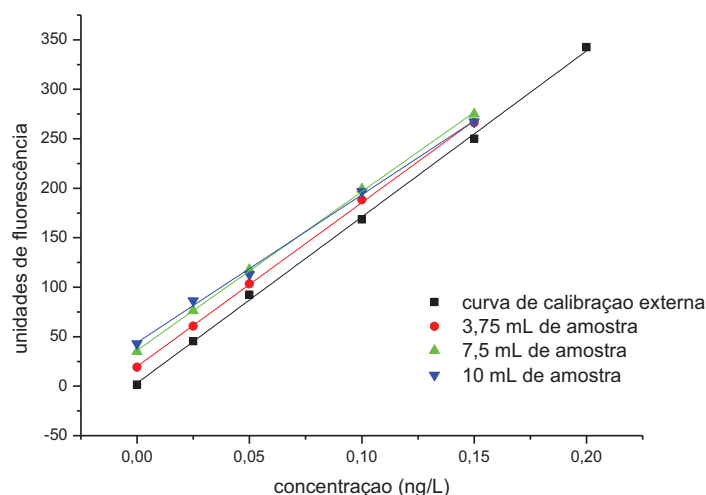


Figura.37 Avaliação do efeito matriz para diferentes volumes de amostra digerida.

As curvas analíticas traçadas para os diferentes volumes de amostra digerida indicam que nenhum efeito de matriz significativo foi observado. Embora o aumento na quantidade de amostra tenha sido considerável.

A Tabela 15 mostra as inclinações da reta e as concentrações obtidas com os diferentes volumes de amostra digerida: 3,75, 7,5 e 10 mL. Pode-se inferir que os conteúdos de Hg são concordantes entre si para as três alíquotas da amostra, e que medida direta com calibração externa pode ser empregada.

Tabela 13 – Estudo da dependência do efeito de matriz com a variação do fator de diluição

Volume de amostra digerida (mL)	Método de adição de analito	Concentração obtida pela calibração externa ng g ⁻¹	Concentração obtida pelo método de adição de analito ng g ⁻¹
3,75	F= 1654,8C + 20	7,0 ± 2,0	6,5 ± 0,6
7,5	F= 1603,4C + 36	6,7 ± 1,0	6,7 ± 0,4
10	F= 1493C + 44	6,3 ± 0,8	6,7 ± 0,7
-	F = 1610,5C + 6,1	Equação de calibração externa	

*. F: sinal de fluorescência e C: concentração em ng L⁻¹

A massa de amostra digerida em forno de micro-ondas foi de 0,5 g de arroz, diluído em 25 mL de água. Para a determinação de Hg por CV-AFS os diferentes volumes estudados foram diluídos para 50 mL.

A Tabela 16 mostra os principais parâmetros de desempenho método proposto. O limite de detecção (LOD) foi estimado como sendo $3\sigma/a$. O desvio padrão (σ) foi encontrado para seis medidas do branco e o coeficiente angular (a) foi obtido da curva de calibração externa. A partir da massa empregada foi calculado o LOD em ng g⁻¹. Considerando o fator de diluição empregado neste trabalho de 1:667, o limites de detecção encontrado foi inferior aos valores relatados na literatura.

O trabalho de Li e colaboradores [28] empregando a técnica de injeção em fluxo combinada com espectrometria de absorção atômica co atomização eletrotérmica, obteve um limite de detecção de 6,2 ng L⁻¹. Navarro-Alarcón e colaboradores obtiveram um limite de detecção de 0,195 ng mL⁻¹ empregando a espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio (CV-AAS) [31]. Cao et al. utilizou a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP MS) e o limite de detecção foi de 0,007 µg L⁻¹ [29]. Al-Saleh e Shinwari usando espectrometria de absorção

atômica (AAS) obtiveram um limite de detecção de $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ [30]. O limite de detecção só foi superior ao que Li e colaboradores relataram em seu trabalho empregando espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente e vaporização eletrotérmica (ET-ICP-MS) com valor de $0,53 \text{ ng g}^{-1}$ [27]. Embora o limite de detecção do método proposto para a determinação da concentração de Hg em amostras de arroz, tenha sido baixo, é possível diminuir ainda mais este valor, empregando volumes maiores de amostra digerida.

O desvio padrão relativo (RSD) foi obtido a partir da análise, em triplicata, da amostra real com concentração de $7,8 \text{ ng g}^{-1}$. Este valor é aceitável por se tratar de medidas de baixas concentrações bem como devido às características inerentes da técnica associada à geração de vapor frio.

A sensibilidade do método proposto foi da ordem de $1659,5$ a $2010,6$ fluorescência mL ng^{-1} variando ligeiramente a cada nova medida. Estes valores mostram que o método é sensível

Foram realizados experimentos de recuperação, adicionando soluções aquosas contendo Hg com concentrações conhecidas de 5 , 20 e 50 ng g^{-1} às respectivas amostras, antes de iniciar a digestão assistida por micro-ondas. Os percentuais de recuperação para os três níveis de concentração estão descritos na tabela 16 e observa-se que os valores obtidos estão no intervalo aceitável.

Tabela.14- Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de Hg em arroz empregando CV-AFS

LOD (ng L^{-1})	1,4
LOD (ng g^{-1})	0,92
RSD(%) (concentração de $7,8 \text{ ng g}^{-1}$)	18
Sensibilidade (fluorescência mL ng^{-1})	1700-2000
% Recuperação (adição de solução 5 ng g^{-1} Hg, $n = 4$)	95 ± 4
% Recuperação (adição de solução 20 ng g^{-1} Hg, $n = 4$)	98 ± 7
% Recuperação (adição de 50 ng g^{-1} Hg $n = 4$), $n = 4$)	94 ± 4

III. 4.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE ARROZ

Para avaliar a exatidão do método proposto, foi analisada uma amostra de referência denominada amostra certificada NIST SRM 1568a rice flour e os resultados estão apresentados na Tabela 17. A concentração média de mercúrio foi de $6,4 \pm 0,5 \text{ ng g}^{-1}$ e está de acordo com o valor certificado que é de $5,8 \pm 0,5 \text{ ng g}^{-1}$.

Quando se comparam os valores de concentração encontrados por calibração externa e pelo método de adição de analito, fica evidente que ambos estão de acordo com o valor de referência. Logo, conclui-se que o método é viável e apropriado para detectar Hg total em arroz, além de não apresentar efeito matriz.

Tabela 15: Determinação de Hg total na amostra certificada NIST-SRM 1568a rice flour

Avaliação	Equação	Método de adição de analito, ng g ⁻¹	Método de calibração externa, ng g ⁻¹
Calibração	$F = 1884,4C + 4,1$	-	-
Adição de analito	$F = 1868,6C + 23,1$	5,9	5,8
Adição de analito	$F = 1878,1C + 25,5$	7,6	6,8
Adição de analito	$F = 1903,6C + 22,3$	6,7	6,6
Média ± desvio padrão		$6,7 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,5$

*Equação de calibração externa $F = 1884,4C + 4,1$ F: sinal de fluorescência e C: concentração em ng L⁻¹

O método proposto foi aplicado para determinar a concentração de Hg em 24 amostras de arroz, de origens distintas. Nove amostras de arroz foram provenientes do Brasil, as quais foram adquiridas nas cidades de Recife e São Paulo. Quinze amostras foram adquiridas em Valência, Espanha, quatro amostras da Tailândia e cinco amostras do Japão. Todas as amostras foram adquiridas no comércio local das respectivas cidades.

As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras de arroz analisadas variaram entre 1,2 e 7,8 ng g⁻¹, conforme pode ser visto na Tabela 18. Não foram observadas diferenças significativa nas concentrações de Hg encontradas nas amostras de arroz, no tocante às diferentes origens das amostras.

O conteúdo de Hg encontrado nestas amostras foi menor que níveis consumidos na Arábia Saudita que estão na faixa de 3 a 43,6 ng g⁻¹ [30] e níveis reportados por Appleton e colaboradores [69] em arroz proveniente das Filipinas que variam de 8 a 50 ng g⁻¹.

Tabela 16: Teor médio e desvio padrão encontrados em amostras de arroz de diferentes origens empregando CV-AFS

País de			País de		
Amostra	origem	Hg (ng g ⁻¹)	Amostra	origem	Hg (ng g ⁻¹)
Arroz 1	Brasil	3,2 ± 0,7	Arroz 13	Brasil	3,2 ± 0,2
Arroz 2	Brasil	2,2 ± 0,4	Arroz 14	Espanha	1,9 ± 0,5
Arroz 3	Brasil	2,6 ± 0,6	Arroz 15	Espanha	2,5 ± 0,6
Arroz 4	Brasil	4,4 ± 0,4	Arroz 16	Japão	2,7 ± 0,5
Arroz 5	Tailândia	2,9 ± 0,6	Arroz 17	Tailândia	1,3 ± 0,4
Arroz 6	Espanha	1,6 ± 0,5	Arroz 18	Espanha	3,3 ± 1,3
Arroz 7	Espanha	1,6 ± 0,5	Arroz 19	Tailândia	3,7 ± 1,3
Arroz 8	Espanha	1,9 ± 0,2	Arroz 20	Japão	2,3 ± 0,5
Arroz 9	Brasil	3,6 ± 0,9	Arroz 21	Japão	1,2 ± 0,5
Arroz 10	Brasil	2,1 ± 0,7	Arroz 22	Japão	7,8 ± 1,4
Arroz 11	Brasil	2,8 ± 0,3	Arroz 23	Tailândia	2,6 ± 0,7
Arroz 12	Brasil	4,1 ± 1,2	Arroz 24	Japão	1,7 ± 0,3

III. 5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido, que combina a digestão assistida por radiação micro-ondas com a determinação por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio, mostrou-se sensível para a determinação de Hg total em amostras de arroz, com concentrações da ordem de ng g^{-1} . O limite de detecção do método proposto foi de $0,9 \text{ ng g}^{-1}$ e uma boa exatidão e precisão demonstram que o método proposto é uma excelente ferramenta para a quantificação de Hg total em amostras de arroz de diferentes origens. As concentrações encontradas variaram de 1,3 a $7,8 \text{ ng g}^{-1}$ em amostras de arroz comercialmente disponíveis.

O método pode ser aplicado futuramente a outros alimentos, visto que a técnica CV-AFS apresentou bom desempenho em determinar baixas concentrações de mercúrio.

III.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Baird, A. C., **Environmental chemistry**. New York: W.H. Ferman and Company, 1995. 484p.
- [2] Zhang, L.; Wong, M. H., **Environ. Int.** v. 33, p. 108-121, 2007.
- [3] EPA-452/R-97-007 **Mercury study report to congress: health effects of mercury and mercury compounds**, 5.vol. United States. Environmental Protection Agency, December, 1997.
- [4] Nascimento, E. S.; Chasin, A. A. M., **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos**. Vol.1. Salvador: CRA. 2001. 165p.
- [5] WHO – **World Health Organization**, **Methylmercury**. Geneva: Environment Health Criteria, 1990. v.118, 144p.
- [6] **National Oceanic and Atmospheric Administration Contaminants in aquatic habitats at hazardous waste sites: mercury**. Seattle, Technical Memorandum ORCA. 1996 Disponível em: <http://response.restoration.noaa.gov/cpr/sediment/mercury.pdf>. acessado em janeiro de 2010.
- [7] Schroeder, W.H.; Munthe, J.; Atmospheric Mercury-an overview, **Atmospheric Environment**, v.32, p.809-822, 1998.
- [8] Kudo, A., Natural and artificial mercury decontamination – Ottawa River and Minamata Bay (Yatsushiro Sea). **Water Sci. Technol.**, v. 26, p.217-225, 1992.
- [9] Gustin, M.S.; Ericksen, J.A.; Schorran, D.E.; Johnson, D.W; Lindberg, S.E.; Coleman, J.S., Application of controlled mesocosm for understanding mercury plant–soil–air exchange, **Environ. Sci. Technol.** v.38, p.6044-6050, 2004.
- [10] Bisinot, M. C.; Jardim, W. F., Behavior of methylmercury in the environment. **Química Nova**, v. 27, p. 593-600, 2004.
- [11] Miretzsk, M. C.; Bisinot, M. C.; Jardim, W. F. Factors affecting Hg adsorption in soils from the Rio Negro Basin, **Química Nova**, v.28, p 438 – 443, 2005.
- [12] Fitzgerald, W. F.; Engstrom, D. R.; Mason, R. P; Nater, E. D.; The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. **Environ. Sci. Technol.** v. 32, p. 1–7, 1998.
- [13] Harris, H.H.; Pickering, I. J.; George, G.N., The chemical form of mercury in fish. **Science**, v.301, p.1203, 2003.
- [14] Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L.; Amyot, M., The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Department of Geosciences, Guyot Hall, Princeton University, New Jersey 08544, USA., **Annual Review of Ecology and Systematics** vol. 29 p.543-566.
- [15] Amyot, M.; Mierle, G.; Lean, D. R. S.; Mackuen, D. J., Sunlight-induced formation of dissolved gaseous mercury in lake waters. **Environ. Sci. Technol.**, v.28, p. 2366-2371, 1994.
- [16] Osa, R. H., **Mercury Atmospheric Processes: A Synthesis Report**, Workshop Proceedings, Tampa, Flórida, E.U.A. 1994.

- [17] Goyer, R.A.; **Toxic effects of metals**, 5.ed.Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: Mc.Grow Hill. 1995. 691p
- [18] Silbergeld, E.K.; Silva, I. A.; Nyland, J. F., Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 207, p. 282 – 292, 2005.
- [19] Jewett, S.C.; Duffy, L. K., Mercury in fishes of Alaska, with emphasis on subsistence species, **Sci. Total Environ.**,v.387, p.3–27, 2007.
- [20] Branches, F. R. Y., Erickson, T. B., Aks, S. E., Hryhorczuk, D. O., **Clin. Toxicol.**, v. 31, p.295-306,1993.
- [21] Goldwater, L.J., Mercury in the environment. **Scientific American**.v. 224, p. 15-21, 1971.
- [22] Malman, R. B., **Heavy metals:Introduction to environmental toxicology**. New York, Oxford: Elsevier, North Holland, 1980. 37-39p.
- [23] Goodman, L.; Gilman, A., **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1065p.
- [24] FAO/WHO. 1978. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. Twenty-second report of theJoint Expert Committee on Food additives. Geneva, World Health Organization, 1978.631 n°.
- [25] Lee, H-S; Cho, Y-H.; Park, S-O.; Kye, S-H; Kim, B-H; Hahn, T-S; Kim, M, , Lee, J-O, C-I, Kim; C., Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury, **Food Compos. Anal.** Vol. 19, p.31-37, (2006).
- [26] Llobet, J.M.; Falco C, G.; Teixido C. A.; Domingo, J. L., Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Common Foods and Estimated Daily Intake by Children, Adolescents, Adults, and Seniors of Catalonia, Spain **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 838-842, 2003.
- [27] Li, P-C.; Jiang,S-J., Electrothermal vaporization inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of Cr, Cu, Cd, Hg and Pb in rice flour. **Anal. Chim. Acta** v.495, p.143-150, 2003
- [28] Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X-P.;Ni, Z-M, Determination of trace mercury in environmental and foods samples by online coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Environ. Sci. Technol.** v.36, p.4886-4891, 2002.
- [29] Cao S.Q.; Chen, H.T.; Zeng, X.J.; Determination of mercury in biological samples using organic compounds as matrix modifiers by inductively coupled plasma mass spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.** v. 14, p. 1183-1186, 1999.
- [30] Al-Saleh, I.; Shinwari N., Report on the levels of cadmium, lead, and mercury in imported rice grain samples **Biol. Trace Element Res.** v.83, p. 91-96, 2001.
- [31] Navarro-Alarcon, M.; Lopez-Martinez, M-C.; Sanchez-Viñas, M.; Lopez-Garcia-de-la-Serrana, H., Determination of mercury in crops by cold vapor atomic absorption spectrometry after

microwave dissolution, **J. Agric. Food Chem.** v.39, p. 2223-2225, 1991.

[32] Ombaba, J.M.; Total Mercury Determination in Biological and Environmental Standard Samples by Gold Amalgamation Followed by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, **Microchem. J.** v.53, p. 195-200, 1996.

[33] Morita, M.; Yoshinaga, J.; Edmonds, J.S., The Determination of mercury species in environmental and Biological Samples, **Pure & Appl. Chem.**, v. 70, p. 1585-1615, 1998.

[34] Chilov, S., Determination of small amounts of mercury." **Talanta**, v. 22, p. 205- 232, 1975.

[35] Schickling, C.; Broekaert, J.A.C.; Determination of mercury species in gas condensates by on-line coupled high-performance liquid chromatography and cold-vapor atomic absorption spectrometry, **Appl. Organomet. Chem.** v. 9, p. 29, 1995,

[36] Carro-Díaz, A. M.; Lorenzo-Ferreira, R. A.; Cela-Torrijos, R., Capillary electrophoresis of methylmercury with injection by sample stacking , **J. Chromatogr. A**, v. 730, p. 345, 1996.

[37] Horvat, M.; **In Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances**, 1996. p.1.

[38] Farah, J. B. D.; Farah, K.S., Multielement atomic absorption spectrometry: a historical perspective, **Microchim. J.**, v. 48, p. 319, 1993.

[39] Poluektov, N. S.; Vitkun, R. A.; Zelyukova, Y. A.; Atomic absorption spectrometry, **Zh. Anal. Khim.**, v.19, p.837, 1964

[40] Nguyen, T. H.; Boman, J.; Leermakers, M.; Baeyens, W.; Mercury analysis in environmental samples by EDXRF and CV-AAS, Fresenius **J. Anal. Chem.** v.360, p. 199-204, 1998.

[41] Haase O.; Klarea, M.; Krenzel-Rothenseeb, K.; Broekaert, Evaluation of the determination of mercury at the trace and ultra-trace levels in the presence of high concentrations of NaCl by flow injection–cold vapour atomic absorption spectrometry using SnCl₂ and NaBH₄ as reductants, **Analyst**, v.123, p.1219–1222, 1998.

[42] Horvat, M., Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: Global and Regional Mercury Cycles: sources, fluxes and mass balance, Eds Novosibirsk, Siberia. Kluwer, Dordrecht, Holland, n° 21, 1996, 135p.

[43] WHO – **World organization, health guidelines for the use of waste water in agriculture and aquaculture**, Report of a WHO Scientific Group, technical Reports Serie 778, WHO, Geneva 1989

[44] Jardim, W. F., contaminação por mercúrio: Fatos e Fantasia, **Ciência Hoje**, v.41, p.78, 1988.

[45] Bol'Shakov, A.A.; Ganeev, A.A.; Nemets, V.M.; Prospects in analytical atomic spectrometry, **Russian chemical reviews** v. 75, p. 829-302, 2006.

[46] Winefordner, J. D.; Vickers, T. J. A., Atomic Fluorescence Spectroscopy as a Means of Chemical **Analysis. Anal. Chem.**, v. 36, p. 161–165, 1964.

- [47] Thompson, K. C.; The atomic-fluorescence determination of antimony, arsenic, selenium and tellurium by using the hydride generation technique, **Analyst**, v 307, p.100, 1975.
- [48] Tsujii, K.; Kuga, K.; Determination of arsenic by nondispersive atomic fluorescence spectrometry with a gas sampling technique, **Anal. Chim. Acta**, v. 72, p. 85, 1974,.
- [49] Nakahara, T.; Applications of hydride generation techniques in atomic absorption, atomic fluorescence and plasma atomic emission spectroscopy, **Prog. Anal. At. Spectrosc.**,v.6, p.163, 1983.
- [50] Greenfield S., Atomic fluorescence spectrometry: progress and future prospects, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.14, p. 435-442, 1995.
- [51] H.Morita, Tanaka H., Shimomura S., **Spectrochim. Acta**, Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments, v. 50, p.69-84, 1995.
- [52] Lakowicz, J.R.; **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Plenum Press: New York, 1983.
- [53] Santos, D. M.; Pedroso, M. M.; Costa, L.M.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J.A., A new procedure for bovine milk digestion in a focused microwave oven: gradual sample addition to pre-heated acid, **Talanta**, v. 65, p.505, 2005.
- [54] Lamble, K.J., Hill, S.J.,Microwave digestion procedures for environmental matrices, **Analyst**, v. 123, p. 103-133, 1998.
- [55] Mingorance, M. D.; Pérezvazquez, M. L.; Lachica, M., Microwave digestion methods for the atomic spectrometric determination of some elements in biological samples, **J.Anal. At. Spectrom.**, v 8, p 853-858,1993.
- [56] Corns, W. T., Stockwell, P. B.,Jameel, M. Rapid Method for the Determination of Total Mercury in Urine Samples Using Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry, **Analyst**, Vol. 119, p.2481-2484, 1994.
- [57] Anderson, R.; **Sample Pretreatment and Separation Analytical Chemistry by Opening Learning**, Chichester: John Wiley, 1991.
- [58] Kingston, H. M.; Jassie, L. B., **Introduction to Microwave Sample Preparation - Theory and Practice**, ACS, Washington, DC, 1988.
- [59] Abu-Samra, A; Morris, J. S.; Koirtyohann, S. R., Wet ashing of some biological samples in a microwave oven**Anal. Chem.**, v. 47, p. 1475, 1975.
- [60] Jeffry, A.; Barry, G., Some Problems Associated with the Determination of Mercury in Plant Material and Biological Tissue **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** v.31, p. 1929-1934, 2000
- [61] Krystek P. Ritsema, R., Mercury speciation in thawed out and refrozen fish samples by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy, **Anal Bioanal Chem.** v. 381, p. 354–359, 2005
- [62] Hight S. C., Cheng J. ,Determination of total mercury in seafood by cold vapor-atomic

absorption spectroscopy (CVAAS) after microwave decomposition, **Food Chemistry**, v. 91, p. 557–570, 2005.

[63] Flores, E.M.M.; Silva, L.L.C., Barin, J.S.; Saidelles, A.P.F.; Zanella, R.; Dressler, V.L.; Paniz, J.N.G. Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v.56, p. 1883-1891, 2001

[64] Nunes, D.L.; Santos, E.P ; Barin, J.S.; Mortari, S.R.; Dressler, V.L.; De-Moraes-Flores, E.M.; , Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption, **Spectrochim. Acta** v.60, p.731-736, 2005.

[65] Pedro S. Fadini and Wilson F. Jardim, Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles, *Analyst*, 2000, 125, 549–551

[66] **Customer Technical Information File**, PA Analytical, Issue No. 4.2, November 2000.

[67] Cava-Montesinos, P.; Rodenas-Torralba, E.; Morales-Rubio, A.; Cervera, M.L; de la Guardia, M., Cold vapour atomic fluorescence determination of mercury in milk by slurry sampling using multicommutation, **Anal. Chim. Acta** v. 506, p. 145-153, 2004.

[68] Hac, E.; Krzyzanowski, M.; Krechniak, J., Total mercury in human renal cortex, liver, cerebellum and hair, **Sci. Total Environ.**, v. 248, p.37-43, 2000.

[69] Appleton, J.D.; Weeks, J.M.; Calvez, J.P.S.; Beinhoff, C., Impacts of mercury contaminated mining waste on soil quality, crops, bivalves, and fish in the Naboc River area, Mindanao, Philippines, **Sci. Total Environ.** , v. 354, p. 198–211, 2006.

TRABALHOS PUBLICADOS

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis

Maria José da Silva^a, Edijane V. dos Anjos^b, Ricardo S. Honorato^b,
Maria Fernanda Pimentel^c, Ana Paula S. Paim^{a,*}

^a Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-550 Recife, PE, Brazil

^b Departamento da Polícia Federal, Superintendência Regional em Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2008

Received in revised form

2 September 2008

Accepted 11 September 2008

Published on line 18 September 2008

Keywords:

Flow-batch system

Sequential injection analysis

Cocaine

Cobalt thiocyanate

Spectrophotometry

ABSTRACT

Quantifying cocaine in apprehended samples is important to the Brazilian Federal Police because the concentration can indicate the origin of the drug and consequently the traffic route. In addition to the other risks of using this drug is the variability in cocaine concentration, which makes large doses lethal. Gas Chromatography with a Flame Ionization Detector (GC-FID) and a Mass Selective Detector (GC-MS) are the techniques usually employed, but these systems are not available in all police laboratories, due to the relatively high cost. In the present work, a flow-system procedure for the spectrophotometric determination of cocaine using cobalt thiocyanate as a complexing reagent was developed. In this reaction, two phases are formed: the superior (pink) contains an excess of cobalt thiocyanate solution and the lower layer (blue) contains the complex cocaine–cobalt thiocyanate. Samples and reagent are inserted through a sequential-injection valve between two air bubbles inside a reaction chamber. An optic fiber sensor connected to the chamber recorded the absorbance at 630 nm signal. The detection and quantification limits were 29.4 mg L^{-1} and 98 mg L^{-1} , respectively. Relative standard deviation was 4.9% for solutions containing 400 mg L^{-1} ($n = 10$), with stable baselines. The analytical throughput was 12 determinations per hour.

© 2008 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Cocaine ([1R-(exo,exo)]-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo [3.2.1]octane-2-carboxylic acid methyl ester) is an illicit drug consumed by 0.3% of the world's population between 15 and 64 years old and is responsible for 48% of the demand for medical treatment in South America [1]. Brazil is a traffic route of this drug to countries in West Africa and Europe. Quantifying cocaine in apprehended samples is important to the Brazilian Federal Police Department (FPD), because its concentration can indicate the drug's origin and consequently the traffic route [2]. There are numerous methods to test the presence

of cocaine in urine [3–5], hair [6–8], blood [9,10], saliva [11,12], brain [13] and banknotes [14,15] using gas chromatography (GC) [12] and liquid chromatography (LC) [8,16]. Methodologies based on Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) [6,7,16,17] are largely employed. Other techniques such as liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) [16] and thin-layer chromatography [18] have also been used to test the presence of cocaine in biological fluids. Chromatography presents shortcomings such as slow speed and high operational cost. Because of this, the availability of reliable procedure using simpler separation and detection techniques

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 7469; fax: +55 81 2126 8442.

E-mail addresses: anaspaim@ufpe.br, paulapaim@pq.cnpq.br (A.P.S. Paim).
0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.aca.2008.09.030

is desirable. The Scott test is widely used for qualitative analysis of cocaine *in situ* [19], and consists of three steps [20]. In the first one, cobalt thiocyanate is added to the sample and a blue precipitates appears. In the second step, hydrochloric acid solution is added and the blue precipitates disappear. In the last one, chloroform is added and the blue color reappears in the lower layer.

Valcarcel and co-workers have presented three papers about indirect determination of cocaine employing flow injection analysis (FIA) with detection by flame atomic absorption spectrometry [21–23]. Fernández-Abedul and Costa-García described a simple and reproducible procedure employing Flow Injection Analysis (FIA) with amperometric detection applied for the determination of cocaine in illegal dosage forms confiscated by police authorities [24]. Sequential injection analysis (SIA) [25] is an alternative methodology to FIA. The widespread acceptance of SIA can be attributed to its modular configuration and its superior ability to handle several solutions. The SIA methodology has already been applied for sequential monitoring of species in natural and waste waters and in galvanic baths [26,27]; to perform in-line dilution combined with the Monosegmented Flow Analysis (MSFA) approach [28]; to carry out simultaneous determination employing potentiometric titration [29]; to determine organic and inorganic carbon using a PTFE (polytetrafluorethylene) membrane and UV lamp to sample irradiation [30]; and to implement enzymatic reaction for the determination of malic acid in wines [31].

The first works that combined flow systems with a batch reaction chamber, denominated as AMBA (Automated Micro Batch Analyzer) were proposed in 1988 [32,33]. One decade later, these systems reappeared, hyphenised with the methodologies FIA, MSFA and SIA and were denominated Flow-Batch (FB) [34–38]. In these systems, some analytical steps are carried out in a continuous way, and others occur inside a reaction chamber as in batch analysis. In recent studies, only sampling and discarding of solutions are performed in continuous way [35,36]. FB approach combines the intrinsic advantages of flow systems with the wide application range inherent in batch systems [37]. Generally it is necessary to choose a particular strategy for inserting the solutions into the reaction chamber of the flow-batch. SIA is efficient for this purpose [36,38].

The majority of the works found in the literature are about the determination of cocaine in biological fluids (blood, urine and saliva), hair and bank notes. Few papers explore the determination of cocaine in actual apprehended samples of the drug. In this work, a sequential injection system was coupled with a flow-batch (SIA–FB) to perform spectrophotometric determination (at 630 nm) of cocaine in samples apprehended by the Brazilian Federal Police. The proposed method uses a cocaine reaction to cobalt thiocyanate complex. Two phases are formed: the superior (pink) contains an excess of cobalt thiocyanate solution and the lower layer (blue) contains the complex cocaine–cobalt thiocyanate. The proposed flow-batch system facilitates contact between solutions, and more importantly, also facilitates signal acquisition in the lower phase, which could be difficult with the use of other flow strategies, such as FIA, SIA (without the batch chamber) and multicommutation [39].

2. Experimental

2.1. Reagents

All the solutions were prepared from analytical reagent grade chemicals using ultrapure water with a resistivity of $18\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$, obtained by means of a Milli-Q (Millipore, USA) water purification system.

A 0.29 mol L^{-1} of cobalt(II) thiocyanate, $\text{Co}(\text{SCN})_2$, solution was prepared by dissolving 6.8 g of cobalt(II) chloride, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Synth), and 4.3 g of ammonium thiocyanate, NH_4SCN (Synth), in water and the volume was completed to 100 mL.

The cocaine standard (purity of $93.6 \pm 1.0\text{ wt}\%$) was prepared from a cocaine sample, which had been purified according to Brazilian Federal Police Department internal procedures. The purity of this standard was evaluated by GC–MS, using a reference standard from Cerilliant [40]. A cocaine stock solution of 5000 mg L^{-1} was prepared by dissolving 0.5 g of cocaine standard in 100 mL of CHCl_3 (Merck). The concentration of reference solutions varied from 100 to 1000 mg L^{-1} of cocaine. The sample solutions of cocaine were prepared by dissolving 0.07 g and the volume was completed to 100 mL with CHCl_3 . The cocaine samples used had been obtained from the Technical-Scientific Sector of the Brazilian Federal Police.

2.2. Apparatus

The sequential injection system coupled to the flow-batch chamber is schematically outlined in Fig. 1.

The FI manifold consisted of an FIA Lab 3000 system (FIALab Instruments, Bellevue, WA, USA) comprising a $2500\text{ }\mu\text{L}$ syringe pump, a six port multi-position valve (Valco Instruments Co., Houston, TX) and a 300-cm holding coil with 0.8 mm i.d. straight Tygon tubing. A 386 personal microcomputer was employed for data acquisition and control of the analytical system.

Detection was carried out using a multi-channel PC-2000 fiber optic spectrophotometer (Ocean Optics) at 630 nm (see spectra in Fig. S1 in Supporting information) with a tungsten halogen light source (LS-1, Ocean Optics Inc.) and an A/D converter (SAD-500, Ocean Optics Inc.) to interface the spectrometer and computer. Optical fibers were employed to transport radiation from the source to the flow chamber inlet and from the chamber outlet to the detection system (charge coupled device – CCD). The FIALab software was employed for system control and data acquisition. Using a sequential-injection valve, sample and the reagent aliquots were inserted between two air bubbles inside home-made flow-batch reaction chamber constructed in Teflon®.

2.3. Description of the flow-batch chamber

Fig. 2a shows the flow-batch chamber with its cap, both constructed in Teflon®. The chamber cavity, a cylinder 51 mm long and with an internal diameter of 8 mm, was used to hold the sample and reagent solutions (see details of the chamber dimensions in Fig. S2 in Supporting information). Additionally, an air stream was inserted through the base of the sepa-

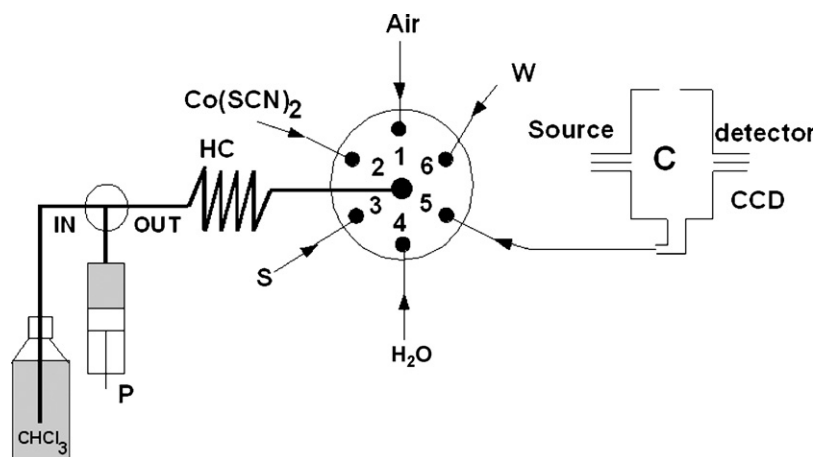


Fig. 1 – Manifold used for the sequential injection coupled to flow-batch chamber determination of cocaine. Note— CHCl_3 : organic solvent; Co(SCN)_2^{4-} : colorimeter reagent; S: sample, W: waste, HC: holding coil (300 cm), P: syringe pump, at $50 \mu\text{L s}^{-1}$, C: flow-batch chamber with optic fiber coupled to CCD at 630 nm.

ration chamber to promote mixture of the two phases. In the orifices L1 and L2, optic fibers were coupled to transport radiation beam from the source (L1) to the detection system (L2). An opening in the chamber permitted batch procedures (S). Although the total volume of the flow-batch chamber is 2.59 mL only 600 μL was inserted, because this volume is sufficient to fill the chamber above the orifices L1 and L2 (Fig. 2b). This system employs the chamber both as a reactor and flow cell. Solutions and air bubbles were inserted and discarded through the orifice at the base of the chamber using Tygon tubing.

2.4. Procedure

Table 1 describes the conditions of the devices used during the analytical sequence.

Before beginning the analyses, the acquisition of a blank signal was carried out, by adding chloroform and Co(SCN)_2^{2-} solutions to the chamber. After that, air (500 μL), cobalt thiocyanate (200 μL) and sample (400 μL) solutions were

sequentially aspirated into the holding coil (steps 1–3) and then (step 4) directed towards the chamber (700 μL). The remaining air (460 μL) was dispensed using a smaller flow rate (460 μL) to promote reagent and sample mixture in the chamber (step 5). The flow was stopped and the analytical signal was acquired (step 6). Subsequently, the flow was reactivated and the flow cell was washed out (step 7). The reaction products were dispensed and stored for posterior treatment (step 8).

The syringe pump (carrier bottle) was activated and 2000 μL of CHCl_3 was aspirated to fill the syringe (step 9). The chamber clean up step was initialized, aspirating 300 μL of water into the HC (step 10). After the flow reversal, 900 μL of CHCl_3 and water was dispensed into the chamber (step 11). In this sequence, air (350 μL) was aspirated to promote the mixture into the flow-batch chamber (step 12) and 430 μL of the solution was dispensed to fill the chamber (step 13). After this step, the chamber was emptied by aspirating 1010 μL solution into the HC (step 14). After flow reversal the 2300 μL solution was thrown away (step 15). To return to the starting position, 1200 μL of CHCl_3 was aspirated into the syringe pump (carrier bottle) and then, the system was ready for the next analytical sequence (step 16).

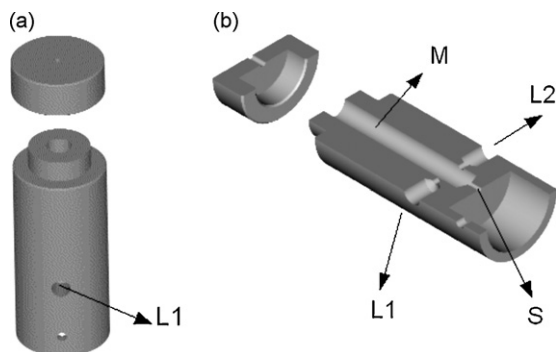
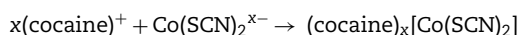


Fig. 2 – (a) Frontal and (b) transversal view of the flow-batch chamber made of Teflon®. S = solution inlet/outlet; M = mixture chamber cavity (51 mm long and 8 mm inner diameter); L1 = optical fiber that transmits the radiation beam from the light; L2 = optical fiber which carries the radiation beam to the charge-coupled device detector.

3. Results and discussion

3.1. Reaction between cocaine and cobalt thiocyanate

The reaction between cocaine and Co(SCN)_2^{2-} used in this work is based in the Scott test. The nitrogen of cocaine is protonated in acidic media, which facilitates the formation of the reaction product [21]. The chemical equation proposed is:



Cocaine dissolves well in chloroform providing a colorless solution, while Co(SCN)_2^{2-} dissolved in acid is pink and slightly soluble in chloroform. When Co(SCN)_2^{2-} is mixed with a cocaine solution in chloroform, the product's

Table 1 – Protocol sequence to determine cocaine in apprehended samples

Step	Three-way valve	6-ports valve	Pump	Volume (μL)	Description
0		Air	Off	0	Start
1		Air	Aspiration	500	
2		$\text{Co}(\text{SCN})_2$	Aspiration	200	Air bubble, reagent and sample sampling
3		Sample	Aspiration	400	
4	Flow system	Chamber	Dispensing	700	Sample/reagent addition in chamber
5		Chamber	Dispensing	460	Sample/reagent mixture with air bubbles
6		Chamber	Off	–	Analytical signal acquisition
7		Chamber	Aspiration	710	Chamber emptying
8		Waste	Dispensing	1840	Reaction products discharge
9	Carrier bottle	–	Aspiration	2000	Syringe filling with carrier solution
10		Water	Aspiration	300	
11		Chamber	Dispensing	900	
12	Flow system	Air	Aspiration	350	Chamber cleaning
13		Chamber	Dispensing	430	
14		Chamber	Aspiration	1010	Chamber emptying
15		Waste	Dispensing	2300	Cleaning mixture discharge
16	Carrier bottle	–	Aspiration	1200	Syringe filling to start position

((cocaine) $_x$ [Co(SCN) $_2$]) blue color becomes visible. The signal is measured in the lower layer (blue) that is the complex cocaine–thiocyanate partitioned into the organic phase. The excess of cobalt thiocyanate remains in the upper layer and the blue solution in the lower layer (see Fig. S3 in Supporting information).

3.2. Discussion

Initially a flow-batch chamber made of glass was used, but the results showed low sensitivity and poor repeatability, due to difficulties in chamber cleaning because the chloroform adhered to the glass walls. Aiming to overcome this drawback, a flow-batch chamber machined in Teflon[®] as indicated in Fig. 1 was then employed.

In the experimental set-up, illustrated in Fig. 2, sample solutions, reagents and air bubbles were inserted into the flow-batch chamber. The air bubbles were the means used to provide homogenization of the solutions in the flow-batch chamber.

The total volume of the solutions employed depends on the capacity of the flow-batch chamber and on the position (height) at which the optic fibers are coupled to chamber (see Fig. 2). The lower layer volume should be at least 250 μL , which is sufficient to fill the chamber above the orifices L1 and L2. It is convenient to use a small amount of chloroform to reduce the sample and toxic solvent consumption. Sample volumes

of less than 400 μL , however, do not guarantee that the lower layer will be above the fiber optics, resulting in inadequate precision. A volume of 400 μL per determination was selected as a compromise between practical requirements (lower layer above the fiber optic) and waste generation.

Based on the Scott test, the concentration of cobalt thiocyanate solution in the flow-chamber was 0.29 mol L^{-1} [19]. Different volumes of this solution were tested and the best analytical signal stability was obtained with 200 μL . Besides chloroform, other organic solvents, such as ethylic alcohol and acetone, were tested in cocaine solution preparations (samples and standards). The results showed that only those achieved using chloroform as extracting solvent presented an appropriated relationship between the signal and the cocaine concentration, and for this reason, it was selected.

3.3. Analytical figures of merit

Using the best operational conditions determined previously (volumes of 400 μL for sample and 200 μL for reagent solutions) additional experiments were performed in order to establish the linear dynamic range and detection limit. The analytical curve equation ($n=3$) was $\text{Abs} = (3.50 \times 10^{-4} \pm 7.90 \times 10^{-6}) \% \text{cocaine} + (0.0101 \pm 0.0048)$ with a correlation coefficient of 0.998. The limit of detection (LOD) was 29.4 mg L^{-1} and the quantification limit (LOQ) was 98 mg L^{-1} . The LOD and LOQ were estimated using the equations: $\text{LOD} = 3s_b/S$, and

Table 2 – Analytical parameters of cocaine determination using the reference method (GC–MS), the proposed flow-batch system and works described in Refs. [21–24]

Parameters	Reference method	Flow-batch system	Ref. [21]	Ref. [22]	Ref. [23]	Ref. [24]
Linear range (mg L^{-1})	^a	100–1000	3–30	6–100	50–850	0.06–3
R.S.D. (%) ^b	14.6	5.3	4.3	1.1	3.2	1.7
Sample consumption (μL)	5	400	150	120	^a	200
Throughput (h^{-1})	5	12	30	100	150	60

^a Not evaluated.

^b R.S.D.: relative standard deviation corresponding to 10 independent measurements of a solution containing 400 mg L^{-1} .

Table 3 – Cocaine concentration (wt%) in samples confiscated by Brazilian Federal Police obtained by the proposed procedure (SIA-FB) and the GC-MS reference method

Samples	SIA-FB (wt %)	GC-MS (wt %)
1	32.3 ± 2.6	30.1 ± 5.2
2	85.5 ± 7.7	79.4 ± 14.4
3	74.5 ± 11.3	74.5 ± 12.1
4	77.2 ± 7.0	80.8 ± 6.3
5	63.7 ± 1.7	64.6 ± 8.0
6	67.1 ± 11.8	65.1 ± 12.0

LOQ = $10s_b/S$, respectively, where S is the slope and s_b is the blank solution standard deviation ($n_b = 8$) [41]. The results obtained by the system were compared (Table 2) with those found using the reference method based on Gas Chromatography with Mass Spectrometry [40] and previously reported methods [21–24]. Relative standard deviation, R.S.D. (obtained using 10 replicates of a 400 mg L⁻¹ cocaine solution) for the reference method (14.6%) was 2.7 times higher than that found using the flow-batch system (5.3%). The sample consumption was 80 times higher for the flow-batch system (400 µL) than for the GC-MS method (5 µL) but only two times higher than the FIA using amperometric detection (200 µL) method. The sampling throughput, however, was 12 injections per hour, for the flow-batch system, which indicates that laboratory productivity would be enhanced by 2.5 times when compared with GC-MS method (5 h⁻¹). Comparing with methods using FIA [21–24], the proposed SIA-FB method is 2.5 to 12.5 times slower. These FIA procedures, however, are not fully automated and require the presence of the analyst to inject samples and reagents. The main drawbacks of the methods described in Refs. [21–24] are the use of relatively expensive equipments and more susceptible to noise (flame atomic absorption spectrophotometer and potentiostat). The SIA-FB method, on the other hand, performs similarly and can be carried out using cheaper equipment (visible spectrophotometer).

The performance of the flow-batch method in real sample analysis was evaluated using six cocaine samples confiscated by Federal Police which were assayed using both the proposed procedure and the reference GC-MS method [40]. The chromatogram of the cocaine in the presence of CHCl₃ can be seen in Fig. S4 in Supporting information. The results are presented in Table 3.

The data reported indicated the presence of cocaine concentrations between 32 and 85 wt% with a R.S.D. between 2.7 and 17.6% using the method under study, compared with 7.8–18.4% for the reference method. The R.S.D. values for the flow-batch and GC-MS methods were 10.4% and 15.2 %, respectively. It should be noted that reference method, GC-MS, was performed with manual injection. An automatic injector device would certainly improve the repeatability of these results. An assessment of the correlation of the results obtained using the proposed method with the values obtained using the reference procedure yields the equation $C_{SIA-FB} = 2.6 (\pm 5.9) + 0.97 (\pm 0.08)C_{GC-MS}$, $R^2 = 0.969$, which confirms the agreement between the procedures, since the ideal values of zero intercept and unit slope fall within the respective 95% confidence intervals.

4. Conclusions

The proposed methodology which combines SIA and flow-batch strategies using a detector (spectrometer with optic fiber) inserted in the flow-batch chamber showed robustness and versatility and offers several advantages over the reference method for routine analyses of cocaine samples (GC-MS), such as higher analytical frequency and lower cost. The extraction and detection in a biphasic medium are integrated in the same manifold and all operations can be controlled from the computer, providing simplicity and reliability to this system when compared to GC-MS. Considering the advantages presented, is feasible to employ this procedure for cocaine analysis in any police laboratory.

Acknowledgements

The authors thank the FINEP-CTPETRO and CAPES/PROCAD for financial support. Research fellowships granted by the Brazilian agency CNPq and CAPES is also gratefully acknowledged. Professor B. F. dos Reis is also kindly acknowledged for manuscript revision.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aca.2008.09.030.

REFERENCES

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2007. United Nations Publication, Vienna, Austria, 2007, 282 p.
- [2] E.T. Noggle, C.R. Clark, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65 (1982) 756.
- [3] N. De Giovanni, S.S. Rossi, J. Chromatogr. B 658 (1994) 69.
- [4] M. Balikova, J. Vecerkova, J. Chromatogr. B 656 (1994) 267.
- [5] T. Saito, H. Maseb, S. Takeichi, S. Inokuchi, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 358.
- [6] R. Cordero, S. Paterson, J. Chromatogr. B 850 (2007) 423.
- [7] A.M. Bermejo, P. López, I. Álvarez, M.J. Tabernero, P. Fernández, Forensic Sci. Int. 156 (2006) 2.
- [8] K.M. Clauwaert, J.F.V. Bocxlaer, W.E. Lambert, A.P.D. Leenheer, Forensic Sci. Int. 110 (2000) 157.
- [9] J.D. Burdick, R.L. Boni, F.W. Fochtman, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1167.
- [10] A.W. Jones, A. Holmgren, F.C. Kugelberg, Forensic Sci. Int. 177 (2008) 133.
- [11] A.D. Campiglia, T. Vo-Dinh, Anal. Chim. Acta 372 (1998) 349.
- [12] E. Cognard, S. Bouchonnet, C. Staub, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 925.
- [13] A. Hernandez, W. Andollo, W.L. Hearn, Forensic Sci. Int. 65 (1994) 149.
- [14] S.J. Dixon, R.G. Brereton, J.F. Carter, R. Sleeman, Anal. Chim. Acta 559 (2006) 54.
- [15] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, J. Moros, S. Garrigues, A. Pastor, M. Guardia, J. Chromatogr. A 1065 (2005) 321.
- [16] M. Nishikawa, K. Nakajima, M. Tatsuno, F. Kasuya, K. Igarashi, M. Fukui, H. Tsuchihashi, Forensic Sci. Int. 66 (1994) 149.

- [17] M.A. Huestis, J.M. Oyler, E.J. Cone, A.T. Wstadik, D. Schoendorfer, R.E. Joseph, J. Chromatogr. B 733 (1999) 247.
- [18] M.J. Kogan, D.J. Pierson, M.M. Durkin, N.J. Willson, J. Chromatogr. 490 (1989) 236.
- [19] L.J. Scott Jr., Microgram 6 (1973) 179.
- [20] Y. Tsumura, T. Mitome, S. Kimoto, Forensic Sci. Int. 155 (2005) 158.
- [21] M. Eisman, M. Gallego, M. Valcarcel, Anal. Chem. 64 (1992) 1509.
- [22] M. Eisman, M. Gallego, M. Valcarcel, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1993) 1117.
- [23] M. Eisman, M. Gallego, M. Valcarcel, J. Pharm. Biomed. Anal. 12 (1994) 179.
- [24] M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Anal. Chim. Acta 328 (1996) 67.
- [25] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- [26] C.X. Galhardo, J.C. Masini, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 39.
- [27] J.E. Silva, M.F. Pimentel, V.L. Silva, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, Anal. Chim. Acta 506 (2004) 197.
- [28] M.S.P. Silva, J.C. Masini, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 345.
- [29] A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, L. Kousalová, H. Sklenářová, P. Solich, R.P. Olmosc, Anal. Chim. Acta 505 (2004) 161.
- [30] O. Tue-Ngeun, R.C. Sandford, J. Jakmunee, K. Grudpan, I.D. McKelvie, P.J. Worsfold, Anal. Chim. Acta 554 (2005) 17.
- [31] M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 99.
- [32] J.A. Sweileh, P.K. Dasgupta, Anal. Chim. Acta 214 (1988) 107.
- [33] J.A. Sweileh, J.L. Lopes, P.K. Dasgupta, Rev. Sci. Instrum. 59 (1988) 2609.
- [34] R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.G. Zagatto, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 91.
- [35] J.M.T. Carneiro, A.C.B. Dias, E.A.G. Zagatto, R.S. Honorato, Anal. Chim. Acta 455 (2002) 327.
- [36] R.S. Honorato, J.M.T. Carneiro, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 441 (2001) 309.
- [37] L.F. Almeida, V.L. Martins, E.C. Silva, P.N.T. Moreira, M.C.U. Araújo, Anal. Chim. Acta 486 (2003) 143.
- [38] J.E. Silva, F.A. Silva, M.F. Pimentel, R.S. Honorato, V.L. Silva, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, Talanta 70 (2006) 522.
- [39] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.
- [40] United Nations, Recommended Methods for Testing Cocaine: Manual for Use by National Narcotics Laboratories, United Nations Division of Narcotic Drugs, New York, 1986.
- [41] Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, Analyst 112 (1987) 199.

Gunshot Residues: Screening Analysis by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy

Maria José Silva,^a Juliana Cortez,^b Celio Pasquini,^b Ricardo S. Honorato,^c
Ana Paula S. Paim^a and Maria Fernanda Pimentel^{*,d}

^aDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife-PE, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas-SP, Brazil

^cDepartamento da Polícia Federal, Superintendência Regional em Pernambuco, 50030-230 Recife-PE, Brazil

^dDepartamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521 Recife-PE, Brazil

A espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) foi avaliada para a detecção de resíduos de disparo de arma de fogo (GSR) nas mãos de um suspeito. Para desenvolver o procedimento, 114 amostras foram obtidas pressionando um pequeno pedaço de fita adesiva contra a região dorsal das mãos de não-atiradores, atiradores após o disparo e de atiradores após terem lavado as mãos com sabão e água. As fitas foram analisadas diretamente em um equipamento LIBS baseado em um policromador *echelle* com resolução temporal construído em laboratório. Os espectros foram obtidos a partir da aplicação de um único pulso de laser em 20 locações diferentes, espalhadas uniformemente sobre a superfície da fita, para assegurar uma amostragem eficiente na detecção de resíduos de disparo. Os espectros mostram uma assinatura com linhas de emissão características de bário e chumbo. Quando os dados espectrais foram submetidos à técnica de reconhecimento de padrão SIMCA (Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe), atiradores e não-atiradores foram corretamente classificados. O método baseado em LIBS e SIMCA demonstrou ser não-destrutivo da evidência do crime e permitiu discriminar as amostras coletadas de voluntários não-atiradores e atiradores, mesmo após a lavagem das mãos.

Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) is further developed for the detection of gunshot residue (GSR) on the hands of a suspected shooter. To develop the procedure, 114 samples were obtained by pressing a small piece of adhesive tape against the dorsal region of the hands of non-shooters, of shooters just after firing a weapon, and of shooters after washing their hands with soap and water. The tapes were analyzed directly in a time-resolved *echelle* based LIBS system, assembled in the laboratory, and 20 single laser pulses, spread uniformly on the tape surface, were shown to be enough to ensure the detection of true positives. The spectra obtained by LIBS from the tape present a signature with emission lines that are attributed to barium and lead. After the spectral data was submitted to a pattern recognition method SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), shooters and non-shooters were correctly classified. The method based on LIBS and SIMCA has been demonstrated to be non-destructive of crime evidence and enabled discrimination between the samples collected from non-shooter volunteers and shooter volunteers before and after washing their hands.

Keywords: laser-induced breakdown spectroscopy, gunshot residues, SIMCA, screening analysis, LIBS

Introduction

Gunshot residues (GSR) evidence has been considered essential during recent decades in forensic science as it makes it possible to determine if a suspect has fired, been in crime location or come into contact with a firearm.

Despite the recent advances in the production of the so called clean ammunitions and well sealed guns, the use of cheap and widespread standard fire arms and propulsive charge remains associated with the majority of hand-armed crimes.¹ At the moment of shooting an assortment of vapors and inorganic particles of residues resulting from the burnt and unburnt particles from the propulsive charge, primer, lubricant, bullet jacket, bullet, cartridge case and gun barrel

*e-mail: mfp@ufpe.br

are expelled.² It is now common knowledge that these residues are mainly composed of lead (from the initiator), barium (from the oxidant), and antimony and lead (from the fuel), when common ammunition is employed. In addition to these predominant elements (Sb, Ba and Pb), shot residues can also contain trace amounts of Cu, Si, Al, Fe, S, P (rare), K, Cl, Mg, Zn (if Cu is also present) and Ni (rare and only together with Cu and Zn).^{1,3,4}

Gunshot residues (GSR) are formed from a mixture of partially molten and vaporized bullet and primer materials, produced under the specific conditions of high temperature (1500-2000 °C) and pressure (10⁴ kPa) after the detonation of the primer mixture, which occurs within ten thousandth of a second. These “specific” conditions contribute to rapid condensation of GSR particles in their characteristic surface morphology, as also in their inner distribution of Pb, Sb and Ba. Due to cohesive intermolecular forces, these particles are predominantly spherical in shape, ranging in size from 1 to 10 µm.^{5,6} The type of ammunition may have influence on the amount of residue formed, on its composition and dispersion and deposition on the shooter body and clothes.⁶

Part of the residues produced can be found on the back of the hand, face, hair, and clothing of the shooter and on nearby objects. Normally, only trace amounts are deposited, but these could be sufficient to determine if an individual has recently discharged a weapon. Generally there is a greater quantity of these elements on the hand just after a handgun has been fired. The amount of these elements on the hands of a shooter depends, however, on several factors: the type of the weapon, the munitions used, the age and condition of the weapon, the suspect's personal hygiene, the time elapsed since the firing, the environment and the routine occupational habits of the shooter.⁶ This is a delicate question, however, because of the possibility of incriminating innocent people in criminal occurrences. With respect to this, studies have confirmed that, in the majority of cases, people with automobile-related jobs such as mechanics (batteries, motors, tyres), automotive electricians, users of cartridge-operated industrial tools, and people who work with fireworks have been shown to have higher levels of Ba, Pb and Sb on their hands, which, in some cases, may cause “false-positive” results.^{2,3,7,8} For criminal justice, however, evidence of gunshot residue is only taken into consideration when “unique” GSR particles with the following elemental compositions: (1) Pb-Ba-Sb, (2) Sb-Ba or (3) Pb-Ba-Ca-Si-Sn are found.

Chemical tests, based on color reactions to identify suspects at crime scenes, such as the “dermal nitrate test”,⁹ Griess reagent¹⁰ and sodium rhodizonate,¹¹ but due to numerous incidences of false positive results these tests were abandoned by forensic scientists. Nowadays,

the investigation of gunshot residue particles in forensic laboratories is usually performed by scanning electron microscopy-energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS),^{12,13} using the tape-lift method for sample collection.¹⁴⁻¹⁷ SEM-EDS has been used to carry out concurrent analysis of both elemental composition and morphology of single particles. The main disadvantage of SEM-EDS, however, is the excessive time required to search and locate the particles on a large area of a tape-lift. Moreover, this technique is expensive and only available in a limited number of Police Crime Laboratories.

Several others techniques have also been evaluated to determine elements in gunshot residues collected from a specific area of a hand, each exhibiting advantages and drawbacks, such as neutron activation analysis (NAA),¹⁸ flame atomic absorption spectrometry (FAAS),¹⁹ graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS),²⁰ anodic stripping voltammetry (ASV),²¹ differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV),²² proton-induced X-ray emission (PIXE),²³ inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS),^{24,25} inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICPOES),²⁶ photoluminescence spectroscopy²⁷ and fluorescence microscopy.²⁸

Due to the need for a rapid and sensitive method at low cost, there has been great interest in alternative methods capable of furnishing simultaneous elemental analysis of higher specificity for gunshot residue. Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) appears an attractive tool for screening analyses that can be used to determine whether or not a person has discharged a firearm.

LIBS provides some advantages over traditional methods of elemental analysis, such as rapid measurement, sufficient detectability, and the possibility for non-destructive simultaneous multi-element analysis. Moreover, it is a relatively simple method and little or no sample preparation is required. The technique utilizes a pulsed laser focused on a small spot of the sample surface.²⁹ The high fluence (energy *per area*) produces vaporization of a tiny quantity of the sample constituents, the formation of a plasma of high temperature capable of atomizing and/or ionizing most of the chemical elements present in the sample, which are excited to higher electronic energy levels. After a strong initial intense continuous, the emitted light generated from relaxation of the excited atoms and ions, is measured at specific wavelengths. The emitted radiation is collected by a lens or fiber optics, dispersed into its wavelengths and measured by a detector. In recent years, the technique has been used for a wide variety of purposes (e.g., environmental monitoring, industrial process control and analysis of explosives, plant materials, geochemical and archaeological samples, etc.).³⁰⁻³⁷

Despite extensive use of LIBS, only three works can be found in the specialized literature reporting on its use in forensic elemental analysis to identify GSR.¹⁴⁻¹⁶ Dockery and Goode showed the potential of the LIBS method to identify trace amounts of gunshot residue (mainly Ba and Pb) on the hands of a suspected shooter.¹⁵ They employed, during the test firing, 6 shooters, obtaining 42 possible positive tests and also 20 blanks. Only one type of weapon and ammunition was employed, limiting the sources of variability associated with the amount of GSR. All spectra consisted of the emission observed from one laser pulse. The sampling tape was probed by the laser in 20 locations and a “maximum spectrum” created, consisting of the largest observed signal found at each wavelength in any of the 20 individual spectra obtained from the sample. The error rates associated with LIBS identification of a subject who fired one shot were evaluated by Monte Carlo simulation techniques, and criteria were proposed for defining positive or negative test result.¹⁵ In a more recent work, the same group investigated the lifetime of detectable amounts of gunshot residue on the hands of a shooter.¹⁶ The authors used the univariate approach based only on the barium emission line at 455.403 nm. Statistically significant results, positive for GSR, were found 5.27 days after a firearm discharge.

The present work reports the results of a broad investigation on the application of LIBS to detect GSR on the hands of a suspected shooter. For instance, different types of cartridges and ammunition, fired using two types of weapons were employed. SIMCA was applied to the spectral data in order to classify samples as produced by shooters and nonshooters. In addition, the non-destructive characteristic of the LIBS protocol for GSR detection regarding the preservation of the crime evidence is demonstrated.

Experimental

Ammunition and firearms

A sequence of 51 tests of shots was carried out using 9 volunteers, on different occasions, at the Shooting Association of Recife. In each occasion, the number of shots varied from 1 to 5 consecutive detonations. Cartridges with extension jacketed, semi-jacketed and unjacketed projectiles and twelve types of the ammunition (original and rechargeable) with a 9 mm Luger, a .380 AUTO, a .38 SPL and a .357 Magnum fire guns were used. The majority of the ammunition used was produced by CBC (Brazilian Cartridge Company), and only one type was manufactured by FCC (Federal Cartridge Company) and WCC (Western Cartridge Company) both from the USA.

Collection of sample and shot tests

The collection of samples was carried out using an adhesive tape (3M Scotch), which was later adhered to a plastic frame (used for projection slides), with external dimensions of 50 × 50 mm and internal dimension of 23 × 35 mm, as shown in Figure 1. Tapes of two different widths (25 mm and 45 mm) were employed. Nine volunteers were used to make shots on different occasions and 97 samples were collected from their hands. The collection procedure for each sample consisted in pressing and removing the same tape piece 10 times each on the dorsal region of both right and left hand of the volunteer. Samples (S) were collected after each session of shots. In order to investigate the permanence of the residues, samples were also collected after the volunteers had washed their hands with soap and water (W). For preliminary evaluation of the persistence of gunshot residue over time, 2 samples were collected after 16 h of firing 1 or 2 shots. To avoid contamination of GSR, the weapons used were carefully cleaned between uses. For 6 samples, instead of adhesive tape, a liquid polymeric resin, composed of alginate, was used.³⁸ A swab was used to spread the resin over the dorsal region of the volunteers' hands, which were then covered with gauze until completely dry. Then, the resin was removed from the hands of the volunteer. Samples were also collected from the hands of 15 volunteers who had never shot a weapon and had not participated in the shooting sessions (N). Three additional samples were taken from the hands of a automobile brake repair workers, in order to investigate possible false positive results of GSR.

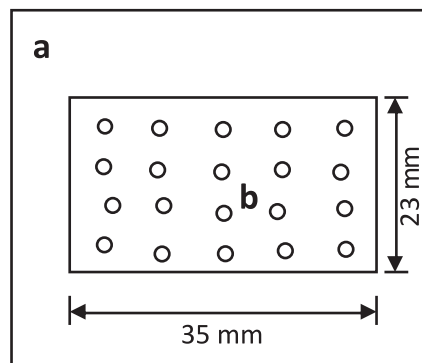


Figure 1. Schematic of a framed sample of adhesive tape showing a typical distribution of the 20 laser shots employed for GSR detection. (a) Plastic frame; (b) adhesive tape.

Instrumentation and detection of GSR

A schematic diagram of the LIBS instrument, assembled in Instituto de Química-UNICAMP, can be found in Pontes *et al.*³⁹ A pulsed Q-switched Nd:YAG laser (Brio-Quantel) (20 Hz, 110 mJ/pulse and pulse duration

of 5.5 ns at FWHM) was employed. The laser pulse was reflected at 45° by a dichroic mirror and sent to a biconvex lens of 10 cm focal length, which focused the laser on the surface of the adhesive tape. The nominal irradiance of the system is around $1.5 \times 10^{10} \text{ Wcm}^{-2}$. The focal point was set 6 mm below the sample surface to minimize breakdown over the sample. The radiation emitted by the plasma was collected by a quartz biconvex lens, with a focal length of 30 mm, coupled to an optical fiber of 50 μm diameter (Ceram Optec), which delivers it to an echelle spectrometer (Mechelle 5000, Andor Tehnology) for detection by an ICCD camera (iStar DH734, Andor Technology). The emission signals for Ba, Pb and Sb were identified using the NIST Atomic Spectra.⁴⁰

The spectra were displayed and analyzed using the software Andor iStar versão 4.1.0.0 12C. To avoid the effect of the high background intensity of continuum emission, a delay of 3 μs was employed before detection was started. The emission spectra resulted from 30 μs integration of the emitted radiation after the initial delay.

For the scanning electron microscopy energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) analysis, a model JEOL JSM-6360 instrument was used

Sampling procedure

The exposed area of the adhesive tape or resin was probed by firing 20 single laser shots distributed more or less equidistantly as shown in Figure 1. Following sampling of the first pulse and the acquisition of the emission spectrum, 5 dummy pulses were fired in the same location in order to mark the sampled spot in a way that it could be recognized by the naked eye. This procedure avoids that the same location of the tape might be probed again in a further test by LIBS or by a complementary technique such as SEM-EDS.

Two samples, collected from the hands of a gun-shooter, earlier measured by LIBS, as described above, were re-sampled by firing two additional sets of 20 laser shots in between the spots previously sampled. The two additional sets of spectra were employed to verify if the tape samples are preserved for further analysis, after being firstly probed by LIBS.

One sample was also analyzed using SEM-EDS, in accordance with ASTM 1588-95 (Analysis of GSR by scanning electron microscopy energy-dispersive X-ray spectroscopy).

SIMCA

SIMCA is a well-known tool in multivariate data analysis for supervised pattern recognition, based on principal

component analysis (PCA).^{41,42} PCA can simplify data by reducing the number of variables into a smaller number of orthogonal variables, which are linear combinations of the original variables (wavelength) and maximize the variability contained within them, thereby displaying most of the original variability in a smaller number of dimensions. SIMCA modeling consists in building one PCA model for each class, which describes the structure of that class as well as possible. The modeling stage needs enough samples as members of each class to be able to build a reliable model. It also requires enough variables to describe the samples accurately. The actual classification stage uses significance tests, where the decisions are based on statistical tests performed on the object-to-model distances. SIMCA was mainly employed to verify the possibility of distinguishing samples collected from the hands of those volunteers who had fired a gun (S) or had fired a gun and had washed their hands (W), or had not fired a gun for at least one week before sample collection named here as non-shooters (N).

In the modeling stage was employed a training set containing samples collected from the hands of those volunteers who had fired a gun (S) plus samples collected from the hands of those who had fired a gun and had washed their hands (W), totalizing 64 samples (Table 1). Just one class was modeled, named here as shooter class. The optimal number of PCs was chosen using full-cross validation. The external validation set was composed by 49 samples, as described in Table 1.

Table 1. Training and external validation set description

Samples description	Number of samples	
	Training set	Validation set
Samples collected from the hands of:		
(S) shooters	35	15
(W) shooters after they had washed their hands	29	14
(W) shooters after 16 h from shooting a gun	-	2
(M) mechanic	-	3
(N) volunteers who had not fired a gun at least one week before sample collection	-	15

The data matrix was composed of the average spectra (average of the spectra obtained from 20 locations, for each sample). Five spectral regions (405.4219 to 406.5749 nm; 454.3076 to 456.1812 nm; 492.5487 to 494.1394 nm; 612.8567 to 614.9184 nm; and 649.2721 to 651.0392 nm) have been selected in order to produce a data set (containing 264 variables) which includes the strongest emission peaks of Ba and Pb (according with NIST) and a surround portion

of the background signal, close to each peak. No background correction was found to be necessary. Spectral regions for Sb were not employed because the signal for this element was too low for most of the samples. After this selection, the resultant spectra were normalized by the maximum intensity.

Results and Discussion

Figure 2 shows a typical average LIBS emission spectrum obtained from the hands of a volunteer who had not fired a gun within at least one week before sampling (blank or non-shooter). Predominant emission lines are attributed to Ca, Na and K. Emission lines of Ba, Pb and Sb were not observed.

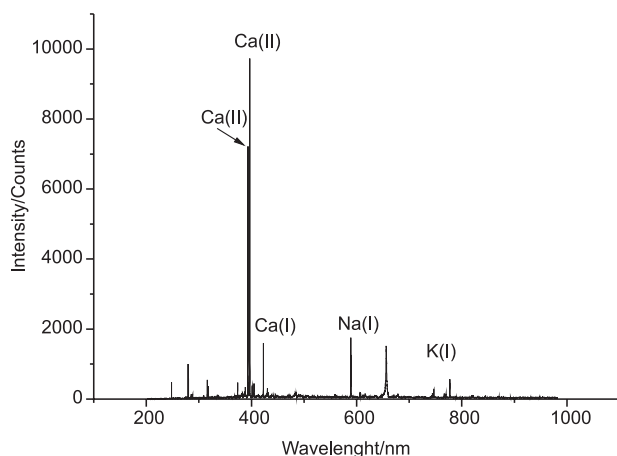


Figure 2. Representative average emission spectrum from a sample collected from the hands of a volunteer who had not fired a gun within 48 h before sampling. Predominant emission lines were attributed to Ca (I) 422.67 nm, Ca (II) 393.36 nm, Ca (II) 396.85 nm, Na (I) 588.99 nm and K (I) 769.89 nm.

A typical average spectrum of a sample collected from the hands of a volunteer after firing five shots (using a .380 AUTO pistol and cartridge manufactured by CBC) is presented in Figure 3a. The predominant lines of Ba and Pb, which are typically present in GSR, can be observed.

A sample collected from the hands of the same volunteer after he had washed his hands with soap and water is shown in Figure 3b. Emission lines of Ca and Na are present again, but intense emission lines from Ba and Pb, typical of GSR, were still observed.

Samples collected using the polymeric resin showed spectra similar to those presented in Figure 3, which demonstrates that this procedure is as efficient as the tape-lift method for removing the GSR from the hands of a shooter. The drawback of the resin based protocol is the time required for polymerization (about 20 min) and its very irregular morphology which makes analysis more difficult.

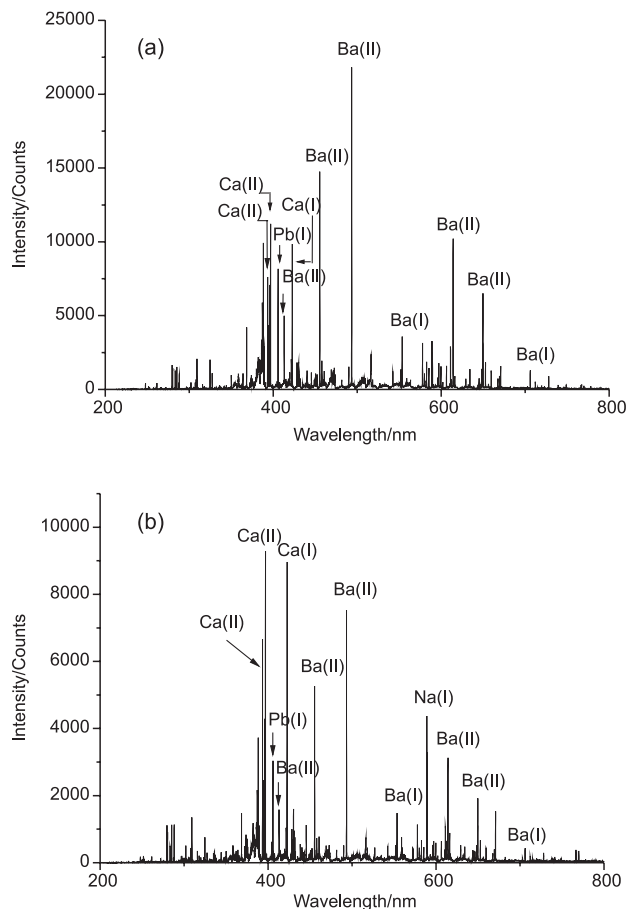


Figure 3. (a) Representative average emission spectrum of a positive GSR test. Predominant emission lines were attributed to Ba (II) 413.06 nm, Ba (II) 455.40 nm, Ba (II) 493.40 nm, Ba (I) 553.54 nm, Ba (II) 614.17 nm, Ba (II) 649.69 nm, Ba (I) 705.99 nm and Pb (I) 405.75 nm. (b) Representative average emission spectrum of a sample collected from a volunteer after having fired five shots and then washed his hands with soap and water. Predominant emission lines were attributed mainly to Ca (I) 422.67 nm, Ca (II) 393.36 nm, Ca (II) 396.85 nm, Ba (II) 413.06 nm, Ba (II) 455.40 nm, Ba (II) 493.40 nm, Ba (I) 553.54 nm, Ba (II) 614.17 nm, Ba (II) 649.69 nm, Ba (I) 705.99 nm and Pb (I) 405.75 nm.

The sample whose spectrum is presented in Figure 3a was analyzed using SEM-EDS (Figure 4). The scanning was carried out on the surface of the sample and the chemical composition of the particles found, showing a consistent morphology with GSR, was determined. Lines of the three elements Pb, Ba and Sb in a single residual particle were observed.

The results found in the present study are in accordance with an early work on the same subject.¹⁴ On the other hand, the efficiency of the LIBS technique was effectively evaluated by extending the study to the GSR generated by different types of guns and ammunitions. Also, the efficiency of the sampling protocol and other potential influential factors (such as washing hands) were evaluated. In addition, the results found in the present investigation are in accordance with Rosenberg and Dockry,¹⁶ and even

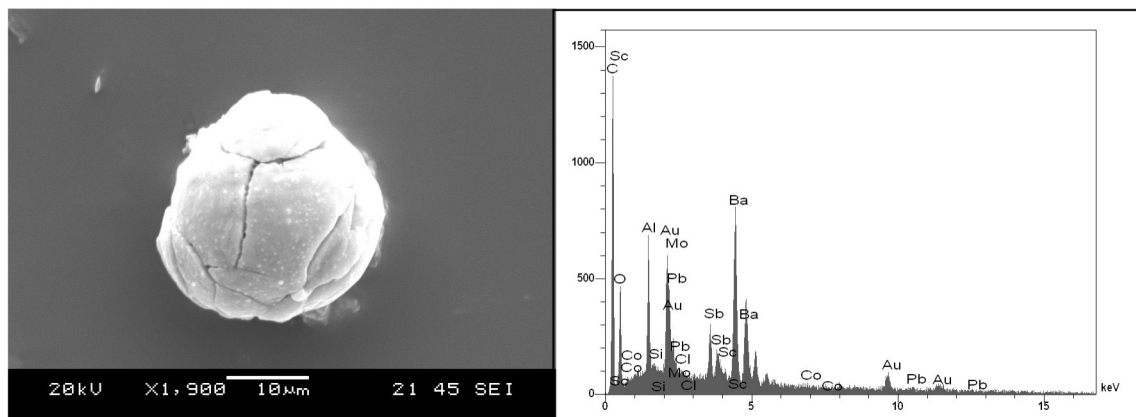


Figure 4. SEM image and EDS spectrum of an "unique" GSR particle.

16 h after firing, it is possible to identify typical emission spectra from GSR on the hands of shooters.

It is known that some professional activities can induce false-positive results for GSR. This aspect was evaluated collecting samples from the hands of a mechanic, who works specifically with automobile brake pads. Representative average emission spectra are shown in Figure 5. In Figure 5a, Ca and Ba lines are predominant. After washing the hands with water and soap (Figure 5b), intense Ba and Pb lines are still present.

SIMCA classification was carried out on the LIBS spectral data. Figure 6 shows the relative distance from the validation samples (Si/S0) versus leverage plot (Hi). The sample-to-model distance (Si) is a measure of how far the sample lies from the modeled class. It is computed as the square root of the sample residual variance. It can be compared to the overall variation of the class (referred as S0), and this is the basis of the statistical criterion used to decide whether a new sample can be classified as a member of the class or not. The sample leverage is a measure of how far the projection of a sample onto the model is from the class center, *i.e.* it expresses how different the sample is from the other class members, regardless of how well it can be described by the class model. This plot includes the class membership limits for both measures. Samples which fall within both limits for a particular class are said to belong to that class. The level of the limits is governed by the significance level used in the classification. In this work the level was 5%.

It can be seen that all samples collected from the hands of who had fired a gun was correctly classified, even if they had washed their hands. The samples collected from the hands of the 2 volunteers 16 h after firing a gun were also correctly classified. No false negative results were found. One of the 3 samples collected from the hands of a volunteer who works with automobile brake pads were also included in the shooter class, confirming the

problem of false-positives results. Two samples, however, were not classified as shooters. These two samples fall

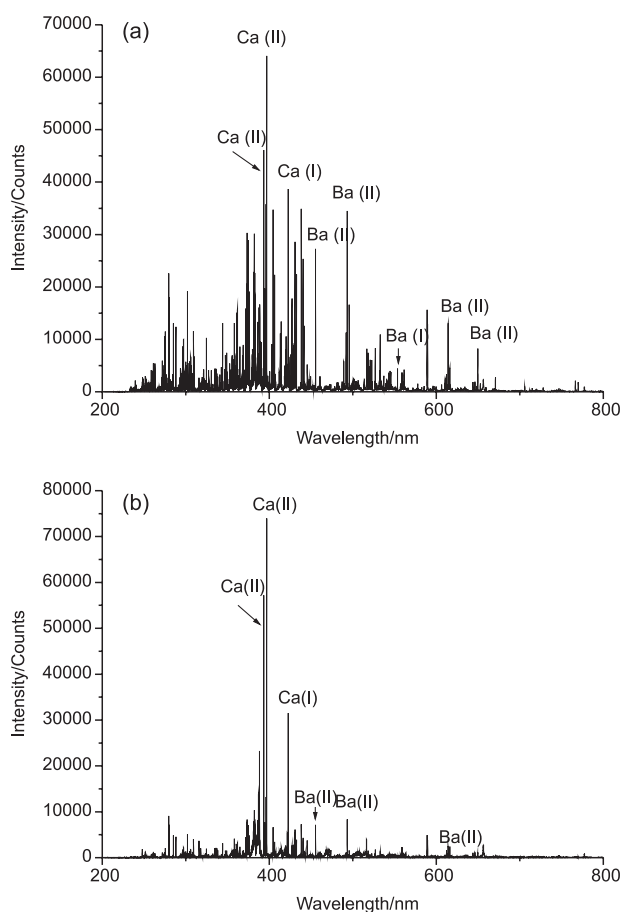


Figure 5. (a) Average emission spectrum of a sample collected from the hands of a volunteer, who works with automobile brake pad. Predominant emission lines were attributed mainly to Ba (II) 455.40 nm, Ba (II) 493.40 nm, Ba (I) 553.54 nm, Ba (II) 614.17 nm, Ba (II) 649.69 nm, Ca (I) 422.67 nm, Ca (II) 393.36 nm, Ca (II) 396.85 nm. (b) Representative average emission spectrum of a sample collected from the hands of a volunteer, who works with automobile brake pads, after washing his hands with soap and water. Predominant emission lines were attributed mainly to Ca (I) 422.67 nm, Ca (II) 393.36 nm, Ca (II) 396.85 nm, Ba (II) 455.40 nm, Ba (II) 493.40 nm and Ba (II) 614.17 nm.

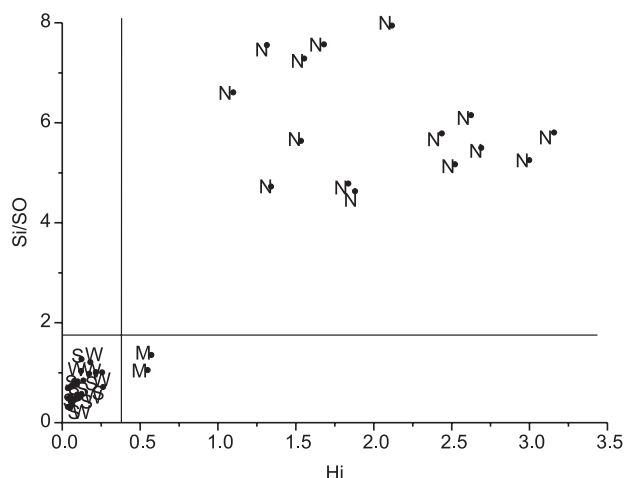


Figure 6. Plot of the relative distance from the validation samples (Si/S_0) versus their leverage (Hi). N, samples collected from the hands of nonshooters; S, samples collected from the hands of shooters; W, samples collected from the hands of shooters who had washed their hands; and M, sample collected from the hands of a mechanic who works with brake repair.

out of the class leverage limit, probably due to different ratio between the intensities of the spectral lines of the elements associated with GSR. All samples collected from the hands of who had not fired a gun were not classified as shooters.

GSR is composed by well defined tiny spherical particles. The number of particles sampled from the hands of a shooter should depend on the number of shots fired. However, the analytical signal is composed only by the laser shots which reach a particle of GSR. In this work was demonstrated that 20 laser shots will take to a 100% correct detection of a true-positive sample. The signal intensity is consequence of statistically defined number of laser shots reaching the GSR. Therefore, there is a reasonable probability to attain an analytical signal for a sample collected after one gun shot that is stronger than a signal obtained after 5 gun shots, for instance. This was in fact observed in some cases in the development of this work.

These results demonstrate that is possible to classify shooters and non-shooters (even after hand washing). The problem of possible false-positive results due to the type of professional activity is also confirmed. However, LIBS can be proposed as a screening analysis method for identification of GSR. Only samples classified in the shooter group would be then submitted, for instance, to the more expensive and slower SEM-EDS analysis. In this case it is important to guarantee that the method would not give false negative results.

Another relevant aspect of any GSR screening technique is related to the preservation of the crime evidence. Of course, the use of LIBS for identification of the elements

associated with GSR causes the vaporization and removal of the GSR particles from the sample spot irradiated by the laser pulse. However, the 20 pulses employed in the present study, considered of to be enough to efficiently detect all the true-positive cases, leave the sampling tape with a large non-probed area. This area can be used for additional screening (see Figure 1), via a counter-proof assay made by LIBS or another analytical technique. The additional screening analysis (2 for each 2 samples) showed the presence of GSR and the samples were again properly classified as being collected from the hands of shooters.

Conclusions

Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) was found to be very efficient for detection of gunshot residues (GSR) common ammunition on the hands of a suspected shooter.

The spectra obtained presented a clear signature with emission lines attributed mainly to barium and lead. A SIMCA classification using the spectral data showed that is possible to discriminate the samples collected from volunteers who had not fired a gun from those who fired a gun, even after washing their hands with soap. The false positive problem was also confirmed, but no false negative result was found. Thus, the methodology proposed in this work could be used as a screening analysis for GSR.

Although the LIBS screening procedure proposed can not be considered strictly non-destructive, the evidence is preserved due the micro-analytical capability of the technique. This allows for additional tests to be performed on the same sample after a first LIBS result indicates the presence of GSR. Additional tests can be performed by using LIBS again or another approved technique.

The efficiency and accuracy of the technique could be further improved by coupling the LIBS system to an optical microscope to locate and characterize the typical shape of the GSR particles while orienting the focusing spot of the laser pulse on such particles. Then, unequivocal information regarding particle shape and its chemical composition could be employed, in a complementary way, to ensure better accuracy for GSR detection and possibly excluding some false-positives detected by the method.

Further studies may reveal the potentiality of LIBS for detection of GSR produced by clean ammunition by searching for fingerprints associated with the ratios of the intensities of elements associated with the residue of the organic compounds employed as primers (mainly C, O, N). However, the sampling protocol and sampling material substrate to collect the GSR from the shooter hands need to be developed before.

Acknowledgments

Authors are grateful to CAPES/PROCAD, CNPq, INCTAA and FAPESP for financial support. Professor C. H. Collins is also kindly acknowledged for manuscript revision. CP is grateful to FAPESP for financial support for the LIBS system.

References

1. Martiny, A.; Campos, A. P. C.; Sader, M. S.; Pinto, M. A. L.; *Forensic Sci. Int.* **2008**, *177*, 9.
2. Romolo, F. S.; Margot, P.; *Forensic Sci. Int.* **2001**, *119*, 195.
3. Wolten, G. M.; Nesbitt, R. S.; Calloway, A. R.; Loper, G. L.; Jones, P. F.; *J. Forensic Sci.* **1979**, *24*, 409.
4. Brozek-Mucha, Z.; *X-Ray Spectrom.* **2007**, *36*, 398.
5. Zeichner, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1178.
6. Meng, H. H.; Caddy, B.; *J. Forensic Sci.* **1997**, *42*, 553.
7. Wolten, G. M.; Nesbitt, D. S.; Calloway, A. R.; Loper, G. L.; *J. Forensic Sci.* **1979**, *24*, 423.
8. Garofano, L.; Capra, M.; Ferrari, F.; Bizzaro, G. P.; Di Tullio, D.; Dell'Olio, M.; Ghitti, A.; *Forensic Sci. Int.* **1999**, *103*, 1.
9. Heard, B. J.; *Handbook of Firearms and Ballistics: Examining and Interpreting Forensic Evidence*, Wiley: Chichester, 1997.
10. Steinberg, M.; Leist, Y.; Goldschmidt, P.; Tassa, M.; *J. Forensic Sci.* **1984**, *29*, 464.
11. Tugcu, H.; Yorulmaz, C.; Karslioglu, Y.; Uner, H. B.; Koc, S.; Ozdemir, C.; Ozaslan, A.; Celasun, B.; *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **2006**, *27*, 296.
12. Germani, M. S.; *J. Forensic Sci.* **1991**, *36*, 331.
13. Cardinetti, B.; Ciampini, C.; D'Onofrio, C.; Orlando, G.; Gravina, L.; Ferrari, F.; Di Tullio, D.; Torresi, L.; *Forensic Sci. Int.* **2004**, *143*, 1.
14. Goode, S. R.; Dockery, C. R.; Bachmeyer, M. F.; Nieuwlan, D. A. A.; Morgan, S. L.; *Trends Opt. Photonics* **2002**, *81*, 175.
15. Dockery, C. R.; Goode, S. R.; *Appl. Opt.* **2003**, *42*, 6153.
16. Rosenberg, M. B.; Dockery, C. R.; *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 1238.
17. Zeichner, A.; *J. Forensic Sci.* **2001**, *46*, 1447.
18. Capannesi, G.; Ciavola, C.; Sedda, A. F.; *Forensic Sci. Int.* **1993**, *61*, 75.
19. Koons, R. D.; Havekost, D. G.; Peters, C. A.; *J. Forensic Sci.* **1987**, *32*, 846.
20. Dahl, D. B.; Lott, P. F.; *Microchem. J.* **1987**, *35*, 347.
21. Briner, R. C.; Chouchoiy, S.; Webster, R. W.; Popham, R. E.; *Anal. Chim. Acta* **1985**, *172*, 31.
22. Woolever, A. C.; Dewald, H. D.; *Forensic Sci. Int.* **2001**, *117*, 185.
23. Warren, M. W.; Falsetti, A. B.; Kravchenko, I. I.; Dunnam, F. E.; Van Rinsvelt, H. A.; Maples, W. R.; *Forensic Sci. Int.* **2002**, *125*, 37.
24. Sarkis, J. E. S.; Negrini Neto, O.; Viebig, S.; Durrant, S. F.; *Forensic Sci. Int.* **2007**, *172*, 63.
25. Steffen, S.; Otto, M.; Niewoehner, L.; Barth, M.; Brozek-Mucha, Z.; Biegstraaten, J.; Horváth, R.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2007**, *62*, 1028.
26. Molina, D. K.; Martinez, M.; Garcia, J.; DiMaio, V. J. M.; *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **2007**, *28*, 191.
27. Jones, P. F.; Nesbitt, R. S.; *J. Forensic Sci.* **1975**, *20*, 231.
28. Bird, D. K.; Agg, K. M.; Barnett, N. W.; Smith, T. A.; Trevor, A.; *J. Microscopy* **2007**, *226*, 18.
29. Song, K.; Lee, Y.; Sneddon, J. In *Advances in Atomic Spectroscopy-Vol. 7*; Sneddon, J., ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2002, ch. 6.
30. Trevizan, L. C.; Santos, D.; Samad, R. E.; Vieira, J. N. D.; Nomura, C. S.; Nunes, L. C.; Rufini, I. A.; Krug, F. J.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2008**, *63*, 1151.
31. Lee, W. B.; Wu, J. Y.; Lee, Y.; Sneddon, J.; *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *39*, 27.
32. Pasquini, C.; Cortez, J.; Silva, L. M. C.; Gonzaga, F. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 463.
33. Winefordner, J. D.; Gornushkin, I. B.; Correll, T.; Gibb, E.; Smith, B. W.; Omenetto, N.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1061.
34. Anzano, J. M.; Villoria, M. A.; Ruíz-Medina, A.; Lasheras R. J.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *575*, 230.
35. Fortes, F. J.; Cortés, M.; Simón, M. D.; Cabalín, L. M.; Laserna, J. J.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 136.
36. Moreno, C. L.; Palanco, S.; Laserna, J. J.; DeLucia, J. F.; Miziolek, A. W.; Rose, J.; Walters, R. A.; Whitehouse, A. I.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21*, 55.
37. Harmon, R. S.; DeLucia, F. C.; McManus, C. E.; McMillan, N. J.; Jenkins, T. F.; Walsh, M. E.; Miziolek, A.; *Appl. Geochem.* **2006**, *21*, 730.
38. http://peritocriminal.net/mambo/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=175, accessed in June 2006.
39. Pontes, M. J. C.; Cortez, J.; Galvão, R. K. H.; Pasquini, C.; Araújo, M. C. U.; Coelho, R. M.; Chiba, M. K.; Abreu, M. F.; Madari, B. E.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *642*, 12.
40. NIST Atomic Spectra Database, http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html, accessed in October 2008.
41. Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T.; *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications: Chichester, 2002.
42. Martens, H.; Russwurm, J. H.; *Food Research and Data analysis*, Applied Science Publishers: London, 1982.

Received: April 29, 2009

Web Release Date: November 12, 2009

FAPESP helped in meeting the publication costs of this article.



Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion

Maria José da Silva^{a,b}, Ana Paula S. Paim^b, Maria Fernanda Pimentel^c,
M. Luisa Cervera^{a,*}, Miguel de la Guardia^a

^a Department of Analytical Chemistry, Edificio de Investigación, University of Valencia, 50 Dr. Moliner Street, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-550 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2010

Received in revised form 30 March 2010

Accepted 7 April 2010

Available online 14 April 2010

Keywords:

Cold vapor

Atomic fluorescence spectrometry

Mercury

Microwave digestion

Rice

ABSTRACT

A cold vapor atomic fluorescence spectrometry method (CV-AFS) has been developed for the determination of Hg in rice samples at a few ng g^{-1} concentration level. The method is based on the previous digestion of samples in a microwave oven with HNO_3 and H_2O_2 followed by dilution with water containing KBr/KBrO_3 and hydroxylamine and reduction with SnCl_2 in HCl using external calibration. The matrix interferences and the effect of nitrogen oxide vapors have been evaluated and the method validated using a certified reference material. The limit of detection of the method was 0.9 ng g^{-1} with a recovery percentage of $95 \pm 4\%$ at an added concentration of 5 ng g^{-1} . The concentration level of Hg found in 24 natural rice samples from different origin ranged between 1.3 and 7.8 ng g^{-1} .

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury has been widely recognized as a highly dangerous element and potentially toxic and, due to its accumulative and persistent behaviour, it may contaminate the environment and soils [1]. One of the main sources of mercury for humans are foods, Hg is bioaccumulated and biomagnified, especially in rice, an important component of the diet in different countries. Low concentration exposure to mercury represents a potential hazard to human health and produces adverse effects on cardiovascular, gastrointestinal and reproductive systems [2]. The joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [3] has established a provisional tolerable weekly intake for total Hg of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight, or $43 \mu\text{g}$ per day for an individual weighing 60 kg. Thus, in recent years it has been growing interest in the determination of mercury at very low trace levels in food samples, in order to correctly calculate the Hg intake. However due the extremely low levels of mercury in various matrices, highly sensitive and sophisticated analytical methods are required for the monitoring of food samples.

Studies of the estimation of the Hg daily intake reported by Llobet et al. [4] highlighted that cereals was the food group showing the highest contribution to Hg intake in children and adolescents,

in the same way, Lee et al. [5] reported that cooked rice was the most important contributor to mercury intake because the contribution of foods to total heavy metal intake was more influenced by the amount of food consumed.

A considerable number of methods have been reported for the determination of mercury in different matrices [6–9], but few of them have been applied to rice sample analysis. Electrothermal vaporization inductively coupled plasma-mass spectrometry [10], electrothermal atomic absorption spectrometry coupled flow injection [11], cold vapor coupled with atomic absorption spectrometry (CV-AFS) [12,13], solid sample atomic absorption spectrometry [14], and inductively coupled plasma-mass spectrometry [15] have been reported for the determination of mercury in rice samples. One of the most powerful analytical techniques for the determination of trace mercury in biological and environmental samples is atomic fluorescence spectrometry coupled with cold vapor, due to its inherent simplicity, the low cost of the apparatus, high relative sensitivity, reduced number of potential interferences, and low limits of detection [16,17].

In recent years, closed vessel microwave-assisted digestion seems to be a method of choice over conventional procedures for the total dissolution of mercury from solid matrix. This method of digestion allows a rapid decomposition of samples in inorganic analysis due a strict control over the heating power and the heating time and selective leaching of analyte compounds in a short digestion time with an easier control of digestion parameters and

* Corresponding author. Fax: +34 96 3544845.

E-mail address: m.luisa.cervera@uv.es (M.L. Cervera).

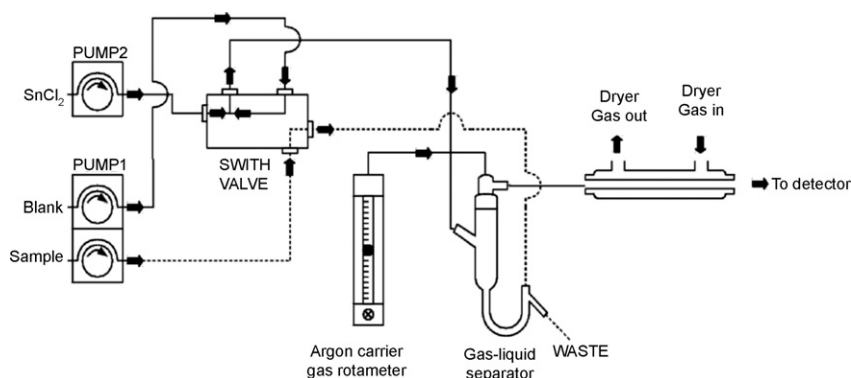


Fig. 1. Schematic diagram of the CV-AFS employed for determination of Hg in rice.

the easy automation, and efficiency. One of the main problems in the determination of trace amounts of mercury is the presence of interferences by several nitrogen oxide species, such as NO, N₂O₄ and NO₂, which can be formed during the digestion with HNO₃ and H₂O₂ [18]. Generally it occurs when the digestion is not completed, where organic compounds and nitrogen oxides remain in the solution. In this case, the analytical signals can be strongly affected, some reagents are proposed in the literature to remove volatile nitrogen oxides from sample digests in the determinations by CV-AAS: addition of urea [18], addition of sulphamic acid [19], and purging the solution with argon [20] has been recommended. In this work, the effect of volatile nitrogen oxides on the determination of mercury by CV-AFS was evaluated through the use of the standard addition method and several strategies for overcome their interferences.

2. Materials and methods

2.1. Instruments, apparatus and reagents

Hg determinations were performed by using CV-AFS system PSA 10.025 Millennium Merlin Instrument (Orpington, Kent, UK). A schematic diagram of the setup is shown in Fig. 1. Solutions were introduced into the system by two independent peristaltic pumps and the switching valve that alternates between sample and reagent blank solutions was computer controlled. The Hg⁰ vapor generated by the chemical reduction of inorganic mercury with SnCl₂ was transported into a gas-liquid separator by an argon flow. Carrier gas humidity was removed by a Perma Purer[®] device reducing interference by quenching of the Hg fluorescence. The concentrations of mercury were determined by using an external calibration method based on peak height fluorescence measurements in the range between 0.025 and 0.2 ng mL⁻¹. The instrumental conditions, flow rates and all reagent concentrations employed in this study for the CV-AFS determination of Hg in rice samples are outlined in Table 1.

For the determination of total Hg, samples were digested by using a microwave system Ethos SEL from Millestone (Soriso, Italy), equipped with a temperature feedback control (1000 W maximum output). This device is accurate in sensing temperature and automatically adjusts the microwave field output power. The microwave oven is capable of holding a maximum of 10 samples simultaneously. High pressure closed digestion vessels used are made of high purity TFM (a thermally resistant form of Teflon), with an internal volume of 100 mL.

The microwave vessels were cleaned with sub-boiling HNO₃ in the TraceClean from Millestone system and the glass and plastic material were rinsed with 10% (v/v) HNO₃ during 15–30 min and

let to stand overnight immersed in a 10% (v/v) HCl bath and after that rinsed with ultrapure water.

A 350 mL ultrasound water bath from Selecta (Barcelona, Spain) operated at 50 W and 50 Hz frequency was used for sample sonication.

All reagents were of the highest purity available and all solutions were prepared in ultrapure water, with a resistivity of 18.2 MΩ cm obtained from a Milli-Q system Millipore (Bedford, USA). The reduction solution was prepared at 2% (m/v) SnCl₂·2H₂O Merck (Darmstadt, Germany) in 10% HCl (v/v) from Merck. In order to do the elimination of mercury traces in the aforementioned solutions, the reducing mixture was purged with a stream of nitrogen with constant stirring for 30 min. Nitrogen gas was obtained from a nitrogen generator N₂ Micro from Claind (Lenno, Italy) with gas purity higher than 97.5%.

A 1000 mg L⁻¹ Hg (II) certified standard stock solution was obtained from Merck. Calibration solutions in the range of 0.025–0.2 ng mL⁻¹ were prepared daily by sequential dilution of the stock one. Nitric acid 69% (m/v) from Scharlau (Barcelona, Spain) and 35% (m/v) H₂O₂ from Scharlau were employed for digestion of samples. A stock solution of reagent mixture of 0.1 mol L⁻¹ KBr from Scharlau and 0.017 mol L⁻¹ KBrO₃ from Scharlau were prepared daily from the corresponding ACS reagent grade salts. The excess of Br⁻ guaranteed a complete conversion of bromate to Br₂. A solution of hydroxylamine hydrochloride from Scharlau (12% m/v) was used to remove excess of bromine and the nitrous oxides generated during the digestion, that have an unfavourable impact on the reduction of mercury with stannous chloride. Other reagents used were a 2000 mg L⁻¹ potassium dichromate solution from Panreac reagent (Barcelona, Spain), a 2000 mg L⁻¹ potassium permanganate

Table 1
Operating conditions for the CV-AFS determination of Hg.

Parameter	Value
Wavelength (nm)	254
Measurement mode	Peak height
Replicates	3
Delay times (s)	15
Analysis time (s)	40
Memory wash time (s)	60
Gain	1000
Carrier gas flow rate (mL min ⁻¹)	250
Dryer gas flow rate (L min ⁻¹)	2.5
Carrier flow rate (mL min ⁻¹)	9
Sample flow rate (mL min ⁻¹)	9
SnCl ₂ flow rate (mL min ⁻¹)	4.5
SnCl ₂ % (m/v)	2
HNO ₃ % (v/v)	5
KBr/BrO ₃ (mol L ⁻¹)	0.1/0.017
Hydroxylamine hydrochloride % (m/v)	12

solution from Panreac reagent and a 4% (m/v) urea solution prepared from Panreac reagent.

The applicability of the method to real samples was demonstrated by the analysis of NIST-SRM 1568a Rice Flour certified reference material (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Samples of different rice were purchased at the local market in Valencia (Spain), Recife and Sao Paulo (Brazil). Rice samples were ground in a domestic mill Taurus (Lleida, Spain), and the powdered samples were stored in polyethylene bottles before their analysis.

2.2. General procedure

To determine total mercury, approximately 0.5 g of rice sample and reference material were accurately weighed inside a pressure-resistant vessel (100 mL), and were digested with 4 mL of 69% concentrated nitric acid, 2 mL of 35% hydrogen peroxide and 4 mL of H₂O. The mixture was sonicated for 30 min in an ultrasound water bath and the reactor was closed, starting the digestion procedure in a microwave oven following the program: step 1 – room temperature to 85 °C for 3 min; step 2 – heat 85–145 °C for 9 min; step 3 – heat 145–180 °C for 4 min; step 4 – hold time at this temperature for 15 min; step 5 – decrease the temperature to 30 °C for 25 min. After cooling the vessels to room temperature, sample and blank digests were diluted to 25 mL with nanopure water.

4 mL of sample solution were transferred to a 50 mL volumetric flask, followed by the addition of 1 mL of a KBr/KBrO₃ solution 0.1/0.017 M, 30 µL of 12% (m/v) hydroxylamine hydrochloride and 2.5 mL concentrated nitric acid, and diluted with nanopure water. The calibration solutions and the carrier solution were prepared in the same medium as samples (containing HNO₃, KBr/KBrO₃ and hydroxylamine). The determination of total Hg was performed by CV-AFS through direct aspiration of the sample solution and reduction with SnCl₂ in HCl, using external calibration.

3. Results and discussion

3.1. Digestion of samples

The digestion of rice samples produces a high evolution of gases and an increased pressure inside the reactor with a risk of leaks. To avoid it, a pre-digestion step was carried out in an ultrasound water bath. After the addition of 4 mL of HNO₃ the samples were let to stand during 30 min, then 1 mL of H₂O₂ were carefully added and the samples were sonicated for 15 min. The addition of H₂O₂ produces a big amount of foam that rises up lengthways the walls of the reactor being necessary to add a second mL of H₂O₂ separately. The addition of the last 4 mL of water allows us to rinse the wall of the reactor. The procedure employed makes possible to digest 0.5 g of sample in safe conditions, providing colourless or pale yellow solutions with no residue.

3.2. Cross-contamination study

The contamination of samples usually can occur during sample preparation or analytical determination [21], being that associated with unsatisfactory results. This source of errors was minimized by carefully checking all analytical procedures and equipment, using ultrapure acids and water and cleaning the material with HNO₃ before use.

Taking into account the low level of Hg in rice samples we must take a high care with cleaning the glass and Teflon® material. In order to check the appropriated procedure we fill four volumetric flasks with a standard solution of 0.100 ng mL⁻¹ Hg and let to stand the whole weekend. After that, the flasks were washed with soap and submitted to different cleaning procedures:

Table 2

Evaluation of the cleaning procedure for Hg determined by CV-AFS.

Cleaning conditions	Fluorescence value	Variation (%)
Soap + HNO ₃	56.75	14
Soap + KMnO ₄ + HCl	50.22	0.9
Soap + HNO ₃ + HCl	49.44	0.7
Soap + HNO ₃ + KMnO ₄	50.31	1.1

Reference value (standard solution of 0.025 ng mL⁻¹) = 49.78 fluorescence units.

(1) immersed overnight in a 10% (v/v) HNO₃ bath, (2) rinsed with KMnO₄ during 15–30 min and immersed overnight in 10% (v/v) HCl bath, (3) rinsed with HNO₃ during 15–30 min and immersed overnight in 10% (v/v) HCl bath, and (4) rinsed with HNO₃ during 15–30 min and filled overnight in KMnO₄. After cleaning the volumetric flask were employed for the preparation of a standard solution of 0.025 ng mL⁻¹ which was measured by CV-AFS. As it can be seen in Table 2, the immersion in HNO₃ overnight was not enough for cleaning; being satisfactory the rest of procedures which provided fluorescence signals that agree well with the reference value obtained with new material. From the results found a treatment with HNO₃ followed by HCl was selected.

3.3. Study of the matrix effect and interferences

The low level of Hg present in the rice samples avoids the use of a high dilution of the samples. However, to avoid the interference of nitrous acid and nitrous oxides present in sample solutions after digestion, these were diluted and the fluorescence measured by employing a gain of 1000, and a calibration range until 0.2 ng mL⁻¹ Hg. Following the procedure recommended in the Customer Technical Information File [22], samples were prepared containing 5% (v/v) HCl, 1 mL of a mixture of KBr/KBrO₃ solution and 30 µL of hydroxylamine hydrochloride. External calibration provided slope values of around 2740.3 fluorescence ng⁻¹ mL which are different than those found by the standard addition method (around 2037.1 fluorescence ng⁻¹ mL).

Different strategies were studied to overcome the aforementioned interference: (i) the addition of a minimum amount of oxidants like KMnO₄ and K₂Cr₂O₇ alone or in combination with hydroxylamine hydrochloride; (ii) the use of a 4% (m/v) urea solution, as suggested by Hac et al. [23]; (iii) the increase of HCl concentration as suggested by Cava-Montesinos et al. [24]; and (iv) the use of 5% (v/v) HNO₃. In order to oxidize the nitrous oxides, employing the minimum amount required to obtain a pink and yellow colour of the solution, respectively, and using or not hydroxylamine hydrochloride to eliminate the colour of solution before the measurement.

The addition of hydroxylamine together with K₂Cr₂O₇ provided not reproducible results and in the presence of KMnO₄ matrix effects were persisted. However, when no hydroxylamine was added the slopes of two calibration methods were similar.

In the present work we have studied the appropriate volume of urea solution in order to overcome matrix interferences by adding 0.5, 1, 2 and 3 mL. The net fluorescence signal (sample/standard – blank) were not significant different with the volume employed, thus 0.5 mL was selected. The slope of external calibration and standard addition method in the aforementioned conditions were the same (see Table 3).

When HCl 3 M (25%, v/v) was employed alone or with K₂Cr₂O₇, interference effects were found, but the use of KBr/KBrO₃ or KMnO₄ provided comparable slopes for external and standard addition calibrations.

The use of 5% (v/v) HNO₃ as the medium to generate Hg vapor, recommended in the AFS manual for the BEC checking, provided the highest sensitivity but the interference from nitrous oxides was persistent, even when KMnO₄ was added. However the presences

Table 3
Evaluation of the matrix effect on the Hg determination in rice by CV-AFS.

Condition	External calibration	Standard addition method	$S_{\text{stand}}/S_{\text{ext}} \times 100$
HCl 5% + 1 mL $\text{Br}^-/\text{BrO}_3^-$ + 30 μL hydroxylamine	$F = 2740.3C + 31.6$	$F = 2037.1C + 86.4$	74
HCl 5% + 25 μL MnO_4^- + 10 μL hydroxylamine	$F = 2193.9C - 4.7$	$F = 1341.2C + 41.4$	61
HCl 5% + 100 μL $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ + 50 μL hydroxylamine	No reproducible	No reproducible	–
HCl 5% + 25 μL MnO_4^-	$F = 3172.5C + 8.9$	$F = 2968.7C + 87.6$	94
HCl 5% + 100 μL $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	$F = 2993.6C + 13.9$	$F = 3055.7C + 43.5$	102
HCl 5% + 0.5 mL urea	$F = 3174.9C + 11.5$	$F = 3104.3C + 73.9$	98
HCl 25%	$F = 1598.5C + 8.6$	$F = 1463.4C + 20.8$	92
HCl 25% + 1 mL $\text{Br}^-/\text{BrO}_3^-$ + 30 μL hydroxylamine	$F = 2036.3C + 21.9$	$F = 2050.5C + 31.5$	101
HCl 25% + 25 μL MnO_4^-	$F = 2307C + 2.9$	$F = 2255.4C + 26.7$	98
HCl 25% + 100 μL $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	$F = 2064.6C + 14.6$	$F = 1861.4C + 31.4$	90
HNO_3 5%	$F = 3374.1C + 5.3$	$F = 2840.8C + 59.9$	84
HNO_3 5% + 1 mL $\text{Br}^-/\text{BrO}_3^-$ + 30 μL hydroxylamine	$F = 2069.8C + 30.6$	$F = 1934.5C + 53.4$	94
HNO_3 5% + 25 μL MnO_4^-	$F = 3434C + 6.2$	$F = 3133.5C + 60.9$	91
HNO_3 5% + 100 μL $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	$F = 3321.1C + 23.7$	$F = 3210.8C + 45.4$	97

Note: In all cases a digested sample volume of 3.75 mL was diluted to 50 mL. S_{stand} : slope of the addition method and S_{ext} : slope of external calibration.

Table 4
Study of the stability of the digested sample.

Days after digestion	External calibration	Standard addition method	Concentration (ng g^{-1})	
			External calibration	Standard addition method
1	$F = 1955.3C + 6.0$	$F = 1866.4C + 88.8$	30.8 ± 1.2	32.2 ± 1.6
4	$F = 1743.7C + 6.1$	$F = 1659.5C + 67.2$	23.4 ± 1.2	24.6 ± 0.5
6	$F = 1884.4C + 4.1$	$F = 1811.3C + 63.9$	21.4 ± 0.9	22.3 ± 0.5
10	$F = 1877.5C + 3.7$	$F = 1844.1C + 62.6$	20.7 ± 0.7	21.1 ± 0.8
11	$F = 2049C + 0.3$	$F = 2012.6C + 73.2$	22.1 ± 0.7	22.5 ± 0.8

Table 5
Study of the matrix effect as a function of digested sample volume.

Sample digested volume (mL)	Equation by standard addition method	Concentration by external calibration (ng g^{-1})	Concentration by standard addition method (ng g^{-1})
3.75	$F = 1654.8C + 20$	7 ± 2	6.5 ± 0.6
7.5	$F = 1603.4C + 36$	6.7 ± 1.0	6.7 ± 0.4
10	$F = 1493C + 44$	6.3 ± 0.8	6.7 ± 0.7

Equation of external calibration $F = 1610.5C + 6.1$. Note: 0.5 g of rice was microwave digested and diluted to 25 mL. To do the CV-AFS determination of mercury a discrete volume of digested sample was diluted to 50 mL.

of KBr/KBrO_3 mixture or $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ provided comparable slopes for external and standard addition calibrations.

From results obtained and taking into account different aspects like the reproducibility of measurements, the correlation coefficients, the agreement between the intercept of the standard addition line and the fluorescence sample signal, two media were selected for additional studies: 25% (v/v) of HCl and 5% (v/v) of HNO_3 , and in both cases it was evaluated the addition of a mixture of KBr/KBrO_3 and hydroxylamine hydrochloride. The standard addition method was applied to a series of different microwave digested samples of rice in order to evaluate the matrix effect. No differences were found, but HNO_3 , as acid medium provided higher sensitivity than HCl, with slope values which varied from 1832.5, 1867, 1945.6 to 1953.3 for samples in front of a value of 1992.5 for the external calibration. At this point it must be clarified that nitrogen oxides obtained after sample digestion and not NO_3^- introduced in the final acidification of diluted samples can create some interferences as it was previously indicated in the literature [18] and has been our own experience.

3.4. Study of the stability of the digested samples

In order to evaluate the stability of the digested samples the same sample was analyzed in different days after digestion. Results found by employing external calibration and standard addition methods are shown in Table 4. As it can be seen, there is no difference between the concentrations found in the sample by external

calibration and standard addition method along the days elapsed from digestion. Otherwise we can find a decrease of the Hg concentration after 6 days of digestion from 31 to 21 ng g^{-1} , while the concentration remain constant from the 6th day to 11th day. So, it can be concluded that Hg can be adsorbed on the glass wall of the container, being recommended the fast analysis of digested samples with a delay not greater than 1 day.

3.5. Analytical figures of merit

Taking into account the low level of Hg in natural rice samples and in order to improve the sensitivity and to decrease the

Table 6
Analytical figures of merit of the CV-AFS determination of Hg in rice.

Parameter	Value
LOD (ng L^{-1})	1.4
LOD (ng g^{-1})	0.9
RSD (%) (concentration 7.8 ng g^{-1})	18
Sensitivity/fluorescence ($\text{ng}^{-1} \text{ mL}$)	1700–2000
%Recovery 5 ng g^{-1} added ($n = 4$)	95 ± 4
%Recovery 20 ng g^{-1} added ($n = 4$)	98 ± 7
%Recovery 50 ng g^{-1} added ($n = 4$)	94 ± 2

LOD was calculated from the standard deviation of 6 blank measurements divided by the slope of the calibration line (ng L^{-1}) and from this data and taken into account the sample mass employed it was calculated the LOD in ng g^{-1} . RSD was calculated as the variation coefficient from three independent analysis of a real sample containing 7.8 ng g^{-1} .

Table 7

Determination of total Hg in NIST-SRM 1568a rice flour.

Sample	Standard addition method	Concentration (ng g ⁻¹)	
		Standard addition method	External calibration
Rice flour 1	$F = 1868.6C + 23.1$	5.98	5.87
Rice flour 2	$F = 1878.1C + 25.5$	7.63	6.88
Rice flour 3	$F = 1903.6C + 22.3$	6.75	6.69
Mean $\pm$ standard deviation		6.9 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 0.5

External calibration equation $F = 1884.4C + 4.1$. Certified value = 5.8 ± 0.5 ng g⁻¹.

limit of detection, a minor dilution factor was assayed. We have compared the results found by transferring 3.75 mL of digested sample with the results obtained by transferring 7.5 mL and 10 mL of digested solution (see Table 5). As it can be seen no matrix effect was found and the Hg contents were in good agreement for the three sample aliquots and direct measurement with external calibration except when digested samples were directly measured.

Table 6 shows the main analytical figures of merit of the method. The limit of detection was calculated as three times the standard deviation of six reagent blanks divided by the slope of the calibration curve and taking into account the dilution factor. The limit of detection found was lower than the values reported in literature 6.2 ng L⁻¹ [11], 0.195 ng mL⁻¹ [12], 0.007 μ g L⁻¹ [15], 3.0 μ g kg⁻¹ [25] and higher than 0.53 ng g⁻¹ obtained employing electrothermal vaporization inductively coupled plasma-mass spectrometry [10]. Regarding the content of Hg in natural rice samples, the limit of detection of the present methodology is enough low for their determination and it can be decreased by using higher sample digested volumes.

The RSD was the value obtained in the analysis of the three replicates of a sample containing 7.8 ng g⁻¹.

The sensitivity of the proposed method was in the range of 1659.5 and 2010.6 fluorescence units ng⁻¹ mL varying a little bit each day.

In order to evaluate the accuracy a reference sample NIST-SRM 1568a of rice flour (see Table 7) has been analyzed. The Hg content found 6.5 ± 0.5 ng g⁻¹ was in good agreement with the certified value of 5.8 ± 0.5 ng g⁻¹. On the other hand, the comparison between data found by external calibration and by the standard addition method evidenced the excellent agreement with the certified values and thus, it can be concluded that the proposed method has not matrix effects.

Additionally recovery experiments were carried out, spiking samples before the microwave-assisted digestion with standard solutions of Hg and following the proposed method. As it can be seen in Table 5, the recovery percentage for three concentration levels of 5, 20 and 50 ng g⁻¹ were quantitative.

3.6. Analysis of rice samples

The proposed method has been applied to the determination of Hg in 24 natural rice samples from different origin: nine samples from Brazil acquired in the Brazilian local market, six samples from Spain, four samples from Thailand and five samples from Japan, all those acquired in the Spanish local market. Table 8 shows the results obtained, and as it can be seen the Hg content ranges between 1.2 and 7.8 ng g⁻¹, and not significant differences in Hg could be found regarding the origin of rice samples. The Hg content found in samples was lower than the level in rice commonly consumed in Saudi Arabia (range <3–43.6 ng g⁻¹) [25] and level reported by Appleton et al. [26] in rice from Philippines (8–50 ng g⁻¹).

Table 8

Determination of mercury in natural rice samples by CV-AFS.

Sample	Country of origin	Hg (ng g ⁻¹)
Rice 1	Brazil	3.2 $\pm$ 0.7
Rice 2	Brazil	2.2 $\pm$ 0.4
Rice 3	Brazil	2.6 $\pm$ 0.6
Rice 4	Brazil	4.4 $\pm$ 0.4
Rice 5	Brazil	3.6 $\pm$ 0.9
Rice 6	Brazil	2.1 $\pm$ 0.7
Rice 7	Brazil	2.8 $\pm$ 0.3
Rice 8	Brazil	4.1 $\pm$ 1.2
Rice 9	Brazil	3.2 $\pm$ 0.2
Rice 10	Japan	2.7 $\pm$ 0.5
Rice 11	Japan	2.3 $\pm$ 0.5
Rice 12	Japan	1.2 $\pm$ 0.5
Rice 13	Japan	7.8 $\pm$ 1.4
Rice 14	Japan	1.7 $\pm$ 0.3
Rice 15	Spain	1.6 $\pm$ 0.5
Rice 16	Spain	1.6 $\pm$ 0.5
Rice 17	Spain	1.9 $\pm$ 0.2
Rice 18	Spain	1.9 $\pm$ 0.5
Rice 19	Spain	2.5 $\pm$ 0.6
Rice 20	Spain	3.3 $\pm$ 1.3
Rice 21	Thailand	2.9 $\pm$ 0.6
Rice 22	Thailand	1.3 $\pm$ 0.4
Rice 23	Thailand	3.7 $\pm$ 1.3
Rice 24	Thailand	2.6 $\pm$ 0.7

4. Conclusion

The developed methodology, which combines microwave-assisted digestion of samples with a commercially available cold vapor atomic fluorescence determination, provides an enough sensitive methodology to determine total Hg in rice samples at few ng g⁻¹ concentration levels. The limit of detection of the method, 0.9 ng g⁻¹, and the good accuracy and precision provided us an excellent tool for the quantification of Hg in samples of different origin, having found concentrations from 1.3 to 7.8 ng g⁻¹ in commercially available rice.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian agencies CNPq and CAPES for the grant, and the Ministerio de Ciencia e Innovacion project AGL2007-64567 and the Direccion General de Salud Publica de la Generalitat Valenciana project Ref-A-05/09 for the financial support.

References

- [1] L. Zhang, M.H. Wong, Environ. Int. 33 (2007) 108–121.
- [2] F. Zahir, S.J. Rizwi, S.K. Haq, R.H. Khan, Environ. Toxicol. Pharmacol. 20 (2005) 351–360.
- [3] FAO/WHO, Evaluation of certain food additives and contaminants, Twenty-second report of the Joint Expert Committee on Food additives, Geneva, World Health Organization, 1978 (WHO Technical Report Series, No.631).
- [4] J.M. Llobet, G. Falco, C. Casas, A. Teixido, J.L. Domingo, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 838–842.

- [5] H.-S. Lee, Y.-H. Cho, S.-O. Park, S.-H. Kye, B.-H. Kim, T.-S. Hahn, M. Kim, J.-O. Lee, C.-I. Kim, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) S31–S37.
- [6] M.A. Hamilton, P.W. Rode, M.E. Merchant, J. Sneddon, *Microchem. J.* 88 (2008) 52–55.
- [7] R.B. Voegborlo, H. Akagi, *Food. Chem.* 100 (2007) 853–858.
- [8] M.A. Augelli, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, M.I. Cantagallo, L. Angnes, *Food Chem.* 101 (2007) 579–584.
- [9] A. Detcheva, K.H. Grobecker, *Spectrochim. Acta* 61B (2006) 454–459.
- [10] P.-C. Li, S.-J. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 143–150.
- [11] Y. Li, Y. Jiang, X.-P. Yan, Z.-M. Ni, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4886–4891.
- [12] M. Navarro-Alarcon, M.-C. Lopez-Martinez, M. Sanchez-Viñas, H. Lopez-Garcia-de-la-Serrana, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 2223–2225.
- [13] J.M. Ombaba, *Microchem. J.* 53 (1996) 195–200.
- [14] N. Salvato, C. Pirola, *Mikrochim. Acta* 123 (1996) 63–71.
- [15] S.Q. Cao, H.T. Chen, X.J. Zeng, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1183–1186.
- [16] Y. Cai, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 62–66.
- [17] H. Morita, H. Tanaka, S. Shimomura, *Spectrochim. Acta* 50 (1995) 69–84.
- [18] D.L. Nunes, E.P. dos-Santos, J.S. Barin, S.R. Mortari, V.L. Dressler, E.M. de-Moraes-Flores, *Spectrochim. Acta* 60B (2005) 731–736.
- [19] A. Jeffry, G. Barry, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31 (2000) 1929–1934.
- [20] I. Rokkaer, B. Hoyer, N. Jensen, *Talanta* 40 (1993) 729–735.
- [21] M. Coquery, F.P. Carvalho, S. Azemat, M. Bachelez, M. Horvat, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 792–801.
- [22] Customer Technical Information File, PA Analytical, Issue No. 4.2, November 2 2000.
- [23] E. Hac, M. Krzyzanowski, J. Krechniak, *Sci. Total Environ.* 248 (2000) 37–43.
- [24] P. Cava-Montesinos, E. Rodenas-Torralba, A. Morales-Rubio, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 145–153.
- [25] I. Al-Saleh, N. Shinwari, *Biol. Trace Elem. Res.* 83 (2001) 91–96.
- [26] J.D. Appleton, J.M. Weeks, J.P.S. Calvez, C. Beinhoff, *Sci. Total Environ.* 354 (2006) 198–211.