

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Utilização do Sinal de Fundo e Calibração Multivariada
como um Procedimento para Acessar a Concentração
Total de Concomitantes em Espectrometria de Absorção
Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico
(TS-FF-AAS)**

Kelber dos Anjos de Miranda*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

* bolsista CNPq

**São Carlos - SP
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M672us

Miranda, Kelber dos Anjos de.

Utilização do sinal de fundo e calibração multivariada como um procedimento para acessar a concentração total de concomitantes em espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS) / Kelber dos Anjos de Miranda. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

58 f.

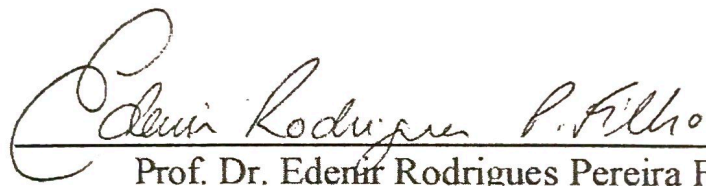
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

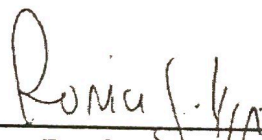
1. TS-FF-AAS. 2. Sinal de fundo. 3. Calibração multivariada. I. Título.

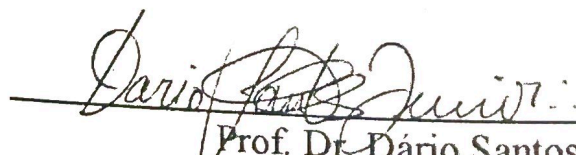
CDD: 543.085 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado do candidato Kelber dos Anjos de Miranda, realizada em 19 de fevereiro de 2009:


Prof. Dr. Ederir Rodrigues Pereira Filho


Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi


Prof. Dr. Dário Santos Junior

*Dedico este trabalho à minha esposa Eduana Moura pelo
apoio e amor incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter dado ao homem a racionalidade.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela seriedade e comprometimento com o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira e ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pelos ensinamentos de Química Analítica e lições de profissionalismo e ética.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela contribuição para minha formação profissional.

A todos os colegas do GAIA pelos conhecimentos trocados.

Aos amigos Telma, Rose, Fernando e Juninho ao permitirem que parte desse trabalho fosse realizada nas dependências do CCDM.

À professora Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por consentir que parte desse trabalho fosse executada nas dependências da Unicamp.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo concedida.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo suporte financeiro (Processos 04/01970-4 e 07/04515-4).

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica
APDC	Pirrolidinaditiocarbamato de amônio
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CLS	Método clássico de mínimos quadrados
DDTP	O, O-dietilditiofosfato
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
MLR	Regressão linear múltipla
NaDDTC	Dietilditiocarbamato de sódio
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PAR	4-(2-piridilazo-resorcinol)
PCA	Análise de componentes principais
PLS	Método dos mínimos quadrados parciais
PUF	Espuma de poliuretano
RMSEC	Raiz quadrada dos erros médios de calibração
RMSEP	Raiz quadrada dos erros médios de previsão
RMSEV	Raiz quadrada dos erros médios de validação
SEM	Microscopia de varredura eletrônica
TAM	2-2(tiazolilazo)-5-dimetilaminofenol
TS-FF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico
XRF	Espectrometria de fluorescência de raios-X

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1.1.	Concentração dos concomitantes e relação entre Cd e concomitantes.....	34
TABELA 5.2.1.	Concentração dos concomitantes e relação entre Pb e concomitantes.....	35
TABELA 5.3.1.	Experimentos realizados para a construção dos modelos usando os sinais de fundo.....	36
TABELA 5.3.2.	Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Cd e Pb por TS-FF-AAS.....	37
TABELA 6.1.1.	Resultados da influência dos concomitantes no sinal analítico de Cd.....	40
TABELA 6.2.1.	Resultados da influência dos concomitantes no sinal analítico de Pb.....	42
TABELA 6.9.1.	Parâmetros dos modelos propostos e a soma das concentrações de Na, K, Mg e Ca em uma amostra farmacêutica.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.4.1.	Espectros de absorção molecular utilizando 5 μL de sais de haleto.....	18
FIGURA 3.4.2.	Espectros de absorção molecular do NaCl.....	19
FIGURA 3.4.3.	Espectro de absorção molecular do KCl.....	20
FIGURA 3.4.4.	Espectro proveniente da vaporização de 100 μg Ca de uma solução aquosa de CaCl_2	21
FIGURA 4.2.1.	Esquema do sistema TS-FF-AAS, composto por bomba peristáltica, injetor comutador, capilar cerâmico e tubo atomizador de Ni.....	31
FIGURA 6.1.1.	Gráfico de probabilidades com os valores de contrastes.....	41
FIGURA 6.2.1.	Gráfico de probabilidades com os valores de contrastes.....	42
FIGURA 6.3.1.	Sinais de fundo obtidos para os experimentos descritos na Tabela 5.3.1 usando TS-FF-AAS.....	43
FIGURA 6.4.1.	Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de fundo em 283,3 nm (Pb) foram avaliados com PLS.....	45
FIGURA 6.5.1.	Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando ambos os sinais de fundo em 283,3 nm (Pb) e em 228,8 nm (Cd) foram avaliados com PLS.....	46
FIGURA 6.6.1.	Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de fundo em 228,8 nm (Cd) foram avaliados com PLS.....	47
FIGURA 6.8.1.	Sinais analíticos obtidos por XRF a partir dos experimentos descritos na Tabela 5.3.1.....	48
FIGURA 6.8.2.	Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de XRF foram avaliados com PLS.....	49
FIGURA 6.9.1.	Resultados obtidos para os três melhores modelos propostos em uma amostra farmacêutica.....	50

RESUMO

UTILIZAÇÃO DO SINAL DE FUNDO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA COMO UM PROCEDIMENTO PARA ACESSAR A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CONCOMITANTES EM ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO TUBULAR NA CHAMA E AEROSSOL TÉRMICO (TS-FF-AAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS) emprega um tubo de Níquel como atomizador, o qual é posicionado sobre uma chama ar/acetileno. Neste método, o tempo de residência dos átomos no caminho ótico é maior do que o observado em Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS). Com o uso deste atomizador, elevados sinais de fundo são obtidos e, neste sentido, inicialmente foi feito um estudo sobre os efeitos causados pelos concomitantes Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn nos sinais analíticos de Cd e Pb com o auxílio de planejamento fatorial. Concluiu-se que os sinais analíticos de Cd e Pb são pouco afetados pelos concomitantes. Contudo, o principal objetivo deste trabalho foi utilizar o sinal de fundo e calibração multivariada como um procedimento para acessar a concentração total de concomitantes em TS-FF-AAS. Sinais de fundo de 29 soluções contendo Cd (25 µg/L), Pb (500 µg/L) e quatro concomitantes (Ca, K, Mg e Na – valores da concentração total de 0 a 5,52 g/L) foram obtidos para prever a concentração total de concomitantes com ajuda da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). O melhor modelo mostrou *Raiz quadrada dos erros médios de validação* (RMSEV) de 0,35 g/L usando sinais de fundo em 283,3 nm. Uma amostra farmacêutica contendo 3 g/L (soma de Ca, K, Mg e Na) foi analisada e o erro relativo foi de 3%. Esta amostra e outras utilizadas para a calibração e validação do modelo também foram analisadas utilizando Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) e uma boa concordância foi observada. Este trabalho abre novas possibilidades para o estudo de concomitantes em Espectrometria de absorção atômica utilizando o sinal de fundo.

ABSTRACT

USING BACKGROUND SIGNALS AND MULTIVARIATE CALIBRATION AS A PROCEDURE TO ASSESS THE TOTAL CONCENTRATION OF CONCOMITANTS IN THERMOSPRAY FLAME FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY (TS-FF-AAS)

TS-FF-AAS employs a metal tube atomizer above an air/acetylene flame and in this case, the atoms residence time is longer than that observed in FAAS (Flame AAS). As a result, elevated background signals are obtained. For this reason, a study about the effects of the concomitants Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na and Zn on the analytical signals of Cd and Pb with the help of factorial design was performed initially. Cadmium and Pb analytical signals were not significantly affected by the presence of concomitants. Although, the main purpose of this study was to make use of background signals and multivariate calibration as a procedure to assess the total concentration of concomitants in Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry (TS-FF-AAS). Background signals of 29 solutions containing Cd (25 $\mu\text{g/L}$), Pb (500 $\mu\text{g/L}$) and four concomitants (Ca, K, Mg and Na – total concentration values ranging from 0 to 5.52 g/L) were recorded at two wavelengths: 228.8 Cd and 283.3 nm Pb. With the help of Partial Least Squares (PLS), calibration models using either each wavelength alone or a combination of both were constructed to predict the total concentration of concomitants. The best model showed Root Means Square Errors of Validation (RMSEV) of 0.35 g/L using background signals at 283.3 nm. A pharmaceutical sample containing 3 g/L (sum of Ca, K, Mg and Na) was analyzed and 3% was the relative error. This sample and those used in the calibration and validation sets were also analyzed using X-ray fluorescence (XRF) and a good agreement was observed. This study extends the possibilities for the use of background signals in spectrometric techniques.

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Objetivos	5
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)	7
3.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)	8
3.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS)	9
3.4. Sinal de Fundo.....	16
3.5. Planejamento Fatorial	21
3.5. Calibração multivariada	24
4. Material e Métodos	30
4.1. Equipamentos e acessórios	30
4.2. Sistema TS-FF-AAS	30
4.3. Reagentes e soluções	31
4.4. Amostra farmacêutica	32
4.5. Descontaminação dos materiais	32
4.6. Tratamento de dados.....	32
5. Procedimento Experimental	34
5.1. Avaliação dos efeitos de concomitantes no sinal analítico de Cd	34
5.2. Avaliação dos efeitos de concomitantes no sinal analítico de Pb	35
5.3. Determinação da concentração total de concomitantes através dos sinais de fundo.....	35
5.4. Construção do modelo de calibração para comparação	37
5.5. Tratamento dos dados	37
5.6. Teste dos modelos de calibração	38
6. Resultados e Discussão	40
6.1. Efeitos dos concomitantes no sinal analítico de Cd	40
6.2. Efeitos dos concomitantes no sinal analítico de Pb	41
6.3. Sinal de fundo e concentração total de concomitantes	43
6.4. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Pb (283,3 nm)	44
6.5. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Pb (283,3 nm) e Cd (228,8 nm)	45
6.6. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Cd (228,8 nm)	46
6.7. Modelos de calibração linear	48
6.8. Modelo de calibração para comparação	48
6.9. Teste com uma amostra farmacêutica.....	50
7. Conclusões e perspectivas	53
8. Referências Bibliográficas	55

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS, do inglês *Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) proposta por Gáspár e Berndt em 2000¹ foi uma tentativa de êxito para melhorar a sensibilidade da espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês *Flame AAS*). Em TS-FF-AAS, um tubo de níquel é posicionado sobre uma chama de ar-acetileno e funciona como um atomizador. A amostra pode ser introduzida na forma de solução ou suspensão no interior deste tubo pelo uso de um capilar cerâmico de 0,5 mm de diâmetro interno. Portanto, a eficiência do transporte da amostra e o aumento do número de átomos do analito no estado fundamental no volume de absorção resultam em um significativo acréscimo de sensibilidade para elementos voláteis como Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, In, K, Pb, Pd, Rb, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn². As aplicações em Química Analítica com TS-FF-AAS estão crescendo e aproximadamente 30 publicações podem ser encontradas na literatura. Amostras biológicas podem ser analisadas sem nenhum procedimento prévio de mineralização usando introdução direta de suspensão no atomizador. Os limites de detecção obtidos (LOD, do inglês *Limit of Detection*) estão tipicamente na faixa de $\mu\text{g/L}$. Contudo um estudo sistemático e amplo sobre o comportamento de concomitantes ainda não foi reportado.

Do ponto de vista qualitativo, deve ser mencionado que não se espera que a seqüência de atomização (dessolvatação, fusão, vaporização do cristal de sal e dissociação das espécies moleculares da matriz na fase gasosa) seja tão completa na zona analítica em TS-FF-AAS quanto em FAAS. Este efeito adverso é causado pelo maior volume da gota e a menor temperatura na fase gasosa (aproximadamente 1000 °C¹) em TS-FF-AAS. O sinal de fundo em TS-FF-AAS se refere, principalmente, à absorção molecular ao invés de sinais atômicos. Neste caso, bandas de absorção molecular causadas por espécies não dissociadas presentes na matriz, produzem o espectro resultante e os sinais de fundo poderiam ser usados para prever as concentrações das espécies responsáveis por este fenômeno. Fry e Denton³ já reportaram elevadas interferências espectrais em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em tubo de carbono.

Quando Cd e Pb são determinados em amostras biológicas e de alimentos, estas amostras são usualmente decompostas com ácidos (principalmente HNO_3 e/ou HCl) e agentes oxidantes (principalmente H_2O_2) e o conteúdo de carbono residual é baixo⁴. Entretanto, as concentrações de Ca, K, Mg e Na geralmente estão em g/L, na forma de cloretos e nitratos e as contribuições dessas espécies não dissociadas podem ser observadas no sinal de fundo em TS-FF-AAS. Portanto, esta informação poderia ser usada para acessar a concentração total dos principais concomitantes (soma de Ca, K, Mg e Na), visto que a importância desses 4 macronutrientes para a saúde humana e animal já é bem documentada⁵. Em alguns trabalhos, as concentrações desses elementos são expressas pela soma (principalmente Ca, K, Mg e Na)⁶. Neste caso, a estratégia analítica proposta nesta dissertação de mestrado pode ser usada como um procedimento na avaliação da concentração total de macronutrientes em alimentos e amostras farmacêuticas. Em TS-FF-AAS, os sinais analíticos e de fundo são registrados pelo espectrômetro, contudo os sinais de fundo não são usados para retirar informações analíticas.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. Objetivos

Os objetivos desta dissertação de mestrado foram:

- Estudar os efeitos de interferência nos sinais analíticos de Cd e Pb em Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS) pelos concomitantes Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn com o auxílio de planejamento fatorial;
- Utilizar o sinal de fundo e calibração multivariada como um procedimento para acessar a concentração total de concomitantes em TS-FF-AAS.
- Ampliar as possibilidades analíticas da espectrometria de absorção atômica, mostrando que é possível efetuar uma determinação simultânea aproveitando as informações dos sinais analítico e do fundo.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica foi proposta pelo australiano Alan Walsh⁷ em 1955. O método era simples, consideravelmente livre de interferências, sensível, preciso e não exigia habilidades específicas do analista se comparado com os principais procedimentos analíticos utilizados naquela época (gravimetria, volumetria, colorimetria, polarografia e espectrometria de emissão atômica). A determinação em níveis de mg/L ou mg/kg era uma tarefa difícil e somente alcançada por alguns procedimentos trabalhosos e com muitas etapas. Grande quantidade de amostra era necessária e os interferentes eram abundantes. Cada procedimento possuía seu próprio conjunto de problemas e o analista deveria estar capacitado para resolvê-los. As determinações através dessas técnicas consumiam muito tempo e poucas amostras podiam ser analisadas diariamente.

A segunda maior contribuição de Alan Walsh foi o uso da modulação do feixe da lâmpada de catodo oco, eliminando a interferência provocada pela radiação emitida pela amostra no atomizador. Estas linhas de emissão envolviam as mesmas transições que as linhas de absorção e, sem a modulação, causariam grandes interferências provocando perda de sensibilidade para todos os elementos. Ele também usou uma chama alongada, diferentemente dos queimadores circulares usados em fotometria de chama. Este queimador aumentou significativamente a sensibilidade. Também merece destaque o seu importante trabalho no desenvolvimento das lâmpadas de catodo oco, as quais são as mais utilizadas até hoje como fonte de radiação em absorção atômica⁸. O primeiro equipamento de absorção atômica não contava com o corretor de sinal de fundo.

Em 1961, Boris V. L'vov publicou, em inglês, o seu primeiro artigo utilizando um forno de grafite aquecido resistivamente como dispositivo atomizador para a espectrometria de absorção atômica⁹. Boris V. L'vov também estabeleceu as bases teóricas do atomizador de forno de grafite. Nesta época, os espectrômetros de absorção atômica com chama começavam a serem comercializados.

A espectrometria de absorção atômica é uma das mais importantes técnicas para a análise da composição elementar de amostras. O método se baseia

na absorção de energia radiante por átomos neutros não excitados no estado gasoso. Durante a absorção, o átomo passa de um estado de menor energia para um estado de maior energia¹⁰.

3.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

Para superar as dificuldades iniciais, a espectrometria de absorção atômica com chama sofreu diversos avanços instrumentais, tornando os equipamentos mais robustos. A correção da radiação de fundo com fonte contínua e o uso de detectores com resposta rápida para o registro dos sinais transientes possibilitou melhor caracterização e distinção do sinal analítico em relação ao sinal de fundo. A FAAS é uma técnica simples, robusta, seletiva e capaz de distinguir diferentes elementos químicos em amostras complexas. Possui custos de aquisição e manutenção relativamente baixos, sendo uma das principais ferramentas utilizadas em laboratórios de análise de rotina⁹.

Na espectrometria de absorção atômica com chama, a amostra líquida é introduzida no atomizador por meio de um nebulizador que converte o líquido em um aerossol. O aerossol é misturado com o gás comburente e oxidante antes de atingir o queimador. O nebulizador pneumático de tubo concêntrico é o tipo mais comum, no qual a amostra é aspirada através de um tubo capilar por um fluxo de alta pressão de um gás em torno do tubo. O gás em alta velocidade divide o líquido em gotas de vários tamanhos. As gotas se dispersam em partículas ainda menores e as maiores são eliminadas por meio de um dreno. As gotículas que atingem a chama evaporam e o sólido que resta se vaporiza, liberando átomos no estado gasoso. A concentração desses átomos é determinada por absorção da radiação, diretamente relacionada com a quantidade de átomos presentes, conforme descrito pela lei de Lambert-Beer. Para isso, fontes especiais de luz conjugadas com sistemas eficientes de seleção de comprimentos de onda permitem a determinação específica de elementos¹¹.

A baixa eficiência no processo de nebulização (5-10% do volume da solução original alcançam a chama) e a rápida e contínua passagem dos átomos pela zona de medida são os dois principais fatores que impedem a determinação de analitos em FAAS na faixa de $\mu\text{g/L}$ ¹². Neste caso, a sensibilidade desta técnica pode

ser melhorada significativamente aumentando-se a eficiência do transporte da amostra e prolongando-se o tempo de residência do analito no volume de absorção.

3.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Tubular na Chama e Aerossol Térmico (TS-FF-AAS)

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da FAAS, GÁSPÁR e BERNDT¹ propuseram em 2000 a espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-AAS, do inglês *Thermospray Flame Furnace AAS*).

No sistema de introdução de amostras utilizado na FAAS (via nebulizador pneumático) apenas cerca de 5 a 10 % da amostra alcança o queimador¹³. Em um nebulizador thermospray, o aerossol é produzido pela passagem de uma solução através de um capilar aquecido, favorecendo o transporte do analito. Observa-se o aumento da sensibilidade em comparação ao sistema pneumático de introdução de amostras da maioria dos espectrômetros de absorção atômica¹⁴. O thermospray (TS) foi originalmente desenvolvido por VESTAL e FERGUSSON¹⁵ em 1985 como uma interface entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa. Em espectrometria atômica, o aquecimento do capilar era feito eletricamente para manter a temperatura constante, e desta forma limitava o uso da técnica a poucos elementos. O uso de aerossol térmico para introdução de amostras em tubo atomizador foi primeiramente proposto por GÁSPÁR e BERNDT¹ em 2000, dando origem à técnica TS-FF-AAS.

Na TS-FF-AAS, um tubo de Ni é posicionado sobre a chama ar/acetileno do queimador de um espectrômetro de absorção atômica com chama e este funciona como um atomizador. A amostra é introduzida no tubo através de um capilar cerâmico aquecido pela própria chama do equipamento. A ponta do capilar em contato com o tubo alcança uma temperatura de aproximadamente 900 °C. O transporte da amostra é efetuado por uma bomba peristáltica. Ao atingir a extremidade do capilar, a amostra é imediatamente vaporizada, sendo totalmente introduzida no volume de absorção. A técnica é efetiva para elementos relativamente voláteis^{1,2}.

No primeiro trabalho publicado foram avaliados o diâmetro do capilar cerâmico, volume da amostra, vazão da solução carregadora e composição do tubo

atomizador. A completa introdução da amostra no tubo atomizador e o aumento do tempo de permanência da nuvem atômica no caminho óptico propiciaram limites de detecção bem inferiores em comparação à FAAS convencional, sendo 0,19 µg/L para Cd, 1,3 µg/L para Cu, 21 µg/L para Hg, 13 µg/L para Pb e 5,2 µg/L para Tl (57, 14, 67, 31 e 17 vezes menores para Cd, Cu, Hg, Pb e Tl, respectivamente). Os autores previram que o aumento da sensibilidade poderia ser obtido para mais 12 elementos (Ag, As, Au, Bi, In, K, Pd, Rb, Sb, Se, Te e Zn)¹.

Em 2002, PEREIRA-FILHO et al.¹⁶ determinaram Cd, Cu e Pb em amostras biológicas através da TS-FF-AAS aproveitando o ambiente oxidante no interior do tubo atomizador quando se usa HNO₃ para promover simultaneamente a digestão das amostras e a atomização dos analitos. As amostras foram preparadas em HNO₃ e Triton X-100, homogeneizadas em banho de ultra-som e introduzidas na forma de suspensões. O volume de injeção foi de 300 µL. Para a avaliação da exatidão através da aplicação do teste t não pareado, os autores efetuaram determinações em suspensões preparadas a partir de amostras de materiais certificados de referência (espinafre, fígado bovino, folhas de cítricos e folhas de tomateiro). Observou-se que os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores certificados em um nível de confiança de 95%.

Em 2002, GÁSPÁR et al.¹⁷ utilizaram um capilar de sílica fundida para a geração do aerossol térmico e um cilindro de gás com pressão de 1 MPa (10 bar) para transportar as amostras. O método se mostrou vantajoso para volumes de amostra inferiores a 10 µL. Amostras com volume de 0,3 µL contendo 5 µg/mL de Pb foram analisadas e o limite de detecção encontrado nesse caso foi de 69 µg/L (6,5 vezes menor que em FAAS). Resultados similares também foram obtidos para Cd, Hg, Tl e Zn.

Em 2003, Outros parâmetros relacionados à TS-FF-AAS como composição, diâmetro e espessura do tubo atomizador, natureza do capilar cerâmico e vazão do carregador foram otimizados por DAVIES e BERNDT². Melhor sensibilidade foi obtida utilizando-se tubo de Ni de 100 mm de comprimento, com diâmetro interno (d.i.) de 10 mm, diâmetro externo (d.e.) de 12 mm e com 6 orifícios de 2 mm de diâmetro na parte inferior que permitiu a entrada parcial da chama de ar/acetileno. O capilar de alumina não porosa de 100 mm de comprimento, com 0,5 mm d.i. e 2,0 mm d.e. apresentou melhor desempenho, assim como a vazão de 0,4 mL/min. Observou-se um aumento no poder de detecção de 3 a 100 vezes para 17

elementos (Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, In, K, Pb, Pd, Rb, Sb, Se, Te, Tl e Zn) comparado à FAAS convencional, sendo que os limites de detecção ficaram na faixa de 0,2 µg/L (Zn) a 310 µg/L (Se).

Em 2004, TARLEY e ARRUDA¹⁸ conseguiram aumentar a sensibilidade nas determinações de Cd em TS-FF-AAS utilizando a pré-concentração em linha. Inicialmente, Cd foi complexado com O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP). O complexo formado foi adsorvido em uma espuma de poliuretano (PUF, do inglês *polyurethane foam*) e posteriormente eluído com etanol 80% (v/v). Nesse trabalho foram avaliadas a massa de adsorvente, concentração do agente complexante, pH de formação do complexo, taxas de pré-concentração e eluição. Radiação microondas foi utilizada para digerir as amostras e o limite de detecção atingido foi de 0,12 µg/L (216 vezes mais sensível em relação a FAAS). A faixa linear de trabalho foi de 0,4 a 15,0 µg/L.

Com o objetivo de proporcionar maior sensibilidade nas determinações de Cd e Pb, IVANOVA et al.¹⁹ desenvolveram um sistema de pré-concentração baseado em uma coluna de cromatografia líquida de C₁₈ utilizando o agente quelante pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC) e metanol 60% (v/v) como eluente. Foram utilizados 20 mL de amostra. Os limites de detecção obtidos foram 0,007 µg/L para Cd e 0,17 µg/L para Pb.

GONZÁLEZ et al.²⁰ determinaram Cd, Pb e Zn em águas e sedimentos marinhos. Salmoura sintética foi utilizada como matriz para preparar as curvas de calibração. Os limites de detecção obtidos foram de 0,32; 2,6 e 0,21 µg/L para Cd, Pb e Zn, respectivamente.

Cobre e Zn foram determinados em amostras de suco de frutas e leite bovino sem qualquer pré-tratamento por NASCENTES et al.²¹ em 2004. As amostras foram diluídas em água ou em solução de aminas terciárias solúveis em água (CFA-C, 20% v/v). Uma solução H₂O₂ 1% v/v foi injetada após cada medida para evitar o acúmulo de resíduos de açúcar e carbono na extremidade do capilar cerâmico. Os limites de detecção em soluções aquosas foram 2,2 µg/L para Cu e 0,9 µg/L para Zn.

PEREIRA et al.²² determinaram Cd e Pb em amostras de água pré-concentrando os analitos por formação de um complexo com APDC com posterior adsorção do mesmo em 40 mg de uma mistura de fulerenos C₆₀ e C₇₀. Os limites de detecção calculados para Cd e Pb foram, respectivamente 0,1 e 2,4 µg/L com

desvios padrão relativos menores que 4,5% (n = 10). Resultados obtidos a partir da aplicação da ETAAS foram usados para confirmar a exatidão do método.

Em 2005, NASCENTES et al.²³ determinaram Cu, Mn, Pb e Zn em amostras de cerveja sem digestão prévia usando a TS-FF-AAS. As amostras foram degaseificadas em banho de ultra-som e diluídas com HNO₃ 0,14 mol/L. Utilizou-se o método da adição de padrão, pois a calibração em meio aquoso provocou erros negativos para todos os analitos. Para evitar efeitos de dispersão na interface entre amostra e carregador, utilizou-se ar como carregador. Os limites de detecção obtidos foram 2,2, 18, 1,5 e 0,9 µg/L para Cu, Mn, Pb e Zn, respectivamente.

Como alternativa ao uso da chama de óxido nitroso-acetileno em FAAS, LOBO et al.²⁴ utilizaram a TS-FF-AAS para determinar Sn em soluções analíticas. Essa proposta visava diminuir os efeitos de desgaste no espectrômetro causados pela alta temperatura da chama óxido nitroso-acetileno. O limite de detecção atingido foi de 1,7 mg/L.

TARLEY et al.²⁵ utilizaram a TS-FF-AAS na determinação de Cu em amostras de águas. Cobre foi complexado com DDTP e posteriormente eluído com etanol 80% (v/v). Empregou-se planejamento fatorial para otimização do pH, vazão e concentração de DDTP. O limite de detecção calculado foi 0,22 µg/L.

BRANCALION e ARRUDA²⁶ determinaram Cd em amostras de plantas medicinais por TS-FF-AAS após digestão assistida por radiação microondas em minifrascos de polipropileno. Foram utilizados 5 mg de amostra e 400 µL de reagentes (HNO₃ concentrado e H₂O₂ 30% v/v). O limite de detecção calculado foi de 0,9 µg/L. A exatidão do método foi confirmada com a determinação de Cd em amostras de referência certificadas de centeio e fígado bovino.

Ainda no ano de 2005, utilizando um fluxo de ar comprimido de baixa pressão (< 20 kPa) para o transporte da amostra, BERNDT e PULVERMACHER²⁷ determinaram Cd e Pb em amostras de pimentas. Os limites de detecção calculados foram 0,005 e 0,1 µg/g para Cd e Pb, respectivamente. Também foram obtidos baixos limites de detecção para Hg e Tl.

Em 2006, DONATI et al.²⁸ aplicaram extração ácida e pré-concentração por extração em ponto nuvem para determinação de Co em materiais biológicos por TS-FF-AAS. Através da formação de compostos voláteis de Co contornou-se o problema relativo à baixa sensibilidade devido à alta temperatura de atomização deste elemento. Os autores estudaram os efeitos de interferência no sinal de Co

pelos concomitantes Al, Cu, Fe, Mn e Zn, sendo que apenas para Al e Fe foi observada uma interferência negativa de 60 vezes. Esse problema foi solucionado usando-se HCl 1,0 mol/L na extração. A melhor sensibilidade foi obtida empregando-se APDC como complexante e Triton X-114 como surfactante, sendo obtido um limite de detecção de 2,1 µg/L. Esse procedimento permitiu um aumento de sensibilidade de aproximadamente 200 vezes na determinação de Co em relação à determinação deste metal por TS-FF-AAS sem a pré-concentração. A verificação da exatidão do método foi realizada pela quantificação de Co em amostras de referência de fígado bovino e de folhas de tomateiro.

WU et al.²⁹ aplicaram a pré-concentração por extração em ponto nuvem utilizando Triton X-114 e APDC para determinação de Cd em amostras de água e urina. Altura do queimador, velocidade da bomba peristáltica e vazão dos gases foram otimizados para se obter melhor intensidade e estabilidade do sinal analítico. O limite de detecção alcançado foi de 0,04 µg/L para um volume de amostra de 10 mL. Os resultados encontrados para Cd em amostras de água e urina concordaram com os obtidos pela técnica utilizada para comparação, ICP-MS (do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*).

PETRUCELLI et al.³⁰ caracterizaram vários tipos de tubos metálicos atomizadores utilizados em TS-FF-AAS antes e depois de serem usados nas determinações de Cd, Cu, Mn, Pb e Zn em soluções aquosas, amostras ambientais (lodo de esgoto) e alimentícias. Tubos de Ni (99%) e de Ti (99%) tiveram os melhores desempenhos, porém a formação de óxido de titânio (TiO₂) na superfície externa dos tubos de Ti acarretou em um curto tempo de vida dos mesmos (aproximadamente 5 horas). Fluorescência de raios-X (XRF, do inglês *X-ray fluorescence*) e microscopia de varredura eletrônica (SEM, do inglês *Scanning electron microscopy*) juntamente com as ferramentas quimiométricas análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e PCA de imagens foram usadas na obtenção de informações sobre a morfologia da superfície. Tubos de Ni apresentaram resultados reprodutíveis mesmo após 88 h de uso e tubos de Ti propiciaram um aumento de sensibilidade para o elemento Cu de 2,5 vezes quando comparado ao tubo de Ni, com limite de detecção de 6,5 µg/L.

TARLEY et al.³¹ conseguiram aumentar a sensibilidade (640 vezes em relação à FAAS convencional) para as determinações de Cd através do acoplamento de um sistema de pré-concentração em fluxo utilizando nanotubos de

carbono e TS-FF-AAS. A pré-concentração de Cd foi feita em pH igual a 4,9 durante 2 minutos a uma vazão de 5 mL/min. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 11,4 e 38,1 ng/L, respectivamente.

Utilizando uma mini-coluna contendo bagaço de uvas, MATOS e ARRUDA³² empregaram a pré-concentração *online* para determinar Cd em materiais de referência certificados. A eluição dos íons metálicos foi feita com HCl 1 mol/L. O limite de detecção alcançado foi 0,03 µg/L. Os resultados obtidos concordaram com as concentrações certificadas a um nível de 95% de confiança.

Em 2007, AMORIM e BEZERRA³³ quantificaram Cd em níveis ultratraço em amostras de vegetais por TS-FF-AAS utilizando a complexação em fluxo em uma coluna de Amberlite XAD-2 impregnada com 2-(2-tiazolilazo)-5-dimetilaminofenol (TAM) e posterior eluição com HCl 1,0 mol/L. O limite de detecção obtido foi de 8,0 ng/L. O metal pôde ser determinado com adequada concordância em matérias certificados de referência: farinha de arroz, folhas de maçã e folhas de pomar.

PETRUCELLI et al.³⁴ determinaram Cd e Pb em amostras de lodo de esgoto associando modelos de calibração multivariada com TS-FF-AAS. As suspensões foram estabilizadas com Triton X-100 e homogeneizadas em banho de ultra-som. Limites de detecção de 0,2 e 0,7 µg/kg foram obtidos para Cd e Pb, respectivamente, aplicando-se o método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) ao perfil total do pico obtido em 57 s de análise. Quatro estratégias de calibração foram avaliadas e as concentrações dos metais nas amostras de lodo de esgoto variaram de 1,87 a 6,26 mg/kg para Cd e de 101 a 327 mg/kg para Pb. A frequência analítica foi de 60 determinações/h. Esse procedimento pode ser expandido principalmente em casos onde possam existir pronunciados efeitos de interferência causados por concomitantes.

ROSINI et al.³⁵ avaliaram o comportamento do Se em TS-FF-AAS. Amostras biológicas foram digeridas com o emprego da radiação microondas, e utilizou-se planejamento fatorial para otimização de algumas variáveis que poderiam interferir nos valores das absorbâncias. Na otimização foram selecionados os seguintes parâmetros: chama oxidante, água como carregador (vazão de 0,4 mL/min), altura do queimador de 1,5 cm acima da chama e o volume de amostra introduzido no atomizador (tubo de Ni) foi de 600 µL. Após a confirmação de possíveis efeitos de interferência de concomitantes presentes em materiais

biológicos, como Ca, K, Mg e Na, utilizou-se o método de adições de padrão para a calibração, obtendo-se um limite de detecção de 8,7 µg/L. Materiais de referência de rim suíno e de mexilhão foram utilizados para a avaliação da exatidão do método, sendo que os valores obtidos foram concordantes com aqueles certificados em um nível de confiança de 95%.

BRANCALION et al.³⁶ confirmaram que o efeito Lendeinfrost governa o processo de geração do aerossol, descrito por Gáspar e Berndt¹ em 2000, ao utilizar uma câmera de alta velocidade para obter imagens do aerossol térmico que se forma dentro do tubo atomizador. Uma camada de vapor se forma entre o líquido e a parede quente do capilar e a gota evapora lentamente dentro do tubo atomizador.

Em 2008, WU et al.³⁷ determinaram ultratraços de Ag em matrizes complexas utilizando procedimentos de extração em ponto nuvem e TS-FF-AAS. Inicialmente, o complexo Cu-DDTC foi formado a partir da reação de íons Cu com DDTC. Após a remoção da fase aquosa, uma solução contendo íons Ag⁺ foi adicionada e o procedimento de extração em ponto nuvem foi realizado novamente. Como a estabilidade do complexo Ag-DDTC é maior que a do Cu-DDTC, íons Ag⁺ substituíram os íons Cu²⁺ do complexo Cu-DDTC. A fase surfactante contendo Ag foi diluída para diminuição da viscosidade e injetada no tubo atomizador para a determinação de Ag por TS-FF-AAS. O limite de detecção obtido foi de 0,2 µg/L.

Para gerar compostos de Co mais voláteis que pudessem ser determinados por TS-FF-AAS, MATOS e ARRUDA³⁸ complexaram Co com DDTC. A reação do metal com o complexante dietilditiocarbamato de sódio (NaDDTC) gerou o composto volátil, que foi determinado por TS-FF-AAS. Após a otimização de parâmetros como pH, concentração e volume do complexante, volume de amostra, composição da chama e configuração do tubo atomizador, foi observado um limite de detecção de 7 µg/L. O aumento de sensibilidade foi de 17 vezes em relação à determinação por FAAS. Materiais de referência de sedimento de lago e sedimento marinho foram usados para a avaliação da exatidão do método, sendo que os valores obtidos concordaram com os certificados em um nível de confiança de 95%.

COELHO et al.³⁹ realizaram a determinação multielementar seqüencial de Cd, Cu e Pb em amostras de água mineral utilizando a técnica de pré-concentração por ponto nuvem com 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) como complexante e Triton X-114 como surfactante. Os autores otimizaram o volume de solução de NaCl 1% (m/v), pH e concentração do tampão borato. Os limites de

detecção obtidos foram de 0,025, 0,38 e 0,43 $\mu\text{g/L}$ para Cd, Cu e Pb, respectivamente. Para avaliar a exatidão do método, os analitos foram determinados em material de referência de elementos traço em água, com valores concordantes em nível de confiança de 95%.

SCHIAVO et al.⁴⁰ avaliaram a TS-FF-AAS na determinação direta de Cd, Cu e Pb em amostras de vinho e de suco de uva. O procedimento desenvolvido não requereu digestão ácida preliminar. Um volume de 150 μL foi introduzido em um tubo de Ni utilizando um fluxo de 0,54 mL/min e uma solução de HNO_3 0,14 mol/L foi usada como carregador. Avaliou-se o efeito do etanol em diversas concentrações sobre os sinais analíticos de Cd, Cu e Pb. O método de adições de padrão foi utilizado durante as determinações. Os limites de detecção obtidos foram de 1,8, 13 e 5,3 $\mu\text{g/L}$ para Cd, Cu e Pb, respectivamente.

3.4. Sinal de Fundo

A absorção do sinal de fundo (não específica) ocorre quando a radiação proveniente da lâmpada de catodo oco é atenuada por espécies moleculares ou por partículas sólidas presentes no caminho ótico. As espécies moleculares podem absorver energia e as partículas sólidas podem espalhá-la. Quando o atomizador não possui energia suficiente para decompor todos os componentes da amostra, as moléculas remanescentes poderão absorver radiação da lâmpada de catodo oco. Absorção molecular e espalhamento são adicionados à absorção atômica, provocando um falso aumento de sinal. Em FAAS, o valor da absorbância proveniente do sinal de fundo é geralmente menor que 0,05. Contudo, em análises por forno de grafite, o sinal de fundo pode exceder 2,0 de absorbância. Altos valores do sinal de fundo reduzem a quantidade de luz que atinge o detector, diminuem a razão sinal-ruído e comprometem a precisão e exatidão das determinações⁹.

A correção do sinal de fundo permite identificar a quantidade de absorção não específica que foi adicionada à absorção do sinal atômico. Todos os sistemas de correção do sinal de fundo disponíveis comercialmente empregam os mesmos princípios básicos: A absorção total (soma da absorção atômica e não específica) e a absorção não específica são medidas em intervalos de tempo

diferentes, separados por alguns milissegundos (2 a 10 ms). O sinal da absorção atômica é obtido subtraindo-se a absorção não específica da absorção total¹⁰.

O método mais comum de correção do sinal de fundo envolve o uso da lâmpada de deutério para medi-lo. Esta lâmpada é uma fonte contínua que opera entre 180 e 425 nm, cobrindo a faixa de comprimentos de onda em que o sinal de fundo é mais pronunciado. A configuração óptica do instrumento permite que os feixes provenientes da lâmpada de catodo oco e da lâmpada de deutério coincidam ao passarem pelo caminho óptico. É fundamental que ambos os feixes estejam alinhados para que possam seguir o mesmo caminho óptico durante a passagem pelo atomizador, evitando erros na correção do sinal de fundo. A emissão da lâmpada de catodo oco é atenuada por espécies atômicas e moleculares, representando uma medida da absorbância total. Aproximadamente 99 % da atenuação da emissão da lâmpada de deutério é causada por espécies moleculares. Conseqüentemente, o sinal de fundo é subtraído da medida da absorbância total para se obter a absorção atômica corrigida:

$$\text{Sinal da lâmpada de catodo oco} = \text{absorção atômica} + \text{absorção molecular}$$

$$\underline{\text{Sinal da lâmpada de deutério} = \text{absorção molecular}}$$

$$\text{Sinal analítico processado} = \text{absorção atômica}$$

A Absorção molecular provocada por espécies presentes na matriz representa uma severa interferência encontrada em determinações por absorção atômica em nível de traços em amostras complexas. Esta interferência pode ser corrigida pelo corretor de fundo se não exceder 2,0 de absorbância¹¹. Alguns trabalhos sobre a avaliação da absorção molecular em espectrometria de absorção atômica podem ser encontrados na literatura.

Em 1965, KOIRTYOHANN e PICKETT⁴¹ apresentaram resultados referentes à natureza da absorção molecular encontrada em sistemas por atomização em chama. Um queimador de consumo total foi usado para pulverizar a amostra e suportar uma chama O₂-H₂ em um tubo de absorção de caminho ótico longo. Os espectros de absorção molecular de haletos de metais alcalinos puderam ser observados com essa montagem, na qual a temperatura de atomização no interior do tubo é relativamente baixa. Uma solução de NaCl 1% proporcionou um sinal de fundo de 0,6 de absorbância. O sinal de fundo praticamente desapareceu quando se usou a chama ar-acetileno sem a montagem, sugerindo que as moléculas foram decompostas quase que completamente em temperatura mais elevada.

Em 1975, com o propósito de estabelecer a natureza da absorção não atômica encontrada em diferentes matrizes durante as determinações por espectrometria de absorção atômica com atomização em tubo de carbono, CULVER e SURLES⁴² obtiveram espectros moleculares de soluções aquosas de NaF, NaCl, KCl, KBr, NaI, CaCl₂, Na₂SO₄, NaNO₃ e Na₂HPO₄ utilizando uma lâmpada de catodo oco de hidrogênio como fonte contínua. Para todas as soluções contendo sais de oxi-ânions, pouca absorbância foi observada na região de comprimentos de onda de interesse (200-400 nm). Determinações em sais de haleto 0,1 % (m/v) (utilizando 5 µL) apresentaram absorbâncias máximas entre 0,6 e 1,0 (veja Figura 3.4.1). Em todos os casos, os valores de absorbância foram proporcionais à concentração do sal. Os autores afirmaram que o espalhamento pode ter contribuído para o aumento da absorção não atômica, porém muito pouco se comparado ao efeito da absorção molecular.

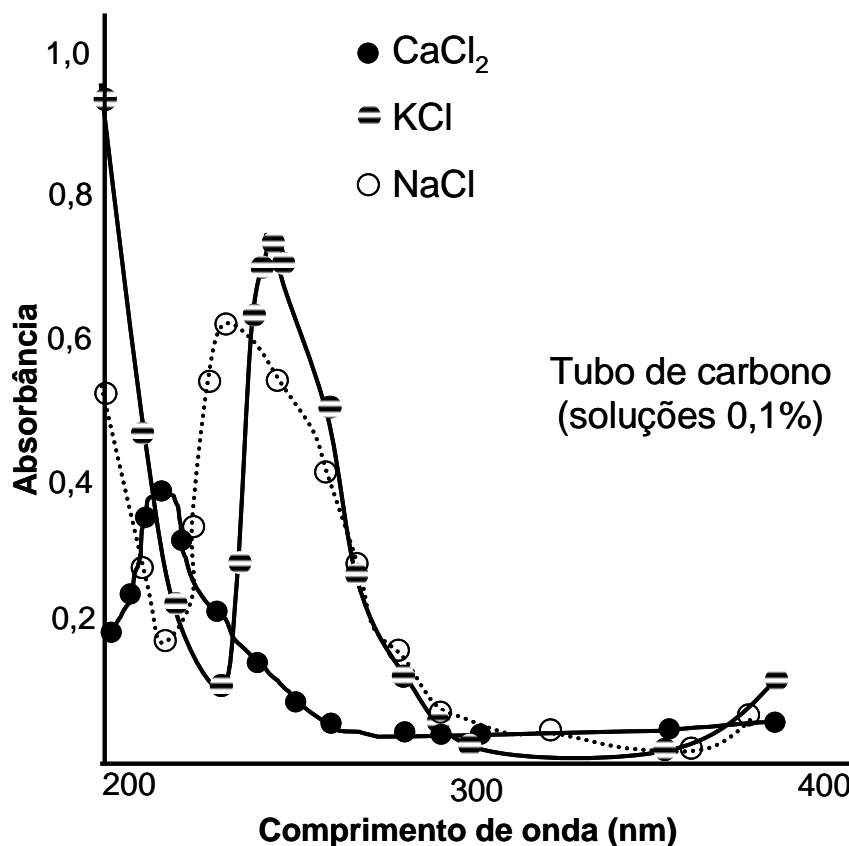


FIGURA 3.4.1. Espectros de absorção molecular utilizando 5 µL de sais de haleto.

Em 1979, FRY e DENTON³ caracterizaram o espectro de absorção molecular em FAAS quando amostras complexas como sangue, suco de tomate, entre outras, foram diretamente atomizadas sem nenhum tratamento prévio. Os

espectros produzidos por soluções aquosas contendo sais inorgânicos também foram obtidos e podem ser vistos na Figura 3.4.2. Os autores observaram que a FAAS exibe espectro de absorção molecular devido às espécies inorgânicas poliatômicas não dissociadas, contudo, a intensidade de tais espectros foi insignificante se comparada com a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

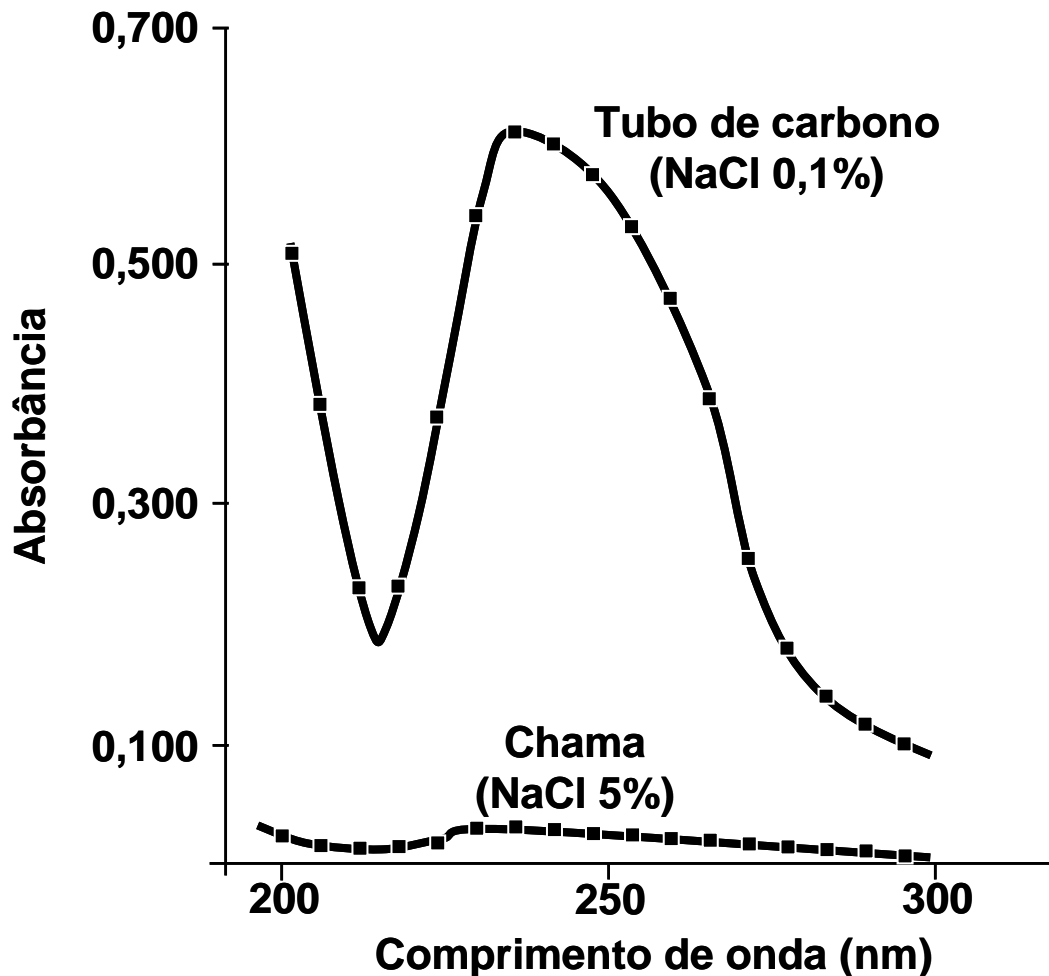


FIGURA 3.4.2. Espectros de absorção molecular do NaCl

Em 1999, DAMINELLI et al.⁴³ utilizaram a espectrometria de absorção molecular com vaporização eletrotérmica para medir a absorção de haletos de metais alcalinos. O sistema, consistindo de uma lâmpada de deutério, um atomizador com tubo de grafite, um policromador com rede Echelle e um dispositivo de carga acoplada (CCD), permitiu a determinação simultânea da absorção atômica e molecular entre 200 e 400 nm. A vaporização foi realizada utilizando um tubo de grafite pirolítico e a absorção foi medida durante o aquecimento entre 500 e 2000 °C

em 100 segundos. Os valores máximos de absorção molecular foram atingidos para temperaturas entre 880 °C (CsI) e 1440 °C (LiF). A Figura 3.4.3 mostra o espectro de absorção molecular do KCl com valor máximo em 980 °C.

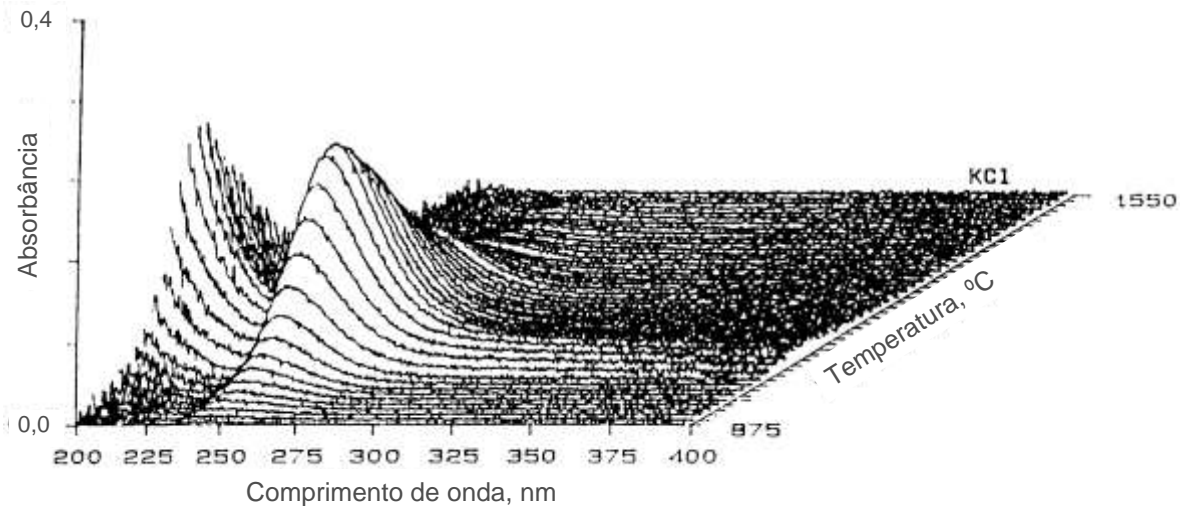


FIGURA 3.4.3. Espectro de absorção molecular do KCl.

Em 2001, KATSKOV et al.⁴⁴ utilizaram a espectrometria de absorção molecular com vaporização eletrotérmica para medir a absorção molecular de haletos de metais alcalinos terrosos. O sistema, consistindo de uma lâmpada de deutério, um atomizador com tubo de grafite, um policromador com rede Echelle e um CCD, permitiu a determinação simultânea da absorção atômica e molecular entre 200 e 475 nm. A vaporização foi realizada utilizando um tubo de grafite pirolítico e a absorção foi medida durante o aquecimento entre 500 e 2500 °C. A Figura 3.4.4 mostra o espectro molecular obtido com a vaporização de 100 µg Ca de uma solução aquosa de CaCl₂. O valor máximo de absorção molecular foi atingido para a temperatura de 1200 °C.

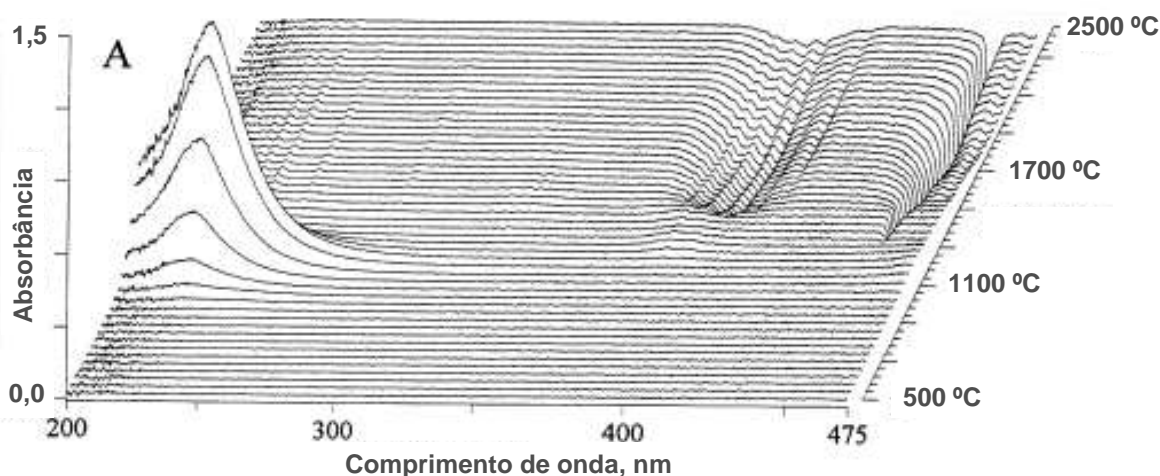


FIGURA 3.4.4. Espectro proveniente da vaporização de 100 μg Ca de uma solução aquosa de CaCl_2 .

3.5. Planejamento Fatorial

Um problema usual que um experimentador pode enfrentar é a determinação de como uma resposta instrumental depende das variáveis controladas pelo experimentador (os fatores envolvidos). Este tipo de sistema pode ser considerado como uma função desconhecida que atua sobre as variáveis de entrada (os fatores) gerando como saída as respostas observadas. O objetivo do analista é obter uma aproximação satisfatória dessa função. O primeiro procedimento a ser feito no planejamento de um experimento é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Em seguida, é preciso definir claramente que objetivo se pretende alcançar com os experimentos, porque isso definirá que tipo de planejamento experimental deve ser usado⁴⁵.

Para executar um planejamento fatorial precisamos em primeiro lugar especificar os níveis em que cada fator será estudado, ou seja, os valores dos fatores que serão estudados nos experimentos. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isso implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples de todos eles. Havendo k variáveis controladas pelo experimentador (k fatores), o planejamento de dois níveis irá requerer a realização

de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo por isso chamado de *planejamento fatorial 2^k* . Nos planejamentos de dois níveis costuma-se identificar o nível superior e o inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente, atribuindo naturalmente o nível superior aos valores mais altos⁴⁵.

O número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo (2^k) aumenta rapidamente com o número de fatores investigados (k). Com oito fatores, por exemplo, um planejamento completo exigiria 256 experimentos. Contudo, a informação desejada pode ser muitas vezes obtida executando-se um número de ensaios bem menor, equivalente a uma fração do número de experimentos do planejamento completo. Os efeitos principais tendem a serem maiores que as interações de dois fatores, que por sua vez são mais importantes que as interações de três fatores, e assim por diante. Como os efeitos das interações de três ou mais fatores freqüentemente não são significativos, não há necessidade de se fazer todos os ensaios de um planejamento completo. Pode-se utilizar planejamento fatorial fracionário ao invés de completo. Por exemplo, um planejamento completo com 256 experimentos (2^8) pode ser reduzido para um planejamento fracionário (2^{8-4}) com 16 experimentos⁴⁵.

O Método de otimização tradicional univariado ainda é utilizado, todavia demanda um número de experimentos relativamente maior e freqüentemente falha em prever as condições ótimas de trabalho. Além disso, é tedioso e pode levar à interpretações erradas dos resultados devido a sua inabilidade de levar em conta possíveis interações entre os fatores. O planejamento fatorial, ao contrário, é mais efetivo e tem sido usado em várias fases no desenvolvimento da estratégia de otimização. Sua maior serventia é o reduzido número de experimentos necessários para se obter o máximo de informação. O uso de planejamento fatorial é essencial quando ocorrem interações entre as variáveis de um sistema, possibilitando que o efeito de um determinado fator seja estipulado em alguns níveis de outros fatores, de modo que as conclusões sejam válidas em uma faixa de condições experimentais mais ampla⁴⁵.

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, porém, pouco difundida em espectrometria atômica. No estudo de interferências causadas pela presença de concomitantes em AAS, é comum, estudá-los individualmente, realizando experimentos univariados. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer,

devido ao fato de que os efeitos de interação entre os concomitantes não são explorados. Além do problema relatado anteriormente, o número de experimentos executados é geralmente maior se comparado com àqueles obtidos em um planejamento fatorial⁴⁶.

Em 1999, BARAJ et al.⁴⁷ utilizaram planejamento fatorial completo com 32 experimentos (2^5) para demonstrar a severa interferência de íons metálicos presentes em água do mar, salmouras e sedimentos marinhos na determinação de Li por FAAS. As cinco variáveis e os níveis estudados foram Li (0,4 – 0,8 mg/L), Ca (1000 – 5000 mg/L); Na (1000 – 4000 mg/L); Fe (200 – 2000 mg/L) e K (500 – 1500 mg/L). Cálcio, Fe e Na reduziram o sinal de absorção do Li quando se utilizou a chama ar/acetileno. Alumínio, Mg e Sr em concentrações máximas de 1500, 1000 e 200 mg/L, respectivamente, não exibiram interferência no sinal analítico do Li nas mesmas condições. Potássio produziu alguma supressão no sinal do elemento Li quando em concentração superior a 1500 mg/L. A interferência foi demonstrada em duas amostras sintéticas (salmoura e sedimentos marinhos) e uma amostra natural de sedimento marinho. Foi possível eliminar todas as interferências usando uma chama de temperatura mais elevada (óxido nitroso/acetileno).

Em 2000, IZGI et al.⁴⁸ empregaram planejamento fatorial completo (2^4) com 16 experimentos para a otimização de um processo para determinação de Hg por ETAAS (do inglês, *Electrothermal AAS*). Neste caso, o parâmetro mais importante foi aquele relativo ao volume da solução.

Em 2002, PEREIRA-FILHO et al.⁴⁶ empregaram planejamento fatorial para otimizar as temperaturas de pirólise e atomização em ETAAS. Cádmio e Pb foram determinados usando-se temperaturas de pirólise e atomização reduzidas e, Al e Mo com altas temperaturas de pirólise e atomização. Bons resultados foram obtidos para Cd empregando-se Rh como modificador químico permanente com temperaturas de pirólise e atomização de 640 e 1500 °C, respectivamente. Para Zr, W ou Zr+W, as temperaturas de pirólise e atomização do Cd foram 500 e 1500 °C, respectivamente. Os melhores resultados para Pb foram aqueles usando Rh, Zr, W e Zr+Rh, obtendo-se massas características de 42, 37, 34 e 36 pg, respectivamente. Para este metal foram alcançadas temperaturas de pirólise e atomização de 910 e 1850 °C, respectivamente. Em todas as situações, o número de experimentos executados foi menor do que quando se emprega uma otimização univariada com o mesmo número de variáveis.

Em 2004, FERREIRA et al.⁴⁹ propuseram um procedimento de pré-concentração para determinação de Mn em amostras de água do mar por FAAS baseado na extração em fase sólida de íons Mn(II) como quelato de 4-(2-piridilazo-resorcinol) (PAR) usando carvão ativado como sorvente. A otimização dos parâmetros experimentais (pH, massa de carvão ativado, massa de PAR e tempo de agitação) foi realizada através de planejamento fatorial. Os resultados demonstraram que todas as variáveis e suas interações (pH x massa de PAR; pH x massa de carvão ativado e massa de carvão ativado x tempo de agitação) foram estatisticamente significativas.

O processo de revestimento de ligas gera resíduos sólidos ricos em metais tóxicos. Em 2007, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental provocado por tais resíduos, OLIVIER et al.⁵⁰ empregaram planejamento fatorial no desenvolvimento de um método para extração de zinco de resíduos galvânicos. As seguintes variáveis foram estudadas: concentração ácida (15, 20 ou 30% v/v), tipo de ácido (H₂SO₄ ou HCl), volume de ácido (15, 20 ou 25 mL) e tempo de extração (12, 24 ou 36 h). Este método permitiu estabelecer as condições ótimas (15 mL de HCl 30% durante 12 h) para se obter uma extração de Zn com 100% de eficiência.

Em 2008, SANTOS et al.⁵¹ realizaram a determinação simultânea de As, Cd e Pb em amostras de água purificada para hemodiálise por GFAAS após otimização multivariada baseada no uso de planejamento fatorial. Temperaturas de pirólise e atomização e massa de modificadores químicos foram otimizadas através do uso de planejamento fatorial. Para avaliar a exatidão do método, os analitos foram determinados em material de referência de água natural, com valores concordantes em nível de confiança de 95%. Este método foi usado no controle de qualidade de água purificada para hemodiálise.

3.5. Calibração multivariada

Atualmente diversas ferramentas quimiométricas oferecem alternativas eficientes e efetivas no desenvolvimento de modelos de calibração. Para a análise de dados, os métodos multivariados são os mais adequados porque propiciam um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados, permitindo a identificação de problemas

eventuais com linha base ou interferentes nas amostras usadas na calibração e na previsão. Apesar da idéia de se combinar regressão multivariada e espectrometria de absorção atômica não ser nova e produzir métodos analíticos menos dispendiosos, ser ambientalmente mais correta (menor consumo de reagentes, modificadores, etc.), relativamente mais rápida e sem ensaios de tentativa e erro, poucos artigos podem ser encontrados na literatura sobre esse tema⁵².

A calibração é definida como a operação que determina a relação funcional entre os valores medidos (intensidades de sinais, absorbâncias, comprimentos de onda) e as quantidades analíticas, caracterizando tipos e quantidades de analitos (conteúdo, concentração). A calibração inclui a seleção do modelo, a estimativa dos parâmetros do mesmo, bem como, seus erros, e a validação desses parâmetros. Uma vez validado, o modelo poderá ser usado para prever a concentração do componente químico de interesse em amostras de composição desconhecida, usando a resposta instrumental das mesmas. Absorbância e concentração são apenas exemplos das inúmeras possibilidades que este procedimento oferece para obtenção de informações de interesse a partir de sinais instrumentais⁵³.

Inicialmente os dados são organizados numa matriz **X**, de variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra e contém as respostas medidas para a mesma. O outro conjunto de dados é constituído das variáveis dependentes e organizado na matriz **Y**, caso haja mais de uma variável (mais de um analito de interesse), ou pelo vetor **y**, no caso de uma única variável. O total de elementos deste vetor é igual ao número de amostras e corresponde às concentrações de um determinado analito de interesse ou alguma outra propriedade que se espera prever.

O processo geral de calibração⁵⁴ é composto de duas etapas: MODELAGEM, que estabelece uma relação matemática entre **X** e **Y** no conjunto de calibração e, VALIDAÇÃO, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do(s) analito(s) de interesse. Uma vez concluída a calibração, o sistema (parte instrumental + modelo matemático) está pronto para ser utilizado na previsão em outras amostras.

Medidas em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias são alguns dos motivos que fazem com que os dados experimentais originais não tenham uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de

informações úteis e interpretação dos mesmos. Neste caso, um pré-processamento nos dados originais pode ser de grande valia. Os métodos de pré-processamento mais utilizados consistem basicamente em centrar na média ou autoescalar os dados. Para centrar na média, calcula-se a média das intensidades e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio. Autoescalar significa centrar os dados na média e dividí-los pelo respectivo desvio padrão. Recomenda-se centrar os dados na média no caso de calibração de dados espectroscópicos⁵³.

Os métodos tradicionais de calibração CLS (do inglês, *Classical Least Squares*) e MLR (do inglês, *Multiple Linear Regression*) utilizam toda a informação contida na matriz de dados \mathbf{X} para modelar a concentração, incluindo informações irrelevantes. Um método que é consideravelmente mais eficiente para lidar com ruídos experimentais é o PLS (do inglês, *Partial Least Squares*). Todas as variáveis relevantes são incluídas no modelo via PLS, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes conhecidos, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos. O método PLS é robusto, ou seja, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração⁵⁴.

A base fundamental do PLS é a PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis através de um número menor de "fatores". Constrói-se um novo sistema de eixos denominados de componentes principais para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões⁵⁵. A função das componentes principais é descrever o espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. Isto é feito definindo novos eixos (componentes principais) que se alinham com os dados. A primeira componente principal (PC1) tem uma direção que descreve o máximo espalhamento das amostras, mais que qualquer uma das variáveis originais. Além disto, a percentagem da variação total nos dados descrita por qualquer componente principal pode ser previamente calculada. As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais são denominadas de "scores". Cada componente principal é construída pela combinação linear das variáveis originais. Os coeficientes da combinação linear (quanto cada variável antiga contribui) são denominados de "loadings".

A construção do modelo de calibração utilizando PLS começa com a seleção de um conjunto de amostras representativas de toda a região a ser modelada. Este conjunto será utilizado na construção de um modelo apropriado para relacionar as respostas instrumentais com a concentração. Uma característica do método PLS é a construção das componentes principais utilizando as respostas instrumentais (matriz **X**) levando em consideração informações provenientes das concentrações (matriz **Y**). As matrizes **X** e **Y** são decompostas em scores e loadings de acordo com as equações:

$$X = TP^T + E$$

Onde, **T** e **P** são as matrizes contendo os scores e loadings, respectivamente para a matriz **X**;

$$Y = UQ^T + E$$

Onde, **U** e **Q** são as matrizes com os scores e loadings, respectivamente para a matriz **Y**. Os scores de ambas as matrizes são combinados para calcular os coeficientes de regressão (b):

$$U = bT$$

Estes coeficientes são usados para calcular a concentração da(s) espécie(s) de interesse.

O modelo construído deve ser validado, isto é, testado na previsão das concentrações de amostras (de preferência não usadas na sua construção), para estabelecer se ele irá realmente refletir o comportamento do analito de interesse. Dois fatores devem ser considerados durante a etapa de validação:

- 1) O número de componentes principais a ser utilizado no modelo;
- 2) Detecção de amostras anômalas.

Uma alternativa prática para a determinação do número de componentes principais que serão empregadas na modelagem é o método de validação cruzada⁵⁶.

A validação cruzada é um método baseado na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Esta avaliação é feita pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas e consiste nas seguintes etapas:

- 1) Remove-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração e constrói-se o modelo como anteriormente.
- 2) Usa-se o novo modelo para prever os dados removidos (C_{prevista})

3) Calcula-se o erro de previsão ($C_{\text{real}} - C_{\text{prevista}}$).

4) Calcula-se a soma dos quadrados dos erros de previsão: PRESS (do inglês, *Predicted Residual Error Sum of Squares*)

$$\sum (C_{\text{real}} - C_{\text{prevista}})^2$$

Ou a raiz quadrada dos erros médios de previsão, RMSEP (do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*), que é um desvio padrão

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (C_{\text{real}} - C_{\text{prevista}})^2}{n}}$$

onde n é o número de amostras do conjunto de calibração.

Entretanto, se o objetivo é prever concentrações de novas amostras, é necessário que todas estas novas amostras estejam na mesma faixa de concentração daquelas usadas na etapa de calibração.

Em 2006, FELIPE-SOTELO et al.⁵⁷ observaram que quando Sb é determinado em água por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), os maiores concomitantes (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}) causam deslocamento, depleção e divisão do pico atômico. A construção de um modelo de calibração utilizando PLS se mostrou uma maneira confiável de prever a concentração de Sb em amostras aquosas, com um RMSEP de 1,44 ng/mL.

Em 2007, Petrucelli et al.³⁴ propuseram dois modelos de calibração baseados em PLS para a determinação de Cd e Pb em amostras de lodo de esgoto por TS-FF-AAS. Os modelos de calibração propostos utilizaram perfil total do pico que foram registrados por 57 segundos. Os limites de detecção e quantificação foram três vezes menores que aqueles encontrados quando se usou calibração univariada com padrões em soluções aquosas.

Capítulo 4

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1. Equipamentos e acessórios

Os experimentos com TS-FF-AAS foram realizados em um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo AA 640 (Varian, Mulgrave, Austrália), com correção de fundo feita por lâmpada de deutério. Lâmpadas de catodo oco de Cd e Pb (Varian) foram utilizadas como fonte de radiação. As medidas por Espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) foram feitas utilizando um equipamento de Fluorescência de raios-X, modelo Shimadzu EDX 700 (Kyoto, Japan), provido de um tubo de raios-X de Rh operado a uma voltagem máxima de 50 kV. As medidas foram efetuadas sob vácuo de 30 Pa., 25% de tempo morto do detector, 10 mm de colimação do feixe e tempo de irradiação de 100 s. Estas medidas com XRF foram executadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e contou com a ajuda da Profa. Dra. Maria Izabel M. S. Bueno.

4.2. Sistema TS-FF-AAS

O sistema TS-FF-AAS consiste na união de um sistema em fluxo a um tubo metálico atomizador posicionado sobre a chama de um espectrômetro de absorção atômica convencional.

Na montagem do sistema em fluxo, foram utilizados:

- bomba peristáltica de 8 canais (Ismatec, modelo MCP, Suíça);
- tubos de Tygon® de diferentes diâmetros;
- tubos de polietileno para a configuração da alça de amostragem e percurso do sistema em fluxo (0,8 mm d.i.).

Um suporte de aço inoxidável foi posicionado no queimador ar/acetileno para adaptação do tubo metálico. Como célula de atomização, utilizou-se um tubo de Ni 99% (10 cm de comprimento, 1,0 cm d.i., 1,2 cm d.e.) contendo um orifício central de 2,0 mm de diâmetro para introdução da amostra. Este tubo foi posicionado de forma a permitir que o feixe proveniente da lâmpada de catodo oco

passasse por seu interior. Na injeção da amostra foram utilizados um injetor comutador construído em acrílico e um capilar cerâmico de 10 cm de comprimento, 0,5 mm d.i. e 2,0 mm d.e. (Friatec, Mannheim, Alemanha). A extremidade do capilar, responsável pela produção do aerossol térmico, foi introduzida aproximadamente 2,0 mm no interior do tubo atomizador. A representação esquemática do sistema TS-FF-AAS é mostrada na Figura 4.2.1.

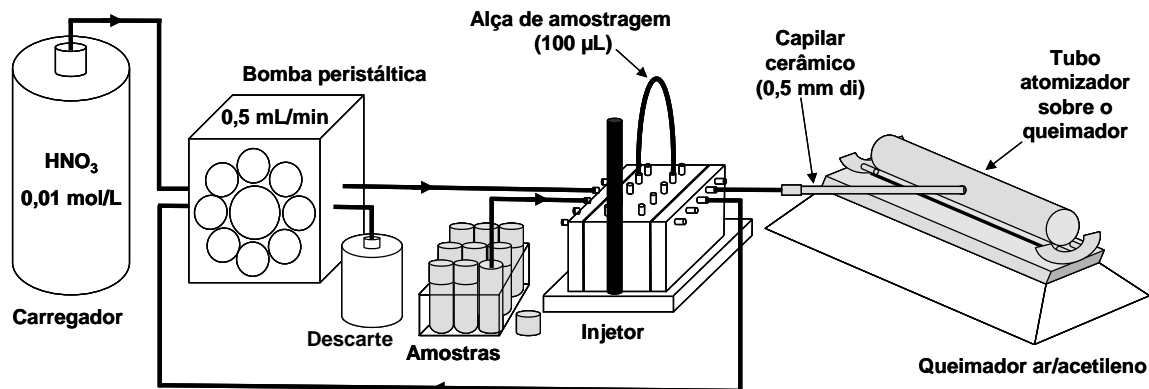


FIGURA 4.2.1. Esquema do sistema TS-FF-AAS, composto por bomba peristáltica, injetor comutador, capilar cerâmico e tubo atomizador de Ni.

4.3. Reagentes e soluções

Reagentes de pureza analítica e água deionizada por sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA) foram utilizados para preparar as soluções. As soluções padrão de referência foram preparadas por sucessivas diluições das soluções estoque de Cd e Pb, de concentração 1000 mg/L (Teclab, Hexis, São Paulo, Brasil). A solução carregadora (HNO_3 0,01 mol/L) foi preparada a partir da solução de HNO_3 14,0 mol/L (Merck, Darmsdadt, Alemanha). As soluções contendo os concomitantes foram preparadas a partir dos seguintes sais: Ca (preparado a partir de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Cu [$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], Fe [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$], K (KCl), Mg [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), Na (NaCl) e Zn [$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$].

4.4. Amostra farmacêutica

Uma amostra farmacêutica (suplemento mineral CALTRATE) foi utilizada para testar os modelos de previsão da concentração total de concomitantes através dos sinais de fundo.

4.5. Descontaminação dos materiais

Toda a vidraria e frascos plásticos utilizados foram lavados com água corrente e detergente neutro, enxaguado com água destilada e deixados em banho ácido (HCl 10% v/v) por 24 h. Após retirado do banho ácido, o material foi enxaguado com água deionizada e deixado em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil) para secagem.

4.6. Tratamento de dados

Planilhas eletrônicas para realizar cálculos dos planejamentos fatoriais foram desenvolvidas utilizando-se o software Excel® da Microsoft e o programa Pirouette 4.0 (Infometrix, USA) foi utilizado para aplicar as ferramentas quimiométricas PCA e PLS.

Capítulo 5

*PROCEDIMIENTO
EXPERIMENTAL*

5. Procedimento Experimental

Os experimentos desta dissertação de mestrado foram divididos em análise do sinal analítico e do sinal de fundo.

5.1. Avaliação dos efeitos de concomitantes no sinal analítico de Cd

Foram investigados os efeitos de oito concomitantes (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) no sinal analítico de Cd com o auxílio de um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} (16 experimentos) sendo que em todos os 16 experimentos a concentração de Cd foi fixada em 15 $\mu\text{g/L}$ (ponto central da curva de calibração). A relação entre as concentrações de Cd e concomitantes foi estabelecida através de uma média baseada em diversas amostras de referência certificada (por exemplo, chá, cabelo humano, tecido de mexilhão, alga verde, folhas de tomateiro, folhas de tabaco, entre outras) considerando-se uma digestão de 250 mg e um volume final de 10 mL. As concentrações dos concomitantes nos níveis -1 e +1, bem como a relação entre Cd e os concomitantes (Cd:Conc.) são apresentadas na Tabela 5.1.1.

TABELA 5.1.1. Concentração dos concomitantes (g/L) e Cd:Conc..

Nível	K	Ca	Na	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
-1	0	0	0	0	0	0	0	0
+1	1,455	0,706	0,202	0,546	0,038	0,042	0,006	0,002
Cd:Conc. (nível +1)	1:97000	1:47067	1:13467	1:36400	1:2533	1:2800	1:400	1:133

Todos os ensaios foram efetuados em ordem aleatória e em triplicata. Em todos os experimentos o corretor de fundo foi acionado e a absorbância integrada dos sinais analíticos foi registrada. A vazão do carregador e o volume de amostra foram iguais a 0,5 mL/min e 100 μL , respectivamente.

5.2. Avaliação dos efeitos de concomitantes no sinal analítico de Pb

Um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} também foi usado para estudar os efeitos de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn no sinal analítico de Pb sendo que em todos os ensaios a concentração deste metal foi fixada em 250 $\mu\text{g/L}$ (ponto central da curva de calibração). A relação entre as concentrações de Pb e concomitantes foi estabelecida através de uma média baseada em amostras de referência certificada considerando-se uma digestão de 250 mg e um volume final de 10 mL. A relação entre Pb e os concomitantes (Pb:Conc) e as concentrações dos concomitantes nos níveis -1 e +1 são apresentadas na Tabela 5.2.1. A vazão do carregador e o volume de amostra foram iguais a 0,5 mL/min e 100 μL , respectivamente.

TABELA 5.2.1. Concentração dos concomitantes (g/L) e Pb:Conc..

Nível	K	Ca	Na	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
-1	0	0	0	0	0	0	0	0
+1	1,559	0,914	0,672	0,529	0,074	0,042	0,008	0,001
Pb:Conc. (nível +1)	1:6234	1:3656	1:2887	1:2114	1:294	1:169	1:32	1:5

5.3. Determinação da concentração total de concomitantes através dos sinais de fundo

Com o objetivo de construir modelos de calibração para determinar a concentração total de concomitantes (soma de Ca, K, Mg e Na), 29 soluções contendo Cd (25 $\mu\text{g/L}$) e Pb (500 $\mu\text{g/L}$) foram preparadas e Ca, K, Mg e Na foram adicionados. Os experimentos realizados são apresentados na Tabela 5.3.1. A primeira solução contém apenas Cd e Pb; sendo portanto um branco para os concomitantes. Nos demais experimentos (Exp 1 ao Exp 28), as concentrações dos concomitantes variaram, em g/L, de 0,20 (Exp 26) a 1,34 (Exp 18) para Na, de 0,16 (Exp 26) a 3,12 (Exp 20) para K, de 0,05 (Exp 26) a 1,06 (Exp 22) para Mg e de 0,09 (Exp 26) a 1,83 (Exp 24) para Ca. A relação entre as concentrações de Cd, Pb e concomitantes foi obtida através do mesmo procedimento adotado nos itens

anteriores. Micronutrientes em concentrações encontradas em amostras certificadas descritas anteriormente também foram testados para avaliar suas contribuições no sinal de fundo.

TABELA 5.3.1. Experimentos realizados para a construção dos modelos usando os sinais de fundo.

Conjunto de calibração (concentração dos concomitantes em g/L)											
Experimento	[Na]	[K]	[Mg]	[Ca]	[Total]	Experimento	[Na]	[K]	[Mg]	[Ca]	[Total]
Branco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Exp1	0,34	0,78	0,27	0,46	1,85
Exp3	0,34	2,34	0,27	0,46	3,41	Exp4	1,01	2,34	0,27	0,46	4,08
Exp5	0,34	0,78	0,80	0,46	3,05	Exp6	1,01	0,78	0,80	0,46	3,05
Exp8	1,01	2,34	0,80	0,46	4,61	Exp12	1,01	2,34	0,27	1,37	4,99
Exp13	0,34	0,78	0,80	1,37	3,29	Exp14	1,01	0,78	0,80	1,37	3,96
Exp15	0,34	2,34	0,80	1,37	4,85	Exp16	1,01	2,34	0,80	1,37	5,52
Exp18	1,34	1,56	0,53	0,92	4,35	Exp19	0,67	0,00	0,53	0,92	5,24
Exp20	0,67	3,12	0,53	0,92	5,24	Exp21	0,67	1,56	0,00	0,92	3,15
Exp22	0,67	1,56	1,06	0,92	4,21	Exp23	0,67	1,56	0,53	0,00	2,76
Exp24	0,67	1,56	0,53	1,83	4,59	Exp25	0,67	1,56	0,53	0,92	3,68
Exp26	0,20	0,16	0,05	0,09	0,50	Exp27	0,34	0,26	0,09	0,15	0,84
Exp28	0,51	0,39	0,14	0,23	1,26						
Conjunto de validação											
Experimento	[Na]	[K]	[Mg]	[Ca]	Total	Experimento	[Na]	[K]	[Mg]	[Ca]	[Total]
Exp2	1,01	0,78	0,27	0,46	2,52	Exp7	0,34	2,34	0,80	0,46	3,94
Exp9	0,34	0,78	0,27	1,37	2,76	Exp10	1,01	0,78	0,27	1,37	3,43
Exp11	0,34	2,34	0,27	1,37	4,32	Exp17	0,00	1,56	0,53	0,92	3,01

As determinações foram realizadas por TS-FF-AAS utilizando-se chama de ar/acetileno (13,5/2,0 L/min). Os sinais de fundo de Cd (228,8 nm) e Pb (283,3 nm) foram registrados separadamente durante 50 s cada. No processo de determinação foi utilizada uma solução de HNO₃ 0,01 mol/L como carregador a uma vazão de 0,5 mL/min. Já o volume de solução introduzido foi de 100 µL. Alguns experimentos adicionais também foram feitos. Os concomitantes foram estudados individualmente para avaliar a magnitude dos sinais de fundo em 228,8 e 283,3 nm.

Neste caso, a concentração de cada concomitante foi de 1,0 g/L. A Tabela 5.3.2. apresenta os parâmetros utilizados nas determinações por TS-FF-AAS.

TABELA 5.3.2. Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Cd e Pb por TS-FF-AAS.

Parâmetros	Cd	Pb
Vazão do carregador (mL/min)	0,5	
Volume de amostra (μ L)	100	
Vazão de ar (L/min)	13,5	
Vazão de acetileno (L/min)	2,0	
Resolução espectral (nm)	0,5	
Corrente da lâmpada (mA)	4,0	10,0
Comprimento de onda (nm)	228,8	283,3
Altura do tubo (cm)	0,5	
Carregador	HNO ₃ 0,01 mol/L	

5.4. Construção do modelo de calibração para comparação

Com o propósito de comparação, um modelo foi desenvolvido para determinar a concentração total de concomitantes combinando-se XRF e PLS. Para a aquisição dos espectros de XRF, 30 (L de cada solução (29 soluções descritas na Tabela 5.3.1) foram coletados, depositados e secos à temperatura ambiente sobre papéis de filtro de 3 cm de diâmetro (faixa branca, BOECO, Alemanha). Os espectros foram registrados entre 0 e 20 keV, com uma resolução de 0,01 keV, resultando em 2048 pontos por espectro.

5.5. Tratamento dos dados

As determinações por TS-FF-AAS referentes aos 29 experimentos foram realizadas em triplicata. Os sinais de fundo foram organizados em duas matrizes de dados (para Cd e Pb) contendo 87 linhas e 50 colunas. As matrizes

contendo os sinais de fundo para Cd e Pb foram centradas na média e avaliadas usando análise de componentes principais (PCA) para detectar possíveis réplicas anômalas (*outliers*) e para auxiliar na seleção dos experimentos dos conjuntos de calibração e validação. Posteriormente, as médias das réplicas dos sinais de fundo foram calculadas e a absorvância, a absorvância integrada e o perfil completo do pico foram usados para propor modelos de calibração para prever a concentração total de concomitantes.

As determinações por XRF dos 29 experimentos foram efetuadas em triplicata. Os espectros, cada um contendo 2048 pontos, foram organizados em uma matriz de dados contendo 87 linhas e 2048 colunas.

5.6. Teste dos modelos de calibração

Uma amostra farmacêutica contendo Ca, K, Mg e Na foi utilizada para testar os modelos propostos. Para isso, uma suspensão da amostra foi preparada com uma concentração da soma de Ca, K, Mg e Na teórica de 3 g/L.

Capítulo 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

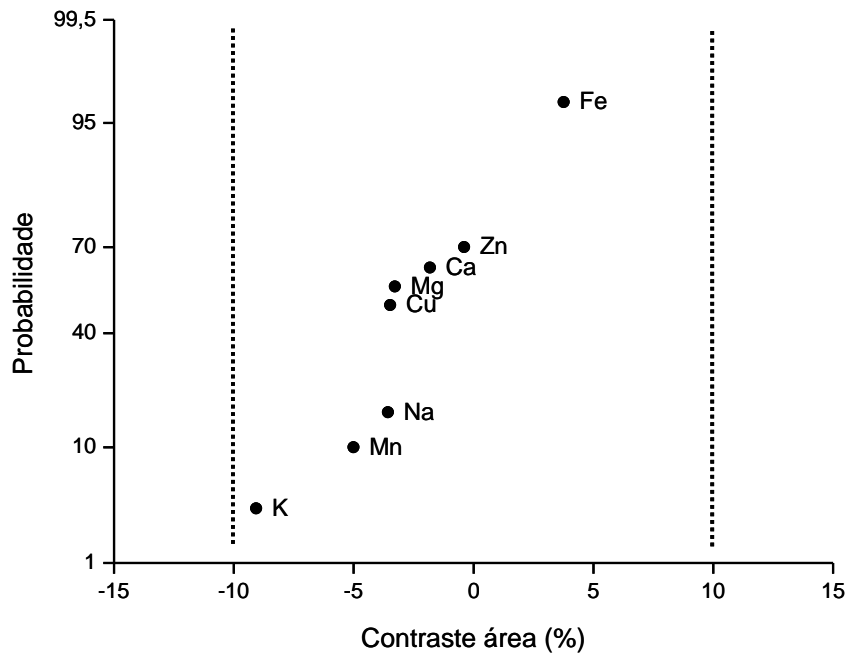


FIGURA 6.1.1. Gráfico de probabilidades com os valores de contrastes.

6.2. Efeitos dos concomitantes no sinal analítico de Pb

Os resultados dos sinais analíticos dos 16 ensaios com os valores das absorvâncias integradas normalizados entre 0 e 100% podem ser vistos na Tabela 6.2.1, sendo que as variações do sinal analítico ficaram abaixo de 10%. Ao observar o gráfico de probabilidades com os valores de contrastes na Figura 6.2.1, constata-se que os contrastes ficaram abaixo de 10% e, em geral, os macronutrientes exerceram mais influência que os micronutrientes sobre as variações do sinal analítico do Pb.

TABELA 6.2.1. Resultados da influência dos concomitantes no sinal analítico de Pb.

Ensaio	K	Ca	Na	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu	Absorbância integrada (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	100
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	101
3	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	94
4	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	104
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	92
6	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	103
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	101
8	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	99
9	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	93
10	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	105
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	95
12	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	110
13	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	107
14	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	109
15	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	103
16	1	1	1	1	1	1	1	1	107

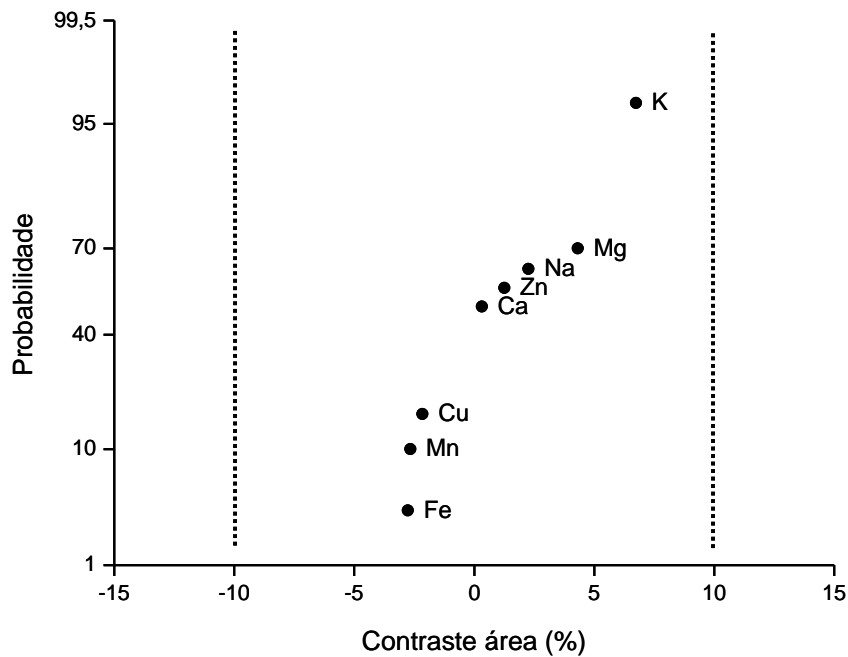


FIGURA 6.2.1. Gráfico de probabilidades com os valores de contrastes.

6.3. Sinal de fundo e concentração total de concomitantes

Quando os micronutrientes foram estudados (veja as concentrações na seção “5. Procedimento experimental”) não foi observada qualquer contribuição no sinal de fundo. Quando a TS-FF-AAS foi comparada com a FAAS, os experimentos com os principais concomitantes (sais de Ca, K, Mg e Na) resultaram em espectros moleculares mais pronunciados, como pressuposto. Durante os experimentos com o comprimento de onda da linha de absorção do Pb (283,8 nm), foi observado que as mesmas concentrações de sais de Ca, K, Mg e Na contribuíram na mesma magnitude para o sinal de fundo. Sinais de fundo para Cd e Pb podem ser vistos na Figura 6.3.1.

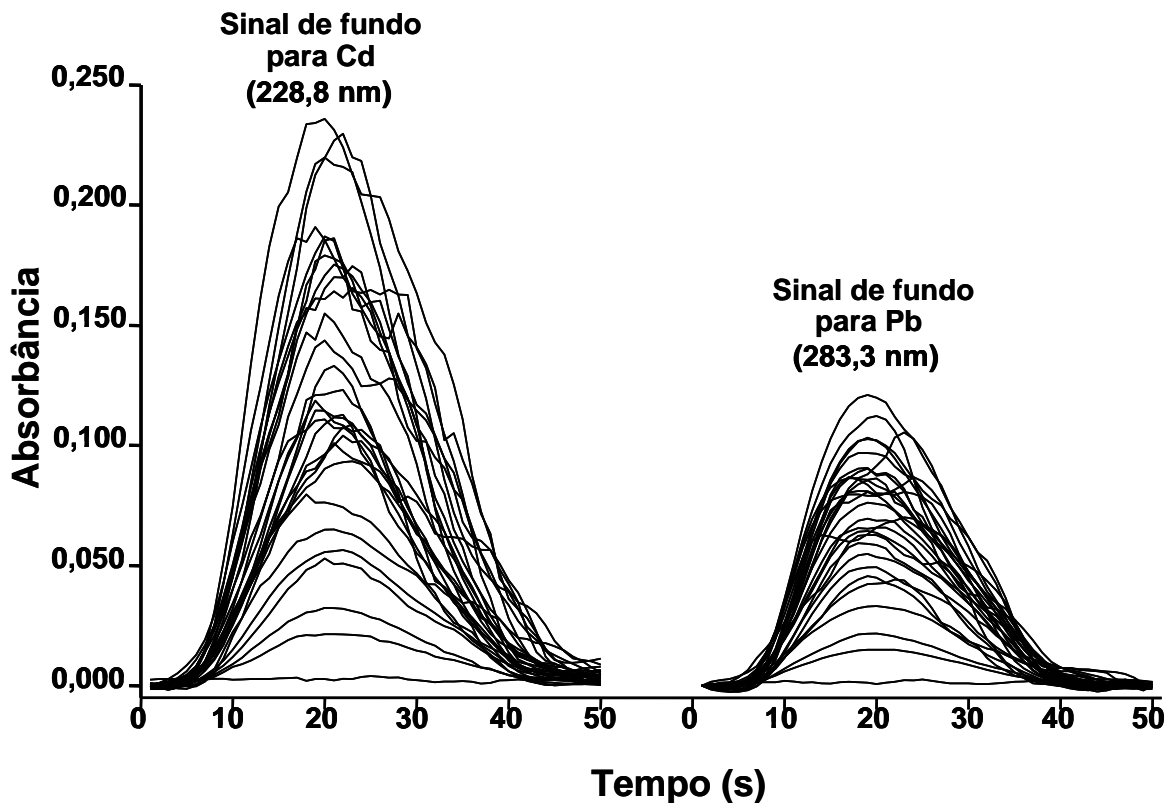


FIGURA 6.3.1. Sinais de fundo obtidos para os experimentos descritos na Tabela 5.3.1 usando TS-FF-AAS.

Com o propósito de selecionar os experimentos para os conjuntos de calibração e validação, as matrizes contendo os sinais de fundo para Cd e Pb foram centrados na média e avaliados usando PCA. Os conjuntos de calibração e validação e as concentrações dos concomitantes usados nos experimentos (branco

e experimentos 1 ao 28) podem ser vistos na Tabela 5.3.1. Com a finalidade de prever a concentração total dos principais concomitantes (soma de Ca, K, Mg e Na), três modelos de calibração multivariada baseados em PLS foram propostos: (a) usando os sinais de fundo do Pb (283,3 nm), (b) usando os sinais de fundo do Cd (228,8 nm) e (c) usando ambos os sinais de fundo do Cd e do Pb. Estes foram comparados com modelos de calibração convencional (univariada) usando absorvância e absorvância integrada.

6.4. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Pb (283,3 nm)

Sinais de fundo obtidos em 283,3 nm (Pb) foram centrados na média e um modelo de calibração foi desenvolvido utilizando PLS. É importante notar que apesar de se incluir quatro concomitantes, apenas 2 componentes principais (PC`s) foram necessárias. A percentagem de variância explicada na matriz **X** foi de 95 %. Foi obtida excelente correlação linear entre as concentrações totais reais e previstas dos concomitantes. A qualidade dos modelos de previsão foi avaliada observando-se a raiz quadrada dos erros médios de calibração (RMSEC) e a raiz quadrada dos erros médios de validação (RMSEV), ambas calculadas conforme a seguinte equação:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (C_{\text{real}} - C_{\text{prevista}})^2}{n}}$$

onde, n é o número de amostras usadas no conjunto de calibração ou validação, C_{real} e C_{prevista} são a concentração real e prevista para os conjuntos de calibração (RMSEC) ou validação (RMSEV). Outros parâmetros do conjunto de calibração como coeficiente de correlação (r) entre os valores reais e previstos, coeficiente linear e coeficiente angular também foram considerados na avaliação da qualidade dos modelos de previsão. Um modelo de boa qualidade deve possuir:

- 1) RMSEC e RMSEV com os menores valores possíveis;
- 2) Coeficiente de correlação e coeficiente angular com valores mais próximos da unidade;
- 3) Coeficiente linear com valor próximo de zero.

Para o modelo usando somente os sinais de fundo em 283,3 nm (Pb), o RMSEC e o RMSEV foram iguais a 0,34 e 0,35, respectivamente. O modelo

ajustado mostrou-se satisfatório, visto que foram notadas diferenças desprezíveis entre os valores reais e previstos, como pode ser observado na Figura 6.4.1. Pode-se concluir que ou os efeitos não lineares não foram acentuados ou estes foram modelados eficientemente pelo PLS. Outros parâmetros do conjunto de calibração como coeficiente de correlação (r) entre os valores reais e previstos, coeficiente linear e coeficiente angular também foram satisfatórios. Tais parâmetros podem ser observados na Tabela 6.9.1 (página 50).

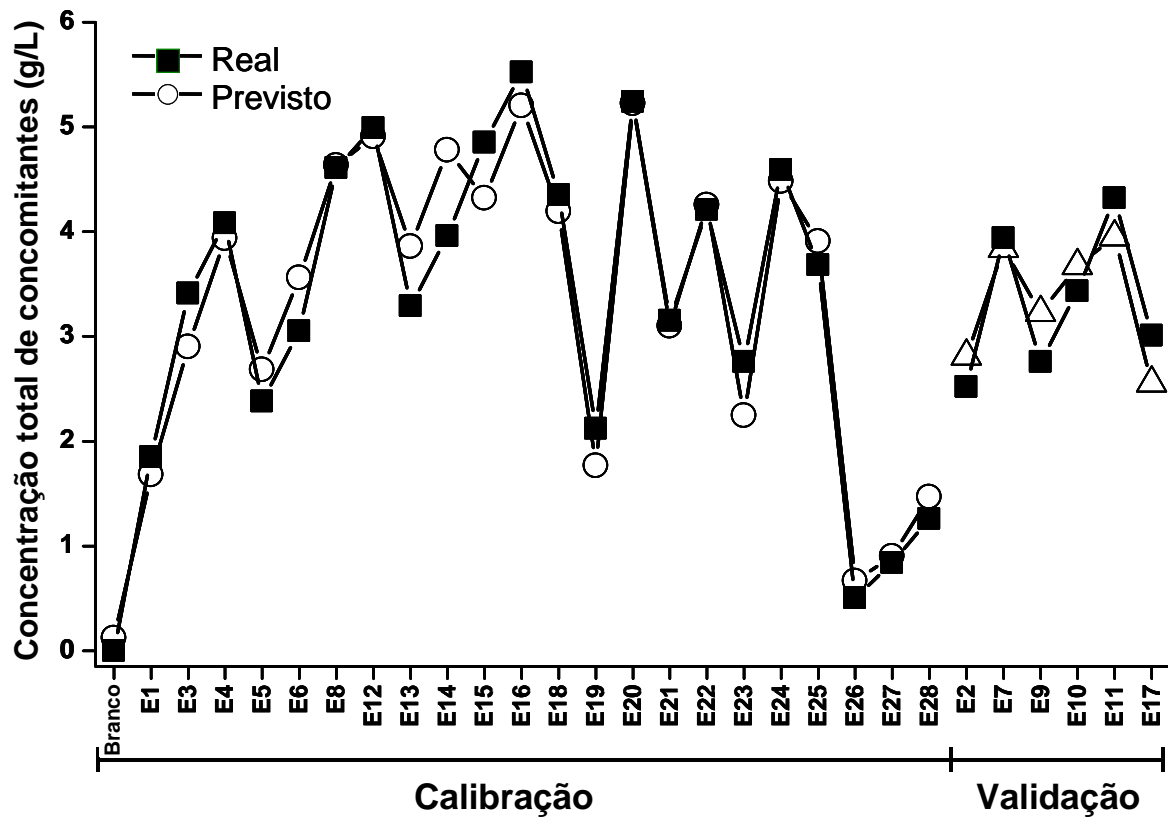


FIGURA 6.4.1. Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de fundo em 283,3 nm (Pb) foram avaliados com PLS.

6.5. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Pb (283,3 nm) e Cd (228,8 nm)

O modelo desenvolvido com ambos os sinais de fundo obtidos em 283,3 nm (Pb) e 228,8 nm (Cd) usando PLS com dados centrados na média mostrou-se satisfatório na previsão da concentração total de concomitantes. As

diferenças entre os valores reais e previstos podem ser observadas na Figura 6.5.1. A porcentagem de variância explicada na matriz X foi de 96 % e foram necessários somente 2 componentes principais (PC`s). Os valores de RMSEC e RMSEV foram de 0,36 e 0,39, respectivamente. Outros parâmetros de calibração são mostrados na Tabela 6.9.1 (página 50).

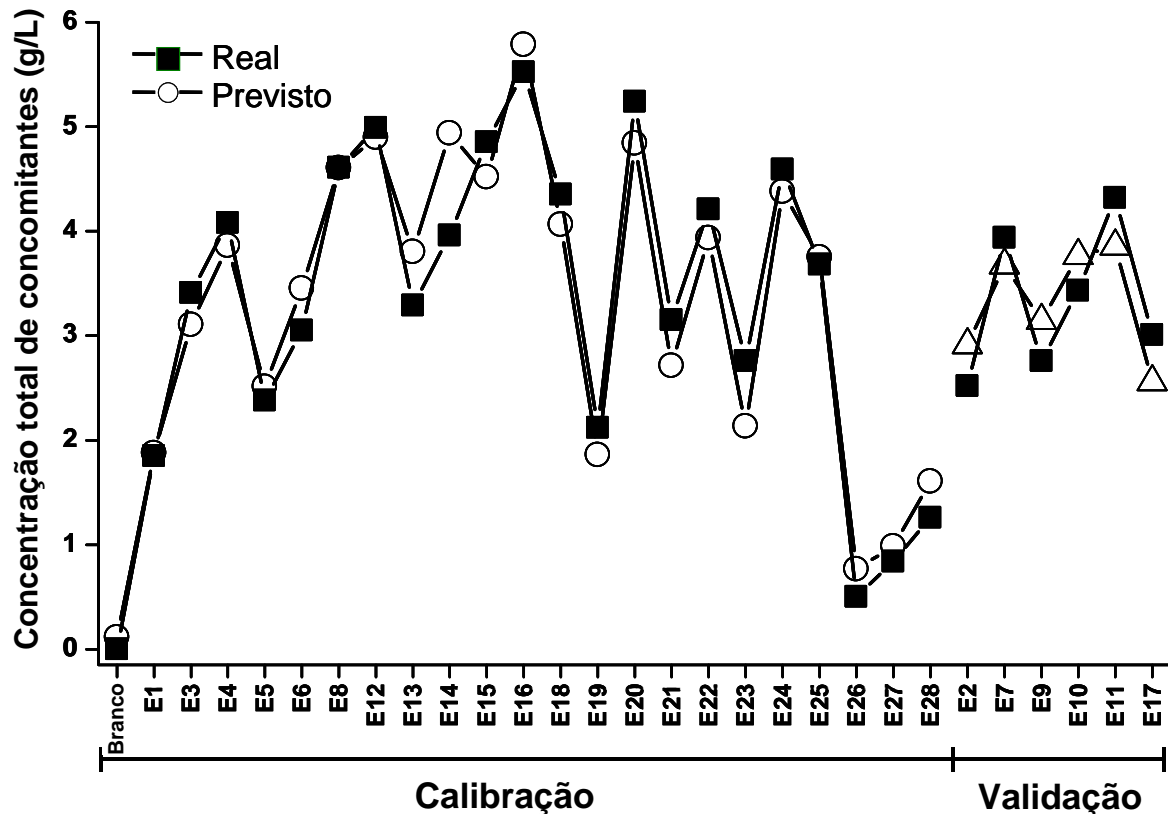


FIGURA 6.5.1. Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando ambos os sinais de fundo em 283,3 nm (Pb) e em 228,8 nm (Cd) foram avaliados com PLS.

6.6. Modelo usando PLS e sinais de fundo do Cd (228,8 nm)

O modelo desenvolvido com os sinais de fundo obtidos em 228,8 nm (Cd) usando PLS não se mostrou tão adequado quanto os outros dois modelos discutidos anteriormente. Este fato pode ser observado na Figura 6.6.1 através das diferenças entre os valores reais e previstos.

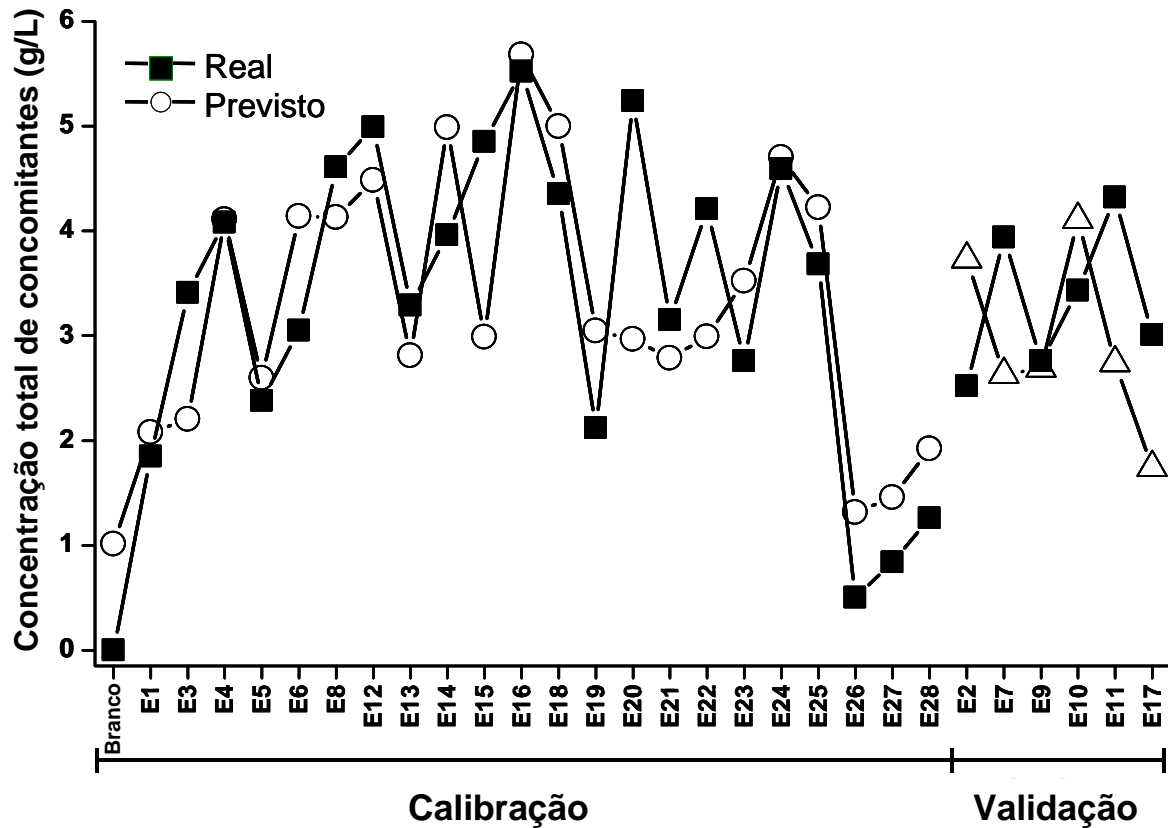


FIGURA 6.6.1. Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de fundo em 228,8 nm (Cd) foram avaliados com PLS.

Isto significa que ou os efeitos não lineares foram acentuados ou estes não puderam ser eficientemente modelados pelo PLS. Os valores de RMSEC (0,92) e RMSEV (1,14) foram 3 vezes maiores que aqueles obtidos com o modelo utilizando PLS e sinais de fundo em 283,3 nm. Durante os experimentos adicionais onde os concomitantes foram estudados individualmente (veja a seção “**5. Procedimento experimental**”), foi observado que os concomitantes apresentaram intensidade do sinal de fundo na mesma magnitude em 283,3 nm. O mesmo não ocorreu quando as medidas foram feitas em 228,8 nm. Neste caso, Na (NaCl) apresentou intensidade do sinal de fundo mais acentuado que os outros concomitantes, prejudicando a linearidade do modelo de previsão da concentração total. Os sinais de fundo em 228,8 nm (veja Figura 6.3.1) foram maiores que aqueles obtidos em 283,3 nm devido às diferenças na contribuição do Sódio. Na realidade, o Na, principalmente como NaCl, apresenta sinal de fundo com maior intensidade em 228,8 nm do que em 283,3 nm. Esta observação já foi reportada por CULVER e SURLES⁴² (veja Figura 3.4.1).

6.7. Modelos de calibração univariada

Modelos utilizando absorvância (altura de pico) e absorvância integrada (área do pico) foram desenvolvidos com os mesmos conjuntos de calibração e validação. Modelos usando sinais de fundo obtidos em 283,3 nm mostraram-se adequados na previsão da concentração total de concomitantes. Em geral, melhores resultados foram obtidos com modelos de calibração multivariada (PLS) em comparação com modelos usando absorvância ou absorvância integrada. Os principais resultados estão resumidos na Tabela 6.9.1 (página 50).

6.8. Modelo de calibração para comparação

Com o propósito de fazer uma comparação com os modelos propostos, uma técnica diferente foi usada para medir a concentração total de concomitantes. Visto que a faixa das concentrações de Ca, K, Mg e Na nos 29 experimentos era em g/L, a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) poderia realizar esta tarefa⁵⁸. No início, tentou-se determinar a concentração de cada concomitante, individualmente, mas os sinais analíticos de Mg e Na não foram observados no espectro (veja Figura 6.8.1), devido às suas baixas concentrações para o XRF (0 – 1,06 g/L para Mg e 0 – 1,34 g/L para Na).

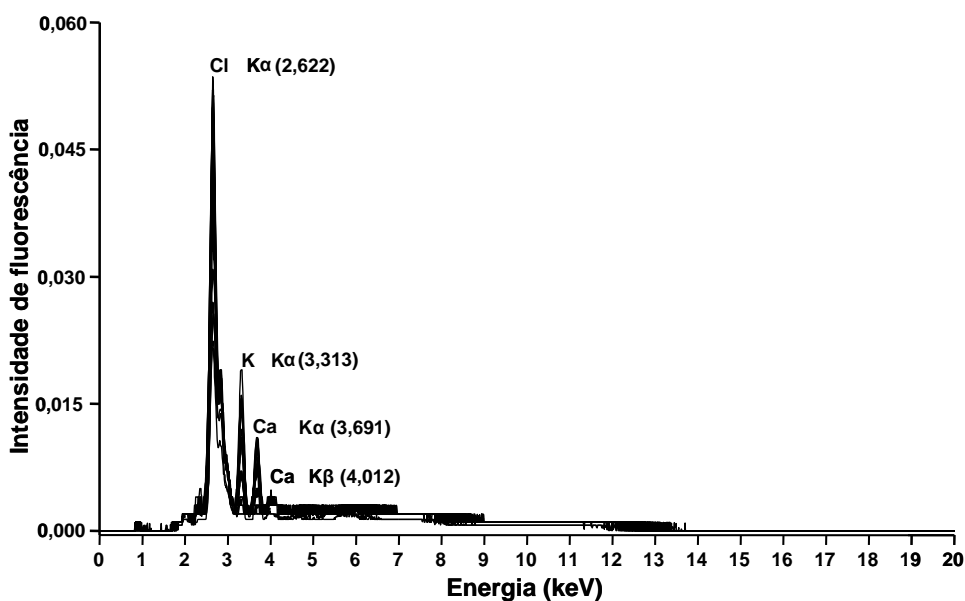


FIGURA 6.8.1. Sinais analíticos obtidos por XRF a partir dos experimentos descritos na Tabela 5.3.1.

Portanto, decidiu-se desenvolver um modelo combinando-se os espectros completos e PLS para determinar a concentração total de concomitantes. Os espectros de XRF foram centrados na média. Os conjuntos de calibração e validação foram os mesmos usados nos modelos propostos com os sinais de fundo. Três componentes principais (PC`s) foram necessárias para explicar 90 % da variância na matriz X . Foi obtida uma boa relação linear entre as concentrações reais e previstas, como pode ser observado através das diferenças entre os valores reais e previstos na Figura 6.8.2. RMSEC, RMSEV e outros parâmetros do conjunto de calibração (veja Tabela 6.9.1 na página 50) foram bem similares aos modelos propostos utilizando PLS e sinais de fundo em 283,3 nm (“Pb”) ou “283,3 nm + 228,8 nm” (“Pb+Cd”).

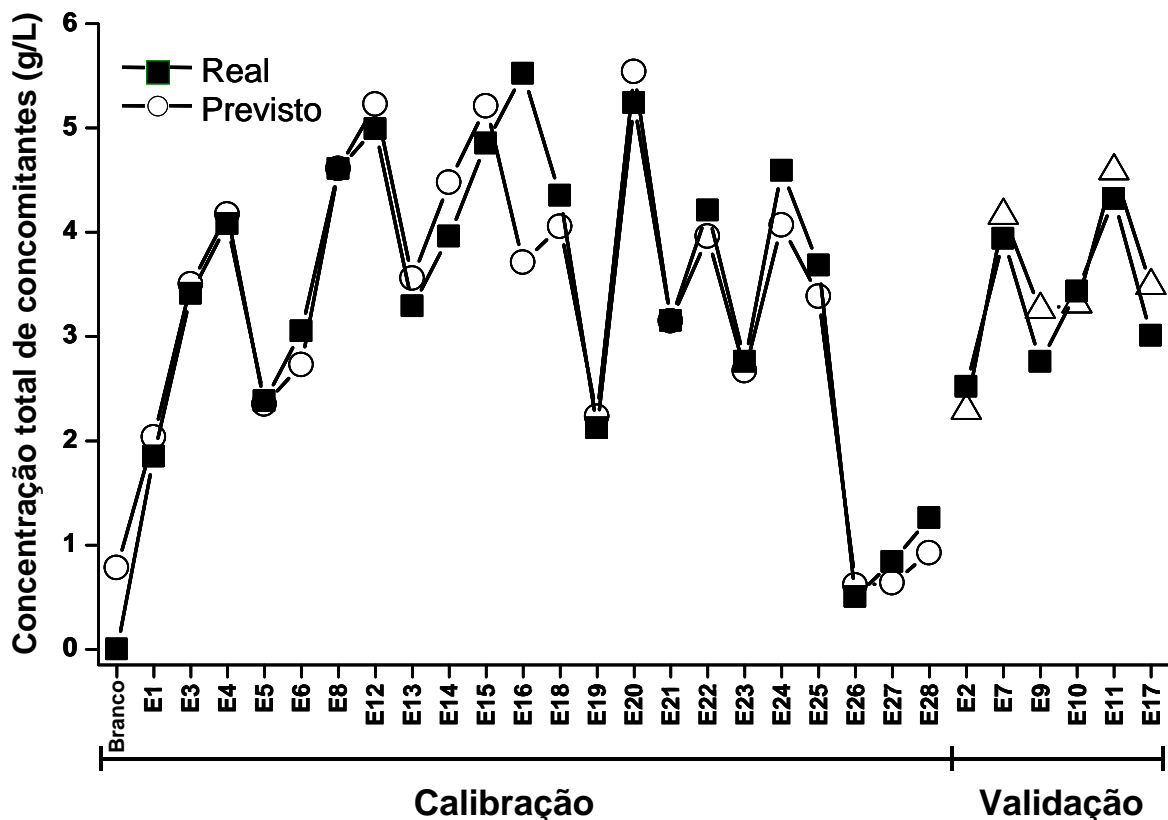


FIGURA 6.8.2. Concentração real e prevista do total de concomitantes para os conjuntos de calibração e validação quando os sinais de XRF foram avaliados com PLS.

6.9. Teste com uma amostra farmacêutica

As estratégias apresentadas foram testadas em uma amostra farmacêutica contendo Ca, K, Mg e Na. A suspensão da amostra foi preparada com uma concentração esperada de 3 g/L e os resultados da previsão para todos os modelos propostos podem ser vistos na última coluna da Tabela 6.9.1 (página 50). Os modelos usando PLS (com exceção para Cd) mostraram boa concordância considerando-se os valores teóricos e previstos, sendo que o modelo desenvolvido com PLS e sinais de fundo em 283,3 nm exibiu o menor erro relativo (3%). Os resultados para os 3 melhores modelos podem ser vistos na Figura 6.9.1. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para este modelo foram calculados de acordo com o procedimento reportado por BRAGA e POPPI⁵⁹. Os resultados obtidos foram de 21 e 71 mg/L, respectivamente.

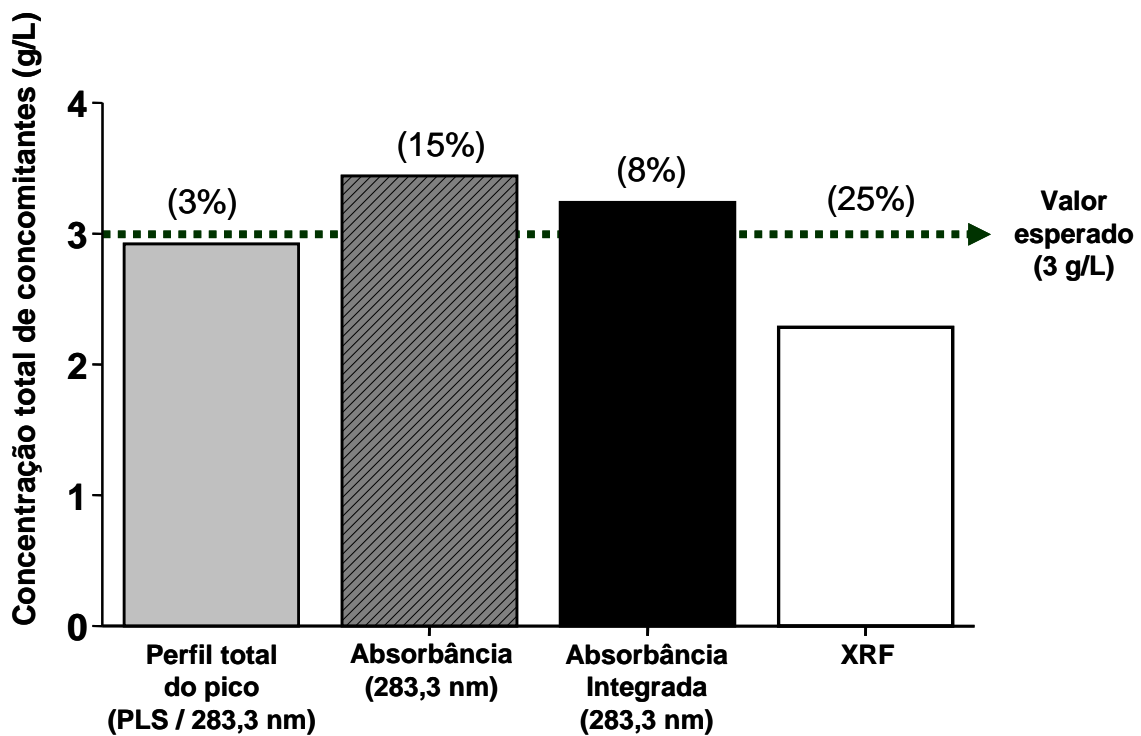


FIGURA 6.9.1. Resultados obtidos para os três melhores modelos propostos em uma amostra farmacêutica.

TABELA 6.9.1. Parâmetros dos modelos propostos e a soma das concentrações de Na, K, Mg e Ca em uma amostra farmacêutica.

Modelo		Variância em X (%)	#PC's	RMSEC	RMSEV	Parâmetros do conjunto de calibração			Soma das concentrações de Na, K, Mg e Ca (g/L) em uma amostra farmacêutica (Erro relativo %)
						Coefficiente de correlação (r)	Inclinação	Intercepto	
Pb	PLS	95	2	0,34	0,35	0,9877	0,9563	0,1451	2,92 (3%)
Pb+Cd		96	2	0,36	0,39	0,9860	0,9453	0,1692	3,24 (8%)
Cd		96	1	0,92	1,14	0,8946	0,6553	1,1390	1,96 (35%)
XRF		90	3	0,48	0,33	0,9746	0,9003	0,2749	2,24 (25%)
Pb	Absorbância integrada	-	-	0,36	0,40	0,9869	1,0151	-0,0639	3,24 (8%)
	Absorbância	-	-	0,42	0,31	0,9822	1,0134	-0,0614	3,44 (15%)
Pb+Cd	Absorbância integrada	-	-	0,69	1,07	0,9549	1,0000	0,0000	2,10 (30%)
	Absorbância	-	-	0,75	1,04	0,9483	0,9999	-0,0003	2,13 (29%)
Cd	Absorbância integrada	-	-	0,99	1,49	0,9163	0,9999	0,0000	1,44 (52%)
	Absorbância	-	-	1,08	1,44	0,9034	0,9993	0,0006	1,36 (55%)

Capítulo 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7. Conclusões e perspectivas

Os sinais analíticos de Cd e Pb em TS-FF-AAS foram pouco afetados pelos concomitantes estudados (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn), sendo que todos os concomitantes apresentaram contrastes inferiores a 10%.

Foi possível prever a concentração total dos principais concomitantes (soma de Ca, K, Mg e Na) em soluções padrão e em uma amostra farmacêutica por meio do sinal de fundo em 283,3 nm usando TS-FF-AAS e ferramentas quimiométricas. As determinações foram baseadas no fato de que medidas em TS-FF-AAS produzem sinais de fundo mais pronunciados que em FAAS e, os sais de Ca, K, Mg e Na utilizados contribuíram para a absorção molecular na mesma magnitude em 283,3 nm. Os sinais analíticos e de fundo são simultaneamente registrados pelo espectrômetro, contudo o sinal de fundo é unicamente usado pelo instrumento para fazer a correção. Este estudo amplia as possibilidades de se avaliar concomitantes em AAS explorando os sinais de fundo, visto que a soma das concentrações dos macronutrientes é uma informação útil em amostras com aplicações em nutrição. Este método também pode ser aplicado em outras técnicas onde um espectro possa ser registrado, permitindo que a calibração multivariada possa ser usada para se obter informações de sinais que são descartados.

Os resultados desta dissertação de mestrado foram aceitos para publicação no *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (JAAS, DOI:10.1039/B809896D).

Capítulo 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

1. GÁSPÁR, A. & BERNDT, H. "Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) - a simple method for trace element determination with microsamples in the $\mu\text{g/l}$ concentration range". *Spectrochim. Acta Part B*, **55**: 587, 2000.
2. DAVIES, J. & BERNDT, H. "Improvements in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **479**: 215, 2003.
3. FRY, R. C. & DENTON, M. B. "Molecular absorption spectra of complex matrices in premixed flames". *Anal. Chem.*, **51**: 266, 1979.
4. OLIVEIRA, E. "Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 174, 2003.
5. ABRAHAMS, P. W. "Soils: their implications to human health". *Sci. Total Environ.*, **291**: 1, 2002.
6. Report of the EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials, *Food Chem. Toxicol.*, **46**: S2, 2008.
7. WALSH, A. "The application of atomic absorption spectra to chemical analysis". *Spectrochim. Acta*, **7**: 108, 1955.
8. JONES, W.G. & WALSH, A. "Hollow-cathode discharges: the construction and characteristics of sealed-off tubes for use as spectroscopic light sources". *Spectrochim. Acta*, **16**: 249, 1960.
9. WELZ, B. & SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3ª ed. Weinheim, Wiley-VCH, 1999. 941 p.
10. VANDECASTEELE, C. & BLOCK, C. B. *Modern Methods for Trace Element Determination*. 1ª ed. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 1997. 93 p.
11. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. 5ª ed. Trad. I. C.; P. C. I.; R. H. A. S. & R. H. P. F. Porto Alegre, Bookman, 2002. cap. 9.
12. HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed. Trad. B. P. A. JOSÉ & B. E. OSWALDO. Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, 2005. 483 p.
13. FUWA, K. & VALEE, B. L. "The physical basis of analytical atomic absorption spectrometry. The pertinence of the Beer- Lambert law". *Anal. Chem.*, **35**: 942, 1963.
14. KOROPCHAK, J. A. & WINN, D. H. "Thermospray sample introduction for atomic spectrometry- trends in analytical chemistry". *Trends Anal. Chem.*, **6**: 171, 1987.
15. VESTAL, M.L. & FERGUSSON, G. "Thermospray liquid chromatograph/mass spectrometer interface with direct electrical heating of the capillary, *Anal. Chem.*, **57**: 2373, 1985.
16. PEREIRA-FILHO, E. R.; BERNDT, H. & ARRUDA, M. A. Z. "Simultaneous sample digestion and determination of Cd, Cu and Pb in biological samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) with slurry sample introduction". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **17**: 1308, 2002.
17. GÁSPÁR, A.; SZÉLEZ, E. & BERNDT, H. "Analysis of submicroliter samples using micro thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**: 136, 2002.
18. TARLEY, C. R. T. & ARRUDA, M. A. Z. "A sensitive method for cadmium determination using an on-line polyurethane foam preconcentration system and thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Sci.*, **20**: 961, 2004.

19. IVANOVA, E.; BERNDT, H. & PULVERMACHER, E. "Air driven on-line separation and preconcentration on a C₁₈ column coupled with thermospray flame furnace AAS for the determination of cadmium and lead at µg/L levels". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **19**: 1507, 2004.
20. GONZÁLEZ, E.; AHUMADA, R. & MEDINA, V. "Espectrofotometría de absorción atómica con tubo en la llama: aplicación en la determinación total de cadmio, plomo y zinc en aguas frescas, agua de mar y sedimentos marinos". *Quim. Nova*, **27**: 873, 2004.
21. NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **64**: 912, 2004.
22. PEREIRA, M. G.; PEREIRA-FILHO, E. R. & ARRUDA, M. A. Z. "Determination of cadmium and lead at low levels by using preconcentration at fullerene coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **59**: 515, 2004.
23. NASCENTES, C. C.; KAMOGAWA, M. Y.; FERNANDES, K. G.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**: 749, 2005.
24. LOBO, F. A.; VILLAFRANCA, A. C.; OLIVEIRA, A. P. & MORAES, M. "Sistema TS-FF-AAS com chama acetileno-ar como alternativa em relação à chama acetileno-óxido nitroso em FAAS na determinação de estanho". *Eclética*, **30**: 61, 2005.
25. TARLEY, C. R. T.; FIGUEIREDO, E. C. & ARRUDA, M. A. Z. "Thermospray flame furnace-AAS determination of copper after on-line sorbent preconcentration using a system optimized by experimental designs". *Anal. Sci.*, **21**: 1337, 2005.
26. BRANCALION, M. L. & ARRUDA, M. A. Z. "Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS". *Microchim. Acta*, **150**: 283, 2005.
27. BERNDT, H. & PULVERMACHER, E. "Sample introduction assisted by compressed air in flame furnace AAS: a simple and sensitive method for the determination of traces of toxic elements". *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**: 1826, 2005.
28. DONATI, G. L.; NASCENTES, C. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; ARRUDA, M. A. Z. & NÓBREGA, J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchem. J.*, **82**: 189, 2006.
29. WU, P.; ZHANG, Y.; LV, Y. & HOU, X. "Cloud point extraction-thermospray flame quartz furnace atomic absorption spectrometry for determination of ultratrace cadmium in water and urine". *Spectrochim. Acta Part B*, **61**: 1310, 2006.
30. PETRUCELLI, G. A.; STOCCO, P. K.; BUENO, M. I. M. S. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Tube atomizers in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: characterization using x-ray fluorescence, scanning electron microscopy and chemometrics". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **21**: 1298, 2006.
31. TARLEY, C. R. T.; BARBOSA, A. F.; SEGATELLI, M. G.; FIGUEIREDO, E. C. & LUCAS, P. O. "Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at ngL⁻¹ levels using a simple flow injection minicolumn

- preconcentration system with multiwall carbon nanotubes". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **21**: 1305, 2006.
32. MATOS, G. D. & ARRUDA, M. A. Z. "Online preconcentration/determination of cadmium using grape bagasse in a flow system coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrosc. Lett.*, **39**: 755, 2006.
 33. AMORIM, F. A. C. & BEZERRA, M. A. "Online preconcentration system for determining ultratrace amounts of Cd in vegetal samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchim. Acta*, **159**: 183, 2007.
 34. PETRUCELLI, G. A.; POPPI, R. J.; MINCATO, R. L. & PEREIRA-FILHO, E. R. "TS-FF-AAS and multivariate calibration: a proposition for sewage sludge slurry sample analyses". *Talanta*, **71**: 620, 2007.
 35. ROSINI, F.; NASCENTES, C. C.; NEIRA, J. Y. & NÓBREGA, J. A. "Evaluation of selenium behavior in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **73**: 845, 2007.
 36. BRANCALION, M. L.; SABADINI, E. & ARRUDA, M. A. Z. "Description of the thermospray formed at low flow rate in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry based on high-speed images". *Anal. Chem.*, **79**: 6527, 2007.
 37. WU, P.; GAO, Y.; CHENG, G.; YANG, W.; LV, Y. & HOU, X. "Selective determination of traces amounts of silver in complicated matrices by displacement-cloud point extraction coupled with thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **23**: 752, 2008.
 38. MATOS, G. D. & ARRUDA, M. A. Z. "Improvements in cobalt determination by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry using an on-line derivatization strategy". *Talanta*, **76**: 475, 2008.
 39. COELHO, L. M. & BEZERRA, M. A.; ARRUDA, M. A. Z.; BRUNS, R. E. & FERREIRA, S. L. C. "Determination of Cd, Cu, and Pb after cloud point extraction using multielemental sequential determination by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS)". *Sep. Sci. Technol.*, **43**: 815, 2008.
 40. SCHIAVO, D.; NEIRA, J. Y. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **76**: 1113, 2008.
 41. KOIRTYOHANN, S. R. & PICKETT, E. E. "Background corrections in long path atomic absorption spectrometry". *Anal. Chem.*, **37**: 601, 1965.
 42. CULVER, B. R. & SURLS, T. "Interference of molecular spectra due to alkali halides in non-flame atomic absorption spectrometry". *Anal. Chem.*, **47**: 920, 1975.
 43. DAMINELLI, G.; KATSKOV, D.A.; MOFOLO, R.M. & TITTARELLI, P. "Atomic and molecular spectra of vapours evolved in a graphite furnace. Part 1. Alkali halides". *Spectrochim. Acta Part B*, **54**: 669, 1999.
 44. KATSKOV, D.A.; MOFOLO, R.M. & TITTARELLI, P. "Atomic and molecular spectra of vapors evolved in a graphite furnace. Part 4: Alkaline earth chlorides". *Spectrochim. Acta Part B*, **56**: 57, 2001.
 45. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 3ª ed. Editora da Unicamp, Campinas, 2008. 17 p.
 46. PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J. & ARRUDA, M. A. Z. "Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS". *Quím. Nova*, **25**: 246, 2002.
 47. BARAJ, B.; NIENCHESKI, L. F. H.; TRAPAGA, R. D.; FRANÇA, R. G.;

- COCOLI, V. & ROBINSON, D. "Study of interference in the flame atomic absorption spectrometric determination of lithium by using factorial design". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364**: 678, 1999.
48. IZGI, B.; DEMIR, C. & GÜÇER, S. "Application of factorial design for mercury determination by trapping and graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B*, **55**: 971, 2000.
49. FERREIRA, A.C.; KORN, M.D.G.A. & FERREIRA, S.L.C. "Multivariate optimization in preconcentration procedure for manganese determination in seawater samples by FAAS". *Microchim. Acta*, **146**: 271, 2004.
50. OLIVIER, S.; SILVA, V.L.; MOTTA, M. & SILVA, J.E. "Emprego de planejamento fatorial no desenvolvimento de uma metodologia para extração de zinco de resíduos galvânicos". *Quim. Nova*, **30**: 1750, 2007.
51. SANTOS, L. M. G.; GONCALVES, J. M. & JACOB, S. C. "Determinação simultânea de As, Cd e Pb em amostras de água purificada para hemodiálise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite após otimização multivariada baseada no uso de planejamento experimental". *Quím. Nova*, **31**: 975, 2008.
52. ANDRADE, J. M.; CAL-PRIETO, M. J.; GÓMEZ-CARRACEDO, M.P.; CARLOSENA, A. & PRADA, D. "A tutorial on multivariate calibration in atomic spectrometry techniques". *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**: 15, 2008.
53. HAALAND, D. M. & THOMAS, E. V. "Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information". *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
54. GELADI, P. & KOWALSKI, B. R. "Partial least-squares regression: a tutorial". *Anal. Chim. Acta*, **185**: 1, 1986.
55. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S. & VOLPE, P.L.O. "Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial". *Quím. Nova*, **22**: 724, 1999.
56. WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. & ERIKSSON, L. "PLS-regression: A basic tool of chemometrics". *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **58**: 109, 2001.
57. FELIPE-SOTELO, M.; CAL-PRIETO, M.J.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; ANDRADE, J.M. & CARLOSENA, A. "Linear PLS regression to cope with interferences of major concomitants in the determination of antimony by ETAAS". *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**: 61, 2006.
58. PEREIRA, F.M.V.; PEREIRA-FILHO, E. R. & BUENO, M.I.M.S. "Development of a methodology for calcium, iron, potassium, magnesium, manganese, and zinc quantification in teas using x-ray spectroscopy and multivariate calibration". *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5723, 2006.
59. BRAGA, J. W. B. & POPPI, R. J. "Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration". *J. Pharm. Sci.*, **93**, 2124, 2004.