

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTRATÉGIAS ESPECTROANALÍTICAS PARA
ANÁLISE QUÍMICA INORGÂNICA DE PLANTAS
MEDICINAIS**

Alex Virgilio*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

*Bolsista CAPES

**São Carlos – SP
2014**

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

V816ee Virgilio, Alex.
Estratégias espectroanalíticas para análise química
inorgânica de plantas medicinais / Alex Virgilio. -- São Carlos
: UFSCar, 2014.
126 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Química analítica. 2. Plantas medicinais. 3. Técnicas
espectrométricas. 4. Análise inorgânica. I. Título.

CDD: 543 (20^a)



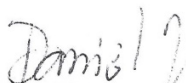
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

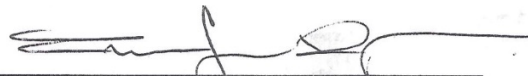
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Alex Virgilio, realizada em 01/12/2014:


Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega
UFSCar


Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges
UFSC


Prof. Dr. Francisco José Krug
USP


Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
USP


Profa. Dra. Solange Cadore
UNICAMP

"A vida é curta demais para se acordar pela manhã com arrependimentos. Então, ame as pessoas que te tratam bem e esqueça-se daquelas que não o fazem. Acredite que tudo acontece por uma razão. Se você tiver uma chance, agarre-a. Se ela mudar sua vida, deixe-a. Ninguém disse que seria fácil. Simplesmente prometeram que valeria a pena."

Harvey Mackay

"Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação. Para mim, é muito melhor compreender o universo como ele realmente é do que persistir no engano, por mais satisfatório e tranquilizador que possa parecer."

Carl Sagan

**Aos meus pais Sérgio e Marli,
ao meu irmão André
À minha família e meus amigos
Dedico**

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pela amizade, orientação, paciência, incentivos e ensinamentos. Obrigado pelo apoio, por acreditar na minha capacidade e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Professor Dr. José Anchieta Gomes Neto pela amizade, dedicação, parceria e oportunidades dadas durante toda minha jornada acadêmica.

À Professora Dra. Mercedes de Moraes por sua amizade e pela forma dedicada e atenciosa com que sempre se dispôs a compartilhar seus valiosos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Bradley Todd Jones pelo companheirismo e pela oportunidade de realizar meu estágio em seu laboratório no Department of Chemistry da Wake Forest University (EUA).

Ao Professor Dr. George Luis Donati pela amizade, paciência, ensinamentos e orientação durante meu período de estágio no exterior. Agradeço a ele, Nice, Carolzinha, Bruna, Felipe, Jim e Rosemary Davidson pelos vários momentos agradáveis e por serem minha família durante o tempo em que estive em Winston-Salem, NC.

À Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira e ao Professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela amizade e pelas sugestões dadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do grupo GAIA com quem tive o prazer de conviver nos últimos anos. Obrigado pelas conversas, ensinamentos, discussões, cafés e momentos de amizade e descontração.

À Dra. Renata Stábile Amais e Dra. Daniela Schiavo pela amizade e ensinamentos sobre ICP-MS. À Professora Dra. Poliana Macedo dos Santos pela amizade.

Aos amigos do grupo GEA, integrantes e ex-integrantes, pelo convívio, apoio, companheirismo e ensinamentos durante todos esses anos de pós-graduação. Ao Professor Dr. Jorge Luiz Raposo Júnior pela amizade e parceria dentro e fora do laboratório.

Ao meu amigo Dr. Jardes Figuerêdo do Rêgo por sua amizade, parceria, ensinamentos e às valiosas discussões e contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química (UFSCar) e Instituto de Química (UNESP) e seus profissionais por me proporcionarem a oportunidade de obter uma sólida formação em Química através de seus ensinamentos, atenção e dedicação ao longo dos anos.

Aos meus pais Sérgio e Marli, meu irmão André pelo amor incondicional, carinho, apoio, por sempre estarem ao meu lado, acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu tivesse uma boa educação e formação.

À minha amada família pelo permanente incentivo e por estarem presentes em todas as conquistas e também em momentos de dificuldade.

À minha noiva Carol pelo amor, carinho, cumplicidade e por ser tão especial em minha vida. Obrigado por apoiar minhas decisões e por ser paciente e compreensiva principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de Araraquara pela constante presença em minha vida e pelos momentos de apoio, descontração e companheirismo.

Aos meus amigos de São Carlos, em especial ao Roma, Quake, Marcelão e Flor pelos inúmeros churrascos, cervejas, risadas e momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduiche no exterior (Processo BEX 18901-12/3).

À Analytik Jena AG e Agilent Technologies por cederem gentilmente algumas das figuras utilizadas neste trabalho.

Aos membros da banca pelas sugestões e correções.

A todos que estiveram presentes e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Corrente alternada (<i>Alternate current</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAS	Espectrometria de absorção atômica (<i>Atomic absorption spectrometry</i>)
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo (<i>Background equivalent concentration</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-coupled device</i>)
CP	Pixel central (<i>Central pixel</i>)
CRC	Cela de colisão e reação (<i>Collision/reaction cell</i>)
CRI	Interface de reação e colisão (<i>Collision/reaction interface</i>)
CRM	Material de referência certificado (<i>Certified reference material</i>)
DC	Corrente contínua (<i>Direct current</i>)
DRC	Cela de reação dinâmica (<i>Dynamic reaction cell</i>)
EC	Calibração externa (<i>External calibration</i>)
EDL	Lâmpada de descarga sem eletrodo (<i>Electrodeless discharge lamp</i>)
EMEA	Agência Europeia de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (<i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>)
ETV	Vaporização eletrotérmica (<i>Electrothermal vaporization</i>)
ETV-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e com vaporização eletrotérmica (<i>Electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
F AAS	Espectrometria de absorção atômica em chama (<i>Flame atomic absorption spectrometry</i>)
FP	Fotometria de chama (<i>Flame photometry</i>)

GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (<i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
GSAM	Método generalizado das adições de padrão (<i>Generalized standard additions method</i>)
HG AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (<i>Hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i>)
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução (<i>High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i>)
HR-CS F AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em chama (<i>High-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry</i>)
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em forno de grafite (<i>High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
HR-CS MAS	Espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução (<i>High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry</i>)
ICP	Plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP-MS/MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem (<i>Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry</i>)
ICP-QMS	Espectrometria de massas quadrupolar com plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry</i>)
ICPQQQ	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e triplo quadrupolo (<i>Triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IS	Padronização interna (<i>Internal Standardization</i>)
ISA	Adição de padrão interno (<i>Internal Standard Addition</i>)

INAA	Análise por ativação neutrônica instrumental (<i>Instrumental Neutron Activation Analysis</i>)
KED	Descriminação por energia cinética (<i>Kinetic energy discrimination</i>)
LA	Ablação a laser (<i>Laser ablation</i>)
LA-ICP-MS	Ablação a laser acoplada à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (<i>Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
LS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linhas (<i>Line source atomic absorption spectrometry</i>)
LS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com fonte de linhas (<i>Line source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
LSBC	Correção de fundo por mínimos quadrados (<i>Least squares background correction</i>)
m_0	Massa característica
ORS	Sistema octapolar de reação (<i>Octopole reaction system</i>)
R	Coeficiente de correlação linear
RF	Radio frequência
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
SAM	Método de adição de padrão (<i>Standard Addition Method</i>)
SDA	Análise por diluição de padrão (<i>Standard dilution analysis</i>)
SDA ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e análise por diluição de padrão (<i>Standard dilution analysis inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
SBR	Razão sinal analítico / sinal de fundo (<i>Signal-to-background ratio</i>)
SF ICP-MS	Espectrometria de massas com setor magnético com plasma indutivamente acoplado (<i>Sector field inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)

SN-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e nebulização de solução (<i>Solution nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
SRM	Material de referência padrão (<i>Standard reference material</i>)
SS	Análise direta de sólidos (<i>Solid sampling</i>)
SS-GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com análise direta de sólidos (<i>Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
SS-HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em forno de grafite com análise direta de sólidos (<i>Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
STPF	Forno com plataforma e temperatura estabilizada (<i>Stabilized temperature platform furnace</i>)
THGA	Atomizador de grafite aquecido transversalmente (<i>Transversely heated graphite atomizer</i>)
TOF ICP-MS	Espectrometria de massas por tempo de voo com plasma acoplado indutivamente (<i>Time of flight inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
TRA	Análise resolvida temporalmente (<i>Time-resolved analysis</i>)
USN	Nebulização ultrassônica (<i>Ultrasonic nebulization</i>)
XRF	Fluorescência de raios-X (<i>X-ray fluorescence</i>)
WC AAS	Espectrometria de absorção atômica com filamento de tungstênio (<i>Tungsten coil atomic absorption spectrometry</i>)
WC AES	Espectrometria de emissão atômica com filamento de tungstênio (<i>Tungsten coil atomic emission spectrometry</i>)
WC AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com filamento de tungstênio (<i>Tungsten coil atomic fluorescence spectrometry</i>)
WIA	Absorbância integrada no comprimento de onda (<i>Wavelength integrated absorbance</i>)
WSA	Absorbância selecionada no comprimento de onda (<i>Wavelength selected absorbance</i>)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Programa de moagem criogênica empregado para as amostras de plantas medicinais. Adaptado de Rêgo. ⁵⁸	24
TABELA 3.2 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão das amostras de plantas medicinais.	25
TABELA 3.3 – Programa de aquecimento utilizado para otimizações e determinações por SS-HR-CS GF AAS.	26
TABELA 3.4 – Condições operacionais do ICP OES para determinação de Al. ...	27
TABELA 3.5 – Massas características (m_0) calculadas para meio aquoso e sólido em diferentes temperaturas de atomização (T_a), tipos de pirólise e modificadores....	34
TABELA 3.6 – Determinação de Cr, Ni e V em CRMs utilizando calibração aquosa e pirólises convencional e assistida por ar por SS-HR-CS GF AAS (média \pm desvio padrão, $n=3$).	35
TABELA 3.7 – Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Cr, Ni e V por SS-HR-CS GF AAS utilizando calibração com soluções aquosas e sólidos e empregando pirólise assistida por ar.	37
TABELA 3.8 – Condições otimizadas para determinação de Cr, Ni e V em plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS.	38
TABELA 3.9 – Concentrações determinadas (média \pm desvio padrão, $n=3$) para Cr, Ni e V em plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS.	38
TABELA 3.10 – Parâmetros de desempenho para Al por HR-CS F AAS: intervalo linear, sensibilidade, coeficiente de correlação linear (R), concentração característica (C_0), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD).	41
TABELA 3.11 – Resultados (média \pm desvio padrão, $n=3$) para determinação de Al ($\mu\text{g g}^{-1}$) em materiais de referência certificados e plantas medicinais pelo método proposto (HR-CS F AAS) e pelo método comparativo (ICP OES).	42
TABELA 3.12 – Concentrações de Al, Cr, Ni e V em plantas medicinais obtidas neste trabalho em comparação com trabalhos da literatura e legislações.	43
TABELA 4.1 – Programa de aquecimento para tratamento térmico e condicionamento de filamentos de tungstênio novos.	55
TABELA 4.2 – Programa de aquecimento utilizado para otimizações por WC AES.	56
TABELA 4.3 – Programa de aquecimento utilizado para determinações de Al, Cr e V por WC AES.	65

TABELA 4.4 – Temperaturas de ebulição e energias de ionização para os analitos (Al, Cr e V) e modificadores (Co, Ni e Pd) avaliados neste trabalho.	67
TABELA 4.5 – Parâmetros de desempenho para Al, Cr e V na presença e ausência de 1000 mg L ⁻¹ de Ni como modificador por WC AES: faixa linear de calibração (linearidade), sensibilidade, coeficiente de correlação linear (R), limite de detecção (LOD) e desvio padrão relativo médio(RSD).	71
TABELA 4.6 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Al por WC AES e ICP OES (mg g ⁻¹) e para Cr e V (mg L ⁻¹) por WC AES após adição de 2 mg L ⁻¹	72
TABELA 4.7 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Al, Cr e V em plantas medicinais e seus respectivos limites de detecção para WC AES.	71
TABELA 5.1 – Condições operacionais padrão e avaliadas em otimizações para ICP OES.	84
TABELA 5.2 – Condições de operação instrumental do ICP OES para determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em plantas medicinais.	87
TABELA 5.3 – Percentuais de recuperação (n=3) para Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em água poluída (WPS-1) utilizando calibração externa (EC), calibração externa e padronização interna (EC + IS), adição de padrão (SAM), adição de padrão e padronização interna (SAM + IS) e análise por diluição de padrão (SDA) para ICP OES.	88
TABELA 5.4 – Percentuais de recuperação (n=3) para Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em sedimento de rio (RSA) utilizando calibração externa (EC), calibração externa e padronização interna (EC + IS), adição de padrão (SAM), adição de padrão e padronização interna (SAM + IS) e análise por diluição de padrão (SDA) para ICP OES.	88
TABELA 5.5 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Al, Fe, Mn, Zn (µg g ⁻¹), Ca e Mg (mg g ⁻¹) em materiais de referência certificados por SDA ICP OES.	89
TABELA 5.6 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Al, Ca, Mg, Fe, Mn e Zn (mg g ⁻¹) em amostras de plantas medicinais por SDA ICP OES.	90
TABELA 6.1 – Exemplos de interferências espectrais em ICP-MS. ¹⁴⁵	94
TABELA 6.2 – Condições operacionais do ICP-MS/MS utilizadas neste trabalho. .	101
TABELA 6.3 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão das amostras CRMs e fitoterápicos.	101

TABELA 6.4 – Sensibilidades e limites de detecção para As, Cd, Cr, Ni, Pb e V sob diferentes vazões de O₂ na ORS e modos de detecção “*on mass*”(Q1=Q2) e “*mass shift*”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS. 103

TABELA 6.5 – Determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em folhas de macieira ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou em % de recuperação, n=3) sob diferentes vazões de O₂ na ORS e modos de detecção “*on mass*”(Q1=Q2) e “*mass shift*”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS. 104

TABELA 6.6 – Determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em folhas de tomateiro ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou em % de recuperação, n=3) sob diferentes vazões de O₂ na ORS e modos de detecção “*on mass*”(Q1=Q2) e “*mass shift*”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS. 105

TABELA 6.7 – Resultados (média \pm desvio padrão, n=3) para As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em amostras de fitoterápicos por ICP-MS/MS. 106

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1 – Representação esquemática do espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS): (1) lâmpada de arco curto de Xe, (2) espelhos focalizadores elipsoidais, atomizadores de (3) forno de grafite e (4) chama, (5) fenda de entrada, (6) espelhos parabólicos, (7) prisma, (8) fenda intermediária ajustável, (9) rede de difração echelle e (10) detector CCD. Fonte: Adaptado de Analytik Jena. Cedido gentilmente por Analytik Jena AG. 14
- FIGURA 3.2 – Espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em chama ou forno de grafite com análise direta de sólidos Analytik Jena ContrAA 700 (Laboratório do Grupo de Espectroanalítica e Automação – GEA, Instituto de Química, UNESP, Araraquara).. 22
- FIGURA 3.3 – Amostrador automático SSA 600 do espectrômetro ContrAA 700® com vista geral (a), detalhes das pinças, plataforma e micro-espátula para inserção de amostra (b), detalhes do braço mecânico e micro-balança (c) e detalhe da adição de modificador químico à plataforma (d). Fonte: Cedido gentilmente por Analytik Jena AG. 23
- FIGURA 3.4 – Plataformas de grafite para análise de sólidos após ciclos de aquecimento utilizando pirólise convencional e assistida por ar. 29
- FIGURA 3.5 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cr em meio aquoso (a) e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) (b) na ausência e presença de modificador $Mg(NO_3)_2$ e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar..... 31
- FIGURA 3.6 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Ni em meio aquoso (a) e sólido (folhas de macieira – SRM 1515) (b) na ausência e presença de modificador $Mg(NO_3)_2$ e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar..... 32
- FIGURA 3.7 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para V em meio aquoso (a) e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) (b) na ausência e presença de modificador BaF_2 e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar.. 33
- FIGURA 3.8 – Curvas de calibração para Cr utilizando $Mg(NO_3)_2$ (a), Ni (b) e V (c) em meio aquoso e sólido com emprego de pirólise assistida por ar por SS-HR-CS GF AAS... 36
- FIGURA 3.9 – Otimização da composição de chama (a) e altura de observação (b) para Al por HR-CS F AAS. 40

FIGURA 4.1 – Diagrama esquemático básico de um espectrômetro de emissão atômica com filamento de tungstênio WCAES. Fonte: Adaptado de VIRGILIO <i>et al.</i> ⁹⁵	48
FIGURA 4.2 – Foto do espectrômetro de emissão atômica com filamento de tungstênio (WC AES), composto de controle de vazão da mistura Ar/H ₂ (a), fonte de energia (b), cela de vidro borossilicato (c) com orifício de introdução da amostra (d), atomizador de filamento de tungstênio (e), janelas de quartzo (f), lente focalizadora (g), fenda de entrada (h) do espectrógrafo (i) e detector CCD (j). Fonte: Autor e adaptação de DONATI. ⁸⁶	53
FIGURA 4.3 – Imagens obtidas por microscopia óptica (magnitude de aumento de 45 X) para filamento de tungstênio novo (a) e após programa de condicionamento (b). Adaptado de VIRGILIO <i>et al.</i> ¹¹⁰	58
FIGURA 4.4 – Relação entre a resistividade e a temperatura para o tungstênio a partir de dados de DESAL <i>et al.</i> ¹¹¹	60
FIGURA 4.5 – Temperaturas superficiais para atomizadores de tungstênio em diferentes correntes aplicadas para filamentos novos e condicionados ¹¹⁰ , e comparação com outros métodos descritos na literatura. ^{112,113}	61
FIGURA 4.6 – Temperaturas superficiais para atomizadores novo e condicionado em diferentes tempos de atomização aplicando 10,5 A. ¹¹⁰	62
FIGURA 4.7 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Al, Cr e V por WC AES utilizando um atomizador condicionado.	64
FIGURA 4.8 – Influência da etapa de pirólise e sua duração sobre os sinais de emissão de Al, Cr e V por WC AES.	65
FIGURA 4.9 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Co sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.	67
FIGURA 4.10 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Ni sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.	68
FIGURA 4.11 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Pd sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.	68
FIGURA 4.12 – Espectros obtidos na faixa espectral de 390 - 440 nm para 1000 mg L ⁻¹ Co (a), 5 mg L ⁻¹ de Al, Cr e V em meio 1000 mg L ⁻¹ Co (b), 1000 mg L ⁻¹ Ni (c) e 5 mg L ⁻¹ de Al, Cr em meio 1000 mg L ⁻¹ Ni (d) para WC AES.	70
FIGURA 5.1 – Exemplo de obtenção dos sinais analíticos pelo método da SDA. Adaptado de VIRGILIO <i>et al.</i> ¹³¹	80
FIGURA 5.2 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da potência de radiofrequência aplicada.	85

FIGURA 5.3 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da pressão do gás de nebulização.	85
FIGURA 5.4 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da vazão de introdução da amostra.....	86
FIGURA 6.1 – Representação esquemática de um instrumento de ICP-QMS. Adaptado de: Agilent Technologies ¹⁴² . Cedida gentilmente por Agilent Technologies.....	92
FIGURA 6.2 – Representação esquemática da remoção de interferências na determinação de ⁸⁰ Se por ICP-QMS (a) e ICP-MS/MS (b) através de reação com oxigênio na cela. Adaptado de Agilent Technologies. ¹⁴⁷ Cedido gentilmente por Agilent Technologies.	97

RESUMO

ESTRATÉGIAS ESPECTROANALÍTICAS PARA ANÁLISE QUÍMICA INORGÂNICA DE PLANTAS MEDICINAIS

Este trabalho de tese descreve o desenvolvimento de procedimentos analíticos baseados em análise direta de sólidos para espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em forno de grafite (SS-HR-CS GF AAS) e soluções aquosas em chama (HR-CS F AAS), espectrometria de emissão atômica com filamento de tungstênio (WC AES), análise por diluição de padrão para espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (SDA ICP OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração tandem (ICP-MS/MS) para análise química inorgânica de plantas medicinais. No primeiro estudo, avaliou-se a SS-HR-CS GF AAS para determinação de Cr, Ni e V. Usando-se um programa de aquecimento do forno de grafite com etapa adicional de pirólise assistida por ar e uso de modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ para Cr, foi possível o emprego da calibração com padrões aquosos para a análise das amostras sólidas. Limites de detecção de 3, 18 e 7 ng g^{-1} foram obtidos para Cr, Ni e V, respectivamente. Por se encontrar em concentrações elevadas nas amostras, Al foi determinado por HR-CS F AAS e apresentou LOD de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para os estudos envolvendo a determinação simultânea de Al, Cr e V por WC AES, foi desenvolvido um novo método para monitoramento da temperatura do atomizador a fim de possibilitar o emprego de programas de aquecimento com melhor precisão e controle. O uso de filamentos condicionados, modificadores químicos para aumento de sensibilidade e etapa de pirólise forneceram menores limites de detecção (0,1 mg g^{-1} Al, 9 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cr e 13 $\mu\text{g g}^{-1}$ V) e melhor precisão. Em outro estudo, avaliou-se o desenvolvimento e aplicação de um novo método de calibração denominado análise por diluição de padrão (SDA) para determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES. A SDA combina os benefícios de compatibilização de matriz da calibração por adição de padrão e de correção de interferências da padronização interna, de maneira eficiente e sem quaisquer modificações instrumentais. O procedimento apresenta elevada frequência analítica e é aplicável para análises de rotina. A SDA

foi comparada com diferentes métodos convencionais de calibração na análise de CRMs, nos quais recuperações entre 88 - 112 % foram obtidas pelo método proposto. Os limites de detecção do método foram de 2 (Al) ; 0,1 (Ca) ; 0,02 (Mg) ; 0,3 (Fe), 0,1 (Mn) e $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Zn). Por fim, foi avaliado o desempenho do ICP-MS/MS na determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em medicamentos fitoterápicos. Utilizando-se a configuração MS/MS, o sistema octapolar de reação pressurizado com oxigênio e a detecção de óxidos para As e Cr, obtiveram-se resultados com boa exatidão e precisão. Nesses casos, limites de detecção de 10 (As); 0,2 (Cd); 8 (Cr); 8 (Ni); 3 (Pb) e 2 ng g^{-1} (V) foram obtidos.

ABSTRACT

SPECTROANALYTICAL STRATEGIES FOR INORGANIC CHEMICAL ANALYSIS OF MEDICINAL PLANTS

This thesis describes the development of analytical procedures based on direct solid analysis by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry in graphite furnace (SS-HR-CS GF AAS) and aqueous solutions by flame (HR-CS F AAS), tungsten coil atomic emission spectrometry (WC AES), standard dilution analysis for inductively coupled plasma optical emission spectrometry (SDA ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry with a tandem mass spectrometer (ICP-MS/MS) for inorganic chemical analysis of medicinal plants. In the first study, SS-HR-CS GF AAS was evaluated for the determination of Al, Cr, Ni and V. The development of an atomizer heating program with an additional air-assisted pyrolysis step and use of chemical modifier for Cr, makes feasible the use of calibration with aqueous standards for solid sample analysis. Limits of detection of 3, 18 and 7 ng g⁻¹ were obtained for Cr, Ni and V, respectively. Aluminum was determined by HR-CS F AAS due to its high content in the samples, and presented a LOD of 10 µg L⁻¹. For studies involving the determination of Al, Cr and V by WC AES, it was developed a new method for atomizer temperature monitoring, in order to perform more accurate and controllable heating programs. The use of conditioned coils, chemical modifiers for sensitivity enhancement and a pyrolysis step produced lower limits of detection (0.1 mg g⁻¹ Al, 9 µg g⁻¹ Cr and 13 µg g⁻¹ V) and better precision. In another study, it was evaluated the development and application of a new calibration method called standard dilution analysis (SDA) for the determination of Al, Ca, Fe, Mg, Mn and Zn by ICP OES. SDA combines the benefits of matrix matching as in the standard additions method, and the correction of interferences similarly to internal standardization approach without any instrumental modifications. The procedure has high sample throughput and it is suitable for routine analysis. SDA was compared to different conventional calibration methods for CRMs analysis and recoveries in the 88 - 112 % range were obtained by the proposed method. Limits of detection of 2 (Al) ; 0.1 (Ca) ; 0.02 (Mg) ; 0.3 (Fe), 0.1 (Mn) and 0.1 µg g⁻¹

(Zn) were obtained. In the last study, it was evaluated the performance of ICP-MS/MS for As, Cd, Cr, Ni, Pb and V determination in phytotherapeutic drugs. By using the MS/MS configuration, oxygen in octopole reaction system (ORS) and oxide detection for As and Cr, results with good accuracy and precision were obtained. In these cases, limits of detection of 10 (As); 0.2 (Cd); 8 (Cr), 8 (Ni), 3 (Pb) and 2 ng g⁻¹ (V) were obtained.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 – <i>Plantas medicinais e legislação</i>	2
1.2 – <i>Análise de plantas medicinais por técnicas espectrométricas</i>	4
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS GERAIS	10
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS PARA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE CONTÍNUA E ALTA RESOLUÇÃO (HR-CS AAS) NA ANÁLISE DE PLANTAS MEDICINAIS ...	12
3.1 – Introdução e revisão bibliográfica	13
3.1.1 – <i>Fundamentos e instrumentação para HR-CS AAS</i>	13
3.1.2 – <i>Aspectos gerais e características da análise direta de sólidos</i>	16
3.1.3 – <i>Aplicações da análise direta de sólidos para HR-CS GF AAS</i>	19
3.2 – Objetivos específicos	21
3.3 – Parte experimental	21
3.3.1 – <i>Instrumentação e condições operacionais</i>	21
3.3.2 – <i>Reagentes, soluções e amostras</i>	23
3.3.3 – <i>Procedimentos analíticos</i>	25

3.4 – Resultados e discussão	27
3.4.1 – <i>Avaliação do comportamento termoquímico dos elementos</i>	27
3.4.2 – <i>Calibração e parâmetros de desempenho analítico</i>	33
3.4.3 – <i>Análise das amostras de plantas medicinais.....</i>	37
3.4.4 – <i>Determinação de Al por HR-CS F AAS.....</i>	39
3.5 – Conclusões Parciais.....	43
CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al, Cr e V EM PLANTAS MEDICINAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO (WC AES)	44
4.1 – Introdução e revisão bibliográfica	45
4.1.1 – <i>Fundamentos, instrumentação e aplicações para WC AES.....</i>	45
4.2 - Objetivos específicos.....	52
4.3 – Parte experimental.....	52
4.3.1 – <i>Instrumentação e condições operacionais</i>	52
4.3.2 – <i>Reagentes, soluções e amostras</i>	54
4.3.3 – <i>Procedimentos analíticos</i>	54
4.4 - Resultados e discussão	56
4.4.1 – <i>Desenvolvimento do método voltamperométrico para determinação da temperatura do filamento</i>	56
4.4.2 – <i>Avaliação das etapas de pirólise e atomização e estudos de modificadores químicos.....</i>	63

4.4.3 – <i>Parâmetros de desempenho analítico e análise das amostras</i>	70
4.5 - Conclusões parciais	73
CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR DILUIÇÃO DE PADRÃO PARA ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE PARA ANÁLISE DE PLANTAS MEDICINAIS	74
5.1 – Introdução e revisão bibliográfica	75
5.1.1 – <i>Métodos convencionais de calibração</i>	75
5.1.2 – <i>Calibração por adição de padrão interno e análise por diluição de padrão</i>	77
5.1.3 – <i>Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente</i>	81
5.2 – Objetivos específicos	82
5.3 – Parte experimental	83
5.4 - Resultados e discussão	84
5.4.1 – <i>Otimização das condições operacionais do plasma</i>	84
5.4.2 – <i>Avaliação da análise por adição de padrão para determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em plantas medicinais</i>	87
5.5 - Conclusões parciais	90

CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE E CONFIGURAÇÃO DE TRIPLO QUADRUPOLO (ICP-MS/MS) PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	91
6.1 – Introdução e revisão bibliográfica	92
<i>6.1.1 – Fundamentos, instrumentação e correção de interferências para ICP-MS</i>	<i>82</i>
<i>6.1.2 – ICP-MS/MS</i>	<i>96</i>
6.2 – Objetivos específicos	100
6.3 – Parte experimental	100
6.4 - Resultados e discussão	102
6.5 - Conclusões parciais	107
CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

CAPÍTULO 1

Introdução e Revisão bibliográfica

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Plantas medicinais e legislação

O uso de plantas para cura de males e doenças é quase tão antigo quanto a própria história da humanidade. Os homens primitivos se alimentavam de determinadas plantas ou de seus constituintes (raízes, caules, folhas, frutos e sementes), e observavam suas ações e efeitos tanto tóxicos como curativos.¹ Devido ao uso medicinal de plantas estar por muito tempo agregado a práticas místicas, ritualísticas e mágicas, há grande dificuldade para estabelecer sua evolução ao longo do tempo. Os primeiros registros históricos remontam ao ano 3000 a.C. na China, onde as primeiras farmacopéias começaram a ser registradas e compiladas.²

Na medicina moderna, plantas medicinais são definidas como plantas que contêm substâncias pró-ativas com propriedades terapêuticas (tratamento de enfermidades), profiláticas (prevenção de doenças) e paliativas (amenização de sintomas). A fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura de doenças.³ Essas plantas são geralmente utilizadas em tratamentos alternativos de baixo custo na forma de chás, da própria planta seca ou como fitoterápicos, que são descritos como medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem ter composição padronizada, oferecer garantia de qualidade e ter a segurança e seus efeitos terapêuticos comprovados.⁴

Plantas medicinais são reatores biológicos capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos químicos que desempenham funções biológicas importantes no organismo. Apesar de bem-intencionado, seu uso não é isento de risco, devendo ser considerada a mesma cautela requerida a qualquer outro medicamento.⁵ Além do princípio ativo terapêutico, a planta pode conter outras substâncias tóxicas provenientes de contaminação por agrotóxicos⁶ ou metais.⁷ A concentração de um elemento nutriente ou tóxico em uma planta varia de acordo com a espécie vegetal, seu estágio de crescimento, estado nutricional e outras condições que influenciem a translocação do elemento do solo ao tecido vegetal.⁸ Todo princípio ativo terapêutico e produtos secundários (dentre esses os elementos essenciais e tóxicos) apenas são

benéficos dentro de um estreito intervalo de concentração, sendo que abaixo desse patamar o efeito é insignificante e acima passa a ser tóxico. Como a biodiversidade vegetal brasileira é vasta, a variação na composição elementar de plantas medicinais pode ser muito grande.

É estimado que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais ou preparações como atenção primária de saúde.⁹ Com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro a plantas medicinais e fitoterápicos, promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, foi aprovado em 22 de junho 2006 o Decreto 5.813 instituindo o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.³ Adicionalmente, foi instituída a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) através da Portaria Ministerial nº 971 de 03 de maio de 2006, com os objetivos de estimular mecanismos naturais de prevenção e recuperação da saúde, integrar o ser humano com o meio ambiente e promover alternativas inovadoras e socialmente contributivas ao desenvolvimento sustentável.⁹ Os documentos de ambas as legislações descrevem detalhadamente os objetivos, metas, diretrizes, definições, prazos, responsabilidades, entre outros aspectos da implantação e gestão dessas políticas públicas.

Com o intuito de assegurar o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 9 de março de 2010 através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 instituiu o marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos.¹⁰ Em seu Anexo 1, são dispostas informações acerca de nomes científico e popular, parte da planta utilizada, forma de uso, posologia, indicações de uso, contraindicações, reações adversas e referências para consulta.¹¹

Mais recentemente em sua Instrução Normativa nº 4 de 18 de junho de 2014, são descritos os procedimentos para requerimento de registro de medicamentos fitoterápicos.¹² Anexo a esse documento, no item 2.4 *Testes de Pureza e Integridade*, é disposta a necessidade da determinação de elementos potencialmente tóxicos e também seus limites máximos permitidos de acordo com os Métodos Gerais da Farmacopeia Brasileira.¹³ Vale a pena ressaltar que as concentrações de elementos

essenciais ou tóxicos podem variar também de acordo com a forma de preparação e administração empregada pelo usuário de plantas medicinais.

Embora seja possível afirmar que problemas de saúde ocasionados pela exposição a metais potencialmente tóxicos em plantas sejam uma realidade, a extensão do problema ainda não foi devidamente estudada para plantas medicinais. Através das políticas nacionais, o acesso da população brasileira a plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos é uma realidade e tende a aumentar. Sendo assim, é indispensável o estabelecimento de procedimentos analíticos para conhecimento da composição inorgânica dessas plantas, a fim de garantir o monitoramento de sua qualidade.

1.2 Análise de plantas medicinais por técnicas espectrométricas

É descrita na literatura uma extensa quantidade de trabalhos envolvendo a determinação de elementos-traço e majoritários em plantas medicinais utilizando diversas técnicas espectroanalíticas, como espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e forno de grafite (GF AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), fluorescência de raios-X (XRF) e outras. Em virtude disso, a presente revisão tem como objetivo enfatizar os trabalhos mais recentes e relevantes destacando-se diferentes estratégias e métodos analíticos para análise química inorgânica de plantas medicinais.

KOLASANI e colaboradores¹⁴ determinaram as concentrações de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, e Zn em 50 amostras de plantas medicinais de origem chinesa utilizando F AAS com chama ar/acetileno. O preparo de amostra foi feito por digestão ácida em sistema aberto e os autores utilizaram ferramentas quimiométricas para separação e classificação de acordo com as concentrações encontradas para os macro e micronutrientes. Concentrações médias entre 1,04 e 30,0 mg g⁻¹ para Ca, Fe, K e Mg e entre 72 e 281 µg g⁻¹ para Mn, Na e Zn foram determinados nas amostras. BECHLIN *et al.*¹⁵ utilizaram as estratégias de absorbância integrada no comprimento de onda (WIA) e somatório de sinais de absorbância para incremento de sensibilidade para determinação de B, P (via molécula de PO) e S (via molécula de CS) em 12 amostras

digeridas de plantas medicinais por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em chama (HR-CS F AAS) utilizando chama acetileno/óxido nitroso. A integração com 3 a 5 pixels foi eficiente para aumento de sensibilidade, porém, o ganho em limite de detecção (LOD) foi limitado. O uso do somatório de linhas proporcionou uma ligeira redução em LOD apenas para P e S. As amostras analisadas apresentaram concentrações entre 19,4 - 34,5 mg kg⁻¹ B, 719 - 3910 mg kg⁻¹ P e 1469 - 7653 mg kg⁻¹ S.

No trabalho de OKATCH e colaboradores¹⁶ foi desenvolvido um procedimento para monitoramento de elementos tóxicos como As, Cr, Ni e Pb em amostras de plantas medicinais de regiões africanas utilizadas no combate de doenças oportunistas associadas a AIDS. Os autores encontraram concentrações de 0,19 - 0,54 µg g⁻¹ Cd (LOD = 0,16 µg g⁻¹), 0,15 - 1,27 µg g⁻¹ Cr (LOD = 0,08 µg g⁻¹), 0,09 - 0,21 µg g⁻¹ Ni (LOD = 0,06 µg g⁻¹) e de 0,12 - 0,23 µg g⁻¹ Pb (LOD = 0,03 µg g⁻¹) por F AAS nos digeridos das amostras, sendo que os valores determinados foram menores do que os níveis permitidos pela OMS. LIU *et al.*¹⁷ propuseram um método para determinação simultânea de As e Se total por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS) após digestão em sistema com aquecimento assistido por radiação micro-ondas. Os autores utilizaram meio de HCl e ácido tartárico para favorecer a geração simultânea dos hidretos de As e Se. As concentrações máximas determinadas foram de 0,53 µg g⁻¹ As (LOD = 0,13 µg L⁻¹) e 0,21 µg g⁻¹ Se (LOD = 0,13 µg L⁻¹).

KOLACHI *et al.*¹⁸ estudaram procedimentos de extração aquosa para determinação de Se em plantas medicinais por GF AAS com mistura Pd/Mg como modificador químico. O procedimento consistiu na adição de 25 mL de água a 1,0 g da amostra e posterior extração em chapa de aquecimento a 80 °C com tempo variável entre 10 e 60 min para extração convencional, ou ainda utilizando um sistema com aquecimento assistido por micro-ondas com tempo variável entre 0,5 e 5 min. Após filtração, a análise de amostras enriquecidas mostrou boas recuperações após 40 min de extração convencional e 2 min de extração assistida por micro-ondas, sendo que para ambos os procedimentos não houve diferenças significativas ao nível de 95% de confiança. As amostras foram também digeridas para determinação de Se total e residual. Teores totais de 4,8 - 9,6 µg g⁻¹, extraíveis de 1,1 a 2,2 µg g⁻¹ e residuais de

3,2 a 7,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ Se foram determinados nas amostras. KALNY e colaboradores¹⁹ utilizaram GF AAS para determinar Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em materiais de referência certificados (CRMs) e plantas medicinais digeridas em forno de micro-ondas e suas infusões em água fervente. Para Ba e Pb foi utilizado como modificador a mistura $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e para Ni foi utilizado $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Em geral, as eficiências de extração foram baixas para a maioria dos elementos e amostras estudados, sendo geralmente maiores que 50% apenas para Ni e Zn. As concentrações máximas determinadas em digeridos foram de 72,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Ba, 0,68 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Cd, 0,91 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Cr, 9,49 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Cu, 522 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Fe, 11,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Ni, 1,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Pb e 221 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Zn.

RÊGO e colaboradores²⁰ propuseram um procedimento baseado na análise direta de sólidos acoplada a HR-CS GF AAS para determinação de Pb em CRMs e amostras de plantas medicinais. Os autores estudaram o uso dos modificadores convencionais $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e plataforma modificada permanentemente com W. Foi avaliada a possibilidade de calibração aquosa através de pirólise assistida por ar e a influência dos modificadores no comportamento térmico, sensibilidade e precisão para Pb em meios aquoso e sólido. Foi avaliada também a homogeneidade das amostras e a massa mínima estimada foi de 0,1 mg. As concentrações determinadas nas amostras variaram entre 0,30 e 1,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ com LOD de 24 ng g^{-1} e precisão melhor do que 10%. FORTUNATO *et al.*²¹ propuseram um método utilizando amostragem por suspensões para determinação simultânea de Cd e Pb por LS GF AAS utilizando Ir como modificador permanente. As suspensões foram preparadas adicionando-se 10 mL de solução 0,2 % $\text{HNO}_3 + 0,05$ % Triton X-100 (v/v) a 50 mg de amostra pulverizada em moinho criogênico. Suspensões preparadas a partir de CRMs com concentração entre 0,5 e 2,5 % (m/v) foram estudadas, sendo as melhores recuperações para Cd e Pb obtidas com a menor massa avaliada. Foram determinadas concentrações de Cd entre 0,19 e 0,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ (LOD = 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$) e de Pb entre 1,02 e 1,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ (LOD = 1,22 $\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras com RSD menor que 5,3%.

No trabalho de BARTH WAL *et al.*²² foi estudada a bioacumulação de metais potencialmente tóxicos como Cd, Cr, Ni e Pb em solos e plantas medicinais de áreas ambientais distintas como: área de tráfego pesado (AT), industrial (AI) e

residencial (AR), analisando-se amostras digeridas em sistema aberto com bloco digestor por ICP OES. De modo geral, para uma mesma amostra, as concentrações dos metais determinados em solo e plantas seguem a ordem AT > AI > AR. A acumulação de Pb em plantas com relação à concentração encontrada no solo é maior para áreas que sofrem maior ação antrópica (AT e AI) do que em áreas residenciais. As concentrações médias determinadas em solos e plantas variaram entre 0,1 - 1,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd, 0,2 - 2,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cr, 0,5 - 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ni e 0,4 - 4,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ Pb. GOMEZ *et al.*²³ reportaram em seu trabalho a determinação de Al, Cr, Fe e V por ICP OES com nebulizador ultrassônico e de Cd, Co e Pb por GF AAS utilizando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico (para Cd e Pb apenas) em folhas, flores, chás, tinturas e tabletes de *Hypericum perforatum*, utilizada em tratamentos contra depressão. As concentrações determinadas nas amostras líquidas (tinturas e chás) foram geralmente menores que os LODs para Cd (0,008 $\mu\text{g L}^{-1}$) e Co (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$) e para os digeridos de amostras sólidas (folhas, flores e tabletes), variaram entre 0,05 - 0,26 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd e 0,09 - 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ Co. Para Al (LOD = 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$), Fe (LOD = 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$), Pb (LOD = 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$) e V (LOD = 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$), as concentrações determinadas nas amostras variaram entre 1,2 - 17,7; 7,4 - 45,1; 0,21 - 16,9 e 1,6 - 30 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. As concentrações de Cr ficaram abaixo do LOD (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) para todas as amostras analisadas.

PYTLAKOWSKA *et al.*²⁴ determinaram a composição inorgânica de 12 amostras de plantas e suas infusões utilizando ICP OES. As amostras sólidas foram preparadas utilizando digestão por via seca e posterior solubilização em HCl, ao passo que as infusões foram preparadas adicionando-se água fervente a 2 g de amostra e deixando-as em contato por 10 e 30 min para verificar a eficiência de extração. A partir dos resultados obtidos para os elementos estudados, foi feita a classificação em 3 grupos: i-) altamente extraíveis (>55%): K, ii-) moderadamente extraíveis (20-55%): B, Cu, Mg, Na, P e Zn e iii-) pouco extraíveis (<20%): Al, Ba, Ca, Fe, Mn e Sr. O decréscimo na concentração de alguns elementos em infusões por 30 min foi observado e foi atribuído à formação de complexos com substâncias orgânicas, baixa solubilidade e processos de hidrólise (infusões com pH entre 5,2 e 6,5). ARUMUGAM *et al.*²⁵ investigaram a utilização de ferramentas de análise multivariada para estabelecer a diferenciação e classificação de drogas vegetais de acordo com as concentrações de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn determinados por ICP OES e de Na e K por

fotometria de chama (FP). As amostras foram digeridas utilizando sistema aberto com chapa de aquecimento e as concentrações médias determinadas foram de 84,3 mg kg⁻¹ Al, 0,25 mg kg⁻¹ Co, 7,6 mg kg⁻¹ Cr, 1,1 mg kg⁻¹ Cu, 131,6 mg kg⁻¹ Fe, 555,5 mg kg⁻¹ K, 312,3 mg kg⁻¹ Mg, 7,4 mg kg⁻¹ Mn, 400,7 mg kg⁻¹ Na, 0,34 mg kg⁻¹ Ni, 2,04 mg kg⁻¹ Pb, 2,3 mg kg⁻¹ Zn e <LOD para Cd. O uso das análises de componentes principais (PCA) e hierárquica de clusters (HCA) foi eficiente para diferenciação e classificação das amostras de acordo com o perfil dos elementos analisados.

LOZAK e colaboradores²⁶ reportaram a determinação de Ba, Cd, Co, Cr, Cu, I, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Sr, Ti, V e Zn por ICP-MS e de Ca e Fe por GF AAS em 2 amostras de plantas medicinais digeridas com auxílio de radiação micro-ondas e em infusões. De acordo com as concentrações encontradas nas amostras, os elementos podem ser divididos em 3 grupos: a-) majoritários: Ca, Fe, Mg e Mn com concentrações entre 188 - 15331 mg kg⁻¹ (total) e 27 - 2871 mg kg⁻¹ (extraíveis); b-) minoritários: Ba, Cu, Ni, Pb, Sr, Ti e Zn, com concentrações entre 2,4 e 51 mg kg⁻¹ (total) e 2,3 a 6,3 mg kg⁻¹ (extraíveis); e c-) traço: As, Cd, Co, Cr, I, Li, Se e V, com concentrações entre 0,09 e 0,9 mg kg⁻¹ (total) e 0,008 e 0,4 mg kg⁻¹ (extraíveis). Os limites de detecção variaram entre 0,008 e 0,00001 mg kg⁻¹ para Ca e Co/Cd, respectivamente. LIN & JIANG²⁷ avaliaram a determinação de As, Cr, Hg e Pb por ICP-MS com vaporização eletrotérmica (ETV) e introdução de amostra na forma de suspensões homogêneas com sonda ultrassônica. Os autores utilizaram 8-hidroxiquinolina como modificador para incremento do sinal analítico e analisaram CRMs de plantas para validação do procedimento. Para efeitos de comparação as amostras foram analisadas utilizando-se adição de analito em suspensão 0,5% (m/v) por ETV-ICP-MS e utilizando calibração externa e nebulização pneumática por USN-ICP-MS para amostras digeridas utilizando sistema de micro-ondas. Ambos os métodos foram considerados estatisticamente semelhantes ao nível de 95% de confiança. Concentrações entre 0,18 - 0,40 µg g⁻¹ As (LOD = 0,3 ng g⁻¹), 0,015 - 0,10 µg g⁻¹ Cd (LOD = 0,1 ng g⁻¹), 0,01 - 0,24 µg g⁻¹ Hg (LOD = 0,1 ng g⁻¹), 0,33 - 4,1 µg g⁻¹ Pb (LOD = 0,2 ng g⁻¹) foram determinados pelo método proposto.

BU e colaboradores²⁸ determinaram Al, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, V e Zn em suplementos alimentares a base de plantas por ICP-MS com setor magnético (SF) e introdução de amostra por ablação a laser (LA) ou nebulização

pneumática (SN), após digestão em sistema fechado com aquecimento assistido por radiação micro-ondas. Para LA, as amostras foram pastilhadas e mapeadas em linha a uma taxa de $30 \mu\text{m min}^{-1}$, utilizando um laser Nd-YAG ($\lambda=213 \text{ nm}$), com frequência de 20 Hz e diâmetro de feixe de $100 \mu\text{m}$. Para o ICP-MS foi utilizado o modo de baixa resolução ($m/\Delta m \approx 400$) e ^{13}C foi monitorado como padrão interno. Limites de detecção para LA ICP-MS (entre $1,5 - 2450 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram de 3 a 2750 vezes maiores do que os obtidos para com SN-ICP-MS (entre $0,02$ e $6,9 \mu\text{g kg}^{-1}$), sendo atribuído à menor quantidade de amostra inserida no plasma em LA. As amostras analisadas pelos dois métodos apresentaram boa correlação. NOOKABKAEW *et al.*²⁹ utilizaram a técnica de ICP-MS para determinação de 19 elementos em 3 amostras de plantas medicinais tailandesas digeridas com assistência de radiação micro-ondas e suas infusões. As concentrações médias totais e % de extração encontrados para os elementos essenciais Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Se, Zn e V variaram entre $0,032$ (Se) - 21048 (Ca) mg kg^{-1} , com eficiência de extração entre $1,4$ e $75,6\%$ para V e Mg, respectivamente. Para elementos não essenciais como Al, As, Ba, Cd, Hg, Sb, Sr e Pb, as concentrações variaram entre $0,001$ (Sb) a 2014 (Al) mg kg^{-1} e apresentaram eficiência de extração entre $1,5$ e $53,8\%$ para Al e Sr, respectivamente. Os autores verificaram que as concentrações determinadas ficaram abaixo dos níveis de segurança para o consumo humano.

Apesar da grande quantidade de trabalhos descrevendo a análise química inorgânica de plantas medicinais, ainda há uma demanda crescente pelo desenvolvimento de métodos sensíveis, simples, exatos, precisos e de baixo custo relativo para esses tipos de amostras. Outras técnicas espectroanalíticas como análise por ativação neutrônica instrumental (INAA)³⁰⁻³² e espectrometria com fluorescência de raios-X (XRF),³³⁻³⁵ vêm sendo utilizadas nos últimos anos para a determinação de elementos essenciais e tóxicos em plantas medicinais. Essas, porém, não serão discutidas neste trabalho.

CAPÍTULO 2

Objetivos Gerais

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos desta tese são:

- Avaliar diferentes procedimentos de preparo de amostras para análise de plantas medicinais;
- Desenvolver procedimentos utilizando diferentes técnicas analíticas baseadas em SS-HR-CS GF AAS, HR-CS F AAS, WC AES, ICP OES e ICP-MS/MS para a determinação da composição química inorgânica de plantas medicinais.

CAPÍTULO 3

Avaliação da análise direta de sólidos para espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução (HR-CS AAS) na análise de plantas medicinais

AVALIAÇÃO DA ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS PARA ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FONTE CONTÍNUA E ALTA RESOLUÇÃO (HR-CS AAS) NA ANÁLISE DE PLANTAS MEDICINAIS

3.1 Introdução e revisão bibliográfica

3.1.1 Fundamentos e instrumentação para HR-CS AAS

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica espectroanalítica que se baseia na absorção de radiação, proveniente de uma fonte, por átomos nos estados gasoso e geralmente fundamental. Esta técnica foi proposta inicialmente por Alan Walsh³⁶ no início dos anos 1950 e desde então, vários avanços científicos e tecnológicos como a utilização de atomizadores eletrotérmicos^{37,38} e do conceito de forno com plataforma e temperatura estabilizada (STPF)³⁹, uso de chamas mais energéticas⁴⁰, desenvolvimento de instrumentos com capacidade multielementar⁴¹ e outras inovações nas áreas de microeletrônica e computacional, fizeram com que a AAS se tornasse amplamente difundida e usada rotineiramente.⁴²

A espectrometria de absorção atômica apresenta algumas vantagens como: simplicidade, baixo custo relativo, robustez, seletividade, baixos limites de detecção (para GF AAS) e moderada tolerância aos constituintes matriciais.⁴³ Apesar do notório desempenho analítico, a necessidade de se manter viável e competitiva frente a técnicas analíticas alternativas, provocou uma extensa reformulação conceitual e instrumental em AAS.⁴⁴ Avanços instrumentais como o uso de monocromadores de alta resolução, fontes contínuas de radiação com alta intensidade de emissão e detectores mais modernos proporcionaram o desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução (HR-CS AAS).^{45,46}

A configuração esquemática do espectrômetro de HR-CS AAS⁴⁷ está ilustrada na Figura 3.1. A nuvem atômica gerada pela atomização em tubo de grafite ou chama (3,4) é inicialmente interceptada pela radiação proveniente da lâmpada de arco curto de xenônio, utilizada como fonte contínua (1). A lâmpada de fonte contínua é composta por dois eletrodos com distância de cerca de 1 mm, encapsulados em um invólucro de quartzo pressurizado a 17 bar com Xe gasoso. A lâmpada apresenta potência nominal de 300 W e, quando colocada em operação no modo “hot spot”,

promove uma descarga entre os eletrodos que eleva em até 400% a pressão do gás e gera entre eles um micro plasma com temperaturas de até 10.000 K e diâmetro menor que 0,2 mm. A fonte contínua apresenta um espectro de emissão na região de 190 a 900 nm com intensidades de emissão de 1-2 ordens de grandeza maiores do que uma típica fonte de linhas, o que proporciona elevadas razões sinal/ruído e melhorias de 3 a 10 vezes para os limites de detecção.⁴⁷

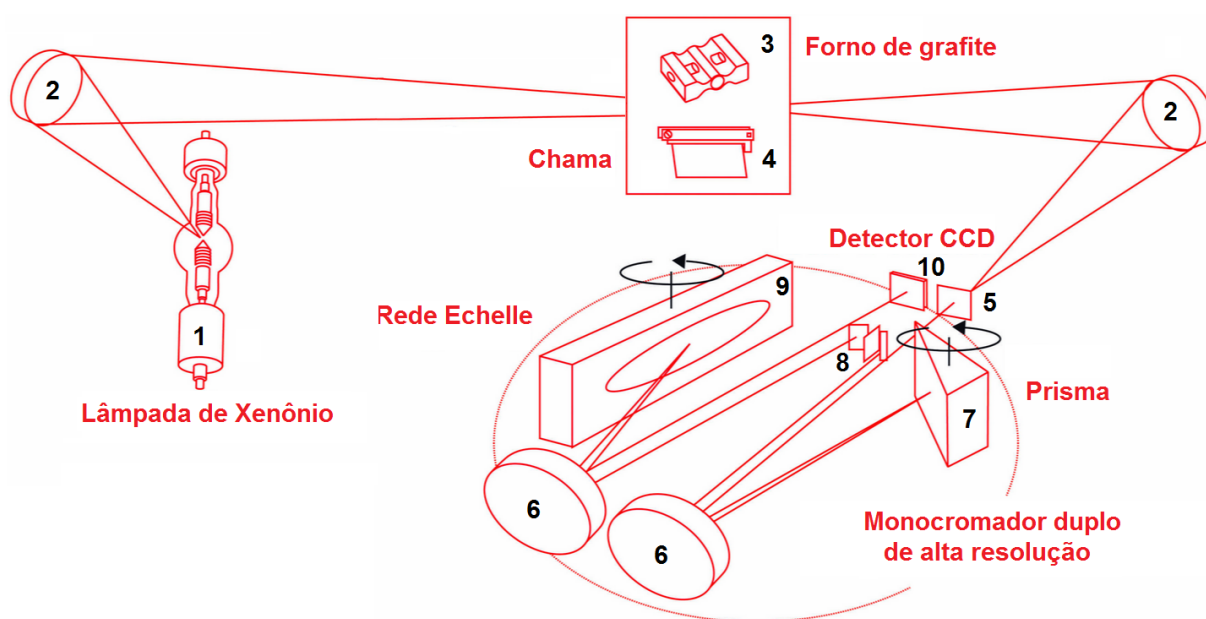


FIGURA 3.1 – Representação esquemática do espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS): (1) lâmpada de arco curto de Xe, (2) espelhos focalizadores elipsoidais, atomizadores de (3) forno de grafite e (4) chama, (5) fenda de entrada, (6) espelhos parabólicos, (7) prisma, (8) fenda intermediária ajustável, (9) rede de difração echelle e (10) detector CCD. Fonte: Adaptado de Analytik Jena. Cedido gentilmente por Analytik Jena AG.

A radiação atenuada pelo fenômeno da absorção é então direcionada através de um espelho focalizador (2) até a fenda de entrada (5) e, posteriormente, até o monocromador. O monocromador duplo de alta resolução é constituído por dois elementos dispersores com arranjo Littrow em série, um prisma (7) e uma rede echelle (9). O prisma atua como elemento pré-dispersor da radiação contínua, selecionando uma determinada região espectral de interesse. Após atravessar a fenda intermediária (8) a radiação parcialmente resolvida é direcionada até a rede echelle, que fornece a alta resolução no intervalo espectral selecionado (cerca de 2 pm pixel^{-1} em 200 nm).⁴⁷

Por fim, a radiação altamente resolvida é direcionada ao detector de carga acoplada. O detector CCD é composto de 588 elementos fotossensíveis (pixels) dispostos linearmente, que oferecem um efetivo registro espacial e temporal de intensidades de sinal. Cada pixel horizontal contém um amplificador individual que o permite atuar de maneira independente, sendo que apenas 1 a 3 deles são tipicamente utilizados nas medidas do sinal analítico. Cerca de 200 pixels são utilizados para visualização do ambiente espectral.⁴⁸

O novo arranjo instrumental da HR-CS AAS e suas inerentes funcionalidades ofereceram novas possibilidades e estratégias analíticas até então indisponíveis para a instrumentação de LS AAS. Devido à ampla faixa de emissão da fonte contínua e mudanças no comprimento de onda selecionado em curto intervalo de tempo, a determinação multielementar é uma possibilidade, tanto de maneira sequencial rápida (apenas para atomização em chama) quanto simultânea (quando os sinais para diferentes analitos estiverem na mesma janela espectral).⁴⁹ Além da maior sensibilidade, a alta intensidade da lâmpada de arco curto de Xe proporciona a determinação de elementos em linhas secundárias sem o comprometimento da precisão e da razão sinal/ruído.

O acoplamento entre o monocromador de alta resolução e o detector CCD é outro aspecto que se sobressai em HR-CS AAS. O detector de carga acoplada possibilita o registro dos sinais de absorvância em pixels adjacentes ao pixel do comprimento de onda principal, o chamado registro na lateral (ou “asa”) do pico (WSA), a fim de se diminuir a sensibilidade e possibilitar a extensão do intervalo linear de calibração.⁵⁰ Outra possibilidade é a utilização dos pixels adjacentes ao central (CP) na integração do sinal analítico (WIA). O uso de 3 ($CP\pm 1$), 5 ($CP\pm 2$) e 7 ($CP\pm 3$) pixels na integração proporciona incrementos substanciais de sensibilidade, que diminui à medida que mais pixels são avaliados, devido a proximidade da linha de base e conseqüentemente maior integração de ruído.⁵⁰ Essas duas funcionalidades podem ser utilizadas após simples reprocessamento de sinal após a leitura, porém dependem do elemento analisado e do perfil dos picos.

Em HR-CS AAS, o fundo para eventos contínuos é automaticamente corrigido.⁴⁸ Devido à possibilidade de registro de espectros tridimensionais (absorvância vs. comprimento de onda vs. tempo) e uma melhor visualização do ambiente espectral,

abriu-se uma nova possibilidade para eventos não contínuos, tais como a correção de fundo estruturado via programa de controle usando-se o algoritmo dos mínimos quadrados (LSBC).⁵¹ A determinação de elementos não metálicos como S, F, Cl, Br, I e N por LS AAS é considerada inviável, pois as linhas de ressonância para esses elementos situam-se na região do ultravioleta no vácuo, inacessível a essa instrumentação. Devido à alta resolução proporcionada pela HR-CS AAS, é possível a medida de sinais analíticos originados por moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina e alta energia de dissociação (e.g. PO, CS, SH e outras) para quantificação de não metais e halogênios por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS).⁵²

3.1.2 Aspectos gerais e características da análise direta de sólidos

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) é uma técnica bastante atrativa para a análise direta de sólidos (SS), devido principalmente a sua alta sensibilidade e por atuar como um reator termoquímico no pré-tratamento da amostra durante o programa de aquecimento para separação entre analito e matriz.⁵³ Por empregar um preparo mínimo de amostras, métodos analíticos envolvendo a análise direta de sólidos apresentam como vantagens a redução nos riscos de contaminação e perdas, possibilidade de calibração com soluções aquosas, menor consumo de amostras e reagentes perigosos, menor geração de resíduos, e elevada frequência analítica.⁵⁴

A análise direta de sólidos pode ser empregada em uma gama de matrizes, sendo algumas dessas aplicações bastante atrativas como: i-) na análise de materiais de alta pureza como os utilizados na indústria de semicondutores, que requerem menores riscos de contaminação durante a etapa de preparo de amostra; ii-) na análise de amostras de difícil decomposição como solos, rochas e vidros por dispensar o uso de reagente perigosos, minimizar perdas de analito e aumentar a frequência analítica; iii-) na análise de materiais com disponibilidade reduzida como amostras biológicas e forenses por empregar pequenas massas de amostra (ca. 1 mg) e iv-) em estudo de homogeneidade e representatividade para CRMs.⁵⁴

Apesar das vantagens apontadas, a análise direta de sólidos apresenta algumas limitações e desafios a serem superados. Por empregar quantidades reduzidas de amostra, problemas relacionados à homogeneidade e representatividade são corriqueiros.⁵⁵ Um material pode ser considerado homogêneo para uma determinada característica avaliada quando não apresentar diferença significativa na comparação entre suas partes distintas. Amostras aparentemente homogêneas podem se comportar como heterogêneas à medida que a porção analisada é reduzida, sendo então necessário o estabelecimento de uma massa mínima que garanta representatividade, precisão e exatidão adequados.⁵⁶ Em virtude disso, incertezas da ordem de 5-10% para elementos na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e de 10-30 % para elementos presentes em ng g^{-1} podem ser considerados adequados em SS. KURFÜRST⁵⁷ estabeleceu um método para caracterizar a homogeneidade de materiais através da definição do parâmetro constante de homogeneidade (H_e), utilizando a equação:

$$H_e = S_H \times \sqrt{m}$$

A constante de homogeneidade (H_e) é proporcional ao erro relativo a amostragem (S_H) para uma determinada massa de amostra (m) em mg e pode ser estimada diretamente a partir do desvio-padrão relativo das medidas ($S_H = \% \text{RSD}$). Um material pode ser considerado homogêneo quando H_e for menor do que 10, e depende de características físicas da amostra como tipo, concentração e distribuição do analito.⁵⁸

A homogeneidade de uma amostra está intimamente associada ao tamanho das partículas constituintes e a uma cominuição adequada. Alguns fatores como tipo de amostra e de moinho, quantidade de amostra disponível, capacidade do equipamento e velocidade de moagem podem influenciar na eficiência de moagem e, conseqüentemente, na distribuição de tamanho de partículas.⁵⁵ A dimensão de partículas da amostra em SS pode também influenciar na cinética de atomização dos analitos e acentuar efeitos de matriz para medidas efetuadas em GF AAS. Partículas com tamanho inadequado podem ocasionar maior retenção do analito e dificuldades na remoção de concomitantes durante a etapa de pirólise, induzindo o aparecimento de

sinais transientes alargados e picos duplos durante a atomização.⁵⁶ As condições do atomizador, efeitos de transferência e difusão de calor, cinética de evaporação do analito e interações físico-químicas entre analito e matriz sólida são outros fatores que podem afetar a característica do sinal transiente.

O procedimento de calibração em SS-GF AAS não é uma tarefa das mais triviais. Idealmente, a utilização de padrões sólidos e com composição matricial análoga é a maneira mais indicada para calibração envolvendo análise de sólidos. Entretanto, a indisponibilidade de materiais de referência com tais características para diversos tipos de amostra e a escassez de CRMs com homogeneidade garantida para massas menores que 100 mg limitam a aplicação desse tipo de calibração a um grupo reduzido de amostras.⁵⁶ Outra alternativa é a adição de alíquotas crescentes de padrão a uma amostra sólida, como ocorre na calibração por adição de analito, porém, essa estratégia pode não reproduzir fidedignamente os mesmos efeitos a que os analitos presentes no material sólido e na solução são suscetíveis.⁵⁷

Em vista dessas limitações, o emprego da calibração com padrões aquosos é desejável visto que é simples e convenientemente aplicável a vários analitos e matrizes. Esse tipo de calibração pode ser realizado através do preparo de múltiplas soluções padrão com concentrações crescentes e utilização de um volume fixo dos mesmos para análise, ou ainda preparando-se uma única solução com concentração fixa, de modo a dispensar volumes crescentes dessa solução no atomizador. O emprego da calibração aquosa é bastante desafiador do ponto de vista analítico, pois deve-se comprovar que a influência da matriz seja semelhante à que ocorre no meio aquoso.⁵⁸ A compatibilidade entre os meios pode ser alcançada através do estabelecimento de programas de aquecimento adequados e da utilização de modificadores químicos para aumentar a estabilidade térmica dos analitos e favorecer a volatilização da matriz.⁵³

3.1.3 Aplicações da análise direta de sólidos para HR-CS GF AAS

A análise direta de sólidos vem sendo empregada em GF AAS desde a introdução dos atomizadores de grafite. No entanto, desde meados dos anos 2000, o acoplamento com a HR-CS GF AAS e as vantagens propiciadas pela técnica possibilitaram a extensão das aplicações com SS.⁵⁹

Determinações de Ag por SS-HR-CS GF AAS foram estudadas por DITTERT *et al.*⁶⁰, em amostras geológicas e CRMs e ARAUJO *et al.*⁶¹ em material particulado recolhido em filtro. Limites de detecção de 0,2 e 17 ng g⁻¹ foram obtidos, respectivamente. DITTERT *et al.*⁶⁰ destacaram o dificultoso procedimento de preparo para esses tipos de amostras e a presença de fundo causado por bandas moleculares. RESANO *et al.*⁶² investigaram a determinação de nano partículas de Au (LOD = 2 ng g⁻¹) em tecidos de ratos utilizando calibração aquosa. Os autores analisaram diferentes tipos de tecido e utilizaram LSBC para correção de fundo estruturado causada por estruturas finas de moléculas de PO.

GUNDUZ & AKMAN determinaram Pb por análise direta de amostras cosméticas⁶³ e grãos de arroz.⁶⁴ Em ambos os casos, os resultados foram comparados com os obtidos usando soluções resultantes de digestão assistida por radiação micro-ondas. Coeficientes de variação de até 20% e limites de detecção de 21,3 pg e 2,3 ng g⁻¹ foram obtidos, respectivamente. BORGES *et al.* propuseram a determinação de Pb em amostras de carvão⁶⁵ e em amostras biológicas⁶⁶ por SS-HR-CS GF AAS. No primeiro caso foi realizada a comparação entre calibração com soluções e com sólidos sem o uso de modificadores, enquanto que no último, o uso de plataformas modificadas permanentemente com Ru e uso de calibração aquosa foram empregados. Os autores obtiveram limites de detecção entre 8 e 10 ng g⁻¹ para a linha de ressonância do Pb em 217,001 nm.

SILVA *et al.*⁶⁷, ARAÚJO *et al.*⁶⁸ e RESANO *et al.*⁶⁹ avaliaram a HR-CS GF AAS com análise direta de sólidos para determinação de Hg. Devido à alta volatilidade do mercúrio, os dois primeiros utilizaram KMnO₄ como modificador para aumentar a estabilidade térmica do analito em soluções aquosas. Limites de detecção de 100 e 40 ng g⁻¹ com RSDs menores que 17% foram tipicamente obtidos. RESANO *et al.*⁶⁹

compararam o desempenho da análise direta de amostras sólidas de polímeros por LS GF AAS e HR-CS GF AAS utilizando também o modificador permanganato. Ambos os procedimentos apresentaram boa exatidão e precisão menor que 11% porém, o fundo obtido foi corrigido com maior eficiência para HR-CS GF AAS.

Com o advento da HR-CS AAS, a possibilidade de determinação de não metais e halogênios vem sendo extensamente explorada na literatura por diversos grupos de pesquisa. Destacando-se principalmente o enxofre, FERREIRA *et al.*⁷⁰, RESANO & FLÓREZ⁷¹ e MIOR *et al.*⁷² propuseram procedimentos para determinação desse elemento via molécula de CS, utilizando a amostragem sólida de CRMs de materiais biológicos⁷⁰, aço, CRMs, polímeros, derivados de petróleo utilizando modificadores com nanopartículas⁷¹ e carvão e CRMs⁷², com limites de detecção variando entre 3 e 30 ng.

Apesar do caráter monoelementar da técnica, trabalhos envolvendo a determinação de múltiplos elementos foram reportados por diversos pesquisadores. LEPRI *et al.*⁷³ avaliaram a composição elementar de carbono e carvão pela determinação de Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e V. O programa de aquecimento foi otimizado para cada elemento e para Cr, Mn e V houve a necessidade da utilização de CRMs para calibração com sólidos. LODs entre 0,006 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ni) e 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fe) foram obtidos. A determinação de elementos com diferentes volatilidades possibilita o uso de estratégias como a atomização sequencial para análises quase simultâneas. DUARTE *et al.*⁷⁴ determinaram sequencialmente Cd + Cr em amostras sólidas de biomassa, enquanto RESANO *et al.*⁷⁵ utilizaram-se desse mesmo artifício para determinação de Cd + Ni em repolho. Nesses casos, cuidados especiais na otimização do programa de aquecimento devem ser tomados para empregar uma pirólise adequada para eliminação de concomitantes e evitar a perda do analito menos volátil durante a primeira atomização, onde o analito mais volátil é determinado.

Em HR-CS AAS, determinações realmente simultâneas somente são possíveis para elementos que estejam no mesmo intervalo espectral (ca. 0,2 nm em torno do comprimento de onda principal), sendo, portanto, limitadas por esse aspecto. RESANO *et al.*⁷⁵ avaliaram a determinação simultânea de Co (352,685 nm), Fe (352,604 ; 352,617 nm) e Ni (362,454 nm) em tecidos de ostra e de Cd (228,802 nm) e Ni (228,998 nm) em CRM. O mesmo grupo propôs em outro trabalho a determinação de

Co (383,443 nm), Fe (383,245 nm), Ni (383,455 nm), Pb (383,306 nm) em amostras sólidas de nanotubos de carbono⁷⁶ e a determinação de Mo (319,397 nm) e Ti (319,200 nm) em papel de filtro embebido com urina.⁷⁷ DOS SANTOS *et al.*^{78,79} estudaram a determinação simultânea de Cd (228,802 nm) e Fe (228,726 nm) em amostras de alimentos em grãos e solos.

3.2 Objetivos específicos

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi o desenvolvimento de procedimentos usando espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em forno de grafite com análise direta de sólidos (HR-CS GF AAS) e em chama (HR-CS F AAS) para a determinação de Al, Cr, Ni e V

3.3 Parte Experimental

3.3.1 Instrumentação e condições operacionais

Um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução com atomização em chama e forno de grafite ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) foi utilizado durante os experimentos (Figura 3.2). Esse equipamento é composto por uma lâmpada de arco curto de Xe de 300 W (XBO 301, GLE, Alemanha) que opera no modo “hot spot” com faixa de emissão entre 190 e 900 nm, além de um monocromador duplo com rede echelle de alta resolução (ca. 2 pm pixel⁻¹) e um detector com arranjo de carga acoplada (CCD). Para o arranjo com forno de grafite e amostragem de sólidos, foi utilizado um amostrador automático SSA 600 (Analytik Jena) (Figura 3.3a) composto de um par de pinças movido por um braço robótico (Figura 3.3b) e uma micro balança Sartorius WZ2PW (Göttingen, Alemanha) com precisão de 1 µg (Figura 3.3c).



FIGURA 3.2 – Espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em chama ou forno de grafite com análise direta de sólidos Analytik Jena ContraAA 700 (Laboratório do Grupo de Espectroanalítica e Automação – GEA, Instituto de Química, UNESP, Araraquara).

Uma micro espátula de aço foi utilizada para introdução das amostras sólidas em plataformas de grafite do tipo barca revestidos com grafite pirolítico (Figura 3.3b). Tubos de grafite pirolítico para análise de sólidos sem orifício para injeção e aquecidos transversalmente (THGA) foram empregados neste trabalho. Soluções padrão e modificadores foram introduzidos manualmente (Figura 3.3d) com o auxílio de uma micropipeta Eppendorf (0,5 -10,0 μL). Argônio de alta pureza (99,996%, White Martins, São Paulo) foi utilizado como gás de purga e proteção. Para o arranjo instrumental com chama como atomizador, as medidas foram feitas utilizando um módulo de injeção SFS 6 (Analytik Jena) com taxa de aspiração de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ e chama acetileno-óxido nitroso (99,7% Air Liquide, Sertãozinho).

As amostras foram secas em estufa TE-394/2 (Tecnal, Piracicaba) com circulação forçada de ar, processadas em moinho de facas Willey 648 (Tecnal) com peneira de 20 mesh e então moídas em moinho criogênico Freezer/Mill 6800 (Spex, EUA). As amostras foram pesadas em balança analítica BL 210S (Sartorius) e mineralizadas utilizando um sistema de digestão com aquecimento assistido por radiação micro-ondas Multiwave (Anton Paar, Áustria) equipado com frascos de quartzo de 50 mL.

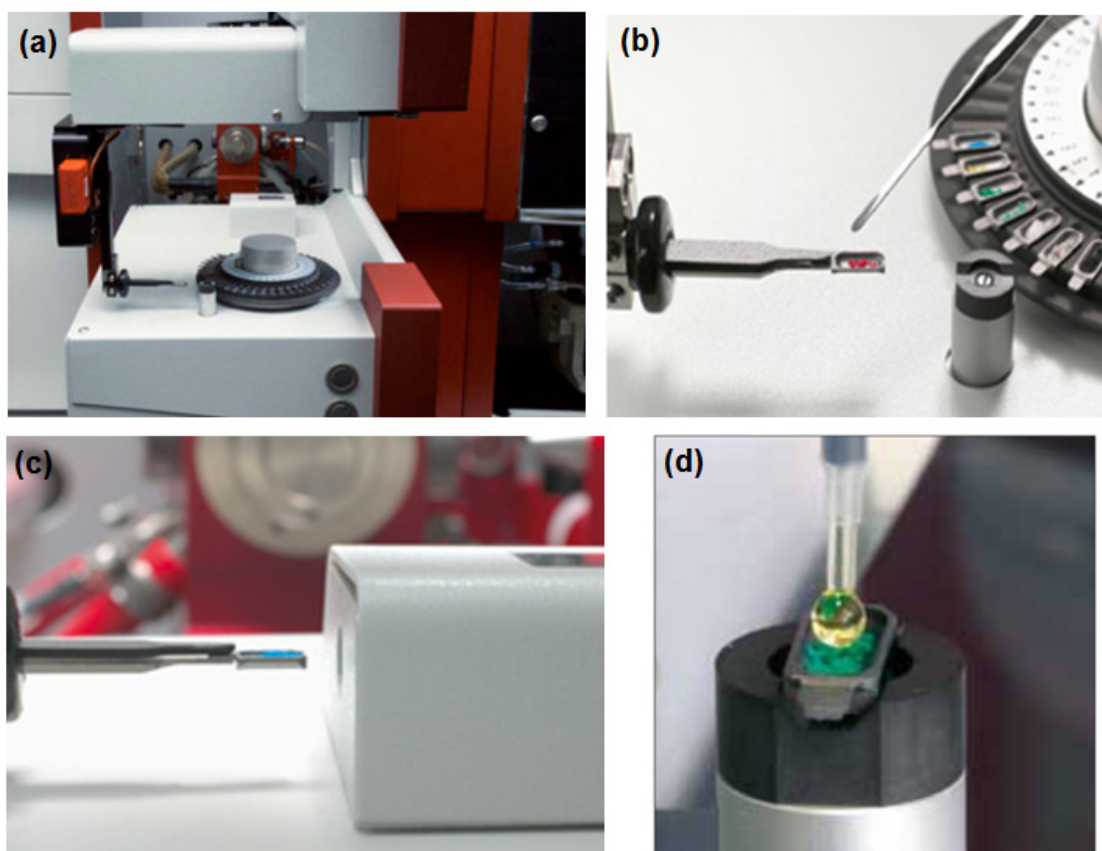


FIGURA 3.3 – Amostrador automático SSA 600 do espectrômetro ContrAA 700[®] com vista geral (a), detalhes das pinças, plataforma e micro-espátula para inserção de amostra (b), detalhes do braço mecânico e micro-balança (c) e detalhe da adição de modificador químico à plataforma (d). Fonte: Cedido gentilmente por Analytik Jena AG.

3.3.2 Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água destilada-deionizada (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5 combinado com desionizador Millipore Milli-Q Academic (Bedford, EUA) e ácido nítrico ultra-puro Suprapur (Merck, Alemanha).

Soluções-padrão monoelementares de Al, Cr, Ni e V foram preparadas a partir de diluições apropriadas de soluções estoque 1000 mg L⁻¹ Normex (Carlo Erba, Itália) em 0,1% (v v⁻¹) HNO₃. As soluções de modificadores químicos contendo 0,05% (m v⁻¹) Mg(NO₃)₂ para Cr e Ni foram preparadas diluindo-se uma solução estoque 10 g L⁻¹ Mg(NO₃)₂ (Merck) em meio 0,05% (m v⁻¹) Triton X-100 (Mallinckrodt Baker, EUA)

para melhorar a molhabilidade das amostras sólidas. Para V, a solução de modificador contendo 0,1 % (m v⁻¹) BaF₂ foi preparada pela dissolução de 50 mg de BaF₂ 99.9% (Aldrich, EUA) em 50 mL de água e posterior adição de 0,05% (m v⁻¹) Triton X-100 (Mallinckrodt Baker). Para digestão das amostras, ácido nítrico concentrado (Spectrum, EUA) e peróxido de hidrogênio 30% (m m⁻¹) (Merck) foram utilizados.

Os materiais de referência certificados de folhas de macieira (NIST SRM 1515), folhas de pessegueiro (NIST SRM 1547), acículas de pinheiro (NIST SRM 1575a), folhas de espinafre (NIST SRM 1570a) e folhas de tomateiro (NIST SRM 1573a) do NIST (National Institute of Standards and Technology, EUA) foram utilizados em otimizações, validação e como padrões sólidos para calibração. Amostras das plantas medicinais boldo (*Peumus boldus*), camomila (*Chamomilla recutita*), carqueja (*Bacharis crispa*), cavalinha (*Equisetum ssp*), chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), erva doce (*Foeniculum vulgare*), pata de vaca (*Bauhinia forficata*), graviola (*Annona muricata*) e guaco (*Mikania glomerata*) foram adquiridas em mercado local em Araraquara-SP. As amostras foram inicialmente secas a 60 °C por 48 h e moídas em moinho de facas. Uma porção das amostras (ca. 1 g) foi transferida para frascos de polycarbonato e submetidas à moagem criogênica seguindo o programa descrito na Tabela 3.1.⁵⁸ O tamanho de partículas esperado foi de aproximadamente 60 µm.⁵⁵

TABELA 3.1 – Programa de moagem criogênica empregado para as amostras de plantas medicinais. Adaptado de Rêgo.⁵⁸

Etapa	Tempo (min)
Pré-congelamento	4
Moagem 1	2
Congelamento entre moagens	4
Moagem 2	2

Para os procedimentos de digestão, pesou-se aproximadamente 0,5 g de amostra que foram transferidas para os frascos de quartzo, nos quais adicionaram-se 4,0 mL de HNO₃ concentrado e 2,0 mL de H₂O₂. As amostras foram mineralizadas empregando radiação micro-ondas segundo o programa descrito na Tabela 3.2. O

tempo total do programa foi de 40 min e os digeridos foram diluídos para um volume final de 25 mL.

TABELA 3.2 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão das amostras de plantas medicinais.

Etapa	Potência inicial (W)	Rampa (min)	Potência máxima (W)	Patamar (min)	Temperatura (°C)
1	100	5	600	5	130
2	600	5	1000	10	200
3	0	0	0	15	ambiente

3.3.3 Procedimentos analíticos

Todas as medidas para HR-CS GF AAS foram realizadas em triplicata e com integração equivalente a 3 pixels. Os comprimentos de onda avaliados foram 396,1520 nm (Al), 357,8687 nm (Cr), 232,0030 nm (Ni) e 318,5400 nm (V). O comportamento termoquímico dos analitos foi avaliado através de curvas de temperatura de pirólise e atomização empregando-se soluções-padrão e CRMs. A avaliação da temperatura de pirólise foi feita nos intervalos de 800-1800 °C, fixando-se a atomização em 2500 °C (Cr) e 2700 °C (Ni e V). Para a otimização da etapa de atomização, utilizaram-se as temperaturas de pirólise otimizadas previamente para cada condição e avaliou-se a atomização entre 2200-2700 °C. Para estudos em meio aquoso, foram utilizadas alíquotas de 10 µL de soluções-padrão monoelementares 50 µg L⁻¹ de Cr, Ni e V, de modo a serem analisadas massas dos analitos de 500 pg. Para estudos em meio sólido, massas entre 50-200 µg dos materiais certificados de folhas de macieira (SRM 1515) para Ni e folhas de tomateiro (SRM 1573a) para Cr e V, foram pesadas diretamente na plataforma de grafite. Devido à dificuldade em se pesar massas iguais, os sinais de absorvância obtidos foram normalizados para 1,0 mg de amostra. Alíquotas de 5 µL dos modificadores Mg(NO₃)₂ (Cr e Ni) e BaF₂ (V) foram utilizadas para avaliar o efeito dos mesmos sobre a estabilidade térmica dos analitos. O programa de aquecimento usado nas otimizações é descrito na Tabela 3.3. Além da

avaliação de diferentes meios e do uso de modificadores químicos, foi estudada a introdução de uma etapa de pirólise assistida por ar, inserindo-se as etapas Pirólise 1 e Resfriamento (Tabela 3.3) ao programa de aquecimento, além da etapa convencional de pirólise com atmosfera de argônio (Pirólise 2).

Para calibração em meio aquoso, alíquotas crescentes de 1 a 20 μL de soluções individuais $50 \mu\text{g L}^{-1}$ foram dispensadas nas plataformas de grafite. Para calibração em meio sólido, quantidades de massa crescentes dos CRMs de folhas de macieira (Ni) e folhas de tomateiro (Cr e V) foram pesadas de acordo com as concentrações dos analitos em cada um dos materiais. Curvas de calibração entre 50-750 pg (Cr), 50-1000 pg (Ni) e 100-2000 pg (V) foram obtidas para ambos os meios.

TABELA 3.3 – Programa de aquecimento utilizado para otimizações e determinações por SS-HR-CS GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s⁻¹)	Patamar (s)	Vazão de gás (L min⁻¹)
Secagem 1	110	10	20	2,0 (Ar)
Secagem 2	130	5	10	2,0 (Ar)
Pirólise 1*	600	50	30	2,0 (ar)
Resfriamento*	300	0	10	2,0 (Ar)
Pirólise 2	Tp**	100	30	2,0 (Ar)
Auto-Zero	Tp**	0	5	0
Atomização	Ta**	3000	5	0
Limpeza	2700	500	5	2,0 (Ar)

* Etapas empregadas somente nos estudos envolvendo a pirólise assistida por ar.

** Temperatura de pirólise (Tp) e de atomização (Ta) variáveis de acordo com o analito.

Para determinação de Al foi empregada a HR-CS AAS em chama acetileno-óxido nitroso. As otimizações das condições de chama e altura de observação foram realizadas aspirando-se uma solução contendo 10 mg L^{-1} Al em meio 0,1% (m/v) KCl como supressor de ionização. A vazão de acetileno foi variada entre 170 - 260 L h^{-1} enquanto a altura de observação foi mantida em 5 mm. Com a condição ótima de chama, procedeu-se a avaliação da altura de observação no intervalo de 4 - 10 mm. Curvas de calibração para Al entre 0,5 - 20,0 mg L^{-1} foram obtidas (n=3) utilizando 3

pixels. Para resultados comparativos por ICP OES foi utilizando o espectrômetro Thermo iCAP 6300 operado sob condições descritas na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Condições operacionais do ICP OES para determinação de Al.

Parâmetro	Condição Operacional
Potência de RF (W)	1250 W
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6
Modo de visão	Axial
Número de replicatas	3
Tempo de integração (s)	15
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Comprimento de onda (nm)	396,152

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Avaliação do comportamento termoquímico dos elementos

O estabelecimento de condições ótimas de pirólise e atomização é de fundamental importância em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para análise direta de sólidos, devido à forte influência exercida pela matriz sobre o sinal analítico. A possibilidade de emprego da calibração com soluções aquosas é um dos recursos mais interessantes e convenientes da SS-GF AAS, porém, alcançado apenas quando a matriz é apropriadamente removida durante a etapa de pirólise e o comportamento do analito durante a vaporização/atomização é análogo entre os meios.⁵⁷

A otimização da temperatura e do tempo de pirólise são necessários para que os efeitos de matriz, sinais de fundo e perdas de analito sejam minimizados. Os modificadores químicos para estabilização dos analitos frente a elevadas temperaturas de pirólise, visando à adequada remoção dos concomitantes, são amplamente

empregados principalmente para elementos mais voláteis (e.g. As, Cd e Se). Além do ganho em estabilidade, os modificadores podem promover a difusão dos analitos para a superfície ou ainda favorecer a volatilização da matriz.⁵³ Devido a esses fatores, a avaliação do uso de modificadores para elementos refratários como Cr, Ni e V é justificável para SS-GF AAS quando é desejada a remoção adequada da matriz a fim de se utilizar a calibração com soluções aquosas.

Mesmo com o uso ou não de modificadores, testes preliminares mostraram que os sinais e picos de absorvância para amostras sólidas eram geralmente inferiores e mais alargados do que os obtidos quando se atomizava a mesma quantidade do analito a partir de padrões aquosos. Além disso, foi verificada a presença de um resíduo carbonáceo persistente, que caso não removido antes do início de um novo ciclo, causava aumento do sinal de fundo, efeitos de memória e espalhamento de radiação. A presença de matriz residual ocorria mesmo quando utilizados maiores tempos de pirólise ou temperaturas mais elevadas durante as etapas de atomização e limpeza. Apesar de a remoção poder ser efetuada mecanicamente, deve-se considerar que esse procedimento pode comprometer a frequência analítica e a conveniência do uso do amostrador automático. Considerando-se esse aspecto, avaliou-se o uso de oxigênio como modificador⁵³ implementando-se uma etapa adicional de pirólise assistida por ar a 600 °C por 30 s. A Figura 3.4 mostra o efeito da pirólise assistida por ar sobre as plataformas de grafite. A presença do oxigênio foi eficiente na remoção do resíduo carbonáceo, pois facilita a decomposição da matriz orgânica através de processos de combustão que geram $\text{CO}_{(g)}$, $\text{CO}_{2(g)}$ e $\text{H}_2\text{O}_{(g)}$. Apesar da utilização da vazão de $2,0 \text{ L min}^{-1}$ de ar durante a etapa de pirólise, vazões inferiores a esta podem ser empregadas, porém, o efeito dessa variação não foi objeto de estudo nesse trabalho. Além disso, essa estratégia pode levar a um comportamento semelhante do analito em diferentes meios. É importante mencionar que o uso da pirólise com ar pode promover uma maior perda do revestimento pirolítico dos tubos e plataformas de grafite, diminuindo assim a vida útil desses componentes em cerca de 30%.



FIGURA 3.4 – Plataformas de grafite para análise de sólidos após ciclos de aquecimento utilizando pirólise convencional e assistida por ar.

Neste trabalho, avaliou-se a otimização do programa de aquecimento para determinação de Cr, Ni e V visando o emprego da calibração com soluções aquosas. Foram avaliados o uso dos modificadores 0,05% (m v^{-1}) $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ para Cr e Ni e 0,1% (m v^{-1}) BaF_2 para V e a influência da etapa de pirólise assistida por ar no comportamentos dos analitos presentes em meio aquoso e sólido. A massa característica (m_0), calculada de acordo com as Equações 3.1 (para soluções aquosas) e 3.2 (para sólidos), foi utilizada como parâmetro para avaliação da influência da matriz.⁸⁰

$$m_0 = \frac{v_{\text{amostra}} (\mu\text{L}) \times C_{\text{analito}} (\mu\text{g L}^{-1}) \times 0,0044}{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$m_0 = \frac{m_{\text{amostra}} (\mu\text{g}) \times C_{\text{analito}} (\mu\text{g g}^{-1}) \times 0,0044}{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

A massa característica é definida como a massa do analito que fornece uma absorbância de 0,0044 ou 1% de absorbância.⁵³ Como a massa característica é proporcional à massa de analito atomizada e ao sinal analítico líquido, valores semelhantes de m_0 indicam eficiências de atomização equivalentes e, conseqüentemente, maior probabilidade de aplicação da calibração com soluções aquosas.⁵⁸

A Figura 3.5 mostra curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cr em meios aquoso e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) na ausência e presença do modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e com emprego de pirólise convencional e assistida

por ar. Utilizando-se a pirólise com ar, verifica-se a estabilidade do Cr para temperaturas de até 1600 °C em meio aquoso e de 1400 °C para o CRM, indicando a possível formação de diferentes precursores para atomização em diferentes meios. De acordo com mecanismos de atomização por óxidos e carbetos propostos na literatura⁴², a presença de O₂ na pirólise pode favorecer a formação de compostos com diferentes volatilidades (Cr₂O₃ e Cr₃C₂) de maneira distinta para os diferentes meios. Em ambos casos, a presença de Mg(NO₃)₂ tem influência nula no comportamento térmico do analito. Empregando-se a pirólise convencional, o efeito do modificador é mais perceptível em soluções aquosas (Figura 3.5a) onde a temperatura de pirólise pode alcançar até 1800 °C sem perdas de analito, ao passo que em sua ausência a temperatura máxima é de 1500 °C. Em meio sólido (Figura 3.5b), o Cr é estável termicamente até 1500 °C mesmo na ausência de modificador. Esse fato pode ser atribuído à presença de concentrações elevadas de Mg na matriz de plantas, que pode promover a formação de compostos intermetálicos Cr:Mg e diminuir a volatilidade do analito.⁴² Independentemente da matriz ou do uso de modificador, condições ótimas de atomização de 2400 e 2500 °C foram obtidas para pirólise com ar e convencional, respectivamente.

A Figura 3.6 mostra curvas de temperatura de pirólise e atomização para Ni em meios aquoso e sólido (folhas de macieira – SRM 1515) na ausência e presença do modificador Mg(NO₃)₂, utilizando-se a pirólise convencional e etapa assistida por ar. Empregando-se a pirólise convencional, temperaturas de pirólise de 1300 °C (solução) e 1400 °C (sólido) foram obtidas sem o uso de modificador em ambos os meios. Assim como para Cr, a concentração de Mg na amostra sólida (Figura 3.6b) provoca maior estabilização térmica do analito, sendo que as mesmas temperaturas de pirólise fornecidas pelo uso de Mg(NO₃)₂ em solução (Figura 3.6a) podem ser alcançadas.

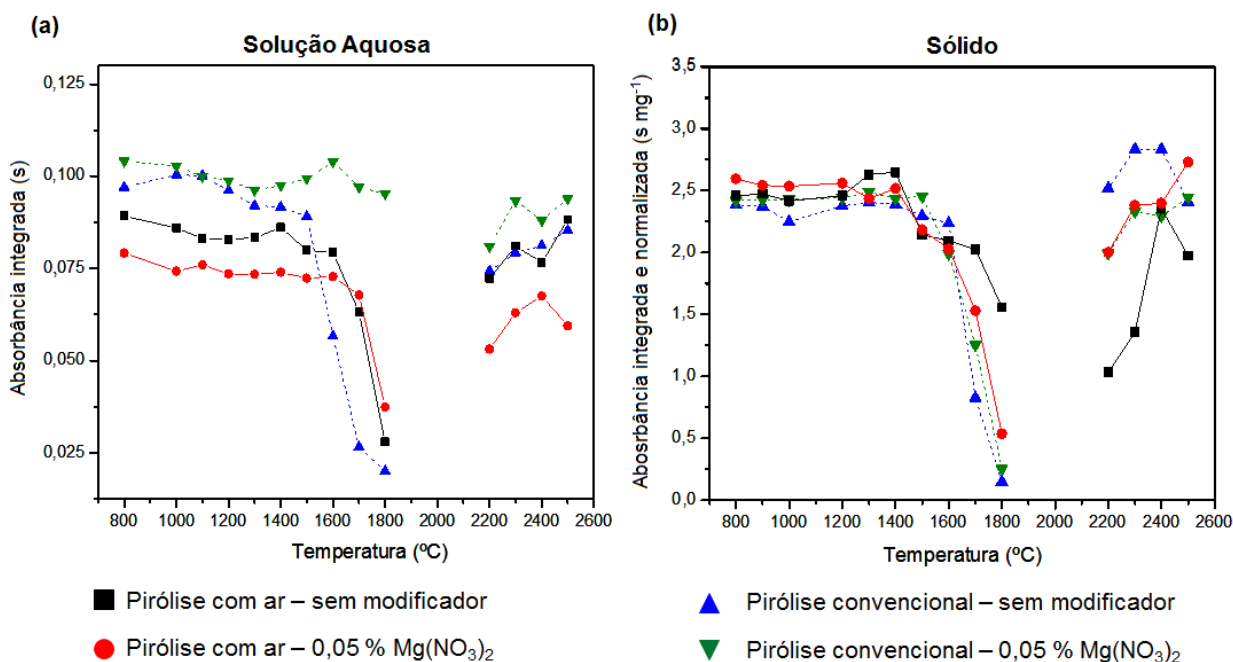
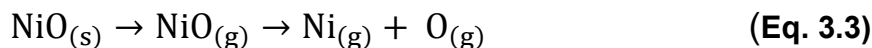


FIGURA 3.5 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cr em meio aquoso (a) e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) (b) na ausência e presença de modificador Mg(NO₃)₂ e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar.

Apesar da depreciação de sinal observada em meio aquoso, a pirólise com ar propiciou estabilidade térmica para Ni até 1500 °C em ambos os meios. A formação de óxido de níquel seguida por sua dissociação em fase gasosa⁴² é apontada como um possível mecanismo de atomização para Ni:



De acordo com esse mecanismo, a facilitação na formação do precursor NiO na etapa de pirólise assistida por ar confere maior estabilidade ao analito por requerer maior energia para sua vaporização e dissociação. Para todas as condições, temperaturas de atomização de 2700 °C geraram os melhores resultados.

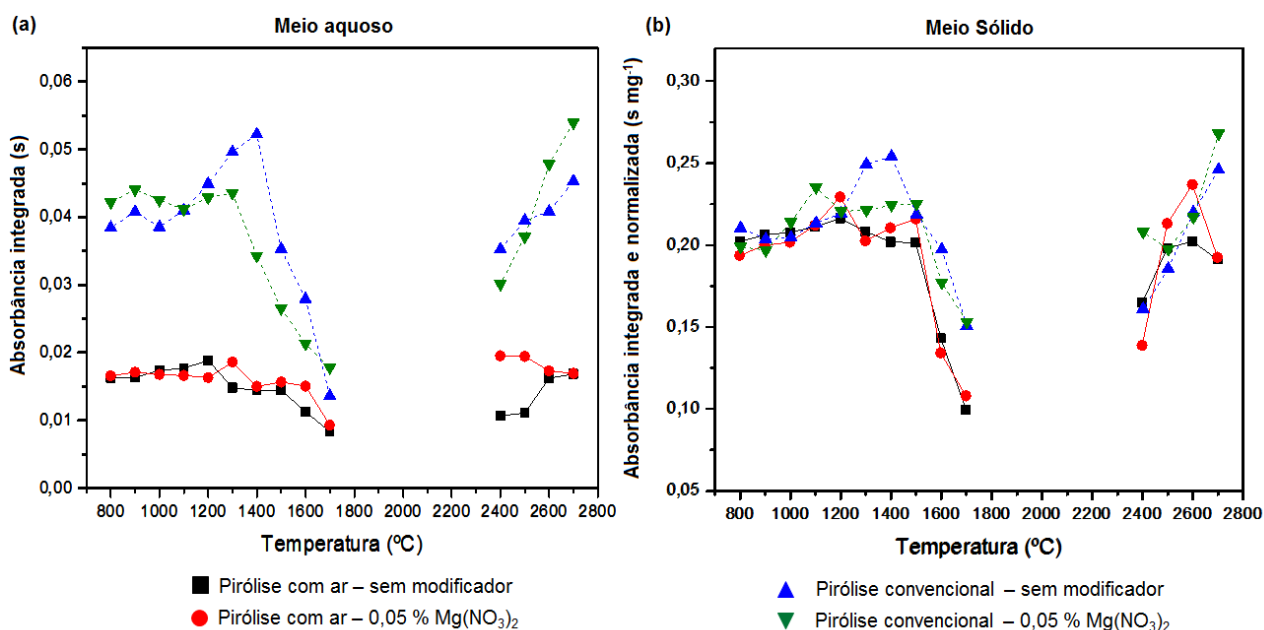


FIGURA 3.6 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Ni em meio aquoso (a) e sólido (folhas de macieira – SRM 1515) (b) na ausência e presença de modificador Mg(NO₃)₂ e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar.

A Figura 3.7 mostra curvas de temperatura de pirólise e atomização utilizando-se a pirólise convencional e etapa assistida por ar para V em meios aquoso e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) na ausência e presença do modificador BaF₂. Devido à característica formadora de carbetos refratários do V, o uso de modificadores químicos para estabilização do analito é geralmente dispensável. AMBROZINI *et al.*⁸¹ reportaram o uso de BaF₂, afirmando que íons fluoreto podem promover a formação de compostos voláteis de V, causando redução da formação de carbetos e aumento de sensibilidade. Verifica-se que tanto para soluções aquosas quanto para sólidos, as temperaturas ótimas de pirólise e atomização foram de 1400 e 2700 °C, respectivamente. O emprego do BaF₂ não apresentou a ação esperada visto que a estabilidade térmica do V se manteve constante e os sinais de absorbância foram menores do que os verificados em sua ausência. Para temperaturas maiores que 1400 °C, a queda do sinal analítico é mais acentuada nas curvas para soluções aquosas (Figura 3.7a) do que para sólidos (Figura 3.7b), indicando novamente uma possível ação estabilizante do Mg presente no CRM.

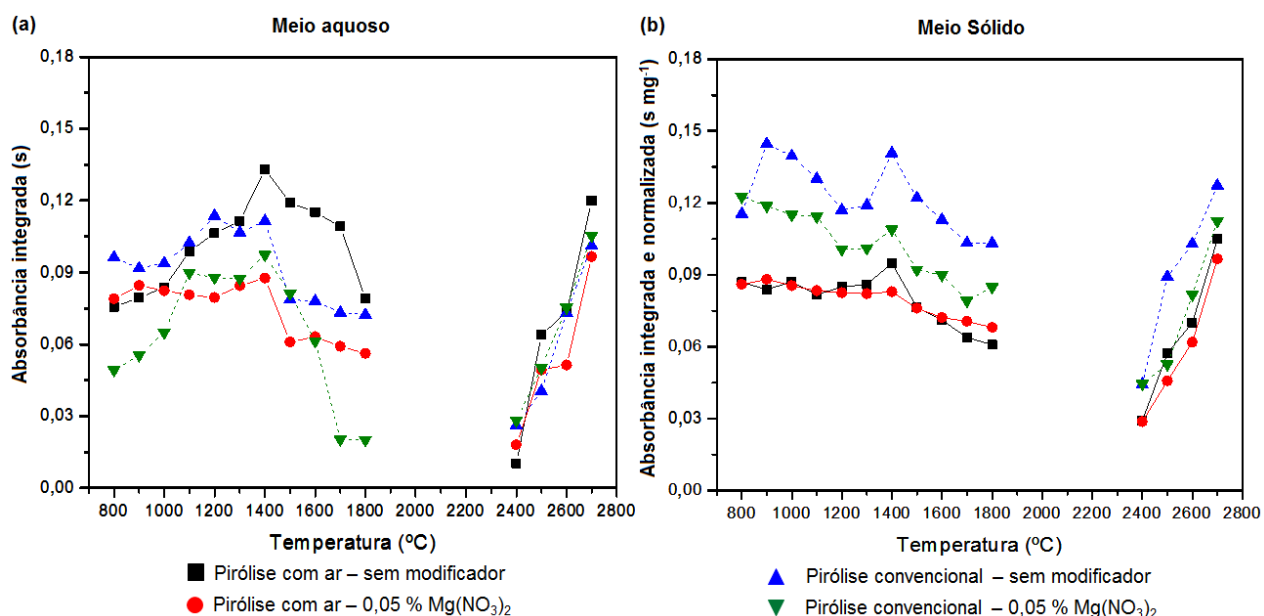


FIGURA 3.7 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para V em meio aquoso (a) e sólido (folhas de tomateiro – SRM 1573a) (b) na ausência e presença de modificador BaF₂ e com emprego de pirólise convencional e assistida por ar.

3.4.2 Calibração e parâmetros de desempenho analítico

Para avaliação das condições mais propícias ao emprego da calibração aquosa, foram considerados a intensidade de sinal, estabilidade térmica dos analitos, perfil do sinal transiente e sinal de fundo para cada temperatura de atomização individual. Como discutido anteriormente, o uso da massa característica (m_0) como parâmetro é bastante conveniente para comparação de sensibilidades entre pirólise convencional e assistida por ar na presença e ausência de modificadores. Os valores calculados de m_0 (Tabela 3.5) para meio aquoso e sólido mais similares foram obtidos para Cr com atomização em 2400 °C (pirólise convencional e sem modificador) e 2400 °C (pirólise com ar e modificador Mg(NO₃)₂), para Ni com atomização em 2700 °C (pirólise convencional com modificador Mg(NO₃)₂ e pirólise com ar sem modificador) e para V com atomização também em 2700 °C (pirólise convencional com modificador BaF₂ e pirólise com ar sem modificador).

TABELA 3.5 – Massas características (m_0) calculadas para meio aquoso e sólido em diferentes temperaturas de atomização (T_a), tipos de pirólise e modificadores.

Analito	T_a (°C)	Tipo de pirólise	m_0 (pg) sem modificador		m_0 (pg) com modificador	
			Meio aquoso	Meio sólido	Meio aquoso	Meio sólido
Cr	2300	Convencional	2,8	3,1	2,4	3,8
		Assistida por ar	2,7	6,4	3,5	3,8
	2400	Convencional	2,7	3,3	2,5	3,8
		Assistida por ar	2,9	3,7	3,3	3,6
	2500	Convencional	2,6	3,7	2,3	3,6
		Assistida por ar	2,5	4,4	3,7	3,2
Ni	2500	Convencional	21,5	4,0	24,6	4,4
		Assistida por ar	7,9	6,2	5,1	6,1
	2600	Convencional	18,7	4,1	18,4	3,5
		Assistida por ar	5,4	4,1	5,5	3,9
	2700	Convencional	19,4	3,6	16,3	3,3
		Assistida por ar	4,7	4,2	4,8	3,7
V	2500	Convencional	54,6	13,1	44,1	34,3
		Assistida por ar	34,3	22,1	44,4	25,1
	2600	Convencional	30,2	16,9	29,3	19,0
		Assistida por ar	29,9	22,2	42,7	28,9
	2700	Convencional	21,8	8,8	20,9	14,3
		Assistida por ar	18,3	18,1	22,7	18,2

É importante salientar que apesar da pequena influência dos modificadores na estabilidade térmica dos analitos, seu uso pode alterar significativamente a massa característica avaliada e tornar possível o uso da calibração com soluções aquosas. Para as condições com m_0 mais próximas, foi feita a avaliação da exatidão analisando-se amostras sólidas de CRMs utilizando calibração com padrões aquosos (Tabela 3.6). De modo geral, boas recuperações para Cr, Ni e V foram observadas quando empregados os métodos com etapa adicional de pirólise assistida por ar. Nesses casos, os valores determinados pelo procedimento proposto foram concordantes com os valores certificados a um nível de 95% de confiança (teste t de Student).

TABELA 3.6 – Determinação de Cr, Ni e V em CRMs utilizando calibração aquosa e pirólises convencional e assistida por ar por SS-HR-CS GF AAS (média ± desvio padrão, n=3).

CRM	Analito	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
			Pirólise convencional	Pirólise assistida por ar
Folhas de tomateiro (SRM 1573a)	Cr	0,3 *	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,03
Folhas de macieira (SRM 1515)	Cr	1,99 ± 0,06	1,7 ± 0,3	2,00 ± 0,07
Folhas de pessegueiro (SRM 1547)	Cr	1 *	0,85 ± 0,09	1,6 ± 0,1
Acículas de pinheiro (SRM 1575a)	Cr	0,3 - 0,5 *	0,32 ± 0,08	0,4 ± 0,1
Folhas de tomateiro (SRM 1573a)	Ni	1,59 ± 0,07	1,16 ± 0,09	1,49 ± 0,07
Folhas de macieira (SRM 1515)	Ni	0,91 ± 0,12	0,81 ± 0,02	0,96 ± 0,04
Folhas de pessegueiro (SRM 1547)	Ni	0,69 ± 0,09	0,67 ± 0,03	0,66 ± 0,03
Acículas de pinheiro (SRM 1575a)	Ni	1,47 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Folhas de espinafre (SRM 1570a)	Ni	2,14 ± 0,1	1,86 ± 0,03	2,1 ± 0,1
Folhas de tomateiro (SRM 1573a)	V	0,835 ± 0,01	1,1 ± 0,1	0,85 ± 0,07
Folhas de macieira (SRM 1515)	V	0,26 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,23 ± 0,02
Folhas de pessegueiro (SRM 1547)	V	0,37 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Folhas de espinafre (SRM 1570a)	V	0,57 ± 0,03	0,67 ± 0,01	0,50 ± 0,04

* Valores de referência não certificados

A eficácia do uso da massa característica para a avaliação de condições para calibração com soluções aquosas foi confirmada, visto que melhores valores de exatidão foram obtidos nos casos de m_0 mais próximas entre diferentes meios. Em virtude da adequada exatidão, menor sinal de fundo e maior eficiência na degradação da matriz, a pirólise com ar foi adotada para avaliação da equivalência entre a calibração com soluções e sólidos (Figura 3.8) e obtenção dos principais parâmetros de desempenho (Tabela 3.7). Nesses casos, o modificador $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi utilizado apenas

para Cr. Através das sensibilidades mostradas na Tabela 3.7 e das curvas de calibração da Figura 3.8, verifica-se boa correlação entre as calibrações obtidas para soluções aquosas e sólidos. Para Cr (Figura 3.8a) e Ni (Figura 3.8b), verifica-se que para massas de analito maiores que 500 pg dos analitos, há a ocorrência de uma maior distinção de comportamento entre as curvas em diferentes meios. Esse fenômeno pode ser atribuído a efeitos de matriz e/ou maior formação de carbetos refratários visto que para obtenção das curvas para sólidos utiliza-se a análise de massas crescentes dos CRMs.

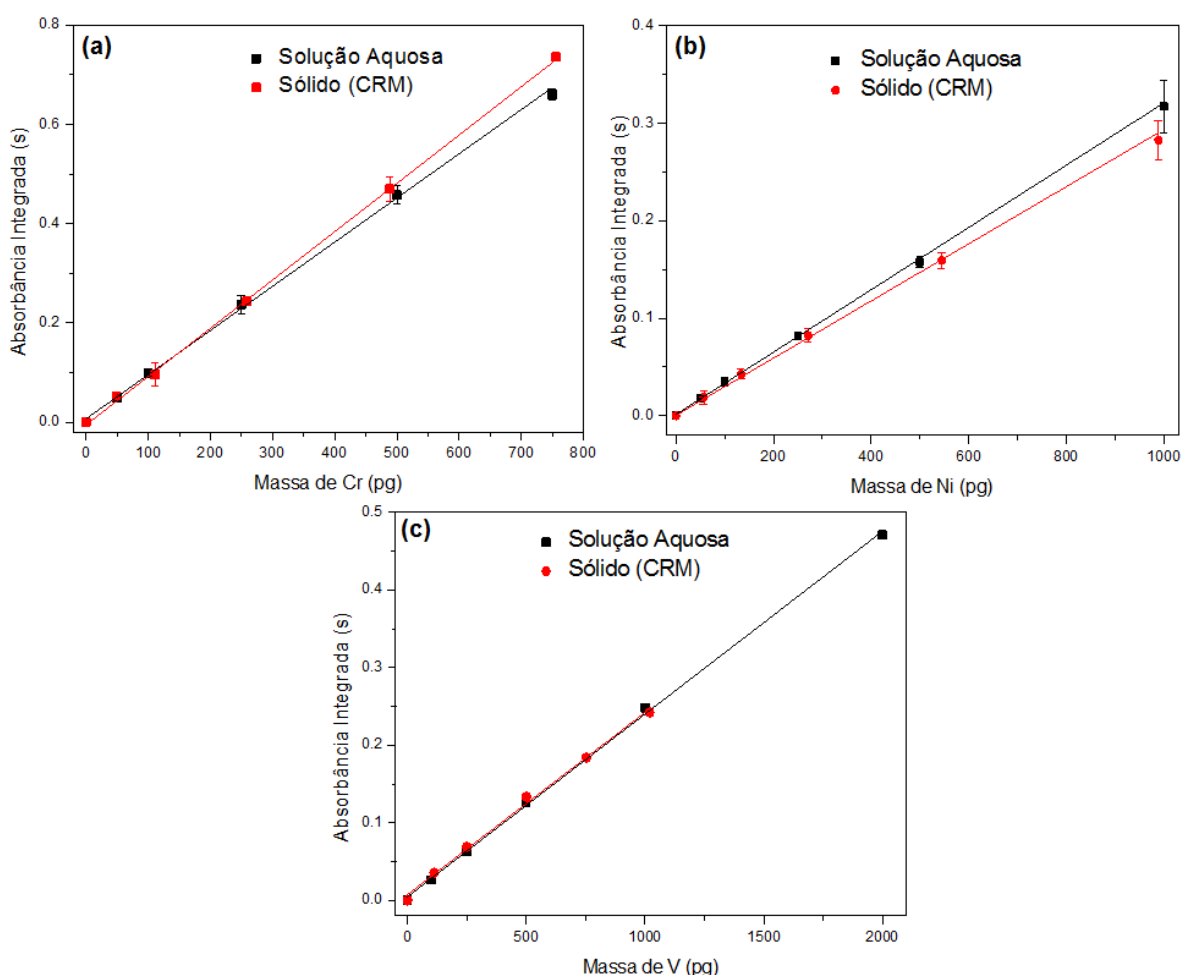


FIGURA 3.8 – Curvas de calibração para Cr utilizando $Mg(NO_3)_2$ (a), Ni (b) e V (c) em meio aquoso e sólido com emprego de pirólise assistida por ar por SS-HR-CS GF AAS.

Limites de detecção e desvios padrão relativos de $0,003 \mu\text{g g}^{-1}$ Cr (RSD = 6,2 %), $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni (RSD = 6,4 %) e $0,007 \mu\text{g g}^{-1}$ V (RSD = 4,0 %) foram obtidos para calibração com soluções aquosas (Tabela 3.7). Trabalhos na literatura envolvendo SS-HR-CS GF AAS reportaram limites de detecção para Cr de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ em biomassa⁷⁴ e $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ em carvão⁷³; para Ni de 11 pg em CRMs de plantas e tecido de ostra⁷⁵, 65 ng em nanotubos de carbono⁷⁶ e $0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ em carvão⁷³; e para V de $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ em carvão.⁷³

TABELA 3.7 – Parâmetros de desempenho analítico para determinação de Cr, Ni e V por SS-HR-CS GF AAS utilizando calibração com soluções aquosas e sólidos e empregando pirólise assistida por ar.

Analito	Modificador	Padrão	Sensibilidade (s ng ⁻¹)	R	m ₀ (pg)	LOD (μg g ⁻¹)	%RSD
Cr	Mg(NO ₃) ₂	Solução	0,88	0,9989	5	0,003	5,5
		Sólido	0,92	0,9985	5	0,003	6,2
Ni	--	Solução	0,32	0,9994	14	0,02	6,4
		Sólido	0,30	0,9986	15	0,02	8,3
V	--	Solução	0,24	0,9985	19	0,007	4,0
		Sólido	0,24	0,9965	18	0,008	4,3

3.4.3 Análise das amostras de plantas medicinais

Os métodos otimizados (Tabela 3.8) para Cr, Ni e V foram aplicados para a análise de 10 amostras de plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS (Tabela 3.9). Concentrações de Cr entre $1,3 - 17,7 \mu\text{g g}^{-1}$, entre $0,9$ e $9,9 \mu\text{g g}^{-1}$ Ni e entre $0,07$ e $3,11 \mu\text{g g}^{-1}$ V foram determinados nas amostras.

TABELA 3.8 – Condições otimizadas para determinação de Cr, Ni e V em plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS.

Analito	Modificador	Tipo de calibração	Tipo de pirólise	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)
Cr	Mg(NO ₃) ₂	Padrões aquosos	Assistida por ar	1500	2400
Ni	ausente	Padrões aquosos	Assistida por ar	1400	2700
V	ausente	Padrões aquosos	Assistida por ar	1400	2700

TABELA 3.9 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Cr, Ni e V em plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS.

Nome popular	Nome científico	Cr (µg g ⁻¹)	Ni (µg g ⁻¹)	V (µg g ⁻¹)
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	3,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3	0,90 ± 0,03
Camomila	<i>Chamomilla recutita</i>	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,09 ± 0,01
Carqueja	<i>Bacharis crispa</i>	1,91 ± 0,08	0,9 ± 0,1	0,46 ± 0,04
Cavalinha	<i>Equisetum ssp</i>	12,4 ± 0,8	3,9 ± 0,6	0,14 ± 0,02
Chapéu de couro	<i>Echinodorus grandiflorus</i>	4,9 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,1 ± 0,1
Erva Cidreira	<i>Melissa officinalis</i>	14 ± 2	9,9 ± 0,7	0,22 ± 0,03
Erva Doce	<i>Foeniculum vulgare</i>	17,7 ± 0,5	6,8 ± 0,9	0,52 ± 0,06
Pata de Vaca	<i>Bauhinia forficata</i>	10,2 ± 0,9	5,9 ± 0,6	0,39 ± 0,03
Graviola	<i>Annona muricata</i>	3,2 ± 0,2	4,1 ± 0,3	0,07 ± 0,01
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	2,6 ± 0,3	2,0 ± 0,2	0,15 ± 0,02

Segundo as normas da ANVISA¹² e os valores limites dispostos na Farmacopeia Brasileira¹³, as concentrações máximas permitidas são de $25 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, Ni e V. Sendo assim, para as 10 amostras analisadas os teores dos metais se situaram dentro dos limites legais. Considerando-se os limites de detecção e a faixa de trabalho, pode-se afirmar que a técnica de SS-HR-CS GF AAS é adequada para o monitoramento de Cr, Ni e V em amostras de plantas medicinais.

3.4.4 Determinação de Al por HR-CS F AAS

A determinação de alumínio em plantas por SS-HR-CS GF AAS é um grande desafio do ponto de vista analítico. A concentração de Al comumente encontrada em plantas é relativamente elevada para aplicação de um método altamente sensível como GF AAS. Tomando como exemplo o material de referência certificado de folhas de tomateiro (SRM 1573a) que contém $598 \mu\text{g g}^{-1}$ Al, se utilizarmos 0,1 mg desse material para análise de sólidos, a massa de analito inserida no atomizador é de aproximadamente 59.800 pg Al. Estudos preliminares mostraram que o limite superior da curva de calibração para Al em 309,2713 nm é de 1500 pg, ou seja, quase 40 vezes menor que o contido em 0,1 mg do CRM. Considerando a heterogeneidade e baixa representatividade para análise de sólidos com massas reduzidas de amostra, algumas alternativas foram avaliadas para determinação de Al por SS-HR-CS GF AAS. Para diminuição de sensibilidade, algumas estratégias envolvendo medidas em linhas secundárias, atomização em temperaturas mais baixas, leitura apenas no pixel central (CP) e o emprego de fluxo contínuo de Ar durante a atomização poderiam aumentar o intervalo linear de calibração e possibilitar a determinação. Em contrapartida, o Al apresenta severos efeitos de memória em GF AAS, sendo que a inserção de altas concentrações desse elemento no atomizador podem inviabilizar a exatidão e precisão.

Em vista dessas limitações e considerando-se a versatilidade do espectrômetro ContrAA 700, avaliou-se a determinação de Al em amostras de plantas medicinais por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em chama (HR-CS FAAS) que apresenta sensibilidade menor que HR-CS GF AAS,

sendo portanto mais adequada às concentrações do analito presentes nas amostras. Contudo, a utilização do espectrômetro no modo chama inviabiliza a análise direta de sólidos. Dessa forma, as amostras foram digeridas em frasco fechado com aquecimento assistido por radiação micro-ondas, segundo o programa descrito na Tabela 3.2. e os procedimentos descritos na seção 3.3.1

A otimização das condições de chama e da altura de observação é de fundamental importância para obtenção de sensibilidade, exatidão e precisão adequadas para as determinações. Foi utilizada uma solução 10 mg L^{-1} Al em meio $0,1\%$ (m v^{-1}) KCl, utilizado como supressor de ionização devido às altas temperaturas alcançadas pela chama acetileno-óxido nitroso. Para otimização das condições da chama, variou-se a vazão de acetileno de 170 L h^{-1} (razão de combustível/oxidante = 0,36) a 260 L h^{-1} (razão de combustível/oxidante = 0,57), mantendo-se a altura de observação em 5 mm. Verifica-se que as chamas redutoras, com composições ricas em combustível, apresentaram as condições mais propícias de ambiente químico e temperatura para a atomização do Al (Figura 3.9a). A vazão de acetileno ótima empregada foi de 240 L h^{-1} . Para otimização da altura de observação, utilizou-se a condição de chama otimizada anteriormente (240 L h^{-1} de acetileno), e variou-se a altura de observação de 4 a 10 mm. Os resultados apresentados na Figura 3.9b, evidenciam que a altura de observação ótima foi 6 mm.

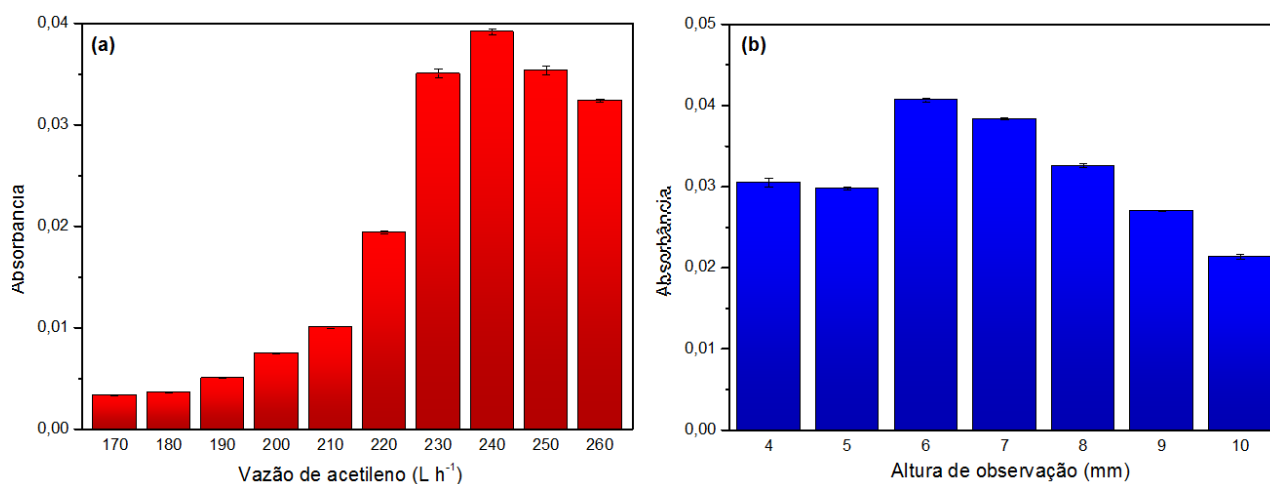


FIGURA 3.9 – Otimização da composição de chama (a) e altura de observação (b) para Al por HR-CS F AAS.

Curvas analíticas para Al em 396,1520 nm foram obtidas para o intervalo de 0,5 a 20 mg L⁻¹ Al com integração equivalente a 3 pixels. Os principais parâmetros de desempenho estão mostrados na Tabela 3.10. O procedimento apresentou limite de detecção de 10 µg L⁻¹ e desvios padrão relativos da ordem de 1,1 %. As amostras digeridas de materiais de referência certificados (CRMs) e plantas medicinais foram analisadas pelo procedimento proposto e por ICP OES como método comparativo (Tabela 3.11). As condições operacionais para ICP OES são descritas na Tabela 3.4. Para os CRMs e amostras de plantas, as concentrações determinadas não apresentam diferenças significativas com os valores certificados a um nível de confiança de 95% (teste t). As amostras de plantas medicinais apresentaram concentrações variáveis entre 69 – 401 µg/g Al e os resultados pelo procedimento proposto foi equivalentes aos obtidos por ICP OES a um nível de 95% de confiança (teste t).

TABELA 3.10 – Parâmetros de desempenho para Al por HR-CS F AAS: intervalo linear, sensibilidade, coeficiente de correlação linear (R), concentração característica (C₀), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD).

Parâmetro	Valor
λ (nm)	396,1520
Intervalo linear (mg L ⁻¹)	0,5 – 20,0
Sensibilidade (L mg ⁻¹)	0,0076
R	0,9998
C ₀ (mg L ⁻¹)	0,6
LOD (µg L ⁻¹)	10
%RSD	1,1

TABELA 3.11 – Resultados (média \pm desvio padrão, n=3) para determinação de Al ($\mu\text{g g}^{-1}$) em materiais de referência certificados e plantas medicinais pelo método proposto (HR-CS F AAS) e pelo método comparativo (ICP OES).

Amostra	HR-CS F AAS ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ICP OES ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Folhas de tomateiro (SRM 1573a)	597 \pm 9	594 \pm 7
Folhas de espinafre (SRM 1570a)	317 \pm 7	311 \pm 5
Folhas de macieira (SRM 1515)	293 \pm 10	288 \pm 4
Folhas de pessegueiro (SRM 1547)	247 \pm 11	245 \pm 2
Erva Cidreira	178 \pm 4	174 \pm 2
Boldo	145 \pm 3	163 \pm 5
Cavalinha	231 \pm 4	234 \pm 3
Graviola	69 \pm 5	71 \pm 2
Carqueja	383 \pm 2	382 \pm 3
Pata de Vaca	156 \pm 4	162 \pm 5
Guaco	131 \pm 5	125 \pm 3
Erva Doce	401 \pm 24	392 \pm 4
Chapeu de Couro	362 \pm 4	367 \pm 3
Camomila	114 \pm 4	119 \pm 5

Valores certificados para Al: Folhas de tomateiro (SRM 1573a) - 598 \pm 12 $\mu\text{g g}^{-1}$, Folhas de espinafre (SRM 1570a) - 310 \pm 11 $\mu\text{g g}^{-1}$, Folhas de macieiras (SRM 1515) - 286 \pm 9 $\mu\text{g g}^{-1}$, Folhas de pessegueiro (SRM 1547) - 249 \pm 8 $\mu\text{g g}^{-1}$.

A Tabela 3.12 mostra a comparação entre as concentrações dos analitos determinadas neste trabalho e outros descritos na literatura. Os limites máximos permitidos para diferentes legislações também são apresentados. Os valores de Al, Cr, Ni e V determinados por SS-HR-CS AAS foram equivalentes aos encontrados na literatura e menores do que os valores máximos permitidos de Cr, Ni e V para exposição oral descritos nas farmacopeias brasileira¹³ e americana⁸² e pela Agência Europeia de Medicamentos.⁸³ Embora hajam contradições, chama a atenção o fato de não haver valores limites para Al dispostos em legislação, visto que sua essencialidade é discutível e este elemento é frequentemente correlacionado com o mal de Alzheimer.

TABELA 3.12 – Concentrações de Al, Cr, Ni e V em plantas medicinais obtidas neste trabalho em comparação com trabalhos da literatura e legislações.

Referência	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	V ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Este trabalho	69 – 401	1,3 – 17,7	0,9 e 9,9	0,07 e 3,11
Kalny <i>et al.</i> ¹⁹	–	0,39 – 0,91	3,86 – 11,3	–
Lozak <i>et al.</i> ²⁶	–	0,94	2,99	0,51
Bu <i>et al.</i> ²⁸	4,9 - 559	0,22 – 2,41	0,55 – 7,3	0,028 – 0,62
Nookabkaew <i>et al.</i> ²⁹	33 - 6130	0,21 – 12,4	5,53 – 9,2	0,06 – 7,7
US Pharmacopeia ⁸²	–	–	< 50	< 10
EMEA ⁸³	–	< 25	< 25	< 25
Farmacopeia brasileira ¹³	–	< 25	< 25	< 25

3.5 Conclusões parciais

Neste capítulo foi demonstrado que a otimização do programa de temperaturas para o forno de grafite, com uso de modificador químico (apenas para Cr) e etapa adicional de pirólise assistida por ar possibilitou o emprego da calibração com padrões aquosos na determinação de Cr, Ni e V em plantas medicinais por SS-HR-CS GF AAS. Os procedimentos apresentaram boa exatidão e as concentrações determinadas se situaram entre 1,3 – 17,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cr, 0,9 – 9,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ Ni e 0,07 – 3,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ V. Devido a alta concentração, Al foi determinado por HR-CS F AAS e as concentrações desse nas amostras variaram entre 69 e 401 $\mu\text{g g}^{-1}$. De um modo geral, as concentrações determinadas para os analitos nessas amostras foram inferiores aos limites estabelecidos em legislação.

CAPÍTULO 4

*Determinação simultânea de Al, Cr e V
em plantas medicinais por
espectrometria de emissão atômica com
filamento de tungstênio (WC AES)*

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Al, Cr e V EM PLANTAS MEDICINAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO (WC AES)

4.1 Introdução e revisão bibliográfica

4.1.1 Fundamentos, instrumentação e aplicações para WC AES

Atomizadores eletrotérmicos vêm sendo empregados em análises químicas por técnicas espectrométricas desde o final da década de 1950, devido a vantagens como alta sensibilidade, baixos limites de detecção, utilização de pequenos volumes de amostra e possibilidade de pré-tratamento da amostra durante a etapa de pirólise. Dentre os dispositivos eletrotérmicos, destaca-se o uso de atomizadores baseados em superfícies gráficas, sendo a GF AAS a técnica que apresentou os maiores avanços ao longo dos anos e uma das mais empregadas atualmente para determinações de elementos traço em um ampla variedade de matrizes.⁵³ No entanto, essa técnica apresenta alguns inconvenientes inerentes ao material, tais como formação de carbetos refratários, baixa taxa de aquecimento e fenômenos de difusão e adsorção na superfície de grafite e que podem dificultar a atomização de alguns elementos e prejudicar a precisão e exatidão das medidas. Além disso, limitações referentes ao arranjo instrumental devido à necessidade de uso de fontes de alta potência e sistemas de refrigeração, que prejudicam a viabilidade de desenvolvimento de equipamentos portáteis e contribuem para a elevação dos custos de aquisição e manutenção.⁸⁴

Frente às limitações apontadas para GF AAS e em vista da necessidade de desenvolvimento de novos dispositivos e materiais, o emprego de atomizadores metálicos desponta como uma alternativa viável. Atomizadores baseados em metais como Mo, Pt e W, apresentam alguns aspectos favoráveis como: i-) menor formação de carbetos, ii-) elevada vida útil, iii-) rápido aquecimento através de uma fonte de baixa potência, iv-) menor emissão de radiação nas regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético, v-) menor gradiente de temperatura desenvolvido durante o aquecimento em comparação com superfícies de grafite.⁸⁵ Dentre os materiais utilizados na confecção de atomizadores metálicos, destaca-se o tungstênio por

apresentar o maior ponto de fusão dentre todos os elementos (3695 K), baixo calor específico ($0,132 \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$) e boa condutividade elétrica. Outras características bastante atrativas de atomizadores de W são a elevada estabilidade, resistência a ácidos como HNO_3 , HCl e H_2SO_4 , baixo custo, ampla disponibilidade (obtidos a partir de bulbos de lâmpadas) e produção em massa sob especificações estritas. Devido à boa ductilidade do metal, atomizadores de tungstênio podem ser encontrados na forma de tubos, copos, plataformas, fitas, fios e filamentos, sendo o último tipo o mais utilizado.⁸⁶ Para proteger o atomizador contra oxidação e aumentar sua vida útil, a utilização de purga com uma mistura gasosa de $\text{Ar}:\text{H}_2$ é geralmente indicada. O ambiente inerte e redutor propiciado pelo gás de purga auxilia também no processo de atomização e formação da nuvem atômica.⁸⁷ Apesar das vantagens apontadas, a atomização em filamento de W ocorre em ambiente aberto, o que prejudica a isothermicidade do sistema. QUEIROZ *et al.*⁸⁸ verificaram gradientes de temperatura da ordem de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ para cada 1 mm acima da superfície, levando a severos efeitos de matriz.

HOU e JONES⁸⁹ descreveram em um trabalho de revisão o uso de atomizadores de tungstênio para medidas de absorção atômica (WC AAS), onde destacam limites de detecção comparáveis a GF AAS. Embora altamente sensível e aplicável à determinação de vários analitos em uma gama de amostras,⁸⁹ o emprego da WC AAS ainda é geralmente monoelementar e requer o uso de fontes de radiação que dificultam a portabilidade. GU *et al.*⁹⁰ empregaram o filamento de tungstênio como atomizador para medidas de fluorescência atômica (WC AFS). Os autores determinaram simultaneamente 9 elementos (Ag, Bi, Cr, Cu, Ga, In, Mg, Mn e Tl) com limites de detecção entre 0,3 e 10 ng. Além do emprego como atomizador, a aplicação de filamentos de tungstênio para introdução de amostras para técnicas de plasma como ICP OES⁹¹ e ICP-MS⁹² são descritas na literatura.

Até recentemente, pouco interesse era direcionado a aplicações envolvendo medidas de emissão devido a alta intensidade de emissão de fundo e a energia insuficiente para excitação de alguns elementos. Entre 2005 e 2006, RUST e colaboradores^{93,94} propuseram a medida simultânea de sinais de emissão atômica (WC AES) utilizando um filamento de tungstênio como fonte de excitação, alinhado a um monocromador de alta resolução e um detector. No primeiro trabalho⁹³ os autores determinaram elementos facilmente excitáveis como Ca, Ba e Sr com limites de

detecção de 0,01; 0,5 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e RSDs de até 7%. No outro trabalho⁹⁴, os autores avaliaram a determinação de Al, Co, Cr, Dy, Ga, K, Mn, Pb, Rb, Sc e Yb utilizando o mesmo arranjo instrumental. Seis desses analitos (Dy – 404,6 nm ; Ga – 403,3 nm; K – 404,4 nm, Mn – 403,1 nm, Pb – 405,8 nm e Sc – 404,8 nm) puderam ser detectados simultaneamente em uma janela espectral de aproximadamente 4 nm. Limites de detecção entre 0,003 (Cr, Yb) e 10 ng (Pb) foram obtidos.

A Figura 4.1 mostra o esquema básico atual de um espectrômetro de emissão atômica com filamento de tungstênio.⁹⁵ O equipamento de WC AES é composto por um atomizador de tungstênio na forma de filamento extraído de uma lâmpada comercial de 150W e 15V após remoção do invólucro de vidro. A conexão elétrica inferior é mantida intacta e o bulbo é conectado em um soquete de cerâmica. O filamento é mantido dentro de uma cela de vidro de borossilicato em formato de T com extremidades horizontais vedadas com janelas de quartzo para confinamento da mistura gasosa Ar:H₂. O atomizador é aquecido resistivamente com uma fonte de baixa potência através da aplicação de uma corrente constante, sendo utilizado um multímetro para monitoramento da diferença de potencial resultante ao longo do programa de aquecimento. A radiação emitida é focalizada utilizando uma lente, onde é direcionada até um espectrógrafo e posteriormente ao detector. O sistema é ligado a um computador para controle do programa de aquecimento e aquisição dos sinais analíticos.

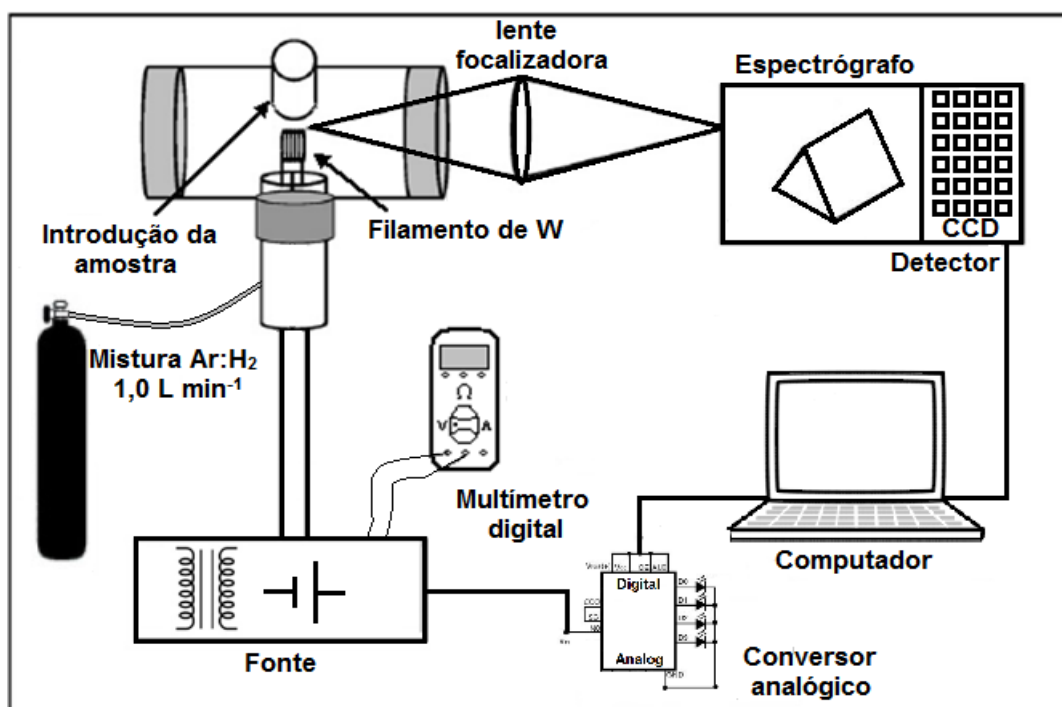


FIGURA 4.1 – Diagrama esquemático básico de um espectrômetro de emissão atômica com filamento de tungstênio WCAES. Fonte: Adaptado de VIRGILIO *et al.*⁹⁵

Desde a proposição da WC AES, vários avanços analíticos e, principalmente, instrumentais foram observados ao longo dos anos. DONATI *et al.*⁹⁶ determinaram 14 lantanídeos em amostras de solo por WC AES utilizando um monocromador de baixa resolução. Para reduzir parte da intensa radiação de fundo proveniente do filamento e evitar a saturação do detector, os autores utilizaram uma fenda com abertura de 2 mm entre as lentes focalizadoras. Os autores observaram também que o uso de filamentos novos proporcionava sinais de emissão até 50% menores do que os mesmos filamentos após 100 ciclos de aquecimento, devido possivelmente à formação de uma camada de óxido que aumenta a área superficial do atomizador ao longo de sua vida útil. Em virtude disso foi proposto um programa para condicionamento através da oxidação forçada do filamento, visando aumentar a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade. Foi avaliada também a utilização de somatório de intensidades de linhas de emissão para um mesmo elemento para fins de incremento de sensibilidade. Limites de detecção entre 0,8 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ (sem somatório de intensidades) e entre 0,7 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (utilizando a estratégia de

somatório de intensidades) sendo geralmente menores do que os obtidos aplicando-se F AAS. Em outro trabalho do mesmo grupo⁹⁷ foram determinados simultaneamente Cr, Ga, In e V em amostras de solo e águas. Limites de detecção entre 4 - 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cr - V) e precisão de até 6,5% foram obtidos utilizando novamente o somatório de intensidades de linhas de emissão.

DONATI *et al.*⁹⁸ propuseram um procedimento para determinação indireta de iodo por WC AES. Esse elemento apresenta alta energia de excitação e é um desafio analítico inclusive quando são utilizadas fontes mais energéticas como plasmas de argônio. Os autores utilizaram a adição de quantidades conhecidas de In para formação da espécie diatômica InI, que apresenta alta estabilidade e portanto ocasiona um decréscimo do sinal analítico proporcional à quantidade de iodo na amostra. Em testes de adição e recuperação em água de torneira, foram verificadas recuperações de até 140%, sendo essas atribuídas à formação de InCl e/ou InF que podem também ocasionar atenuação no sinal e levar à determinação de concentrações aparentes de I mais elevadas. Nesse método, a sensibilidade é proporcional à concentração de In adicionada, sendo que limites de detecção de 0,6 e 3,0 mg L^{-1} I foram obtidos para soluções contendo 10 e 50 mg L^{-1} In, respectivamente.

Na busca por reduzir as limitações atribuídas ao comportamento não-isotérmico entre a fase gasosa e a superfície, DONATI e colaboradores⁹⁹ propuseram a utilização de um arranjo instrumental com dois filamentos de tungstênio. Medidas de temperatura na fase gasosa utilizando dois filamentos mostraram temperaturas até 500 K maiores do que o arranjo com apenas um filamento. A maior temperatura alcançada possibilitou a observação de sinais de emissão para elementos mais dificilmente excitáveis como Ag, Cu e Sn. O uso do arranjo com dois filamentos levou a limites de detecção até 40x menores para V e melhora significativa na precisão para Sr e Ti. Em outro trabalho do mesmo grupo¹⁰⁰, foi proposta a utilização de uma nova cela metálica de atomização para contornar as interferências causadas devido ao ambiente não isotérmico. A cela apresenta uma fenda de saída que proporciona menor propagação da radiação de fundo. Sua construção em Al e design fechado proporciona menores gradientes de temperatura e gera um maior confinamento da nuvem atômica durante a atomização. Os autores avaliaram ainda diferentes gases e misturas para purga contendo Ar, N₂, CO₂, He, H₂ e C₂H₂, obtendo os melhores resultados com a mistura

10% H₂ : 90% Ar. Limites de detecção ligeiramente menores foram obtidos com o novo design quando comparados a trabalhos prévios na literatura.

Explorando as vantagens decorrentes da utilização de um atomizador metálico, o grupo de JONES¹⁰¹ desenvolveu um instrumento portátil para medidas em campo. Esse instrumento era composto por um detector portátil e de ampla janela espectral, uma lente colimadora e a mesma cela de Al desenvolvida em trabalho anterior,¹⁰⁰ os componentes foram montados em uma base cerâmica e podem ser operados com uma bateria automotiva de 12 V. Limites de detecção entre 0,04 e 1500 µg L⁻¹ foram observados para os 15 elementos avaliados (Al, Ba, Cr, Cs, Cu, Eu, Fe, Ga, Li, Mg, Mn, Rb, Sr, V e Yb). Materiais de referência certificados de águas e plantas foram utilizados para avaliar a exatidão e recuperações entre 72 e 157% foram obtidas.

Devido à capacidade de realizar a decomposição da matriz durante a etapa de pirólise, o uso da atomização eletrotérmica com filamento de tungstênio possibilita a realização de análises com mínimo pré-tratamento da amostra. SANTOS *et al.*¹⁰² estudaram a digestão *in situ* assistida por uma mistura oxidante (15% v v⁻¹ H₂O₂ + 1% v v⁻¹ HNO₃) para determinação direta de Ca em amostras de suco e águas mineral e de côco por WC AES. Utilizando esse procedimento, recuperações entre 87 - 116 % foram obtidas para amostras enriquecidas. As amostras foram analisadas comparativamente por ICP OES e não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Em outro trabalho, SANTOS e colaboradores¹⁰³ utilizaram procedimentos de proteólise enzimática e digestão *in situ* para determinação direta de Cs e Sr em amostras de peixe por WC AES. A exatidão foi avaliada por análise comparativa com ICP OES e usando testes de adição e recuperação. Limites de detecção de 0,07 e 0,15 µg L⁻¹ foram obtidos para Cs e Sr, respectivamente. DANCSAK *et al.*¹⁰⁴ avaliaram a WC AES para determinação de Na, K, Cr e V em biodiesel após simples diluição das amostras em metanol ou etanol. Os autores encontraram concentrações de 6,1 a 95,6 mg kg⁻¹ para Na e K (LODs = 20 e 70 µg kg⁻¹, respectivamente), entre 0,22 - 0,43 mg kg⁻¹ para V (LOD = 90 µg kg⁻¹) e menores que o limite de detecção (70 µg kg⁻¹) para Cr.

SALIDO e JONES¹⁰⁵ observaram que as intensidades de sinais de emissão para Sr por WC AES eram potencializadas na presença de altas concentrações de Al e K. Os autores avaliaram a influência de concentrações crescentes ente 100-1000 mg L⁻¹ de Al e K, denominados modificadores químicos em

analogia à GF AAS, sobre as intensidades de emissão para $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Sr. O uso de 100 mg L^{-1} Al e K como modificadores, proporcionou limites de detecção de 2 (LOD = $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$) a 28 vezes menores (LOD = $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente, do que os obtidos na ausência dos mesmos ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$). A exatidão foi avaliada analisando-se CRM de água e nenhuma diferença significativa foi observada para presença e ausência dos modificadores.

SILVA *et al.*¹⁰⁶ verificaram efeito semelhante sobre o sinal de emissão para Cr na presença de Co em experimentos com WC AES. Os autores afirmaram que a presença de elementos que apresentam energias de ionização até 2,1 eV maiores que as do analito, facilitam a ocorrência de reações de transferência de carga e recombinação, produzindo assim uma maior população de átomos no estado excitado e, conseqüentemente, aumento dos sinais de emissão. Ganhos de até 10X no limite de detecção (de 0,7 para $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ Cr) e redução de efeitos matriciais foram apontados como as principais vantagens para o emprego de 1000 mg L^{-1} Co como modificador. Em outro trabalho dos mesmos autores,¹⁰⁷ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi utilizado como modificador para determinações de Mn por WC AES. Limites de detecção 17 vezes menores ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e melhorias de até 50% nos desvios padrão relativos foram observados ao adicionar 750 mg L^{-1} Mg como modificador. O procedimento foi aplicado para a determinação de Mn em CRMs de plantas e adequada exatidão foi obtida apenas quando o modificador foi empregado.

VIRGILIO e colaboradores⁹⁵ avaliaram Co, Ni e Pd como modificadores para aumento de sensibilidade para V por WC AES. Quando utilizados 100 mg L^{-1} Co e 400 mg L^{-1} Ni, sinais de emissão mais intensos e com ápice em tempos maiores de atomização/excitação (*i.e.* 2 s após o início) foram observados. Os autores afirmaram que apesar das maiores temperaturas alcançadas pelo filamento para atomização prolongada, a maior emissão de fundo compromete a razão sinal analítico – sinal de fundo, e conseqüentemente, prejudica os limites de detecção. Para 800 mg L^{-1} Pd como modificador os sinais analíticos aparecem 1,5 s após o início da atomização/excitação, obtendo intensidades de emissão maiores e limites de detecção 4 vezes menores do que aqueles reportados na literatura para o mesmo sistema sem o uso de modificador. Para verificar a exatidão foram analisados um CRM de óleo lubrificante e amostras enriquecidas de óleos usados, obtendo-se recuperações entre 85 e 119 %.

4.2 Objetivos específicos

Esta etapa do trabalho de tese tem como principais objetivos o desenvolvimento de um novo método para avaliação da temperatura do filamento de tungstênio e de procedimentos analíticos baseados em espectrometria de emissão atômica com filamento de tungstênio (WC AES) para determinação simultânea de Al, Cr, e V em amostras de plantas medicinais.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Instrumentação e condições operacionais

O espectrômetro de WC AES utilizado neste trabalho (Figura 4.2) foi baseado no diagrama apresentado na Figura 4.1 da Seção de Revisão Bibliográfica deste capítulo.⁹⁵ Um espectrógrafo Czerny-Turner MonSpec 18 (Scientific Measurement Systems, EUA) e um detector CCD refrigerado termoeletricamente Spec-10 (Princeton Instruments, EUA) foram empregados. O atomizador consistiu de um filamento de tungstênio com 10 espiras extraído de bulbos microscópicos de lâmpadas Xenophot HLX 64633 de 150 W, 15 V (Osram, Alemanha). O filamento e sua base contendo a conexão elétrica foram mantidos e conectados a um soquete cerâmico com dois orifícios. O atomizador foi mantido em uma cela de atomização D131703 de vidro borossilicato em forma de T (Ace Glass, EUA) com duas janelas de quartzo para vedação das extremidades horizontais.

O filamento de tungstênio foi aquecido resistivamente utilizando uma fonte VI-LU1-EU-BM de corrente constante com potência de 200 W (Vicor, EUA), e a radiação emitida foi focalizada utilizando lentes de sílica fundida com distância focal de 75 mm e diâmetro de 25 mm. Foi utilizada uma mistura gasosa constituída por 10 % H₂ / 90 % Ar sob uma vazão de 1,0 L min⁻¹ durante todo o ciclo de aquecimento, para evitar a oxidação do filamento e promover uma melhor atomização/excitação. Para minimizar os sinais de emissão de fundo devido à emissão de corpo negro durante a etapa de atomização, a imagem 1:1 focalizada do filamento foi posicionada a 1 mm do eixo central da fenda de entrada do espectrógrafo. Uma etapa de atomização de 5 s e a aquisição sucessiva de 10 espectros com tempo de integração de 500 ms foram

utilizados nas medidas. Uma micropipeta de 2-20 μL (Eppendorf, EUA) foi utilizada para dispensar as soluções diretamente na superfície do atomizador.

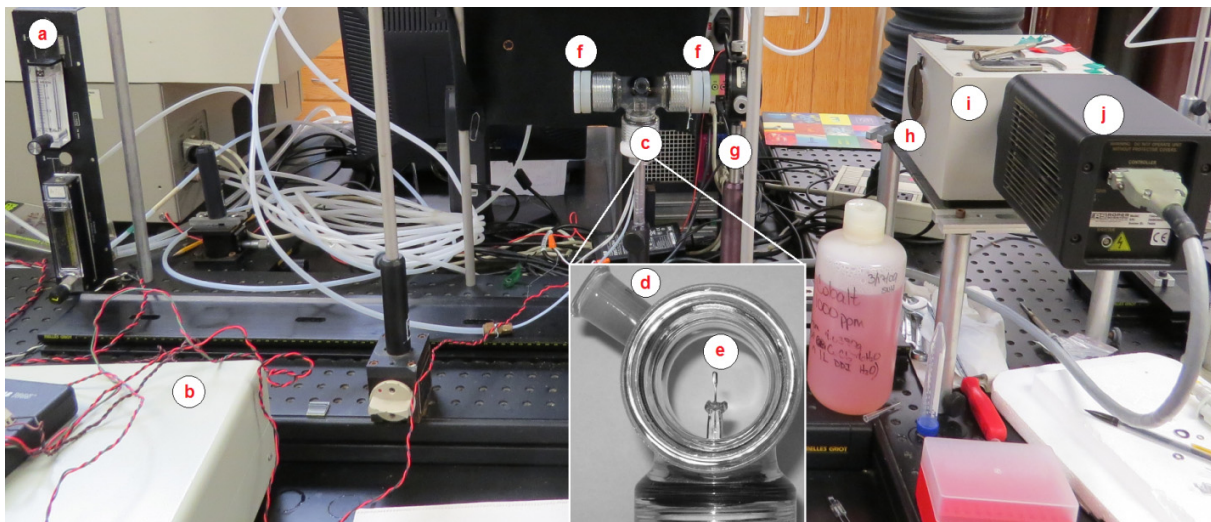


FIGURA 4.2 – Foto do espectrômetro de emissão atômica com filamento de tungstênio (WC AES), composto de controle de vazão da mistura Ar/H_2 (a), fonte de energia (b), cela de vidro borossilicato (c) com orifício de introdução da amostra (d), atomizador de filamento de tungstênio (e), janelas de quartzo (f), lente focalizadora (g), fenda de entrada (h) do espectrógrafo (i) e detector CCD (j). Fonte: Autor e adaptação de DONATI.⁸⁶

Para o desenvolvimento do método voltamperométrico de medida da temperatura, foi utilizado um microscópio trinocular óptico EMZ-5TR com aumento ocular de 30X e lentes objetivas com aumento de 3X (Meiji, Japão) para determinar o raio dos filamentos, e uma balança analítica de precisão AE 100 (Mettler, EUA) para medir a massa do atomizador após remoção da base. Um multímetro digital 42-range (RadioShack, EUA) foi utilizado para determinar as correntes fornecidas pela fonte e para monitorar o potencial durante o ciclo de aquecimento.

Medidas de absorção atômica para determinação da temperatura da fase gasosa foram feitas utilizando uma lâmpada EDL (Westinghouse, EUA) posicionada no eixo do atomizador e em direção oposta ao espectrógrafo. A lâmpada operou com uma corrente de 11 A fornecida por uma fonte (Perkin Elmer, EUA). Uma lente de sílica fundida de distância focal 150 mm e diâmetro de 25 mm foi utilizada para focalizar a radiação proveniente da lâmpada EDL. As amostras sólidas de plantas medicinais foram digeridas com o auxílio de um bloco de aquecimento de alumínio. Para obtenção de dados comparativos foi utilizado um espectrômetro ICP OES Prodigy High

Dispersion (Teledyne Leeman Labs, EUA) operando segundo os padrões recomendados pelo fabricante.

4.3.2 Reagentes, soluções e amostras

Para preparo das soluções analíticas foram utilizadas soluções-padrão estoque monoelementares 1000 mg L^{-1} de Al, Cr e V (High Purity Standards, EUA), água destilada-deionizada Milli-Q (Millipore, EUA). Todas as soluções analíticas foram preparadas em meio $1\% \text{ v v}^{-1}$ HNO_3 (Fisher Scientific, Canadá). Soluções de modificadores foram preparadas por diluição apropriada de soluções-padrão 10 ou 20 g L^{-1} de Co, Ni e Pd (Spex, Edison, EUA). Para as medidas de AAS foi utilizada uma solução $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Sn. Para digestão das amostras, HNO_3 e HCl padrão espectroscópico concentrados (Fisher Scientific) e H_2O_2 $30\% \text{ v v}^{-1}$ (GFS Chemicals, EUA) foram utilizados.

Para construção das curvas de temperatura de pirólise e atomização foi utilizada um solução multielementar 10 mg L^{-1} de Al, Cr e V. Para avaliar a influência da concentração dos modificadores nos sinais analíticos, soluções multielementares 10 mg L^{-1} de Al, Cr e V foram preparadas na ausência e presença de 100 - 1000 mg L^{-1} de Co, Ni e Pd. Nesses casos, o branco consistiu de uma solução contendo 0 - 1000 mg L^{-1} de cada modificador sem a presença do analito. Cinco amostras de plantas medicinais Boldo (*Peumus boldus*), Camomila (*Chamomilla recutita*), Citrus (*Citrus ichangensis*), Chá Verde (*Camellia sinensis*) e Menta (*Mentha piperita*) foram adquiridos na forma de envelopes de chá em um mercado local de Winston-Salem, NC (EUA). É importante mencionar que as amostras empregadas nesse capítulo são distintas das utilizadas no primeiro capítulo.

4.3.3 Procedimentos analíticos

Para comparação entre as temperaturas alcançadas para filamentos novos e usados, os filamentos novos foram submetidos a um tratamento térmico e condicionamento descrito no programa de aquecimento do atomizador (Tabela 4.1). A temperatura da fase gasosa foi determinada utilizando o método de absorção atômica

de duas linhas de Sn proposto por STURGEON e CHAKRABARTI¹⁰⁸ e os valores mais recentes para as constantes físicas.¹⁰⁹

TABELA 4.1 – Programa de aquecimento para tratamento térmico e condicionamento de filamentos de tungstênio novos.

Etapa	Corrente aplicada (A)	Tempo (s)	Vazão de gás
Tratamento 1	3,0	10	atmosfera
Tratamento 2	5,0	5	atmosfera
Tratamento 3	0	10	atmosfera
Tratamento 4	5,0	5	atmosfera
Condicionamento 1	3,5	150	1,0 L min ⁻¹ Ar / H ₂
Condicionamento 2	4,5	150	1,0 L min ⁻¹ Ar / H ₂
Condicionamento 3	5,5	200	1,0 L min ⁻¹ Ar / H ₂
Condicionamento 4	7,0	70	1,0 L min ⁻¹ Ar / H ₂
Condicionamento 5	10,0	30	1,0 L min ⁻¹ Ar / H ₂

Linhas de emissão para Al em 396,1 nm, Cr em 425,3 nm e V em 437,9 nm foram avaliadas neste trabalho. Em WC AES, vários elementos apresentam intensidades de emissão máximas entre 1,5 e 2,0 s após o início da etapa de atomização. Sendo assim, foi realizado o registro sucessivo de 6 espectros com tempo de integração de 500 ms, totalizando 3 s de registro. Para minimizar problemas relacionados a eventuais resíduos no atomizador, ampliou-se a duração da etapa de atomização. É importante ressaltar que durante todo o programa de aquecimento para aquisição dos sinais (Tabela 4.2) foi utilizada a mistura gasosa 10 % H₂ / 90 % Ar a uma vazão de 1,0 L min⁻¹.

TABELA 4.2 – Programa de aquecimento utilizado para otimizações por WC AES.

Etapa	Corrente aplicada (A)	Tempo (s)	Aquisição de sinal
Secagem 1	3,7	35	não
Secagem 2	3,5	20	não
Secagem 3	2,7	20	não
Pirólise	2,0*	15*	não
Resfriamento	0	10	não
Atomização	10*	5	sim

* Para a avaliação da pirólise e atomização esses parâmetros foram variados

Para a digestão das amostras, massas de aproximadamente 300 mg foram pesadas e transferidas para os frascos do bloco digestor. Foram adicionados 4,0 mL de HNO₃, 1,0 mL de HCl, concentrados, e 2,0 mL de H₂O₂ e a mistura foi submetida a digestão em frascos abertos aquecidos a 140 °C por 3 h. Para evitar a secagem durante a digestão, alíquotas de 2 mL de água foram adicionadas a cada 45 min. Após a digestão, filtraram-se as soluções, adicionou-se a solução com modificador às amostras e os frascos foram avolumados para 10,0 mL com água. Para avaliação da exatidão do procedimento foi utilizada a análise das amostras (n=3) por ICP OES para Al e experimentos de adição e recuperação para Cr e V por WC AES.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Desenvolvimento do método voltamperométrico para determinação da temperatura do filamento

Considerando o filamento de W como um fio cilíndrico enrolado na forma de uma espira, a área da circunferência, o volume do fio e a densidade do material podem ser obtidos a partir das equações 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente:

$$A = \pi r^2 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$V = \pi r^2 L \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$d = m/V \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde A é a área do filamento (m^2), r é o raio do filamento (m) e L é o comprimento do filamento (m). Sabendo que a densidade do tungstênio (d)¹⁰⁹ é a razão entre a quantidade de matéria m (kg) e o volume ocupado V (m^3), e apresenta o valor de 19250 kg m^{-3} , substitui-se o valor de V da Eq. 4.3 na Eq. 4.2:

$$\frac{m}{d} = \pi r^2 L \quad \rightarrow \quad L = \frac{m}{d \pi r^2} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Dividindo-se os ambos os termos da igualdade da equação 4.4 pela área (Eq. 4.1), obtém-se a equação 4.5:

$$\frac{L}{A} = \frac{m}{d \pi r^2} \quad \rightarrow \quad \frac{L}{A} = \frac{m}{d \pi^2 r^4} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Para determinação da razão L / A para o filamento de tungstênio, é necessária a determinação da massa do atomizador e do raio do fio, visto que os outros termos da equação 4.5 são constantes e conhecidos. Para obtenção do valor de massa, os filamentos novos e condicionados foram cortados na base e pesados com precisão em uma balança. Massas de $0,0922 \pm 0,0003 \text{ g}$ para filamentos novos e $0,0940 \pm 0,0011 \text{ g}$ para os condicionados foram determinadas (média \pm desvio-padrão, $n=3$), sendo os últimos maiores devido à formação de óxidos na superfície metálica. O raio do fio constituinte do filamento foi determinado através de observações ao microscópio, com valores de $0,144 \pm 0,001 \text{ mm}$ e $0,1515 \pm 0,0006 \text{ mm}$ para filamentos novos e condicionados (média \pm desvio padrão, $n=3$), respectivamente. A maior espessura do raio do filamento usado contribui também com a hipótese de formação de óxidos superficiais. A Figura 4.3 mostra imagens obtidas por microscopia óptica com aumento de 45 vezes para o filamento novo (a) e condicionado (b)¹¹⁰. Verifica-se que o filamento tratado termicamente apresenta aspecto rugoso e com pontos brilhantes, possivelmente atribuídos a partículas de óxido de tungstênio.

Utilizando-se os dados experimentais obtidos e a Eq. 4.5, o valor de L/A para filamentos novos foi de $1,13 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$. Devido à camada de óxido formada durante o processo de condicionamento (Figura 4.3b), a densidade do material é provavelmente diferente daquela do tungstênio puro, e, portanto, um novo valor para

d é requerido na Eq. 5. Sendo assim, a razão L/A para filamentos usados foi calculada a partir do valor de L para filamentos novos, supondo que o comprimento do filamento não varia quando é feito o tratamento térmico. A área do filamento foi calculada a partir do raio e da Eq. 4.1, obtendo-se então uma razão L/A de $1,02 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ para o filamento condicionado.

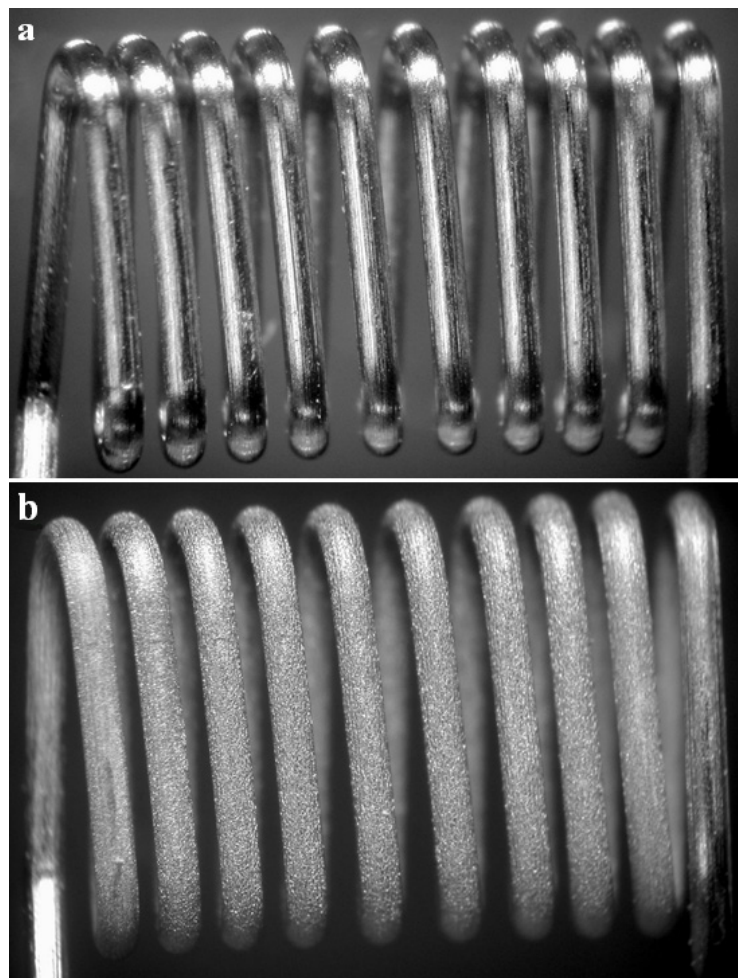


FIGURA 4.3 – Imagens obtidas por microscopia óptica (magnitude de aumento de 45 X) para filamento de tungstênio novo (a) e após programa de condicionamento (b). Adaptado de VIRGILIO *et al.*¹¹⁰

Os filamentos utilizados nos experimentos para determinação de L/A foram descartados. Considerando-se a fabricação em massa dos bulbos de lâmpadas e com estrita especificação e controle de qualidade, é esperado que outros filamentos do

mesmo lote apresentem o mesmo comportamento. Utilizando-se outros filamentos novos e condicionados confinados dentro da cela com fluxo de gás, aplicaram-se correntes nominais (I) de 1 a 10 A e mediu-se a diferença de potencial (V). A partir desses dados é possível obter uma curva que relaciona a corrente aplicada com o potencial medido, sendo a equação polinomial de ajuste da curva dada por:

$$V = 0,0017 I^3 + 0,0521 I^2 + 0,07458 I - 1,6898 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Com auxílio do Microsoft Solver (suplemento do Microsoft Excel) e da Eq. 4.6, calculou-se o valor de corrente efetivamente aplicada no filamento. Com os valores medidos de potencial (V) e calculados de corrente (I), é possível calcular a resistência R do filamento (Ω) através da equação 4.7:

$$R = V/I \quad (\text{Eq. 4.7})$$

A partir dos valores calculados de resistência (Ω) e L/A (m^{-1}), é possível calcular a resistividade do filamento ρ ($\Omega \text{ m}$), segundo a equação 4.8.

$$\rho = \frac{R}{\frac{L}{A}} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

A temperatura superficial do atomizador foi calculada considerando-se a relação com a resistividade do tungstênio (Figura 4.4) proposta por DESAL e colaboradores.¹¹¹

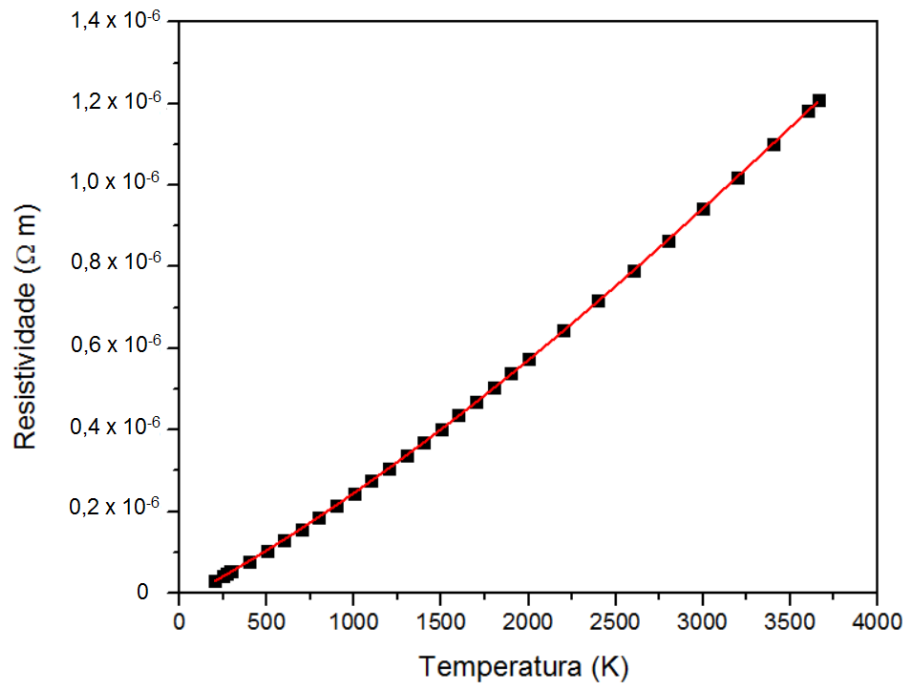


FIGURA 4.4 – Relação entre a resistividade e a temperatura para o tungstênio a partir de dados de DESAL *et al.*¹¹¹

A partir dos dados da curva de ajuste obtida para a Figura 4.4, obteve-se a equação 4.9 que correlaciona temperatura T (K) e a resistividade ρ (Ω m):

$$\rho = 4,5776 \cdot 10^{-11} \times T^{1,2415} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Na Eq. 4.8, substituindo-se o valor de ρ dado em Eq. 4.9, o valor de R em Eq. 4.7 e efetuando os rearranjos, pode-se determinar a temperatura do filamento de tungstênio a partir do simples monitoramento do potencial após aplicação de uma corrente elétrica, segundo:

$$T = \left(\frac{ddp}{\frac{L}{A} I} \right)^{0,805477245} \times 2,128731811 \cdot 10^8 \quad (\text{Eq. 4.10})$$

Onde T é a temperatura (K), ddp é o potencial (V), L/A a razão comprimento/área (m^{-1}) e I a corrente aplicada (A). É importante ressaltar que o valor do potencial para o cálculo da resistência foi coletado após 30 s de aplicação da corrente,

ou seja, quando o filamento atinge o estado de equilíbrio de temperatura. O método desenvolvido¹¹⁰ foi aplicado na determinação da temperatura em filamentos novos e condicionados, e comparado a outros descritos na literatura como o proposto por LEVINE *et al.*,¹¹² baseado na medida de radiação de corpo negro, e por NAVARRE e WALLACE¹¹³ avaliando condições de não equilíbrio, mostrados na Figura 4.5.

Os valores de temperatura utilizando o método de radiação de corpo negro¹¹² são ligeiramente diferentes, especialmente quando baixas correntes são aplicadas. Essa discrepância pode ser atribuída a menores emissões de radiação de corpo negro em condições de baixa corrente. O método desenvolvido por NAVARRE e PAIGE¹¹³ propõe a determinação da razão L/A a partir da medida direta da resistência a uma dada temperatura. As principais desvantagens do método de não equilíbrio são a necessidade de controle criterioso da temperatura do ambiente e o uso de equipamentos bastante precisos e sensíveis para medir baixas resistências elétricas.

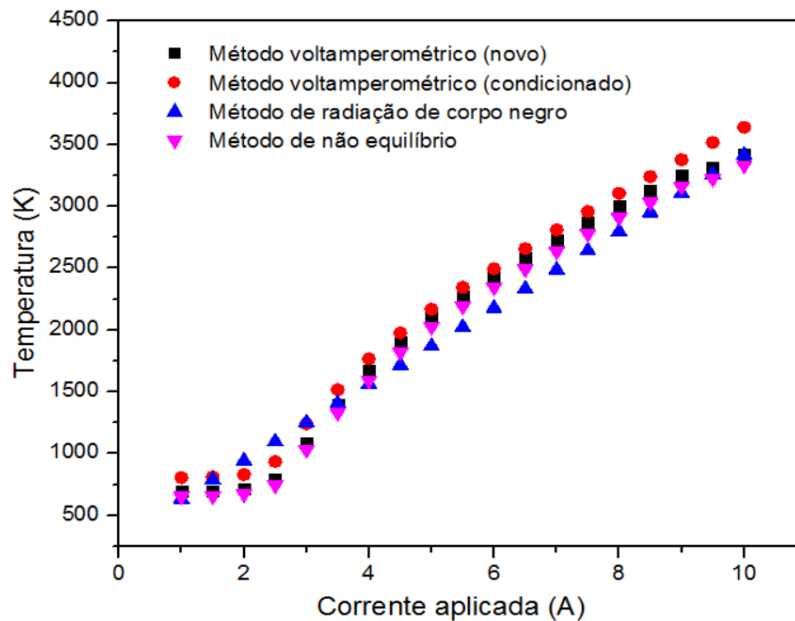


FIGURA 4.5 – Temperaturas superficiais para atomizadores de tungstênio em diferentes correntes aplicadas para filamentos novos e condicionados¹¹⁰, e comparação com outros métodos descritos na literatura.^{112,113}

Apesar das diferenças apontadas, aplicando-se uma corrente de 10,5 A, por exemplo, foram observados desvios de 2,7 e 0,4 % entre o método proposto e os métodos de radiação de corpo negro e de não equilíbrio, respectivamente. Aplicando-se essa mesma corrente, verifica-se que as temperaturas da superfície de filamentos condicionados são cerca de 260 K maiores do que as obtidas para filamentos novos.¹¹⁰ Vale ressaltar que as temperaturas apresentadas não foram medidas empiricamente com um pirômetro óptico.

Em WC AES, os sinais de emissão atômica atingem o máximo entre 1-2 s após o início da atomização e duram cerca de 1 s.⁹⁶ Sendo assim, a determinação da temperatura da superfície do atomizador após alguns segundos de atomização (condição de equilíbrio), fornece poucas informações a respeito do processo. A Figura 4.6 mostra as temperaturas estimadas para os filamentos de tungstênio novos e termicamente tratados em diferentes tempos de atomização após aplicação de uma corrente 10,5 A.

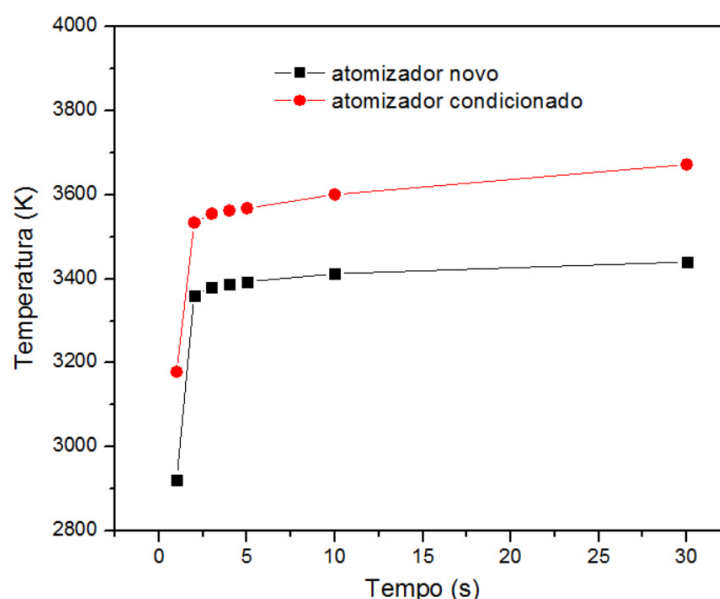


FIGURA 4.6 – Temperaturas superficiais para atomizadores novo e condicionado em diferentes tempos de atomização aplicando 10,5 A.¹¹⁰

Após 2 s de atomização, tempo em que se observam os sinais de emissão, verificou-se que a temperatura obtida para o filamento condicionado é cerca de 170 K maior do que a obtida com o filamento novo. Os resultados dos experimentos envolvendo as medidas de absorção atômica para as duas linhas de Sn¹⁰⁸, mostraram

que as temperaturas da fase gasosa são cerca de 4% maiores para atomizadores condicionados em comparação com os novos. Esse fenômeno pode explicar as maiores intensidades de emissão observadas em trabalhos anteriores que utilizaram filamentos condicionados.^{96,97} Além disso, a formação de um filme de óxidos de tungstênio aumenta a área superficial e pode gerar alterações na formação de precursores ou ainda nos mecanismos e processos de atomização.

4.4.2 Avaliação das etapas de pirólise e atomização e estudo de modificadores químicos

Devido à dificuldade de monitoramento e controle da temperatura do atomizador, poucos trabalhos descreveram a avaliação de curvas de temperatura de pirólise e atomização em WC AES.¹⁰³ Vale ressaltar que nas medidas de emissão atômica em filamento de tungstênio, a etapa denominada como atomização compreende também a excitação dos elementos devido à elevada energia, sendo que o termo atomização foi adotado por analogia com GF AAS. Com o método voltamperométrico desenvolvido¹¹⁰ foi possível a obtenção de curvas de pirólise e atomização para Al, Cr e V simultaneamente, utilizando filamentos condicionados (Figura 4.7). Para isso, adicionou-se 20 μL de uma solução 10 mg L^{-1} de Al, Cr e V e o programa de aquecimento descrito na Tabela 4.2 foi empregado.

Variou-se a corrente aplicada entre 2 A ($T = 840 \text{ K}$) e 5,5 A ($T = 2400 \text{ K}$), mantendo-se a atomização em 10 A. Como condição de compromisso para os 3 analitos, utilizou-se a pirólise com 4,5 A ($T = 2000 \text{ K}$) como ótima. Considerando-se as temperaturas de pirólise típicas para Al, Cr e V em GF AAS (ca. 1700-1900 K com o uso de modificadores⁴²), verifica-se que as temperaturas máximas para WC AES são geralmente mais elevadas. É importante apontar que o tungstênio pode ser empregado como modificador permanentemente em GF AAS, propiciando uma maior estabilidade térmica ao analito.⁸⁰ Vale a pena ressaltar ainda que os mecanismos de atomização e excitação dos analitos são dependentes das interações superficiais, sendo que as características inerentes a atomizadores gráfiticos e metálicos podem modificar os processos aos quais os analitos são sujeitos durante os programas de aquecimento. Na otimização da etapa de atomização, utilizou-se a condição de pirólise previamente

otimizada e variou-se a corrente empregada entre 9 A ($T = 3120$ K) e 10,5 A (3360 K), sendo a corrente mais alta a que propiciou maiores intensidades de emissão.

A influência da etapa de pirólise a 2000 K e de sua duração foram avaliadas. A Figura 4.8 mostra os sinais analíticos obtidos para diferentes tempos de pirólise entre 0 (ausência dessa etapa) e 120 s. Verifica-se que mesmo para etapas mais curtas como 5 s, a pirólise causa um aumento da intensidade de emissão. Para tempos mais longos, verifica-se um aumento mais pronunciado para o V e a manutenção de um patamar para Al e Cr. A precisão foi avaliada através de 10 medidas sucessivas de uma solução 10 mg L^{-1} de Al, Cr e V utilizando 60 s de pirólise e sem a mesma. Os valores de RSDs (sem e com 60 s de pirólise) para Al (3,2 e 3,5 %), Cr (3,8 e 2,3 %) e V (4,1 e 3,5 %) mostram que para os dois últimos há um ganho em precisão com o emprego da etapa de pirólise.

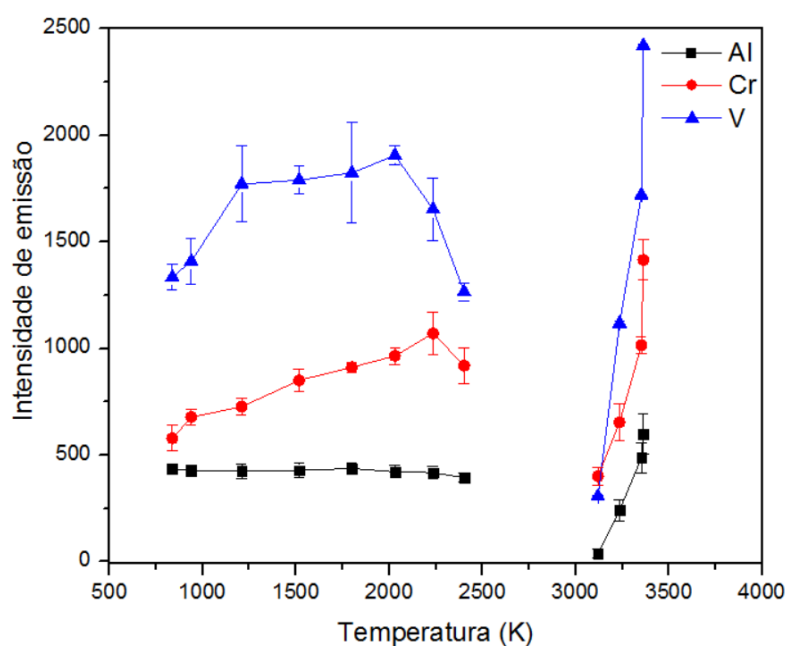


FIGURA 4.7 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Al, Cr e V por WC AES utilizando um atomizador condicionado.

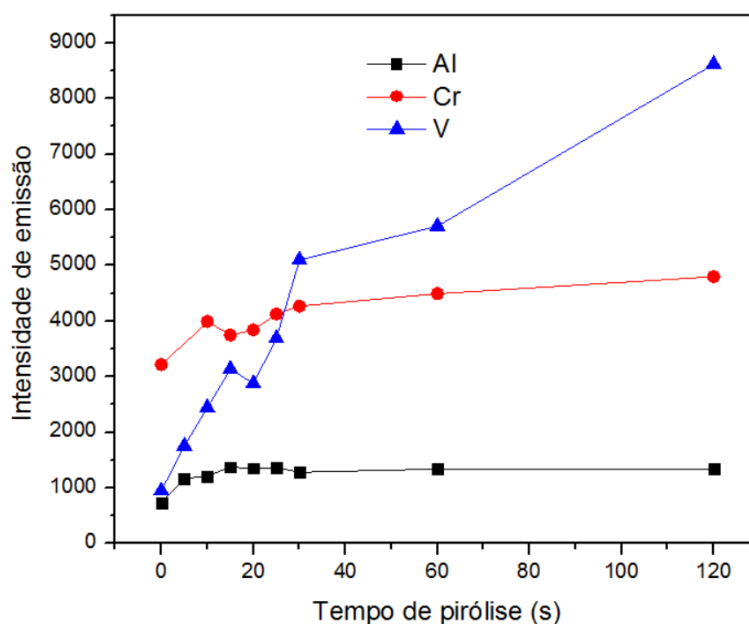


FIGURA 4.8 – Influência da etapa de pirólise e sua duração sobre os sinais de emissão de Al, Cr e V por WC AES.

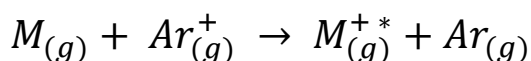
Considerando-se os ganhos de sinal, precisão e também a frequência analítica, adotou-se uma etapa de pirólise de 60 s a 2000 K para os estudos seguintes. O programa de aquecimento otimizado é apresentado na Tabela 4.3. É importante comentar que a etapa de resfriamento anterior à atomização tem a função de garantir condições equivalentes e melhor repetibilidade ao processo de atomização durante a análise de várias soluções.

TABELA 4.3 – Programa de aquecimento utilizado para determinações de Al, Cr e V por WC AES.

Etapa	Corrente aplicada (A)	Tempo (s)	Temperatura calculada (K)	Aquisição de sinal
Secagem 1	3,7	35	373	não
Secagem 2	3,5	20	373	não
Secagem 3	2,7	20	373	não
Pirólise	4,5	60	2000	não
Resfriamento	0	10	273	não
Atomização	10,5	5	3360	sim

Além da pirólise, avaliou-se também o emprego de modificadores químicos para WC AES. Os modificadores químicos são geralmente empregados em espectrometria de absorção atômica para aumentar a estabilidade térmica do analito durante a etapa de pirólise a fim de reduzir os sinais de fundo, efeitos de matriz e interferências. Alguns trabalhos na literatura^{114,115} descreveram o uso de modificadores convencionais como Pd(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂, ácido ascórbico, e também modificadores permanentes, tais como Ir e Rh. Nesses casos, apesar de promover maior estabilidade térmica aos analitos, alguns desses modificadores foram ineficazes na remoção adequada da matriz e podem causar diminuição no tempo de vida útil do atomizador devido a formação de carbetos e óxidos. Apesar do uso extensivo de modificadores em ET AAS, seu emprego para técnicas de emissão é pouco explorado na literatura.

NIU e HOUK¹¹⁶ reportaram o fenômeno de reações de transferência de cargas entre íons Ar⁺ e espécies metálicas na geração de íons em plasma de Ar, segundo a reação:



Os autores concluíram que a formação de espécies metálicas excitadas (M⁺) é mais favorável quando o estado excitado apresenta energia próxima daquela do íon reagente (Ar⁺). ABOU-SHAKRA *et al.*¹¹⁷ e MACHAT *et al.*¹¹⁸ observaram o mesmo efeito de transferência de cargas, sendo que a sensibilidade para Se foi incrementada devido à presença de íons C⁺ para ICP-MS e ICP OES, respectivamente.

Em um trabalho recente para WC AES, SILVA e colaboradores¹⁰⁶ destacam que a adição de elementos com energia de ionização 2,1 eV maiores que a do analito podem facilitar as reações de transferência de carga e recombinação eletrônica, gerando uma maior população de analitos no estado excitado. Essa rota de excitação é energeticamente mais favorável do que a tradicional que utiliza o processo de transferência de calor do atomizador. Sendo assim, o emprego de modificadores pode aumentar a sensibilidade em determinações por WC AES. Outro parâmetro que deve ser considerado é a temperatura de ebulição (TE) das espécies. Modificadores com TE muito menores ou maiores que o do analito podem ser atomizados em momentos diferentes aos da geração das espécies excitadas, comprometendo assim a interação entre modificador e analito. Para tanto, as TEs dos modificadores devem estar

500 K acima ou abaixo daquela do analito. A Tabela 4.4 mostra os parâmetros físico-químicos¹⁰⁹ dos analitos e modificadores utilizados neste trabalho. As Figuras 4.9, 4.10 e 4.11 mostram a influência de concentrações crescentes dos modificadores Co, Ni e Pd, respectivamente, sobre os sinais analíticos obtidos a partir de 20 µL de uma solução 10 mg L⁻¹ de Al, Cr e V (massa dos analitos de 0,2 µg), avaliando-se também a utilização da etapa de pirólise e sua ausência.

TABELA 4.4 – Temperaturas de ebulição e energias de ionização para os analitos (Al, Cr e V) e modificadores (Co, Ni e Pd) avaliados neste trabalho.

Elemento	Energia de ionização (eV)	Temperatura de ebulição (K)
Al	5,99	2792
Cr	6,77	2944
V	6,75	3680
Co	7,88	3200
Ni	7,64	3186
Pd	8,34	3236

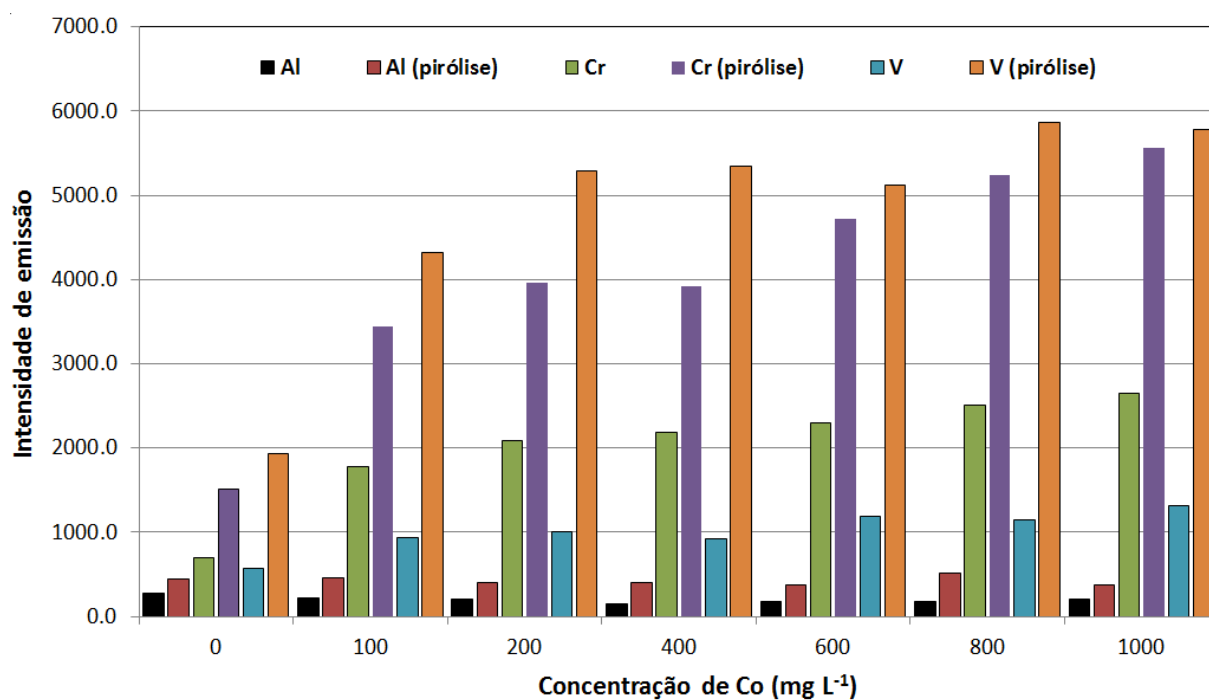


FIGURA 4.9 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Co sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.

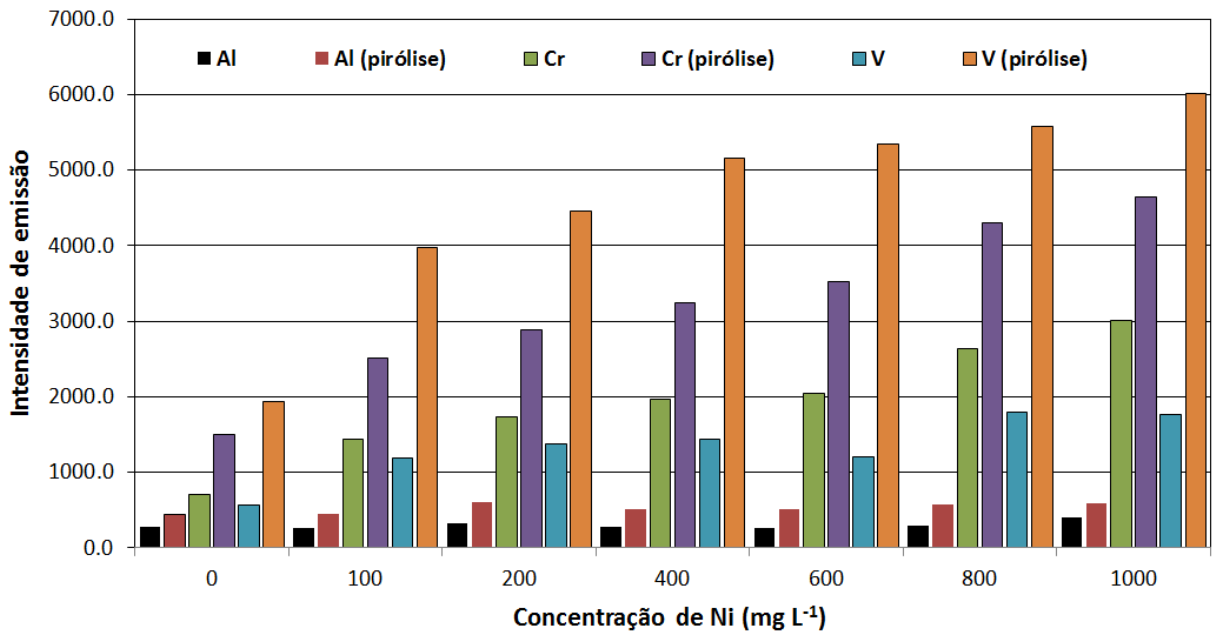


FIGURA 4.10 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Ni sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.

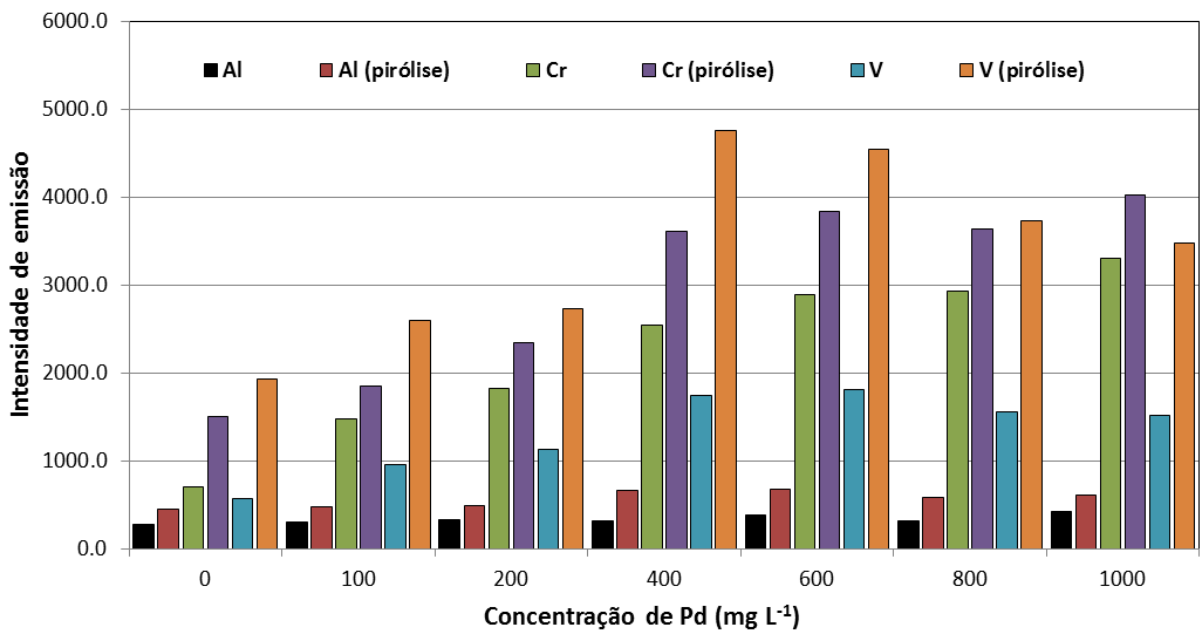
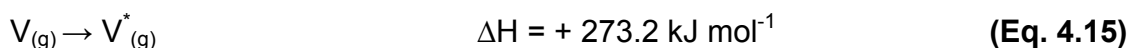
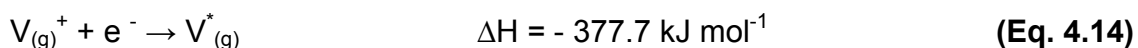
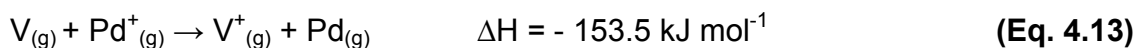
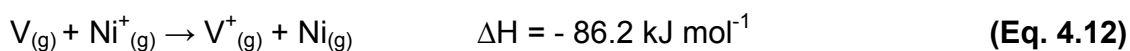
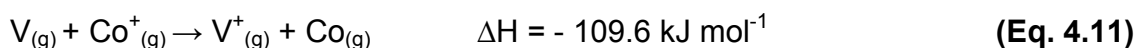


FIGURA 4.11 – Influência da pirólise e de diferentes concentrações do modificador Pd sobre os sinais de emissão para 0,2 µg de Al, Cr e V por WC AES.

Em todos os casos avaliados para Cr e V, verifica-se que tanto o emprego da pirólise quanto o aumento da concentração dos modificadores causou um aumento na intensidade de emissão, sendo observado também um efeito sinérgico quando as duas estratégias são utilizadas para aumento de sensibilidade. SILVA *et al.*¹⁰⁶ propuseram um mecanismo para o processo de atomização e excitação de Cr na presença de modificador Co. VIRGILIO *et al.*⁹⁵ descreveram os mesmos processos para V na presença de Co, Ni e Pd, segundo as equações 4.11 a 4.15:



As equações 4.11 a 4.13 representam os mecanismos de ionização para V utilizando modificadores químicos e as energias necessárias para a ionização do analito através de reações de transferência de carga com as formas iônicas dos modificadores Co, Ni e Pd. A equação 4.14 mostra o processo de recombinação eletrônica para formação do íon excitado. Verifica-se que o uso de modificadores proporciona um caminho de excitação mais favorável (Eq. 4.14, $\Delta H < 0$) do que o caminho clássico de excitação térmica por transferência de calor (Eq. 4.15, $\Delta H = + 273,2 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Para Al os ganhos de sinal são moderados quando utilizada a pirólise e praticamente inexistentes com a adição do modificador em qualquer faixa de concentração. A menor eficiência para Al pode ser explicada pela menor energia de ionização e maior disparidade de temperatura de ebulição com relação aos modificadores avaliados, podendo causar a excitação e vaporização precoces do analito. Foi observado que os modificadores Co e Ni em concentrações de 1000 mg L^{-1} foram os mais efetivos para o aumento de sensibilidade. A Figura 4.12 mostra os espectros de emissão obtidos para 1000 mg L^{-1} de Co e Ni na presença (4.12b e 4.12d) e ausência dos analitos Al, Cr e V (4.12a e 4.12c).

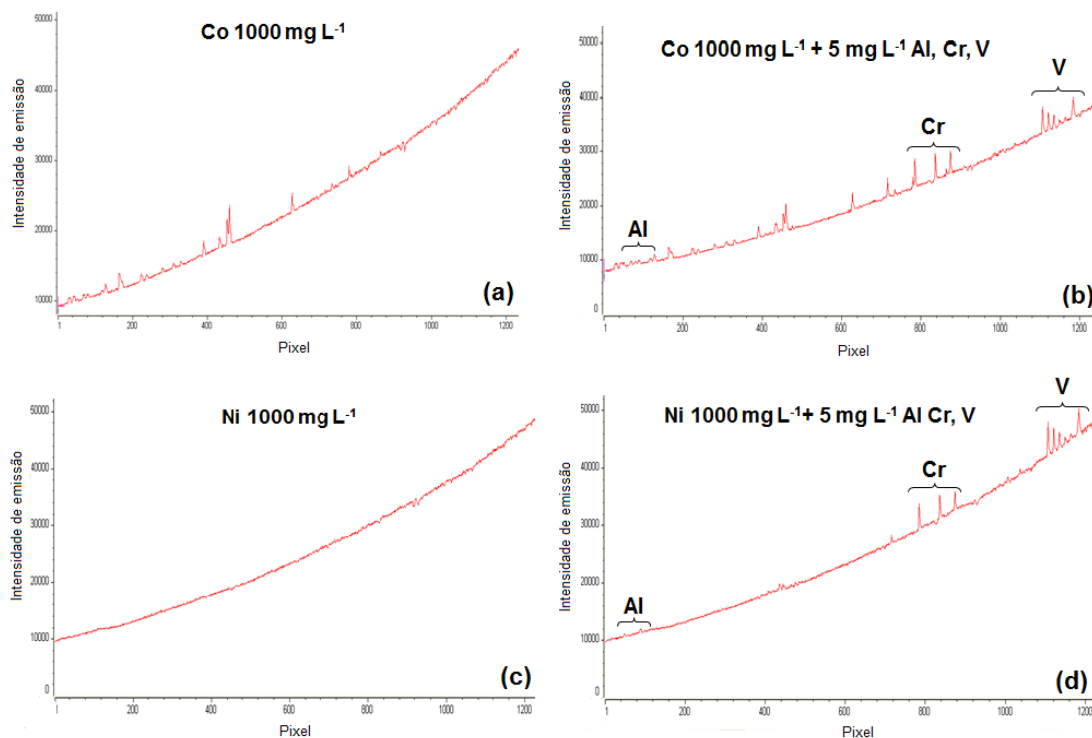


FIGURA 4.12 – Espectros obtidos na faixa espectral de 390 - 440 nm para 1000 mg L⁻¹ Co (a), 5 mg L⁻¹ de Al, Cr e V em meio 1000 mg L⁻¹ Co (b), 1000 mg L⁻¹ Ni (c) e 5 mg L⁻¹ de Al, Cr em meio 1000 mg L⁻¹ Ni (d) para WC AES.

Quando utilizado o modificador Co, verifica-se a presença de várias linhas de emissão de fundo e aumento do ruído (Figura 4.11a), principalmente na região espectral do Al, enquanto que para Ni nota-se um menor ruído e a ausência de sobreposições espectrais (Figura 4.11c). Em virtude do melhor desempenho analítico em termos de limites de detecção e repetibilidade, o modificador Ni foi escolhido para estudos mais detalhados.

4.4.3 Parâmetros de desempenho analítico e análise das amostras

Curvas analíticas no intervalo de 0,25 a 10,0 mg L⁻¹, na presença e ausência de 1000 mg L⁻¹ de Ni como modificador, foram obtidas para avaliação dos principais parâmetros de desempenho para Al, Cr e V por WC AES (Tabela 4.5).

TABELA 4.5 – Parâmetros de desempenho para Al, Cr e V na presença e ausência de 1000 mg L⁻¹ de Ni como modificador por WC AES: faixa linear de calibração (linearidade), sensibilidade, coeficiente de correlação linear (R), limite de detecção (LOD) e desvio padrão relativo médio (RSD).

Analito	Modificador	Linearidade (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (L mg ⁻¹)	R	LOD (mg L ⁻¹)	RSD (%)
Al	-	1-10	159	0,9912	1,0	8,6
	Ni	1-10	112	0,9977	0,7	8,4
Cr	-	1-10	284	0,9970	0,8	7,5
	Ni	0,25 - 2	2244	0,9959	0,1	5,7
V	-	0,5 - 5	721	0,9914	0,4	8,9
	Ni	0,25 -10	898	0,9993	0,1	6,4

Para Al, nota-se que o uso do modificador prejudicou a sensibilidade, porém, o mesmo efeito não foi observado para o limite de detecção que teve uma ligeira diminuição. Melhorias de sensibilidade de até 8x e de LOD até 4x foram verificadas para Cr na presença de Ni. Para V, apesar do ganho em sensibilidade não ter sido tão elevado como observado para Cr, o LOD calculado é 4x menor do que aquele observado na ausência do modificador. A melhoria da precisão das medidas com o uso de modificadores foi descrita por SILVA *et al.*¹⁰⁶ em trabalho anterior. Para Al, Cr e V, os valores de desvios padrão relativos foram ligeiramente menores na presença de Ni.

A exatidão para Al foi avaliada através de análise comparativa por ICP OES devido à alta concentração na amostra e conseqüente dificuldade em se realizar testes de adição e recuperação. Para Cr e V, foram adicionados 2 mg L⁻¹ dos analitos e verificou-se a recuperação para amostras de boldo, camomila, citrus, chá verde e menta digeridas em bloco digestor. Os resultados da Tabela 4.6 evidenciam que os resultados obtidos para WC AES e ICP OES são concordantes a um nível de 95% de confiança (teste t), exceto para a amostra de menta. Para Cr e V, recuperações entre 93 e 118% foram determinadas.

TABELA 4.6 – Concentrações determinadas (média \pm desvio padrão, n=3) para Al por WC AES e ICP OES (mg g^{-1}) e para Cr e V (mg L^{-1}) por WC AES após adição de 2 mg L^{-1} .

Amostra	Al (mg g^{-1})		Cr (mg L^{-1})		V (mg L^{-1})	
	WCAES	ICP OES	Determinado	%Rec	Determinado	%Rec
Boldo	$1,9 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,04$	$2,2 \pm 0,1$	111	$1,9 \pm 0,2$	95
Camomila	$0,43 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,2$	118	$1,86 \pm 0,07$	93
Citrus	$2,0 \pm 0,2$	$2,12 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,2$	104	$1,95 \pm 0,04$	97
Chá verde	$2,1 \pm 0,2$	$2,00 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,2$	106	$1,97 \pm 0,07$	98
Menta	$0,71 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,2$	114	$2,01 \pm 0,05$	101

O procedimento desenvolvido foi aplicado para a determinação de Al, Cr e V em amostras de plantas medicinais por WC AES (Tabela 4.7). As concentrações de Al variaram entre $0,43$ e $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ enquanto que Cr foi encontrado apenas na amostra de menta ($39 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e V apenas na amostra de boldo ($18 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). As determinações de Cr e V só foram possíveis para algumas amostras quando utilizado o modificador Ni. Considerando-se os limites estabelecidos pela ANVISA¹² ($25 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr e V), verifica-se que apenas a concentração de Cr na amostra de Menta excede os limites dispostos em legislação.

TABELA 4.7 – Concentrações determinadas (média \pm desvio padrão, n=3) para Al, Cr e V em plantas medicinais e seus respectivos limites de detecção para WC AES.

Amostra	Al (mg g^{-1})	Cr ($\text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$)	V ($\text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$)
Boldo	$1,9 \pm 0,2$	< 9	18 ± 4
Camomila	$0,43 \pm 0,02$	< 9	< 13
Citrus	$2,0 \pm 0,2$	< 9	< 13
Chá verde	$2,1 \pm 0,2$	< 9	< 13
Menta	$0,71 \pm 0,06$	39 ± 5	<13
LOD (sem modificador)	0,2	72	52
LOD (1000 mg L^{-1} Ni)	0,1	9	13

4.5 Conclusões parciais

Foi mostrado neste capítulo que o método voltamperométrico é simples, rápido e efetivo para o monitoramento das temperaturas do atomizador. O uso do programa de aquecimento baseado em temperaturas possibilita uma aplicação mais sistemática e universal do sistema de WC AES. O condicionamento dos filamentos é responsável por uma maior temperatura superficial e em fase gasosa do que filamentos novos. O emprego de filamentos condicionados aliado ao uso da etapa de pirólise possibilitaram obtenção de menores limites de detecção e melhor precisão. Juntamente com essas estratégias, o uso de modificadores fornece uma rota energética mais favorável e que pode gerar uma maior população de átomos no estado excitado, e conseqüentemente, aumento na sensibilidade. As concentrações determinadas se situaram entre 0,43 – 2,1 mg g⁻¹ Al, 39 µg g⁻¹ Cr e 0,07 – 18 µg g⁻¹ V. Verifica-se que o método de WC AES não apresenta sensibilidade suficiente para determinação de Cr e V em grande parte das amostras.

CAPÍTULO 5

Desenvolvimento e aplicação da análise por diluição de padrão para espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente para análise de plantas medicinais

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR DILUIÇÃO DE PADRÃO PARA ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE PARA ANÁLISE DE PLANTAS MEDICINAIS

5.1 Introdução e revisão bibliográfica

5.1.1 Métodos convencionais de calibração

A calibração é o procedimento analítico que visa o estabelecimento da correlação entre a medida da intensidade do sinal analítico (grandeza de saída) e a quantidade ou concentração de uma espécie química de interesse (grandeza de entrada).¹¹⁹

O método mais comumente empregado em análises químicas é o da calibração externa (EC). Nesse método, são preparadas múltiplas soluções analíticas (soluções de referência) com concentrações conhecidas e crescentes dos analitos, além do branco analítico, que é uma solução que com exceção dos analitos, possui a mesma composição das soluções padrão.⁵⁵ A partir dos dados experimentais obtidos pela leitura das soluções de referência, é construída uma curva analítica, correlacionando o sinal medido (eixo y) e a concentração do analito (eixo x), com a sensibilidade (m) sendo a inclinação da curva de ajuste. A simplicidade pode ser apontada como a principal vantagem desse método, visto que a concentração do analito presente na amostra pode ser determinada por extrapolação gráfica e regressão linear.¹²⁰ Apesar de robusta, a calibração externa é limitada na correção de efeitos de matriz visto que a composição de amostras complexas e soluções padrão são bastante diferentes. Além disso, a etapa de preparo das soluções é considerada lenta e laboriosa.

Uma maneira de superar os erros causados por efeitos de matriz é através do emprego do método de calibração por adições de padrão (SAM). Nesse método, um conjunto de soluções analíticas é preparado, onde a cada uma delas é adicionada uma alíquota constante da amostra a ser analisada e quantidades crescentes das soluções padrão. Esse procedimento garante que qualquer interferente presente na matriz afetará de forma similar as soluções padrão. A calibração por adição de analito possibilita a minimização ou eliminação de interferências matriciais, uma vez que ocorre

a compatibilização entre as amostras e as soluções de referência contendo alíquotas das mesmas.¹²¹ A concentração do analito pode ser determinada por extrapolação gráfica da curva sinal analítico vs. concentração de analito adicionada, quando a curva intercepta o eixo x (o sinal analítico é nulo) é igual ao módulo da concentração do analito na amostra.¹²¹ Devido às vantagens apontadas, esse método é empregado com frequência na análise de amostras relativamente complexas como ambientais, geológicas e biológicas. Por outro lado, devido à necessidade de construção de uma curva analítica para cada amostra a ser analisada, a frequência analítica é reduzida e o consumo de reagentes e a geração de resíduos são superiores aos do método convencional. É importante ressaltar que o método da adição de padrão para técnicas multielementares pode apresentar elevada frequência analítica e correções eficientes de efeitos de matriz quando associado a sistemas de injeção em fluxo, através da aplicação do método generalizado das adições de padrão (GSAM).¹²²

Mesmo com o atual estágio de desenvolvimento da espectrometria atômica, determinações empregando várias técnicas ainda são suscetíveis a alterações nas condições instrumentais. Os desvios instrumentais relacionados a interferências não espectrais podem gerar erros aleatórios e sistemáticos, influenciando assim na qualidade dos resultados.¹²³ Vários tipos de interferências não espectrais como alterações que afetem as condições do sistema de transporte/nebulização da amostra, parâmetros de operação do plasma e da interface são descritos na literatura.^{124,125}

Uma maneira simples e eficaz de corrigir esses tipos de interferências é através do emprego da padronização interna (IS).¹²⁶⁻¹³⁰ Esse método se baseia na adição de uma quantidade fixa e constante de um elemento denominado padrão interno a todas as soluções analíticas, brancos e amostras.¹²⁷ Os sinais dos analitos e do padrão interno devem ser registrados simultaneamente ou de maneira sequencial rápida.¹²⁶ A curva de calibração é construída utilizando-se a razão do sinal do analito pelo sinal do padrão interno (S_A / S_I), diferentemente das calibrações externa e por adição de padrão que consideram apenas o sinal do analito. Empregando-se essa estratégia é possível a melhoria significativa da precisão e exatidão, pois tanto o analito quanto o padrão interno podem ser igualmente afetados pelas interferências, fazendo com que eventuais flutuações de sinal sejam compensadas através do uso da razão entre os sinais.¹²⁸

Um elemento candidato a padrão interno deve atender alguns pré-requisitos importantes como: i-) possuir propriedades físico-químicas ou características semelhantes às do analito, ii-) estar ausente ou em concentração constante nas amostras, iii-) ser estável e solúvel nas soluções analíticas e amostras e iv-) não interferir na determinação do analito.¹²³ Considerando-se ainda fatores de homologicidade para técnicas de emissão como energias de excitação e de ionização próximas entre os analitos e padrão interno, a escolha de um padrão interno adequado deve ser estudada criteriosamente de modo a garantir que os comportamentos do analito e do padrão interno sejam semelhantes frente às diferentes variações a que são suscetíveis.

Além da calibração externa, a padronização interna pode ser combinada com o método de calibração por adição de padrão, ampliando assim a possibilidade de aplicação de correções para análises espectrométricas. Esse método possui como limitações o fato de requerer um maior tempo no preparo das soluções, utilizar maiores quantidades de reagentes e requerer avaliação e otimização prévia.

5.1.2 Calibração por adição de padrão interno e análise por adição de padrão

Um dos princípios básicos da padronização interna convencional é relacionado ao fato que o elemento encontre-se ausente ou presente em quantidade constante em todas as soluções. No entanto, uma nova estratégia denominada adição de padrão interno (ISA) possibilita a aplicação de forma simultânea da padronização interna e da calibração com adições de padrão. Nesse método, uma única solução combinada contendo os analitos e padrão interno é preparada e adicionada em alíquotas crescentes a volumes definidos da amostra. Nesse caso, a concentração do padrão interno é crescente e não mais constante. Se assumirmos uma relação linear entre a concentração e o sinal analítico do padrão interno (Equação 5.1), temos:

$$S_I = m_I C_I^{std} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

onde S_I é o sinal analítico do padrão interno, m_I a inclinação ou sensibilidade da curva e C_I^{std} a concentração do padrão interno presente na solução. O sinal do analito (S_A), é obtido pela soma do sinal proveniente da concentração prévia na amostra (S_A^{sam}) e do sinal devido a adição de padrão a partir da solução combinada (S_A^{std}), segundo a Equação 5.2:

$$S_A = S_A^{sam} + S_A^{std} = m_A (C_A^{sam} + C_A^{std}) \quad (\text{Eq. 5.2})$$

onde m_A é a sensibilidade da curva de calibração, C_A^{sam} a concentração do analito na amostra e C_A^{std} a concentração do analito na solução combinada (padrões interno e de calibração). Quando realizamos a correção por padronização interna, utilizamos a razão do sinal do analito pelo sinal do padrão interno, obtendo-se a Equação 5.3:

$$\frac{S_A}{S_I} = \frac{m_A(C_A^{std} + C_A^{sam})}{m_I C_I^{std}} = \frac{m_A}{m_I} \times \frac{C_A^{std}}{C_I^{std}} + \frac{m_A}{m_I} \times \frac{C_A^{sam}}{C_I^{std}} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

É importante ressaltar que a razão entre as concentrações (C_A^{std} / C_I^{std}) é conhecida e constante, visto que é proveniente da solução combinada contendo os analitos e o padrão interno. Considerando que ambos têm comportamentos semelhantes, a razão entre as sensibilidades (m_A / m_I) também deve ser constante. Ao construirmos uma curva com a razão dos sinais do analito e do padrão interno (S_A/S_I) no eixo y, e o inverso da concentração do padrão interno ($1/C_I^{std}$) no eixo x, o coeficiente linear da curva é termo que relaciona as razões das constantes e a sensibilidade é proporcional à concentração do analito na amostra (C_A^{sam}), como demonstrado na Equação 5.4:

$$\text{coeficiente linear} = \frac{m_A}{m_I} \times \frac{C_A^{std}}{C_I^{std}} \quad \text{inclinação} = \frac{m_A}{m_I} \times C_A^{sam} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Rearranjando-se a Equação 5.4, a concentração do analito na amostra (C_A^{sam}) pode ser determinada a partir da multiplicação entre as razões dos parâmetros

da curva (inclinação e coeficiente linear) e as concentrações de analito e padrão interno, como demonstrado na Equação 5.5:

$$C_A^{sam} = \frac{\text{inclinação}}{\text{coef.linear}} \times \frac{C_A^{std}}{C_I^{std}} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Essa nova estratégia de calibração apresenta algumas vantagens como: i-) correção eficiente de efeitos de matriz, efeitos de transporte e flutuações, ii-) a concentração do analito na amostra é obtida a partir de maneira mais exata utilizando-se os parâmetros da curva e não o método de interpolação gráfica, iii-) o coeficiente linear é obtido em altas concentrações de padrão interno fazendo com que os sinais analíticos sejam elevados, fáceis de medir e com menor desvio e iv-) o preparo das soluções é facilitado pois são originários de uma mesma solução estoque contendo os padrões analítico e interno. Apesar das vantagens, o tempo despendido no preparo das soluções ainda é tão elevado quanto a adição de padrão convencional, pois requer a preparação de uma curva de calibração para cada amostra.

Com o objetivo de agregar as vantagens da calibração por adições de padrão para superar efeitos de matriz e da padronização interna para corrigir flutuações de sinal analítico em um método simples e com elevada frequência analítica, foi proposta a análise por diluição de padrão (SDA). O método de SDA é rápido, não requer quaisquer modificações instrumentais ou estratégias analíticas adicionais e pode ser aplicado a qualquer técnica analítica multielementar que empregue um sistema de introdução de amostras contínuo.

Em SDA, são preparadas apenas 2 soluções: solução A, contendo padrões analíticos e amostra na proporção 1:1 ($v \ v^{-1}$), e solução B contendo branco e amostra na mesma proporção ($1:1 \ v \ v^{-1}$). Ao introduzirmos uma solução, é feito o monitoramento do sinal analítico com relação ao tempo (modo de leitura TRA), obtendo-se um gráfico como mostrado na Figura 5.1. Quando a solução A é nebulizada, os sinais transientes para os analitos e padrão interno tendem a se elevar até alcançarem uma região de patamar, onde permanecem até aproximadamente 60 s após a introdução da solução, dependendo da taxa de aspiração. Quando a solução B é misturada à solução A, ocorre o decaimento gradual do sinal analítico (que perdura por

aproximadamente 20 s) devido à diluição dos padrões. Após a queda, há a formação de uma segunda região de patamar, essa, em menor intensidade de sinal, decorrente da mistura entre as soluções A e B e que permanece por cerca de 40 s ou mais. Na etapa final, o tubo de aspiração conectado ao nebulizador é removido da solução e introduzido em solução adequada para limpeza do sistema e introdução da amostra seguinte.

É importante enfatizar que no decorrer do experimento a quantidade de amostra permanece constante, pois as soluções A e B contêm sempre 50% da mesma, proporcionando assim a compatibilização de matriz. A concentração do padrão interno em cada ponto, assumindo-se uma relação linear entre sinal analítico e concentração, é calculada de maneira proporcional para cada intervalo de tempo, sendo a concentração inicial dada pela maior intensidade de sinal obtida na região de patamar para amostra + padrões (Figura 5.1). A região de gradiente contém dezenas de pontos que podem ser utilizados na plotagem das curvas de calibração por SDA.

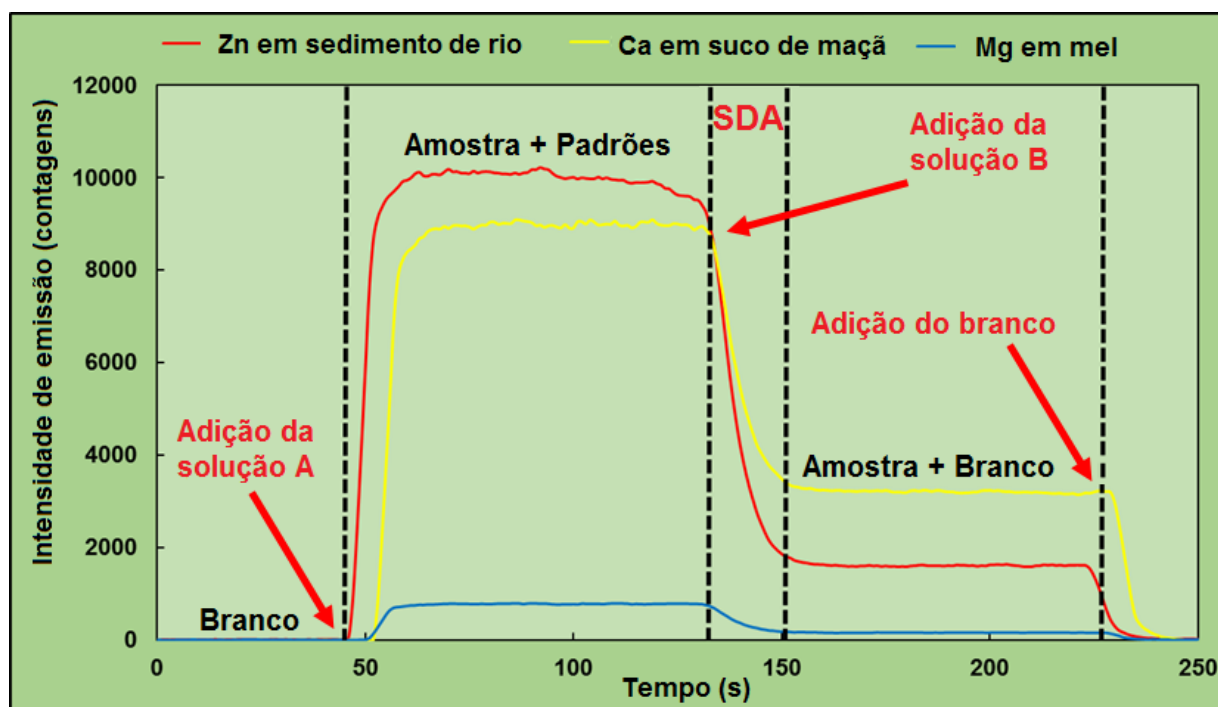


FIGURA 5.1 – Exemplo de obtenção dos sinais analíticos pelo método da SDA. Adaptado de VIRGILIO *et al.*¹³¹

Além de possibilitar a combinação entre calibração por adição de padrão e padronização interna, esse método possui outras vantagens como: i-) mínima manipulação das soluções e utilização de sistema fechado de introdução de amostra (redução da possibilidade de perdas e contaminação), ii-) não requer o preparo de múltiplas soluções padrão, iii-) consumo de pequenos volumes de amostra e reagentes, iv-) menor geração de resíduos, v-) elevada frequência analítica e vi-) aplicabilidade em análises de rotina. A aplicabilidade da SDA a amostras de elevado grau de complexidade pode ser considerada promissora, no que se refere à correções de interferências de transporte e de matriz na análise amostras orgânicas, biológicas e ambientais com boa precisão e exatidão.

5.1.3 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) é um método analítico multielementar amplamente empregado em análises de rotina para a determinação de elementos traço em uma gama de amostras.¹³² Essa técnica se baseia na introdução de uma amostra (comumente no estado líquido) em um plasma altamente energético, que promove a conversão das espécies presentes na amostra em átomos e íons excitados.¹³³ Quando as espécies excitadas retornam ao estado fundamental, emitem radiação em níveis de energia característicos para cada elemento. Os fótons emitidos alcançam o detector e sua quantidade é diretamente proporcional às concentrações dos analitos.

Por alcançar altas temperaturas (de aproximadamente 8.000 K) para atomização, excitação e ionização até mesmo de elementos refratários, a técnica de ICP OES possibilita a determinação simultânea de até 70 elementos em ampla faixa de trabalho (geralmente entre mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). Essa técnica apresenta como características a baixa suscetibilidade a interferências de matriz, boa sensibilidade, precisão e exatidão.¹³⁴

A posição da tocha no instrumento com relação ao detector pode ser disposta em duas configurações diferentes: axial ou radial. O modo de visão axial apresenta maior sensibilidade devido a visualização do canal central do plasma, ao

passo que o modo de visão radial é menos suscetível a emissão de fundo e efeitos de matriz. A escolha da posição mais adequada depende geralmente da matriz e dos elementos a serem analisados, bem como da faixa de concentração do analito a ser determinado.¹³⁵

Embora altamente versátil, ICP OES ainda é susceptível a interferências que podem ser classificadas em três tipos: i-) espectrais devido a sobreposições de linhas de emissão e elevado sinal de fundo contínuo ii-) interferências físicas e de transporte e iii-) interferências de matriz. Enquanto as primeiras são facilmente superadas pela simples seleção de comprimentos de onda alternativos ou uso de espectrômetros de alta resolução, as interferências físicas e matriciais requerem um maior empenho do analista. A presença da matriz pode prejudicar o processo de nebulização da amostra, principalmente quando essas apresentam densidade, viscosidade ou tensão superficial diferentes das soluções padrão. A influência da matriz pode ainda alterar o desempenho do plasma, através da introdução de amostras com elevadas acidez, carga orgânica ou concentração de elementos facilmente ionizáveis.¹³⁶ Como discutido nas seções anteriores, as interferências matriciais podem ser compensadas usando-se calibração por adição de padrão e o uso da padronização interna pode auxiliar na correção de flutuações devido a alterações operacionais. O método de SDA apresenta grande potencial na correção dos principais tipos de interferência encontrados em ICP OES.

5.2 Objetivos específicos

Esta etapa tem como principais objetivos o desenvolvimento e aplicação de um novo método de calibração, denominado análise por diluição de padrão, para correção de eventuais interferências não espectrais na determinação da composição elementar de plantas medicinais por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).

5.3 Parte Experimental

Um ICP OES Prodigy High Dispersion (Teledyne Leeman Labs, EUA) foi utilizado em todos os experimentos. Os sinais analíticos para Al I (308,215 nm), Ca II (317,933 nm), Fe II (239,563 nm), Mg II (279,078 nm), Mn II (257,610 nm), Zn I (213,856 nm) e Y I (371,030 nm), foram obtidos no modo de análise resolvida temporalmente (TRA) com tempo de integração de 1 s. Para otimização das condições de operação do plasma, utilizou-se uma solução de Mg a 5 mg L^{-1} e avaliou-se o método das razões de Mg II (280,271 nm) e Mg I (285,213 nm) descrito por MERMET.¹³⁷

Para preparo das soluções analíticas foram utilizadas soluções padrão estoque monoelementares 1000 mg L^{-1} de Al, Ca, Fe, Mg, Mn, Zn e Y (High Purity Standards, EUA) diluídas em água destilada-deionizada Milli-Q (Millipore, EUA). Todas as soluções analíticas foram preparadas em meio 1% ($v v^{-1}$) HNO_3 (Fisher Scientific, Canadá). Para digestão das amostras, HNO_3 e HCl padrão espectroscópico concentrados (Fisher Scientific) e 30% $v v^{-1}$ H_2O_2 (GFS Chemicals, EUA) foram utilizados. As soluções para o método SDA foram preparadas como se segue: Solução A (Amostra + Padrões) – 10 mL da amostra (diluída 1:20) + 10 mL de uma solução padrão (10 mg L^{-1} Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn + 5 mg L^{-1} Y); Solução B (Amostra + Branco) – 10 mL da amostra (diluída 1:20) + 10 mL de água destilada-deionizada. Para os métodos de calibração convencionais, soluções padrão entre 0,1 e 100 mg L^{-1} dos analitos e 5 mg L^{-1} Y (padrão interno), foram preparadas por diluições apropriadas das soluções estoque.

Para o estabelecimento e comparação da SDA com outros métodos de calibração, foram analisados os CRMs de água poluída (WPS-1, VHG Labs, EUA) e sedimento de rio (RSA, High Purity Standards, EUA), ambos com diluições entre 10 e 250 x, dependendo da concentração dos analitos. Os CRMs de folhas de tomateiro (SRM 1573a), folhas de pessegueiro SRM 1547) e farinha de arroz (SRM 1568a) foram utilizados para verificar a exatidão do método de DAS para aplicação a plantas medicinais. Cinco amostras de plantas medicinais Boldo (*Peumus boldus*), Camomila (*Chamomilla recutita*), Citrus (*Citrus ichangensis*), Chá Verde (*Camellia sinensis*) e Menta (*Mentha piperita*) foram adquiridos na forma de envelopes de chá em um

mercado local de Winston-Salem, NC (EUA). As amostras utilizadas neste capítulo e o procedimento de preparo das amostras foram os mesmos descritos no Capítulo 4, Seção 4.3.3. Os digeridos das amostras foram diluídos 20 vezes.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Otimização das condições operacionais do plasma

A avaliação da robustez do plasma através da razão entre as linhas iônica e atômica de Mg^{137} foi realizada em modo univariado. As condições padrão e faixas de estudo avaliadas para parâmetros de operação do plasma como potência da rádio-frequência e pressão do gás de nebulização e vazão de introdução da amostra são mostradas na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 – Condições operacionais padrão e avaliadas em otimizações para ICP OES.

Parâmetro	Condição operacional padrão	Faixa de estudo avaliada
Potência de RF (kW)	1,3	0,8 – 1,3
Pressão do gás de nebulização (psi)	30	15 - 40
Vazão da amostra ($mL\ min^{-1}$)	0,6	0,5 – 1,0

As Figuras 5.2 a 5.4 mostram os resultados obtidos para avaliação da potência do gerador de radiofrequência (Figura 5.2), pressão do gás de nebulização (Figura 5.3), vazão de introdução da amostra (Figura 5.4) e tempo de integração (Figura 5.5). De acordo com DENNAUD *et al.*¹³⁸, condições robustas do plasma são obtidas para Mg II / Mg I superiores a 8. Observando-se as Figuras 5.2-5.5, verifica-se que esse requisito é atendido para potências superiores a 1,1 kW e pressões de nebulização entre 20 e 30 psi (Figuras 5.2 e 5.3).

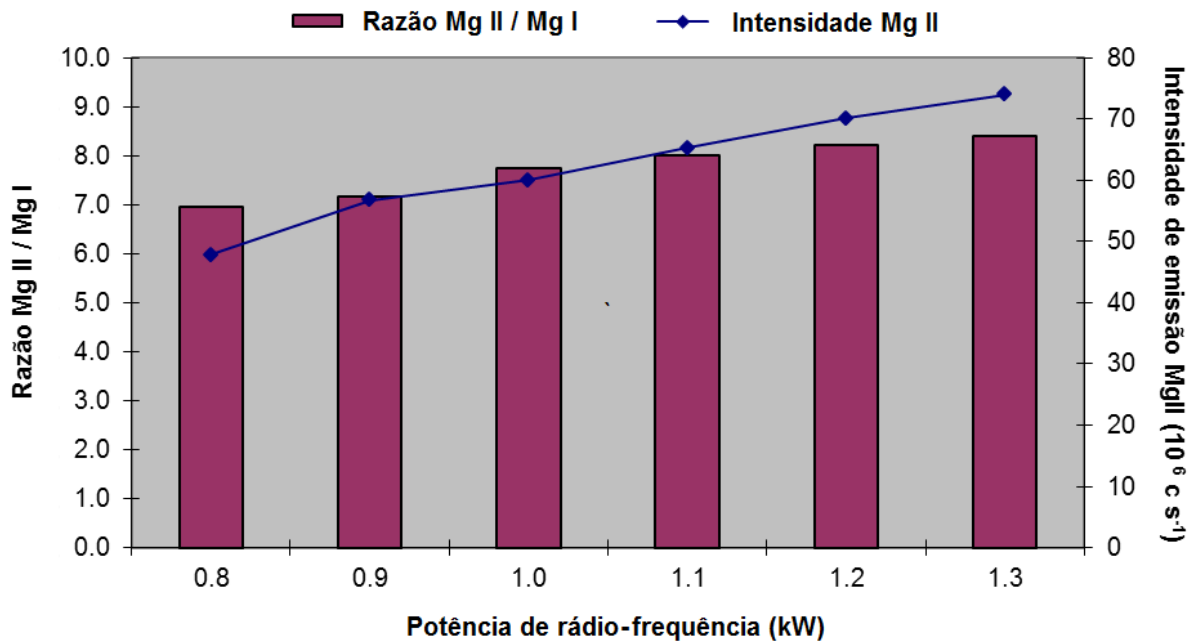


FIGURA 5.2 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da potência de radiofrequência aplicada.

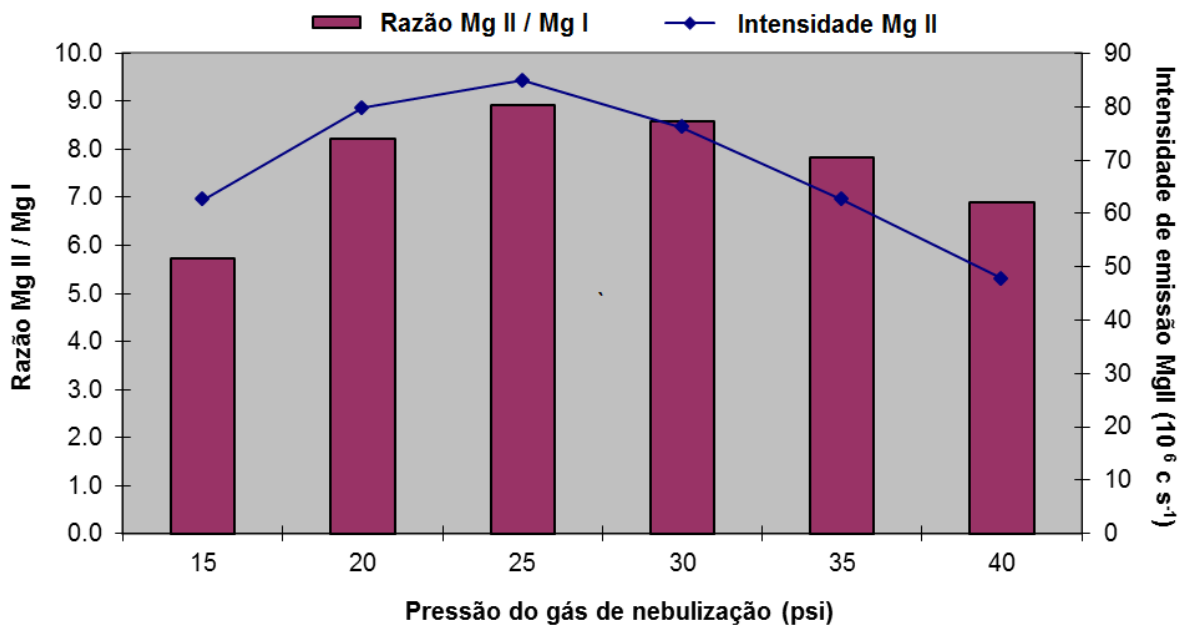


FIGURA 5.3 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da pressão do gás de nebulização.

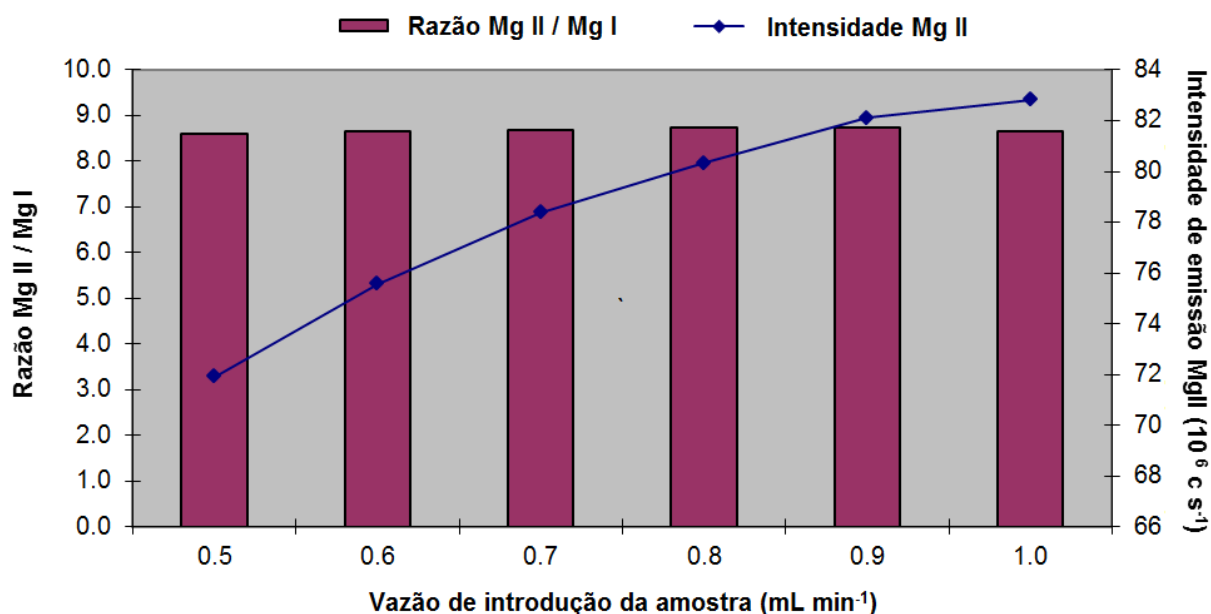


FIGURA 5.4 – Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da vazão de introdução da amostra.

O parâmetro vazão da amostra exerceu pouco efeito sobre as razões de Mg, sendo portanto maiores do que 8 para todos os casos (Figuras 5.4). Considerando-se os resultados para robustez do plasma e sensibilidade em termos de intensidade de sinal analítico, as condições operacionais otimizadas e utilizadas durante este trabalho são descritas na Tabela 5.2. É importante ressaltar que o modo de visão axial é mais susceptível a efeitos de matriz do que o modo radial. O elemento Y foi adotado como padrão interno por atender aos requisitos de homogenicidade discutidos na seção de introdução.

TABELA 5.2 – Condições de operação instrumental do ICP OES para determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em plantas medicinais.

Parâmetro	Condição de operação
Potência de RF (kW)	1,3
Pressão do gás de nebulização (psi)	25
Vazão de introdução da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	18
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0
Tempo de integração (s)	30 (modo convencional) e 1 (modo TRA)
Orientação da tocha	axial
Câmara de nebulização	Scott double-pass
Tipo de nebulizador	Concêntrico
Comprimentos de onda (nm)	Al - 308,215 (I), Ca - 317,933 (II), Fe - 239,563 (II), Mg 279,078 (II), Mn - 257,610 (II), Zn - 213,856 (I), Y - 371,030 (I)

5.4.2 Avaliação da análise por diluição de padrão para determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em plantas medicinais

O desempenho da SDA foi comparado com outros métodos de calibração como calibração externa convencional sem (EC) e com padrão interno (EC + IS) e adição de padrão sem (SAM) e com padrão interno (SAM + IS), para a determinação de Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn nos CRMs de água poluída (Tabela 5.3) e sedimento de rio (Tabela 5.4). Pode-se observar que, de uma maneira geral, SDA gerou recuperações melhores ou equivalentes do que quando comparados aos outros métodos de calibração.

TABELA 5.3 – Percentuais de recuperação (n=3) para Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em água poluída (WPS-1) utilizando calibração externa (EC), calibração externa e padronização interna (EC + IS), adição de padrão (SAM), adição de padrão e padronização interna (SAM + IS) e análise por diluição de padrão (SDA) para ICP OES.

Analito	EC	EC + IS	SAM	SAM + IS	SDA
Al	91	88	85	85	102
Fe	104	99	89	90	96
Mn	90	95	94	96	88
Zn	72	91	74	92	89

Valores certificados: 500 mg L⁻¹ Al, 100 mg L⁻¹ Fe, Mn e Zn. Diluição utilizada: 100x.

TABELA 5.4 – Percentuais de recuperação (n=3) para Al, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em sedimento de rio (RSA) utilizando calibração externa (EC), calibração externa e padronização interna (EC + IS), adição de padrão (SAM), adição de padrão e padronização interna (SAM + IS) e análise por diluição de padrão (SDA) para ICP OES.

Analito	EC	EC + IS	SAM	SAM + IS	SDA
Al	87	85	82	83	100
Ca	127	94	126	105	103
Mg	100	98	99	100	107
Fe	101	99	97	98	112
Mn	82	88	88	93	93
Zn	74	96	75	97	100

Valores certificados: 250 mg L⁻¹ Al, 300 mg L⁻¹ Ca, 70 mg L⁻¹ Mg, 1200 mg L⁻¹ Fe, 8 mg L⁻¹ Mn e 15 mg L⁻¹ Zn . Diluições utilizadas: 10x (Mg, Mn e Zn) e 250x (Al, Ca e Fe).

O método de SDA apresentou recuperações entre 88 e 112 % para os dois materiais certificados avaliados. Apesar da melhor exatidão para SDA, os métodos de calibração convencionais também apresentaram recuperações adequadas em alguns casos. Pode-se afirmar que, para as amostras analisadas, não foram verificadas interferências matriz ou de transporte tão pronunciadas. A avaliação de amostras mais

complexas poderia explicitar o efeito das interferências e sua efetiva correção de interferências pelo método proposto. É importante ressaltar que o método do SDA não altera significativamente alguns parâmetros de desempenho como LOD e sensibilidade.

Os limites de detecção foram calculados utilizando os conceitos de BEC e SBR¹³⁹, e foram de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Al), 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Ca), 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Mg), 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fe), 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Mn) e 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Zn). Para verificar a exatidão, o procedimento por SDA foi aplicado na análise de 3 CRMs (Tabela 5.5). Boas recuperações foram observadas e as concentrações determinadas não apresentam diferenças significativas a um nível de confiança de 95% (teste t) com os valores certificados ou de referência, exceto para Fe (Tomato Leaves) e Mn (Peach Leaves).

TABELA 5.5 – Concentrações determinadas (média \pm desvio padrão, n=3) para Al, Fe, Mn, Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$), Ca e Mg (mg g^{-1}) em materiais de referência certificados por SDA ICP OES.

Analito	SRM 1573a		SRM 1547		SRM 1568a	
	Valor certificado	Valor determinado	Valor certificado	Valor determinado	Valor certificado	Valor determinado
Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	598 \pm 121	660 \pm 50	249 \pm 8	230 \pm 8	4,4 \pm 1,0	< 2
Ca (mg g^{-1})	50,5 \pm 0,9	44,4 \pm 0,8	15,6 \pm 0,2	18,1 \pm 0,5	0,12 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Mg (mg g^{-1})	12*	14,2 \pm 0,5	4,3 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	0,56 \pm 0,02	0,69 \pm 0,09
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	368 \pm 7	432 \pm 6	220*	219 \pm 1	7,4 \pm 0,9	7,6 \pm 0,4
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	246 \pm 8	220 \pm 5	98 \pm 3	80 \pm 2	20,0 \pm 1,6	22 \pm 1
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	30,9 \pm 0,7	34 \pm 3	17,9 \pm 0,4	18,7 \pm 0,1	19,4 \pm 0,5	20,3 \pm 0,6

CRMs: Folhas de tomateiro (SRM 1573a), Folhas de pessegueiro (SRM 1547) e Farinha de arroz (SRM 1568a)

A análise por diluição de padrão foi aplicada também na análise de 5 amostras de plantas medicinais (Tabela 5.6). Foram encontrados concentrações de Al entre 0,37 - 2,2 mg g⁻¹, Ca entre 8,0 - 22,7 mg g⁻¹, Mg entre 2,63 - 10,4 mg g⁻¹, Fe entre 0,41 - 1,49 mg g⁻¹ e Mn entre 1,68 - 2,3 mg g⁻¹. As concentrações de Zn ficaram abaixo do limite de detecção do método (0,1 µg g⁻¹).

TABELA 5.6 – Concentrações determinadas (média ± desvio padrão, n=3) para Al, Ca, Mg, Fe, Mn e Zn (mg g⁻¹) em amostras de plantas medicinais por SDA ICP OES.

Amostra	Al (mg g ⁻¹)	Ca (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	Fe (mg g ⁻¹)	Mn (mg g ⁻¹)	Zn (mg g ⁻¹)
Boldo	1,9 ± 0,1	8,0 ± 0,4	2,8 ± 0,1	1,49 ± 0,08	1,69 ± 0,09	<0,0001
Camomila	0,45 ± 0,06	10,3 ± 0,8	4,1 ± 0,2	1,06 ± 0,06	<0,0001	<0,0001
Citrus	2,18 ± 0,03	8,4 ± 0,1	2,63 ± 0,05	0,73 ± 0,02	1,68 ± 0,04	<0,0001
Chá verde	2,2 ± 0,1	9,7 ± 0,3	3,20 ± 0,06	0,41 ± 0,01	2,3 ± 0,1	<0,0001
Menta	0,37 ± 0,01	22,7 ± 1,1	10,4 ± 0,2	0,62 ± 0,01	<0,0001	<0,0001

5.5 Conclusões parciais

Neste capítulo, foi mostrado que a análise por diluição de padrão (SDA) é uma alternativa nova e que pode atuar na correção de eventuais não espectrais para ICP OES em amostras complexas. A SDA combina de maneira prática as vantagens da calibração por adição de padrão e da padronização interna, além de apresentar elevada frequência analítica e possibilidade de aplicação em análises de rotina. As concentrações determinadas se situaram entre 0,37 - 2,2 mg g⁻¹ Al, 8,0 - 22,7 mg g⁻¹ Ca, 2,63 - 10,4 mg g⁻¹ Mg, 0,41 - 1,49 mg g⁻¹ Fe, 1,68 - 2,3 mg g⁻¹ Mn e 1,68 - 2,3 mg g⁻¹ Mn e menores que 0,0001 mg g⁻¹ Zn.

CAPÍTULO 6

Avaliação da espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração de triplo quadrupolo (ICP-MS/MS) para análise de medicamentos fitoterápicos

AVALIAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE E CONFIGURAÇÃO DE TRIPLO QUADRUPOLO (ICP-MS/MS) PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

6.1 Introdução e revisão bibliográfica

6.1.1 Fundamentos, instrumentação e correção de interferências para ICP-MS

A espectrometria de massas acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS) é atualmente uma das técnicas analíticas mais importantes para determinação de elementos em níveis traço e ultra-traço ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}).¹⁴⁰ Com caráter multielementar e capacidade para análises isotópicas, a técnica de ICP-MS é caracterizada pela alta sensibilidade, amplo intervalo de trabalho, obtenção de espectros mais simples e com menor sinal de fundo e elevada frequência analítica.¹⁴¹ A Figura 6.1 mostra um diagrama esquemático de um instrumento de ICP-QMS.¹⁴²

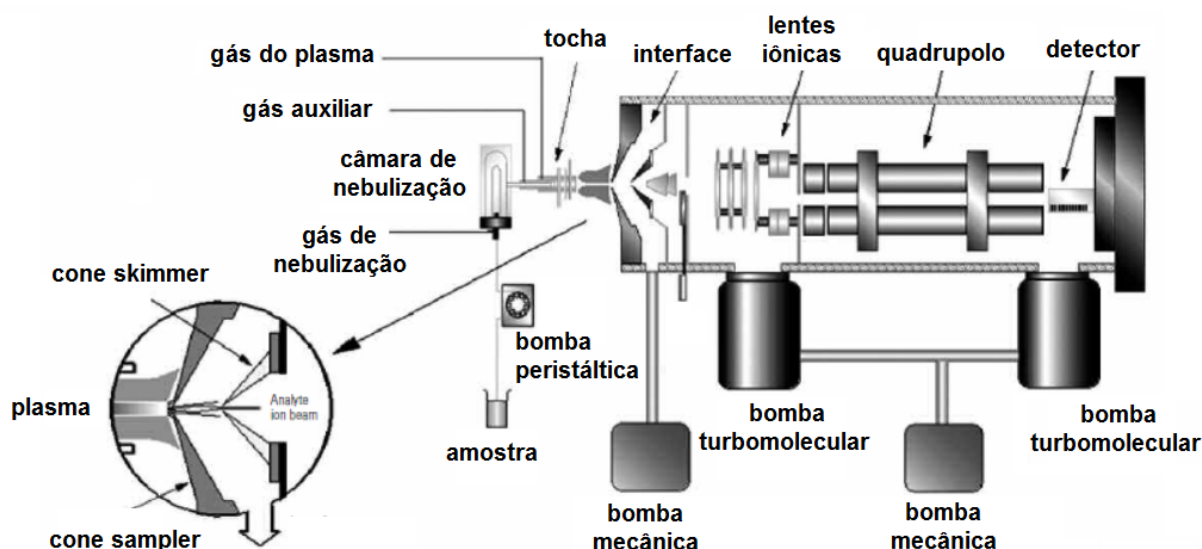


FIGURA 6.1 – Representação esquemática de um instrumento de ICP-QMS. Adaptado de: Agilent Technologies¹⁴². Cedida gentilmente por Agilent Technologies.

Dentre as fontes de plasma utilizadas em análises instrumentais, destaca-se o plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP), composto de uma tocha, um gerador de corrente de radiofrequência e uma espira de cobre. A tocha de quartzo constituída por 3 tubos concêntricos é posicionada concêntrica com uma espira

de cobre por onde passa uma corrente alternada de elevada frequência (27,12 ou 40,68 MHz). Quando uma potência de radiofrequência (tipicamente 750 - 1500 W) é aplicada, a oscilação da corrente elétrica alternada na espira de cobre gera um intenso campo magnético sobre o gás do plasma (geralmente Ar), que flui a uma vazão de 12 - 17 L min⁻¹ entre os tubos externo e intermediário. Uma descarga elétrica gera elétrons livres que são acelerados através do campo magnético e colidem com os átomos de Ar gasoso, ionizando-os e gerando-se assim o plasma.¹⁴¹

As amostras são comumente introduzidas na forma de solução com o auxílio de um sistema pneumático, onde há a geração de um aerossol por um nebulizador e a seleção de gotas de menor diâmetro em uma câmara de nebulização. O aerossol produzido é conduzido ao plasma que possui energia (ca. 15,8 eV) e temperaturas (ca. 7500 K) suficientemente elevadas para submeter os constituintes da amostra a diversos processos físicos como dissolução, vaporização, atomização, excitação e ionização.¹⁴²

Os íons gerados são direcionados à região de interface que tem a função de direcionar o feixe iônico da região do plasma (pressão atmosférica) até o analisador de massas (10⁻⁵ - 10⁻⁶ torr). A interface é composta geralmente por dois cones metálicos com pequenos orifícios na extremidade, que são refrigerados e mantidos sob vácuo de baixa intensidade (1 - 2 torr) com o auxílio de bomba mecânica. O feixe iônico proveniente do plasma intercepta os cones de amostragem (diâmetro do orifício 0,8 - 1,2 mm) e "skimmer" (diâmetro do orifício 0,4 - 0,8 mm). Com a finalidade de reduzir a tendência de expansão do feixe, um sistema de focalização iônica é inserido após os cones.¹⁴¹ Esse sistema consiste de lentes eletrostáticas que são polarizadas negativamente e possibilitam a remoção de fótons e espécies neutras, além de guiar os íons positivos até o analisador de massas.¹⁴³

Em ICP-MS, a separação de massas pode ser alcançada através do emprego de diferentes mecanismos e tecnologias como por tempo de voo (TOF ICP-MS), com dupla focalização e setor magnético (SF ICP-MS) e quadrupolo (ICP-QMS), sendo o último o mais empregado em espectrômetros devido à simplicidade e menor custo. O quadrupolo é composto por quatro hastes metálicas em formato cilíndrico dispostas de maneira quadrangular e opera através da utilização de correntes diretas (DC) e alternadas (AC). A aplicação de um potencial com AC/DC definidos a um par de

barras do quadrupolo, produz uma trajetória estável apenas a íons com uma razão massa/carga (m/z) pré-estabelecida, sendo os outros íons ejetados do quadrupolo. Os íons separados no quadrupolo chegam ao detector onde são amplificados através de colisões com dinodos e geram o sinal analítico registrado em computador.¹⁴⁴

Apesar das vantagens apontadas, a técnica de ICP-MS com quadrupolo apresenta baixa resolução (ca. 400), sendo assim suscetível a alguns tipos de interferências espectrais. As interferências isobáricas e poliatômicas ocorrem devido à sobreposição de elementos ou espécies moleculares com massas similares ao analito. Elementos que formam espécies de dupla carga também podem causar sobreposições espectrais em elementos que apresentem metade de sua massa, visto que o quadrupolo processa a separação em virtude da razão m/z dos analitos. A Tabela 1 mostra alguns exemplos de interferências espectrais comumente encontradas em análises por ICP-MS.¹⁴⁵

TABELA 6.1 – Exemplos de interferências espectrais em ICP-MS.¹⁴⁵

Interferência	m/z	Analito	Abundância (%)	Interferente
Sobreposição isobárica	40	$^{40}\text{Ca}^+$	96,9	$^{40}\text{Ar}^+$
	50	$^{50}\text{Ti}^+$	5,4	$^{50}\text{Cr}^+$, $^{50}\text{V}^+$
Espécies poliatômicas	75	$^{75}\text{As}^+$	100	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
	80	$^{80}\text{Se}^+$	49,6	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
Espécies de dupla carga	69	$^{69}\text{Ga}^+$	60,1	$^{138}\text{Ba}^{2+}$
	70	$^{70}\text{Ge}^+$	21,2	$^{140}\text{Ce}^{2+}$

Ao longo dos anos, vários dispositivos e estratégias vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de atenuar ou superar interferências espectrais em ICP-MS. A seleção de isótopos alternativos que sejam livres ou menos afetados por interferências é uma das maneiras mais simples de corrigi-las. Os isótopos ^{44}Ca e ^{78}Se com abundâncias de 2,086% e 23,78%, respectivamente, podem ser utilizados como alternativas aos isótopos ^{40}Ca e ^{80}Se , altamente afetados por interferências isobáricas e poliatômicas. Como desvantagens dessa estratégia aponta-se a perda de sensibilidade

devido ao uso de isótopos secundários e a inaplicabilidade a elementos monoisotópicos, tais como ^{59}Co e ^{75}As , por exemplo. Outra estratégia bem estabelecida é o emprego de correções matemáticas. Esse método baseia-se na medida da intensidade de uma espécie interferente em uma razão massa/carga correlata, geralmente livre de interferências. A correção matemática é aplicada considerando-se as intensidades de emissão para a espécie interferente no analito e no isótopo alternativo. Apesar de efetivo, esse método é limitado na correção de interferências poliatômicas mais severas e quando a concentração do interferente é significativamente superior àquela do analito.¹⁴¹

O emprego de condições de “plasma frio” vem sendo demonstrado na literatura desde a década de 1980 para correção de sobreposições poliatômicas mais severas, principalmente aquelas relacionadas com espécies de Ar geradas no plasma. A operação do plasma sob menores potências aplicadas (500 - 800 W) e vazões do gás de nebulização mais elevadas ($1,5 - 1,8 \text{ L min}^{-1}$) afeta diretamente o processo de ionização e formação de espécies interferentes. Interferências causadas por $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ sobre ^{56}Fe e $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ em $^{52}\text{Cr}^+$ podem ser minimizadas drasticamente usando-se condições de plasma frio.¹⁴⁶ Algumas limitações dessa estratégia, devido principalmente à menor temperatura alcançada pelo plasma, são a menor eficiência na decomposição de elementos da matriz, dificuldade na determinação de elementos com elevado potencial de ionização, perda de sensibilidade pela menor ionização dos analitos e reduzida aplicabilidade para análises multielementares.¹⁴¹

Com os avanços tecnológicos dos últimos anos e a necessidade de alternativas mais eficientes e aplicáveis universalmente para a correção de interferências espectrais, foram desenvolvidos dispositivos baseados em interfaces (CRI) e celas de reação e colisão¹⁴¹. Localizada entre as regiões da interface e do quadrupolo, a cela de reação e colisão (CRC) pode ser pressurizada com um gás colisional (geralmente He) que interage com o feixe iônico focalizado através de um multipolo. Em virtude de íons poliatômicos serem mais volumosos que os analitos, o número de colisões efetivas do gás com essas espécies são maiores, causando a diminuição de sua energia cinética. O uso de uma barreira energética possibilita a separação dos interferentes por discriminação de energia cinética (KED).¹⁴⁴ Caso gases reativos como H_2 , NH_3 ou O_2 sejam introduzidos na cela dinâmica de reação (DRC) ou

sistema octapolar de reação (ORS), as colisões em fase gasosa têm o efeito de promover reações com as espécies poliatômicas interferentes e dissociá-las, ou ainda, reagir com o analito e gerar como produto uma espécie a ser determinada em uma nova razão massa/carga, livre da interferência poliatômica original.¹⁴¹

6.1.2 ICP-MS/MS

A ineficiência na remoção de algumas interferências poliatômicas por processos colisionais e a baixa seletividade em processos reacionais, levaram ao desenvolvimento de um espectrômetro de massas com configuração MS/MS (tandem) para análises elementares. Utilizado até então em espectrometria de massas para moléculas orgânicas, o chamado “triplo quadrupolo” ou “ICPQQQ”, apresenta grande flexibilidade para correções de interferências.¹⁴¹ Apesar da denominação, o arranjo instrumental apresenta dois quadrupolos (Q1 e Q2) intercalados entre um octapolo ou sistema octapolar de reação (ORS), utilizado como cela de reação. O instrumento de ICP-MS/MS apresenta um primeiro quadrupolo (Q1), localizado após o sistema de focalização iônica, que atua como um filtro de massas que separa apenas razões m/z pré-selecionadas, excluindo-se assim as demais. Dessa forma, apenas os analitos e interferentes que causam sobreposições espectrais em m/z específicos chegam ao ORS, proporcionando o aumento na eficiência de remoção de interferências no modo colisional e o controle mais eficaz dos precursores e produtos no modo reacional.

A Figura 6.2 apresenta um exemplo comparativo das eficiências do ICP-QMS (6.2a) e do ICP-MS/MS (6.2b) na determinação de ^{80}Se (altamente afetado por interferências $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) através de reação com oxigênio.¹⁴⁷ No caso do ICP-QMS (Figura 6.2a), todos os íons provenientes do plasma chegam à cela de reação pressurizada com O_2 . Como o analito (^{80}Se) reage facilmente com o gás, é desejável selecionar no quadrupolo a razão m/z 96, relativa ao íons $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ formados. Dessa forma, interferências relativas ao dímero de $^{40}\text{Ar}^+$ e elementos com dupla carga como Gd^{2+} e Dy^{2+} são eliminados em $m/z = 80$. Porém, a possível presença de íons $^{96}\text{Zr}^+$, $^{96}\text{Mo}^+$ e $^{96}\text{Ru}^+$ na matriz pode interferir na determinação de Se^+ via SeO^+ na m/z 96. Quando o ICP-MS/MS é utilizado (Figura 6.2b), seleciona-se no primeiro quadrupolo (Q1) somente a razão m/z referente ao $^{80}\text{Se}^+$, excluindo-se as demais. No ORS, a

espécie de ^{80}Se é então convertida no óxido $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ e é transferida para o segundo quadrupolo (Q2) onde a razão $m/z = 96$ é selecionada. Nesse caso ($m/z = 96$), as espécies interferentes de Zr, Mo e Ru já foram removidas inicialmente em Q1, e as espécies interferentes em $m/z = 80$ serão eliminadas em Q2.

Determinação de ^{80}Se

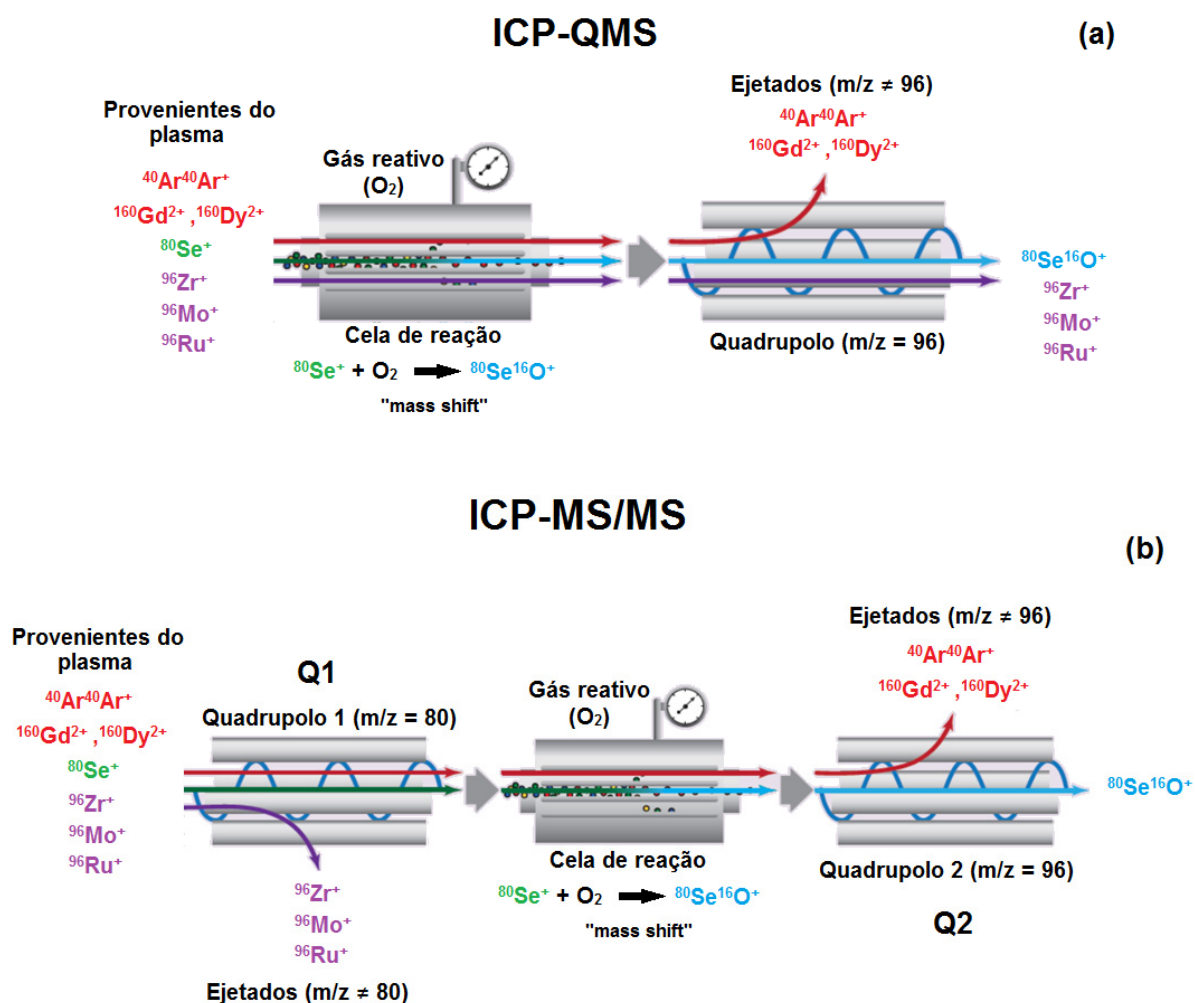


FIGURA 6.2 – Representação esquemática da remoção de interferências na determinação de ^{80}Se por ICP-QMS (a) e ICP-MS/MS (b) através de reação com oxigênio na cela. Adaptado de Agilent Technologies.¹⁴⁷ Cedido gentilmente por Agilent Technologies.

Além da maior seletividade e controle durante as reações no sistema ORS, o arranjo instrumental ICP-MS/MS apresenta diferentes modos operacionais de acordo com a demanda analítica.¹⁴¹ No modo MS, o primeiro quadrupolo (Q1) é desativado e atua apenas como um guia para o feixe iônico, possibilitando assim a operação do instrumento como um espectrômetro de ICP-QMS convencional. Na configuração tandem MS/MS, o instrumento pode operar no modo “*mass shift*” onde $Q2 = Q1 + m/z$ do gás reacional (múltiplos de 16 para O_2 ou de 17 para NH_3), como discutido anteriormente para a determinação de ^{80}Se via $^{80}Se^{16}O^+$. Nesse modo operacional, pode-se também realizar estudos com relação ao precursor ou produtos da reação.¹⁴⁷ No primeiro caso, é selecionado o produto da reação em Q2 e faz-se uma varredura de massas em Q1, a fim de verificar qual íon precursor gera o produto desejado de maneira mais eficiente. No segundo caso, seleciona-se em Q1 o precursor desejado e faz-se uma varredura de massas em Q2, com o intuito de estudar os produtos formados e suas intensidades.

Outra possibilidade em MS/MS se dá através do modo “*on mass*” onde Q1 e Q2 são ajustados para a mesma razão massa/carga.¹⁴⁷ Um exemplo dessa aplicação é na determinação de ^{112}Cd em matrizes com altas concentrações de ^{96}Mo , que geram no plasma $^{96}Mo^{16}O^+$. A determinação de Cd em $m/z = 112$ é prejudicada pela sobreposição do óxido de Mo, enquanto que sua determinação na forma de CdO^+ ($m/z = 128$) é dificultada pela baixa reatividade do Cd com O_2 e também pela formação do interferente $^{96}Mo^{16}O^{16}O^+$. Utilizando-se O_2 no ORS e selecionando-se $Q1 = Q2 = 112$, a espécie interferente $^{96}Mo^{16}O^+$ é convertida a $^{96}Mo^{16}O^{16}O^+$, possibilitando a determinação de Cd livre de interferência originadas pelo Mo. É importante ressaltar que apesar da perda de sensibilidade relativa ao uso de gases reativos no ORS, em muitos casos observam-se menores sinais de fundo e consequentes ganhos em poder de detecção.¹⁴⁸

Por ser um método analítico relativamente recente, há poucos trabalhos na literatura descrevendo o emprego de ICP-MS/MS para análises químicas inorgânicas. BALCAEN *et al.*¹⁴⁹ descreveram um procedimento para determinação de quantidades ultra-traço de Ti em sangue por ICP-MS/MS. Devido à baixa concentração do analito na matriz, os autores propuseram a utilização do isótopo 48, o mais abundante de Ti (73,72%), mas que apresenta sobreposição espectral com ^{48}Ca ,

presente em altas concentrações na matriz. Os autores estudaram o emprego de O_2 e NH_3 como gases reacionais e utilizaram o modo “*mass shift*” para seleção das espécies de interesse. Inicialmente, foram analisadas soluções de Ti na ausência e presença de Ca através de uma varredura com $Q1 = 48$ e em $Q2$ foram verificados os possíveis produtos reacionais formados. Essa análise mostrou que o uso de oxigênio na cela foi ineficaz na remoção das interferências de Ca, visto que em $m/z = 64$ o sinal analítico apresentava contribuição de $^{48}Ti^{16}O^+$ e $^{48}Ca^{16}O^+$. Para obter boa exatidão, os autores propuseram a determinação de Ti na forma de $^{48}Ti(NH_3)_6^+$ na $m/z = 150$, sendo a espécie hexa-coordenada de amônia livre da interferência oriunda do ^{48}Ca . O procedimento foi aplicado a amostras de sangue de portadores de implantes à base de Ti e amostras controle, e comparado com SF ICP-MS. O limite de detecção foi de 3 ng L^{-1} e os autores puderam concluir que as amostras de interesse apresentaram concentrações mais elevadas de Ti do que as amostras controle.

O grupo de VANHAECKE¹⁵⁰ estudou também a determinação de S em amostras de biodiesel por ICP-MS/MS utilizando diluição isotópica. A determinação de S por ICP-MS é desafiadora por apresentar severas interferências principalmente do dímero de $^{16}O_2^+$ sobre seu isótopo mais abundante ($^{32}S - 95,04\%$). Os autores avaliaram as condições padrão com 1 quadrupolo (MS, sem e com O_2 na ORS) e o modo com 2 quadrupolos (MS/MS, com deslocamento de massa utilizando O_2 na ORS). No modo MS, o uso de oxigênio no ORS foi fundamental para obtenção de curvas de calibração, até então indisponíveis no modo sem gás. Apesar disso, a exatidão pode ser comprometida visto que a presença na matriz de íons ^{48}Ca , ^{48}Ti e $^{12}C^{16}O^+$ em $m/z = 48$ causa sobreposição com espécies $^{32}S^{16}O^+$ formadas na cela. No modo MS/MS, foi selecionado em $Q1$ a $m/z = 32$, ejetando os íons interferentes em $m/z = 48$, mesma razão massa/carga selecionada em $Q2$ para determinação de enxofre via $^{32}S^{16}O^+$ com limite de detecção de $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

AMAIIS *et al.*¹⁴⁸ propuseram a mesma estratégia de deslocamento de massas através de reação com oxigênio para determinação de S, Si e P em biodiesel, diesel e óleo lubrificante por ICP-MS/MS. Os autores estudaram diferentes vazões gasosas para ORS ($0,30$; $0,50$ e $0,75 \text{ mL min}^{-1} O_2$) e sua influência sobre a sensibilidade, poder de detecção e exatidão na análise de CRM. Utilizando $0,75 \text{ mL min}^{-1} O_2$, limites de detecção de até $0,49$; $0,31$ e $0,33 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos para Si, P e

S, respectivamente, com recuperações entre 95 - 107% para óleo lubrificante e 91 - 135% para diesel e biodiesel.

6.2 Objetivos específicos

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o desempenho do ICP-MS/MS nos modos “*on mass*” e “*mass shift*” utilizando a reação com oxigênio no ORS para a determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em medicamentos fitoterápicos.

6.3 Parte Experimental

Todos os experimentos foram realizados com um espectrômetro de massas acoplado ao plasma indutivo com triplo quadrupolo (ICP-MS/MS) 8800 ICP-MS Triple Quad (Agilent Technologies, Japão). As condições operacionais do instrumento são apresentadas na Tabela 6.2. Todas as soluções foram preparadas com água destilada-desionizada (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA) e ácido nítrico sub-destilado a partir de um sistema Distillacid (Berghof, Alemanha).

Soluções de referência multielementares de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V no intervalo de 0,1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparada a partir da diluição apropriada de soluções estoque 1000 mg L^{-1} em 1% (v v⁻¹) HNO₃. Os materiais de referência certificados de folhas de macieira (SRM 1515) e folhas de tomateiro (SRM 1573a, NIST, EUA) foram utilizados para avaliação da exatidão. Amostras de medicamentos fitoterápicos em cápsulas contendo: Boldo 200 mg (*Peumus boldus*), Chá Verde 250 mg (*Camellia sinensis*), Ginseng 300 mg (*Panax ginseng*) e Kawa Kawa 100 mg (*Piper methysticum*) foram adquiridas em farmácia de manipulação local em São Carlos - SP. Cabe ressaltar que as amostras de medicamentos fitoterápicos utilizadas neste capítulo foram distintas das de plantas medicinais utilizadas nos capítulos anteriores. Para digestão das amostras (n=3) foi utilizado um sistema de micro-ondas com cavidade Ethos 1600 (Milestone, Itália) com frascos de PTFE com capacidade de 45 mL. Foram pesados cerca de 0,3 g de amostra, adicionados 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ e 2 mL de

H₂O₂ 30% m m⁻¹ e procedeu-se a digestão segundo o programa descrito na Tabela 6.3. Os digeridos foram levados a um volume final de 50,0 mL.

TABELA 6.2 – Condições operacionais do ICP-MS/MS utilizadas neste trabalho.

Parâmetro	Condição de operação
Potência de RF (W)	1550
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	18,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,09
Profundidade de amostragem (mm)	8,0
Tempo de integração (s)	3,0
Tempo de estabilização (s)	20
Número de replicatas	3
Temperatura da câmara de nebulização (°C)	2
Vazão de O ₂ no ORS (mL min ⁻¹)	0,30 ; 0,50 ; 0,75
Razões m/z avaliadas (elementos)	51 (V); 52 (Cr); 60 (Ni); 75 (As); 112 (Cd); 208 (Pb)
Razões m/z avaliadas (óxidos)	67 (VO); 68 (CrO); 76 (NiO); 91 (AsO); 128 (CdO); 224 (PbO)

TABELA 6.3 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão das amostras de CRMs e fitoterápicos.

Etapa	Potência máxima (W)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	800	10	200 (rampa)
2	1000	10	200 (patamar)
3	0	20	resfriamento

6.4 Resultados e discussão

A reação entre os íons dos analitos formados no plasma com o oxigênio pressurizado no ORS geralmente ocorre através da transferência de átomos de oxigênio, resultando na formação de um óxido iônico com razão m/z deslocada em 16 u.m.a. A facilidade com que ocorre esse tipo de reação, desconsiderando-se o fator entrópico, é determinada pela entalpia (ΔH_r) que pode ser positiva (reação endotérmica) ou negativa (reação exotérmica). Por não requererem energias de ativação apreciáveis, as reações exotérmicas de íons em fase gasosa tendem a ocorrer de forma espontânea, e sua eficiência é amplamente dependente da vazão do gás no ORS.¹⁵¹

Considerando-se esse aspecto foi avaliado o desempenho do ICP-MS/MS nos modos de operação com 1 quadrupolo (MS) e sem gás reacional e com 2 quadrupolos (MS/MS) com O_2 no ORS em vazões de 0,30 ; 0,50 e 0,75 mL min⁻¹. Para isso foram avaliados, inicialmente, parâmetros como sensibilidade e capacidade de detecção (LOD) para os modos “*on mass*” ($Q1 = Q2$) e “*mass shift*” ($Q2 = Q1+16$). Os resultados da Tabela 6.4 mostram que de um modo geral as sensibilidades tenderam a diminuir a medida que a vazão de O_2 no ORS aumentou. Para As e V verifica-se que menores LODs e maiores sensibilidades foram obtidos quando analisados os óxidos (modo *mass shift*) frente aos íons sem deslocamento de massa. Esse aspecto já era esperado devido às reações entre esses íons serem termodinamicamente favoráveis, com ΔH_r de - 0,63 eV para As e - 0,85 eV para V.¹⁵¹ Para os elementos que apresentam reações endotérmicas com O_2 como Cd, Cr (+ 1,38 eV), Ni (+2,36 eV) e Pb (+2,9 e V), o monitoramento dos íons sem reação (modo *on mass*) proporcionou resultados com menores LOD e maiores sensibilidades em comparação com os óxidos. Em nota técnica da AGILENT¹⁵², pode-se confirmar os resultados obtidos, sendo que os analitos sob influência de O_2 na ORS encontram-se predominantemente nas formas de $^{75}As^{16}O^+$, $^{112}Cd^+$, $^{52}Cr^+$, $^{60}Ni^+$, $^{208}Pb^+$ e $^{51}V^{16}O^+$.

As Tabelas 6.5 e 6.6 mostram os resultados para determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V nos materiais de referência de folhas de macieira (SRM 1515) e folhas de tomateiro (SRM 1573), respectivamente, para diferentes vazões de O_2 no ORS e avaliando-se os íons sem reação de deslocamento e com monitoramento de óxidos.

TABELA 6.4 – Sensibilidades e limites de detecção para As, Cd, Cr, Ni, Pb e V sob diferentes vazões de O₂ na ORS e modos de detecção “on mass”(Q1=Q2) e “mass shift”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS.

Analito	Q1 → Q2	Sem gás na ORS		0,30 mL min ⁻¹ O ₂		0,50 mL min ⁻¹ O ₂		0,75 mL min ⁻¹ O ₂	
		Sensibilidade	LOD (µg L ⁻¹)	Sensibilidade	LOD (µg L ⁻¹)	Sensibilidade	LOD (µg L ⁻¹)	Sensibilidade	LOD (µg L ⁻¹)
As	75 → 75	28141	0,005	333	0,05	36	0,5	1	8,0
	75 → 91	--	--	12704	0,04	7888	0,06	3748	0,006
Cd	112 → 112	51744	0,001	24032	0,02	15260	0,001	9874	0,005
	112 → 128	--	--	11	0,4	2	1,0	0,3	9,0
Cr	52 → 52	163096	0,04	52809	0,007	23788	0,05	18614	0,02
	52 → 68	--	--	7803	0,02	2904	0,07	1065	0,05
Ni	60 → 60	47604	0,1	14877	0,02	10492	0,05	4883	0,02
	60 → 76	--	--	572	0,08	249	0,1	98	0,2
Pb	208 → 208	119283	0,01	66638	0,02	58915	0,02	33148	0,09
	208 → 224	--	--	206	0,05	52	0,4	16,7	0,3
V	51 → 51	178173	0,004	2357	0,04	260	1,0	7	18,0
	51 → 67	--	--	84125	0,003	43332	0,01	18994	0,005

TABELA 6.5 – Determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em folhas de macieira ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou em % de recuperação, n=3) sob diferentes vazões de O_2 na ORS e modos de detecção “on mass”(Q1=Q2) e “mass shift”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS.

Analito	Q1 → Q2	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Sem gás na ORS		$0,30 \text{ mL min}^{-1} \text{ O}_2$		$0,50 \text{ mL min}^{-1} \text{ O}_2$		$0,75 \text{ mL min}^{-1} \text{ O}_2$	
			Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec
As	75 → 75	$0,038 \pm 0,007$	$0,13 \pm 0,01$	3488	$3,8 \pm 0,2$	9998	$16,1 \pm 0,3$	4×10^4	243 ± 2	6×10^5
	75 → 91		--	--	$0,041 \pm 0,001$	108	$0,033 \pm 0,002$	88	$0,035 \pm 0,003$	93
Cd	112 → 112	$0,013 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,01$	108	$0,021 \pm 0,001$	162	$0,011 \pm 0,001$	85	$0,015 \pm 0,001$	112
	112 → 128		--	--	$0,26 \pm 0,03$	1996	$0,36 \pm 0,08$	7012	<LOD	<LOD
Cr	52 → 52	0,3*	$0,58 \pm 0,08$	193	$0,333 \pm 0,003$	111	$0,33 \pm 0,06$	112	$0,28 \pm 0,02$	94
	52 → 68		--	--	$0,31 \pm 0,03$	103	$0,22 \pm 0,02$	72	$0,34 \pm 0,05$	113
Ni	60 → 60	$0,91 \pm 0,12$	$1,3 \pm 0,6$	142	$1,1 \pm 0,2$	125	$0,89 \pm 0,09$	98	$0,93 \pm 0,09$	102
	60 → 76		--	--	$1,5 \pm 0,2$	164	$0,93 \pm 0,08$	103	$1,56 \pm 0,08$	171
Pb	208 → 208	$0,470 \pm 0,024$	$0,45 \pm 0,08$	95	$0,51 \pm 0,02$	108	$0,46 \pm 0,07$	99	$0,48 \pm 0,04$	102
	208 → 224		--	--	$0,51 \pm 0,01$	109	$0,29 \pm 0,01$	61	$0,36 \pm 0,02$	77
V	51 → 51	$0,26 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$	74	$0,43 \pm 0,07$	166	$1,00 \pm 0,02$	384	$14,1 \pm 0,6$	5413
	51 → 67		--	--	$0,18 \pm 0,01$	69	$0,24 \pm 0,01$	94	$0,177 \pm 0,005$	68

TABELA 6.6 – Determinação de As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em folhas de tomateiro ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou em % de recuperação, $n=3$) sob diferentes vazões de O_2 na ORS e modos de detecção “*on mass*”(Q1=Q2) e “*mass shift*”(Q2 = Q1+16) para ICP-MS/MS.

Analito	Q1 → Q2	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Sem gás na ORS		0,30 mL min ⁻¹ O ₂		0,50 mL min ⁻¹ O ₂		0,75 mL min ⁻¹ O ₂	
			Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec	Determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% Rec
As	75 → 75	0,112±0,004	0,15 ± 0,01	134	0,54 ± 0,05	486	2,0 ± 0,2	1785	22,6 ± 0,3	2,10 ⁴
	75 → 91		--	--	0,106 ± 0,006	94	0,11 ± 0,03	96	0,10 ± 0,01	90
Cd	112 → 112	1,52 ± 0,04	1,224 ± 0,002	80	1,259 ± 0,004	83	1,571 ± 0,006	103	1,13 ± 0,02	75
	112 → 128		--	--	1,87 ± 0,06	123	1,9 ± 0,3	126	1,58 ± 0,07	104
Cr	52 → 52	1,99 ± 0,06	1,62 ± 0,1	81	1,76 ± 0,01	89	2,24 ± 0,02	113	1,5 ± 0,1	76
	52 → 68		--	--	1,8 ± 0,1	91	1,94 ± 0,05	98	2,00 ± 0,02	101
Ni	60 → 60	1,59 ± 0,07	1,7 ± 0,1	104	1,5 ± 0,2	92	1,5 ± 0,3	93	1,7 ± 0,3	104
	60 → 76		--	--	2,7 ± 0,2	174	2,0 ± 0,1	126	2,5 ± 0,3	155
Pb	208 → 208	--	0,55 ± 0,01	--	0,58 ± 0,04	--	0,49 ± 0,03	--	0,61 ± 0,05	--
	208 → 224		--	--	0,56 ± 0,05	--	0,42 ± 0,01	--	0,47 ± 0,05	--
V	51 → 51	0,835±0,010	0,64 ± 0,02	77	1,12 ± 0,03	134	2,6 ± 0,2	314	32 ± 1	3798
	51 → 67		--	--	0,61 ± 0,02	73	0,84 ± 0,03	100	0,60 ± 0,02	72

Observa-se nas Tabelas 6.5 e 6.6 que as melhores recuperações foram obtidas empregando-se vazões de 0,50 e 0,75 mL min⁻¹ O₂ no ORS e quando são monitorados os respectivos óxidos para As e V e os próprios íons para Cd, Cr, Ni e Pb. Nessas condições e com 0,50 mL min⁻¹ O₂, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas a um nível de 95% de confiança (teste t) e as recuperações para os dois CRMs avaliados variaram entre 85 - 113%. Para 0,75 mL min⁻¹ O₂, recuperações entre 68-112% foram obtidas, porém os valores para V em folhas de macieira (SRM 1515) e Cd, Cr e V em folhas de tomateiro (SRM 1573a), não foram concordantes com os valores certificados a um nível de 95% de confiança. Nota-se também que para Cd, Cr, Ni e Pb (elementos com menor tendência reativa com o O₂) no modo “mass shift” e para As, V (elementos com maior tendência reativa com o O₂) no modo “on mass”, o aumento nas vazões do gás levou a resultados inexatos e recuperações elevadas. Esses fenômenos são de difícil interpretação, sendo que estudos detalhados sobre mecanismos e reações em fase gasosa na ORS podem ser conclusivos para a explicação dos resultados. Estes, porém, não foram focados neste trabalho. Considerando-se a sensibilidade, exatidão e os limites de detecção, optou-se pelo procedimento envolvendo o uso de 0,5 mL min⁻¹ O₂ no ORS e monitoramento dos íons ¹¹²Cd⁺, ⁵²Cr⁺, ⁶⁰Ni⁺ e ²⁰⁸Pb⁺ e dos óxidos ⁷⁵As¹⁶O⁺, ⁵¹V¹⁶O⁺ para a análise das amostras de fitoterápicos (Tabela 6.7).

TABELA 6.7 – Resultados (média ± desvio-padrão, n=3) para As, Cd, Cr, Ni, Pb e V em amostras de fitoterápicos por ICP-MS/MS.

Amostra	As (ng g ⁻¹)	Cd (ng g ⁻¹)	Cr (ng g ⁻¹)	Ni (ng g ⁻¹)	Pb (ng g ⁻¹)	V (ng g ⁻¹)
Chá Verde	44 ± 3	23 ± 1	480 ± 40	1180 ± 30	520 ± 20	190 ± 5
Boldo	168 ± 4	6 ± 1	820 ± 40	870 ± 60	400 ± 40	2400 ± 200
Kawa Kawa	<10	<0,2	270 ± 20	250 ± 10	9 ± 1	26 ± 1
Ginseng	<10	30 ± 1	430 ± 30	500 ± 30	220 ± 80	920 ± 50
LOD	10	0,2	8	8	3	2

Foram encontrados nas amostras concentrações de 44 a 168 ng g⁻¹ As, 6 - 30 ng g⁻¹ Cd, 270 - 820 ng g⁻¹ Cr, 250 - 1180 ng g⁻¹ Ni, 9 - 520 ng g⁻¹ Pb e 26 - 2400 ng g⁻¹ V e o procedimento apresentou limites de detecção entre 0,2 (Cd) e 10 (As) ng g⁻¹. As normas da ANVISA¹² e as concentrações máximas permitidas na Farmacopeia Brasileira¹³, são de 1,5 µg g⁻¹ As, 0,5 µg g⁻¹ Cd, 1,0 µg g⁻¹ Pb e 25 µg g⁻¹ para Cr, Ni e V. Considerando-se os valores determinados para esses elementos e seus limites de detecção, pode-se concluir que o procedimento é adequado à análise de impurezas em medicamentos fitoterápicos e estes se situaram abaixo do valores limites para as amostras estudadas.

6.5 Conclusões parciais

Neste capítulo, demonstrou-se que a espectrometria de massas acoplada ao plasma indutivo com configuração tandem (ICP-MS/MS) é uma estratégia bastante versátil e eficiente para determinação de elementos traço e ultra-traço em amostras de fitoterápicos. Utilizando-se o modo MS/MS com vazão de 0,5 mL min⁻¹ de oxigênio no ORS e detecção de óxidos em alguns casos, foi possível a obtenção de limites de detecção apropriados e boa exatidão para As, Cd, Cr, Ni, Pb e V. As concentrações determinadas se situaram entre 44 - 168 ng g⁻¹ As, 6 - 30 ng g⁻¹ Cd, 270 - 820 ng g⁻¹ Cr, 250 - 1180 ng g⁻¹ Ni, 9 - 520 ng g⁻¹ Pb e 26 - 2400 ng g⁻¹ V e foram menores que as máximas permitidas em legislação.

CAPÍTULO 7

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi demonstrado o emprego de diferentes métodos analíticos para análise química inorgânica de plantas medicinais e fitoterápicos. Para a escolha da técnica e do procedimento mais adequados para a resolução de um problema analítico devem-se considerar alguns fatores como a disponibilidade de amostras e instrumentos, o custo relativo, a perícia do analista, o número de amostras a serem analisadas, o número de analitos a serem determinados, a sensibilidade, frequência analítica, exatidão e repetibilidade requeridas.

A espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução em forno de grafite é um método altamente sensível, simples e de custo moderado, sendo indicado para determinação de elementos em níveis traço e ultra-traço. Quando associado à análise direta de sólidos, apresenta elevada frequência analítica, pois utiliza o preparo mínimo, quantidades reduzidas de amostra e possibilidade de calibração com soluções aquosas. Apesar de monoelementar, o emprego da análise de sólidos para HR-CS GF AAS é relativamente recente e pode estender a gama de aplicações da espectrometria de absorção atômica a novos elementos e matrizes. Esse método pode ser indicado na determinação de um número reduzido de elementos em baixas concentrações para análise de plantas medicinais.

A espectrometria de emissão atômica em filamento de tungstênio é um método multielementar, com boa sensibilidade e baixo custo relativo. As principais limitações desse método são relativas a problemas de não isotermicidade e maior susceptibilidade a efeitos de matriz, que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados. A WC AES não apresenta equipamentos com disponibilidade comercial e o alinhamento do sistema óptico requer perícia do analista. O emprego de filamentos condicionados, e mais recentemente de modificadores químicos, são estratégias eficazes para aumento de sensibilidade e melhoria da precisão. Porém, a sensibilidade e os limites de detecção para WC AES não foram adequados para a determinação de elementos em concentrações mais baixas como Cr e V em amostras de plantas medicinais.

A análise por diluição de padrão (SDA) para a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente é uma estratégia nova e prática para calibração. Esse método requer o uso de uma técnica multielementar de detecção como ICP OES, a seleção adequada de um elemento como padrão interno e o conhecimento prévio da concentração dos analitos na amostra para diluição apropriada. A SDA ICP OES apresenta aplicabilidade em análises de rotina e grande potencial para superar interferências de transporte e de matriz em amostras mais complexas. O método pode ser facilmente aplicado na determinação de macro e micronutrientes em plantas medicinais.

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e configuração de triplo quadrupolo é um método altamente sensível e multielementar. O uso de oxigênio na ORS e do modo MS/MS propiciam maior controle e seletividade às reações em fase gasosa, além de alta eficiência para correção de interferências espectrais. Esse método requer a digestão das amostras utilizando um sistema adequado (preferencialmente assistido por radiação micro-ondas). O ICP-MS/MS apresenta um elevado custo relativo e requer perícia do analista para operação, sendo indicado para determinações multielementares de elementos em níveis traço e ultra-traço em amostras de fitoterápicos.

CAPÍTULO 8

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SUMNER, J. *The natural history of medicinal plants*. Portland: Timber Press, 2008. p. 39-76.
2. JORGE, S. S. A. *Plantas Medicinais: Coletânea de Saberes*. Disponível em: <http://www.fazendadocerrado.com.br/fotos_noticias/1280/Livro.pdf>. Acesso em 18 de set. 2014.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 18 set.2014.
4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Medicamentos Fitoterápicos*. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>>. Acesso em: 18 set.2014.
5. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Fitoterápicos*. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf> Acesso em: 18 set.2014.
6. ZUIN, V. G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines. *Phytother. Res.*, **14**: 73, 2000.
7. GRÜN, T. A.; KÖHLER, U.; NAGELL, A. Contamination of medicinal plants with residues of pesticides, microorganisms, aflatoxines, heavy metals. *Acta Hort.*, **333**: 195, 1993.
8. SOLTANPOUR, P.N.; WORKMAN, S. M. Use of NH_4HCO_3 -DTPA soil test to assess availability and toxicity of selenium to alfafa plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, **11**: 1147, 1980.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2014.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução - RDC nº 10, de 9 de março de 2010* Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 18 set. 2014.

11. BRASIL. Ministério da Saúde. *Anexo 1 da Resolução - RDC nº 10, de 9 de março de 2010*. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/anexo/anexo_res0010_09_03_2010.pdf>. Acesso em: 18 set. 2014.
12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Instrução Normativa nº4, de 18 de junho de 2014*. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbbf8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 18 set. 2014.
13. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. Volume 1, 5. ed., Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acesso em: 18 set.2014.
14. KOLASANI, A.; XU, H.; MILLIKAN, M. Evaluation of mineral content of Chinese medicinal herbs used to improve kidney function with chemometrics. *Food Chem.* **127**:1465, 2011.
15. BECHLIN, M. A.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. *Microchem. J.*, **109**:134, 2013.
16. OKATCH, H.; NGWENYA, B.; RALETAMO, K. M.; ANDRAE-MAROBELA, K. Determination of potentially toxic heavy Metals in traditionally used medicinal plants for HIV/AIDS opportunistic infections in Ngamiland District in Northern Botswana. *Anal. Chim. Acta*, **730**:42, 2012.
17. LIU, Z.; SUN, H.; SHEN, S.; LI, L.; SHI, H. Simultaneous determination of total arsenic and total selenium in Chinese medicinal herbs by hydride generation atomic fluorescence spectrometry in tartaric acid medium. *Anal. Chim. Acta*, **550**: 151, 2005.
18. KOLACHI, N. F.; KAZI, T. G.; ALFRIDI, H. I.; KHAN, S.; WADHWA, S. K.; SHAH, A. Q.; SHAH, F.; BAIG, J. A.; SIRAJJUDIN. Determination of selenium content in aqueous extract of medicinal plants used as herbal supplement for cancer patients. *Food Chem. Toxicol.*, **48**: 3327, 2010.
19. KALNY, P.; FIJALEK, Z.; DASZCZUK, A.; OSTAPCZUK, P. Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions. *Sci. Total Environ.*, **381**: 99, 2007.
20. RÊGO, J. F.; VIRGILIO, A.; NÓBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling. *Talanta*, **100**: 21, 2012.

21. FORTUNATO, F. M.; GOMES NETO, J. A.; FRESCHI, G. P. G. Simultaneous determination of cadmium and lead using graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct slurry sampling. *At. Spectrosc.*, **33**: 138, 2012.
22. BARTH WAL, J.; NAIR, S.; POONAM, K. Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmental different sites. *Biomed. Environ. Sci.*, **21**: 319, 2008.
23. GOMEZ, M. R.; CERUTTI, S.; SOMBRA, L. L.; SILVA, M. F.; MARTÍNEZ, L. D. Determination of heavy Metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. *Food Chem. Toxicol.*, **45**: 1060, 2007.
24. PYTLAKOWSKA, K.; KITA, K.; JANOSKA, P.; KOZIK, V. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chem.*, **135**: 494, 2012.
25. ARUMUGAM, R.; KANNAN, R. R. R.; JAYALAKSHMI, J.; MANIVANNAN, K.; DEVI, G. K.; ANANTHARAMAN, P. Determination of element contents in herbal drugs: chemometric approach. *Food Chem.*, **135**: 2372, 2012.
26. LOZAK, A.; SOLTYK, K.; OSTAPCZUK, P.; FIJALEK, Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. *Sci. Total Environ.*, **289**: 33, 2002.
27. LIN, M.; JIANG, S. Determination of As, Cd, Hg and Pb in herbs using slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chem.*, **141**: 2158, 2013.
28. BU, K.; CIZDIEL, J. V.; REIDY, L. Analysis of herbal supplements for selected dietary minerals and trace elements by laser ablation- and solution-based ICPMS. *Microchem. J.*, **106**: 244, 2013.
29. NOOKABKAEW, S.; RANGKADILOK, N.; SATAYAVIVAD, J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 6939, 2006.
30. SINGH, V.; GARG, A. N.; Availability of essential trace elements in ayurvedic indian medicinal herbs using instrumental neutron activation analysis. *Appl. Radiat. Isot.*, **48**: 97, 1997.
31. FATIMA, I.; WAHEED, S.; ZAIDI, J. H. Elemental analysis of Anethum graveolens, Sismbrium Irio and Veronia Anthelmintica seed by instrumental neutron activation analysis. *Appl. Radiat. Isot.*, **71**: 57, 2013.

32. WAHEED, S.; FATIMA, I. Instrumental neutron activation analysis of *Emblica officinalis*, *Terminalia belerica* and *Terminalia chebula* for trace element efficacy and safety. *Appl. Radiat. Isot.*, **77**: 139, 2013.
33. KHUDER, A.; SAWAN, M. K.; KARJOU, J.; RAZOUK, A. K. Determination of trace elements in Syrian medicinal plants and their infusions by energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **64**: 712, 2009.
34. DESIDERI, D.; MELI, M. A.; ROSELLI, C. Determination of essential and non-essential elements in some medicinal plants by polarized X-ray fluorescence spectrometer (EDPXRF). *Microchem. J.*, **95**: 174, 2010.
35. CALLE, I.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N. LAVILLA, I. BENDICHO, C. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food Chem.*, **138**: 234, 2013.
36. WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochim. Acta Part B*, **7**:108, 1955.
37. L'VOV, B. V. The analytical used of atomic absorption spectra, *Spectrochim. Acta Part B*, **17**: 761, 1961.
38. NÓBREGA, J. A.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, P. V.; KRUG, F. J.; BACCAN, N. Espectrometria atômica com atomização eletrotérmica em superfícies metálicas. *Quim. Nova*, **18**: 555, 1995.
39. SLAVIN, W.; MANNING, D. C.; CARNRICK, G. R. The stabilized temperature platform furnace, *At. Spectrosc.*, **2**: 137, 1981.
40. BOWMAN, J. A.; WILLIS, J. B. Some applications of the nitrous oxide-acetylene flame in chemical analysis by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, **39**: 1210,1967.
41. HARNLY, J. M.; O'HAVER, T. C.; GOLDEN, B.; WOLF, W. R. Background-corrected simultaneous multielement atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, **51**: 2007-2014, 1979.
42. WELZ, B.; SPERLING, M. *Atomic absorption spectrometry*. 3a ed. Weinheim: VCH, 1999. 941 p.
43. THERMO ELEMENTAL. *AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS which technique should I use? : An elementary overview of elemental analysis*. Disponível em: <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_18407.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2014.

44. HIEFTJE, G. M. Atomic absorption spectrometry – has is gone or where is it going? *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**: 117, 1989.
45. HARNLY, J. The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **14**: 137, 1999.
46. FLOREK, S.; BECKER-ROSS, H. High-resolution spectrometer for atomic spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **10**: 145, 1995.
47. WELZ, B. High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**: 69, 2005.
48. BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. *Revista Analytica*, **18**: 58, 2005.
49. WELZ, B.; VALE, M. G. R.; PEREIRA, É. R.; CASTILHO, I. N. B.; DESSUY, M.B. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, present and future aspects – A critical review. *J. Braz. Chem. Soc.*, **25**: 799, 2014.
50. HEITMANN, U.; WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G.; Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **62**: 1222, 2007.
51. BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS – determination of selenium and arsenic in human urine. *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**: 137, 2000.
52. BUTCHER, D. J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. *Anal. Chim. Acta*, **804**: 1, 2013.
53. BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J. *A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry*. New York: John Wiley & Sons, 1998. 272 p.
54. BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how? *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **21**: 828, 2002.
55. KRUG, F. J. *Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. Piracicaba: CENA/SUP, 2008. p. 104-128.

56. NOMURA, C.S. Estudo de Parâmetros Associados à Análise Direta de Sólidos por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2006.
57. KURFÜRST, U. *Solid sampling analysis: Direct and Slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP*. Berlim: Springer-Verlag, 1998.
58. RÊGO, J. F. Amostragem de Sólidos em Espectrometria de Absorção Atômica de Fonte Contínua com Alta Resolução: Análise de Plantas Medicinais. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química, Araraquara, 2013.
59. RESANO, M.; ARAMENDIA, M.; BELARRA, M. A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review. *J. Anal. At. Spectrom.*, **29**, 2229, 2014.
60. DITTERT, I.; BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; CURTIUS, A.; BECKER-ROSS, H. Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Microchim. Acta*, **167**: 21, 2009.
61. ARAÚJO, R. G. O.; VIGNOLA, F.; CASTILHO, I. N. B.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; SMICHOWSKI, P.; FERREIRA, S. L. C.; BECKER-ROSS, H. Determination of silver in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Microchem. J.*, **109**: 36, 2013.
62. RESANO, M.; MOZAS, E.; CRESPO, C.; BRICEÑO, J.; DEL CAMPO-MENOYO, J.; BELARRA, M. A. Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the biodistribution of gold nanoparticles in mice tissue after intravenous administration. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25**: 1864, 2010.
63. GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Investigation of lead contents in lipsticks by solid sampling high resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Reg. Toxicol. Pharm.*, **65**: 34, 2013.
64. GUNDUZ, S.; AKMAN, S. Determination of lead in rice grains by solid sampling HR-CS GFAAS. *Food Chem.*, **141**: 2634, 2013.
65. BORGES, D. L. G.; SILVA, A. F.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Determination of Lead in Coal Using Direct Solid Sampling and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Microchim. Acta*, **154**: 101, 2006.

66. BORGES, D. L. G.; DA SILVA, A. F.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J.; HEITMANN, U. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**: 763, 2006.
67. SILVA, A. F.; LEPRI, F. G.; BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J.; HEITMANN, U. Determination of mercury in biological samples using solid sampling high-resolution continuum source electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with calibration against aqueous standards. *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**: 1321, 2006.
68. ARAUJO, R. G. O.; VIGNOLA, F.; CASTILHO, I. N. B.; BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; SMICHOWSKI, P.; FERREIRA, S. L. C.; BECKER-ROSS, H. Determination of mercury in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Spectrochim. Acta Part B*, **66**: 378, 2011.
69. RESANO, M.; BRICEÑO, J.; BELARRA, M. A. Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry: A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation. *Spectrochim. Acta Part B*, **64**: 520, 2009.
70. FERREIRA, H. S.; LEPRI, F. G.; WELZ, B.; CARASEK, E.; HUANG, M. D. Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25**: 1039, 2010.
71. RESANO, M.; FLÓREZ, M. R. Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. *J. Anal. At. Spectrom.*, **27**: 401, 2012.
72. MIOR, R.; MORÉS, S.; WELZ, B.; CARASEK, E.; DE ANDRADE, J. B. Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace. *Talanta*, **106**: 368, 2013.
73. LEPRI, F. G.; BORGES, D. L. G.; ARAUJO, R. G. O.; WELZ, B.; WENDLER, F.; KRIEG, M.; BECKER-ROSS, H. Determination of heavy metals in activated charcoals and carbon black for Lyocell fiber production using direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, **81**: 980, 2010.

74. DUARTE, A. T.; DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; WELZ, B.; DE ANDRADE, J. B. Sequential determination of Cd and Cr in biomass samples and their ashes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Talanta*, **115**: 55, 2013.
75. RESANO, M.; RELLO, L.; FLÓREZ, M.; BELARRA, M. A. On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. *Spectrochim. Acta Part B*, **66**: 321, 2011.
76. RESANO, M.; BOLEA-FERNÁNDEZ, E.; MOZAS, E.; FLÓREZ, M. R.; GRINBERG, P.; STURGEON, R. E. Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**: 657, 2013.
77. RELLO, L.; LAPEÑA, A. C.; ARAMENDIA, M.; BELARRA, M. A.; RESANO, M. A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **81**: 11, 2013.
78. DOS SANTOS, L. M. G.; ARAUJO, R. G. O.; WELZ, B.; JACOB, S. C.; VALE, M. G. R.; BECKER-ROSS, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **78**: 577, 2009.
79. DOS SANTOS, L. M. G.; WELZ, B.; ARAUJO, R. G. O.; JACOB, S. C.; VALE, M. G. R.; MARTENS, A.; MARTENS, I. B. G.; BECKER-ROSS, H. Simultaneous Determination of Cd and Fe in Beans and Soil of Different Regions of Brazil Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Solid Sampling. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 10089, 2009.
80. JACKSON, K. W. *Electrothermal atomization for Analytical Atomic Spectrometry*. New York: John Wiley & Sons, 1999. 465 p.
81. AMBROZINI, B., AMORIM FILHO, V. R., OLIVEIRA, S. R., SACRAMENTO, L. V. S., GOMES NETO, J. A. Evaluation of modifiers for determination of V in parsley by GF AAS. *Food Chem.*, **116**: 1024, 2009.
82. UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). *Chapters <232> Elemental impurities – Limits and <233> Elemental Impurities – Procedures*. Rockville, MD, EUA. Disponível em: <<http://www.usp.org/pt/node/5420>>. Acesso em: 02 out. 2014.

83. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents*. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003586.pdf>. Acesso em: 02 out. 2014.
84. SUZUKI, M.; OHTA, K.; YAMAKITA, T.; KATSUNO, T. Electrothermal atomization with a metal micro-tube in atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **36**: 679, 1981.
85. SUZUKI, M.; OHTA, K. Electrothermal atomic absorption spectrometry with metal atomizers. *Prog. Analyt. Atom. Spectrosc.* **6**: 49, 1983.
86. DONATI, G. L. *Trends in Tungsten Coil Atomic Spectrometry*. ProQuest, Cambridge, 2011. 262 p.
87. RUST, J.; DONATI, G. L.; AFONSO, M. T.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. An overview of electrothermal excitation sources for atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **64**: 191, 2009.
88. QUEIROZ, Z.F.; OLIVEIRA, P. V.; NÓBREGA, J. A.; SILVA, C. S.; RUFINI, I. A.; SOUSA, S. S.; KRUG, F. J. Surface and gas phase temperatures of a tungsten coil atomizer. *Spectrochim. Acta Part B*, **57**: 1789, 2002.
89. HOU, X.; JONES, B. T. Tungsten devices in analytical atomic spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **57**: 659, 2002.
90. GU, J.; DONATI, G. L.; YOUNG, C. G.; JONES, B. T. Continuum source tungsten coil atomic fluorescence spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, **65**: 382, 2011.
91. HOU, X.; LEVINE, K. E.; SALIDO, A.; JONES, B. T.; EZER, M.; EL WOOD, S.; SIMEONSSON, J. B. Tungsten coil devices in atomic spectrometry: absorption, fluorescence and emission. *Anal. Sci.*, **17**:175, 2001.
92. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; NÓBREGA, J. A. Tungsten coil electrothermal matrix decomposition and sample vaporization to determine P and Si in biodiesel by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**: 280, 2013.
93. RUST, J. A.; NÓBREGA, J. A.; CALLOWAY JR, C. P.; JONES, B. T. Advances with tungsten coil atomizers: continuum source atomic absorption and emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **60**: 589, 2005.
94. RUST, J. A.; NÓBREGA, J. A.; CALLOWAY JR, C. P.; JONES, B. T. Tungsten coil atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **61**: 225, 2006.

95. VIRGILIO, A.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Chemical modification in atomic emission: Determination of V in lubricant oils by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Microchem. J.*, **115**: 58, 2014.
96. DONATI, G. L.; GU, J.; NÓBREGA, J. A.; CALLOWAY JR., C. P.; JONES, B. T. Simultaneous determination of the lanthanides by tungsten coil atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**: 361, 2008.
97. DONATI, G. L.; KRON, B. E.; JONES, B. T. Simultaneous determination of Cr, Ga, In and V in soil and water samples by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **64**: 559, 2009.
98. DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A.; NASCENTES, C. C.; JONES, B. T. Indirect determination of iodine by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Microchem. J.*, **93**: 242, 2009.
99. DONATI, G. L.; CALLOWAY JR., C. P.; JONES, B. T. Double tungsten coil atomic emission spectrometry: signal enhancement and a new gas phase temperature probe. *J. Anal. At. Spectrom.*, **24**: 1105, 2009.
100. DONATI, G. L.; WILDMAN, R. B.; JONES, B. T. A new atomization cell for trace metal determinations by tungsten coil atomic spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **688**: 36, 2011.
101. GU, J.; OLIVEIRA, S. R.; DONATI, G. L.; GOMES NETO, J. A.; JONES, B. T. Rugged, portable tungsten coil atomic emission spectrometer. *Anal. Chem.*, **83**: 2526, 2011.
102. SANTOS, L. N.; GONZALEZ, M. H.; MOURA, M. F.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. In situ digestion for the determination of Ca in beverages by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Talanta*, **97**: 285, 2012.
103. SANTOS, L. N.; DONATI, G. L.; CALLOWAY, JR., C. P.; JONES, B. T.; NÓBREGA, J. A. Enzymatic proteolysis and in situ digestion as strategies to determine Cs and Sr in fish by tungsten coil atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **27**: 2082, 2012.
104. DANCSAK, S. E.; SILVA, S. G.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Direct determination of sodium, potassium, chromium and vanadium in biodiesel fuel by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **806**: 85, 2014.
105. SALIDO, A.; JONES, B. T. The use of aluminum and potassium as modifiers to improve the determination of strontium by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Anal. Lett.*, **44**: 2760, 2011.

106. SILVA, S. G.; DONATI, G. L.; SANTOS, L. N.; JONES, B. T.; NÓBREGA, J. A. Cobalt as chemical modifier to improve chromium sensitivity and minimize matrix effects in tungsten coil atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **780**: 7, 2013.
107. SILVA, S. G.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. AND DONATI, G. L. Magnesium nitrate as a chemical modifier to improve sensitivity in manganese determination in plant materials by tungsten coil atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **29**: 1499, 2014.
108. STURGEON, R. E.; CHAKRABARTI, C. L. The temperature of atomic vapor in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **32**: 231, 1977.
109. LIDE, D. R. (Ed). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 88a ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
110. VIRGILIO, A.; HEALY, C. K.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Evaluation of atomizer conditioning and pyrolysis and temperature control to improve procedures based on tungsten coil atomic emission spectrometry. *Microchem. J.*, **110**: 758, 2013.
111. DESAL, P. D.; CHU, T. K.; JAMES, H. M.; HO, C. Y. Electrical resistivity of selected elements. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **13**: 1069, 1984.
112. LEVINE, K.; WAGNER, K. A.; JONES, B. T. Jones, Low-cost, modular electrothermal vaporization system for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, **52**: 1165, 1998.
113. NAVARRE, E. C.; WALLACE, P. A non-equilibrium approach to temperature calibration for tungsten filament atomic spectrometry, *Spectrosc. Lett.*, **47**: 314, 2013.
114. BRUHN, C. G.; SAN FRANCISCO, N. A.; NEIRA, J. Y.; NÓBREGA, J. A. Determination of cadmium and lead in mussels by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **50**: 967, 1999.
115. BRUHN, C. G.; NEIRA, J. Y.; GUZMAN, M. I.; DARDER, M. M.; NÓBREGA, J. A. Study of chemical modifiers for the determination of chromium in biological materials by tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **364**: 273, 1999.
116. NIU, H.; HOUK, H. S. Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **51**: 779, 1996.

117. ABOU-SHAKRA, F. R.; RAYMAN, M. P.; WARD, N. I.; HOTTON, V.; BASTIAN, G. Enzymatic Digestion for the Determination of Trace Elements in Blood Serum by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**: 429, 1997.
118. MACHAT, J.; OTRUBA, V.; KANICKY, V. Spectral and non-spectral interferences in the determination of selenium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**: 1096, 2002.
119. BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quím. Nova*, **25**: 856, 2002.
120. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Ed. Thomson, 2006.
121. HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. 6a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
122. GINÉ, M.F.; KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; BRUNS, R. E. Flow injection calibration of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using the generalized standard additions method. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**: 673, 1988.
123. FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. *Quím. Nova*, **26**: 249, 2003.
124. CORREIA, P. R. M.; OLIVEIRA, P. V. Avaliação da Padronização Interna em Espectrometria de Absorção Atômica Utilizando Gráficos de Correlação. *Quím. Nova*, **28**: 539, 2005.
125. VANHAECKE, F.; VANHOE, H.; DAMS, R. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta*, **39**: 737, 1992.
126. RAPOSO Jr., J. L.; OLIVEIRA, A. P.; JONES, B. T.; GOMES NETO, J. A. Internal standardization combined with dilute-and-shoot preparation of distilled alcoholic beverages for Cu determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **92**: 53, 2012.
127. FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P.V. Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the determination of lead in wines by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, **127**: 157, 2002.

128. OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Use of the internal standardization for difficult sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **64**: 334, 2004.
129. ZACHARIADIS, G. A.; SARAFIDOU, P. C. Internal standardization with yttrium spectral lines using axial-viewing inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for plant certified reference materials analysis. *Microchim. Acta*, **166**: 77, 2009.
130. RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y. Communication Evaluation of internal standardisation in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Comm.*, **36**: 13, 1999.
131. VIRGILIO, A.; JONES, W. B.; SCHIAVO, D.; COSTA, L. M.; JONES, B. T.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. Gradient flow analysis applied to flame atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma with mass spectrometry or optical emission spectrometry. Scientific Exchange SCIX, 2014, Reno, EUA. In: *Anais do SCIX 2014*. Disponível em: <https://www.scixconference.org/images/pdfs/program/2014_final_program_w_covers.pdf>. Acesso em: 14 out. 2014.
132. BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. *Concept, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Norwalk: Perkin Elmer, 1997.
133. TODOLI, J.; MERMET, J. *Liquid sample introduction in ICP spectrometry: A practical guide*. Oxford: Elsevier, 2008.
134. HOU, C.; JONES, B.T. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. In: Meyers, R. A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: Wiley, 2000.
135. OLIVEIRA, A. A.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; TREVIZAN, L. C. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. *Quím. Nova*, **35**: 1299, 2012.
136. DEAN, J. R. *Practical inductively coupled plasma spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 2005.
137. MERMET, J. M. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Anal. Chim. Acta*, **250**: 85, 1991.

138. DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. *Spectrochimica Acta Part B*, **56**: 101, 2001.
139. THOMSEN, V. Spectral background radiation and the “Background Equivalent Concentration” in elemental Spectrochemistry. *Spectroscopy*, **27**: 28, 2012.
140. BECKER, J. S. *Inorganic mass spectrometry: Principles and application*. 1a ed. Chichester: Wiley, 2008. 518 p.
141. THOMAS, R. J. *Practical Guide to ICP-MS*. 3a ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. 418 p.
142. AGILENT TECHNOLOGIES. *ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Primer*. Disponível em: <<http://www.agilent.com/primer/ICP-MS%20Primer.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2014.
143. HILL, S. J. *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its applications*. 2a ed. Wiley-Blackwell, 2007.
144. TAYLOR, H. E. *Inductively coupled plasma – mass spectrometry, practices and techniques*. San Diego: Academic Press, 2001.
145. PODLAHA, R. *Isotope Abundances, Interferences and DRC information*, Perkin Elmer Sciex, 2008, 8 p.
146. DEAN, J. R. *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. Chichester: Wiley, 2005, 184 p.
147. AGILENT TECHNOLOGIES. *Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS Brochure*. Disponível em: <https://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5991-0079EN_8800_ICPQQQ_Brochure.pdf>. Acesso em: 20 out. 2014.
148. AMAIS, R. S.; AMARAL, C. D. B.; FIALHO, L. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of P, S and Si in biodiesel, diesel and lubricating oil using ICP-MS/MS. *Anal. Meth.*, **6**: 4516, 2014.
149. BALCAEN, L.; BOLEA-FERNANDEZ, E.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS/MS. *Anal. Chim. Acta*, **809**: 1, 2014.
150. BALCAEN, L.; WOODS, G.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Accurate determination of S in organic matrices using isotope dilution ICP-MS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**: 33, 2013.

151. AGILENT TECHNOLOGIES. *Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS: Understanding oxygen reaction mode in ICP-MS/MS*. Disponível em: <https://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5991-1708EN_TechOverview_ICP-MS_8800_OR mode.pdf>. Acesso em: 20 out. 2014.
152. AGILENT TECHNOLOGIES. *Reaction data for 70 elements using O₂, NH₃ and H₂ gases with the Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS*. Disponível em: <https://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5991-4585EN_TechNote8800_ICP-QQQ_reactiondata.pdf>. Acesso em: 20 out. 2014.