

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS E BOTÂNICAS POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE
CONTÍNUA, UTILIZANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Rodolpho Merlo de Andrade

Florianópolis
2013

Rodolpho Merlo de Andrade

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS E BOTÂNICAS POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE
CONTÍNUA, UTILIZANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título
de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Lázaro
Gallindo Borges

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Andrade, Rodolpho Merlo

Determinação de elementos traço em amostras biológicas e botânicas por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, utilizando análise direta de sólidos / Rodolpho Merlo Andrade ; orientador, Daniel Lázaro Gallindo Borges - Florianópolis, SC, 2013.

69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Análise direta de sólidos. 3. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. 4. Determinação de elementos traço. I. Borges, Daniel Lázaro Gallindo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Rodolpho Merlo de Andrade

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS E BOTÂNICAS POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE
CONTÍNUA, UTILIZANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2013.

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Daniel L. G. Borges, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo S. Chaves, Dr.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Ivan G. de Souza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico a meu pai,
exemplo de perseverança e
integridade, que mesmo na
ausência de sua presença,
estará em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Daniel L. G. Borges, pela orientação, paciência e generosidade intelectual, sendo esta, indispensável para a realização do presente trabalho.

A professora Vera Frescura, por seu apoio, conselhos e apoio e pela oportunidade de ingressar nesse fantástico grupo de pesquisa.

Aos meus amigos Adriana, Daiane, Graziela, Jairo, Jesse, Juliano, Luci, Patrícia, Rui, Tarcísio e Victor pela amizade, companheirismo, auxílio e principalmente por tornarem o ambiente de pesquisa um lugar enriquecedor e estimulante. Gostaria de deixar um grande agradecimento ao meu amigo Jefferson, pelo auxílio no decorrer deste trabalho assim como pelas sugestões dadas.

Aos professores Eduardo Sidinei Chaves e Ivan Gonçalves de Souza por avaliarem o presente estudo, enriquecendo-o com importantes sugestões.

A CAPES pelo apoio financeiro oferecido no decorrer deste projeto.

Finalmente, gostaria de agradecer mesmo que já não esteja entre nós, ao professor Adilson J. Curtius, que dedicou grande parte de sua vida a este laboratório, onde tenho a honra de trabalhar e estudar.

A todos, meu sincero OBRIGADO!

RESUMO

Por prover informações sobre o funcionamento do metabolismo de seres vivos, antigas formações geológicas, hábitos alimentares de antigos povos e também permitir estudos de toxicidade, a determinação de elementos traço em amostras animais e botânicas tem despertado interesse. Neste contexto a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua utilizando a análise direta de sólidos é uma técnica ideal por ser: rápida, sensível e econômica; permitindo seu uso em complexos estudos como também para análise de rotina. Foi desenvolvido um método para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr em amostras botânicas e biológicas. Otimizaram-se os parâmetros térmicos obtendo-se uma temperatura de pirólise e atomização ideal de 1000 e 2500 °C para Mn, de 1000 e 2600 °C para o Ni, de 800 e 2500 °C para o Rb e de 900 e 2600 °C para o Sr. Avaliou-se a homogeneidade das amostras concluindo-se que podem ser utilizadas para micro e submicroanálises. Avaliaram-se as curvas de calibração verificando-se a possibilidade do emprego de curvas feitas utilizando-se soluções aquosas. Para as amostras botânicas, com exceção do Ni, foi possível o emprego da curva aquosa para a quantificação dos demais analitos (Mn, Rb e Sr). Já as amostras de tecido animal o mesmo não foi observado devido à complexidade de sua matriz, sendo possível o emprego da curva aquosa apenas para o Mn. Determinou-se Mn, Ni, Rb e Sr em amostras botânicas e biológicas obtendo-se limites de detecção de 5, 2, 103 e 10 ngg⁻¹, respectivamente. Para as amostras botânicas de guaraná e amostras biológicas de tecido de ostra, músculo de peixe e fígado bovino foram determinadas concentrações de 0,32 a 20,46 µgg⁻¹ para o Mn, 1,13 a 3,57 µgg⁻¹ para o Ni, 4,04 a 44,29 µgg⁻¹ para o Rb e 0,42 a 4,35 µgg⁻¹ para o Sr. O método proposto demonstrou elevada sensibilidade, praticidade, rapidez e confiabilidade sendo viável para a análise de rotina em amostras botânicas para esses elementos. Devido à matriz complexa das amostras biológicas, calibração utilizando materiais de referência certificados foi necessária, resultando em uma boa exatidão para a determinação dos analitos.

Palavras-chave: Análise de amostras biológicas. Análise direta de sólidos. SS-HR-CS AAS.

ABSTRACT

Due to the ability to provide information about the metabolism of living beings, ancient geological formations, habits of ancient people and to enable toxicity studies, the determination of trace elements in animal and plant samples has attracted attention. In this context, solid sampling high resolution continuum source atomic absorption spectrometry is an interesting alternative due to its high analytical frequency, low cost and high sensitivity, allowing its use for complex studies and also for routine analysis. This work describes the development of a method aiming at the determination of Mn, Ni, Rb and Sr in biological and botanical samples. The optimum pyrolysis and atomization temperatures were determined as 1000 and 2500°C for Mn, 1000 and 2600 °C for Ni, 800 and 2500 °C for Rb, 900 and 2600 °C for Sr. The homogeneity factor for the samples was verified and the samples were found suitable for micro and submicroanalyses. Several calibration approaches were evaluated, aiming at verifying the possibility of employing calibration curves against aqueous standards. For the botanical samples, with the exception of Ni, it was possible the use of aqueous curve for the quantification of other analytes (Mn, Rb and Sr). For animal tissue samples, the same approach was not adequate, due to the complexity of the matrix, being possible the use of aqueous curve only for Mn. It was determined Mn, Ni, Rb and Sr in botanical and biological samples obtaining a detection limit of 0.005, 0.002, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. For the botanical samples of guaraná and biological samples of oyster tissue, fish's muscle and bovine liver were determined concentrations of 0.32 to 20.46 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Mn, 1.13 to 3.57 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Ni, 4.04 to 44.29 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Rb and 0.42 to 4.35 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Sr. The proposed method showed high sensitivity, convenience, speed and reliability, allowing its use for routine analysis in botanical samples for these elements. Due to the complex matrix of biological samples, calibration against a solid standard was required, resulting in good accuracy for the determination of the evaluated analytes.

Key-words: Biological sample analysis. Direct solid sampling. SS-HR-CS AAS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sistema automatizado da análise direta de sólidos..... | 29 |
| Figura 2. Sir Alan Walsh..... | 31 |
| Figura 3. Conceito instrumental da HR CS-AAS..... | 33 |
| Figura 4. Curvas de pirólise e atomização para Mn utilizando-se padrão aquoso e amostras..... | 42 |
| Figura 5. Espectro de absorção para o Ni..... | 43 |
| Figura 6. Espectros de referência utilizados pela correção por mínimos quadrados..... | 44 |
| Figura 7. Curvas de pirólise e atomização para Ni utilizando-se padrão aquoso e amostras..... | 45 |
| Figura 8. Curvas de pirólise e atomização para Rb utilizando-se padrão aquoso e amostra..... | 47 |
| Figura 9. Curvas de pirólise e atomização para Sr utilizando-se padrão aquoso e amostra..... | 49 |
| Figura 10. Espectro de absorção resolvido pela correção por mínimos quadrados para a amostra Nist 1566b (tecido de ostra).... | 54 |
| Figura 11. Curva de calibração para o Ni, empregando amostra certificada de referência Nist 1566b..... | 55 |
| Figura 12. Curva de calibração para o Ni, empregando amostra certificada de referência Nist 1515..... | 56 |
| Figura 13. Espectros de absorção resolvidos pela correção de mínimos quadrados para Ni nas amostras de fígado bovino e músculo de peixe..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Parâmetros operacionais do ICP-MS..... | 37 |
| Tabela 2. Programa de temperatura para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr por SS HR-CS AAS..... | 37 |
| Tabela 3. Programa utilizado na digestão assistida por microondas das amostras..... | 38 |
| Tabela 4. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da plataforma SS..... | 39 |
| Tabela 5. Fator de homogeneidade (H_c) calculado para amostras de referência certificadas, amostras reais de guaraná, músculo de peixe, fígado de boi e tecido de ostras, peneiradas em malha de $67\mu\text{m}$ | 51 |
| Tabela 6. Diferença percentual de sensibilidade entre as curvas de calibração construídas com materiais sólidos de referência e a sensibilidade obtida para cada curva da calibração aquosa..... | 53 |
| Tabela 7. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de referência certificadas CTA OTL-1, NIST 1515 e NIST 8433 obtidos por ICP-MS e SS-HR-CS AAS..... | 58 |
| Tabela 8. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de guaraná por ICP-MS (amostras digeridas) e por SS HR-CS AAS utilizando calibração líquida e sólida..... | 59 |
| Tabela 9. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de referência certificadas TORT-2, NIST 1566b e NIST 8414 obtidos por SS-HR-CS AAS..... | 60 |
| Tabela 10. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras biológicas por ICP-MS (amostras digeridas) e por SS HR-CS AAS utilizando calibração líquida e sólida..... | 62 |

Tabela 11. Parâmetros de mérito obtidos pela metodologia proposta para as amostras botânicas e biológicas.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS:** Espectrometria de absorção atômica (Atomic absorption spectrometry);
- CCD:** Dispositivo de carga acoplada (Charged coupled device);
- F AAS:** Espectrometria de absorção atômica com chama (Flame atomic absorption spectrometry);
- GF AAS:** Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Graphite furnace atomic absorption spectrometry);
- HCL:** Lâmpada de cátodo oco (Hollow cathode lamp);
- ICP-MS:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry);
- ICP-OES:** Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry);
- LS AAS:** Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (Line source atomic absorption spectrometry);
- OES:** Espectrometria de emissão óptica (Optical emission spectrometry);
- SIS GF AAS:** Espectrometria de absorção atômica com suspensão em forno de grafite (Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry);
- SS:** Análise direta de sólidos (Solid Sampling);
- SS GF AAS:** Espectrometria de absorção atômica utilizando análise direta de sólidos em forno de grafite (Solid Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry);
- SS HR-CS AAS:** Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (Solid Sampling High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry);
- XRF:** Espectrometria de fluorescência por raios-x (X-Ray Fluorescence);

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 25 |
| 2.1 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Mn, Ni, Rb E Sr..... | 25 |
| 2.2 ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS..... | 27 |
| 2.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA..... | 31 |
| 3 OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 GERAL..... | 35 |
| 3.2 ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 4 METODOLOGIA..... | 36 |
| 4.1 INSTRUMENTAÇÃO..... | 36 |
| 4.2 AMOSTRAS REAGENTES E SOLUÇÕES..... | 37 |
| 4.3 PROCEDIMENTOS..... | 38 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 40 |
| 5.1 ESCOLHA DE LINHAS ALTERNATIVAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Mn, Ni, Rb E Sr..... | 40 |
| 5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS TÉRMICOS..... | 41 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS CERTIFICADAS DE REFERÊNCIA E DAS AMOSTRAS REAIS..... | 50 |
| 5.4 CONFEÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO AMOSTRAS DE REFERÊNCIA CERTIFICADAS E SOLUÇÃO PADRÃO DE REFERÊNCIA..... | 52 |
| 5.5 DETERMINAÇÃO DE Mn, Ni, Rb E Sr EM AMOSTRAS BOTÂNICAS E BIOLÓGICAS..... | 57 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 64 |
| REFERÊNCIAS..... | 65 |

1 INTRODUÇÃO

Mediante a determinação de elementos traço em amostras biológicas, é possível obter informações relevantes a respeito do funcionamento e manutenção do metabolismo de seres vivos[1,2] , formações geológicas[3] , estudos toxicológicos[4], entre outros.

Entre estes metais, o manganês, tem grande importância aos seres vivos. Devido à atividade da fosfotransferase, o Mn é primordial no crescimento de plantas e para o transporte de açúcares em micro-organismos e auxilia na formação do tecido ósseo e conjuntivo sendo importante para o crescimento de animais.[2] Sua determinação também permite obter informações relevantes para a química ambiental, por elucidar diferentes ciclos bioquímicos, tais como bioacumulação em seres vivos.[3] Por apresentar toxicidade ao sistema nervoso central também possibilita estudos toxicológicos e alimentares, sendo a principal fonte de manganês aos seres humanos a alimentação, em especial produtos de origem vegetal, como o arroz e o trigo.[2]

Mesmo não possuindo funções biológicas esclarecidas em seres humanos, o níquel desperta interesse na área médica, dada a sua ampla distribuição no meio ambiente, sendo a contaminação pela ingestão de alimentos ou água contaminada; além de seu elevado potencial alergênico.[4] Apesar disso, o níquel é um dos principais micronutrientes em plantas. Por ser um componente de diversas enzimas responsáveis pela redução de nitrato, entre elas a urease, auxilia o transporte de nitrogênio na planta, impedindo a acumulação de ureia, que, por sua vez, é tóxica.[5]

Além destes elementos, estudos relacionados à determinação de rubídio e estrôncio, têm ganhado destaque. Devido à grande aplicabilidade de compostos de rubídio em diferentes ramos da indústria como farmácia, fotográfica e de componentes eletrônicos em geral, tem surgido crescente preocupação, uma vez que há estudos na literatura relatando sua toxicidade.[6] Apesar de sua grande massa atômica, as similaridades entre o Rb^+ e íon K^+ , tais como similar raio de íon hidratado, faz com que ambos compitam pelos sítios ativos de diversas enzimas, sendo sua concentração maior conforme o nível trófico que ocupa o ser vivo.[7]

O estrôncio por sua vez, devido à sua baixa mobilidade pode ser utilizado como um importante indicador, provend

informações relevantes a respeito da região e de hábitos alimentares de diferentes organismos.[8] Por substituir o cálcio nos ossos auxiliando a uma maior densificação óssea, é possível associar a determinação de estrôncio com os hábitos alimentares do indivíduo.[9]

Devido à exposição a estes elementos estar relacionada, em sua maioria, à ingestão de alimentos, é necessária a elaboração de diferentes metodologias para a determinação desses metais nas mais variadas amostras biológicas e botânicas. Por apresentarem uma matriz complexa, concentrações em quantidades ínfimas e distribuição heterogênea; a determinação de metais em amostras biológicas e botânicas oferece desafios, necessitando o desenvolvimento de metodologias sensíveis, práticas e confiáveis.

Nesse contexto a técnica de análise direta de sólidos em conjunto com a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (SS-HR-CS AAS) surge como uma promissora técnica. Entre suas vantagens, destacam-se: simplificação do preparo da amostra, elevada capacidade de detecção e redução na geração de resíduos[10,11,12]. Além disso, essa técnica, em conjunto com a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, passa a possuir um eficiente sistema de correção de fundo, facilitando a análise de sólidos introduzidos diretamente ao forno.[12,13]

Sob essa premissa, o presente trabalho, visa desenvolver um método rápido, sensível e confiável para a determinação de Sr, Rb, Ni e Mn em amostras biológicas e botânicas de guaraná utilizando a técnica de SS HR-CS AAS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Técnicas para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr

Em função da concentração de diferentes elementos em plantas e animais, prover informações relevantes sobre atividades antropogênicas [14,15], ciclo de micronutrientes e geoquímicos [1-3,16], diversos procedimentos metodológicos para a quantificação elementar, já foram propostos na literatura[14-18].

Os procedimentos relatados na literatura utilizam, em sua maioria, procedimentos complexos e laboriosos para o preparo das amostras. Para amostras botânicas, especificamente a alta concentração de sílica requer procedimentos mais rigorosos para a digestão, assim como o emprego de ácidos fortes, como o ácido fluorídrico.[14] Além disso, uma vez que uma alta concentração de HF é necessária, partes do equipamento onde será realizada a análise podem ser danificadas[17], vindo a requerer mais uma etapa no procedimento do preparo da amostra e com isso um maior tempo de análise.

Visando o uso de um substituto para o HF, Sapkota e colegas empregaram HBF₄ em um estudo de determinação de elementos traço (Sr e Mn) em amostras de plantas e de turfa, utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Apesar do sucesso da análise e do baixo limite de detecção encontrado (0,3 e 0,2 µg L⁻¹ para o Mn e Sr, respectivamente), os autores, relataram a dificuldade em digerir as amostras contendo silicatos, uma vez que HNO₃ sozinho não seria suficiente para abrir a amostra, sendo necessário do emprego de um ácido mais forte como HBF₄. Ainda, durante o preparo da amostra foram desprendidos 76 minutos para que fosse finalizado o programa de temperatura do microondas, sendo necessários mais 35 minutos após seu término. [16]

Em um estudo similar, Sucharová e colegas avaliaram diferentes métodos de digestão em microondas para a determinação de 35 elementos em plantas, entre estes Mn, Ni, Rb e Sr. Foram avaliados três métodos, denominados livremente de “A” (adição de HNO₃ e H₂O₂), “B” (adição de HNO₃, H₂O₂, HF e H₃BO₃) e “C” (adição de HNO₃, H₂O₂ e HBF₄), sendo empregado aos dois últimos métodos uma digestão extra, após a realização da primeira digestão e no procedimento B uma pré-etapa a essa digestão, visando eliminar o excesso de HF. Os autores concluíram que a concentração de sílica afetava diretamente a

concentração dos analitos nas amostras. Além de estar presente em baixa concentração, a digestão empregando HNO_3 e H_2O_2 não seria suficiente para promover a quebra da ligação entre Si e Ni, levando a uma baixa recuperação do analito. A determinação deste metal por outros procedimentos resultou em concentrações maiores que as certificadas sugerindo a contaminação da amostra durante o seu preparo. Já a determinação de Mn, Rb e Sr não houve influência pelo processo de digestão utilizado. [17] Estes mesmos problemas, também foram observados por Buchmann e colegas, ao digerir amostras certificadas de referência (folhas de pinheiro) com auxílio de micro-ondas empregando 15 mL de HNO_3 , visando o desenvolvimento de uma metodologia para monitorar bioindicadores.[15]

Margui e colegas compararam a determinação de Mn e Sr em plantas próximas a zonas de garimpo, utilizando espectrometria de fluorescência por raios-x (XRF) e a técnica de ICP-OES. Com o uso da primeira técnica, a amostra não passou por nenhum tratamento sendo analisada diretamente, obtendo-se por este método limites de detecção de 1,1 e 4 mg kg^{-1} para o Sr e Mn, respectivamente. Já na análise por ICP OES, observou-se que uma digestão assistida por microondas utilizando HNO_3 e H_2O_2 não seria suficiente para a quebra das espécies de sílica contendo Mn, levando à determinação de resultados menores que esperado.[14] Também por XRF, Guohui e colegas determinaram Mn, Ni, Rb e Sr em diversas amostras de plantas, sem a necessidade de um tratamento prévio da amostra porém obtendo-se limites de detecção na faixa de mg kg^{-1} . [18]

Amostras biológicas, particularmente as de tecido animal, São em geral mais facilmente digeridas. Todavia por possuírem uma matriz complexa, necessitam também do emprego de ácidos fortes e processos laboriosos na preparação. Ainda, para que a amostra se mantenha conservada caso não seja utilizada, são necessários outros procedimentos, tais como a liofilização,[19] que adiciona custo à análise e pode representar uma nova fonte de contaminação da amostra.

Devido à baixa concentração de Mn em amostras biológicas, Lemos e colegas [20], utilizaram duas mini-colunas para a pré-concentração do analito, possibilitando a análise de amostras de vegetais e papinhas de bebê por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). Para que as amostras fossem digeridas além do emprego de HNO_3 e aquecimento, necessitou-se de várias horas para seu preparo. Limites de detecção de até 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram obtidos[2].

Tuzen e colegas, utilizando um procedimento similar para o preparo de amostras, determinaram entre vários elementos, Mn e Ni em amostras de comida enlatada, utilizando para isso, a espectrometria de absorção atômica com diferentes atomizadores. Devido ao fato de Ni estar numa faixa de concentração menor que o limite de detecção obtido pela técnica de F AAS, utilizou-se como atomizador forno de grafite, obtendo-se limites de detecção de até $0,018 \mu\text{gg}^{-1}$ para o Ni e $0,01 \text{mgL}^{-1}$ para Mn por F AAS. [1] Apesar da possibilidade de inserção da amostra sem a necessidade desse preparo, a análise, estaria sujeita a diferentes interferências, sendo estas discutidas no decorrer do estudo.

Já em outro estudo, Baysal e Akman, determinaram níquel em amostras de cabelo utilizando a análise direta de sólidos em conjunto com a espectrometria de absorção atômica com fonte de linha. Além de dispensarem diversas etapas no procedimento de preparo da amostra, obtiveram limites de detecção de até 35ngg^{-1} . [21]

Visando também eliminar laboriosos procedimentos no preparo da amostra, Batista e colegas [22], utilizaram tratamento alcalino empregando-se TMAH para a digestão de amostras de unhas. Apesar do procedimento para a digestão do material biológico ser demorado, necessitando quatro horas para seu preparo, e do uso de um reagente tóxico [23], conseguiram obter limites de detecção de 1,0 e $4,5 \text{ngg}^{-1}$ por ICP-MS e 30 e 143ngg^{-1} por GF AAS, para o Mn e Ni, respectivamente.

Apesar de algumas técnicas já serem estabelecidas na determinação destes metais em amostras biológicas e botânicas, ainda é necessário o desenvolvimento de novos métodos que visem uma menor geração de resíduos, uso de reagentes mais brandos, mais econômicos, mais sensíveis e que possam ser utilizados em análises de rotina.

2.2 Análise direta de sólidos

Idealizada inicialmente por L'vov, ao inserir **NaCl** diretamente em seu protótipo de forno de grafite [24]; a análise direta de sólidos (SS) se caracteriza pela introdução da amostra no atomizador sem qualquer tratamento prévio.

Apesar desta ser uma abordagem distinta da usual conversão de amostras em soluções aquosas por procedimentos já estabelecidos, tais como dissolução por *via seca* ou *via úmida*, [25] a SS oferece um exclusivo leque de vantagens. Por dispensar diversas etapas do preparo da amostra, a SS possui várias vantagens, tais como [26-30]:

(i) *-controle do procedimento analítico* - graças à redução do número de etapas, provenientes da ausência do preparo da amostra; o analista possui a seu dispor um melhor controle das etapas do método, evitando assim diversos erros sistemáticos inerentes à contaminação ou a perdas do analito por volatilização, garantindo maior exatidão e precisão da análise;

(ii) *-simplicidade no método* - o mínimo de preparo da amostra se resume a uma simples moagem (se necessária) e, caso necessário a sua tamisação. Sob neste aspecto, a SS é promissora como técnica para análise de rotina;

(iii) *-frequência analítica* - por dispensar procedimentos laboriosos na abertura da amostra, a análise torna-se muito mais rápida. Segundo Kurfürst, enquanto 70 minutos seriam necessários para realizar a determinação de um analito, pela análise direta de sólidos, 440 min. seriam desprezados para determinar o mesmo elemento em uma amostra digerida.[26];

(iv) *-custo da análise* - por dispensar a utilização de reagentes de elevado grau de pureza, assim como equipamentos necessários à abertura da amostra a técnica de SS, oferece um menor valor agregado a suas análises;

(v) *-baixa periculosidade e geração de resíduos* - por eliminar a necessidade de reagentes tóxicos e/ou corrosivos no preparo da amostra, a análise oferece um menor risco ao analista, assim como uma menor geração de resíduos, contribuindo com o conceito de Química Verde;

(vi) *-capacidade de detecção* - devido à ausência de diluição da amostra, a técnica é caracterizada por possuir uma elevada detectabilidade, permitindo, assim, a quantificação mesmo para concentrações pequenas do analito;

É inerente a técnica, além das vantagens associadas ao preparo da amostra, a possibilidade do estudo da homogeneidade, permitindo, até certo grau, o mapeamento químico da amostra.[31]

A combinação da SS com a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) possui características que incluem a remoção de parte dos concomitantes da matriz durante a etapa de

pirólise, permitindo diminuição do risco de interferências; possibilidade de introdução de pequena quantidade de amostra; boa detectabilidade, alta seletividade, entre outras.[27] Apesar dessas vantagens, até pouco tempo, a SS-GF AAS, era, considera uma técnica semi-quantitativa, sendo a análise direta de sólidos, rotineiramente empregada apenas nas técnicas de OES e XRF.

Os principais motivos se referiam à dificuldade de manipulação e introdução da amostra no forno de grafite; falta de homogeneidade das amostras, ocasionando baixa representatividade na análise; dificuldade em se realizar uma adequada curva de calibração e também, elevada presença de fundo, necessitando de um sistema de correção eficiente.[26,28,32] Apesar da dificuldade da pesagem de pequenas massas de amostra e sua introdução no forno, no decorrer do desenvolvimento da técnica diferentes protótipos foram desenvolvidos. Atualmente estão disponíveis no mercado equipamento que oferecem fácil transporte da amostra até a balança e sua introdução ao forno de grafite, incluindo, sistemas completamente automatizados[26,28], como mostra a Figura 1.

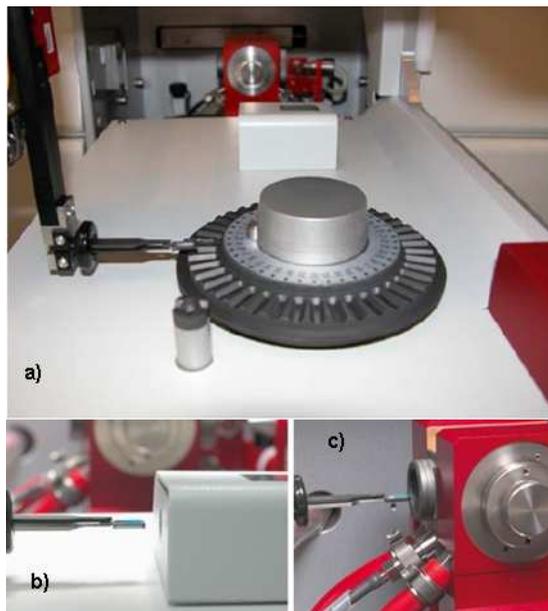


Figura 1. Sistema automatizado da análise direta de sólidos:a)Recolhimento da plataforma;b)inserção na micro-balança; c)introdução ao forno de grafite[25]

Apesar da falta de homogeneidade ser uma propriedade intrínseca à amostra, diferentes artifícios, tais como moagem e tamisação da amostra, podem ser utilizados, visando uma melhor repetibilidade entre as medidas.[26]

Considerada o “calcanhar de Aquiles” da análise direta de sólidos a calibração para a quantificação do analito pode ser uma tarefa árdua, caso algumas considerações não sejam feitas. Idealmente, a curva de calibração deveria possuir similar composição à da amostra. Todavia, devido à impossibilidade de simular a matriz da amostra ou à dificuldade em se obter uma amostra de referência certificada similar, subterfúgios podem ser utilizados permitindo até o uso de soluções aquosas na construção da curva. [26]

Segundo Styris [26], entre os pré-requisitos para o uso de soluções de referências inclui-se: o número de átomos livres do analito durante o ciclo de atomização seja proporcional à concentração do analito em cada amostra e que o mecanismo de atomização tanto para a solução quanto para a amostra sejam semelhantes. Uma vez que a matriz de amostras sólidas exibe uma grande influência no processo de atomização do analito, para minimizar essa diferença deve-se empregar o conceito das condições STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace), ou seja, empregar: sinal da absorbância integrada, minimizando o efeito da variação cinética decorrente do processo de atomização; aquecimento transversal do tubo de grafite, garantindo um ambiente espacialmente isotérmico; elevada taxa de aquecimento na atomização, garantindo uma maior homogeneização no mecanismo de atomização; uso de modificador químico, possibilitando uma maior eficiência durante a pirólise; eficiente correção de fundo, garantindo assim correção de interferências espectrais, entre outros. [26,32]

O elevado fundo característico da técnica de SS pode ser contornado com a utilização de sistemas de correção de fundo eficiente. Apesar de haver relatos na literatura de estudos empregando correção de fundo por efeito Zeeman ou Smith-Hieftje [32], a utilização da técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) é claramente mais vantajosa. Por permitir a visualização de toda a região espectral no qual a linha analítica está contida e também possuir um avançado sistema de correção de fundo, a HR-CS AAS possibilita a escolha do melhor artifício para se evitar a interferência. [28]

2.3 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

Até metade do século XX, devido a limitações instrumentais dos primeiros espectroscópios de absorção atômica, a maior parte dos experimentos para quantificação elementar baseavam-se na emissão óptica, por essa oferecer uma melhor visualização sob um anteparo negro.[33,34]

Em 1952, um físico britânico, Dr. Alan Walsh (Figura 2), questionou a descrença na espectrometria de absorção atômica. Até então, os espectroscópios de absorção atômica, utilizavam fonte contínua como fonte de radiação, mas seu emprego para análises quantitativas apresentava uma grande limitação: para que a radiação absorvida por átomos pudesse ser medida quantitativamente, uma alta resolução (de 2 pm) seria necessária. Walsh sugeriu, então, que fontes de radiação que emitissem em estritos intervalos de comprimento de onda fossem empregadas, dando origem ao desenvolvimento de fontes de emissão de linhas, em especial das lâmpada de catodo oco (HCL), sendo estas utilizadas até hoje.[33-35]



Figura 2. Sir Alan Walsh visionário da técnica de espectrometria de absorção atômica

Diversas vantagens provinham do uso da espectrometria de absorção atômica utilizando fonte de linha (LS AAS), dentre as quais, pode-se citar: aparelhagem simples, por dispensar o uso de um monocromador de alta resolução, permitindo assim difundir a técnica; elevada seletividade, uma vez que o espectro de radiação emitido é característico do elemento que compõe a lâmpada e redução de interferências espectrais geradas devido à sobreposição de linhas analíticas, sendo esta uma grande vantagem em relação à espectrometria de emissão óptica (OES).[34] Apesar dessas vantagens a técnica apresenta diversas limitações, entre elas a análise monoelementar, tornando a determinação de diversos elementos uma tarefa demorada; necessidade de se ter uma coleção de lâmpadas, devido à HCL ser exclusiva para cada elemento, e principalmente, devido a falta de informação obtida na região da análise; como uma estreita faixa do espectro é utilizada na análise, se obtém uma limitada informação da região espectral.[33-35]

Esta última limitação é extremamente complexa, uma vez que a absorção medida na linha escolhida, além de átomos, pode também ser proveniente de moléculas ou pela radiação espalhada por partículas presentes no atomizador, gerando com isso sinal de fundo que, se corrigido de maneira inadequada pode levar a interferências espectrais. Para que a correção fosse bem sucedida, o fundo deveria ser determinado em uma segunda medida e então, subtraído da absorção total obtido na primeira medida. Em decorrência disso, diversos sistemas de correção de fundo foram propostos, tais como correção do fundo por lâmpada de deutério, por efeito Zeeman, levando a uma instrumentação mais complexa e logicamente encarecendo a técnica.[33,34]

Apesar da correção ser geralmente bem sucedida, a HR-CS AAS, ainda não havia sido esquecida. Vários grupos de pesquisa ainda buscavam aprimorar a técnica, o que culminou em meados da década de 90, com a elaboração do primeiro instrumento com a configuração mais próxima a atual.[34]

Em 1996, Heitmann e colaboradores[36], descreveram em um artigo aquela que viria a ser a configuração mais próxima à conhecida hoje do instrumento de HR-CS AAS (Figura 3). A espectrometria de absorção atômica de alta resolução utilizando fonte contínua seria composta por uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, formada por dois eletrodos de tungstênio, operando em modo *hot spot*, a partir da qual seria emitida uma radiação de alta intensidade e na faixa

da região do UV-visível. Esta, ao passar pelo atomizador chegaria a um monocromador duplo de alta resolução (Double Echelle Monochromator, DEMON), constituído por um prisma pré-dispersor, com a função de separar o espectro da radiação incidente, na região de interesse, e também uma rede de difração Echelle, sendo responsável pela alta resolução do intervalo seleccionado anteriormente. Finalmente a radiação emitida e transmitida, após ser seleccionada, atinge o detector, constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) contendo 512 pixels fotossensíveis independentes. Destes 200 são destinados a fins analíticos, permitindo a visualização de 200 a 500 pm da região espectral na qual está contida a linha analítica.[34,35]

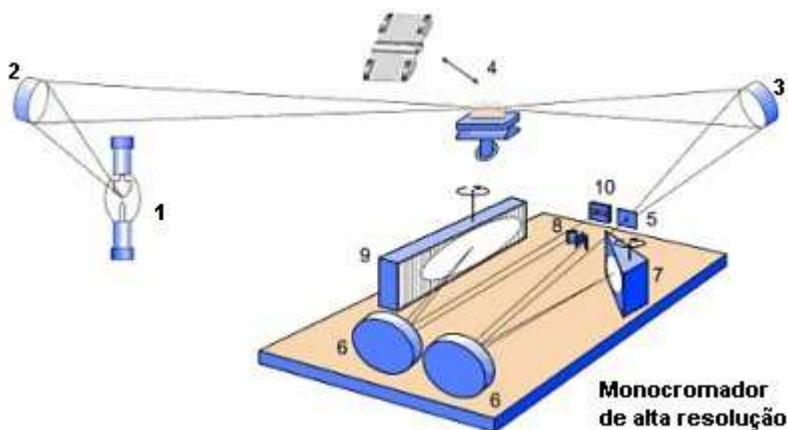


Figura 3. Conceito instrumental da HR CS-AAS, contendo: 1) lâmpada de arco curto de xenônio; 2,3) espelhos elipsoidais; 4) atomizador; 5) fenda de entrada; 6) espelhos parabolóides; 7) prisma; 8) fenda intermediária ajustável; 9) rede echelle e 10) detector CCD.[34]

Entre suas qualidades, a HR-CS AAS, possui: uma intensidade maior do que a tradicional HCL, o que oferece à técnica limites de detecção menores devido a uma maior razão sinal/ruído; sistema de estabilização do comprimento de onda, baseado nas linhas espectrais de uma lâmpada de neônio; visualização de todo o ambiente espectral no qual a linha analítica está contida, permitindo, assim, a melhor correção

de fundo e principalmente um avançado e eficiente sistema de correção de fundo. [33-35]

Devido os 200 pixels utilizados para fins analíticos poderem atuar como detectores independentes, o *software* do equipamento confere à técnica, a capacidade de correção de eventos contínuos, isto é, que influenciam todos os pixels do detector de maneira similar. Para isso, antes da medida, diversas varreduras são realizadas, sendo então armazenadas no *software* do equipamento, servindo como referência. Após a leitura, cada intensidade individual medida é dividida pela intensidade captada por cada pixel da leitura de referência, garantindo, assim, a correção para fundo causado por espalhamento de radiação por partículas vaporizadas no atomizador como também de erros sistemáticos, provenientes das oscilações de intensidade do aparelho.[37]

Em casos onde há interferência espectral para a sua correção, é possível utilizar o artifício matemático do *software*, denominado algoritmo de mínimos quadrados. Nesse caso, o *software* do equipamento permite medir e armazenar o espectro característico da molécula diatômica, através da leitura de uma solução que irá gerar a molécula, obtendo assim o espectro de referência. Após a leitura de uma amostra onde é presenciada a interferência, o *software* permite a redução do espectro de referência, do espectro obtido da amostra, gerando assim o espectro do analito, sem nenhuma sobreposição espectral. Para isso, o procedimento matemático utilizado envolve o ajuste linear do espectro de referência em cada espectro da amostra, através de seu aumento ou diminuição, por um fator de magnificação. As diferenças entre os espectros, assim como seus quadrados, são calculados pixel por pixel, sendo adicionada, a soma final, os valores de seus quadrados. Por fim, o fator de magnificação é variado de modo a minimizar a soma dos quadrados, ou seja, busca encontrar “mínimos quadrados”. [35]

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo versa sobre o desenvolvimento de um método para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr a nível traço em amostras biológicas e botânicas por análise direta de amostras sólidas utilizando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite.

3.2 Específicos

Visando a realização do objetivo geral, como objetivos específicos, temos:

- Investigação e otimizações dos parâmetros operacionais para a HR-CS AAS, tais como: tempo de integração e escolha de linhas espectrais adequadas à sensibilidade do analito;
- Otimização do programa de temperatura, incluindo temperatura de pirólise e atomização, visando uma temperatura ótima para a separação do analito da matriz problemática;
- Avaliação do uso de modificadores químicos para o desenvolvimento do método, avaliando a utilização de modificadores em solução e termicamente depositados sobre a plataforma de grafite;
- Investigação acerca da presença de fundo estruturado e avaliação dos métodos de correção;
- Estudo da microhomogeneidade das amostras certificadas de referência utilizadas na confecção das curvas de calibração e das amostras reais;
- Investigação e avaliação de curvas de calibração e da possibilidade de calibração empregando soluções aquosas;
- Obtenção dos parâmetros de mérito, tais como: limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade da curva e coeficiente de correlação para SS HR- CS AAS utilizando o método otimizado;
- Determinação de Mn, Ni, Sr e Rb em amostras “reais” e certificadas de origem botânica e biológica.

4 METODOLOGIA

4.1 Instrumentação

Para a realização do presente estudo utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) equipado com forno de grafite aquecido transversalmente como atomizador. O ContrAA 700 é constituído por uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade operando em modo “*hot-spot*”, um monocromador duplo de alta resolução DEMON (Double Echelle Monochromator), consistindo de um prisma pré-dispersor e uma rede de difração echelle em arranjo Littrow, e um detector constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD) possuindo 200 pixels para fins analíticos. A inserção direta das amostras foi conduzida através de um amostrador automático de sólidos SSA 600 (Analytik Jena), composto por um conjunto de micro-piças, com a função de transportar plataformas SS com recobrimento de grafite pirolítico (“boats”) até o forno de grafite. As amostras sólidas eram inseridas manualmente nas plataformas através de uma microespátula de aço inoxidável, enquanto o padrão aquoso, para o preparo da curva de calibração aquosa, foi injetado sobre a plataforma com o uso de micropipetadores com ponteiros descartáveis. Conduziram-se todos os experimentos em tubos e plataformas SS com recobrimento pirolítico para a análise de sólidos.

Para a verificação da exatidão do método proposto, as amostras digeridas foram analisadas com um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) Elan 6000 (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Canada) foi utilizado. Utilizou-se gás argônio de elevada pureza 99.996% (White Martins, São Paulo) como gás de purga e de proteção para o instrumento de HR-CS ET AAS e para a geração do plasma e como gás carreador do aerosol em ICP-MS. Para o preparo das amostras utilizadas no ICP-MS utilizou-se digestão assistida por micro-ondas por um forno micro-ondas MLS 1200 Mega (Milestone, Sorisole, Itália).

Para a liofilização das amostras de tecido animal utilizou-se um liofilizador modelo LL3000 (Thermo Scientific Heto PowerDry, Cedex, França).

As condições de compromisso para o ICP-MS estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros operacionais do ICP-MS

| | |
|--------------------------------|---|
| Cone amostrador/skimmer | Pt |
| Medida de Sinal | <i>Peak hopping</i> |
| Voltagem da lente | 8 V |
| Voltagem do detector | Pulso: 1300 V Analógico: -2925 V |
| Rádio Frequência: | 1150 V |
| Vazão do fluxo de gás | |
| Principal: | 15 L min ⁻¹ |
| Auxiliar: | 1,2 L min ⁻¹ |
| Nebulizador: | 1,1 L min ⁻¹ |
| Tempo morto | 50 ns |
| Dwell time | 50 ms |

Na tabela 2, temos os valores estabelecidos para as temperaturas ótimas de pirólise e atomização para os elementos Mn, Ni, Sr e Rb, sendo estes valores discutidos no decorrer do estudo.

Tabela 2. Programa de temperatura para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr por SS HR-CS AAS

| Etapa | Temperatura (°C) | Rampa (°C s⁻¹) | Permanência (s) |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------------|
| Secagem | 110 | 5 | 10 |
| Pirólise | 800 ^c / 900 ^d / 1000 ^{a,b} | 300 | 10 |
| Atomização | 2500 ^{a,c} / 2600 ^{b,d} | FP | 5 |
| Limpeza | 2600 ^{a,c} / 2700 ^{b,d} | 500 | 4 |

a) para o Mn; b) para o Ni ; c) para o Rb e d) para o Sr.

4.2 Amostras, reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Peróxido de hidrogênio 30% (m/m) e ácido nítrico 65% (m/m) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido nítrico foi bi-distilado abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Água

deionizada com resistividade de 18.2 M Ω cm foi produzida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de Mn, Ni, Rb e Sr (SpecSol, São Paulo), W e NH₄H₂PO₄ (SPEX, Edison, EUA) e Mg(NO₃)₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizadas. Soluções de calibração foram preparadas através de diluição apropriada da solução padrão de estoque e acidificadas com HNO₃ 0,14 molL⁻¹.

Os seguintes materiais certificados de referência foram utilizados: TORT-2 “hepatopâncreas de lagosta” do National Research Council Canada (NRC – Ottawa, ON, Canadá); NIST 8414 “músculo bovino”, NIST 1566b “tecido de ostra”, NIST 8433 “farelo de milho” e NIST 1515 “folhas de macieira” do National Institute of Standards and Technology (NIST – Gaithersburg, MD, EUA); BCR 186 “rim suíno” proveniente do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM – Bruxelas, Bélgica); e CTA-OTL-1 “folhas de tabaco oriental” do Institute of Nuclear Chemistry and Technology (ICHTJ – Warsaw, Polônia).

Amostras reais de guaraná, músculo de peixe, fígado de boi e tecido de ostra, foram adquiridas no mercado local de Florianópolis e analisadas empregando a metodologia otimizada.

4.3 Procedimento experimental

Devido à ausência de amostras de referência certificadas de guaraná, realizou-se, a digestão assistida por micro-ondas de 3 amostras de guaraná, para posterior análise por ICP-MS. As amostras botânicas foram aleatoriamente escolhidas e peneiradas em uma malha de diâmetro de 67 μ m, sendo posteriormente nomeadas de G0 até G4. Estas, foram pesadas, em alíquotas contendo entre 300 e 500 mg em frascos de PFA, seguido pela adição de 5 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ 30%. A mistura foi então submetida à digestão assistida em micro-ondas utilizando o programa mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa utilizado na digestão assistida por microondas das amostras

| Step | Time (min.) | Potency (W) |
|------|-------------|-------------|
| 1 | 2 | 250 |
| 2 | 2 | 0 |
| 3 | 6 | 250 |
| 4 | 5 | 400 |
| 5 | 5 | 650 |

Realizou-se a análise em ICP-MS utilizando a curva de calibração com padrões aquosos com concentrações de 1 até 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito, em meio ácido de 0,14 mol L^{-1} , tendo Rh como padrão interno.

Para as medidas pela técnica de HR-CS AAS, foram selecionadas linhas secundárias para Mn, Rb e Ni, de 403,076; 420,180 e 231,096 nm respectivamente, em função da alta concentração destes elementos nas amostras analisadas. Utilizou-se a linha principal para o Sr de 460,733 nm para todas as análises. Todas as medidas foram conduzidas no mínimo em triplicata, avaliando-se o valor da área do perfil do sinal analítico (absorbância integrada) sobre três pixels (pixel central ± 1).

A avaliação do uso de modificadores incluiu o uso de modificadores convencionais como o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, assim como o modificador permanente de W, na determinação de níquel e estrôncio. Para isso, a plataforma SS foi recoberta termicamente com 500 μg de W, através de 25 injeções de 20 μl de uma solução de 1000 mg L^{-1} de W, seguindo o tratamento térmico descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Programa de temperatura utilizado para o recobrimento da plataforma SS

| Etapa | Temp. (°C) | Rampa (°Cs⁻¹) | Permanência (s) |
|-------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------|
| Secagem | 80 | 6 | 20 |
| Secagem | 90 | 3 | 20 |
| Secagem | 110 | 5 | 10 |
| Pirólise | 350 | 50 | 20 |
| Pirólise | 1300 | 300 | 10 |
| Atomização | 2300 | 1500 | 4 |
| Limpeza | 2450 | 500 | 4 |

Curvas de pirólise e atomização foram construídas para cada elemento utilizando as soluções padrão de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Rb e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais elementos, bem como amostra de guaraná e amostras biológicas, com a inserção de alíquotas contendo entre 80 e 700 μg de amostra.

Para a quantificação das amostras utilizou-se amostras de referência certificadas de tecido animal e vegetal avaliando-se a melhor curva a ser utilizada de acordo com o elemento de interesse, a partir da

adição de massas crescentes de amostra. Foram construídas também curvas de calibração com padrões aquosos em meio HNO_3 .

Um estudo de micro-homogeneidade foi realizado analisando-se diferentes quantidades das amostras botânicas, biológicas e certificadas utilizadas, pesando-se massas de 11 a 3305 μg , de acordo com cada elemento. Através dos resultados obtidos, calculou-se o fator de homogeneidade de acordo com Kurfürst[26] .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha de linhas alternativas para a determinação de Mn, Ni e Rb

Apesar de uma elevada sensibilidade ser desejada em procedimentos analíticos, esta, pode ter um efeito contrário na análise direta de sólidos. Devido à elevada concentração de analitos presente na amostra e na dificuldade de sua diluição, caso a sensibilidade do instrumento não seja diminuída, é possível que mesmo com pequenas quantidades de massa utilizadas na análise, seja ultrapassado o limite de linearidade da curva de calibração. Além disso, uma pequena quantidade de massa estaria sujeita a apresentar uma menor precisão na análise, caso a amostra seja heterogênea.

Visando à minimização deste problema, são relatados na literatura artifícios como uso do fluxo de gás interno no forno durante a atomização, removendo prematuramente os átomos do caminho óptico e a mistura da amostra com pó de grafite de alta pureza. Estes, além de cooperaram para uma maior fonte de incerteza na análise, diminuindo a precisão da técnica, ainda podem acarretar na contaminação da amostra durante sua diluição. [32] Outro meio de contornar essa dificuldade, consiste na utilização de linhas alternativas do analito na análise, ao custo da redução na sensibilidade. Esta é uma alternativa mais indicada para a técnica de HR-CS AAS, uma vez que devido à elevada intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de xenônio não há comprometimento da razão sinal/ruído, tornando possível a análise com boa precisão.

Em função da elevada concentração de Mn, Ni e Rb nas amostras, optou-se por utilizar linhas alternativas na análise. Para o Mn, utilizou-se a linha de 403,076 nm, cuja sensibilidade é de cerca de 7% em relação à linha principal. Já para o Ni optou-se pela linha de 231,096 nm com 40% da sensibilidade da linha principal, enquanto para o Rb a

linha escolhida foi de 420,018 nm, com uma sensibilidade de apenas 0,6% da linha principal. Apesar de uma linha analítica menos sensível permitir a introdução de uma maior massa da amostra no forno de grafite, a nova faixa espectral de análise pode estar sujeita a interferências espectrais provenientes do espectro de excitação de moléculas diatômicas. Todavia, este problema pode ser contornado pela técnica de HR-CS AAS dado o eficiente sistema de correção de fundo presente na técnica.[34]

5.2 Otimização dos parâmetros térmicos

Avaliou-se a melhor temperatura de pirólise que possibilitasse a eliminação da matriz sem que houvesse a perda significativa do analito; como também a temperatura de atomização ideal que fornecesse a maior intensidade do sinal analítico e melhor perfil do pulso de absorção, assim como uma menor temperatura, levando a um menor desgaste do forno e da plataforma de grafite.

A otimização da temperatura de pirólise e atomização, constitui uma etapa crítica do desenvolvimento metodológico da SS. Uma temperatura baixa de pirólise acarretaria numa eliminação incompleta da matriz da amostra resultando assim no surgimento de um fundo contínuo devido ao espalhamento da radiação por partículas. Como a amostra está sendo inserida sem nenhum tratamento ou diluição a quantidade de matriz é amplificada em relação à análise de soluções e, portanto, a análise utilizando SS é mais sujeita a estes efeitos. Assim como a otimização da temperatura de pirólise, a otimização da temperatura de atomização, apresenta alguns desafios. Apesar de estar sob as mesmas condições e propriedades termo-físicas do forno, devido à energia de ligação entre o analito e os concomitantes da matriz, o mecanismo de atomização do analito nas amostras e nos padrões podem distinguir. Com isso, as amostras e os padrões além de poderem apresentar diferentes formatos do perfil do sinal transiente, podem também, diferir no tempo do aparecimento do sinal no forno.

Segundo Kurfürst [26], após ter passado pela etapa de secagem, o analito do padrão aquoso estaria na forma de uma fina camada do sal, sendo atomizado logo que a parede atingisse a temperatura necessária; enquanto a amostra sólida, por ter um menor contato com a parede teria sua atomização prejudicada exibindo um perfil alargado, assim como o aparecimento do sinal em um tempo maior.

A otimização da temperatura de pirólise para Mn teve início utilizando-se a amostra certificada de referência NIST 8414 (músculo bovino), uma amostra de guaraná em pó e também padrão aquoso (contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$). É possível notar pelas curvas de pirólise mostradas na Figura 4, que o analito apresenta uma boa estabilidade térmica não apresentando nenhuma queda representativa nas três curvas. Os maiores desvios foram observados para a amostra de guaraná o que sugere um menor grau de homogeneidade do analito na amostra frente à amostra de referência certificada. Manteve-se a temperatura de pirólise de $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ para o Mn.

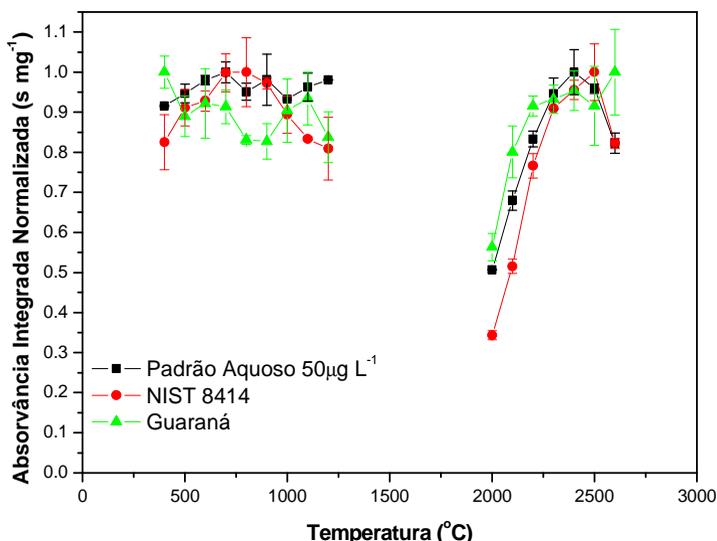


Figura 4. Curvas de pirólise e atomização para Mn (403,076 nm) utilizando-se padrão aquoso, amostra certificada de músculo bovino (NIST 8414) e amostra de guaraná; obtidas por SS HR-CS AAS. Temperatura de atomização de $2300 \text{ }^\circ\text{C}$, de pirólise de $1000 \text{ }^\circ\text{C}$; sem uso de modificador químico.

A otimização da temperatura de atomização foi realizada sob as mesmas condições. Nota-se que as três curvas apresentaram um comportamento semelhante. Para a solução aquosa, o sinal transiente apresentou um perfil adequado após atingir a temperatura de $2400 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto para as amostras sólidas um perfil semelhante só foi notado a uma temperatura de $2500 \text{ }^\circ\text{C}$, devido a influência da matriz na

atomização. Como temperatura de atomização de compromisso foi escolhida a temperatura de 2500 °C.

A seguir, realizou-se a otimização da temperatura de pirólise para o Ni, utilizando-se padrão aquoso, amostra TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta) e a amostra de guaraná. Não foi possível utilizar a amostra NIST 8414 nesta parte do estudo, devido à baixa concentração do analito na amostra ($0,05 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$) e a forte interação entre o analito e a matriz, inviabilizando seu uso.

Graças à capacidade de visualização de toda a região espectral no entorno da linha analítica, observou-se que para as amostras sólidas (botânicas e biológicas), analisadas na região espectral de 231,096 nm (linha de absorção do Ni), havia a presença de fundo estruturado (Figura 5).

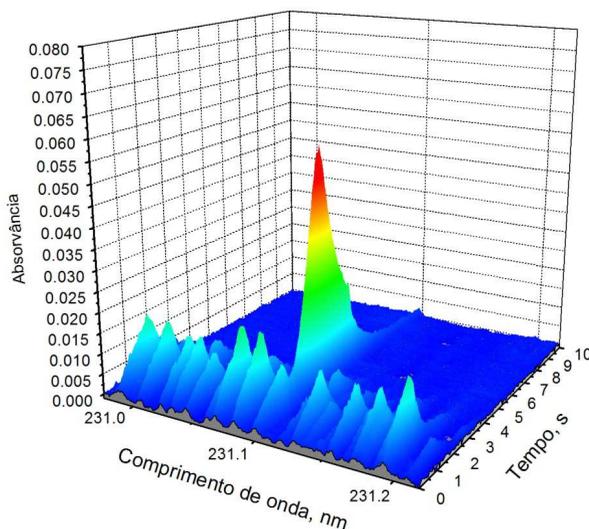


Figura 5. Espectro de absorção resolvido temporalmente para Ni (231,096 nm) na amostra TORT-2 obtido por SS-HR CS AAS a uma temperatura de pirólise de 700 °C e de atomização de 2600 °C.

Como o fundo poderia acarretar em interferência espectral levando a valores errôneos de quantificação, realizou-se a investigação acerca da identidade da molécula causadora do fundo, uma vez que não foi possível a separação através do ajuste temporal do sinal analítico.

Através dos espectros de referência armazenados no *software* do equipamento, observou-se que o fundo estruturado seria proveniente das moléculas diatômicas de PO, para a amostra TORT-2 e de SiO para a amostra de guaraná.

Para contornar esse problema, uma vez que esta interferência levaria a valores errôneos de absorvância, realizou-se a correção por mínimos quadrados. Gerou-se os espectros moleculares correspondentes, introduzindo-se no forno de grafite 20 μL de soluções aquosas contendo 250 mg L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 250 mg L^{-1} de Na_2SiO_3 , resultando nos espectros moleculares de PO e SiO, respectivamente, sendo estes então armazenados e utilizados como espectros de referência para o fundo. Os espectros são mostrados na Figura 6.

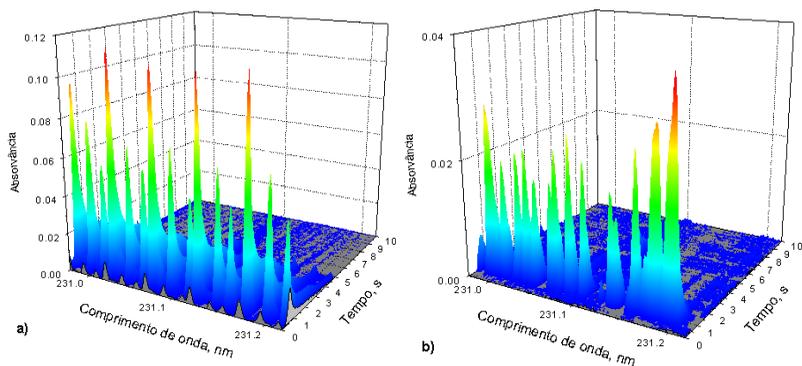


Figura 6. Espectros de referência utilizados pela correção por mínimos quadrados: a)Espectro da molécula SiO; b)Espectro da molécula PO.

Através de um artifício matemático presente no *software* (algoritmo de mínimos quadrados), é possível “subtrair” os espectros de referência dos espectros obtidos originalmente para as amostras, obtendo-se assim um sinal analítico isento das interferências causadas por estas moléculas.

Com a utilização da correção de fundo por mínimos quadrados, foram obtidas as curvas de pirólise para o Ni, demonstradas na Figura 7, a seguir. É possível notar, pelo perfil das três curvas obtidas, que o comportamento térmico do Ni é semelhante nas amostras. Os maiores desvios foram, novamente, observados para a amostra de guaraná. A

manutenção do sinal analítico mesmo com a utilização de elevadas temperaturas de pirólise, demonstra a alta estabilidade térmica do Ni. Devido à estabilidade presenciada, optou-se por utilizar a temperatura de pirólise em 1000 °C para este elemento.

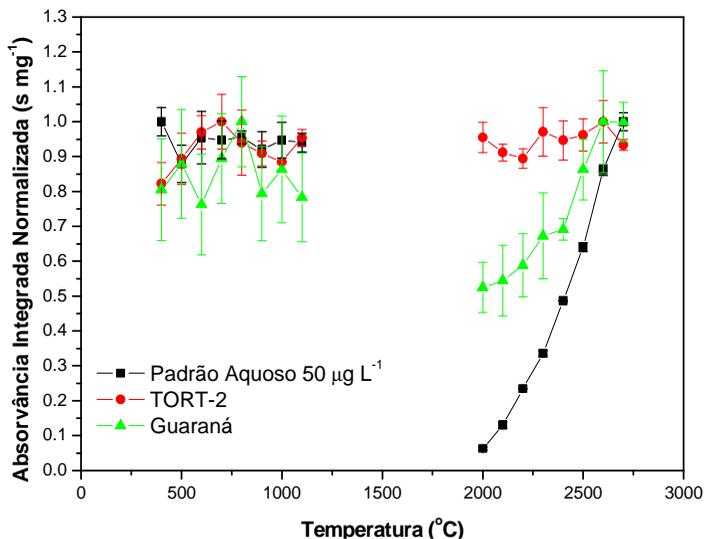


Figura 7. Curvas de pirólise para Ni (231,096 nm) utilizando-se padrão aquoso, amostra certificada de hepatopâncreas de lagosta (TORT-2) e amostra de guaraná; obtidas por SS HR-CS AAS. Temperatura de atomização de 2600 °C , de pirólise de 1000 °C; sem uso de modificador químico.

No decorrer desta parte do estudo, observou-se que para a solução padrão o Ni apresentava em seu sinal uma cauda, provavelmente proveniente da formação de carbetos, prolongando sua atomização [33]. Em função disto, avaliou-se o uso de diferentes modificadores, com o intuito principal de limitar a interação do analito com o carbono da plataforma, melhorando o perfil do sinal transiente.

O uso de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e W como modificadores, não foi bem sucedido. Além de não resultarem em nenhum ganho significativo no sinal do analito para as amostras, como já era esperado, o uso de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ fez com que a solução padrão apresentasse fundo estruturado, proveniente da molécula de PO. Observou-se também que o uso do modificador permanente (W) não diminuiu a interação entre a plataforma e o analito, uma vez que o perfil ainda apresentava uma

cauda. Assim, optou-se por realizar a determinação sem a presença de modificadores, uma vez que a sensibilidade apresentada era suficiente para a quantificação, o efeito de memória era desprezível e uma temperatura de pirólise alta poderia ser aplicada.

Durante o estudo da melhor temperatura de atomização para o Ni, observou-se que para o padrão aquoso o sinal apresentava um perfil alargado até a temperatura de atomização de 2400 °C, vindo a desenvolver um perfil mais estreito a partir de 2500 °C. Além disso, a intensidade do sinal analítico apesar de não ter alcançado um patamar, apresentou um menor aumento após ter atingido a temperatura de 2600 °C. Já para as amostras sólidas o perfil do sinal analítico já era estreito a partir de 2000 °C, porém a sensibilidade máxima só fora alcançada a partir de 2500 °C. Provavelmente o Ni presente na solução aquosa, estaria sendo adsorvido por capilaridade aos interstícios de carbono da plataforma de L'vov, o que favorece a formação de espécies refratárias durante a atomização. Isso explicaria a ausência de um patamar na curva de atomização, para a solução aquosa. Como temperatura de compromisso de atomização optou-se pela temperatura de 2600 °C.

Para o estudo da temperatura de pirólise para o Rb, utilizou-se, além do padrão aquoso, a amostra NIST 8414 (músculo bovino) e a amostra de guaraná, obtendo-se as curvas demonstradas na Figura 8. Avaliando-se o perfil da curva da amostra NIST 8414 é possível notar que após alcançar a temperatura de 600 °C tem-se um pequeno decréscimo na absorvância integrada, ou seja, a temperaturas de pirólise mais altas o analito estaria sendo volatilizado prematuramente. Provavelmente o analito encontra-se menos ligado aos componentes da matriz, oferecendo uma menor estabilidade térmica ao analito. Apesar disso, a temperatura de pirólise de compromisso para o Rb escolhida, foi de 800 °C. Nesta temperatura temos um menor desvio para o padrão aquoso assim como a amostra certificada biológica, além disso, a escolha de uma temperatura baixa de pirólise como condição ótima poderia acarretar em um fundo contínuo, como já mencionado. Outro possível efeito decorrente da eliminação incompleta da matriz seria a diminuição da uniformidade do mecanismo de atomização levando a ineficiente atomização, confirmada por um espectro de absorção alongado. Além disso, uma diferença na eficiência de atomização resultante de uma pirólise baixa poderia vir a prejudicar a utilização de soluções aquosas para a quantificação.

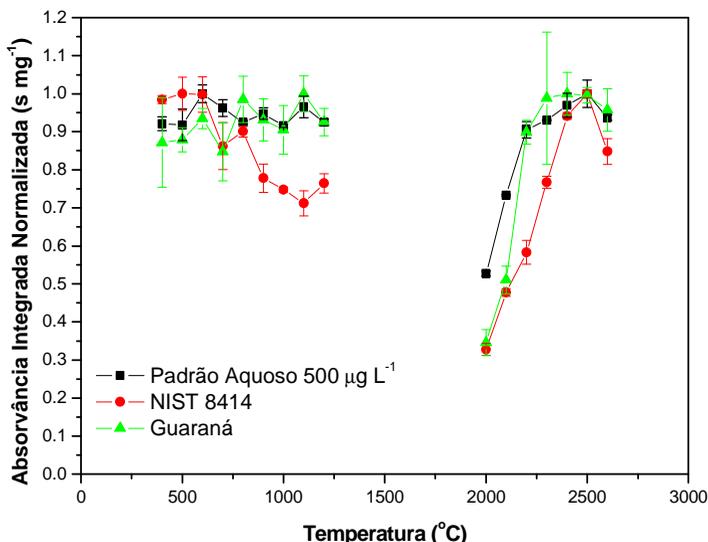


Figura 8. Curvas de pirólise e atomização para Rb (420,018 nm) utilizando-se padrão aquoso, amostra certificada de músculo bovino (NIST 8414) e amostra de guaraná; obtidas por SS HR-CS AAS. Temperatura de atomização de 2500 °C, de pirólise de 700 °C; sem uso de modificador químico.

Durante a otimização da temperatura de atomização do Rb, percebeu-se que para as amostras sólidas o sinal só apresentou um perfil estreito e magnitude máxima a partir de 2500 °C. Para o padrão aquoso, o sinal de absorvância integrada já possuía a magnitude máxima e o perfil ideal em 2300 °C. É possível notar também que na amostra de tecido bovino como já mencionado no estudo da otimização da temperatura de pirólise, o analito está ligado fracamente a componentes da matriz, apresentando uma forte influência pela temperatura, evidenciado pelo perfil estreito do gráfico de atomização para esta amostra. Como temperatura de atomização foi escolhida a de 2500 °C.

A otimização dos parâmetros térmicos para o Sr, foi complexa. Durante a avaliação da temperatura de pirólise, notou-se um pronunciado efeito de memória para o padrão aquoso, ocasionado pela formação de espécies refratárias, originadas provavelmente pelo contato do analito com a superfície da plataforma[33]. Com isso, sinal analítico residual era notado mesmo na ausência da amostra.

Para contornar esse problema, foi avaliada a utilização da plataforma de L'vov, recoberta por um modificador permanente

(tungstênio), que teria a função de recobrir os interstícios do carbono, selando a plataforma e com isso diminuindo a interação do analito com o grafite eletrolítico reativo. Todavia, o uso deste modificador teve efeito contrário ao esperado, isto é, diminuiu a intensidade do perfil do sinal analítico, além de fazer com que o sinal transiente apresentasse uma grande cauda, indicando uma maior interação entre a plataforma e o analito e com isso diminuindo a eficiência da atomização, vindo a requerer o uso de uma temperatura maior para uma atomização mais eficiente. Estes efeitos, também foram descritos por outros autores[38], que concluíram que pelo fato da plataforma possuir uma temperatura mais baixa do que a parede de forno, o sinal seria suprimido.

Uma vez que a remoção da plataforma de L'vov para a introdução de amostras é impossível, já que a amostra é inserida diretamente na plataforma SS e então direcionada ao forno e baseado no estudo citado e em estudos similares[39] utilizou-se na otimização dos parâmetros térmicos do para Sr, uma **plataforma nova, sem uso anterior**, revestida piroliticamente. Esta, em conjunto com uma **temperatura de limpeza de 2700 °C**, permitiam a eliminação em grande parte do efeito de memória, além de um **perfil de absorvância mais simétrico** por aproximadamente 90 queimas, levando ao prosseguimento dos estudos.

Mesmo sob as condições citadas, devido provavelmente à alta concentração de Sr e a forte interação entre o analito e os concomitantes da matriz, o uso da amostras biológica certificadas de referência NIST 1566b, levou a um pronunciado efeito de memória, impossibilitando seu uso nessa otimização. Logo, para a otimização da temperatura de pirólise do Sr, utilizou-se o padrão aquoso e a amostra de guaraná.

Na Figura 9, observou-se que para a solução aquosa, o analito apresentou-se estável termicamente até 1000 °C, sendo então atomizado e perdido em temperaturas maiores, enquanto na amostra de guaraná a estabilidade térmica foi consideravelmente maior. Como condição de compromisso, foi selecionada a temperatura de pirólise de 900 °C, uma vez que uma temperatura de 1000°C, estaria no limite de estabilidade térmica do analito.

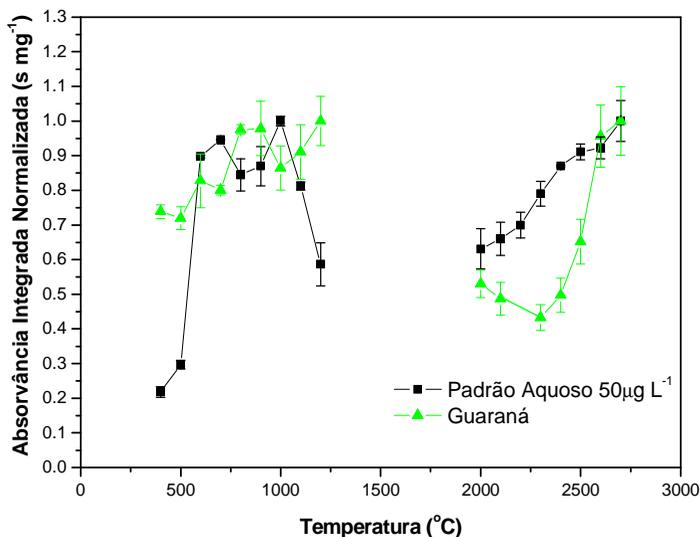


Figura 9. Curvas de pirólise para Sr (460,73 nm) utilizando-se padrão aquoso e amostra de guaraná; obtidas por SS HR-CS AAS. Temperatura de atomização de 2600 °C , de pirólise de 900 °C; sem uso de modificador químico.

Durante o experimento, observou-se que em 2000 °C, para Sr no padrão aquoso, o sinal de absorvância integrada já apresentava um perfil adequado, apesar da presença de uma pequena cauda, característica de elementos refratários. Notou-se também um elevado ganho de sensibilidade a partir de 2300 °C, apresentando ganhos pequenos com as temperaturas subsequentes. Já para a amostra sólida, devido a uma maior interação do analito com a matriz, só foi observado um ganho de sensibilidade pronunciado, assim como um perfil ideal a partir de uma temperatura de 2600 °C, sendo esta a temperatura de atomização escolhida como compromisso.

Apesar de temperaturas maiores, levarem à maior sensibilidade e maior simetria de sinal, o desgaste prematuro da camada do carbono pirólítico na plataforma levaria a um alargamento do sinal, devido a um maior contato do analito com os sítios intersticiais do carbono e, conseqüentemente, a plataforma teria seu tempo de vida extremamente reduzido.

5.3 Avaliação da homogeneidade das amostras certificadas de referência e das amostras reais

No início do desenvolvimento da técnica de análise direta de sólidos, a falta de homogeneidade das amostras revelou-se um sério problema, limitando drasticamente suas aplicações e tornando-a inviável para fins de quantificação. Esta fonte de incertezas, causada por diferenças aleatórias da concentração de analito nas amostras medidas, ilustra um erro de amostragem[26].

Segundo Kurfürst [26], dois fatores são responsáveis pelo surgimento desses erros: a variada concentração do analito em diferentes frações da partícula da amostra e a segregação de frações de diversas partículas, que tendem a contribuir para o grau de heterogeneidade, levando ambos a um aumento da incerteza na medida. Partículas de diferentes tamanhos e formatos além de poderem possuir diferentes concentrações do analito em sua composição, podem ter sua heterogeneidade pronunciada caso a segregação não seja levada em consideração.

Como subterfúgio para a minimização desses efeitos é possível realizar a moagem e peneirar a amostra, obtendo-se uma menor granulometria assim como, uma maior uniformidade dos diâmetros de partículas. [40,41] Devido a isto, no presente estudo, todas as amostras certificadas de referência e amostras reais, foram peneiradas em malha de poliéster de 67 μm , garantindo assim uma maior homogeneização das mesmas.

Em decorrência da falta de informações providas das propriedades da amostra, Kurfürst e colaboradores, introduziram na década de 80, o conceito de fator de homogeneidade (H_e), o qual busca caracterizar amostras sólidas quanto à homogeneidade para pequenas massas de amostras, se tornando mais uma ferramenta útil à análise direta de sólidos. O qual pode ser calculado segundo a equação 1:

$$H_e = S_H \sqrt{m} \quad (1)$$

Onde, o fator de homogeneidade se relaciona com a imprecisão ocasionada pelo erro de amostragem (S_H), estimada diretamente a partir dos valores do coeficiente de variação das medidas (RSD) das medidas e também pela massa da amostra (em mg).

Na Tabela 5 são apresentados, para cada intervalo de massa avaliado na distribuição de Mn, Ni, Rb e Sr, os valores de H_e para cada amostra certificada de referência utilizada nas confecções das curvas e para as amostras reais.

Tabela 5. Fator de homogeneidade (H_e) calculado para amostras de referência certificadas, amostras reais de guaraná, cação em poça, fígado de boi e tecido de ostras, peneiradas em malha de $67\mu\text{m}$.

| Amostras | Mn H_e (mg $^{1/2}$) | Ni H_e (mg $^{1/2}$) | Rb H_e (mg $^{1/2}$) | Sr H_e (mg $^{1/2}$) |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| G0 | 5,24 | 9,14 | 5,37 | 6,38 |
| G1 | 2,81 | 3,68 | 5,63 | 4,50 |
| G2 | 7,57 | 5,93 | 5,33 | 4,58 |
| G3 | 2,90 | 9,13 | 3,60 | 6,34 |
| G4 | 7,76 | 8,77 | 6,41 | 5,36 |
| Músculo de peixe | 4,88 | 4,69 | 6,12 | 2,04 |
| Fígado de boi | 7,32 | 8,85 | 8,40 | 5,88 |
| Tecido de ostra | 1,93 | 8,46 | 8,21 | 4,62 |
| CRM | | | | |
| BCR 186 | 7,58 | * | * | * |
| TORT-2 | 5,68 | 5,88 | * | * |
| NIST 1566b | * | 4,73 | 6,34 | * |
| NIST 8414 | * | * | 2,96 | 3,00 |
| NIST 1515 | 4,89 | 5,78 | 6,08 | * |
| NIST 8433 | 2,91 | 4,80 | * | 6,77 |
| CTA OTL-1 | * | * | 4,57 | * |

*Não foram calculados

Para a determinação do fator de homogeneidade, pesaram-se massas de 50 a 537 μg das amostras de guaraná, 59 até 792 μg de amostras biológicas e 11 até 3305 μg de massa para as amostras certificadas de referência. É possível observar que Sr apresentou a melhor homogeneidade para as diversas amostras utilizadas, lembrando que o mecanismo de atomização pode diferir de acordo com o analito e a matriz no qual está presente, isto é, de acordo a espécie presente. Considerando que o fator de homogeneidade é menor do que 10, é possível afirmar que os materiais são homogêneos, sendo possível seu emprego em microanálises (para massas superiores a 10 mg), como também para submicroanálises (para massas inferiores a 1 mg).

5.4 Avaliação dos procedimentos de calibração

O emprego de uma curva de calibração adequada é primordial para uma análise de sucesso. Por não ser diluída na análise direta de sólidos, a matriz da amostra exerce grande influência sobre a cinética de liberação do analito para a fase gasosa, fazendo com que o analista tenha que optar pelo material mais adequado, assim como a melhor técnica de calibração a ser utilizada.

A escolha do material a ser utilizado depende tanto do analito como da matriz. Idealmente, devido ao intervalo linear da curva de calibração ser estreito, um material (de referência ou padrão) deve apresentar similar concentração do analito com a amostra. Também é necessário, que apresente a composição mais similar possível com a da amostra a ser analisada, garantindo assim, uma similaridade na cinética de atomização, além de uma minimização de interferências.

Mesmo com o uso de amostras certificadas de referência, a complexidade da amostra faz com que o segundo pré-requisito dificilmente seja seguido. Todavia, através de um programa de aquecimento adequado, uso de modificadores e emprego do conceito STPF, pode-se minimizar as diferenças na eficiência de atomização entre a amostra e os padrões da curva de calibração, permitindo que até curvas de calibração feitas com solução aquosas de referência possam ser utilizadas.

Em virtude disso, no presente estudo elaboraram-se cinco curvas de calibração; quatro com amostras certificadas de referência, sendo estas duas de tecido animal e duas de tecido vegetal e uma com soluções aquosas, para cada analito (com exceção do Sr).

Curvas de calibração para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr foram estabelecidas adicionando-se massas crescentes de amostras biológicas certificadas de referência: BCR 186 (fígado bovino), TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), NIST 1566b (tecido de ostra) e NIST 8414 (músculo bovino). Também foram utilizadas amostras botânicas certificadas de referência, sendo estas a NIST 1515 (folhas de macieira), NIST 8433 (farelo de milho) e CTA OTL-1 (folhas de tabaco oriental). Além disso, foram estabelecidas curvas de calibração aquosas contendo de 0,1 a 16 ng do analito por injeção no forno.

Para a verificação da possibilidade do uso da calibração aquosa, realizou-se a comparação entre os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas de calibração em meio aquoso com as das amostras de referência certificadas. Na ausência de um efeito de matriz, as

inclinações das curvas de calibração são similares, levando a uma razão entre as inclinações próxima da unidade, indicando a possibilidade do uso das soluções aquosas para a quantificação.[42]

Na Tabela 6 estão apresentadas as sensibilidades obtidas pela curva de calibração aquosa de cada elemento, assim como, a diferença percentual da sensibilidade entre a curva de calibração feita utilizando materiais certificados de referência e a curva de calibração aquosa, apresentando (+) para uma maior sensibilidade e (-) como uma menor sensibilidade em relação a curva aquosa.

Tabela 6. Diferença percentual de sensibilidade entre as curvas de calibração construídas com materiais sólidos de referência e a sensibilidade obtida para cada curva de calibração aquosa

| Elemento | Amostras certificadas | | | | Amostras certificadas | | | Inclinação da curva de calibração |
|----------|-----------------------|-------------|------------|-----------|-----------------------|-----------|----------|-----------------------------------|
| | BCR 186 | biológicas: | | NIST 8414 | botânicas: | | CTA OTL1 | |
| | | TORT-2 | NIST 1566b | | NIST 1515 | NIST 8433 | | |
| Mn | -6,5% | -14,4% | - | - | -2,2% | -2,4% | - | 0,367 |
| Ni | - | +34,2% | +15,4% | - | +32,0% | +187,3% | - | 0,228 |
| Rb | - | - | -45,5% | -58,9% | +1,3% | - | -0,6% | 0,016 |
| Sr | - | - | - | +52,5% | - | +1,0% | - | 2,946 |

Para o **Mn**, observa-se que as razões entre as inclinações das curvas foram relativamente pequenas para BCR 186, NIST 1515 e NIST 8433, indicando a possibilidade de quantificação com curvas de calibração construídas com soluções aquosas para amostras que contenham características similares à da matriz da amostra de referência certificada utilizada na confecção da curva. A calibração com a amostra TORT-2 resultou em uma diferença percentual de sensibilidade ligeiramente menor que 15%, o que sugere ser desaconselhável o uso da curva de calibração com padrões aquosos para esta amostra.

Durante a confecção das curvas sólidas para o **Ni**, verificou-se a presença de fundo estruturado necessitando-se novamente o uso do artifício da correção por mínimos quadrados. Assim, eliminou-se o fundo estruturado proveniente das moléculas de SiO e PO, para a amostra de tecido de ostra, NIST 1566b, com apenas pequenos picos residuais presentes após o processo, separáveis com ajuste do intervalo de integração do sinal (Figura 10). Constatou-se que para as demais

amostras certificadas de origem biológica, apenas o espectro proveniente de PO, era responsável pelo fundo estruturado, ao passo que nas amostras botânicas houve contribuição efetiva da molécula de SiO, devido à concentração mais elevada de Si nessas amostras.

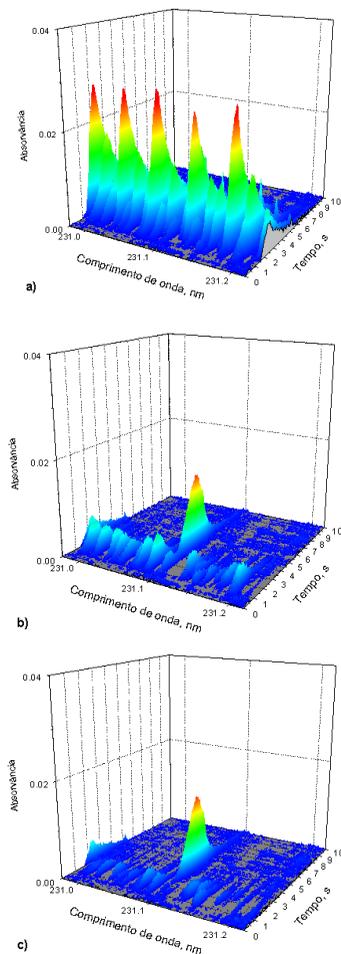


Figura 10. Espectro de absorção resolvido pela correção por mínimos quadrados para o Ni na amostra Nist 1566b obtido por SS-HR-CS AAS a uma temperatura de pirólise de 1000 °C e de atomização de 2600 °C ; a)Espectro sem correção; b)Após correção eliminando a molécula de SiO; c)Após eliminar a molécula de SiO e PO.

É possível notar que a correção teve grande influência no sinal observado para **Ni** das amostras NIST 1566b e NIST 1515, de modo que as curvas de calibração obtidas após a correção resultaram em uma diminuição da inclinação da curva de 22 e 8%, respectivamente, como mostra a Figura 11 e 12. Já para as amostras TORT-2 e NIST 8433 a correção implicou numa diminuição de apenas 2%, indicando que não houve sobreposição espectral entre o fundo e o sinal atômico para **Ni** nestas amostras.

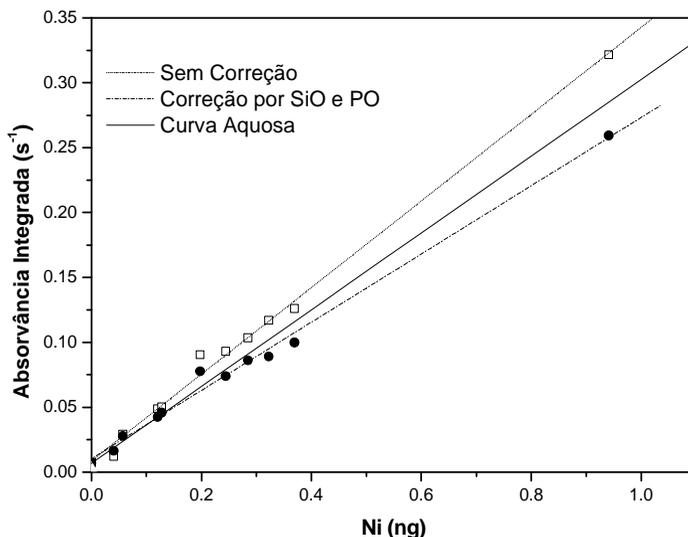


Figura 11. Curva analítica de calibração para o Ni, empregando massas crescentes da amostra certificada de referência Nist 1566b contendo $1,04 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$ do analito (Dados da curva: Sem correção: $y = 0,334x + 0,009$; $R^2 = 0,995$; Com correção: $y = 0,263x + 0,010$; $R^2 = 0,992$).

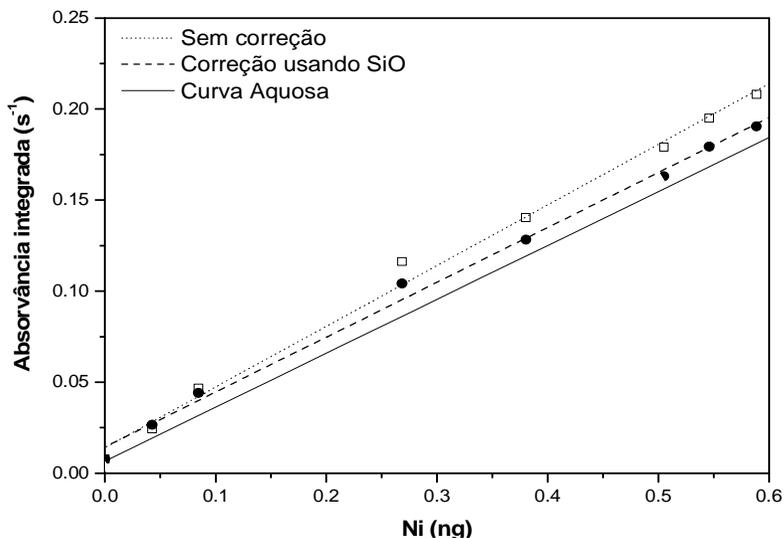


Figura 12. Curva analítica de calibração para o Ni, empregando massas crescentes da amostra certificada de referência NIST 1515 contendo $0,91 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ do analito (Dados da curva: Sem correção: $y = 0,333x + 0,014$; $R^2 = 0,994$; Com correção: $y = 0,301x + 0,014$; $R^2 = 0,996$)

Observou-se que a curva de calibração aquosa para o **Ni**, apresentou uma menor sensibilidade que as demais. Provavelmente, a solução padrão, infiltrou-se por capilaridade, nos interstícios de carbono na plataforma, tendo sua atomização prejudicada, com consequente perda de sensibilidade.

Devido à pequena concentração do analito na amostra de referência NIST 8433 ($0,158 \pm 0,054 \text{ mg kg}^{-1}$), a curva de calibração com uso desta amostra requereu a inserção de massas elevadas quantidade de massa da amostra, ao forno, ocasionando uma perda da sensibilidade na confecção desta curva para o **Ni**. Sabe-se que, o uso de massas elevadas da amostra no atomizador pode levar a valores subestimados devido a uma maior influência dos resíduos da matriz no atomizador [40,43].

A grande diferença entre a sensibilidade da curva de calibração aquosa e as demais curvas, realizadas com amostras certificadas botânicas e biológicas, demonstra ser inviável a quantificação após calibração com padrões aquosos para **Ni**.

Para o **Rb**, verificou-se que para as amostras de origem animal (NIST 1566b e NIST 8414), a diferença de sensibilidade inviabilizava o uso de curva de calibração com padrões aquosos para a quantificação nas amostras de origem biológica, ao passo que para amostras botânicas (NIST 1515 e CTA OTL-1), o uso de calibração aquosa é viável. Deduz-se que a matriz das amostras biológicas utilizadas exerce grande influência na eficiência de atomização do analito, enquanto que para as amostras de vegetais a interação com a matriz parece ser minimizada.

Durante a construção das curvas de calibração para o **Sr**, observou-se que através do uso de concentrações baixas do analito e uma temperatura de limpeza de 2700 °C era possível contornar o efeito de memória que este apresentava. Além disso, o uso de uma nova plataforma SS revestida piroliticamente se mostrou primordial para a minimização deste efeito, vindo este efeito a ser mais pronunciado conforme se utilizava (desgastava) a plataforma.

Através da razão dos coeficientes angulares provenientes das curvas de calibração das amostras certificadas de referência e do padrão, observou-se que para a amostra botânica (NIST 8433), o efeito da matriz na atomização poderia ser negligenciável, permitindo o uso da calibração pelo padrão aquoso. Todavia para a amostra certificada de músculo bovino (NIST 8414), o efeito da matriz na atomização impediu uma sensibilidade similar à da curva de calibração aquosa, inviabilizando seu uso, similar ao observado para o **Rb**.

5.5 Determinação de Mn, Ni, Rb e Sr em amostras botânicas e biológicas

Analisaram-se um total de seis amostras, sendo três amostras de guaraná e três de tecidos biológicos diversos (fígado de boi, músculo de peixe e tecido de ostra). Os procedimentos de calibração foram variados de acordo com a natureza da amostra e do analito conforme discutido na seção anterior.

Devido à ausência de amostras certificadas de guaraná, a exatidão do método foi verificada através da comparação com os resultados obtidos pela análise por ICP-MS, das amostras digeridas de guaraná (G0, G1 e G2) e das demais amostras biológicas.

Avaliou-se a exatidão das análises realizadas por ICP-MS e por SS-HR-CS AAS, através da análise das amostras de referência certificadas (CTA OTL-1, NIST 1515 e NIST 8433), obtendo-se os resultados expressos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de referência certificadas CTA OTL-1, NIST 1515 e NIST 8433 obtidos por ICP-MS e SS-HR-CS AAS. (Média \pm intervalo de confiança de 95%, n=3).

| | | Materiais de referência certificados | | |
|---------|--------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Analito | | CTA OTL-1 ^a | NIST 1515 ^b | NIST 8433 ^b |
| Mn | Certificado | 412,00 \pm 14,00 | 54,00 \pm 3,00 | 2,55 \pm 0,29 |
| | Determinado | 379,37 \pm 35,08 | 49,80 \pm 5,21 | 2,35 \pm 0,22 |
| Ni | Certificado | 6,32 \pm 0,65 | 0,91 \pm 0,12 | 0,158 \pm 0,05 |
| | Determinado | 5,51 \pm 0,40 | 0,90 \pm 0,02 | 0,141 \pm 0,02 |
| Rb | Certificado | 9,79 \pm 1,27 | 10,2 \pm 1,5 | * |
| | Determinado | 8,63 \pm 1,12 | 9,03 \pm 0,70 | * |
| Sr | Certificado | 201,00 \pm 20,00 | * | 4,62 \pm 0,56 |
| | Determinado | 195,71 \pm 14,62 | * | 4,50 \pm 0,45 |

a) Amostra quantificada pela técnica de ICP-MS, b) Amostras quantificadas pela técnica de SS-HR-CS AAS, * Não determinado.

Para a quantificação das **amostras botânicas** por SS-HR-CS AAS, com exceção do **Ni**, foram utilizadas curvas de calibração construídas com soluções aquosas com concentrações de 0,1 a 15 ng.

Para o **Ni**, a diferença de sensibilidade entre a curva aquosa e as curvas obtidas utilizando-se as amostras certificadas botânicas, fez com que seu uso fosse inviável para quantificação. Logo para a quantificação, utilizou-se a curva de calibração construída pela análise de massas crescentes do material certificado NIST 1515 (folhas de macieira).

Em decorrência da presença de fundo estruturado proveniente da molécula de SiO, na amostra de guaraná, para a quantificação de **Ni** foi necessário utilizar a correção por mínimos quadrados. Os resultados das análises estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de guaraná por ICP-MS (amostras digeridas) e por SS HR-CS AAS utilizando calibração líquida e sólida. (Média \pm intervalo de confiança de 95%, n=3).

| Analito | Técnica | Amostras | | |
|---------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| | | G0 | G1 | G2 |
| Mn | ICP-MS | 23,88 \pm 9,06 | 18,75 \pm 0,99 | 18,02 \pm 0,39 |
| | SS-HR-CS AAS | 20,46 \pm 2,65 | 17,22 \pm 3,05 | 16,53 \pm 4,07 |
| Ni | ICP-MS | 3,63 \pm 2,04 | 2,58 \pm 0,10 | 1,57 \pm 0,05 |
| | SS-HR-CS AAS | 3,57 \pm 0,84 | 2,58 \pm 0,47 | 1,58 \pm 0,22 |
| Rb | ICP-MS | 26,10 \pm 9,93 | 10,82 \pm 0,42 | 18,89 \pm 0,32 |
| | SS-HR-CS AAS | 26,70 \pm 0,27 | 11,78 \pm 3,33 | 20,02 \pm 4,79 |
| Sr | ICP-MS | 4,76 \pm 1,84 | 2,55 \pm 0,10 | 2,97 \pm 0,10 |
| | SS-HR-CS AAS | 4,35 \pm 0,94 | 2,45 \pm 0,47 | 2,94 \pm 0,42 |

Os valores obtidos pela técnica de SS-HR-CS AAS foram comparados com os obtidos pela técnica de ICP-MS através do teste *t* de Student, sendo considerados concordantes no nível de 95% de confiança, comprovando a viabilidade da técnica.

Já a quantificação de elementos traço nas **amostras biológicas** (músculo de peixe, fígado bovino e tecido de ostra) optou-se por utilizar amostras certificadas de referência para a quantificação, com exceção do **Mn**, para o qual a calibração com soluções aquosas pôde ser empregada.

Também se verificou a exatidão das análises realizadas por SS-HR-CS AAS, através da análise de amostras biológicas de referência certificadas (TORT-2, NIST 1566b e NIST 8414), obtendo-se os resultados expressos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras de referência certificadas TORT-2, NIST 1566b e NIST 8414 obtidos por SS-HR-CS AAS. (Média \pm intervalo de confiança de 95%, n=3).

| | | Materiais de referência certificados | | |
|---------|-------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
| Analito | | TORT-2 | NIST 1566b | NIST 8414 |
| Mn | Certificado | 13,60 \pm 1,20 | 18,5 \pm 0,2 | 0,37 \pm 0,09 |
| | Determinado | 12,10 \pm 0,99 | * | * |
| Ni | Certificado | 2,50 \pm 0,19 | 1,04 \pm 0,09 | 0,05 \pm 0,04 |
| | Determinado | 2,58 \pm 0,22 | 1,05 \pm 0,02 | * |
| Rb | Certificado | NI | 3,26 \pm 0,14 | 28,70 \pm 3,50 |
| | Determinado | * | 3,31 \pm 0,47 | 25,75 \pm 3,95 |
| Sr | Certificado | 45,2 \pm 1,9 | 6,8 \pm 0,2 | 0,052 \pm 0,015 |
| | Determinado | * | * | 0,054 \pm 0,002 |

NI) Não informado; * Não determinado.

Algumas determinações nas amostras certificadas não foram realizadas. A baixa concentração do analito em algumas amostras (como na determinação de Mn na amostra NIST 8414) implicaria numa grande inserção de massa ao atomizador podendo levar a valores subestimados devido à influência da massa na atomização. Em contrapartida, uma alta concentração de analito na amostra (como na determinação de Sr na amostra TORT-2) levaria a inserção de uma pequena quantidade de massa ao atomizador podendo gerar valores superestimados.

Para a quantificação do Ni, observou-se que além da presença do fundo estruturado proveniente da molécula de SiO, o espectro apresentou um fundo provindo da molécula de PO, para as amostras reais de músculo de peixe, fígado bovino e tecido de ostra. Devido a esta interferência espectral ser temporal e na mesma linha utilizada na quantificação, realizou-se mais uma vez a correção por mínimos quadrados, demonstrada na Figura 13.

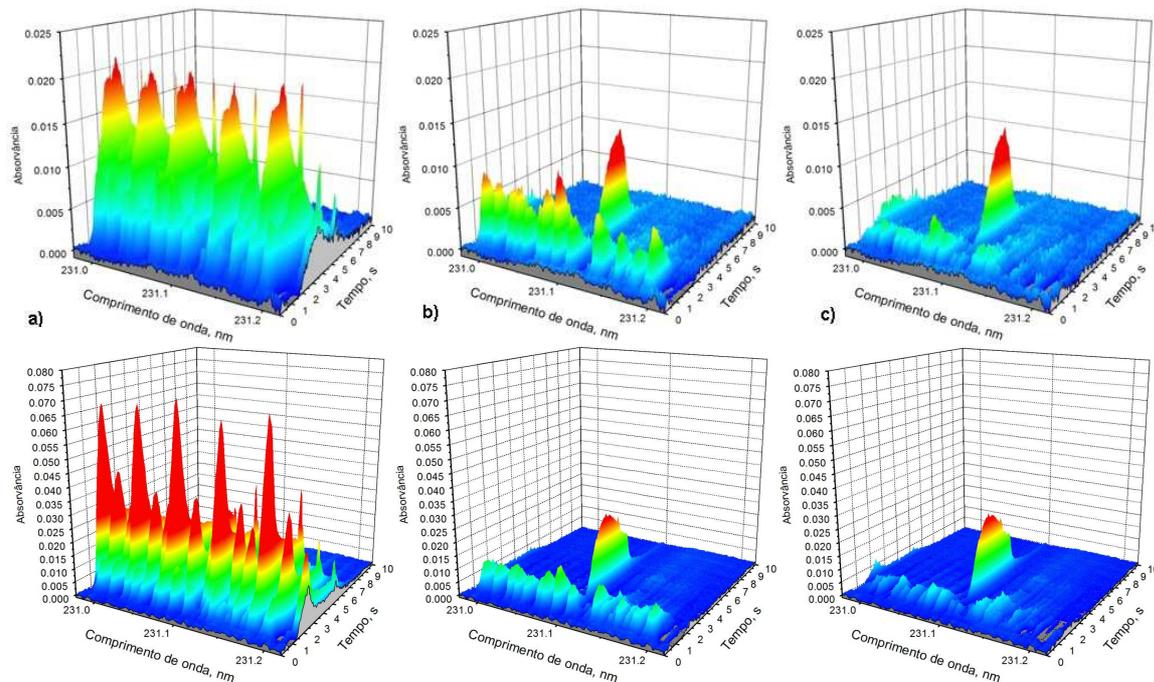


Figura 13. Espectros de absorção resolvidos pela correção de mínimos quadrados para Ni nas amostras reais de fígado bovino e músculo de peixe obtido por SS-HR-CS AAS a uma temperatura de pirólise de 1000 °C e de atomização de 2600 °C; a) Espectro sem correção; b) Correção por mínimos quadrados utilizando espectro de referência de SiO₂; c) Correção por mínimos quadrados utilizando espectro de referência de SiO₂ e PO.

Apesar dos espectros ainda apresentarem vestígios da correção realizada pelo software, seus valores não atrapalharam a quantificação.

Utilizou-se a amostra certificada NIST 1566b (tecido de ostra) para a quantificação de **Ni** e **Rb** nas amostras. Devido à elevada sensibilidade da técnica e a alta concentração de **Sr** na amostra NIST 1566b ($6,8 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$), podendo esta levar a um pronunciado efeito de memória, utilizou-se a amostra NIST 8414 ($0,054 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$) para a quantificação de **Sr** nas amostras.

Para a amostra de ostra, a concentração de **Mn** determinada pela técnica de ICP-MS mostrou-se muito superior a obtida por SS-HR-CS AAS, o que é atribuído a interferência espectral, formação de íons poliatômicos, particularmente: $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$ e $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}$.

A determinação de **Sr** não foi bem sucedida para a amostra de tecido de ostra. A grande quantidade de **Sr** presente na amostra fez com que quantidades mínimas de massa fossem inseridas ao atomizador, levando a um erro na determinação. O uso de uma linha secundária (407,77 nm) para este elemento não foi possível devido a sua sensibilidade ser até 98,5 % menor que a sensibilidade oferecida pela linha principal de 460,73 nm, necessitando com isso, uma grande quantidade de massa no atomizador para que fosse obtido um sinal analítico, levando novamente a erros na determinação.

Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10. Valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ dos analitos nas amostras biológicas por ICP-MS (amostras digeridas) e por SS HR-CS AAS utilizando calibração líquida e sólida. (Média \pm intervalo de confiança de 95%, n=3).

| Analito | Técnica | Amostras | | |
|-----------|--------------|------------------|-------------------|------------------|
| | | Músculo de Peixe | Fígado Bovino | Tecido de Ostra |
| Mn | ICP-MS | $0,36 \pm 0,05$ | $7,20 \pm 0,10$ | $46,61 \pm 0,15$ |
| | SS-HR-CS AAS | $0,32 \pm 0,07$ | $6,69 \pm 1,14$ | $2,25 \pm 0,60$ |
| Ni | ICP-MS | $0,97 \pm 0,67$ | $3,32 \pm 1,35$ | $2,29 \pm 0,84$ |
| | SS-HR-CS AAS | $1,13 \pm 0,15$ | $2,64 \pm 0,57$ | $1,82 \pm 0,52$ |
| Rb | ICP-MS | $4,25 \pm 0,32$ | $40,70 \pm 0,32$ | $4,53 \pm 0,02$ |
| | SS-HR-CS AAS | $5,01 \pm 2,04$ | $44,29 \pm 13,11$ | $4,04 \pm 1,22$ |
| Sr | ICP-MS | $1,96 \pm 0,30$ | $0,41 \pm 0,32$ | $59,08 \pm 6,11$ |
| | SS-HR-CS AAS | $1,98 \pm 0,25$ | $0,42 \pm 0,05$ | $18,23 \pm 0,07$ |

Nota-se que com exceção da quantificação de Mn e Ni na amostra de tecido de ostra, os resultados obtidos pela técnica de SS HR-CS AAS estão concordantes com os obtidos pela técnica de ICP-MS segundo o teste *t* de Student, no nível de 95% de confiança, comprovando a viabilidade da técnica.

Diversos métodos já foram propostos na literatura para o cálculo do limite de detecção (LOD) por análise direta de sólidos. Entre os mais utilizados, o uso do branco de uma solução de referência, apresenta limitações, devido à curva de calibração com padrões aquosos nem sempre poder ser empregada. Além deste, o uso de um material de composição similar ao da amostra, porém com concentrações mínimas do analito, também foge à situação ideal, uma vez que simular a matriz da amostra nem sempre é possível. [26,27]

Assim, no presente estudo, optou-se pelas medidas realizadas com a plataforma de grafite vazia, como método para a determinação do limite de detecção. Para isso, utilizou-se três vezes o desvio de 20 medidas, obtidas com a plataforma vazia, dividido pela inclinação da curva de calibração utilizada. Posteriormente, o resultado obtido foi dividido pela máxima massa de amostra utilizada, obtendo-se o limite de detecção demonstrado na Tabela 11.

Os parâmetros de mérito para a metodologia proposta também estão demonstrados nesta. Observa-se que o maior limite de detecção obtido se refere ao Rb. O método demonstrou uma excelente sensibilidade, da ordem de ng g^{-1} .

Tabela 11. Parâmetros de mérito obtidos pela metodologia proposta para as amostras botânicas e biológicas

| Parâmetros de mérito | Mn | Ni | Rb | Sr |
|------------------------------|--------|----------|---------|--------|
| LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0.005 | 0.002 | 0.1 | 0.01 |
| R ² | 0.996 | 0.996 | 0.999 | 0.996 |
| Faixa de calibração (ng) | 0.05-6 | 0.05-0.6 | 0.05-15 | 0.05-1 |

6 CONCLUSÃO

Com êxito, elaborou-se um método simples, rápido, sensível e confiável para a determinação de Mn, Ni, Rb e Sr em amostras botânicas e biológicas por SS-HR-CS AAS. O uso das linhas secundárias do Mn, Ni, e Rb foi bem sucedido, permitindo a quantificação em amostras com elevadas concentrações. A otimização das temperaturas de pirólise e atomização foi bem sucedida, obtendo-se os melhores parâmetros térmicos para a quantificação. Por dispensar o uso de modificadores, temos uma maior simplicidade ao procedimento. Através da avaliação do fator de homogeneidade, verificou-se que as amostras apresentavam homogeneidade suficiente para o emprego em sub e microanálises. Após o estudo das diferentes curvas de calibração observou-se que para as amostras botânicas, curvas de calibração feitas com o padrão aquoso poderiam ser utilizadas, diminuindo o custo da análise por SS, enquanto que para a determinação de Ni seria necessário o emprego de amostras de referência certificadas de origem vegetal. Já para as amostras biológicas verificou-se que devido a complexidade da matriz dessas amostras, o uso da curva de calibração aquosa para a quantificação só seria possível para o Mn. Bons limites de detecção foram obtidos, adequados às determinações propostas. O método desenvolvido pode ser aplicado para exames de rotina para essas amostras, desde que estejam disponíveis sólidos certificados para a calibração, particularmente para amostras biológicas.

REFERÊNCIAS

1. Tuzen, M.; Soylak, M.; Evaluation of trace elements contents in canned food marketed from Turkey. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1089-1095, 2007.
2. Lemos, V. A.; Noaves, C. G.; Bezerra, M. A.; An automated preconcentration system for the determination of manganese in food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 337-342, 2009.
3. Knap, M.; Kilian, K.; Pyrynska, K.; On-line enrichment system for manganese determination in water samples using FAAS. **Talanta**, v. 71, p. 406-410, 2007.
4. Wilhem, M.; Wittsiepe, J.; Seiwert, M.; Hünken, A.; Becker, K.; Conrad, A.; Schulz, C.; Gehring, M. K.; Levels and predictors of urinary nickel concentrations of children in Germany: Results from the German environmental survey on children (GerES IV). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 163-169, 2013.
5. Khoshgoftarmansh, A.H.; Hosseini, F.; Afyuni, M.; Nickel supplementation effect on the growth, urease activity and urea and nitrate concentrations in lettuce supplied with different nitrogen sources. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 381-385, 2011.
6. Johnson, G.T.; Lewis, T.R.; Wagner, W.D.; Acute toxicity of Cesium and Rubidium compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 32, p. 239-245, 1975.
7. Nyholm, N.E.I.; Tyler, G.; Rubidium content of plants, fungi and animals closely reflects potassium and acidity conditions of forest soils. **Forest Ecology and Management**, v. 134, p. 89-96, 2000.
8. Pate, D.; Brown, K.A.; The stability of bone strontium in the geochemical environment. **Journal of Human Evolution**, v. 14, p. 483-491, 1985.
9. Schoeninger, M.J.; Peebles, C.S.; Effect of mollusk eating on human bone strontium levels. **Journal of Archaeological Science**, v. 8, p. 391-397, 1981.
10. Silva, A.F., Borges, D.L.G., Lepri, F.G., Welz, B., Curtius, A.J., Heitmann, U.; Determination of cadmium in coal using solid sampling graphite furnace high-resolution continuum source

- atomic absorption. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1835-1841, 2005.
11. Dittert, I.M., Borges, D.L.G., Welz, B., Curtius, A.J., Becker-Ross, H.; Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. **Microchimica Acta**, v. 167, p. 21-26, 2009.
 12. Welz, B., Vale, M.G.R., Borges, D.L.G., Heitmann, U.; Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 2085-2095, 2007.
 13. Kurfürst, U., Pauwels, J., Grobecker, K.H., Stoeppler, M., Muntau, H.; Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials: determination and statistical evaluation. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 345, p. 112-120, 1993.
 14. Marguá, E.; Queralt, I.; Carvalho, M.L.; Hidalgo, M.; Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area, **Analytica Chimica Acta**, v. 549, p. 197-204, 2005.
 15. Buchmann, J.H.; Sarkis, J.E.S.; Rodrigues, C.; Determination of metals in plant samples by using sector field inductively coupled plasma mass spectrometer. **The Science of the Total Environment**, v. 263, p. 221-229, 2000.
 16. Sapkota, A.; Krachler, M.; Scholz, C.; Cheburkin, A.K.; Shotyck, W.; Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na and Ti) and trace (Li, Mn, Sr and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 247-256, 2005.
 17. Sucharová, J.; Suchara, I.; Determination of 36 elements in plant reference materials with Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. **Analytica Chimica Acta**, v. 576, p. 163-176, 2006.
 18. Guohui, L.; Shouzhong, F.; Direct determination of 25 elements in dry powdered plant materials by X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 55, p. 75-80, 1995.

19. Kasper, J.C.; Friess, W.; The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, p. 248-263, 2011.
20. Grotti, M.; Leardi, R.; Gnecco, C.; Frache, R.; Determination of manganese by graphite furnace atomic absorption spectrometry: matrix effect control by multiple linear regression model. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, p. 845-851, 1999.
21. Baysal, A.; Akman, S.; A rapid solid sampling method for determination of nickel and copper along human hair by ETAAS. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 291-296, 2011.
22. Batista, B.L.; Rodrigues, J.L.; Nunes, A.J.; Tormen, L.; Curtius, A.J.; Barbosa, JR. F.; Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. **Talanta**, v. 76, p. 575-579, 2008.
23. Lee, C. H.; Wang, C.L.; Lin, H.F.; Chai, C.Y.; Hong, M.Y.; Ho, C.K.; Toxicity of tetramethylammonium hydroxide: Review of two fatal cases of dermal exposure and development of an animal model. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 497-503, 2011.
24. L' Vov, B. V.; Twenty-five years of furnace atomic absorption spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 39, p. 149-157, 1984.
25. Krug, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1. Ed, Ed Piracicaba, 2008.
26. Kurfürst, U.; **Solid Sample Analysis: direct and slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP**. Ed Springer, Berlin, 1998.
27. Nomura, C.S.; Silva, C.S.; Oliveira, P.V.; Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: Uma revisão. **Química Nova**, v. 31, p. 104-113, 2008.
28. Welz, B.; Vale, M.G.R.; Borges, D.L.G.; Heitmann, U.; Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic

- absorption spectrometry. **Anal Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 2085-2095, 2007.
29. Belarra, M.A.; Resano, M.; Vanhaecke, F.; Moens, L.; Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how ?. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 828-839, 2002.
 30. Miller-Ihli; N.J.; Solids analysis by GFAAS. **Analytical Chemistry**, v. 64, p 964-968, 1992.
 31. Nomura, C.S.; Oliveira, P.V.; Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. **Química Nova**, v. 29, p. 234-239, 2006.
 32. Kurfürst, U.; Instrumental requirements, analytical performance and characteristics for the analysis of solid samples by GF-AAS. **Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie**, v. 328, p. 316-318, 1987.
 33. Welz, B.; Sperling, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3rd ed, Ed. Wiley-Vch, 1999.
 34. Borges, D. L. G.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Heitmann, U.; Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, Nº18, p. 58-67, 2005.
 35. Welz, B.; Ross, H.B.; Florek, S.; Heitmann, U.; Vale, M.G.R.; High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry – What can we expect ?. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 220-229, 2003.
 36. Heitmann, U.; Schütz, M.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear range charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, p. 1095-1105, 1996.
 37. Borges, D.L.G.; **Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e investigação de compostos organometálicos por análise direta em tempo real com espectrometria de massa**, Tese de Doutorado, UFSC; 2009.
 38. Burguera, M.; Burguera, J.L.; Rondón, C.; Bernardo, M.L.; Gallignani, M.; Salinas, J.; Appraisal of different electrothermal

- atomic absorption spectrometric methods for the determination of strontium in biological samples. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, p. 805-818, 1999.
39. Slavin, W.; Carnrick, G.R.; Manning, D.C.; Pruszkowska, E.; Recent experiences with the stabilized temperature platform furnace and Zeeman background correction. **Atomic Spectroscopy Journal**, v. 4, p. 69-86, 1983.
 40. Davison, R.L.; Natusch, D.F.S.; Wallace, J.R.; Evans, C.A.; Trace elements in fly ash: Dependence of concentration on particle size. **Environmental Science & Technology**, v. 8, p. 1107-1113, 1974.
 41. Kramer, G.N.; Grobecker, K.H.; Pauwels, J.; Comparison of methods used for the preparation of biological CRM's. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 125-130, 1995.
 42. Correia, P.R.M.; Oliveira, P.V.; Neto, J.A.G.; Nóbrega, J.A.; Silver as internal standard for simultaneous determination of Cd and Pb in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 917-922, 2004.
 43. Belarra, M.A.; Crespo, C.; Garbayo, M.O.M.; Castillo, J.R.; Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results?. **Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, p. 1855-1860, 1997.