



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química de Araraquara**



**Felipe Manfroi Fortunato**

**Avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas  
espectroscópicas**

**ARARAQUARA - SP  
2017**

**FELIPE MANFROI FORTUNATO**

**Avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto**

**ARARAQUARA - SP  
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

F745a Fortunato, Felipe Manfroi  
Avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas / Felipe Manfroi Fortunato. – Araraquara : [s.n.], 2017  
164 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: José Anchieta Gomes Neto

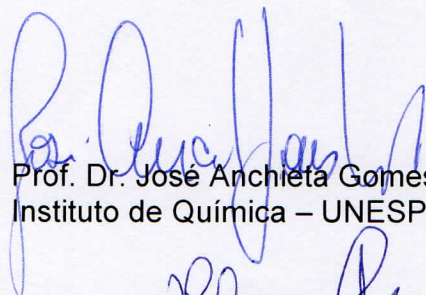
1. Calibração. 2. Espectroscopia Raman.  
3. Espectroscopia atômica. 4. Urina. 5. Combustíveis.  
I. Título.

## FELIPE MANFROI FORTUNATO

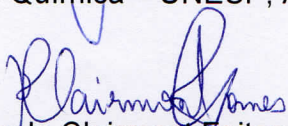
Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Química.

Araraquara, 22 de fevereiro de 2017.

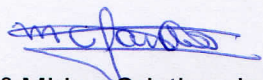
### BANCA EXAMINADORA



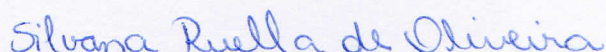
Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Mirian Cristina dos Santos  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Silvana Ruella de Oliveira  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP – Ribeirão Preto - SP



Profª Drª Carolina Lourencetti  
Instituto Federal de São Paulo, IFSP – Matão - SP

## Felipe Manfroi Fortunato

### 1. Dados pessoais

1.1 Data de nascimento: 13/05/1988

1.2 Nacionalidade: Brasileiro

1.3 Naturalidade: Naviraí - MS

1.4 Filiação: Ademir Fortunato da Silva

Vera Cristina Manfroi

1.5 Profissão: Químico

1.6 Endereço: Av. Alberto Tolói 185, Bloco 42; Apto 42 - Araraquara

1.7 Endereço Profissional: Instituto de Química - Unesp

Rua Professor Francisco Degni 55

CEP 14800-900 - Araraquara - SP

### 2. Formação acadêmica

2.1 Graduação em Química - Bacharelado

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados - MS.

Período: 09/2006 – 07/2010.

2.2 Mestrado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara - SP.

Período: 03/2011 – 02/2013.

2.3 Doutorado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara - SP.

Período: 03/2013 – 02/2017.

### 3. Artigos aceitos e submetidos para publicação

3.1 FORTUNATO, F.M.; BECHLIN, M.A.; GOMES NETO, J.A.; VIRGILIO, A; DONATI, G.L.; JONES, B.T. Standard dilution analysis in flow system: Sodium determination by flame atomic emission spectrometry, **Microchem. J.** 124 (2016) 662-667.

3.2 MIRANDA, K.; VIEIRA, A.L.; BECHLIN, M.A.; FORTUNATO, F.M.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Determination of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Se, and Zn in foodstuffs by atomic spectrometry after sample preparation using a low-cost closed-vessel conductively heated digestion system, **Food Anal. Methods**, 9 (2016) 1887-1894.

3.3 TEODÓSIO, T.K.C.; BRABES, K.C.S.; DANTAS, F.G.S.; PAULA, S.M.; FORTUNATO, F.M.; RECH, C.R.; GOES, R.H.; NEGRÃO, F.J. Remoção de cobre por biomassa de *Enterococcus Faecalis* e *Salmonella Enterica* Sorovar *Enteritidis* em solução aquosa. **Evidência (UNOESC)**, 15 (2016) 129-140.

3.4 FORTUNATO, F.M.; BECHLIN, M.A.; GOMES NETO, J.A.; DONATI, G.L.; JONES, B.T. Internal standard addition calibration: Determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry, **Microchem. J.** 122 (2015) 63-69.

3.5 BECHLIN, M.A.; FORTUNATO, F.M.; Da SILVA, R.M.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. A simple and fast method for assessment of the NPK rating of fertilizers using high-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta., Part B**, 101 (2014) 240-244.

3.6 BECHLIN, M.A.; FORTUNATO, F.M.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A.; NÓBREGA, J.A.; DONATI, G.L.; JONES, B.T. Bismuth as a general internal standard for lead in atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, 831 (2014) 24-30.

3.7 FRESCHI, G.P.G.; FORTUNATO, F.M., FRESCHI, C.D.; GOMES NETO, J.A. Simultaneous and Direct Determination of As, Bi, Pb, Sb, and Se and Co, Cr, Cu, Fe, and Mn in Milk by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Food Anal. Methods**, 5 (2012) 861-866.

3.8 FORTUNATO, F.M.; FRESCHI, G.P.G.; GOMES NETO, J.A. Simultaneous Determination of Cadmium and Lead in Medicinal Plants using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Slurry Sampling. **At. Spectrosc.**, 23 (2012) 138-142.

3.9 FORTUNATO, F.M.; MIRANDA, K.; FRESCHI, G.P.G.; GOMES NETO, J.A. Simultaneous determination of chromium and nickel in medicinal plants by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Braz. J. Anal. Chem.**, 3 (2012) 436-440.

3.10 FORTUNATO, F.M.; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A.; DONATI, G.L.; JONES, B.T. Expanding the potentialities of standard dilution analysis: determination of ethanol in gasoline by Raman spectroscopy, **Microchem. J.** (submetido).

#### **4. Principais trabalhos apresentados em congressos**

4.1 FORTUNATO, F.M.; GOMES NETO, J.A. Circumventing fluorescence from 785 nm portable Raman for gasoline analysis: determination of ethanol using on-line solvent extraction and standard dilution analysis. XXV International Conference on Raman Spectroscopy, 2016, Fortaleza – CE.

4.2 FORTUNATO, F.M.; GOMES NETO, J.A. Método de adição de padrão interno: determinação de ureia em urina por espectroscopia Raman. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis – SC.

4.3 FORTUNATO, F.M.; BECHLIN, M.A.; VIRGILIO, A.; DONATI, G.L.; JONES, B.T.; GOMES NETO, J.A. Método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo: determinação de sódio por espectrometria de emissão atômica em chama. 4º Congresso Analítica Latin America, 2015, São Paulo – SP.

4.4 FORTUNATO, F.M.; BECHLIN, M.A.; GOMES NETO, J.A.; DONATI, G.L.; JONES, B.T. Internal standard addition method: calcium and magnesium determination. 13<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2014, Merida – YC.

4.5 FORTUNATO, F.M. ; FRESCHI, G.P.G.; GOMES NETO, J.A. Direct and simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by graphite furnace atomic absorption spectrometry employing slurry sampling. 12<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2012, Foz do Iguaçu - PR.

4.6 FORTUNATO, F.M.; FRESCHI, G.P.G.; GOMES NETO, J.A. Simultaneous determination of Cr and Ni in medicinal plants using GF AAS and direct slurry sampling. 12<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2012, Foz do Iguaçu - PR.

4.7 FORTUNATO, F.M.; WONDRACEK, M.H.; ALVES, V.M.; GOMES NETO, J.A.; FRESCHI, G.P.G. Determinação de Sb(III) e Sb(V) em amostras de água, torta e silagem de girassol por HG-AAS. 16<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão - SP.

4.8 FORTUNATO, F.M.; OLIVEIRA, I.P.; WONDRACEK, M.H.; MORAES, L.F.R.; KUPFER, V.L.; FRESCHI, G.P.G.; RINALDI, A.W.; DOMINGUES, N.L.C. Determinação de As, Sb e Sn em águas residuárias da cidade de Dourados-MS por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos. 33<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP.

4.9 FORTUNATO, F.M.; OLIVERIA, I.P.; DOMINGUES, N.L.C.; RINALDI, A.W.; FRESCHI, G.P.G. Especificação redox de Sb em amostras agronômicas e ambientais empregando HG AAS. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão UFGD, 2010, Dourados - MS.

4.10 FORTUNATO, F.M.; OLIVERIA, I.P.; BRABES, K.C.S.; DOMINGUES, N.L.C.; NEGRAO, F.J.; RINALDI, A.W.; FRESCHI, G. P. G. Determinação de As, Cd, Cr, Mn e Pb em amostras de água empregando a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. 3<sup>o</sup> Encontro de extensão, 3<sup>o</sup> Encontro de iniciação científica e 2<sup>o</sup> Encontro de pós-graduação da UFGD, 2009, Dourados - MS.

4.11 FORTUNATO, F.M.; OLIVERIA, I.P.; RINALDI, A.W.; BRABES, K.C.S.; FRESCHI, G.P.G. Desenvolvimento de método analítico para a determinação de Fe em amostras ambientais por espectrofotometria UV-Vis. 2<sup>o</sup> Encontro de iniciação científica UFGD/UEMS e 1<sup>o</sup> Encontro de pós-graduação UFGD/UEMS, 2008, Dourados - MS.

4.12 FORTUNATO, F.M.; SILVA, G.R.; FRESCHI, G.P.G.; FRESCHI, C.D.; GOMES NETO, J.A. Determinação simultânea de As, Bi, Pb, Sb e Se em leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. 2008. 11° Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos, 2008, Campinas – SP.

4.13 FORTUNATO, F.M.; RAIZER, J.; OLIVERIA, I.P.; FRESCHI, G.P.G.; GOMES NETO, J.A. Determinação de As, Cd, Hg e Pb em antibióticos por espectrometria de absorção atômica. 15° Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Sul, 2007, Ponta Grossa - PR.

## **5. Outras informações relevantes**

5.1 II Prêmio ENIC Melhor Trabalho - Melhor Trabalho de Iniciação Científica na área de Ciências Exatas e da Terra, UFGD, 2010, Dourados - MS.

## DEDICATÓRIA

A minha noiva **Caroline** e aos meus pais **Ademir e Cristina**, minha irmã **Bruna**, minha vó **Helena**, minha prima **Daniela** e a toda minha família, pelo incentivo e compreensão nessa etapa da minha vida. Vocês são os grandes responsáveis por tudo de bom que tenho obtido ao longo dessa minha jornada.

É com todo o meu carinho que lhes dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos recebidas durante esta etapa da minha vida.

A minha noiva Caroline que esteve ao meu lado e me deu forças para cumprir mais esta etapa.

A minha mãe Cristina e seu esposo Ademir, a minha vó Helena, meu pai Ademir e minha irmã Bruna pelo apoio incondicional.

Ao professor Dr. José Anchieta Gomes Neto pela orientação, amizade, confiança, ensinamentos e principalmente PACIÊNCIA durante esse período.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, por todo apoio e suporte.

Ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (CEMPEQC, Instituto de Química – UNESP, Araraquara) e em especial ao Dr. Rafael Rodrigues Hatanaka por sempre estarem dispostos a colaboração na execução do projeto.

Ao Marcos, Alan e Guilherme que foram como irmãos ao longo de toda a minha Pós-graduação, e com certeza levarei para o resto da minha vida.

A todos os amigos e a “família GEA”: Ariane, Carla, Diego, Tiago, Kelber, Maysa, Tháila, Samia, Marília, Juliana, Luciana, Joaquim, Rose, Rodrigo, Rodrigo Garcia, Mario pela amizade e por todos os momentos vividos nesse tempo.

As professoras Edilene e Mirian pelas discussões e contribuições para a execução do trabalho.

Aos amigos da Raia 1 Tatinha, Ricardo, Dito, Preta, Joice, Lasanha, Bruno, Verinha, Zé, Alisson, Pedrão, Luissa, Alzira e Ricardo que sempre me incentivaram e apoiaram ao longo desses anos.

A FAPESP pela bolsa concedida (processo: 2012/23323-7).

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que influenciaram diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

## RESUMO

O objetivo desta Tese de Doutorado foi avaliar o método de adição de padrão interno empregando técnicas espectroscópicas. Inicialmente o método de adição de padrão interno foi aplicado no modo convencional na determinação de Ca e Mg em amostras biodiesel e urina por espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução e fonte contínua e na determinação de ureia em urina por espectroscopia Raman. Para fins comparativos, todas as amostras e materiais certificados foram também analisados pelos métodos de calibração externa, adição de padrão e padronização interna. Nitrato, Sr e Mn foram selecionados como padrões internos para ureia, Ca e Mg, respectivamente. Para avaliar a exatidão do método na determinação de Ca e Mg foram analisados nove materiais de referência certificados (CRM) e os resultados obtidos foram concordantes a 95% de confiança com os valores certificados (teste  $t$ ). Para ureia a exatidão foi avaliada por meio de comparação dos resultados obtidos pelo método de adição de padrão interno e por um método de referência. Todos os resultados obtidos foram concordantes entre si (teste  $t$  pareado) ao nível de 95% de confiança. A exatidão do método também foi checada por meio de testes de adição e recuperação: Ca (93 – 119%), Mg (100 – 116%) e ureia (99 – 105%). A desvantagem do método de adição de padrão interno convencional foi o volume total de amostra utilizado, a quantidade de soluções analíticas empregadas e a baixa frequência analítica. No entanto, estes problemas foram solucionados com o desenvolvimento de sistemas em fluxo e pelo uso de um gradiente de concentração. O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foi avaliado na determinação de Na e K em amostras de biodiesel e urina por espectrometria de emissão atômica em chama e na determinação de etanol em gasolina por espectroscopia Raman. Lítio foi empregado como padrão interno para Na e K, e acetona foi utilizada como padrão interno para etanol. A exatidão do método na determinação de Na e K foi avaliada por meio da análise de cinco CRMs, e os resultados obtidos para Na foram concordantes a 95% de confiança com os valores certificados (teste  $t$ ), para K os resultados apresentaram valores subestimados ao longo do trabalho (em torno de 80% de recuperação). Para determinação de etanol em gasolina a exatidão foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência, e todos os resultados obtidos foram concordantes entre si (teste  $t$  pareado) ao nível de 95% de confiança. A exatidão do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo também foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação: Na (94 – 110%), K (73 – 86%) e etanol (99 – 104%). Os resultados obtidos utilizando o método de adição de padrão interno (convencional e em fluxo) em todas as aplicações apresentaram precisão e exatidão melhores ou comparáveis aos métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa, mostrando ser uma estratégia de calibração eficiente para técnicas espectroscópicas.

**Palavras-chave:** Calibração. Adição de padrão interno. Técnicas espectroscópicas. Padronização interna. Adição de padrão.

## ABSTRACT

The aim of this Doctoral Thesis was to evaluate the internal standard addition method employing spectroscopic techniques. Initially, traditional standard addition method was applied for Ca and Mg determination in biodiesel and urine samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry and for urea determination in urine samples by Raman spectroscopy. For comparison purposes, all samples and certified materials were also analyzed by external calibration, standard addition and internal standardization methods. Nitrate, Sr and Mn were selected as internal standards for urea, Ca and Mg, respectively. In order to verify the accuracy for Ca and Mg determination, nine certified reference materials (CRM) were analyzed, the results were in agreement with certified values at the 95% confidence level (t-test). For urea, the accuracy was evaluated by comparison of the results obtained by internal standard addition and a reference method. All results were in agreement at 95% confidence level (paired t-test) with each other. The accuracy was also checked by addition and recovery tests: Ca (93 - 119%), Mg (100 - 116%) and urea (99 - 105%). The drawbacks of traditional internal standard addition were the total volume of sample used, the amount of analytical solutions employed and the lower sample throughput. However, these problems were solved with the development of flow systems and the use of a concentration gradient. The internal standard addition by flow gradient concentration was evaluated for Na and K determination in biodiesel and urine samples by flame emission atomic spectrometry and for ethanol determination in gasoline by Raman spectroscopy. Lithium was selected as internal standard for Na and K, and acetone was selected as internal standard for ethanol. The accuracy of the method for Na and K determination was evaluated by five CRMs analysis, and the results obtained for Na were in agreement with certified values at the 95% confidence level (t-test), for K the results presented underestimated values throughout the study (around 80% recovery). The accuracy for ethanol determination in gasoline was evaluated comparing the results obtained by the proposed method with the reference method. All results were in agreement at 95% confidence level (paired t-test) with each other. The accuracy of internal standard addition by flow gradient concentration method was also evaluated by addition and recovery tests: Na (94 - 110%), K (73 - 86%) and ethanol (99 - 104%). The results obtained by internal standard addition (traditional and flow modes) for all applications showed accuracy and precision better or comparable with traditional calibration methods (standard addition, internal standardization and external calibration), revealing to be an efficient calibration strategy for spectroscopic techniques.

**Keywords:** Calibration. Internal standard addition. Spectroscopic techniques. Internal standardization. Standard addition.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua.....	46
<b>Figura 2 -</b>	Esquema do preparo das amostras para avaliar o desempenho do método de adição de padrão interno contendo diferentes níveis de enriquecimento de Sr e Mn.....	50
<b>Figura 3 -</b>	Influência da vazão de acetileno nas absorbâncias Ca (-■-) e Sr (-●-) e na razão das absorbâncias de Ca/Sr (-■-)......	53
<b>Figura 4 -</b>	Influência do teor de etanol nas absorbâncias Ca (-■-) e Sr (-●-) e na razão das absorbâncias de Ca/Sr (-■-)......	54
<b>Figura 5 -</b>	Influência da vazão de acetileno nas absorbâncias Mg (-■-) e Mn (-●-) e na razão das absorbâncias de Mg/Mn (-■-)......	55
<b>Figura 6 -</b>	Influência do teor de etanol nas absorbâncias Mg (-■-) e Mn (-●-) e na razão das absorbâncias de Mg/Mn (-■-)......	56
<b>Figura 7 -</b>	Otimização da concentração de La em A) amostras de biodiesel: (-■-) biodiesel 4 (-●-) biodiesel 5 e B) amostras de urina: (-■-) urina 2 (-●-) urina 4.....	58
<b>Figura 8 -</b>	Influência de diferentes concentrações de Sr na determinação de Ca pelo método de adição de padrão interno. A) absorbâncias referentes as adições de Sr a G1 (-■-), G2 (-●-), G3(-▲-) e G4(-▼-), B) absorbâncias descontadas referente as adições de Sr a G1-G4, C) curvas da adição de padrão interno para Ca utilizando os valores das absorbâncias descontadas de Sr.....	60
<b>Figura 9 -</b>	Influência de diferentes concentrações de Mn na determinação de Mg pelo método de adição de padrão interno. A) absorbâncias referentes as adições de Mn a G1 (-■-), G2 (-●-), G3(-▲-) e G4(-▼-), B) absorbâncias descontadas referente as adições de Mn a G1-G4, C) curvas da adição de padrão interno para Mg utilizando os valores das absorbâncias descontadas de Mn.....	61
<b>Figura 10 -</b>	Espectrômetro Raman empregado nas medidas de espalhamento Raman.....	72

<b>Figura 11 -</b>	Espectro Raman de uma solução de ureia contendo 100 g L <sup>-1</sup> utilizando 50 % da potência máxima do laser e 30 s de integração: (1) estiramento C-N e (2) modos de vibração NH <sub>2</sub> .....	78
<b>Figura 12 -</b>	Espectro Raman de uma solução contendo 50 g L <sup>-1</sup> ureia + 5 g L <sup>-1</sup> nitrato utilizando 50 % da potência máxima do laser e 20 s de tempo de integração.....	79
<b>Figura 13 -</b>	Influência da potência do laser nas intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia (-■-) e nitrato (-●-) e nas razões das intensidades relativas de ureia/nitrato (-■-)......	80
<b>Figura 14 -</b>	Influência do tempo de integração nas intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia (-■-) e nitrato (-●-) e nas razões das intensidades relativas de ureia/nitrato (-■-)......	81
<b>Figura 15 -</b>	Influência do tempo de integração no sinal de fundo de uma amostra de urina. Espectros utilizando 10 (-), 20 (-), 25 (-), 30 (-) segundos de tempo de integração.....	82
<b>Figura 16 -</b>	Influência do pH nos espectros Raman de ureia e nitrato: pH 3 (--), 7 (--), 10 (--), e 13 (--)......	83
<b>Figura 17 -</b>	Sistema empregado nas medidas de emissão atômica: a) bomba peristáltica e injetor-comutador proporcional; b) espectrômetro e fibra óptica; c) FAAS.....	88
<b>Figura 18 -</b>	Representação das 5 regiões de um sinal típico obtido pelo método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo para Na (-), K (-) e Li (-): 1) branco; 2) solução A; 3) transição entre as soluções A e B; 4) solução B; 5) branco.....	91
<b>Figura 19 -</b>	Diagrama de fluxos para a determinação de Na e K por adição de padrão interno utilizando gradiente de concentração em fluxo. IC: injetor-comutador, L: alça de amostragem, PD: amortecedor de pulso, B <sub>1</sub> : bobina 110 cm, W: descarte. Branco e Solução A: 1,0 mL min <sup>-1</sup> , Solução B: 1,3 mL min <sup>-1</sup> .....	92
<b>Figura 20 -</b>	Esquema da divisão dos pontos em um sinal típico de Li (-) obtido utilizando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo.....	94

<b>Figura 21</b> -	Espectros de emissão referente as soluções: 1 mg L <sup>-1</sup> Na, 2 mg L <sup>-1</sup> Li, 2 mg L <sup>-1</sup> K, 50 mg L <sup>-1</sup> Mg, 10 mg L <sup>-1</sup> Ca, 10 mg L <sup>-1</sup> Sr, 10 mg L <sup>-1</sup> Rb e 50 mg L <sup>-1</sup> Cs.....	98
<b>Figura 22</b> -	Variação da intensidade de emissão de 1 mg L <sup>-1</sup> Na com o aumento da concentração de Ca.....	99
<b>Figura 23</b> -	Influência da razão ar/acetileno nas intensidades de emissão de Na (-■-), K (-●-), e Li (-▲-) e nas razões das intensidades de emissão de Na/Li (-■-) e K/Li (-●-). .....	100
<b>Figura 24</b> -	Fundo observado (a) em chamas redutoras e (b) registrado.....	100
<b>Figura 25</b> -	Influência da variação da taxa de aspiração nas intensidades de emissão de Na (-■-), K (-●-), e Li (-▲-) e nas razões das intensidades de emissão de Na/Li (-■-) e K/Li (-●-). .....	101
<b>Figura 26</b> -	Avaliação de diferentes tamanhos de alças de amostragem (a) 100 cm (b) 200 cm (c) 300 cm e (d) 500 cm para (-) Na, (-) K e (-) Li utilizando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	103
<b>Figura 27</b> -	Intensidades de emissão (-) Na, (-) K e (-) Li (a) sem amortecedor de pulso (b) com amortecedor de pulso.....	104
<b>Figura 28</b> -	Concentrações de Li no gradiente de concentração calculadas através do método 1 (-■-) e método 2 (-●-) nos dias 1 (a) e 2 (b).....	106
<b>Figura 29</b> -	Determinação de Na em 5 amostras (contendo 0,5 mg L <sup>-1</sup> de Na) empregando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo utilizando médias de: ■ 10 pontos, ■ 20 pontos, ■ 30 pontos, ■ 40 pontos e ■ 50 pontos. E utilizando: a) todos os pontos, b) pontos centrais, c) excluindo pontos iniciais e d) excluindo pontos finais.....	108
<b>Figura 30</b> -	Determinação de K em 5 amostras (contendo 1,0 mg L <sup>-1</sup> de K) empregando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo utilizando médias de: ■ 10 pontos, ■ 20 pontos, ■ 30 pontos, ■ 40 pontos e ■ 50 pontos. E utilizando: a) todos os pontos, b) pontos centrais, c) excluindo pontos iniciais e d) excluindo pontos finais.....	109

<b>Figura 31</b> -	Curvas de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo para Na (-■-) (-▲-) (-◄-) e K (-●-) (-▼-) (-►-) na amostra 3 ( $n=3$ ). a) curvas utilizando todos os pontos; b) curva utilizando todos os pontos ampliada; c) curvas utilizando os pontos centrais; d) curvas utilizando os pontos centrais ampliada.....	111
<b>Figura 32</b> -	Determinação de Na (-■-) e K (-●-) pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando diferentes concentrações do supressor de ionização.....	113
<b>Figura 33</b> -	Sinal de fundo gerado a partir de soluções (--) 0%; (--) 0,05%; (--) 0,1%;(--) 0,5% m/v de CsCl.....	113
<b>Figura 34</b> -	Determinação de Na (-■-) e K (-●-) pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando diferentes concentrações do padrão interno.....	114
<b>Figura 35</b> -	Intensidades de emissão de 1 mg L <sup>-1</sup> Na, 1 mg L <sup>-1</sup> Li e 1 mg L <sup>-1</sup> K em meio de etanol (--) e em meio aquoso (--).....	116
<b>Figura 36</b> -	Sistema empregado nas medidas do espalhamento Raman: a) bomba peristáltica; b) unidade de separação líquido-líquido; c) cela de fluxo e Raman probe; e d) espectrômetro Raman.....	127
<b>Figura 37</b> -	Diagrama de fluxos para determinação de etanol pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aliado a extração líquido-líquido em fluxo. H <sub>2</sub> O: solvente extrator (0,5 mL min <sup>-1</sup> ); Std: 30 % v v <sup>-1</sup> etanol + 30% v v <sup>-1</sup> acetona e B: água (0,5 mL min <sup>-1</sup> ); S: amostra (0,5 mL min <sup>-1</sup> ); a, b: pontos de confluência; B1, B2: bobinas de mistura; FC: cela de fluxo; W: descarte.....	128
<b>Figura 38</b> -	Diagrama de fluxos para determinação de etanol pelos métodos de compatibilização de matriz, adição de padrão e padronização interna aliado a extração líquido-líquido em fluxo. H <sub>2</sub> O: solvente extrator (0,5 mL min <sup>-1</sup> ); Std: padrão, B: branco, S: amostra (0,5 mL min <sup>-1</sup> ); a: ponto de confluência; B1: bobina de mistura; FC: cela de fluxo; W: descarte	130
<b>Figura 39</b> -	Espectros Raman para 3 amostras de gasolina de diferentes distribuidoras.....	132

<b>Figura 40 -</b>	Parafusos de teflon projetados para cela de fluxo BAC 160. a) cela de fluxo com parafusos originais, b) cela de fluxo com parafusos projetados, c) vista frontal e lateral dos parafusos originais e projetados e d) dimensões do parafuso projetado.....	133
<b>Figura 41 -</b>	Produção do gradiente de concentração no volume interno da cela de fluxo.....	133
<b>Figura 42 -</b>	Influência da vazão na precisão do espalhamento Raman.....	134
<b>Figura 43 -</b>	Avaliação do comprimento das bobinas de mistura B1 e B2 na eficiência de extração.....	135
<b>Figura 44 -</b>	Influência da razão gasolina/agente extrator na eficiência de extração..	136
<b>Figura 45 -</b>	Espectro Raman de uma solução 50% etanol + 50% acetona com 80% da potência do laser e 10 s de integração. Pico 1: 756-826 $\text{cm}^{-1}$ acetona (estiramento C-C-C); e Pico 2: 840 – 910 $\text{cm}^{-1}$ etanol (estiramento C-C).....	137
<b>Figura 46 -</b>	Diagrama de causa e efeito para o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aplicado na determinação de etanol por espectroscopia Raman.....	148
<b>Figura 47 -</b>	Influência do erro na medição do volume do etanol na concentração final do mensurando.....	150
<b>Figura 48 -</b>	Influência do erro na medição do volume de acetona na concentração final do etanol.....	151
<b>Figura 49 -</b>	Contribuição (%) de cada fonte de entrada para o cálculo da incerteza expandida.....	154

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Intervalos de resposta linear e principais parâmetros analíticos para Ca, Mg, Mn e Sr.....	57
<b>Tabela 02</b> - Recuperações (%) obtidas para Ca e Mg na ausência e na presença de diferentes concentrações dos padrões internos.....	62
<b>Tabela 03</b> - Resultados (% m m <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de Ca em CRMs empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	63
<b>Tabela 04</b> - Resultados (% m m <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de Mg em CRMs empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	64
<b>Tabela 05</b> - Resultados (mg kg <sup>-1</sup> ) da determinação de Ca em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	66
<b>Tabela 06</b> - Resultados (mg kg <sup>-1</sup> ) da determinação de Mg em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	66
<b>Tabela 07</b> - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Ca em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno....	67
<b>Tabela 08</b> - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Mg em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno....	67
<b>Tabela 09</b> - Resultados (mg L <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de Ca em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	68
<b>Tabela 10</b> - Resultados (mg L <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de Mg em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	68
<b>Tabela 11</b> - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Ca em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	69

<b>Tabela 12 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Mg em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	69
<b>Tabela 13 -</b>	Resultados ( $\text{g L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de ureia em amostras de urina empregando os métodos de referência, calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno....	84
<b>Tabela 14 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação de ureia em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.....	84
<b>Tabela 15 -</b>	Parâmetros das curvas de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo para amostra 3 utilizando todos os pontos (TP) e pontos centrais (PC) na calibração. Resultado ( $\text{mg L}^{-1}$ ) das determinações de Na e K para cada replicata e desvios padrões relativo para TP e PC.....	112
<b>Tabela 16 -</b>	Resultados ( $\% \text{ m m}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Na em materiais referência certificados empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	115
<b>Tabela 17 -</b>	Resultados ( $\% \text{ m m}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de K em materiais referência certificados empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	117
<b>Tabela 18 -</b>	Resultados ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Na em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	118
<b>Tabela 19 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Na em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	119

<b>Tabela 20 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para K em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	120
<b>Tabela 21 -</b>	Resultados (mg L <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de Na em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	121
<b>Tabela 22 -</b>	Resultados (mg L <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de K em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	122
<b>Tabela 23 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Na em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	122
<b>Tabela 24 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para K em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	123
<b>Tabela 25 -</b>	Resultados (% V V <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de etanol em amostras de gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	138
<b>Tabela 26 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para etanol em gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	139
<b>Tabela 27 -</b>	Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para etanol em gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	140

<b>Tabela 28</b> -	Concentrações de etanol determinadas pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (n=9) amostra de gasolina contendo 25% v v <sup>-1</sup> e soma quadrática dos resultados.....	146
<b>Tabela 29</b> -	Valores dos coeficientes a e valores dos cálculos das diferenças de X e da somatória das diferenças de X multiplicado pelos coeficientes a.....	147
<b>Tabela 30</b> -	Resultados (% V V <sup>-1</sup> ) para os testes de repetibilidade e precisão intermediária.....	149
<b>Tabela 31</b> -	Componentes de incerteza utilizadas no cálculo da incerteza padrão combinada.....	152
<b>Tabela 32</b> -	Resultados (% V V <sup>-1</sup> ) da determinação (n=3) de etanol em amostras de gasolina empregando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	153

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
- ASTM - American Society for Testing and Materials
- CRM - Do inglês Certified Reference Material, Material de Referência Certificado
- F AAS - Do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry, Espectrometria de Absorção Atômica em Chama.
- F AES - Do inglês Flame Atomic Emission Spectrometry, Espectrometria de Emissão Atômica em Chama.
- FIA - Do inglês Flow Injection Analysis, Análise de Injeção em Fluxo
- GF AAS - Do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite
- HG AFS - Do inglês Hydride Generator Atomic Fluorescence Spectrometry, Geração de Hidretos em Espectrometria de Fluorescência Atômica
- HPLC - Do inglês High Performance Liquid Chromatography, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- HR-CS FAAS - Do inglês High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry, Espectrometria de Absorção Atômica em Chama de Alta Resolução com Fonte Contínua.
- ICP-MS - Do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado.
- ICP OES - Do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado.
- IUPAC - Do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry, União Internacional de Química Pura e Aplicada.
- LA - Do inglês Laser Ablation, Ablação por Laser.
- LIBS - Do inglês Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser
- MALDI TOFMS - Do inglês Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Analisador de Massas por Tempo de Voo
- MIP OES - Do inglês Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry, Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas

NBR - Normas Brasileiras

PI - Padrão interno

PIXE - Do inglês Particle Induced X ray Emission, Indução de Raios X por Prótons

PTFE – Politetrafluoretileno

r - Coeficiente de Correlação Linear

RSD - Do inglês Relative Standard Deviation, Desvio Padrão Relativo

SD - Do inglês Standard Deviation, Desvio Padrão

UV-Vis - Do inglês Ultraviolet-Visible, Ultravioleta-Visível

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
<b>2.1 Métodos de calibração</b> .....	30
<b>2.2 Métodos de calibração combinados</b> .....	33
2.2.1 MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS SIMULTANEAMENTE.....	34
2.2.2 MÉTODOS DE CALIBRAÇÕES INTEGRADOS.....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
<b>4 MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO: DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA...</b>	45
<b>4.1 Introdução</b> .....	45
<b>4.2 Materiais e métodos</b> .....	46
4.2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	46
4.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	47
4.2.3 METODOLOGIA.....	47
4.2.3.1 Determinação de Ca e Mg em biodiesel.....	50
4.2.3.2 Determinação de Ca e Mg em urina.....	51
<b>4.3 Resultados e discussão</b> .....	52
4.3.1 SELEÇÃO DOS PADRÕES INTERNOS.....	52
4.3.2 INTERVALO DE RESPOSTA LINEAR.....	56
4.3.3 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LANTÂNIO.....	57
4.3.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO INTERNO NO DESEMPENHO DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO.....	58
4.3.5 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO.....	62
4.3.5.1 Materiais de referência certificados.....	62
4.3.5.2 Biodiesel.....	65
4.3.5.3 Urina.....	68
<b>4.4 Conclusões parciais</b> .....	70

<b>5. DETERMINAÇÃO DE UREIA EM URINA EMPREGANDO O MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO EM ESPECTROSCOPIA RAMAN.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>72</b>
5.2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	72
5.2.1.1 Método desenvolvido.....	72
5.2.1.2 Método de referência.....	73
5.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	73
5.2.2.1 Método desenvolvido.....	73
5.2.2.2 Método de referência.....	73
5.2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	74
5.2.3.1 Método desenvolvido.....	74
5.2.3.2 Método de referência.....	74
5.2.4 METODOLOGIA.....	75
5.2.4.1 Método desenvolvido.....	75
5.2.4.1.1 Avaliação do padrão interno.....	75
5.2.4.1.2 Otimização do método.....	75
5.2.4.1.3 Determinação de ureia em urina.....	76
5.2.4.2 Método de referência.....	77
<b>5.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>77</b>
5.3.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO.....	78
5.3.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO.....	81
5.3.3 DETERMINAÇÃO DE UREIA EM URINA.....	83
<b>5.4 Conclusões parciais.....</b>	<b>85</b>
<b>6. MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO: DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM CHAMA.....</b>	<b>86</b>
<b>6.1 Introdução.....</b>	<b>86</b>
<b>6.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>87</b>
6.2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	87
6.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	88
6.2.3 METODOLOGIA.....	89
6.2.3.1 Preparo das amostras.....	89

6.2.3.2 Avaliação do sistema de emissão atômica e do padrão interno.....	89
6.2.3.3 Otimização do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.....	90
6.2.3.4 Determinação de Na e K.....	95
6.2.3.4.1 <i>Análise das amostras de biodiesel</i> .....	95
6.2.3.4.2 <i>Análise das amostras de urina</i> .....	96
<b>6.3 Resultados e discussão</b> .....	97
6.3.1 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE EMISSÃO ATÔMICA.....	97
6.3.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO.....	99
6.3.3 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO.....	102
6.3.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO.....	104
6.3.5 DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO.....	114
6.3.5.1 Materiais de referência certificados.....	114
6.3.5.2 Biodiesel.....	118
6.3.5.3 Urina.....	121
<b>6.4 Conclusões parciais</b> .....	124
<b>7. DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM GASOLINA EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN ALIADA AOS MÉTODOS DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM FLUXO</b> .....	125
<b>7.1 Introdução</b> .....	125
<b>7.2 Materiais e métodos</b> .....	126
7.2.1 INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS.....	126
7.2.2 REAGENTES, SOLUÇÕES ANALÍTICAS E AMOSTRAS.....	127
7.2.3 METODOLOGIA.....	128
7.2.3.1 Desenvolvimento do sistema em fluxo.....	128
7.2.3.2 Otimização do sistema em fluxo.....	129
7.2.3.3 Determinação de etanol em amostras de gasolina.....	129
<b>7.3 Resultados e discussão</b> .....	131
7.3.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO.....	132

7.3.2 ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO E OTIMIZAÇÃO DA FAIXA LINEAR.....	136
7.3.3 DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM AMOSTRAS DE GASOLINA.....	137
7.3.4 TESTES DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	139
<b>7.4 Conclusões parciais.....</b>	<b>140</b>
<b>8. ESTIMATIVA DA INCERTEZA EXPANDIDA DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO.....</b>	<b>141</b>
<b>8.1 Materiais e métodos.....</b>	<b>141</b>
8.1.1 INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS.....	141
8.1.2 REAGENTES, SOLUÇÕES ANALÍTICAS E AMOSTRAS.....	141
8.1.3 METODOLOGIA.....	142
8.1.3.1 Definição do mensurando.....	142
8.1.3.2 Identificação das fontes de incerteza.....	142
8.1.3.3 Cálculo das componentes de incerteza.....	143
8.1.3.3.1 <i>Incerteza-padrão</i> .....	143
8.1.3.3.2 <i>Coefficiente de sensibilidade</i> .....	144
8.1.3.4 Combinação das componentes.....	145
8.1.3.5 Estimativa da incerteza expandida.....	145
8.1.3.5.1 <i>Determinação do fator de abrangência</i> .....	145
<b>8.2 Resultados e discussão.....</b>	<b>146</b>
8.2.1 DEFINIÇÃO DO MENSURANDO E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA.....	147
8.2.2 CÁLCULO DAS COMPONENTES DE INCERTEZA.....	148
8.2.3 COMBINAÇÃO DAS COMPONENTES.....	152
8.2.4 ESTIMATIVA DA INCERTEZA EXPANDIDA.....	152
8.2.5 CONTRIBUIÇÃO DE CADA COMPONENTE NA INCERTEZA EXPANDIDA.....	153
<b>8.3 Conclusões parciais.....</b>	<b>154</b>
<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>156</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As análises químicas quantitativas desempenham um papel fundamental em muitas áreas da indústria, medicina e da ciência<sup>1</sup>, e a busca por métodos acessíveis, simples, de baixo custo que forneçam resultados precisos e exatos se faz necessário diante deste cenário. No entanto, mesmo com o avanço das técnicas instrumentais a etapa de calibração continua sendo uma peça chave em análises químicas quantitativas<sup>2</sup>, o que torna a escolha do método de calibração um ponto crucial, principalmente em análises de amostras complexas como combustíveis<sup>3</sup> e fluidos biológicos<sup>4</sup>.

A calibração externa é o método de calibração mais utilizado devido à sua simplicidade de aplicação e interpretação<sup>2,5</sup>. No entanto, este método é suscetível a erros causados principalmente por variações em parâmetros instrumentais e/ou efeitos de matriz que podem deteriorar a precisão e a exatidão dos resultados. Esses erros podem ser contornados utilizando outros tipos de calibração, como a adição padrão e a padronização interna<sup>2,5,6</sup>.

O método de adição de padrão é uma alternativa para corrigir problemas associados a efeitos de matriz<sup>6</sup>, porém o método geralmente consome grandes volumes de amostras e reagentes, além de requerer elevados tempos de análise, sendo mais conveniente para análise de um número pequeno de amostras.

O método da padronização interna é utilizado para minimizar erros causados por flutuações no sinal analítico e para reduzir efeitos da matriz<sup>6</sup>. No entanto, a seleção de um padrão interno que apresente propriedades físico-químicas semelhantes às do analito não é uma tarefa trivial. Além disso, o elemento selecionado como padrão interno deve estar ausente, ou estar contido em concentrações abaixo dos limites de detecção nas amostras<sup>6,7</sup>.

Considerando os métodos de calibração apresentados, é possível observar que cada um possui vantagens e limitações na sua aplicação, o que dificulta a escolha do mais adequado para cada situação. Assim, a combinação de métodos de calibração pode ser uma alternativa para melhorar a confiabilidade analítica.

Uma nova estratégia de calibração que possibilita corrigir problemas associados a variações em parâmetros instrumentais e efeitos de matriz, aumentando a confiabilidade analítica em termos de precisão e exatidão é o método de adição de

padrão interno<sup>8</sup>. Este método combina os princípios dos métodos de adição de padrão e padronização interna, tendo como vantagem o fato de não ter a concentração do padrão interno fixada nos brancos, padrões e amostras e da não preocupação com os teores do padrão interno originalmente presente nas amostras.

O método de adição de padrão interno pode ser utilizado em técnicas compatíveis com amostras líquidas e que permitam medidas simultâneas ou sequenciais rápidas. No entanto, assim como o método de adição de padrão convencional o método de adição de padrão interno utilizado manualmente, demanda de grandes volumes de amostras, reagentes e tempo de análise.

Uma maneira de contornar os problemas relacionados com o grande número de soluções preparadas, o volume de reagentes e com o tempo de análise é a automação do método utilizando um gradiente de concentração<sup>9</sup> combinado com um sistema de injeção de fluxo, permitindo a análise sequencial de soluções sem a necessidade de diluições manuais<sup>10</sup>, tornando-o um método mais robusto, e diminuindo o consumo de amostras e reagentes, levando a uma diminuição significativa na geração de resíduos. No entanto, para esta combinação se faz necessário o uso de técnicas simultâneas de análise.

Deste modo, esta Tese de Doutorado teve como objetivo avaliar o método de adição de padrão interno utilizado manualmente na determinação de Ca e Mg em amostras de biodiesel e urina por espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua e na determinação de ureia em urina por espectroscopia Raman; e o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo na determinação de Na e K em amostras de biodiesel e urina por espectrometria de emissão atômica em chama (com detecção simultânea) e determinação de etanol em gasolina por espectroscopia Raman.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A química analítica pode ser definida como uma ciência baseada no desenvolvimento e na aplicação de métodos, técnicas e estratégias para se obter informações sobre a natureza e a composição da matéria<sup>11</sup>. Outra definição mais simples, porém abrangente, é dada como: ciência das medições químicas<sup>12,13</sup>.

As análises químicas podem ser divididas em: qualitativas e quantitativas. As análises qualitativas têm como objetivo identificar as espécies químicas presentes em uma amostra, enquanto as análises quantitativas tratam da quantidade relativa das espécies (analitos) presentes em uma amostra em termos numéricos<sup>1,13</sup>.

Uma análise química quantitativa é uma investigação complexa que pode ser resumida em uma série de etapas<sup>14</sup>. Essas etapas (ações) são chamadas de sequência analítica e envolvem: (i) definir o problema a ser resolvido; (ii) escolher o método e a técnica que serão utilizadas; (iii) fazer uma amostragem representativa; (iv) processar a amostra para que ela seja compatível com o método e a técnica escolhida; (v) realizar a medida (obtenção dos dados analíticos); (vi) interpretação dos dados obtidos, que vai da determinação da concentração do analito até a avaliação dos resultados; (vii) elaboração do relatório e ação, etapa onde se toma uma decisão a respeito do problema inicial, tendo como base os resultados analíticos. Dependendo da complexidade da matriz ou da técnica e/ou método escolhido algumas etapas podem ser incluídas ou excluídas<sup>12-16</sup>.

A etapa de medição é considerada crucial dentro da sequência analítica. Esta etapa é definida como um conjunto de operações que tem como objetivo “determinar o valor do mensurando, isto é, o valor de uma grandeza específica a ser medida” (Guia ISO GUM)<sup>17</sup>. Essa grandeza pode ser uma massa, volume, tamanho, quantidade de substância, corrente, voltagem entre outras<sup>18</sup>.

Os primeiros registros sobre o uso de medições para fins analíticos ocorreram por volta de 1350 e 1375 a.C., quando a copelação era utilizada no antigo Egito para verificar a pureza de metais preciosos como ouro e prata<sup>13,19</sup>. Nos séculos seguintes o desenvolvimento das civilizações esteve diretamente ligado a invenção e aperfeiçoamento dos instrumentos de medições<sup>20</sup>. Dentre estes instrumentos destaca-se a balança, pela sua importância no desenvolvimento econômico de várias civilizações, uma vez que o comércio era baseado no peso dos produtos. A balança

também tem um papel incontestável na evolução da química analítica quantitativa, passando pelos trabalhos de Black, Cavendish e Lavoisier<sup>20,21</sup>.

O desenvolvimento de balanças de precisão (balanças analíticas) e vidrarias volumétricas impulsionou a química analítica quantitativa, por meio das análises de massa (gravimétricas) e volume (titulométricas), dando assim, início a química analítica clássica<sup>21,22</sup>. No início do século XX os químicos começaram a utilizar medidas de diferentes propriedades físicas e químicas de átomos e moléculas, tais como: condutividade, absorção, emissão e espalhamento de radiação eletromagnética, fluorescência, relação massa carga, entre outras, para quantificação dos analitos, originando a química analítica instrumental<sup>22</sup>. No entanto, para transformar as medidas dessas propriedades físicas e químicas em uma informação analítica é necessário estabelecer uma relação matemática entre a intensidade do sinal analítico referente a esta propriedade com a concentração do analito; este procedimento é chamado de calibração.

A calibração em química analítica de acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é definida como uma operação que relaciona uma grandeza de saída com uma grandeza de entrada para um sistema de medições com condições específicas<sup>23</sup>. As grandezas de saída são representadas por meio dos valores medidos (sinal analítico), já as grandezas de entrada são expressas pelas quantidades ou concentrações dos analitos<sup>23</sup>.

Nesta Tese de Doutorado serão discutidos alguns métodos de calibração propostos na literatura.

## 2.1 Métodos de calibração

Inúmeros métodos de calibração estão disponíveis na literatura, dentre estes métodos a calibração externa é comumente empregada por ser um procedimento simples e rápido. Este método faz uso de curvas analíticas obtidas a partir de várias soluções contendo concentrações conhecidas e crescentes do analito, e assume-se que o sinal analítico  $S_a$  é proporcional ( $k$ ) a concentração  $C$  do analito (Eq. 1)<sup>2,5,6</sup>.

$$S_a = k C \quad \text{Eq. 1}$$

A calibração externa é simples e de fácil interpretação, pois a concentração do analito é facilmente calculada via gráfico ou equação da reta. Porém, esse tipo de calibração é vulnerável a erros aleatórios e/ou sistemáticos causados por alterações nas condições instrumentais e/ou operacionais e efeitos de matriz que afetam a qualidade dos resultados<sup>2,6</sup>.

Outro método de calibração simples é a calibração com um único ponto, esta é baseada no cálculo de um fator de calibração (FC) que é obtido pela razão da concentração da solução padrão ( $C^p$ ) pelo sinal analítico do padrão ( $S_a^p$ ) medido (Eq. 2). Assumindo-se que o coeficiente linear é igual a zero e que o aumento ou diminuição do sinal analítico seja proporcional a concentração do analito, a concentração do analito na amostra é calculada multiplicando o FC pelo sinal analítico da amostra<sup>6</sup>.

$$FC = \frac{C^p}{S_a^p} \quad \text{Eq. 2}$$

No entanto, assumir que o coeficiente linear é igual a zero e que o aumento ou diminuição do sinal analítico é proporcional a concentração do analito leva esse método a ser muito vulnerável a erros relativos a linearidade, efeito de matriz, flutuações no sinal analítico, entre outros.

Uma alternativa para diminuir possíveis efeitos de matriz é a utilização do método das diluições sucessivas. O método baseia-se em sucessivas diluições de uma única solução padrão e de uma amostra, em cada uma das etapas de diluição a amostra e a solução padrão são analisadas. A cada duas etapas de diluição a concentração do analito é determinada por interpolação utilizando um gráfico de dois pontos, e a concentração calculada é chamada de concentração aparente. No entanto, com sucessivas diluições possíveis interferências são progressivamente eliminadas, levando a se obter concentrações aparentes cada vez mais próximas a concentração real do analito na amostra. Consequentemente, o resultado analítico final é obtido como a concentração calculada a diluição infinita<sup>2,24,25</sup>.

Outra estratégia de calibração descrita na literatura é o método de calibração indireta, este é utilizado quando a técnica empregada não é capaz de medir ou não

tem sensibilidade para quantificar o analito de interesse<sup>2</sup>. O método é baseado em reações envolvendo o analito de interesse, na qual mede-se o produto formado ou o consumo de um reagente<sup>26</sup>. As curvas analíticas do método de calibração indireta são obtidas a partir de várias soluções contendo concentrações conhecidas e crescentes do analito que reagem com um reagente, e assume-se que o aumento (formação de produto) ou decréscimo (consumo de um reagente) do sinal analítico é proporcional a concentração do analito. A concentração do analito pode ser facilmente calculada via gráfico ou pela equação da reta<sup>26</sup>. No entanto, o método é vulnerável a interferências dependendo da especificidade da reação.

Para amostras vulneráveis a efeitos de matriz, o método de compatibilização de matriz pode ser uma alternativa eficiente de calibração. Este método é fundamentado no preparo de padrões analíticos com composição química semelhante à das amostras analisadas. Assim como na calibração externa, as soluções devem conter concentrações conhecidas e crescentes do analito, e assume-se que o sinal analítico é proporcional a concentração do analito. A concentração do analito presente na amostra pode ser facilmente calculada graficamente ou via equação da reta<sup>6,27</sup>.

Erros causados por efeitos de matriz podem ser corrigidos de maneira eficiente utilizando o método de adição de padrão<sup>28</sup>. Neste método, as soluções padrão da curva analítica são preparadas em meio contendo a matriz da amostra. O sinal analítico obtido ( $S_a$ ) corresponde a soma do sinal da amostra e do padrão adicionado ( $S_a = S_a^{am} + S_a^p$ ) e será proporcional a concentração do analito mais a concentração do padrão ( $C_{am} + C_p$ ) (Eq. 3). A concentração do analito é determinada por meio da extrapolação da curva analítica, sendo que o módulo da intersecção no eixo da abscissa (X) corresponderá a concentração do analito ( $C_{am}$ )<sup>2,6</sup>.

$$S_a = S_a^{am} + S_a^p = k (C_{am} + C_p) \quad \text{Eq. 3}$$

Apesar de eficiente na correção de efeitos de matriz, o método de adição de padrão não corrige flutuações no sinal analítico, podendo comprometer a qualidade dos resultados. Diferentemente da calibração externa, o método de adição de padrão requer uma calibração para cada amostra, o que torna a análise mais demorada.

A padronização interna é um método de calibração eficiente para contornar problemas associados a flutuações no sinal analítico<sup>6,7</sup>. Este método baseia-se na adição de uma quantidade fixa e constante de um padrão interno (PI) aos brancos, soluções analíticas e amostras e na utilização da razão sinal do analito ( $S_a$ )/ sinal do PI ( $S_{pi}$ ) como sendo proporcional a concentração do analito (C) (Eq. 4), na qual k é uma constante de proporcionalidade.

$$\frac{S_a}{S_{pi}} = k C \quad \text{Eq. 4}$$

Compensando as perturbações nas medidas, a padronização interna melhora tanto a precisão como a exatidão analítica. Para isso é essencial que a perturbação sobre o padrão interno e o analito seja da mesma magnitude<sup>7,29</sup>. Nesse contexto, a seleção de um padrão interno eficaz não é tarefa fácil, pois alguns critérios precisam ser atendidos: padrão interno e analito devem apresentar comportamento semelhante; o padrão interno deve estar ausente da amostra original, ou se presente, em concentrações abaixo do limite de detecção; não deve interagir com o analito, deve ser solúvel nas soluções analíticas e nas amostras e não deve interferir na determinação do analito<sup>7,30</sup>.

Considerando os métodos de calibração apresentados, pode se observar que cada um possui vantagens e limitações na sua aplicação, o que dificulta a escolha do mais adequado para cada situação. Assim, a combinação de métodos de calibração tem sido estudada com o intuito de melhorar a confiabilidade analítica.

## 2.2 Métodos de calibração combinados

Uma alternativa para melhorar a qualidade dos resultados é a combinação de dois métodos de calibração distintos a fim de unir os benefícios de ambos. Esta combinação pode ser feita de duas maneiras: (i) utilizando dois métodos de calibração simultaneamente ou (ii) integrando os conceitos de dois métodos de calibração em um único método, criando um novo método de calibração<sup>2</sup>.

## 2.2.1 MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS SIMULTANEAMENTE

A utilização de dois métodos de calibração simultaneamente tem como objetivo melhorar o desempenho analítico por meio da união dos benefícios de cada um dos métodos utilizados. No entanto, nesta abordagem não ocorre mudanças na fundamentação matemática dos métodos, de modo que a concentração do analito na amostra é determinada empregando as fórmulas referentes a um dos métodos. Contudo, a curva de calibração é construída considerando ambos os métodos envolvidos, por meio de uma adequação no procedimento experimental.

Uma das alternativas de combinações de métodos de calibração disponível para melhorar a qualidade dos resultados, baseia-se na utilização simultânea dos métodos de adição de padrão e da padronização interna<sup>31-43</sup>. Neste método, as soluções da curva analítica são preparadas em meio da amostra pela adição de quantidades crescentes de padrão a uma quantidade fixa de um padrão interno. Neste caso, assume-se que a razão sinal do analito ( $S_a$ )/ sinal do padrão interno ( $S_{pi}$ ) é proporcional à concentração do analito presente na amostra e à concentração do padrão ( $C_{am} + C_p$ ), conforme a Equação 5.

$$\frac{S_a}{S_{pi}} = k (C_{am} + C_p) \quad \text{Eq. 5}$$

Warren e colaboradores<sup>31</sup> utilizaram a padronização interna juntamente com a adição de padrão para melhorar a precisão e exatidão da técnica de Fosforescência em Temperatura Ambiente. O emprego dos métodos simultaneamente foi avaliado na determinação de ácido acetilsalicílico e ácido p-aminobenzóico em solução 1,0 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, solução 1,0 mol L<sup>-1</sup> de acetato de sódio e amostra de soro sanguíneo em meio de 1,0 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Ácido 1-hidroxi 2-naftóico e ácido 1-naftóico foram utilizados como padrão interno para ácido acetilsalicílico e ácido p-aminobenzóico, respectivamente. O uso dos métodos de calibração simultaneamente apresentou uma boa exatidão e precisão (desvio padrão relativo, RSD 1-3%), quando comparado com as precisões típicas obtidas pela técnica (RSD 10-20%).

Szyszkla e colaboradores<sup>32</sup> avaliaram a utilização simultânea dos métodos de adição de padrão e padronização interna na determinação de polietilenoglicol residual em surfactantes empregando a espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador de massas por tempo de voo (MALDI TOFMS). Polietilenoglicol metil éter foi utilizado como padrão interno, e a combinação dos métodos permitiu a análise quantitativa do polietilenoglicol com erros que variaram entre 0 e 2 %, os resultados obtidos foram concordantes com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector evaporativo com espalhamento de luz.

Yagi e colaboradores<sup>33</sup> empregaram simultaneamente os métodos de adição de padrão e padronização interna na determinação de Cu, Zn, Rb e Sr em materiais de referência certificados de folhas (NBS SRM 1571 Orchard Leaves e 1570 Spinach Leaves) por indução de raios-X por prótons (PIXE). Prata foi utilizada com padrão interno para todos os elementos e o método apresentou boa sensibilidade e precisão (RSDs < 10%).

Yang e colaboradores<sup>34</sup> avaliaram o uso da adição de padrão com a padronização interna para melhorar a exatidão da determinação de Pb em amostras de sangue empregando voltametria por redissolução anódica. Cinquenta e cinco amostras de sangue foram analisadas utilizando somente adição de padrão e utilizando adição de padrão com padronização interna. Os resultados foram avaliados por curvas de correlação utilizando como referências os valores obtidos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Quando as amostras foram analisadas utilizando apenas adição de padrão o coeficiente de determinação foi de 0,555, já quando utilizado TI(III) como padrão interno foi observado uma grande melhora no coeficiente de determinação ( $R^2=0,981$ ).

Brown e colaboradores<sup>35</sup> também avaliaram o emprego do método de adição de padrão e padronização interna simultaneamente na determinação de Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de material particulado por voltametria por redissolução anódica. No entanto, os autores propuseram o uso dos próprios analitos como padrões internos, após um estudo sistemático foram definidos os seguintes pares analito/padrão interno: Cd/Pb, Zn/Pb, Pb/Cd e Cu/Zn. O emprego de adição de padrão com a padronização interna melhorou a exatidão dos resultados, assim como as precisões (aproximadamente 10 vezes).

Masumoto e colaboradores<sup>36-40</sup> publicaram uma série de cinco artigos avaliando o uso dos métodos de adição de padrão e padronização interna simultaneamente na determinação de As, Ba, Ce, Co, Cr, Cs, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Sr, Sb, Tl, U, Y, Zn e Zr em amostras de solo, cinzas de carvão e amostras ambientais e na determinação de Fe em ligas metálicas utilizando análise de ativação de fótons e análise de ativação de prótons. Os padrões internos avaliados foram divididos de acordo com o tempo de meia vida das reações foto nucleares (curto, média e longo), sendo para os analitos com curto tempo de meia vida utilizado Mg e Fe, para médio tempo de meia vida Ca e Ti e para longos tempos de meia vida Na, Ti e Mn. O uso dos métodos simultaneamente ajudou a eliminar vários erros sistemáticos, melhorando a precisão e exatidão dos métodos.

Salin e colaboradores<sup>41</sup> avaliaram os métodos de calibração externa, adição de padrão, padronização interna e adição de padrão com padronização interna na determinação de Ag, Co, Cu, Mg, Mo, Ni, Pb, Rh, Tl, Y em soluções salinas e soluções acidificadas por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foram avaliados Mg, Co, Y, Rh e Pb como padrões internos e a avaliação dos resultados foi feita por meio dos erros médios para cada método: 23 - 41% para calibração externa, 1 - 71% padronização interna, 45% adição de padrão e 0,7 - 5% para adição de padrão com padronização interna, levando os autores a concluir que o uso de dois métodos de calibração para correção de efeitos de matriz e flutuações analíticas operam sinergicamente levando a resultados mais precisos.

Outra opção de combinação de métodos de calibração disponível na literatura, envolve o método de compatibilização de matriz associado a padronização interna<sup>43-47</sup>. A combinação destes métodos de calibração vem ganhando destaque principalmente em técnicas de análise direta de sólidos. Neste caso, os padrões são preparados empregando uma matriz isenta ou uma matriz preparada com composição semelhante à das amostras analisadas. O padrão interno pode ser adicionado como uma quantidade fixa e constante de um padrão interno aos brancos, soluções analíticas e amostras ou pode-se empregar um componente majoritário presente nas amostras analisadas, cuja concentração tenha pouca variação<sup>43-46</sup>. A concentração do analito na amostra é calculada de maneira semelhante à utilizada na padronização interna convencional.

O'Reilly e colaboradores<sup>43</sup> avaliaram o uso dos métodos de compatibilização de matriz e padronização interna para obtenção de imagens químicas quantitativas de Fe em amostras de tecidos biológicos empregando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com ablação por laser (LA-ICP-MS). O uso de Rh como padrão interno juntamente com a compatibilização de matriz forneceu RSD < 10% para as determinações e obtenção de imagens químicas de Fe em tecidos de cérebro.

Ugarte e colaboradores<sup>44</sup> empregaram os métodos de compatibilização de matriz e padronização interna para determinação de Al, As, Ba, Cd, Hg, Mg, Mn, Pb, Rb, Sr, V e Zn em amostras de espinha dorsal de peixes por LA-ICP-MS. Para compatibilização de matriz os autores utilizaram co-precipitação de hidroxiapatita e como padrão interno foi empregado o Ca presente nas amostras e padrões. Os resultados obtidos foram concordantes com o material certificado analisado e apresentaram boa precisão e exatidão.

Chirinos e colaboradores<sup>45</sup> avaliaram o emprego dos métodos de compatibilização de matriz com a padronização interna para determinação B, Ca, K, Mg, Mn, P, S e Zn em amostras de folhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com ablação por laser (LA-ICP OES). As pastilhas para análise quantitativa foram preparadas utilizando materiais de referência certificados de folhas misturados com parafina e carbono foi usado como padrão interno. O padrão interno se mostrou efetivo para compensar efeitos de matriz e variações nos processos de ablação, apresentando precisões entre 1 e 8% (RSD).

Stepánková e colaboradores<sup>46</sup> realizaram um estudo sobre a produção de pastilhas para calibração visando o emprego dos métodos de compatibilização de matriz e padronização interna simultaneamente nas técnicas LA-ICP-MS, espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS), ablação por laser acoplado a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LA-LIBS) visando a aplicação na análise de cálculo urinário. Para a técnica LIBS não foi possível observar o benefício do uso dos métodos de calibração devido à baixa sensibilidade da técnica, para LA-LIBS e LA-ICP-MS o uso da compatibilização de matriz trouxe uma melhora nos coeficientes de correlação das curvas analíticas, já quando a padronização interna foi utilizada juntamente com a compatibilização de

matriz uma melhora significativa foi observada principalmente para a técnica de LA-ICP-MS.

### 2.2.2 MÉTODOS DE CALIBRAÇÕES INTEGRADOS

O emprego de métodos de calibração integrados também tem como objetivo melhorar o desempenho analítico por meio da união dos benefícios dos métodos tomados como base. Porém, nesta abordagem é criado um novo método de calibração que toma como base os fundamentos matemáticos de dois métodos já consagrados, originando um novo conceito matemático e experimental.

Uma opção de integração de métodos utilizada para contornar problemas com interferências de sobreposições de espectros é o emprego do método de adição de padrão aplicado duas vezes, este método é denominado como método de adição de padrão no ponto H. O procedimento deste método envolve o preparo de duas funções de calibração para um analito e amostra determinados de acordo com o procedimento do método de adição de padrão convencional. As funções são formuladas em duas situações diferentes (comprimento de onda, potencial, entre outros). Nestas condições, ambas as funções têm a possibilidade de cruzar num ponto (ponto H), este ponto indica a concentração de analito na amostra e o efeito aditivo referente ao interferente<sup>48-55</sup>.

Pouretedal e Asefi<sup>48</sup> avaliaram o uso do método de adição de padrão no ponto H na determinação simultânea de Zn(II) e Co(II) por espectrofotometria UV-Vis em soluções binárias de Zn e Co e amostras de água de torneira, rio e chuva. As determinações foram feitas utilizando o método do metiltimol azul nos comprimentos de onda de 565 nm e 637 nm. Os resultados obtidos apresentaram boa exatidão (recuperações entre 96-105%) e precisão (< 1%).

Hajian e colaboradores<sup>49</sup> aplicaram o método de adição de padrão no ponto H para contornar problemas com espectros sobrepostos de hidroclorotiazida e propranolol. As determinações foram feitas utilizando espectrofotometria UV-Vis nos comprimentos de onda de 270 e 300 nm para hidroclorotiazida e 250 e 288 nm para propranolol. O método apresentou boa exatidão para as determinações de hidroclorotiazida (96%, 96% e 100%) e propranolol (96%, 104% e 108%) em amostras de sangue, plasma e urina.

Shams e colaboradores<sup>50</sup> avaliaram o uso do método de adição de padrão no ponto H para resolver o problema de sobreposição dos picos dos pulsos de voltametria de redissolução anódica correspondentes a oxidação de Pb e Zn. Os gráficos de adição de padrão no ponto H foram construídos utilizando 0,3663 e 0,4026V de potencial, o método apresentou boa exatidão para a determinação de Pb e Zn em amostras binárias e para determinação de Pb em amostras de bebidas (recuperações entre 99,9-102,3%).

Campíns-Falcó e colaboradores<sup>51</sup> empregaram o método de adição de padrão no ponto H para determinação de teofilina e paraxantina em amostras de urina por cromatografia líquida equipada com detector UV-Vis. Mesmo com uma grande sobreposição dos picos de teofilina e paraxantina foi possível determinar ambas em contrações terapêuticas com boa precisão e exatidão.

Outra opção de método de calibração baseado na junção de dois métodos distintos é o método de calibração integrado. Este método é fundamentado nos princípios dos métodos de calibração externa e método de adição de padrão e tem como principais características a identificação e eliminação de possíveis interferentes nas análises. Neste procedimento são preparadas seis soluções analíticas ( $R_1 - R_6$ ) e um branco ( $R_0$ ), na qual,  $R_0$ : diluente;  $R_1$ : 2/3 de padrão + 1/3 de diluente;  $R_2$ : 2/3 de padrão + 1/3 de amostra;  $R_3$ : 2/3 de diluente + 1/3 de amostra;  $R_4$ : 2/3 de amostra + 1/3 de diluente;  $R_5$ : 2/3 de amostra + 1/3 de padrão; e  $R_6$ : 2/3 de diluente + 1/3 de diluente. A partir da análise das seis soluções + branco, são produzidos 7 sinais analíticos ( $S_0 - S_6$ ), e utilizando os sete sinais analíticos são plotadas quatro curvas de calibração de dois pontos ( $S_0$  e  $S_1$ ;  $S_2$  e  $S_3$ ;  $S_4$  e  $S_5$ ;  $S_6$  e  $S_0$ ). Por meio destas quatro curvas são calculadas seis concentrações aparentes para o analito de interesse ( $C_1 - C_6$ ), destas seis concentrações  $C_1$  e  $C_2$  são calculadas de modo interpolativo,  $C_3$  e  $C_4$  são calculados de modo semi-extrapolativo e  $C_5$  e  $C_6$  são calculadas de modo extrapolativo. A concentração do analito pode ser resumida em 4 etapas: (i) caso as seis concentrações aparentes sejam concordantes entre si, a concentração do analito é dada por uma média aritmética de  $C_1-C_6$ ; (ii) caso  $C_1 - C_6$  não sejam concordantes, é um indicativo que algum efeito de matriz está prejudicando a qualidade dos resultados, quando isso ocorre verifica-se se  $(C_3 + C_4)/2$ ,  $C_5$  e  $C_6$  são concordantes, caso sim, a concentração do analito é dado por uma média aritmética de  $C_3 - C_6$ ; (iii) se as concentrações aparentes não respondem adequadamente as

condições de (i) e (ii), amostras e padrões são diluídas sucessivamente até que umas duas condições sejam atendidas; (iv) se mesmo com as diluições sucessivas não for possível atender as condições de (i) e (ii) é necessário um pré-tratamento da amostra de modo a eliminar esta interferência antes de repetir todo o procedimento<sup>2,5,56</sup>.

Wieczorek e colaboradores<sup>56</sup> automatizaram e aplicaram o método de calibração integrada na determinação de Se em soluções contendo Cu (interferente) e bebidas energéticas utilizando geração de hidretos em espectrometria de fluorescência atômica (HG AFS). Fortes interferências na geração de hidreto de Se foram observadas devido à presença de Cu. No entanto, com a utilização do método de calibração integrada aliado à sistemas em fluxo tal interferência foi eliminada, obtendo-se resultados com boa precisão (RSD < 7%), exatidão (recuperações entre 100 e 106%), baixo consumo de amostras e reagentes (aproximadamente 4 mL de ambos) e curtos períodos de tempo (aproximadamente 6 minutos por amostra).

O método de calibração generalizado é uma modificação do método de calibração integrada e também tem como objetivo identificar e eliminar possíveis interferentes nas análises. O procedimento analítico do método é idêntico ao do método de calibração integrada. No entanto, este método é baseado na integração dos conceitos do método de calibração integrada com o método das diluições sucessivas. Assim, padrão e amostra são diluídos sucessivamente, e para cada ponto de diluição é realizado o método da calibração integrada. Com as sucessivas diluições possíveis interferências são progressivamente eliminadas, levando-se a concentrações aparentes cada vez mais próximas da concentração real do analito na amostra. A concentração final é calculada à diluição infinita<sup>2,57,58</sup>.

Koscielniak e colaboradores<sup>57</sup> aplicaram o método da calibração generalizada na determinação indireta de íons cloreto em amostras de água por espectrofotometria UV-Vis. Os autores desenvolveram um sistema totalmente automatizado, que permitiu a aplicação do método e a determinação dos íons cloreto com precisão e exatidão. Os autores concluem que o método é uma opção que pode ser adaptado em diferentes técnicas analíticas e tem potencial para corrigir diferentes tipos de erros e interferências.

Tendo como base os métodos de adição de padrão e da padronização interna, Jones e colaboradores<sup>8</sup> propuseram o método de adição de padrão interno. Diferentemente dos métodos que une a adição de padrão com padronização interna

convencional, esta proposta emprega a adição de volumes crescentes de uma solução estoque que contém analito + padrão interno às amostras. Nesse caso, foi necessário assumir uma relação linear entre o sinal analítico do padrão interno ( $S_{pi}$ ) e sua concentração  $C_{pi}^p$  (Eq. 6).

$$S_{pi} = k_{pi} C_{pi}^p \quad \text{Eq. 6}$$

Dividindo-se os termos da Eq. 03 (Equação referente ao método de adição de padrão, seção 1.1.2.1) por  $S_{pi}$  e  $k_{pi} C_{pi}^p$ , respectivamente, chega-se a Eq. 7:

$$\frac{S_a}{S_{pi}} = \frac{k_a (C_a^{am} + C_a^p)}{k_{pi} C_{pi}^p} \rightarrow \frac{S_a}{S_{pi}} = \frac{k_a C_a^p}{k_{pi} C_{pi}^p} + \frac{k_a C_a^{am}}{k_{pi} C_{pi}^p} \quad \text{Eq. 7}$$

Observa-se aqui uma equação de reta na qual a razão do sinal do analito pelo do padrão interno é a variável  $y$  e o inverso da concentração do padrão interno é a variável  $x$  (Eq. 8):

$$y = \frac{S_a}{S_{pi}} \quad x = \frac{1}{C_{pi}^p} \quad \text{Coef. linear} = \frac{k_a C_a^p}{k_{pi} C_{pi}^p} \quad \text{coef. angular} = \frac{k_a}{k_{pi}} C_a^{am} \quad \text{Eq. 8}$$

Do ponto de vista experimental, as adições da solução estoque contendo analito + padrão interno conterão uma proporção fixa dos mesmos ( $C_a^p$ ,  $C_{pi}^p$ ) nas amostras. Deste modo, o coeficiente linear (intercepto) será um valor que dependerá apenas dos efeitos de matriz sobre o analito. E a concentração do analito na amostra pode ser calculada pela Equação 9:

$$C_a^{am} = \frac{\text{coef. angular}}{\text{coef. linear}} \times \frac{C_a^p}{C_{pi}^p} \quad \text{Eq. 9}$$

O método de adição de padrão interno une os benefícios da adição de padrão com a padronização interna, com a vantagem de não ter a concentração do padrão interno fixada nos brancos e amostras e da não preocupação com os teores do padrão interno originalmente presente nas amostras. Este método foi aplicado na determinação de Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Ni e Pb em amostras de enxaguante bucal, HNO<sub>3</sub> e vinho empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e na determinação do corante FD&C Blue N°1 em enxaguante bucal por espectrofotometria UV-Vis. As amostras foram analisadas também pelos métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa para fins comparativos. Nesta aplicação o método de adição de padrão interno foi utilizado baseado em um gradiente de concentração e apresentou uma precisão e exatidão superior aos métodos de calibração convencionais, mostrando que a união dos dois métodos de calibração se apresenta como uma ferramenta versátil para corrigir problemas associados a efeitos de matriz, efeitos de transporte e flutuações analíticas.

Virgilio e colaboradores<sup>59</sup> avaliaram o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em comparação aos métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa na determinação de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Se e Zn em amostras de bebidas e alimentos por ICP OES. O método apresentou melhores limites de detecção e quantificação em comparação aos métodos tradicionais, além de apresentar melhor precisão (RSD < 5,0 %) e exatidão (recuperações entre 89 e 111%).

Gonçalves e colaboradores<sup>60</sup> utilizaram o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração na determinação de Al, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn em bebidas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Para fins comparativos as amostras também foram analisadas pelos métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa. O método de adição de padrão interno apresentou melhor exatidão (90 – 99%) que os métodos de calibração convencionais: adição de padrão (101 – 122%), padronização interna (94 – 127%) e calibração externa (95 – 123%).

Virgilio e colaboradores<sup>61</sup> avaliaram o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração na determinação de As, Cr e Ni em amostras de HNO<sub>3</sub> e

HCl concentrados por ICP-MS. Para fins comparativos as amostras também foram avaliadas pelos métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa. Assim como observado nos trabalhos anteriores<sup>51-53</sup> o método de adição de padrão interno apresentou precisões e exatidões comparáveis ou melhores que as obtidas para os métodos convencionais para todos os elementos.

### 3. OBJETIVOS

Esta tese de Doutorado teve como objetivo avaliar e implementar o método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas.

Avaliar o método de adição de padrão interno convencional na determinação de Ca e Mg em amostras de biodiesel e urina por espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua (HR-CS F AAS) e na determinação de ureia em urina por espectroscopia Raman.

Desenvolver e implementar o uso de sistemas em fluxo para automação do método de adição de padrão interno empregando um gradiente de concentração em fluxo. Avaliar o método na determinação de Na e K em amostras de biodiesel e urina por espectrometria de emissão atômica em chama (F AES) e na determinação de etanol em gasolina por espectroscopia Raman.

## **4. MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO: DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA**

### **4.1 Introdução**

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de óleo vegetal ou gordura animal e é uma fonte de energia alternativa promissora e ecologicamente correta para substituir combustíveis fósseis<sup>3</sup>. Entre os parâmetros de controle de qualidade do biodiesel estipulado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a resolução ANP n° 14 prevê os teores máximos permitidos de Ca e Mg<sup>62</sup>. A presença desses íons pode ocasionar problemas mecânicos como corrosão de peças e a desativação dos catalisadores. No contexto da análise química de biodiesel, a complexidade da matriz e a dificuldade no preparo da amostra<sup>3,63</sup> tornam difícil a tarefa de determinar essas espécies de forma simples e com precisão e exatidão satisfatória.

O conhecimento da composição química da urina é importante pois fornece informações relevantes sobre a saúde humana. Os teores de elementos majoritários como Ca e Mg servem como indicativo do funcionamento do nosso organismo e podem auxiliar no diagnóstico de doenças<sup>64</sup>. Porém a complexidade da matriz e a variação da composição química entre amostras diferentes implicam em um grande desafio analítico<sup>65</sup>.

A análise de amostras complexas como biodiesel e urina não é uma tarefa trivial e independente da técnica utilizada, a escolha do método de calibração torna-se um ponto crucial para o sucesso da análise.

O método de adição de padrão interno<sup>8</sup> é uma nova estratégia de calibração que possibilita corrigir problemas associados a variações em parâmetros instrumentais e efeitos de matriz. Este método combina os princípios dos métodos de adição de padrão e padronização interna e pode ser utilizado em técnicas compatíveis com amostras líquidas e que permitam medidas simultâneas ou sequenciais rápidas.

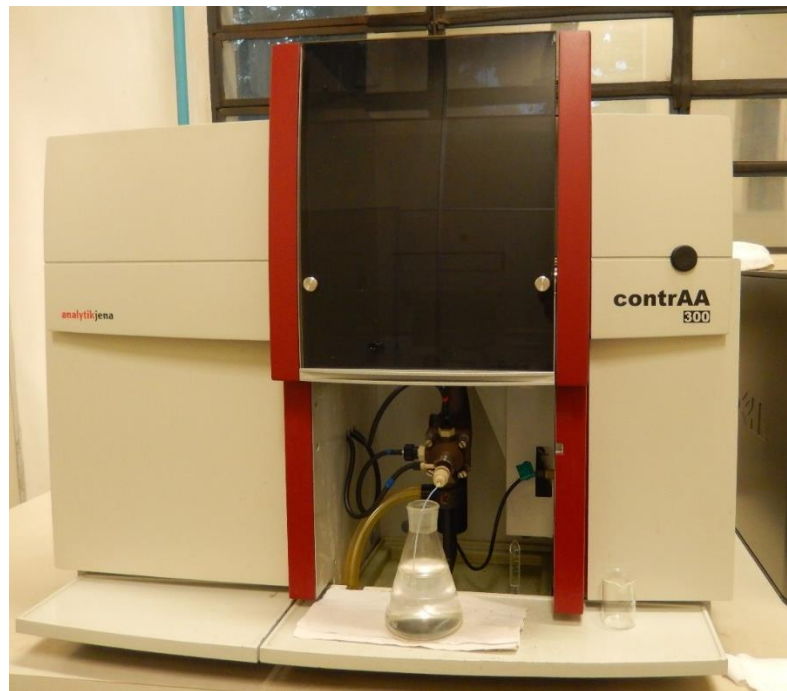
Como a HR-CS F AAS é uma técnica de detecção multi-elementar sequencial rápida e é compatível com a introdução de amostras líquidas, foi avaliada a

determinação de Ca e Mg em amostras de biodiesel e urina empregando o método de adição de padrão interno em HR-CS F AAS

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as determinações foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua (HR-CS F AAS) ContrAA 300® *Analytik Jena*, equipado com queimador com caminho óptico de 100 mm. Chama ar-acetileno foi utilizada para a atomização (Figura 1). Acetileno com grau de pureza 99,7% foi utilizado como gás combustível. A vazão otimizada de acetileno para Ca, Sr, Mg e Mn foi de 80 L h<sup>-1</sup>. As medidas (n=7) de absorbância foram integradas a 3 *pixels* nos seguintes comprimentos de onda: 422,672 nm (Ca - biodiesel), 239,855 nm (Ca - urina), 285,212 nm (Mg - biodiesel), 202,582 nm (Mg - urina), 279,826 nm (Mn) e 460,733 nm (Sr). A taxa de aspiração foi ajustada a uma vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup> e a altura de observação foi fixada em 7 mm.



**Figura 1** – Espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua.

**Fonte:** autor

As digestões ácidas dos materiais de referência certificados (CRM) foram realizadas em um forno micro-ondas Multiwave 3000 (Anton Paar) equipado com rotor de 48 posições e tubos de reação de PFA.

#### 4.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Todas as soluções aquosas empregadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5<sup>TM</sup> combinado com deionizador Millipore Milli-Q<sup>TM</sup> academic<sup>®</sup>.

Soluções analíticas foram preparadas por diluição apropriada de padrões espectroscópicos para absorção atômica 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol) de Ag, Bi, Ca, Co, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Sb e Sr. Todas as soluções foram acidificadas a 1% (V V<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> (J.T. Baker).

Soluções etanol/água contendo diferentes teores (0 a 95% V V<sup>-1</sup>) de etanol foram preparadas a partir da diluição apropriada de etanol destilado.

Solução estoque 5% (m V<sup>-1</sup>) de La foi preparada pela dissolução de 58,6 g de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck) em cerca de 250 mL de HCl 37% (Spectrum) e diluição a 1000 mL com água deionizada.

Para as digestões ácidas foram utilizados HNO<sub>3</sub> 70% (J.T. Baker) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% V V<sup>-1</sup> (Merck).

Frascos plásticos e vidrarias foram descontaminados por imersão em banho 10% (V V<sup>-1</sup>) de Extran por 24 h, lavagem com água deionizada, imersão em banho 10% (V V<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> por 24 h, lavagem com água deionizada. Em seguida esses materiais foram secos na capela e armazenados em local fechado.

#### 4.2.3 METODOLOGIA

As amostras de biodiesel foram adquiridas junto ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (CEMPEQC, Instituto de Química – UNESP, Araraquara) e armazenadas em frascos de vidro âmbar sob refrigeração (aproximadamente 5 °C).

O preparo das amostras de biodiesel e do padrão certificado de biodiesel (Conostan) consistiu em pesar aproximadamente 1,0 g de amostra diretamente em tubo de polipropileno (Corning). O conteúdo foi diluído em 5 mL de etanol destilado, seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado, 200  $\mu\text{L}$  da solução estoque de La e posteriormente diluído a 10 mL com etanol<sup>63,66</sup>.

As amostras de urina foram doadas por diferentes membros do grupo de pesquisa, essas foram acidificadas a 2% ( $V V^{-1}$ ) com  $\text{HNO}_3$  e armazenadas em frascos de polipropileno de alta densidade (Nalgene) sob refrigeração<sup>65</sup>. Alíquota de 2 mL de urina, 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado e 3 mL de solução estoque de La, foram sequencialmente adicionadas a um tubo de polipropileno e este foi avolumado a 30 mL com água deionizada.

Os materiais de referência certificados (CRMs) 1515 Apple Leaves, 1573a Tomato Leaves, 1568a Rice Flour, 1567a Wheat Flour, 1549 Non-Fat Milk Powder, 8435 Whole Milk Powder, 1577b Bovine Liver e 2976 Mussel Tissue (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) foram preparados por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas de acordo com o seguinte procedimento: aproximadamente 0,2 g de cada CRM foi precisamente pesado e transferido para os frascos do micro-ondas. Posteriormente, alíquotas de 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$ , 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 2,0 mL de água deionizada foram adicionados e a mistura submetida a um programa de aquecimento constituído de 5 etapas: (1) 15 min de 0 a 600 W; (2) 5 min a 600 W; (3) 15 min de 600 a 800 W; (4) 5 min a 800 W e (5) 20 min a 0 W (resfriamento). Após o resfriamento, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos e avolumados a 25 mL com água deionizada.

Os elementos Ag, Bi, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Sb e Sr foram avaliados como candidatos a padrões internos para Ca e/ou Mg. Nesse sentido, avaliou-se a influência da variação nas condições de atomização e de amostragem nas absorbâncias de todos os elementos acima.

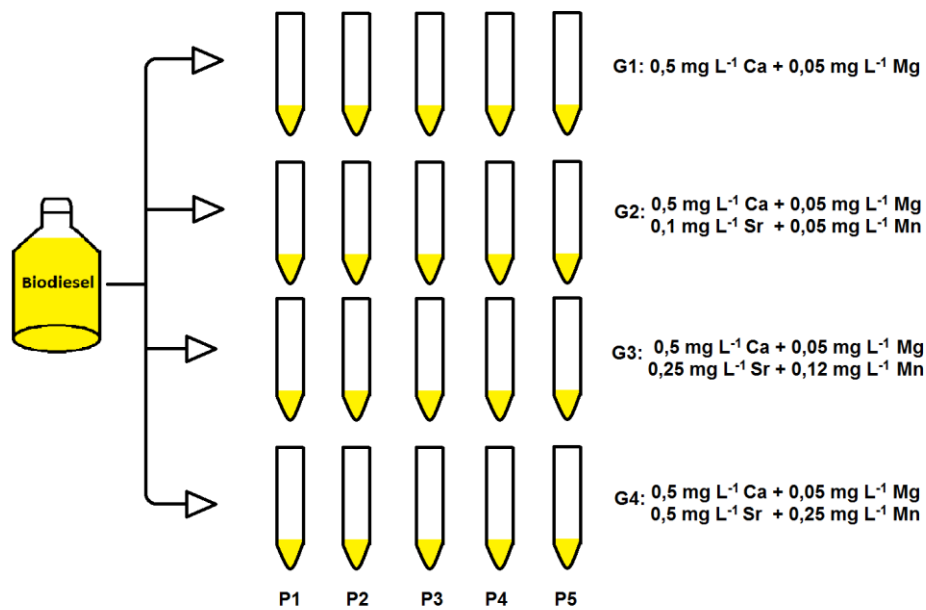
Diferentes condições de atomização foram obtidas a partir da variação da estequiometria da chama. Mantendo-se a taxa de aspiração e altura de observação constantes, variou-se a vazão de acetileno entre 40 e 120  $\text{L h}^{-1}$ ; em cada situação, mediu-se a absorbância de uma solução multielementar contendo 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  Mg; 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  K, Li, Na; 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  Mn; 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, Ni; 0,75  $\text{mg L}^{-1}$  Co; 1  $\text{mg L}^{-1}$  Ag, Bi, Ca, Fe, Sb, Sr. Diferentes taxas de amostragem foram obtidas por meio do preparo de

soluções contendo diferentes proporções etanol:água. Seis soluções multielementares ( $0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$ ;  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ K, Li, Na}$ ;  $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$ ;  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu, Ni}$ ;  $0,75 \text{ mg L}^{-1} \text{ Co}$ ;  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ag, Bi, Ca, Fe, Sb, Sr}$ ) foram preparadas em meio de 1% ( $V V^{-1}$ )  $\text{HNO}_3$  e diferentes teores de etanol (0, 20, 40, 60, 80 e 95%  $V V^{-1}$ ).

Os intervalos de resposta linear visando determinações de altas e baixas concentrações de Ca e Mg foram obtidos por meio da construção de curvas de resposta em suas linhas primárias (Ca:  $422,672 \text{ nm}$ ; Mg:  $285,212 \text{ nm}$ ) e secundárias (Ca:  $239,855 \text{ nm}$ ; Mg:  $202,582 \text{ nm}$ ), sendo os intervalos de concentrações estudados de 1 a  $10000 \mu\text{g L}^{-1}$  e de 0,5 a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Os intervalos de resposta linear para os padrões internos Mn ( $279,826 \text{ nm}$ ) e Sr ( $460,733 \text{ nm}$ ) foram obtidos por meio da construção de curvas de resposta de 1 a  $10000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A influência da concentração do modificador La na minimização da interferência de fosfato, foi avaliada no intervalo de 0,1 a 2% ( $m V^{-1}$ ) nas determinações de Ca e Mg em amostras de biodiesel e urina.

Considerando que as amostras podem vir/ ou não a conter a presença do padrão interno em sua composição foi avaliado o desempenho do método de adição de padrão interno, frente a uma amostra de biodiesel enriquecida com diferentes concentrações dos padrões internos (Mn e Sr). Para isso foram preparadas vinte soluções contendo aproximadamente 1,0 g de biodiesel cada. Estas soluções foram divididas em quatro grupos (G1-G4, Figura 2), sendo que cada conjunto de soluções foi preparado de modo a conter  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca} + 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Sr, Mn}$  (G1),  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Sr} + 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Mn}$  (G2),  $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Sr} + 0,12 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Mn}$  (G3) e  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Sr} + 0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Mn}$  (G4). A cada grupo foram adicionadas quantidades crescentes de Ca, Sr, Mg e Mn de modo a preparar soluções (P1-P5) contendo:  $0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr, Mg, Mn}$  (P1);  $0,10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr} + 0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$  (P2);  $0,250 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr} + 0,025 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,125 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$  (P3);  $0,40 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr} + 0,04 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$  (P4);  $0,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr} + 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$  (P5). As curvas de adição de padrão interno foram construídas para cada grupo e as recuperações de Ca e Mg foram calculadas.



**Figura 2** - Esquema do preparo das amostras para avaliar o desempenho do método de adição de padrão interno contendo diferentes níveis de enriquecimento de Sr e Mn.

**Fonte:** autor

Após as otimizações do método de adição de padrão interno, Ca e Mg foram determinados em cinco amostras de biodiesel e cinco amostras de urina.

A exatidão da estratégia de calibração foi avaliada por meio da análise de nove CRMs e testes de adição e recuperação nas amostras de biodiesel e urina. Para os testes de adição e recuperação alíquotas apropriadas de soluções padrão de Ca e Mg foram adicionadas às amostras de modo a conter  $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$  em biodiesel;  $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$  em urina;  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$  em biodiesel;  $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$  em urina.

Para fins comparativos, todas as amostras e CRMs foram também analisadas empregando os métodos de adição de padrão, calibração externa e padronização interna.

#### 4.2.3.1 Determinação de Ca e Mg em biodiesel

O procedimento do método de adição de padrão interno para determinar Ca e Mg envolveu o preparo de seis soluções a partir de uma amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados 1,0 g de biodiesel, 5 mL de etanol, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ , 200  $\mu\text{L}$  da solução de La, e quantidades apropriadas dos padrões de Ca, Mg, Mn e Sr para que, após diluição a 10 mL com etanol, fossem produzidas soluções

contendo  $0,1 - 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca, Sr} + 0,01 - 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,05 - 0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$ . As curvas de adição de padrão interno foram construídas graficamente a partir das razões das absorvâncias  $A^{\text{Ca}}/A^{\text{Sr}}$  e  $A^{\text{Mg}}/A^{\text{Mn}}$  versus o inverso das concentrações dos padrões internos.

No método de adição de padrão, o procedimento envolveu o preparo de seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados  $1,0 \text{ g}$  de biodiesel,  $5 \text{ mL}$  de etanol,  $100 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ ,  $200 \mu\text{L}$  da solução de La, e quantidades apropriadas dos padrões de Ca e Mg para que, após diluição a  $10 \text{ mL}$  com etanol, fossem produzidas soluções contendo  $0,1 - 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$  e  $0,01 - 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$ .

As calibrações externas foram feitas a partir de soluções analíticas em um intervalo de  $0,1$  a  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$  e  $0,01$  a  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$ . Todas as soluções foram preparadas em meio de  $1\% (V V^{-1}) \text{ HNO}_3$  e  $0,1\% (m V^{-1}) \text{ La}$ .

A calibração por padronização interna, envolveu o preparo de brancos, soluções analíticas ( $0,1$  a  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$ ;  $0,01$  a  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$ ) e amostras de modo a conter  $1\% (V V^{-1}) \text{ HNO}_3 + 0,1\% (m V^{-1}) \text{ La} + 0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn} + 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Sr}$ . As curvas de calibração foram construídas utilizando a razão das absorvâncias  $A^{\text{Ca}}/A^{\text{Sr}}$  e  $A^{\text{Mg}}/A^{\text{Mn}}$  versus  $[\text{Ca}]$  e  $[\text{Mg}]$ , respectivamente.

#### 4.2.3.2 Determinação de Ca e Mg em urina

O procedimento do método de adição de padrão interno para determinar Ca e Mg envolveu o preparo de seis soluções a partir de uma amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados  $2,0 \text{ mL}$  de urina,  $300 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ ,  $3,0 \text{ mL}$  da solução de La, e quantidades apropriadas dos padrões de Ca, Mg, Mn e Sr para que, após diluição a  $30 \text{ mL}$  com água deionizada, fossem produzidas soluções contendo  $5 - 20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca} + 0,1 - 0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Sr} + 1 - 10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg} + 0,5 - 5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}$ . As curvas de adição de padrão interno foram construídas graficamente a partir das razões das absorvâncias  $A^{\text{Ca}}/A^{\text{Sr}}$  e  $A^{\text{Mg}}/A^{\text{Mn}}$  versus o inverso das concentrações dos padrões internos.

No método de adição de padrão, o procedimento envolveu o preparo de seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados  $2,0 \text{ mL}$  de urina,  $300 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ ,  $3,0 \text{ mL}$  da solução de La, e quantidades

apropriadas dos padrões de Ca e Mg para que, após diluição a 30 mL água deionizada, fossem produzidas soluções contendo 5 - 20 mg L<sup>-1</sup> Ca e 1 - 10 mg L<sup>-1</sup> Mg.

As calibrações externas foram feitas a partir de soluções analíticas em um intervalo de 5 a 20 mg L<sup>-1</sup> Ca e 1 a 20 mg L<sup>-1</sup> Mg. Todas as soluções foram preparadas em meio de 1% (V V<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> e 0,5% (m V<sup>-1</sup>) La.

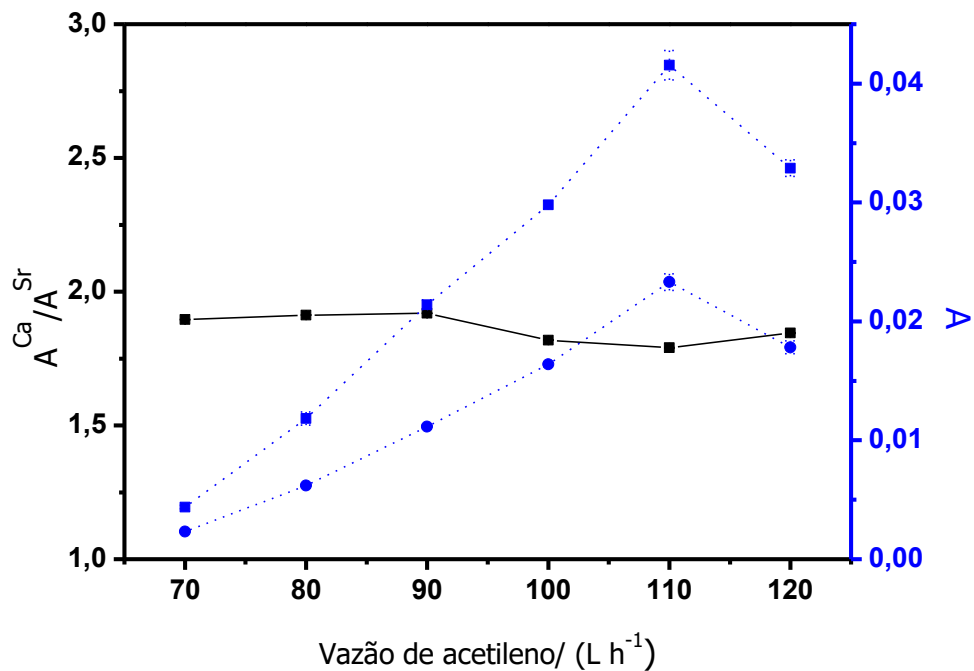
A calibração por padronização interna, envolveu o preparo de brancos, soluções analíticas (5 a 20 mg L<sup>-1</sup> Ca; 1 a 20 mg L<sup>-1</sup> Mg) e amostras de modo a conter 1% (V V<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> + 0,5% (m V<sup>-1</sup>) La + 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mn + 0,5 mg L<sup>-1</sup> Sr. As curvas de calibração foram construídas utilizando a razão das absorvâncias  $A^{Ca}/A^{Sr}$  e  $A^{Mg}/A^{Mn}$  versus [Ca] e [Mg], respectivamente.

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 SELEÇÃO DOS PADRÕES INTERNOS

Os elementos Ag, Bi, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Sb e Sr foram avaliados como candidatos a padrões internos para Ca e/ou Mg. O critério de seleção utilizado foi avaliar o comportamento desses elementos frente as variações nas condições de atomização e de amostragem. Dentre os elementos estudados como candidatos a padrões internos, são apresentados apenas os resultados associados aos de melhor desempenho (Sr e Mn).

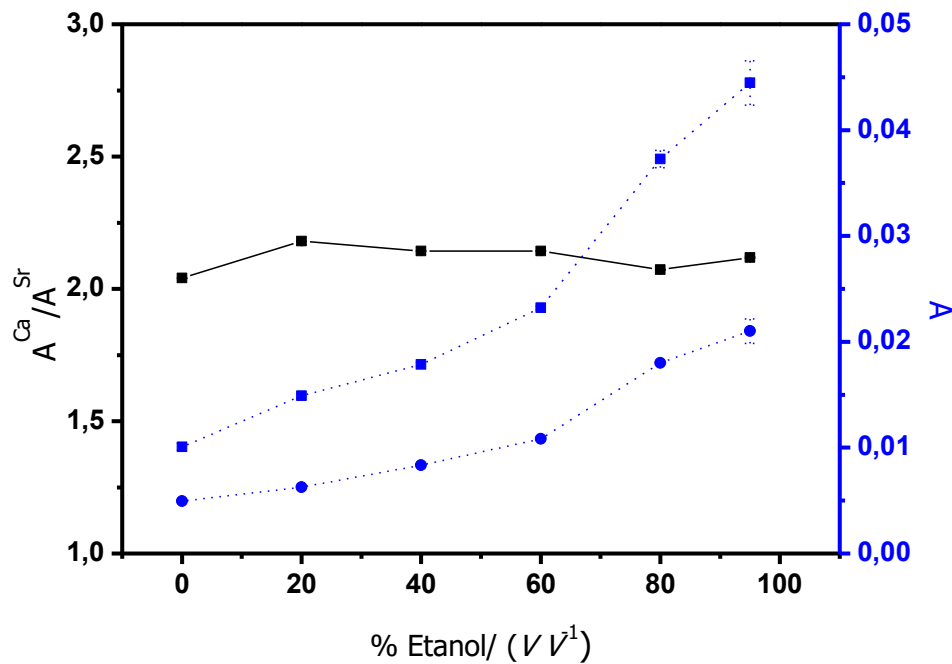
O elemento que apresentou um comportamento mais próximo ao do Ca foi o Sr<sup>67,68</sup>. A influência da variação da vazão de acetileno nas absorvâncias de Ca e Sr e na razão das absorvâncias está apresentada na Figura 3. Observa-se na figura que as absorvâncias dos dois elementos são afetadas de modo semelhante (aumento gradativo) com a mudança da estequiometria da chama (chama mais redutora), sendo está afirmação evidenciado pelo uso das razões das absorvâncias, onde o sinal permanece praticamente constante. Esse efeito pode ser explicado em termos de mecanismos de atomização, uma vez que ambos são atomizados preferencialmente via óxido e as suas energias de dissociação são bem próximas: 363,3 ± 50 kJ mol<sup>-1</sup> (CaO) e 426,3 ± 6,3 kJ mol<sup>-1</sup> (SrO)<sup>69</sup>.



**Figura 3** - Influência da vazão de acetileno nas absorvâncias Ca (-■-) e Sr (-●-) e na razão das absorvâncias de Ca/Sr (-■-).

**Fonte:** autor

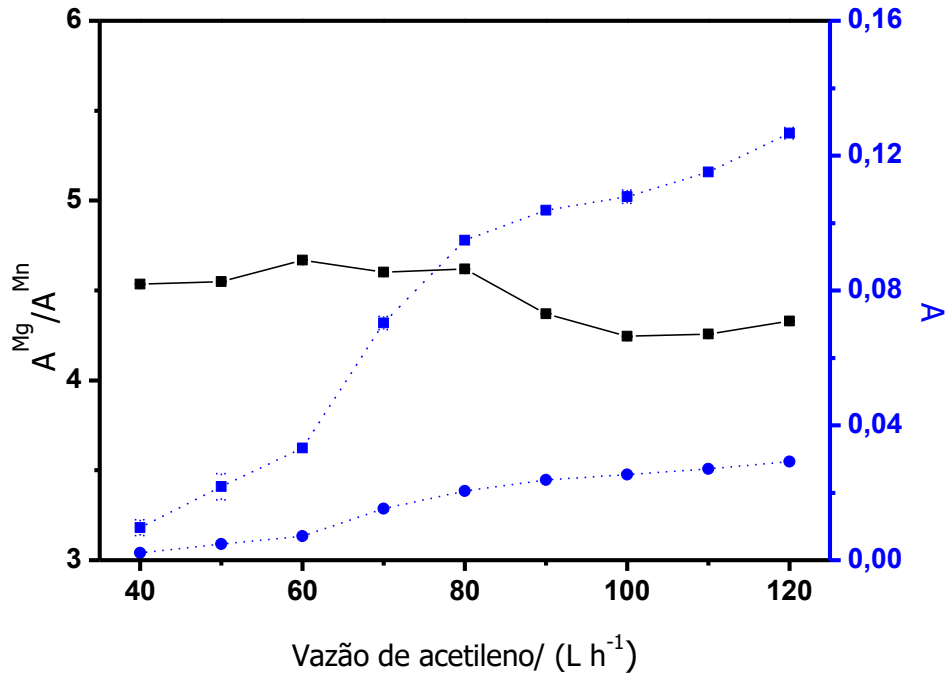
O uso do etanol como diluente do biodiesel – estratégia adotada como preparo das amostras – embora seja uma alternativa mais barata e segura que o xileno<sup>63,66</sup>, pode causar efeitos de transporte e constituir em uma fonte de erro. Nesse sentido avaliou-se a influência da variação do teor de etanol nas absorvâncias de Ca e Sr (Figura 4). Análise da figura revela que ambos os elementos sofrem um acréscimo em suas absorvâncias atribuído ao aumento da temperatura da chama e pela diminuição da tensão superficial da solução. O aumento da temperatura da chama em presença de etanol aumenta a taxa de atomização de Ca e Sr; e a diminuição da tensão superficial da solução facilita a nebulização da mesma, aumentando a população de átomos de Ca e Sr na chama<sup>70</sup>. Com o aumento dos teores de etanol, ocorre também um aumento na viscosidade da solução, reduzindo a taxa de aspiração do nebulizador<sup>71</sup>. Porém, os efeitos do aumento da temperatura da chama e da diminuição da tensão superficial suplantam esse efeito, cujo resultado líquido é o aumento nas absorvâncias dos elementos com o aumento dos teores de etanol. Este aumento nas absorvâncias ocorre de modo semelhante para ambos elementos, sendo este comportamento melhor expresso por meio da razão das absorvâncias que permanecem praticamente constante.



**Figura 4** - Influência do teor de etanol nas absorvâncias Ca (■-) e Sr (●-) e na razão das absorvâncias de Ca/Sr (■-).

**Fonte:** autor

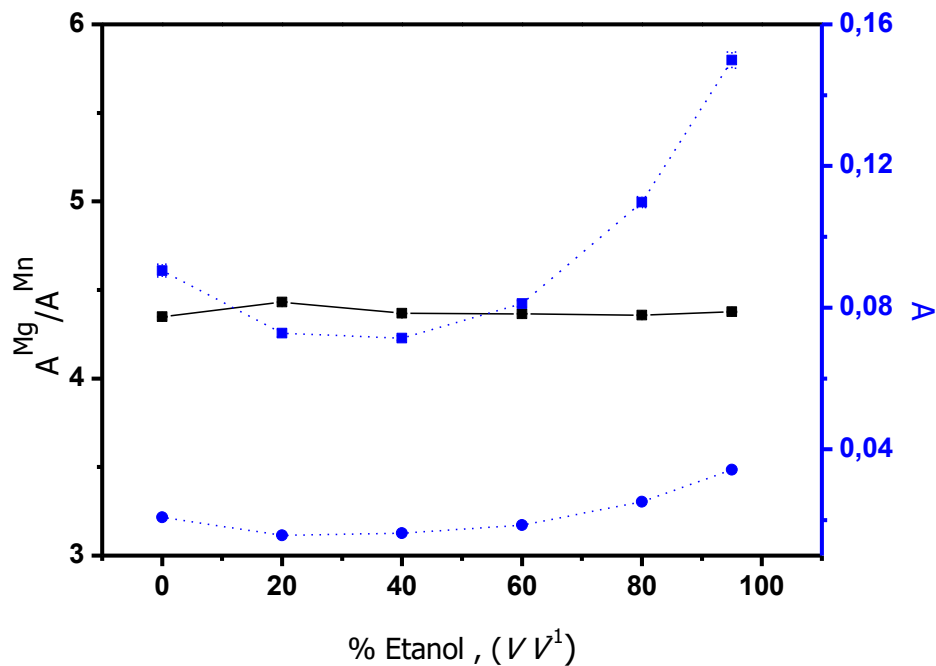
O elemento que apresentou comportamento mais semelhante ao do Mg foi o Mn, como pode ser observado na Figura 5. Análise da figura mostra que com a variação na vazão de acetileno ambos elementos tem um acréscimo acentuado na absorvância até uma vazão de 80 L h<sup>-1</sup>, seguido de um pequeno aumento nas absorvâncias até 120 L h<sup>-1</sup>. O uso da padronização minimiza as variações na vazão de acetileno entre 40 e 80 L h<sup>-1</sup>, como pode ser observado nas razões das absorvâncias. Assim como para Ca e Sr, esse comportamento também pode ser explicado em termos de mecanismos de atomização, uma vez que ambos são atomizados preferencialmente via óxido e as suas energias de dissociação são próximas 358,2 ± 7,2 kJ mol<sup>-1</sup> (MgO) e 362 ± 25 kJ mol<sup>-1</sup> (MnO)<sup>69</sup>.



**Figura 5** - Influência da vazão de acetileno nas absorvâncias Mg (-■-) e Mn (-●-) e na razão das absorvâncias de Mg/Mn (-■-).

**Fonte:** autor

A influência da variação do teor de etanol nas absorvâncias de Mg e Mn estão ilustradas na Figura 6. Análise dessa figura revela que inicialmente ambos os elementos sofrem um decréscimo em suas absorvâncias até 40% V V<sup>-1</sup> de etanol, devido ao aumento na viscosidade da solução, reduzindo a taxa de aspiração do nebulizador<sup>67</sup>. Em seguida há um aumento gradativo nas absorvâncias em soluções maiores que 40% V V<sup>-1</sup> de etanol, causados pelo aumento da temperatura da chama e da diminuição da tensão superficial<sup>68</sup>. No entanto, quando utilizado as razões das absorvâncias de Mg e Mn, observa-se que o sinal permanece praticamente constante, indicando que a padronização interna pode corrigir efeitos causados por variações na concentração de etanol da solução.



**Figura 6** - Influência do teor de etanol nas absorvâncias Mg (-■-) e Mn (-●-) e na razão das absorvâncias de Mg/Mn (-■-).

**Fonte:** autor

Tanto nas variações da composição da chama quanto no teor de etanol, Ca/Sr e Mg/Mn foram influenciados de modo semelhante, o que demonstra que Sr e Mn pode ser bons padrões internos nas determinações de Ca e Mg, respectivamente.

#### 4.3.2 INTERVALO DE RESPOSTA LINEAR

Tendo em vista os teores médios de Ca e Mg usualmente encontrados em amostras de biodiesel<sup>61,62</sup> e de urina<sup>63</sup>, foi necessário estabelecer os intervalos de resposta linear para esses analitos em suas linhas primárias e secundárias visando as determinações em baixas (biodiesel) e altas (urina) concentrações. Como o fundamento teórico do método de adição de padrão interno prevê variações nas concentrações do padrão interno e do(s) analito(s), torna-se necessário conhecer também os intervalos de resposta linear para o(s) padrão(ões) interno(s). Os intervalos de resposta linear para Ca, Mg, Mn e Sr e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) associados às linhas selecionadas são apresentados na Tabela 1. Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando 3 e 10 vezes o

desvio padrão de 10 brancos independentes dividido pelos coeficientes angulares das curvas, respectivamente.

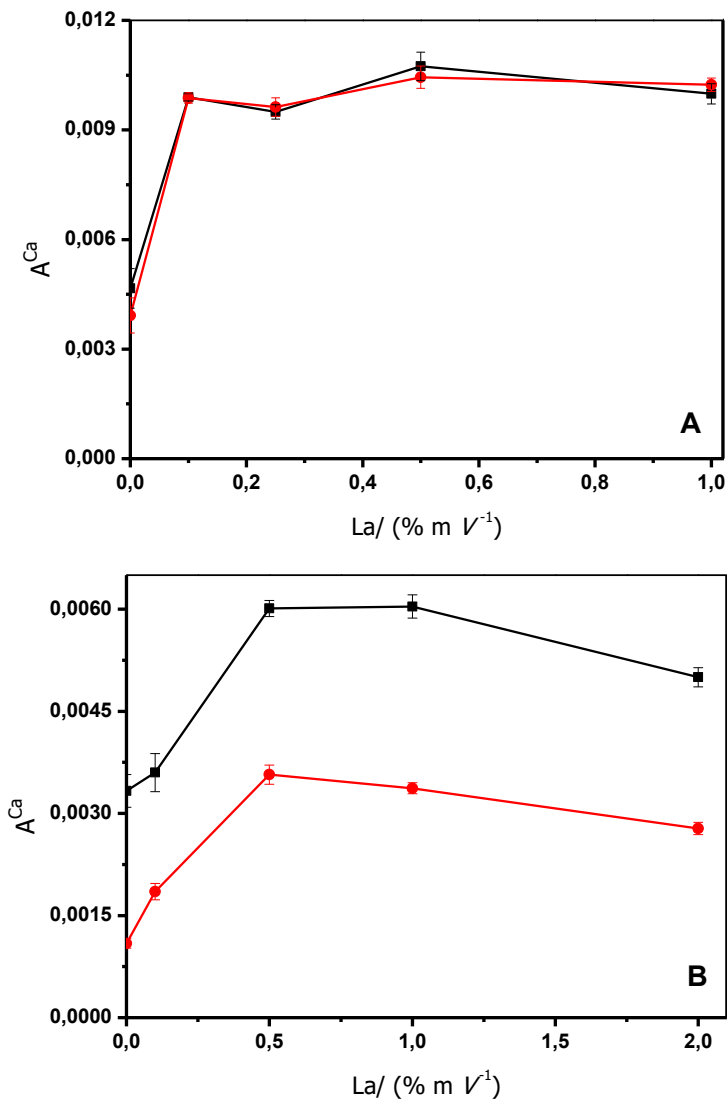
**Tabela 1** - Intervalos de resposta linear e principais parâmetros analíticos para Ca, Mg, Mn e Sr.

Elemento	Linha/ (nm)	Intervalo linear/ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LD/ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ/ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Ca	422,672	21 – 2500	6	21
Ca	239,855	2000 - 100000	600	2000
Mg	285,212	2,8 – 500	0,8	2,8
Mg	202,582	200 - 20000	60	200
Mn	279,826	6,3 – 5000	1,9	6,3
Sr	460,733	26 – 5000	8	26

**Fonte:** autor

#### 4.3.3 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LANTÂNIO

O Ca presente nas amostras de biodiesel e urina em presença de fosfato tende a formar  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . A energia fornecida pela chama ar-acetileno não é suficiente para que haja a quebra das ligações deste composto refratário. Para minimizar ou eliminar esse tipo de interferência, La é comumente utilizado porque forma ligações mais estáveis com o íon fosfato, liberando o Ca para ser atomizado<sup>72</sup>. Devido a presença de fosfato nas amostras de biodiesel e urina, a concentração de La foi otimizada. Para isso, duas amostras de biodiesel (Figura 7A) e de urina (Figura 7B) foram preparadas em diferentes quantidades de La (0,1 – 2% m  $V^{-1}$ ). Análise da Figura 6A revela que apenas 0,1% (m  $V^{-1}$ ) de La foi suficiente para eliminar tal interferência em virtude das baixas concentrações de fosfato usualmente presentes em biodiesel. Em relação as amostras de urina, a presença de 0,5% (m  $V^{-1}$ ) La (Figura 7B) foi suficiente para minimizar a interferência de fosfato. A presença de La não exerceu nenhuma influência nas medidas de absorvância do Mg.



**Figura 7** - Otimização da concentração de La em A) amostras de biodiesel: (-■-) biodiesel 4 (-●-) biodiesel 5 e B) amostras de urina: (-■-) urina 2 (-●-) urina 4.

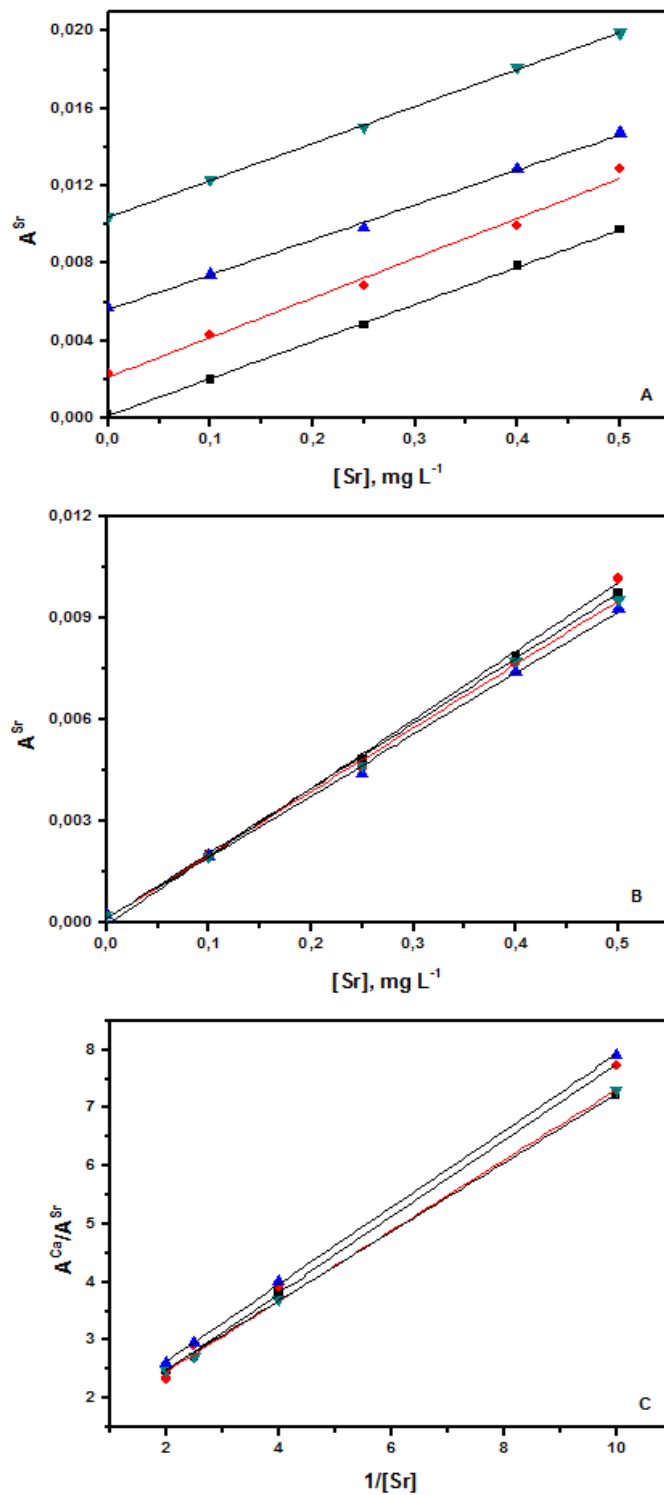
**Fonte:** autor

#### 4.3.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO INTERNO NO DESEMPENHO DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO

Os elementos utilizados como padrões internos podem estar ou não presentes naturalmente nas amostras originais. Sabe-se que variações significativas nas concentrações do padrão interno afetam de modo substancial o desempenho da padronização interna (convencional). Assim, foi feito um estudo para avaliar a

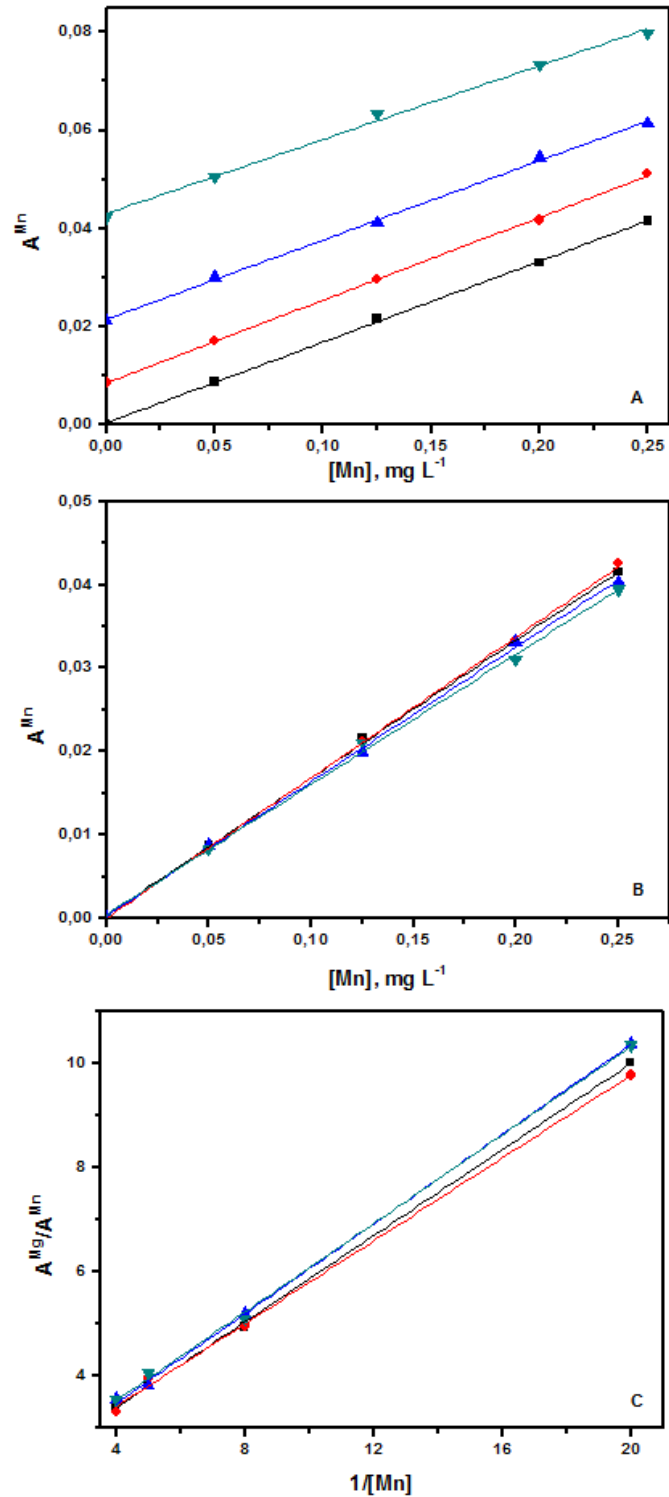
influência da variação da concentração do Sr e Mn no desempenho do método de adição de padrão interno. Vinte soluções foram preparadas e divididas em quatro grupos (G1 - G4). As soluções foram preparadas de modo a conter: 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ca + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0 mg L<sup>-1</sup> Sr, Mn (G1); 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ca + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Sr + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de Mn (G2); 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ca + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,25 mg L<sup>-1</sup> de Sr + 0,12 mg L<sup>-1</sup> de Mn (G3); 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ca + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Sr + 0,25 mg L<sup>-1</sup> de Mn (G4). A cada grupo foram adicionadas quantidades crescentes de Ca, Sr, Mg e Mn visando a calibração com cinco soluções (P1 - P5) contendo 0 mg L<sup>-1</sup> Ca, Sr, Mg, Mn (P1); 0,10 mg L<sup>-1</sup> Ca, Sr + 0,01 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mn (P2); 0,250 mg L<sup>-1</sup> Ca, Sr + 0,025 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,125 mg L<sup>-1</sup> Mn (P3); 0,40 mg L<sup>-1</sup> Ca, Sr + 0,04 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,20 mg L<sup>-1</sup> Mn (P4); 0,50 mg L<sup>-1</sup> Ca, Sr + 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mg + 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mn (P5).

As absorvâncias de Sr (Fig 8A) e Mn (Fig. 9A) correspondentes a solução P1 foram utilizadas como branco analítico, e foram utilizadas para corrigir as absorvâncias das demais soluções P2 – P5 (Fig. 8B e 9B) para cada um dos grupos. As absorvâncias correspondentes ao Sr e Mn naturalmente presentes nas amostras (branco) devem ser subtraídas. Caso contrário, a real concentração do padrão interno não é conhecida e os parâmetros  $1/[Sr]$  ou  $1/[Mn]$  não refletirão as quantidades adicionadas dos padrões internos. Quando se fez essa correção, as curvas representadas nas Figuras 8B, 8C, 9B e 9C deveriam, em princípio, serem totalmente sobrepostas. Análise destas figuras revelam uma pequena variação em seus coeficientes angulares. Essas variações não afetaram a exatidão porque está ao nível dos erros obtidos nas medidas de absorção atômica desses elementos em amostras de biodiesel. A partir das absorvâncias líquidas (descontadas do branco), foram construídos os seguintes gráficos:  $A^{Ca}/A^{Sr}$  vs  $1/[Sr]$  (Fig. 8C) e  $A^{Mg}/A^{Mn}$  vs  $1/[Mn]$  (Fig. 9C). Pode-se observar que as curvas obtidas proporcionaram boas recuperações: 87 - 98% para Ca; 90 - 112% para Mg (Tabela 2), considerando que para estas concentrações são aceitáveis recuperações entre 80 e 110%<sup>73</sup>. Esse estudo indica que o padrão interno, mesmo que presente naturalmente na amostra, não exerce influência significativa na exatidão do método. Contudo, deve ser realçado que a concentração total (concentração do padrão interno presente na amostra + concentração do padrão interno adicionado), deve estar dentro do intervalo de resposta linear do elemento.



**Figura 8** - Influência de diferentes concentrações de Sr na determinação de Ca pelo método de adição de padrão interno. A) absorvâncias referentes as adições de Sr a G1 (-■-), G2 (-●-), G3(-▲-) e G4(-▼-), B) absorvâncias descontadas referente as adições de Sr a G1-G4, C) curvas da adição de padrão interno para Ca utilizando os valores das absorvâncias descontadas de Sr.

Fonte: autor



**Figura 9** - Influência de diferentes concentrações de Mn na determinação de Mg pelo método de adição de padrão interno. A) absorvâncias referentes às adições de Mn a G1 (-■-), G2 (-●-), G3(-▲-) e G4(-▼-), B) absorvâncias descontadas referente às adições de Mn a G1-G4, C) curvas da adição de padrão interno para Mg utilizando os valores das absorvâncias descontadas de Mn.

Fonte: autor

**Tabela 2** – Recuperações (%) obtidas para Ca e Mg na ausência e na presença de diferentes concentrações dos padrões internos.

<b>Amostra de biodiesel</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
0 mg L <sup>-1</sup> Sr + 0 mg L <sup>-1</sup> Mn	95	90
0,1 mg L <sup>-1</sup> Sr + 0,05 mg L <sup>-1</sup> Mn	87	112
0,25 mg L <sup>-1</sup> Sr + 0,12 mg L <sup>-1</sup> Mn	98	100
0,5 mg L <sup>-1</sup> Sr + 0,25 mg L <sup>-1</sup> Mn	93	97

**Fonte:** autor

#### 4.3.5 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO

##### 4.3.5.1 Materiais de referência certificados

Após a otimização do método de adição de padrão interno sua exatidão foi avaliada por meio da análise de oito materiais de referência certificados e um padrão de biodiesel certificado. Para fins comparativos, os analitos foram também determinados nestes CRMs empregando os métodos de calibração externa, adição de padrão e padronização interna.

Os resultados das determinações de Ca e Mg nos materiais de referência certificados são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3** - Resultados (% m m<sup>-1</sup>) da determinação (n=3) de Ca em CRMs empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Valor Certificado</b>	<b>Calibração externa</b>	<b>Padronização interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel	2,5 *	6,29 ± 0,20 *	2,71 ± 0,18 *	2,91 ± 0,10 *	2,53 ± 0,13 *
Bovine Liver	116 ± 4 *	155 ± 43 *	135 ± 21 *	119 ± 11 *	125 ± 6 *
Mussel Tissue	0,76 ± 0,03	0,99 ± 0,09	0,82 ± 0,06	0,66 ± 0,06	0,85 ± 0,07
Non Fat Milk Powder	1,30 ± 0,05	1,70 ± 0,25	1,52 ± 0,16	1,40 ± 0,20	1,25 ± 0,15
Whole Milk Powder	0,922 ± 0,049	1,130 ± 0,099	1,087 ± 0,078	1,052 ± 0,115	1,04 ± 0,100
Rice Flour	0,0118 ± 0,0006	0,0112 ± 0,0012	0,0120 ± 0,0011	0,0107 ± 0,0006	0,0110 ± 0,0006
Wheat Flour	0,0191 ± 0,0004	0,0210 ± 0,0031	0,0199 ± 0,0026	0,0165 ± 0,0005	0,0189 ± 0,0010
Tomato Leaves	5,05 ± 0,09	6,13 ± 0,44	5,26 ± 0,28	5,18 ± 0,09	5,19 ± 0,13
Apple Leaves	1,526 ± 0,015	2,11 ± 0,25	1,70 ± 0,19	1,535 ± 0,092	1,585 ± 0,050

\* Valores expressos em mg Kg<sup>-1</sup>

Fonte: autor

**Tabela 4** - Resultados (% m m<sup>-1</sup>) da determinação (n=3) de Mg em CRMs empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

Amostras	Valor Certificado	Calibração externa	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
Biodiesel	2,5 *	2,86 ± 0,10 *	2,46 ± 0,11 *	2,81 ± 0,15 *	2,60 ± 0,15 *
Bovine Liver	601 ± 28 *	582 ± 35 *	631 ± 21 *	674 ± 37 *	648 ± 25 *
Mussel Tissue	0,53 ± 0,05	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,58 ± 0,03
Non Fat Milk Powder	0,120 ± 0,003	0,110 ± 0,014	0,133 ± 0,011	0,138 ± 0,015	0,130 ± 0,005
Whole Milk Powder	814 ± 76 *	815 ± 74 *	881 ± 65 *	1009 ± 71 *	906 ± 42 *
Rice Flour	0,056 ± 0,002	0,047 ± 0,006	0,042 ± 0,005	0,056 ± 0,005	0,054 ± 0,005
Wheat Flour	0,040 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,035 ± 0,003	0,050 ± 0,005	0,046 ± 0,004
Tomato Leaves	1,2	1,17 ± 0,08	0,88 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,21 ± 0,08
Apple Leaves	0,271 ± 0,008	0,286 ± 0,027	0,269 ± 0,021	0,282 ± 0,045	0,291 ± 0,024

\* Valores expressos em mg Kg<sup>-1</sup>

Fonte: autor

A análise destes resultados mostra que para a calibração externa os resultados obtidos para Ca nos CRMS *Whole Milk Powder* e *Mussel Tissue*, e para Ca e Mg em biodiesel não foram concordantes com os valores certificados a nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* de *Student*. Para o biodiesel a concentração de Ca determinada foi aproximadamente 2,5 vezes maior que o valor certificado, provavelmente devido ao aumento da sensibilidade causado pelo aumento da temperatura da chama, uma vez que o etanol é utilizado como diluente da amostra. Já a concentração de Mg é apenas 1,14 vezes maior que o valor certificado, provavelmente porque o aumento da sensibilidade do Mg é suplantado pela diminuição da taxa de aspiração causada pelo aumento da viscosidade da amostra.

Para a padronização interna, todos os valores determinados para Ca foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t Student*). Para Mg apenas três CRMs apresentaram concentrações menores que os valores certificados. Esses valores subestimados ocorreram provavelmente por causa da presença de Mn

(padrão interno) na composição das amostras: *Mussel Tissue* (25  $\mu\text{g L}^{-1}$  Mn, 87% de recuperação), *Rice Flour* (53  $\mu\text{g L}^{-1}$  Mn, 75% de recuperação) e *Tomato Leaves* (98  $\mu\text{g L}^{-1}$  Mn, 73% de recuperação).

Os valores das concentrações de Ca e Mg determinadas empregando o método de adição de padrão foram próximos aos valores certificados. No entanto, alguns resultados (Ca em biodiesel e *Wheat Flour*, e Mg em *Whole Milk Powder*) não foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t Student*). Estes resultados não concordantes podem ter ocorridos provavelmente devido o excessivo manuseio no preparo das soluções, o que torna o método de adição de padrão mais suscetível a erros aleatórios.

Para o método de adição de padrão interno, todos os valores obtidos para Ca e Mg foram concordantes ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* de *Student*. Os desvios padrões relativos (RSDs) foram de 6% para Ca e Mg, sendo estes, melhores que os calculados para calibração externa (12% Ca e 9% Mg), padronização interna (9% Ca e 7% Mg) e adição de padrão (7% Ca e 8% Mg). Os efeitos negativos na precisão e exatidão causados por erros aleatórios, flutuações analíticas, parâmetros físicos químicos (composição da chama, taxa de aspiração) e devido a presença de Mn na composição das amostras são minimizados pela combinação da padronização interna com a adição de padrão no método de adição de padrão interno.

#### 4.3.5.2 Biodiesel

O método de adição de padrão interno foi aplicado na determinação de Ca e Mg em cinco amostras de biodiesel. Para fins comparativos, os analitos também foram determinados nestas amostras empregando a calibração externa, a adição de padrão e a padronização interna.

Os resultados da determinação de Ca e Mg são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Resultados ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) da determinação de Ca em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	$1,59 \pm 0,44$	$0,70 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,03$
Biodiesel 2	$2,34 \pm 0,56$	$1,00 \pm 0,11$	$1,15 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,04$
Biodiesel 3	$2,33 \pm 0,70$	$1,01 \pm 0,16$	$1,19 \pm 0,15$	$1,05 \pm 0,10$
Biodiesel 4	$2,80 \pm 0,28$	$1,17 \pm 0,13$	$1,28 \pm 0,13$	$1,20 \pm 0,04$
Biodiesel 5	$3,22 \pm 0,23$	$1,39 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,11$	$1,46 \pm 0,06$

Fonte: autor

**Tabela 6** - Resultados ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) da determinação de Mg em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Biodiesel 2	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Biodiesel 3	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Biodiesel 4	$0,128 \pm 0,004$	$0,108 \pm 0,003$	$0,120 \pm 0,007$	$0,110 \pm 0,002$
Biodiesel 5	$0,125 \pm 0,016$	$0,112 \pm 0,003$	$0,121 \pm 0,006$	$0,116 \pm 0,004$

Fonte: autor

A análise das tabelas revela que os valores das concentrações de Ca e Mg seguem a mesma tendência observada para o padrão certificado de biodiesel. Os valores obtidos pelo método de adição de padrão interno foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t* pareado) com os valores obtidos pelos métodos de adição de padrão e padronização interna. No entanto, os resultados obtidos para a calibração externa foram estatisticamente diferentes dos resultados obtidos pelos outros métodos de calibração.

As concentrações de Ca e Mg determinadas nas amostras de biodiesel estavam dentro dos limites permitidos pela ANP (soma das concentrações de Ca e  $\text{Mg} \leq 5 \text{mg kg}^{-1}$ )<sup>62</sup>.

Os desempenhos dos métodos foram também avaliados por meio de testes de adição e recuperação dos analitos. Alíquotas apropriadas de soluções padrão de Ca

e Mg foram adicionadas nas amostras de biodiesel de modo a conter  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  Ca e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  Mg.

As recuperações obtidas para Ca e Mg podem ser observadas nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Ca em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	$234 \pm 27$	$102 \pm 11$	$107 \pm 9$	$94 \pm 2$
Biodiesel 2	$220 \pm 28$	$107 \pm 15$	$97 \pm 5$	$99 \pm 3$
Biodiesel 3	$291 \pm 21$	$112 \pm 11$	$121 \pm 8$	$93 \pm 2$
Biodiesel 4	$219 \pm 11$	$101 \pm 5$	$127 \pm 6$	$109 \pm 4$
Biodiesel 5	$283 \pm 76$	$100 \pm 10$	$127 \pm 10$	$109 \pm 5$

**Fonte:** autor

**Tabela 8** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Mg em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	$111 \pm 5$	$100 \pm 4$	$111 \pm 2$	$100 \pm 5$
Biodiesel 2	$119 \pm 8$	$98 \pm 2$	$115 \pm 2$	$105 \pm 2$
Biodiesel 3	$116 \pm 7$	$105 \pm 3$	$108 \pm 15$	$105 \pm 1$
Biodiesel 4	$113 \pm 5$	$100 \pm 2$	$113 \pm 2$	$103 \pm 2$
Biodiesel 5	$120 \pm 7$	$104 \pm 3$	$106 \pm 17$	$106 \pm 6$

**Fonte:** autor

As recuperações obtidas para Ca e Mg seguem a mesma tendência observadas para as amostras de biodiesel e padrão de biodiesel certificado. As melhores exatidões foram obtidas com os métodos de adição de padrão interno (93 – 109% Ca e 100 – 106% Mg) e padronização interna (100 – 112% Ca e 98 – 105% Mg), seguido do método de adição de padrão (97 -127% Ca e 106 – 115% Mg) e calibração externa (219 - 291% Ca e 111 - 120% Mg).

#### 4.3.5.3 Urina

Por fim o método de adição de padrão interno foi empregado na determinação de Ca e Mg em cinco amostras de urina.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

**Tabela 9** - Resultados ( $\text{mg L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Ca em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

Amostras	Calibração	Padronização	Adição de	Adição de
	Externa	Interna	padrão	padrão interno
Urina 1	142 ± 10	140 ± 7	152 ± 5	150 ± 4
Urina 2	91 ± 3	90 ± 2	91 ± 4	86 ± 4
Urina 3	63 ± 3	64 ± 3	67 ± 2	70 ± 4
Urina 4	94 ± 3	95 ± 5	96 ± 3	92 ± 3
Urina 5	158 ± 10	165 ± 4	156 ± 3	157 ± 4

Fonte: autor

**Tabela 10** - Resultados ( $\text{mg L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Mg em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

Amostras	Calibração	Padronização	Adição de	Adição de
	Externa	Interna	padrão	padrão interno
Urina 1	131 ± 4	133 ± 3	126 ± 3	127 ± 3
Urina 2	76 ± 1	78 ± 1	81 ± 3	75 ± 2
Urina 3	80 ± 3	82 ± 4	79 ± 2	75 ± 3
Urina 4	113 ± 4	111 ± 3	116 ± 2	117 ± 4
Urina 5	75 ± 3	76 ± 2	76 ± 3	72 ± 3

Fonte: autor

As concentrações obtidas para Ca e Mg variaram de 72 a 133  $\text{mg L}^{-1}$  e de 63 a 165  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. Os valores obtidos pelos métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno foram concordantes entre si ao nível de 95% de confiança (teste *t* pareado). Boas precisões (RSD) foram obtidas para todos métodos: calibração externa (1 a 7%), padronização interna (1 a 5%), adição de padrão (2 a 5%) e adição de padrão interno (2 a 6%).

O desempenho dos métodos foi também avaliado por meio de testes de adição e recuperação dos analitos empregando calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno. Alíquotas de soluções padrões de Ca e Mg foram adicionadas as amostras de modo a conter  $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca} + 2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mg}$ .

As recuperações obtidas para Ca e Mg podem ser observadas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

**Tabela 11** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Ca em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	83 ± 8	84 ± 5	102 ± 7	93 ± 4
Urina 2	97 ± 7	96 ± 2	99 ± 10	101 ± 2
Urina 3	93 ± 5	98 ± 5	110 ± 8	108 ± 4
Urina 4	98 ± 8	105 ± 4	99 ± 9	96 ± 5
Urina 5	101 ± 10	90 ± 5	92 ± 5	108 ± 2

**Fonte:** autor

**Tabela 12** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Mg em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	105 ± 6	98 ± 4	110 ± 8	116 ± 5
Urina 2	108 ± 4	101 ± 3	110 ± 10	104 ± 4
Urina 3	105 ± 8	108 ± 5	109 ± 9	94 ± 5
Urina 4	93 ± 5	96 ± 5	107 ± 7	109 ± 2
Urina 5	107 ± 5	108 ± 3	98 ± 7	99 ± 4

**Fonte:** autor

De uma forma geral as recuperações de Ca e Mg foram satisfatórias (entre 80 – 110%)<sup>73</sup> para todos os métodos de calibração: calibração externa (83 - 101% Ca e 93 - 108% Mg), padronização interna (84 - 105% Ca e 96 - 108% Mg), adição de padrão (92 - 110% Ca e 98 - 110% Mg) e adição de padrão interna (93 - 108% Ca e 94 - 116% Mg).

Como Ca e Mg estão presentes em altas concentrações em amostras de urina, foram utilizadas linhas secundárias de menor sensibilidade para as determinações. No entanto, a linha menos sensível do Mg medida a 202,582 nm proporcionou calibração de 0,2 a 20 mg L<sup>-1</sup>. E a linha do Ca em 239,855 nm permitiu calibração de 2 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Estes intervalos de concentrações exigiram diluições das amostras da ordem de 10 a 15 vezes. Com estas diluições os efeitos de matriz e/ou transporte não foram significativamente observados. Esse foi o motivo pelo qual o método de adição de padrão interno não manifestou seus benefícios comparativos aos demais métodos de calibração.

#### **4.4 Conclusões parciais**

O método de adição de padrão interno mostrou ser uma alternativa viável de calibração para a determinação de Ca e Mg em biodiesel, quando comparado ao método oficial que prevê a diluição do biodiesel em xileno e compatibilização da matriz utilizando glicerol. O método mostrou ser eficiente na determinação de Ca e Mg em amostras de urina, farinha, leite, plantas e tecidos biológicos.

Um dos benefícios desta proposta está relacionado com a combinação de dois métodos de correção (padronização interna + adição de padrão). Sendo, possível minimizar os efeitos causados por erros aleatórios, flutuações nos sinais analíticos e variações nos parâmetros físicos químicos (temperatura da chama e taxa de aspiração).

Outro benefício do método de adição de padrão interno, quando comparado com a padronização interna convencional, está relacionado com o fato da não necessidade da ausência do padrão interno na amostra original – um dos pré-requisitos de seleção de candidatos a padrão interno para a padronização interna.

Vale destacar que o volume total de amostra utilizado e a quantidade de soluções analíticas a serem preparadas se tornam uma grande desvantagem no emprego do método de adição de padrão interno convencional. No entanto, a automação do método pode contornar esses problemas, aumentando significativamente a frequência analítica.

## 5. DETERMINAÇÃO DE UREIA EM URINA EMPREGANDO O MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO EM ESPECTROSCOPIA RAMAN

### 5.1 Introdução

A análise de fluidos biológicos fornece informações clínicas relevantes sobre o estado de saúde humana. Um exemplo disto, é a dosagem de ureia em urina<sup>74</sup>, cujos níveis anormais podem ser um indicativo para o diagnóstico de doenças hepáticas e renais<sup>75,76</sup>.

Os métodos comumente empregados na quantificação de ureia em fluidos biológicos são baseados na hidrólise enzimática da ureia e na determinação indireta por espectrofotometria utilizando métodos baseados nas reações de Berthelot e Nessler<sup>75-77</sup>.

Entre as técnicas espectroscópicas moleculares destaca-se a espectroscopia Raman, uma vez que esta apresenta várias características positivas como análise rápida (apenas alguns segundos por medida), não destrutiva, alta especificidade, compatibilidade com soluções aquosas (não sofre interferência das bandas associadas a H<sub>2</sub>O)<sup>78-80</sup>. O uso de lasers de diodo (780 - 830 nm) ajudou a suprimir um dos principais problemas da técnica que é a interferência causada por fluorescência da amostra. No entanto, mesmo com os avanços instrumentais, erros relacionados a variações intrumentais e às condições de análise ainda são muito comuns, principalmente quando aplicado a matrizes complexas<sup>80</sup>. Deste modo, o método de adição de padrão interno pode ser uma alternativa de calibração para contornar tais problemas associados a variações intrumentais e efeitos matriciais.

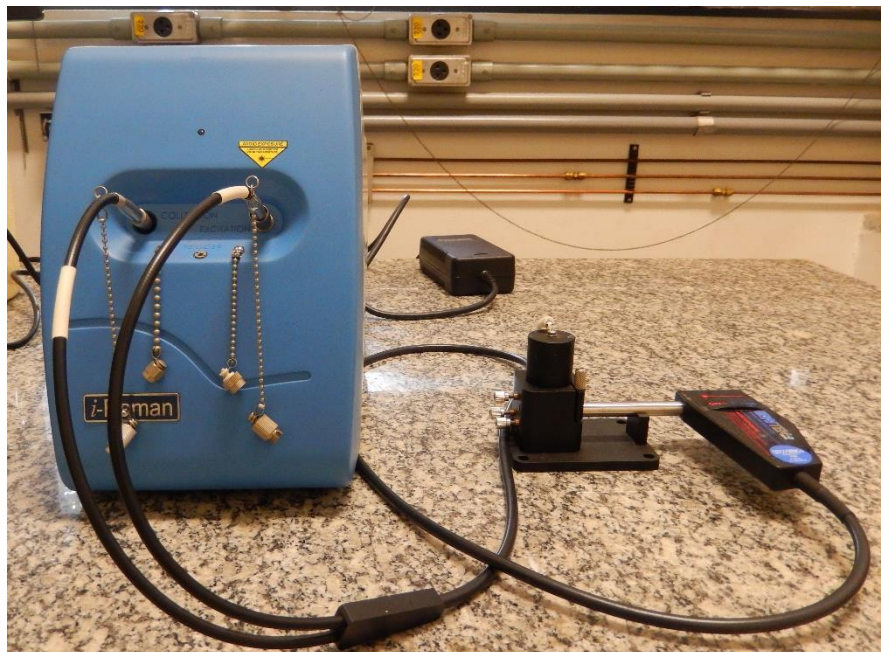
Tendo em vista o exposto, avaliou-se o emprego da espectroscopia Raman aliada ao método de adição de padrão interno na determinação de ureia em urina.

## 5.2 Materiais e métodos

### 5.2.1. INSTRUMENTAÇÃO

#### 5.2.1.1 Método desenvolvido

Os espectros Raman foram obtidos empregando um espectrômetro Raman modelo iRaman BWS415-785H (B&W Tek) com fonte de excitação de 785 nm (potência < 350 mW) e resolução espectral de  $3,5 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 10). A excitação das soluções e amostras de urina, bem como a aquisição dos espectros de espalhamento Raman foi realizada por meio de uma fibra óptica (*Raman probe*) modelo BAC 100 (B&W Tek) acoplada a um suporte para cubetas modelo BCR100A (B&W Tek).



**Figura 10** – Espectrômetro Raman empregado nas medidas de espalhamento Raman.

**Fonte:** autor

Todos os espectros Raman foram obtidos ( $n=5$ ) em um intervalo de 150 - 2700  $\text{cm}^{-1}$  utilizando seguintes parâmetros instrumentais: 50 % de potência máxima do laser e 20 segundos de tempo de integração. O fundo de todos os espectros foi corrigido utilizando a ferramenta Background Removal disponível no software BWSpec (B&W Tek).

A determinação do pH das soluções foi feita empregando um pHmetro pH/ion meter 450 Corning.

#### 5.2.1.2 Método de referência

Para a determinação de ureia foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis UV-M51 (Bel Photonics). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e no comprimento de onda de 700 nm.

Para encubar as amostras e padrões foi utilizado um banho maria SL 150/10 (SOLAB) com temperatura fixada em 37 °C.

### 5.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS

#### 5.2.2.1 Método desenvolvido

Todas as soluções aquosas empregadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5™ combinado com deionizador Millipore Milli-Q™ academic.

Soluções analíticas de ureia foram preparadas por diluição apropriada de uma solução estoque 100 g L<sup>-1</sup>, preparada por meio da dissolução de 50 g de ureia (Sigma Aldrich) em balão volumétrico de 500 mL.

Nos métodos de adição de padrão interno e padronização interna foi utilizada uma solução estoque 100 g L<sup>-1</sup> de nitrato, sendo essa preparada por meio da dissolução de 67,2 g de NaNO<sub>3</sub> (Merck) em balão volumétrico de 500 mL.

#### 5.2.2.2 Método de referência

Para as análises empregando o método de referência foi utilizado um kit para determinação de ureia da marca Labtest. Esse kit é composto por quatro soluções:

Solução 1: Tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> + Urease: ≥ 268 kU/L.

Solução 2: Tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> + C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> (salicilato de sódio) 312 mmol L<sup>-1</sup> + Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] (nitroprussiato de sódio) 16,8 mmol L<sup>-1</sup>.

Solução 3: NaOH 2,8 mol L<sup>-1</sup> + NaClO 121 mmol L<sup>-1</sup>.

Solução 4: Padrão de ureia 700 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções foram preparadas de acordo com as indicações do fabricante:

O conteúdo das soluções 2 (100 mL) e 3 (25 mL) foram diluídos a 500 mL com água deionizada

A Solução 1 foi misturada com a Solução 2 diluída em uma proporção de 1:20.

Padrões analíticos (0 - 700 mg L<sup>-1</sup>) foram preparados a partir da Solução 4 (padrão 700 mg L<sup>-1</sup> de ureia).

### 5.2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de urina utilizadas no trabalho foram cedidas por indivíduos do grupo de pesquisa. Estas foram coletadas por um período de 24 h em frascos devidamente descontaminados e armazenadas sob refrigeração (aproximadamente 5 °C) até o momento da análise.

#### 5.2.3.1 Método desenvolvido

As amostras de urina foram diluídas 1:1 com água deionizada.

#### 5.2.3.2 Método de referência

As amostras de urina foram diluídas 50 vezes com água deionizada.

O preparo de cada réplica do branco, soluções padrões (100 - 700 mg L<sup>-1</sup>) e amostras diluídas foi realizado da seguinte forma: foram adicionados a um tubo de ensaio 20 µL das amostras diluídas, soluções padrões ou do branco + 2 mL da mistura 1:20 da Solução 1 e Solução 2 (urease tamponada + salicilato + nitroprussiato) + 2 mL da solução 3 diluída (NaOH + NaClO). Em seguida os tubos de ensaio foram encubados em banho maria por 5 minutos a 37°C.

## 5.2.4 METODOLOGIA

### 5.2.4.1 Método desenvolvido

#### 5.2.4.1.1 Avaliação do padrão interno

O íon nitrato foi avaliado como padrão interno na determinação de ureia. A efetividade do íon nitrato para corrigir interferências relacionadas a diferentes condições de excitação e tempos de integração foi avaliada frente a variações nas condições instrumentais como: potência do laser e tempo de integração.

Diferentes condições de excitação foram obtidas a partir da variação da potência do laser. Primeiro mantendo-se o tempo de integração fixado em 10 s e variando a potência do laser entre 10 e 90% da máxima. Em seguida, diferentes tempos de integração foram avaliados, mantendo-se a potência do laser fixada em 50% da máxima e variando o tempo de integração entre 1 e 40 s. Em cada uma das situações descritas foi medida as intensidades relativas do espalhamento Raman de uma solução contendo 40 g L<sup>-1</sup> ureia + 10 g L<sup>-1</sup> nitrato.

#### 5.2.4.1.2 Otimização do método

Para otimizar o tempo de integração na determinação de ureia em urina, uma amostra de urina foi selecionada e a potência do laser foi fixada em 50% da máxima, variou-se o tempo de integração entre 10 e 30 s.

A fim de avaliar a influência do pH no espectro Raman de ureia e nitrato, o mesmo foi determinado em soluções contendo 40 g L<sup>-1</sup> ureia + 10 g L<sup>-1</sup> nitrato, com pH ajustados a 3, 7, 10 e 13. Para o ajuste do pH foram utilizadas soluções de HCl e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Com os parâmetros instrumentais otimizados, foi avaliada a faixa linear de ureia e nitrato nas concentrações entre 0,1 g L<sup>-1</sup> - 50 g L<sup>-1</sup>.

#### 5.2.4.1.3 Determinação de ureia em urina

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, ureia foi determinada em 5 amostras de urina utilizando os métodos de adição de padrão interno, calibração externa, padronização interna e adição de padrão.

A exatidão dos métodos foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação nas amostras de urina, nas quais alíquotas apropriadas de solução padrão de ureia foram adicionadas a cada uma das amostras de urina de modo a se obter concentrações de  $15 \text{ g L}^{-1}$ .

No método de adição de padrão interno, foram preparadas seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados 5 mL da amostra de urina, quantidades apropriadas do padrão de ureia e nitrato e, em seguida, avolumadas para 10 mL com água deionizada, produzindo soluções contendo  $0 - 40 \text{ g L}^{-1}$  ureia e  $0 - 10 \text{ g L}^{-1}$  nitrato. As curvas foram construídas a partir das razões das intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia/nitrato versus o inverso da concentração de nitrato.

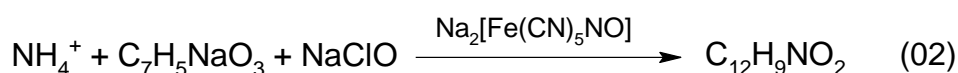
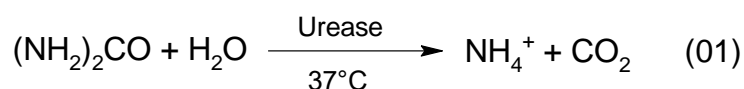
O procedimento empregado no método de adição de padrão envolveu o preparo de seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados 5 mL da amostra de urina, quantidades apropriadas do padrão de ureia, onde após a diluição a 10 mL com água deionizada, fossem produzidas soluções contendo  $0 - 40 \text{ g L}^{-1}$  ureia. As curvas foram construídas a partir das intensidades relativas do espalhamento Raman versus concentração de ureia adicionada.

A calibração utilizando padrões externos foi feita a partir de soluções analíticas em um intervalo de  $0 - 40 \text{ g L}^{-1}$  ureia. A curva foi construída utilizando as intensidades relativas do espalhamento Raman versus concentração de ureia.

A calibração por padronização interna envolveu o preparo de brancos, soluções analíticas ( $0 - 40 \text{ g L}^{-1}$  ureia) e amostras de modo a conter  $10 \text{ g L}^{-1}$  nitrato. A curva de calibração foi construída utilizando a razão das intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia/nitrato versus concentração de ureia.

#### 5.2.4.2 Método de referência

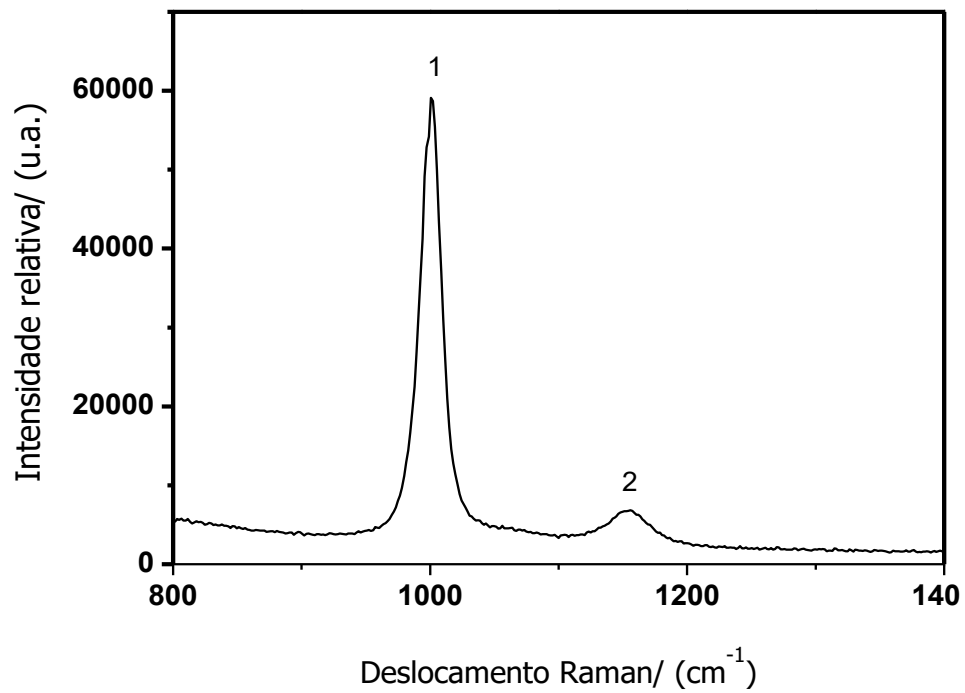
Para fins comparativos, as 5 amostras de urina foram também analisadas por um método enzimático-colorimétrico de referência para análise de ureia. Neste método, a ureia é decomposta em íons amônio (01), que reagem com salicilato em meio de hipoclorito formando o azul de indofenol medido a 700 nm, sendo a reação catalisada pelo nitroprussiato (02).



Para a determinação da ureia foi utilizado o método de calibração externa (0 - 700 mg L<sup>-1</sup> ureia).

### 5.3 Resultados e discussão

A ureia é um composto nitrogenado de fórmula (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO. No corpo humano ela é produzida pelo fígado como parte do processo do metabolismo das proteínas, sendo eliminada através da urina e do suor<sup>81</sup>. A ureia apresenta um espectro Raman característico (Figura 11) com um pico intenso em ~1002 cm<sup>-1</sup> (1) referente ao estiramento C-N e um pico de menor intensidade em ~1155 cm<sup>-1</sup> (2) referente aos modos de vibração de NH<sub>2</sub><sup>82</sup>.

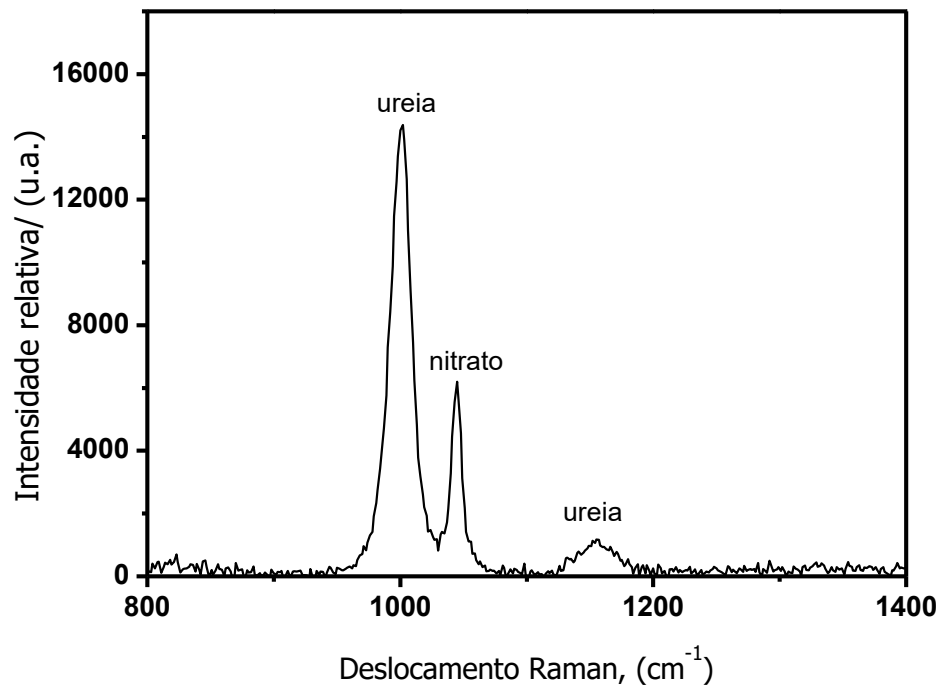


**Figura 11** - Espectro Raman de uma solução de ureia contendo 100 g L<sup>-1</sup> utilizando 50 % da potência máxima do laser e 30 s de integração: (1) estiramento C-N e (2) modos de vibração NH<sub>2</sub>.

**Fonte:** autor

### 5.3.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO

O íon nitrato, de fórmula NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apresenta um pico intenso em ~1045 cm<sup>-1</sup> (Figura 12) referente ao estiramento N-O<sup>83</sup>.

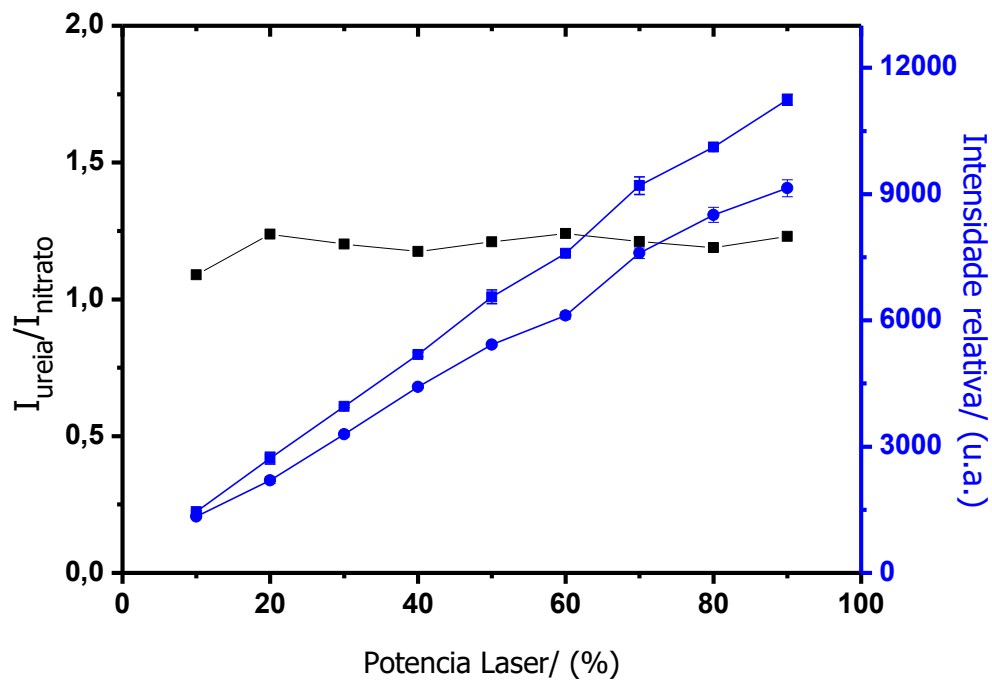


**Figura 12** - Espectro Raman de uma solução contendo 50 g L<sup>-1</sup> ureia + 5 g L<sup>-1</sup> nitrato utilizando 50 % da potência máxima do laser e 20 s de tempo de integração.

**Fonte:** autor

Como o pico do íon nitrato não se sobrepõe aos picos da ureia, e todos se encontram na mesma região do espectro, optou-se por avaliar o íon nitrato na correção de interferências relacionadas a diferentes condições de excitação e tempo de integração. A eficiência de nitrato foi avaliada por meio da análise do comportamento das intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia e nitrato frente à variações nas condições instrumentais.

Diferentes condições de excitação foram obtidas a partir da variação da potência do laser. Mantendo-se o tempo de integração fixado em 10 s, variou-se a potência de laser entre 10 e 90% da máxima. A análise da Figura 13 mostra que as intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia e nitrato aumentam proporcionalmente com o aumento da potência do laser. No entanto, quando se utiliza a razão entre os sinais de ureia/nitrato, este permanece praticamente constante.

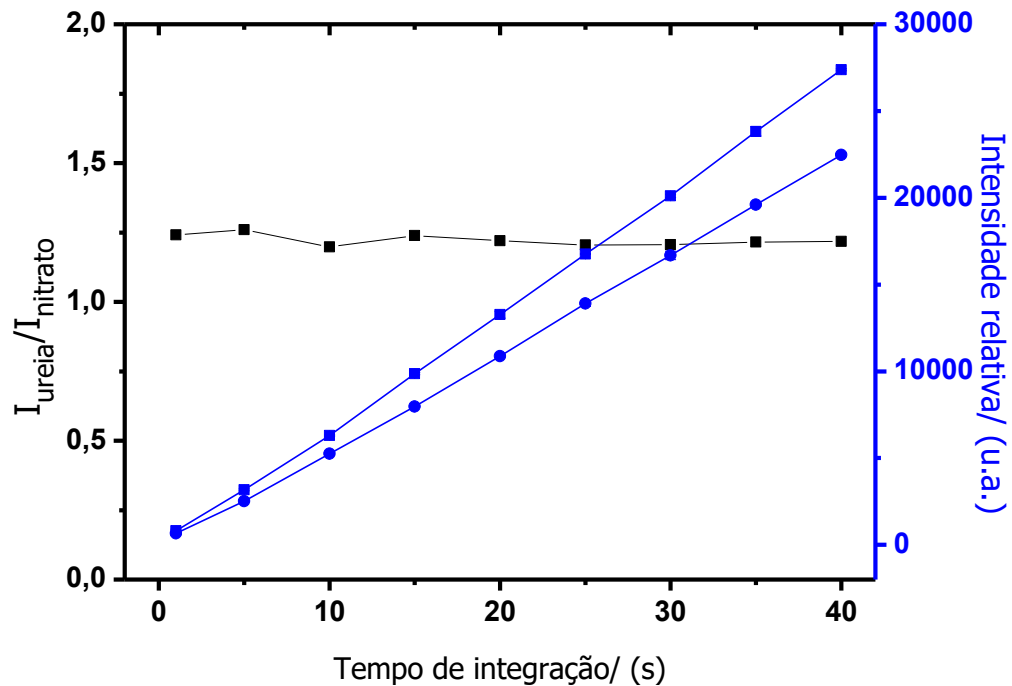


**Figura 13** - Influência da potência do laser nas intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia (-■-) e nitrato (-●-) e nas razões das intensidades relativas de ureia/nitrato (-■-).

**Fonte:** autor

Diferentes tempos de integração (1 - 40 s) foram avaliados fixando-se a potência do laser em 50% da máxima. Pode-se observar na Figura 14 que assim como no aumento da potência do laser o aumento no tempo de integração acarreta em um acréscimo nas intensidades relativas do espalhamento Raman tanto para ureia quanto para nitrato. No entanto, pode-se observar que o nitrato e a ureia apresentam o mesmo comportamento frente ao aumento do tempo de integração de modo que a razão das intensidades permanece praticamente constante.

As intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia e nitrato variam de maneira semelhante, tanto nas variações da potência do laser quanto para o tempo de integração, demonstrando que o nitrato pode ser um bom padrão interno na determinação de ureia.



**Figura 14** - Influência do tempo de integração nas intensidades relativas do espalhamento Raman de ureia (-■-) e nitrato (-●-) e nas razões das intensidades relativas de ureia/nitrato (-■-).

**Fonte:** autor

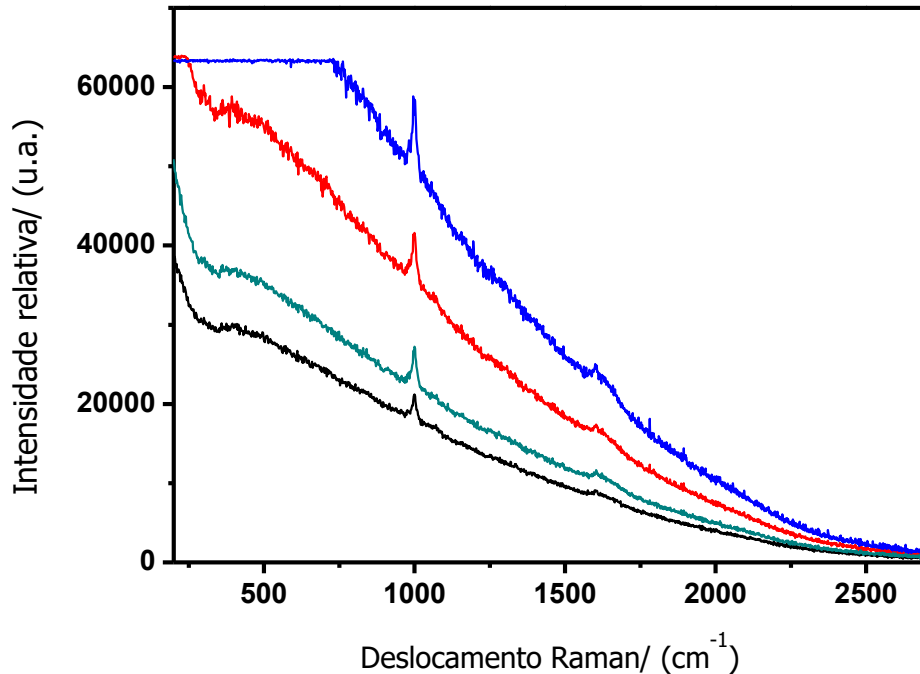
### 5.3.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Um dos principais obstáculos em análises envolvendo espectroscopia Raman está relacionado com o fundo gerado em razão da fluorescência das amostras. O sinal de fluorescência pode ser de  $10^4$  a  $10^7$  vezes maior que o sinal referente ao espalhamento Raman<sup>84</sup>, o que limita a escolha da potência do laser e tempo de integração utilizados.

Para avaliar o tempo de integração na determinação de ureia em urina, uma amostra de urina foi selecionada e fixou-se a potência do laser em 50% da máxima e variou-se o tempo de integração entre 10 e 30 s.

Como pode ser observado na Figura 15, com o aumento do tempo de integração ocorre um aumento do pico da ureia. No entanto o aumento do fundo é mais pronunciado quando o tempo de integração é aumentado de 20 para 25 segundos: o aumento do pico da ureia é de 15%, já o fundo é quase 2 vezes maior. Assim, busca-se uma condição em que se tenha uma maior sensibilidade, sem que

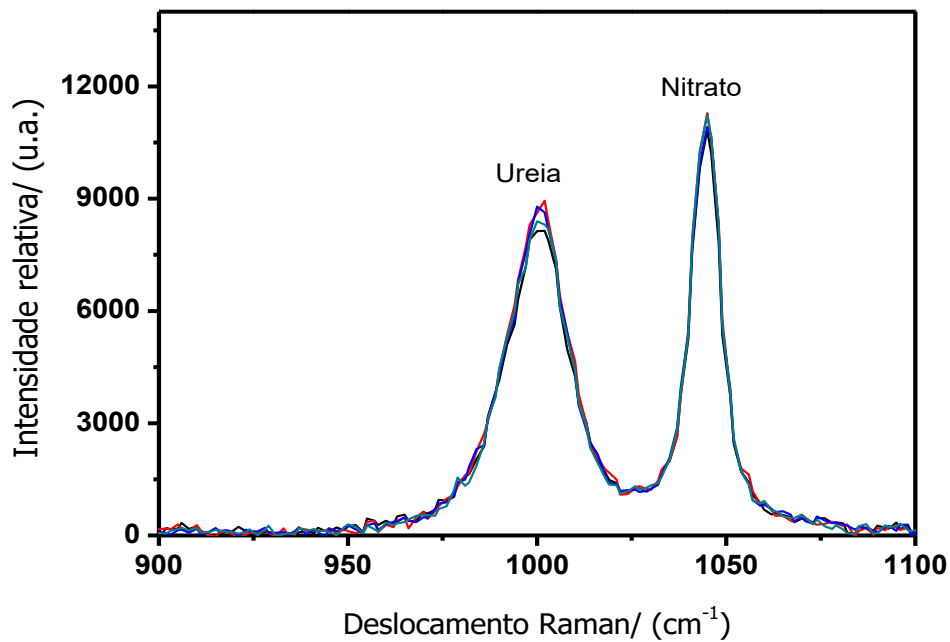
ocorra a saturação do detector. Optou-se então por utilizar 50% de potência máxima do laser e 20 s de tempo de integração nos estudos subsequentes.



**Figura 15** - Influência do tempo de integração no sinal de fundo de uma amostra de urina. Espectros utilizando 10 (-), 20 (-), 25 (-), 30 (-) segundos de tempo de integração.

**Fonte:** autor

Como o pH do meio pode influenciar na polarizabilidade da molécula, foi avaliado o espalhamento Raman de ureia e nitrato a diferentes pH. Para esse estudo foram medidos o espalhamento Raman de soluções contendo  $40 \text{ g L}^{-1}$  ureia +  $10 \text{ g L}^{-1}$  nitrato em pH 3, 7, 10 e 13. Como pode ser observado na Figura 16, a mudança no pH não acarreta em nenhum deslocamento ou mudança significativa nas bandas de ureia e nitrato, demonstrando que não há necessidade do controle do pH dos padrões e amostras analisadas.



**Figura 16** - Influência do pH nos espectros Raman de ureia e nitrato: pH 3 (---), 7 (---), 10 (---) e 13 (---).

**Fonte:** autor

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, avaliou-se a faixa linear de nitrato e ureia utilizando uma potência de 50% do laser e tempo de integração de 20 s. Para nitrato, a faixa linear de resposta foi de 0,5 a 50 g L<sup>-1</sup>; e para ureia, de 1 a 50 g L<sup>-1</sup>.

### 5.3.3 DETERMINAÇÃO DE UREIA EM URINA

Após a otimização do método, foram analisadas 5 amostras de urina empregando os métodos de adição de padrão interno, calibração com padrões externos, padronização interna e adição de padrão. Para fins comparativos as amostras foram também analisadas pelo método de referência.

Os resultados das determinações de ureia em urina estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Resultados ( $\text{g L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de ureia em amostras de urina empregando os métodos de referência, calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

Amostra	Método de referência	Calibração externa	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
1	$7,9 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,2$
2	$18,3 \pm 1,1$	$16,9 \pm 0,3$	$16,8 \pm 0,3$	$16,9 \pm 0,3$	$16,8 \pm 0,2$
3	$14,4 \pm 0,8$	$13,1 \pm 0,4$	$14,2 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,5$	$13,9 \pm 0,3$
4	$12,5 \pm 0,5$	$12,8 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,5$	$11,5 \pm 0,7$	$12,9 \pm 0,5$
5	$13,0 \pm 0,4$	$13,3 \pm 1,0$	$12,7 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,9$	$12,7 \pm 0,6$

Fonte: autor

Análise destes resultados mostra que os valores obtidos para todos os métodos de calibração são concordantes entre si (teste  $t$  pareado) ao nível de 95% de confiança. As concentrações de ureia nas 5 amostras de urina variaram de 6,9 a 14,4  $\text{g L}^{-1}$ , e apenas as concentrações determinadas para a amostra 1 estiveram abaixo dos limites geralmente encontrados em amostras de urina ( $9,3 - 23,3 \text{ g L}^{-1}$ )<sup>74</sup>. O desvio padrão relativo foi de 4% para o método de referência, calibração externa, padronização interna e adição de padrão interna e 6 % para o método de adição de padrão.

O desempenho dos métodos foi também avaliado por meio de testes de adição e recuperação de analito. Uma alíquota apropriada de solução padrão de ureia foi adicionada às amostras de modo a aumentar suas concentrações em 15  $\text{g L}^{-1}$  de ureia. As recuperações obtidas estão apresentadas na Tabelas 14.

**Tabela 14** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação de ureia em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno.

Amostra	Calibração externa	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
1	$97 \pm 3$	$103 \pm 5$	$98 \pm 12$	$99 \pm 3$
2	$108 \pm 7$	$102 \pm 5$	$103 \pm 8$	$108 \pm 6$
3	$87 \pm 4$	$97 \pm 4$	$100 \pm 6$	$105 \pm 5$
4	$88 \pm 2$	$98 \pm 3$	$84 \pm 9$	$104 \pm 7$
5	$95 \pm 3$	$98 \pm 3$	$97 \pm 9$	$105 \pm 3$

Fonte: autor

As recuperações variaram entre: 87 -108% para calibração externa, 97 - 103% para padronização interna, 84 - 103% para adição de padrão e 99 - 105% para adição de padrão interno. Para estes níveis de concentração do analito, apenas os métodos de adição de padrão interno e padronização interna apresentaram recuperações satisfatórias de acordo com a AOAC (entre 90 e 107%)<sup>73</sup>. Os desvios padrões relativos em média foram de 4% para calibração com padrões externos, padronização interna e adição de padrão interno e 9% para adição de padrão.

#### **5.4 Conclusões parciais**

A adição de padrão interno mostrou ser um método de calibração viável para determinação de ureia em urina, com boa precisão (4%) e exatidão (recuperações entre 99 e 105%). No entanto, as amostras de urina não apresentaram pronunciados efeitos de matriz, o que dificultou avaliar a eficiência do método para correções dessa natureza.

Vale ressaltar que o emprego do método de adição de padrão interno em espectroscopia Raman, mesmo não mostrando seu potencial na correção de efeitos de matriz e flutuações analíticas, mostrou ser um método vantajoso quando comparado ao método de referência (determinação indireta de ureia por espectrofotometria), uma vez que ureia é determinado diretamente, necessitando de um preparo mínimo da amostra (apenas diluição em água), menor consumo de reagentes (não são necessárias reações em condições controladas) e menor volume de resíduos gerados.

## 6. MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO: DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM CHAMA

### 6.1 Introdução

O biodiesel é considerado uma das mais importantes fontes de energia alternativas ao diesel, uma vez que este é produzido por meio de fontes renováveis, além de ser biodegradável e não tóxico<sup>85,86</sup>. Entre os parâmetros de qualidade para a comercialização do biodiesel puro (B100) estipulados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) destaca-se o controle das concentrações de Na e K (somatória das concentrações de Na + K deve ser  $\leq 5 \text{ mg kg}^{-1}$ )<sup>62</sup>, estes são provenientes de seus respectivos hidróxidos utilizados na produção do biodiesel, cuja presença em altas concentrações pode acarretar em problemas mecânicos<sup>86</sup>.

O controle dos teores de elementos majoritários como Na e K em fluidos biológicos serve como indicativo do funcionamento do nosso organismo, um exemplo é o monitoramento da razão das concentrações de Na/K em urina, uma vez que estes elementos são um parâmetro importante no controle de hipertensão arterial<sup>87</sup>.

No entanto, no contexto da análise química de combustíveis<sup>3</sup> e fluidos biológicos<sup>4</sup> determinar Na e K de forma simples e com precisão e exatidão satisfatórias não é uma tarefa fácil devido à complexidade das matrizes, o que implica em um grande desafio analítico.

Uma alternativa para minimizar e/ou corrigir problemas associados a variações em parâmetros instrumentais e efeitos de matriz, aumentando a confiabilidade analítica é o uso do método de adição de padrão interno empregando gradiente de concentração proposto por Jones e colaboradores<sup>8</sup>. No entanto, o procedimento deste método é todo manual, podendo introduzir erros aleatórios aos resultados obtidos. Desta forma, a automação do método é uma abordagem interessante para minimizar erros e aumentar a robustez. Considerando que a análise em fluxo é uma excelente técnica para gerenciar soluções<sup>88</sup>, o presente trabalho relata o desenvolvimento de um sistema em fluxo para a automação do método de adição de padrão por gradiente de concentração e a determinação de Na e K em amostras de biodiesel e urina por F

AES. O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração pode ser empregado em qualquer técnica que seja compatível com amostras líquidas e permita a análise simultânea. A fim de atender os requisitos do método foi avaliado também a montagem de um sistema de emissão atômica em chama com detecção simultânea.

## 6.2 Materiais e métodos

### 6.2.1 INSTRUMENTAÇÃO

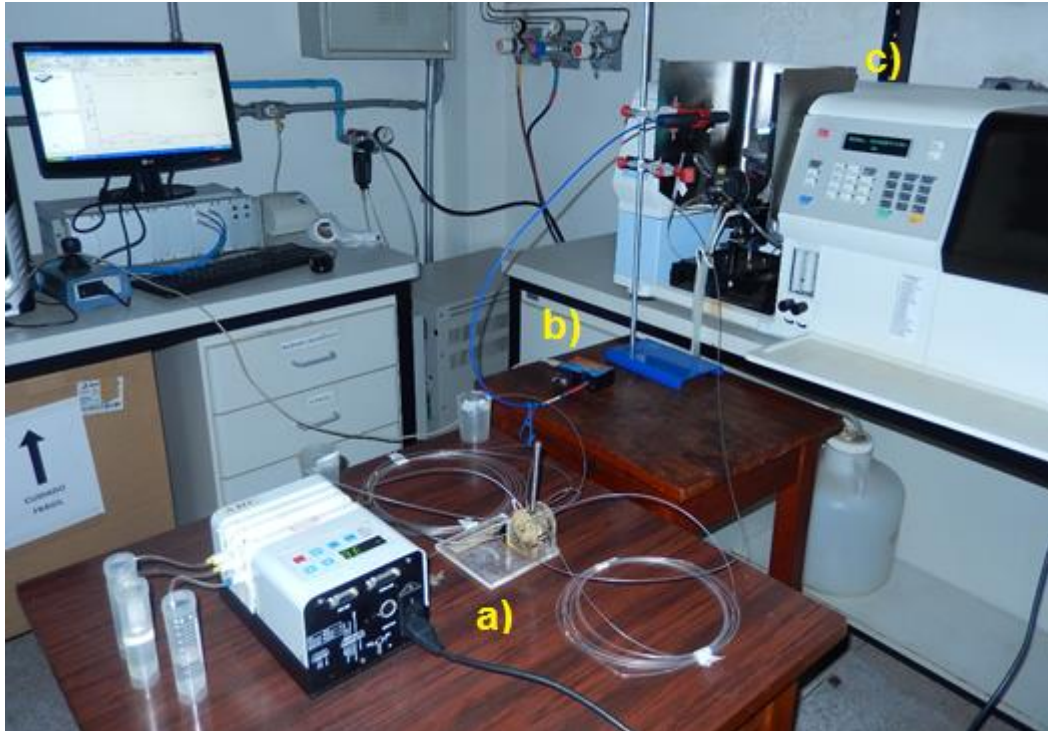
Para a propulsão das amostras e soluções, uma bomba peristáltica IPC-8 (Ismatec), tubos de bombeamento Tygon de diferentes diâmetros, tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro para a construção das alças de amostragem e linhas de transmissão e um injetor-comutador proporcional foram utilizados.

Para nebulização e excitação foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica em chama (F AAS) Analyst 100 (Perkin Elmer), equipado com queimador com caminho óptico de 50 mm. Chama ar-acetileno foi utilizada para a excitação dos analitos. Acetileno com grau de pureza 99,7% (White Martins) foi utilizado como gás combustível. A vazão otimizada para Na, K e Li foi uma razão 4:2 de ar/acetileno.

As medidas de emissão foram realizadas empregando uma fibra óptica (probe) ligada a um espectrômetro Red Tide (Ocean Optics) com resolução de 2 nm e faixa de trabalho de 350 - 1000 nm. O tempo de integração de 50 ms e average igual a 2 (cada espectro obtido era o resultado da média de 2 espectros coletados) foi utilizado para as medidas. As linhas monitoradas foram 586,98 nm (Na), 667,43 nm (Li) e 763,98 nm (K).

As determinações (n=7) empregando os métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa foram realizadas sem o uso da bomba peristáltica, com taxa de aspiração fixada em 5,0 mL min<sup>-1</sup>. Para as determinações utilizando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foi utilizado o sistema de propulsão descrito acima e o método de coleção de dados rápida (High Speed Acquisition) do software SpetraSuite (Ocean Optics) totalizando 6000 espectros medidos sequencialmente.

O sistema empregado no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo está ilustrado na Figura 17.



**Figura 17** - Sistema empregado nas medidas de emissão atômica: a) bomba peristáltica e injetor-comutador proporcional; b) espectrômetro e fibra óptica; c) FAAS.

**Fonte:** autor

As digestões ácidas dos materiais de referência certificados (CRM) foram realizadas em um forno micro-ondas Multiwave 3000 (Anton Paar) equipado com rotor de 48 posições e tubos de reação de PFA.

### 6.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Todas as soluções aquosas empregadas nos experimentos foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5<sup>TM</sup> combinado com deionizador Millipore Milli-Q<sup>TM</sup> academic.

Soluções analíticas foram preparadas por diluição apropriada de padrões espectroscópicos para absorção atômica 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol) de Cs, Ca, K, Li, Mg, Na, Rb.

Etanol destilado foi empregado no preparo das amostras de biodiesel.

Solução estoque 10% m V<sup>-1</sup> de CsCl foi preparado através da dissolução de 10 g de CsCl 99,9% (Sigma Aldrich) em 100 mL de água deionizada.

Para as digestões ácidas foram utilizados  $\text{HNO}_3$  70% (J.T. Baker) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%  $V V^{-1}$  (Merck).

Frascos plásticos e vidrarias foram descontaminados por imersão em banho 10% ( $V V^{-1}$ ) de Extran por 24h, lavagem com água deionizada, imersão em banho 10% ( $V V^{-1}$ )  $\text{HNO}_3$  por 24 h, lavagem com água deionizada. Em seguida esses materiais foram secos na capela e armazenados em local fechado.

### 6.2.3 METODOLOGIA

#### 6.2.3.1 Preparo das amostras

Cinco amostras de biodiesel e o padrão de biodiesel certificado (Conostan) foram preparados pesando-se, aproximadamente, 2,0 g de amostra diretamente em tubos de polipropileno (Corning). O conteúdo foi diluído a 10 mL com etanol<sup>63,66</sup>.

Para as amostras de urina, alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  foram adicionadas a balões volumétricos e estes foram avolumados a 100 mL com água deionizada.

Os materiais de referência certificados 1549 *Non-Fat Milk Powder*, 8435 *Whole Milk Powder*, 1577b *Bovine Liver* e 2976 *Mussel Tissue* (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) foram preparados por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas de acordo com o seguinte procedimento: aproximadamente 0,2 g de cada CRM foi precisamente pesado e transferido para os frascos do micro-ondas. Posteriormente, alíquotas de 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$ , 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 2,0 mL de água deionizada foram adicionados e a mistura submetida a um programa de aquecimento constituído de 5 etapas: (1) 15 min de 0 a 600 W; (2) 5 min a 600 W; (3) 15 min de 600 a 800 W; (4) 5 min a 800 W e (5) 20 min a 0 W (resfriamento). Após o resfriamento, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos e avolumados a 25 mL com água deionizada.

#### 6.2.3.2 Avaliação do sistema de emissão atômica e do padrão interno

Após a montagem do sistema de propulsão, excitação e detecção (Figura 17) foi realizado um estudo preliminar para selecionar possíveis candidatos a padrão interno e identificar possíveis interferentes nas determinações de Na e K. Foram

avaliados os espectros de emissão de elementos das famílias 1A (Li, Na, K, Rb e Cs) e 2A (Ca, Mg e Sr), sendo analisadas as seguintes soluções monoelementares: 1 mg L<sup>-1</sup> Na, 2 mg L<sup>-1</sup> K, 1 mg L<sup>-1</sup> Li, 10 mg L<sup>-1</sup> Ca, 10 mg L<sup>-1</sup> Rb, 10 mg L<sup>-1</sup> Sr, 50 mg L<sup>-1</sup> Mg e 50 mg L<sup>-1</sup> Cs.

Entre os possíveis interferentes na determinação de Na, o mais comumente encontrado na composição das amostras é o Ca. Assim, avaliou-se o efeito da concentração de Ca sobre a intensidade de emissão do Na. Para esse estudo foi monitorado o sinal analítico de Na em nove soluções, onde, fixou-se a concentração deste em 1,0 mg L<sup>-1</sup> e variou-se a concentração de Ca entre 0 e 20 mg L<sup>-1</sup>.

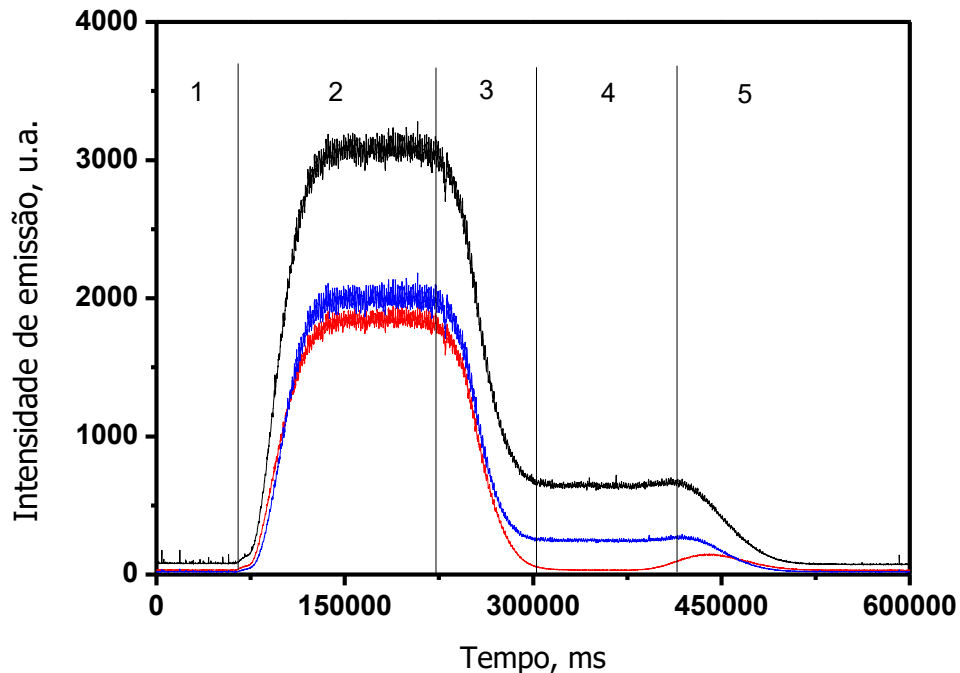
O elemento Li foi avaliado como padrão interno para Na e K<sup>16,89,90</sup>. A efetividade de Li para corrigir interferências relacionadas a diferentes condições de excitação e diferentes taxas de amostragem foi avaliada por meio do comportamento das intensidades de emissão frente a variações nas condições instrumentais: vazão do ar (comburente) e taxa de aspiração.

Diferentes condições de excitação foram obtidas a partir da variação da estequiometria da chama. Primeiro mantendo-se a taxa de aspiração e altura de observação fixas, variou-se a vazão de ar comprimido na razão ar/acetileno entre 0,5 e 2,25. Em seguida, diferentes taxas de amostragem foram avaliadas a partir da variação da taxa de aspiração. Mantendo-se a altura de observação e estequiometria da chama constantes, variou-se a taxa de aspiração de 1 a 6 mL min<sup>-1</sup>. Em cada uma das situações descritas, mediu-se a intensidade de emissão de uma solução multielementar contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> Na + 0,5 mg L<sup>-1</sup> Li + 2,0 mg L<sup>-1</sup> K.

### 6.2.3.3 Otimização do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo

O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utiliza apenas um branco e duas soluções (A e B). A solução A é composta por uma mistura 1:1 de amostra + padrão e a solução B é composta por uma mistura 1:1 de amostra + branco. As soluções são analisadas em sequência de modo a se obter um gráfico como o apresentado na Figura 18, onde observa-se as intensidades de emissão dos analitos e do padrão interno, sendo as regiões numeradas referentes às emissões de: 1) branco, 2) solução A, 3) transição entre as soluções A e B, 4) solução

B, 5) branco. A região 3 onde ocorre a transição entre as soluções A e B corresponde ao gradiente de concentração, sendo essa a região utilizada para a calibração do método.



**Figura 18** - Representação das 5 regiões de um sinal típico obtido pelo método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo para Na (-), K (-) e Li (-): 1) branco; 2) solução A; 3) transição entre as soluções A e B; 4) solução B; 5) branco.

**Fonte:** autor

No sistema de injeção em fluxo as soluções A e B e o branco foram aspiradas com o auxílio de uma bomba peristáltica e amostradas em sequência de modo a se obter um registro como o apresentado na Fig. 18. Para a amostragem foi utilizado um injetor-comutador proporcional, que consiste em três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma móvel. A peça central pode ser deslocada em relação às laterais e é por meio deste movimento que o injetor coleta e insere as soluções de interesse<sup>91</sup>. O sistema FIA (flow injection analysis) representado na Figura 19 é composto de duas alças de amostragem ( $L_1$  e  $L_2$ ), onde, inicialmente o sinal coletado é referente ao branco utilizado, enquanto a alça de amostragem  $L_1$  é preenchida com a solução A (mistura 1:1 de amostra + padrão). Depois de preenchida a alça de amostragem  $L_1$  é feita a comutação do sistema, assim, amostrando a alça  $L_1$  e preenchendo a alça de amostragem  $L_2$  com a solução B (mistura 1:1 de amostra + branco). Ao final da



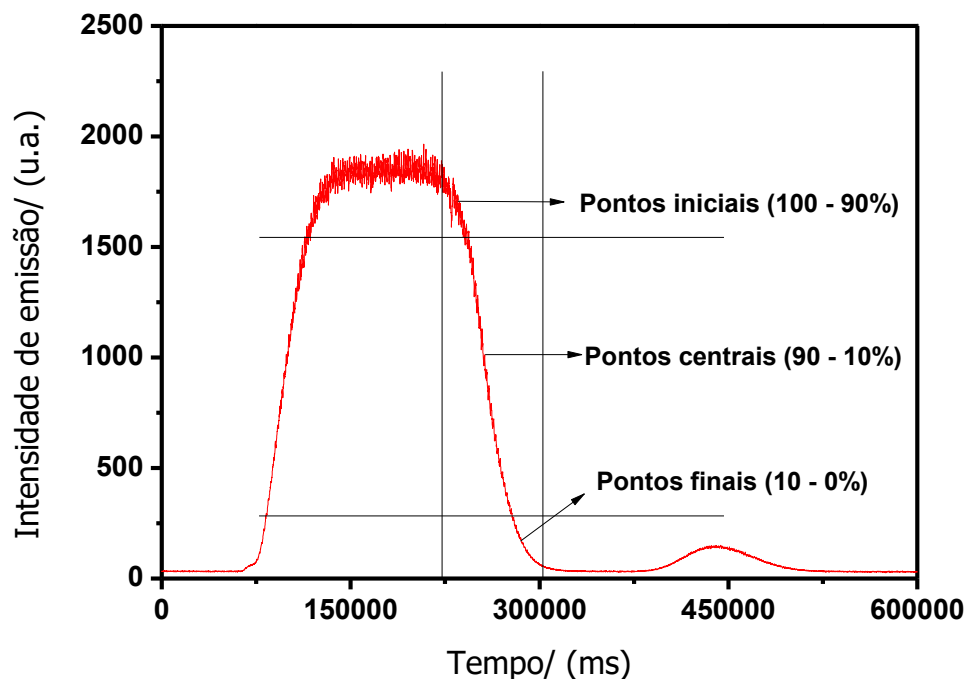
na região do gradiente de concentração utilizada na calibração, a necessidade do uso de um supressor de ionização para a determinação de Na e K e a influência da concentração de Li utilizada no padrão.

Para determinar a concentração de Li foram utilizados dois métodos: 1) calibração externa (0 - 2,0 mg L<sup>-1</sup> Li) antes do uso do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo permitindo que a concentração de Li para cada ponto da região do gradiente de concentração seja calculada por interpolação dos pontos; 2) utilizando o valor do ponto de maior intensidade de emissão do Li (P<sub>max</sub>), onde a concentração é conhecida (concentração utilizada no padrão), calcula-se a concentração para os outros pontos (P<sub>x</sub>) a partir da Equação 10. Foram comparados os dois métodos para determinar a concentração de Li no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo. Para esse estudo foram utilizados um padrão contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> Na + 1,0 mg L<sup>-1</sup> Li + 2,0 mg L<sup>-1</sup> K e água deionizada como branco e amostra. Os testes foram realizados em meio aquoso e em dias diferentes.

$$[\text{Li}] = \frac{\text{Intensidade de emissão } P_x}{\text{Intensidade de emissão } P_{\text{max}}} \times [\text{Li}]_{\text{padrão}} \quad \text{Eq. 10}$$

A aplicação do método da adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando o sistema proposto gera em torno de 1000 pontos que podem ser utilizados na calibração. No entanto, devido a oscilação do sinal e o grande número de pontos, avaliou-se o uso de médias calculadas utilizando diferentes quantidades de pontos para a calibração, sendo avaliadas médias com 10, 20, 30, 40 e 50 pontos. Outro fator estudado foi a faixa na região do gradiente de concentração a ser empregada na calibração para, assim, definir um padrão para a construção da curva de calibração. Para determinar a melhor faixa na região do gradiente de concentração a ser empregada, considerou-se o valor máximo de intensidade de emissão como sendo 100% e o valor mais baixo como sendo 0%, assim, a região do gradiente de concentração foi dividida em diferentes faixas (Figura 20): a) utilizando todos os pontos de 100% até 0%; b) utilizando apenas os pontos centrais de 90% até 10%; c) excluindo-se os pontos iniciais e utilizando os pontos de 90 % até 0%; d) excluindo-se os pontos finais e utilizando os pontos de 100% até 10%. Para determinar

o número de pontos utilizados no cálculo da média e a faixa na região do gradiente de concentração a ser utilizada foram analisadas 5 soluções (amostras) contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo. Água deionizada foi utilizada como branco e um padrão contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Li} + 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  foi utilizado no preparo da solução A.



**Figura 20** - Esquema da divisão dos pontos em um sinal típico de Li (-) obtido utilizando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo.

**Fonte:** autor

Como Na e K são elementos facilmente ionizáveis foi avaliada a influência do uso de um supressor de ionização em suas determinações pelo método proposto. Neste estudo a amostra ( $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$ ), o padrão ( $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Li} + 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$ ) e o branco foram preparados em meio de  $0; 0,05\%; 0,1\%; 0,5\% \text{ m V}^{-1}$  de CsCl.

Por último foi avaliada a influência da concentração do padrão interno utilizada no preparo do padrão para a calibração. Nesse estudo foi utilizada uma solução contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  como amostra, água deionizada como branco e o padrão foi preparado contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  e as concentrações do padrão interno de  $0,5; 1,0$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 6.2.3.4 Determinação de Na e K

Depois de otimizado o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo, Na e K foram determinados em 5 amostras de biodiesel e urina. Para fins comparativos as amostras de urina e biodiesel foram também analisadas pelos métodos de calibração externa, padronização interna e adição de padrão.

A exatidão do método foi avaliada por meio da análise de um padrão de biodiesel certificado, quatro materiais de referência certificados (*Non-Fat Milk Powder*, *Whole Milk Powder*, *Bovine Liver* e *Mussel Tissue*) e testes de adição e recuperação para as amostras de biodiesel e urina. Para os testes de adição e recuperação alíquotas apropriadas de soluções padrão de Na e K foram adicionadas às amostras de biodiesel e urina de modo a se obter concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  para K e de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  para Na.

##### 6.2.3.4.1 Análise das amostras de biodiesel

O procedimento do método de adição de padrão interno com gradiente de concentração em fluxo envolveu o preparo de duas soluções: a) solução 50% amostra + 50% padrão multielementar  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Na,  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Li e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  K em meio de etanol; b) solução 50% amostra + 50% etanol (branco). As soluções foram analisadas utilizando o sistema proposto nas condições otimizadas previamente. As curvas de adição de padrão interno foram construídas graficamente a partir das razões das intensidades de emissão Na/Li e K/Li versus  $1/[\text{Li}]$ .

No método de adição de padrão, o procedimento envolveu o preparo de seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados 1,0 g de biodiesel, 5 mL de etanol e quantidades apropriadas dos padrões de Na e K para que, após diluição a 10 mL com etanol, fossem produzidas soluções contendo 0 -  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  Na e 0 -  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  K. As curvas foram plotadas a partir das intensidades de emissão de Na e K versus  $[\text{Na}]$  e  $[\text{K}]$  adicionadas, respectivamente.

A calibração externa foi feita a partir de soluções analíticas em um intervalo de 0,1 -  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  Na e 0,2 -  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  K. As curvas foram construídas utilizando a intensidade de emissão de Na e K versus  $[\text{Na}]$  e  $[\text{K}]$ , respectivamente.

A calibração por padronização interna envolveu o preparo de brancos, soluções analíticas (0,1 - 1,0 mg L<sup>-1</sup> Na; 0,2 - 2,0 mg L<sup>-1</sup> K) e amostras de modo a conter 0,5 mg L<sup>-1</sup> Li. As curvas de calibração foram construídas utilizando a razão das intensidades de emissão Na/Li e K/Li versus [Na] e [K], respectivamente.

#### 6.2.3.4.2 *Análise das amostras de urina*

O procedimento do método de adição de padrão interno com gradiente de concentração em fluxo envolveu o preparo de duas soluções: a) solução 50% amostra + 50% padrão multielementar 1,0 mg L<sup>-1</sup> Na, 1,0 mg L<sup>-1</sup> Li e 1,0 mg L<sup>-1</sup> K; b) solução 50% amostra + 50% água deionizada (branco). As soluções foram analisadas utilizando o sistema proposto. As curvas de adição de padrão interno foram construídas graficamente a partir das razões das intensidades de emissão Na/Li e K/Li versus 1/[Li].

No método de adição de padrão, o procedimento envolveu o preparo de seis soluções a partir de cada amostra: a cada um dos tubos de polipropileno foram adicionados 5 mL da amostra de urina diluída (descrita no item 2.3), quantidades apropriadas dos padrões de Na e K para que, após diluição a 10 mL com água deionizada, fossem produzidas soluções contendo 0 - 0,5 mg L<sup>-1</sup> Na e 0 - 0,5 mg L<sup>-1</sup> K. As curvas foram plotadas a partir das intensidades de emissão de Na e K versus [Na] e [K] adicionadas, respectivamente.

A calibração utilizando padrões externos foi feita a partir de soluções analíticas em um intervalo de 0,1 - 1,0 mg L<sup>-1</sup> Na e 0,2 - 2,0 mg L<sup>-1</sup> K. As curvas foram construídas utilizando a intensidade de emissão de Na e K versus [Na] e [K], respectivamente.

A calibração por padronização interna envolveu o preparo de brancos, soluções analíticas (0,1 - 1,0 mg L<sup>-1</sup> Na; 0,2 - 2,0 mg L<sup>-1</sup> K) e amostras de modo a conter 0,5 mg L<sup>-1</sup> Li. As curvas de calibração foram construídas utilizando a razão das intensidades de emissão Na/Li e K/Li versus [Na] e [K], respectivamente.

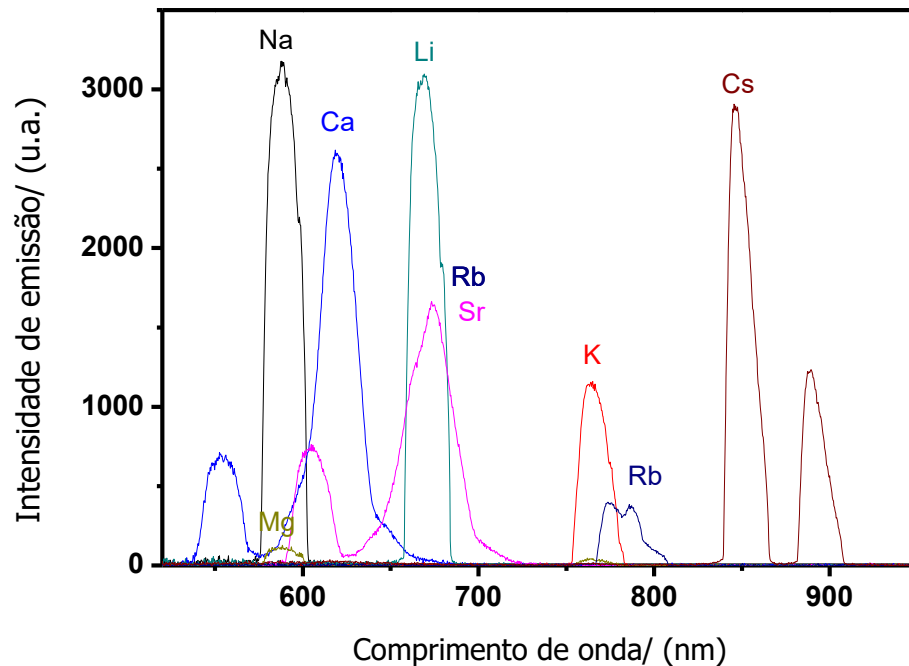
## 6.3 Resultados e discussão

### 6.3.1 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE EMISSÃO ATÔMICA

Após a montagem do sistema de propulsão, excitação e detecção foi realizado um estudo preliminar para selecionar possíveis candidatos a padrão interno e identificar possíveis interferentes nas determinações de Na e K. Foram avaliados os espectros de emissão dos elementos Li, Na, K, Rb, Cs, Ca, Mg e Sr. Como pode ser observado na Figura 21 devido à baixa resolução do espectrômetro utilizado, ao invés de linhas de emissão estreitas para cada analito, são observadas bandas de emissão.

A análise dessa figura revela que o Na sofre interferência espectral dos elementos Ca, Mg e Sr. Nas condições de estudo empregadas e em amostras reais, os elementos que apresentam maior potencial para interferir nas determinações de Na são Ca e Mg, pois são comumente encontrados nas amostras. No entanto, o Mg nas condições de excitação utilizadas é pouco sensível, uma vez que, para uma razão 1:50 de Na/Mg a interferência sobre o sinal do Na é desprezível. Assim, esse interferente será um problema apenas para amostras onde Mg for um componente majoritário na sua composição. O Sr não é comumente encontrado na composição das amostras, e mesmo quando presente, sua concentração é muito inferior à concentração de Na. Devido às altas taxas de diluição necessárias para a determinação de Na, o sinal obtido para o Sr acaba sendo desprezível.

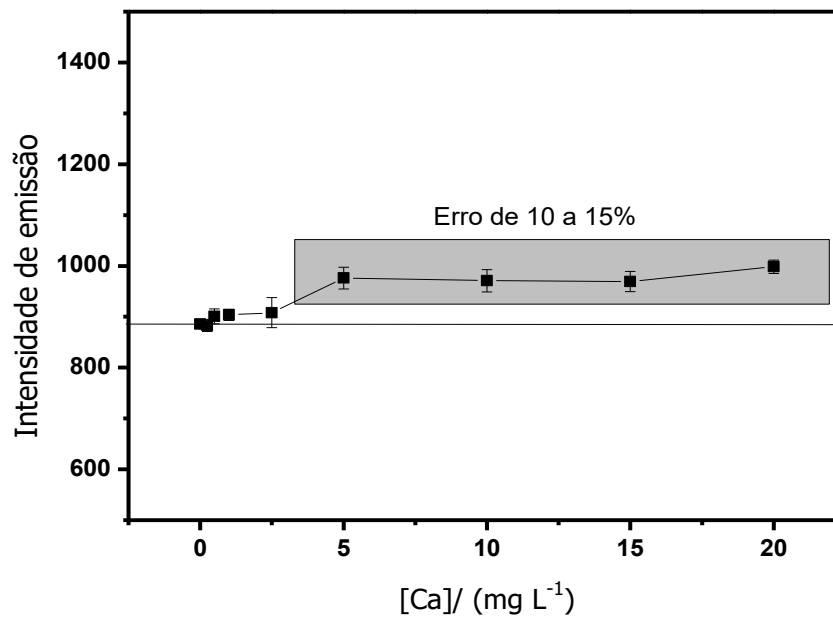
Para determinação de K, apenas o Rb se apresentou como possível interferente, no entanto, é um elemento que dificilmente está presente na composição das amostras, e mesmo quando encontrado, geralmente sua concentração é bem inferior à concentração de K.



**Figura 21** - Espectros de emissão referente as soluções: 1 mg L<sup>-1</sup> Na, 2 mg L<sup>-1</sup> Li, 2 mg L<sup>-1</sup> K, 50 mg L<sup>-1</sup> Mg, 10 mg L<sup>-1</sup> Ca, 10 mg L<sup>-1</sup> Sr, 10 mg L<sup>-1</sup> Rb e 50 mg L<sup>-1</sup> Cs.

**Fonte:** autor

Com base na análise da Figura 21 o efeito da intensidade da emissão de Ca sobre a intensidade de emissão de Na foi avaliado. Para esse estudo foi monitorado o sinal analítico de Na em nove soluções, onde, fixou-se a concentração deste em 1,0 mg L<sup>-1</sup> e variou a concentração de Ca entre 0 e 20 mg L<sup>-1</sup>. Como pode-se observar na Figura 22, em concentrações até 2,5 vezes maior de Ca em relação ao Na o erro obtido é menor que 2%. Já quando a concentração de Ca é maior ou igual a 5 vezes a concentração de Na, esse erro é da ordem de 10%. Assim, para casos onde as matrizes tenham uma relação de Ca/Na maior ou igual a 5, deve ser adotada alguma estratégia para suprimir a excitação do Ca: o emprego de Ti ou PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pode ser uma alternativa por formarem compostos termicamente estáveis (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e CaTiO<sub>3</sub>) em chama ar/acetileno<sup>72</sup>.



**Figura 22** - Variação da intensidade de emissão de 1 mg L<sup>-1</sup> Na com o aumento da concentração de Ca.

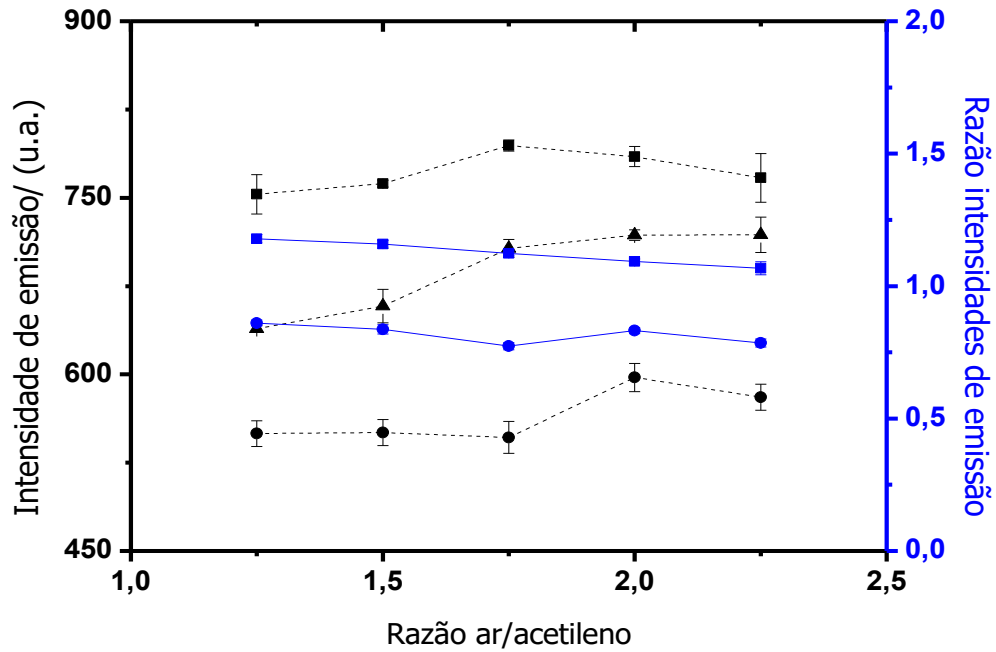
**Fonte:** autor

### 6.3.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO

Dentre os elementos avaliados (Fig. 21) o Li não apresentou sobreposição espectral aos analitos de interesse, além de estar presente em alguns trabalhos na literatura como padrão interno em determinações de Na e K por emissão atômica<sup>16,89,90</sup>. Assim, optou-se por avaliar sua efetividade para corrigir interferências relacionadas a diferentes condições de excitação e diferentes taxas de amostragem, por meio da análise do comportamento das intensidades de emissão de Na, K e Li frente a variações nas condições instrumentais.

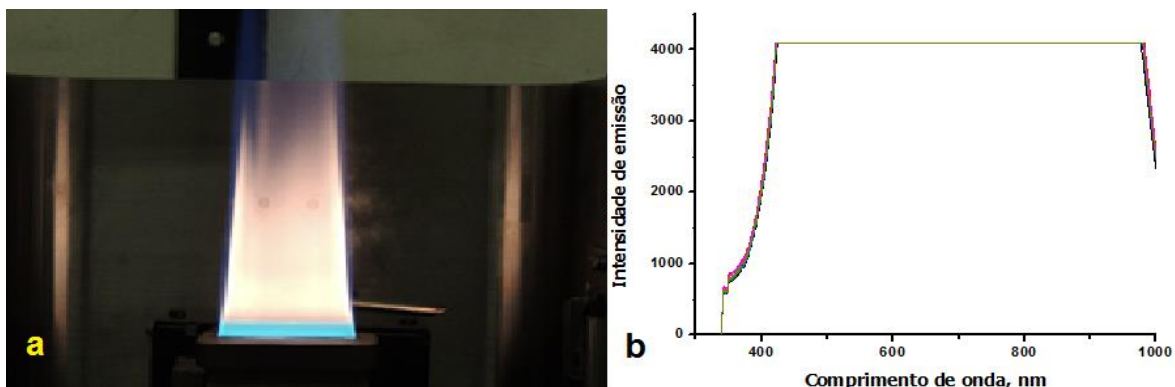
Diferentes condições de excitação foram obtidas a partir da variação da estequiometria da chama. Mantendo-se a taxa de aspiração e altura de observação fixas, variou-se a vazão do ar comprimido em proporções ar/acetileno entre 0,5 - 2,25. A análise da Figura 23 mostra que as intensidades de emissão de Na e Li sofrem um pequeno acréscimo a partir da razão 1,75 ar/acetileno (5% Na e 8% Li), a intensidade de emissão de K sofre um pequeno acréscimo a partir da razão 2,0 ar/acetileno (8%). No entanto, considerando a pequena variação observada nas intensidades de emissão dos analitos e padrão interno, quando utilizado a razão entre os sinais de Na/Li e K/Li, estes permanecem praticamente constantes.

Para proporções ar/acetileno menores ou igual a 1, não foi possível realizar as medidas das intensidades de emissão para Na, Li e K, pois, em chamas redutoras há um aumento na emissão de radiação proveniente da chama<sup>92</sup>, gerando um sinal de fundo que satura o detector, como pode ser observado na Figura 24.



**Figura 23** - Influência da razão ar/acetileno nas intensidades de emissão de Na (-■-), K (-●-), e Li (-▲-) e nas razões das intensidades de emissão de Na/Li (-■-) e K/Li (-●-).

Fonte: autor

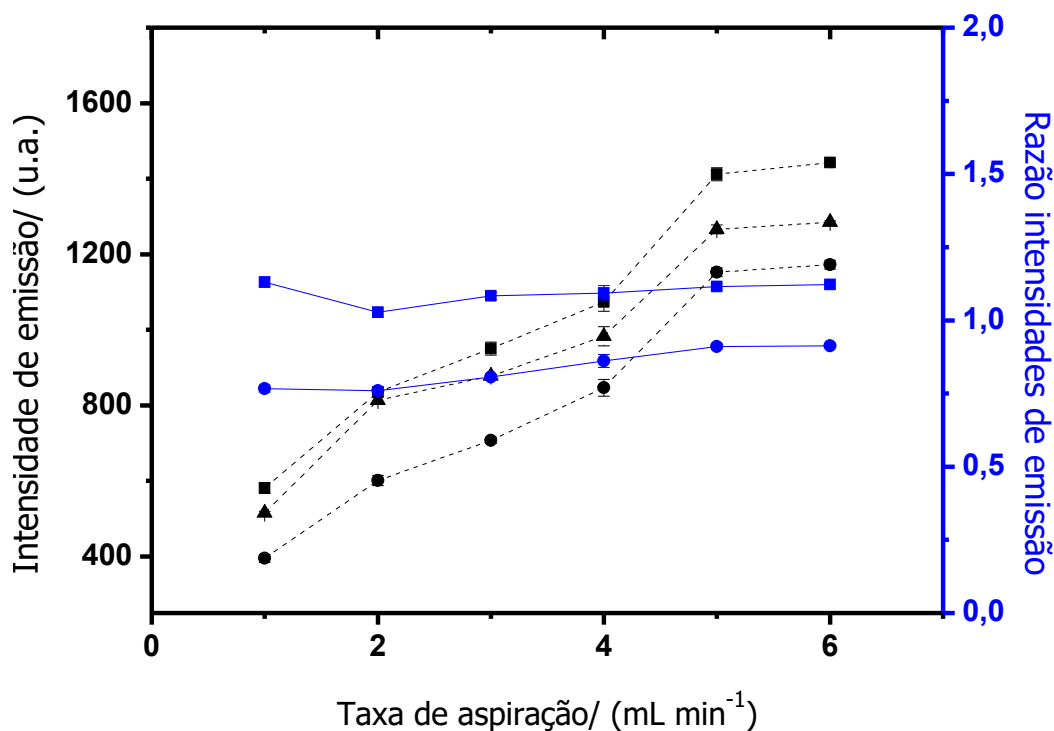


**Figura 24** - Fundo observado (a) em chamas redutoras e (b) registrado

Fonte: autor

Diferentes taxas de amostragem foram avaliadas variando a taxa de aspiração de 1 a 6 mL min<sup>-1</sup>. Pode-se observar na Figura 25 que, com o aumento da taxa de aspiração, ocorre um aumento na intensidade de emissão, devido a maior quantidade de amostra que chega ao atomizador, aumentando assim a população de Na, K e Li excitadas na chama. Esse aumento nas intensidades de emissão decorrente ao aumento da população de Na, K e Li ocorre de modo semelhante para os três elementos. Esse comportamento semelhante pode ser melhor expressado através das razões das intensidades de emissão de Na/Li e K/Li que permanecem praticamente constantes.

As intensidades de emissão de Na, K e Li variaram de maneira semelhante tanto em função das variações de composição da chama quanto em função das taxas de aspiração, demonstrando que o Li pode ser um bom padrão interno para Na e K.



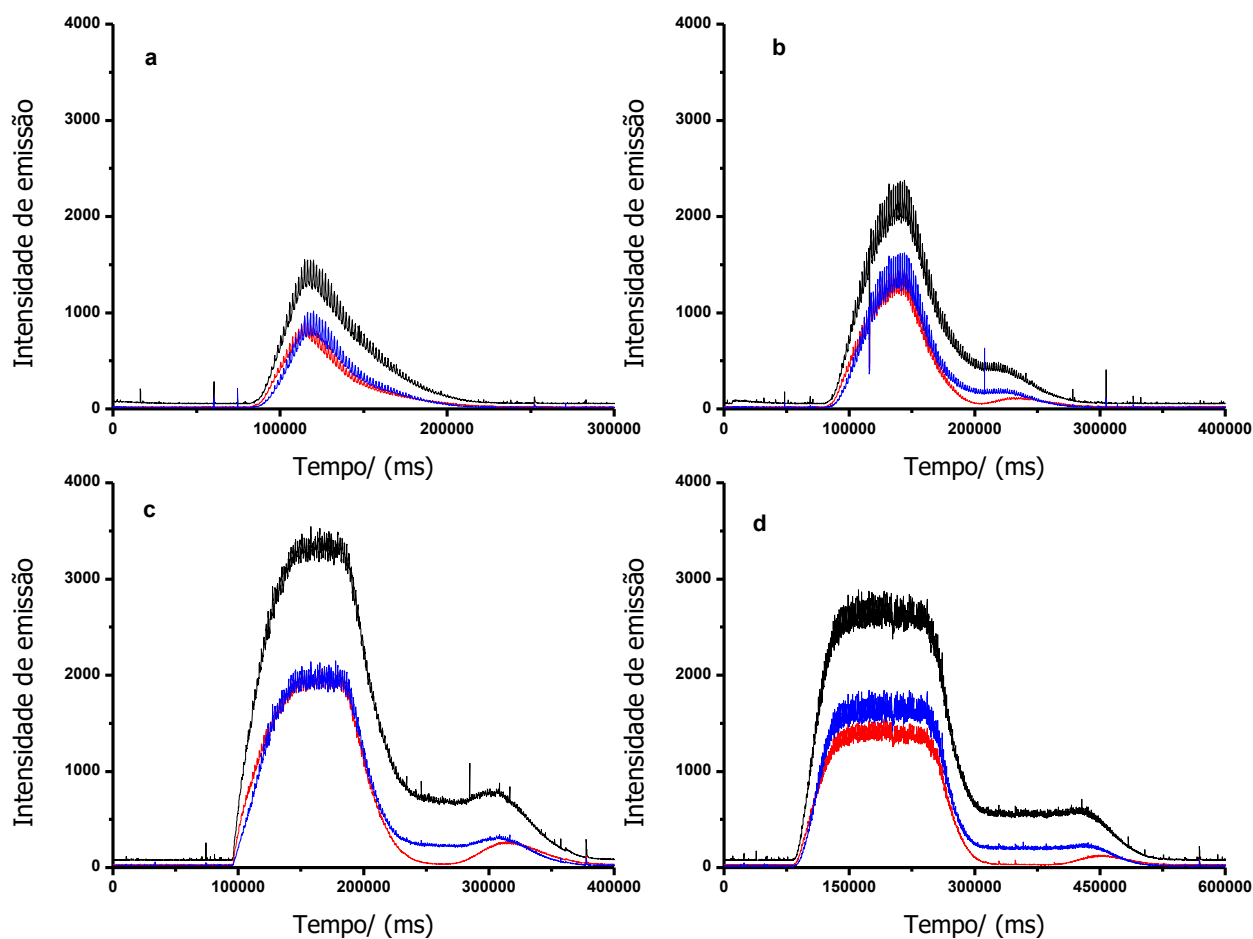
**Figura 25** - Influência da variação da taxa de aspiração nas intensidades de emissão de Na (-■-), K (-●-), e Li (-▲-) e nas razões das intensidades de emissão de Na/Li (-■-) e K/Li (-●-).

Fonte: autor

### 6.3.3 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO

Após a seleção do Li como padrão interno, o sistema de injeção em fluxo para o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foi otimizado. O sistema utilizado (Figura 19) é composto por duas alças de amostragem L<sub>1</sub> (solução A: padrão + amostra) e L<sub>2</sub> (solução B: branco + amostra). Com a injeção da alça L<sub>1</sub>, observa-se a formação de um patamar das intensidades de emissão de Na, K e Li (referentes a concentração presente no padrão + concentração presente na amostra); ao comutar o injetor, a alça L<sub>2</sub> é amostrada. Ao injetar esta alça observa-se que as intensidades de emissão sofrem um decréscimo gradual, sendo isso, condicionado ao volume morto relativamente grande da câmara de nebulização do espectrômetro de absorção atômica. Esse volume morto favorece a ocorrência de uma “pseudo diluição” da solução injetada<sup>9,93</sup>, até que se forme um novo patamar das intensidades de emissão referente a concentração de Na, K e Li presente na solução B (concentração presente na amostra + branco).

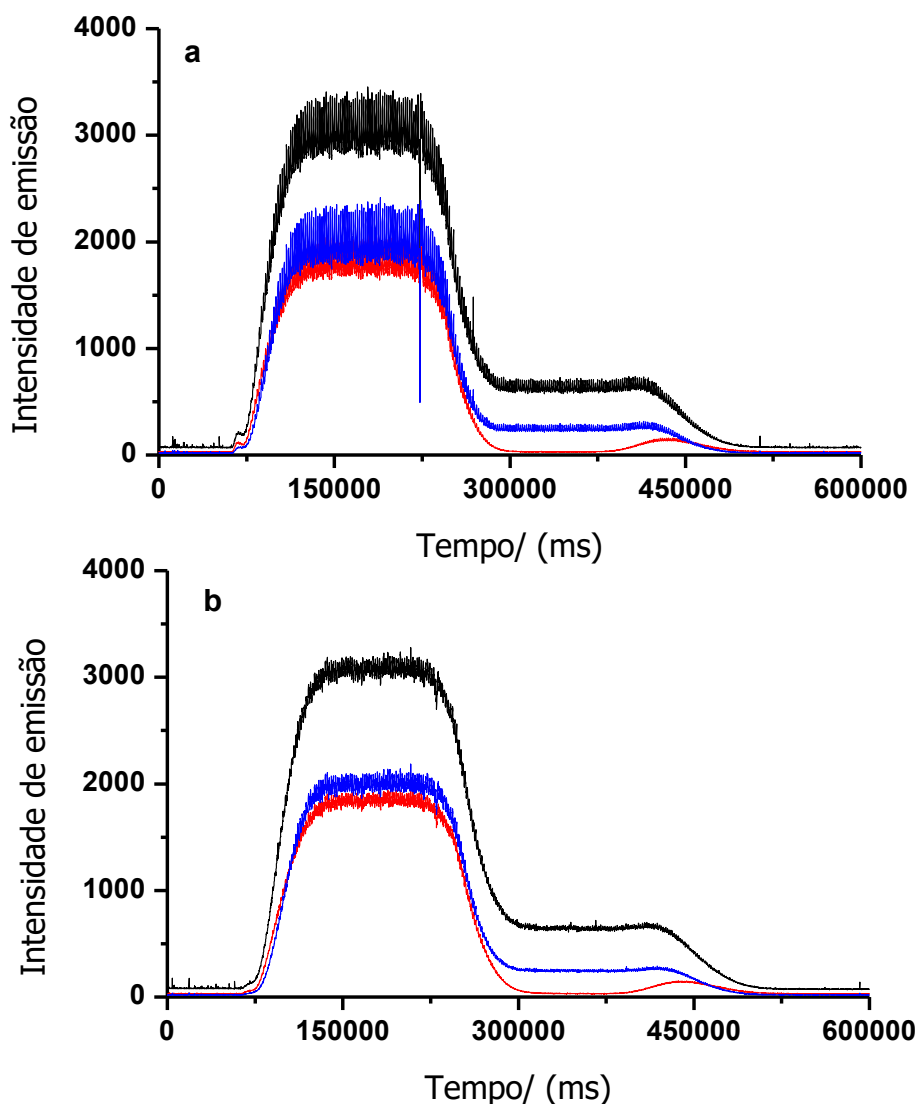
Essa região onde ocorre a “pseudo diluição” é utilizada para construção da curva de calibração do método. No entanto, para que possa ser definida com clareza a região a ser utilizada, se torna necessária a formação de patamares bem definidos. Baseado nisto, o tamanho das alças de amostragem foi avaliado, variando seus comprimentos entre 100 e 500 cm. Como pode ser observado na Figura 26, para alças de amostragem de 100 e 200 cm (Fig. 26a e 26b), não ocorre a formação de patamares referentes aos sinais de Na, K e Li, devido à dispersão do conteúdo das alças de amostragem no fluido transportador (branco). Uma situação de mínima dispersão é obtida com o aumento das alças de amostragem<sup>10,91</sup>, como pode ser observado nas Figuras 26c e 26d, na qual são utilizadas alças de amostragem de 300 e 500 cm, respectivamente. A alça de amostragem de 500 cm apresentou patamares bem definidos, sendo possível identificar com clareza os pontos de máxima intensidade de emissão para as alças L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>. Optou-se por utilizar este comprimento de alça no decorrer do trabalho.



**Figura 26** - Avaliação de diferentes tamanhos de alças de amostragem (a) 100 cm (b) 200 cm (c) 300 cm e (d) 500 cm para (-) Na, (-) K e (-) Li utilizando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

**Fonte:** autor

Com a definição do tamanho das alças de amostragem definido, o uso de um amortecedor de pulso para diminuir a oscilação do sinal analítico causado pelos pulsos da bomba peristáltica foi avaliado. Como pode ser observado na Figura 27b, quando utilizado o amortecedor de pulso o sinal é menos ruidoso, quando comparado com o experimento, sem o uso do amortecedor de pulso (Fig. 27a). Essa diminuição no ruído pode ser melhor evidenciada quando comparados os desvios padrões relativos (RSDs) médios que são da ordem de 2% para Na, K e Li com a utilização do amortecedor de pulso, enquanto que a ausência do mesmo fornece RSDs da ordem de 7% para Na e Li e 10% para K. Assim, optou-se pelo uso do amortecedor de pulso no sistema de fluxos empregado.



**Figura 27** - Intensidades de emissão (-) Na, (-) K e (-) Li (a) sem amortecedor de pulso (b) com amortecedor de pulso.

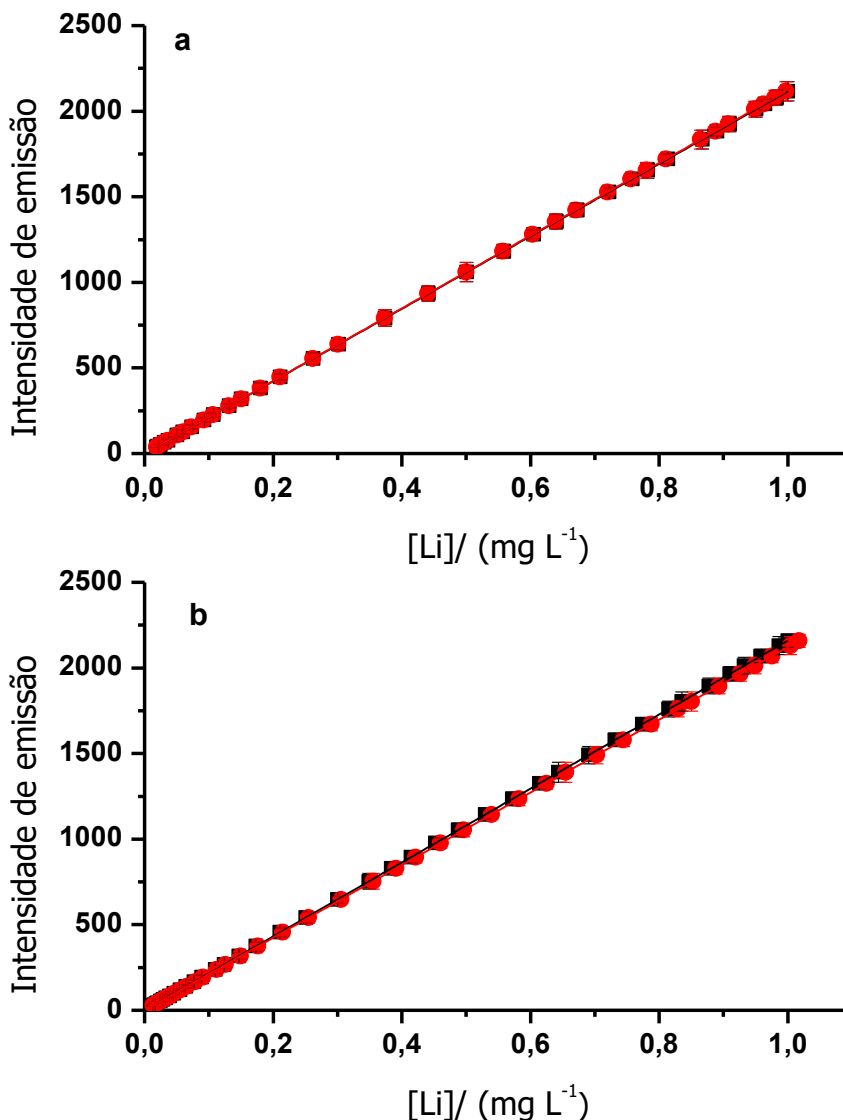
**Fonte:** autor

#### 6.3.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO

Um dos pontos cruciais para o método proposto é a determinação da concentração de Li, uma vez que no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo as curvas são plotadas utilizando a razão da intensidade de emissão do analito pela intensidade de emissão do padrão interno em função do inverso da concentração do padrão interno. Assim dois métodos foram testados: 1)

utilizando uma calibração externa ( $0 - 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Li}$ ) antes do uso do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo permitindo que a concentração de Li para cada ponto da região do gradiente de concentração seja calculada por interpolação dos pontos; 2) utilizando o valor do ponto de maior intensidade de emissão do Li ( $P_{\text{max}}$ ), onde a concentração é conhecida (concentração utilizada no padrão) e, assumindo que o Li tenha uma relação linear, calcula-se a concentração para os outros pontos ( $P_x$ ) a partir da Equação 10 descrita anteriormente (item 5.2.4.2).

Foram comparados os dois métodos para determinar a concentração de Li, sendo esses realizados em meio aquoso e em dois dias distintos. A análise da Figura 28 revela que as concentrações de Li no gradiente de concentração calculadas a partir dos métodos 1 e 2, geram curvas analíticas de Li praticamente sobrepostas. Ao fazer a regressão linear em ambos os casos, são obtidos os seguintes coeficientes angulares:  $2118 \pm 5$  (método 1) e  $2145 \pm 20$  (método 2). Aplicando o teste  $t$  pareado para os coeficientes angulares obtidos pelos dois métodos, conclui-se que as curvas de Li são concordantes ao nível de 95% de confiança. Assim, optou-se por utilizar o método 2 no decorrer do trabalho, pois o uso de uma calibração externa antes de cada análise, diminuiria a frequência analítica, além de haver a necessidade do preparo de pelo menos cinco soluções padrões de Li, somadas às soluções já utilizadas no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.



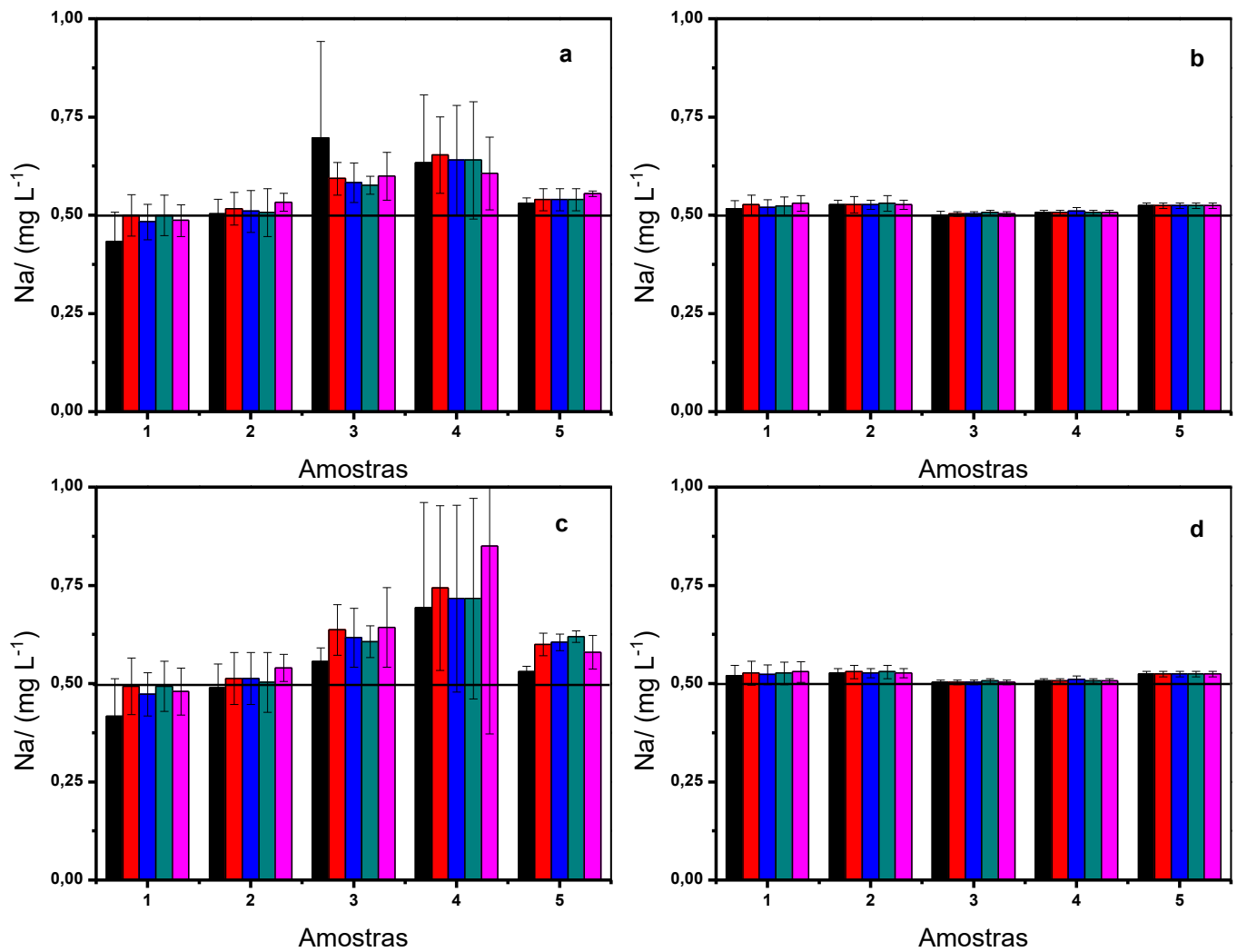
**Figura 28** - Concentrações de Li no gradiente de concentração calculadas através do método 1 (-■-) e método 2 (-●-) nos dias 1 (a) e 2 (b).

**Fonte:** autor

Para emprego do método da adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo pelo sistema proposto, utiliza-se um modo de aquisição rápida de dados, que gera um total de 6000 espectros por análise. Dentre esse total, aproximadamente 1000 espectros correspondem à região do gradiente de concentração. No entanto, devido à oscilação do sinal e o grande número de pontos, avaliou-se o uso de médias, que foram calculadas utilizando 10, 20, 30, 40 e 50 pontos. A análise das Figuras 29 e 30 revela que tanto para Na quanto para K o número de pontos utilizados para calcular a média não tem grande influência na

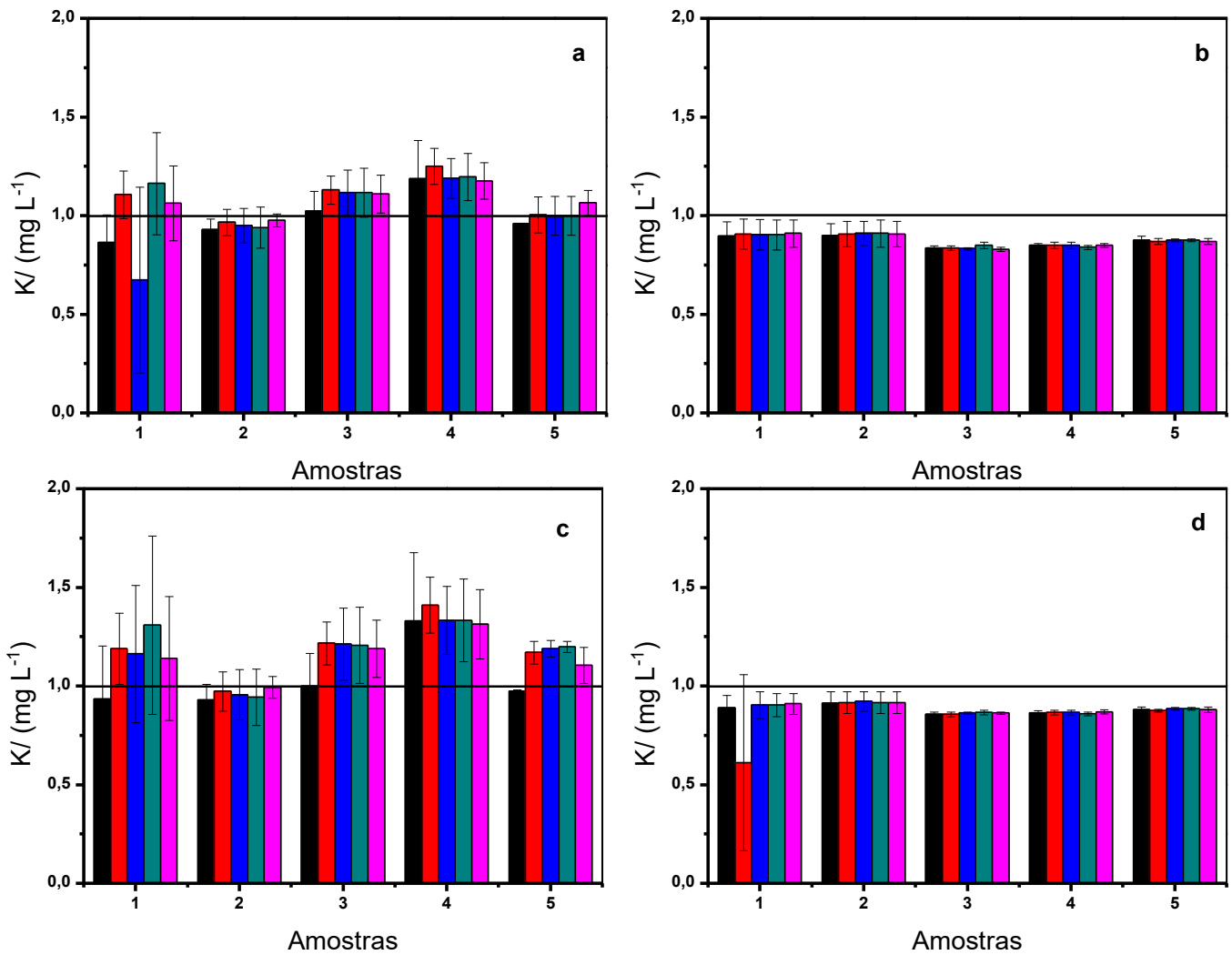
precisão do resultado final, sendo, melhor expressado através dos RSDs médios para as médias calculadas utilizando 10 (10% Na e 8% K), 20 (7% Na e 10% K), 30 (8% Na e 8% K), 40 (8% Na e 8% K) e 50 pontos (8% Na e 7% K). Assim, optou-se por utilizar uma média de 30 pontos para os estudos posteriores.

Um fator importante no desenvolvimento do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo é a definição da faixa na região do gradiente de concentração (região de transição entre as soluções A e B) que deve ser empregada na calibração do método. Visando avaliar a faixa na região do gradiente de concentração a ser utilizada, foram analisadas 5 amostras contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  Na e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  K utilizando o método proposto. Considerando o valor máximo de intensidade de emissão no gradiente de concentração como sendo 100% e o valor mais baixo como sendo 0%, o mesmo foi dividido em diferentes faixas da seguinte maneira: a) todos os pontos de 100% até 0%; b) pontos centrais de 90% até 10%; c) excluindo-se os pontos iniciais de 90 % até 0%; d) excluindo-se os pontos finais 100% até 10%. Como pode ser observado nas Figuras 29 e 30, tanto para Na quanto para K, a precisão (RSD) do método é afetada de maneira mais acentuada quando todos os pontos são utilizados na calibração Fig.29a e 30a (em média 12% para Na e K) e quando foram excluídos os pontos iniciais Fig. 29c e 30c (em média 16% para Na e 14% para K). Com a utilização dos pontos centrais Fig. 29b e 30b e exclusão dos pontos finais Fig. 29d e 30d os RSDs foram da ordem de 2% para Na e 5% para K.



**Figura 29** - Determinação de Na em 5 amostras (contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Na) empregando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo utilizando médias de: ■ 10 pontos, ■ 20 pontos, ■ 30 pontos, ■ 40 pontos e ■ 50 pontos. E utilizando: a) todos os pontos, b) pontos centrais, c) excluindo pontos iniciais e d) excluindo pontos finais.

**Fonte:** autor



**Figura 30** - Determinação de K em 5 amostras (contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de K) empregando o método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo utilizando médias de: ■ 10 pontos, ■ 20 pontos, ■ 30 pontos, ■ 40 pontos e ■ 50 pontos. E utilizando: a) todos os pontos, b) pontos centrais, c) excluindo pontos iniciais e d) excluindo pontos finais.

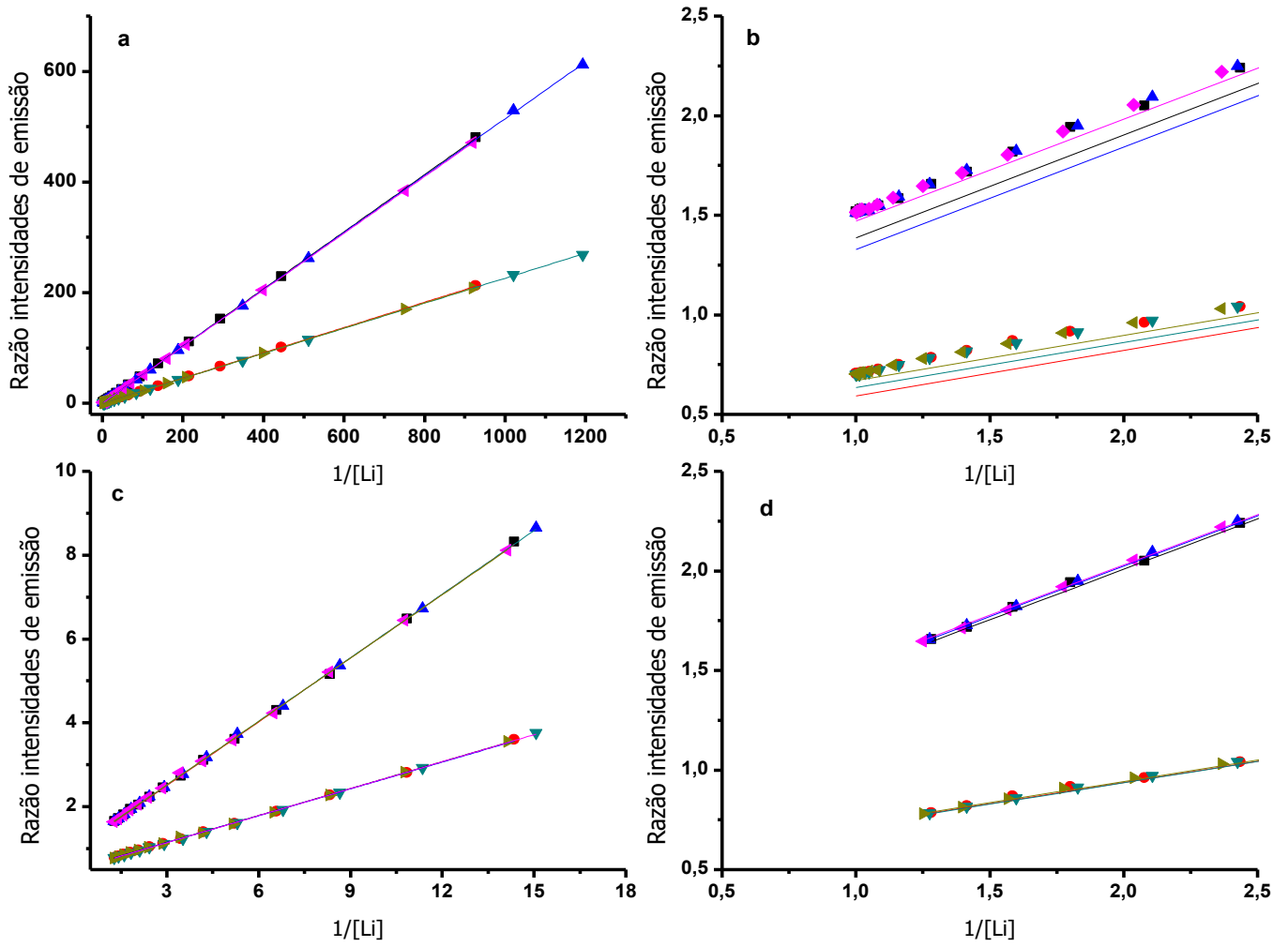
**Fonte:** autor

A melhora na precisão dos resultados quando são utilizados apenas os pontos centrais e quando são excluídos os pontos finais, se deve ao fato da construção das curvas de calibração serem plotadas utilizando a razão das intensidades de emissão de Na/Li e K/Li versus  $1/[Li]$ . Nos pontos situados ao final da região do gradiente de concentração os valores se aproximam muito de zero (Figura 20) e quando se calcula o inverso de um número muito pequeno gera-se um valor alto. Assim, qualquer pequena oscilação nas intensidades de emissão, pode influenciar nos coeficientes angular e linear da curva de calibração, o que afeta diretamente o resultado final da

análise, uma vez que, o cálculo da concentração do analito na amostra ( $C^{am}$ ) pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo é feito por meio da razão do coeficiente angular / coeficiente linear multiplicado pela razão da concentração do analito no padrão ( $C^p_a$ ) / concentração do padrão interno no padrão ( $C^p_{pi}$ ) como pode ser observado na Equação 11.

$$C^{am} = \frac{\text{Coef. angular}}{\text{Coef. linear}} \times \frac{C^p_a}{C^p_{pi}} \quad \text{Eq. 11}$$

Esse efeito pode ser observado na Figura 31 onde são apresentadas as curvas de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo para a determinação de Na e K ( $n=3$ ) utilizando todos os pontos (Fig. 31a) e utilizando apenas os pontos centrais (Fig. 31c) nas curvas de calibração. As curvas para cada uma das replicatas em ambos os casos apresentam inclinações muito próximas como pode ser observado na Tabela 15. No entanto, quando ampliamos as curvas apresentadas na Figura 31a e 31c, pode ser observado que quando todos os pontos são utilizados na calibração (Fig. 31b) os pontos de menor valor não apresentam grande influência na tendência das retas, refletindo nos coeficientes lineares das curvas. Quando são utilizados apenas os pontos centrais na calibração (Fig. 31d), o mesmo comportamento não é observado. Assim, mesmo que as inclinações das retas sejam muito próximas, a diferença nos coeficientes lineares quando todos os pontos são utilizados levam a uma imprecisão maior do método (8,4% Na e 10,3% K) quando comparado com as curvas plotadas apenas com os pontos centrais (1,7% Na e 0,9% K) conforme apresentado na Tabela 15.



**Figura 31** - Curvas de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo para Na (-■-) (-▲-) (-◆-) e K (-●-) (-▼-) (-►-) na amostra 3 (n=3). a) curvas utilizando todos os pontos; b) curva utilizando todos os pontos ampliada; c) curvas utilizando os pontos centrais; d) curvas utilizando os pontos centrais ampliada.

**Fonte:** autor

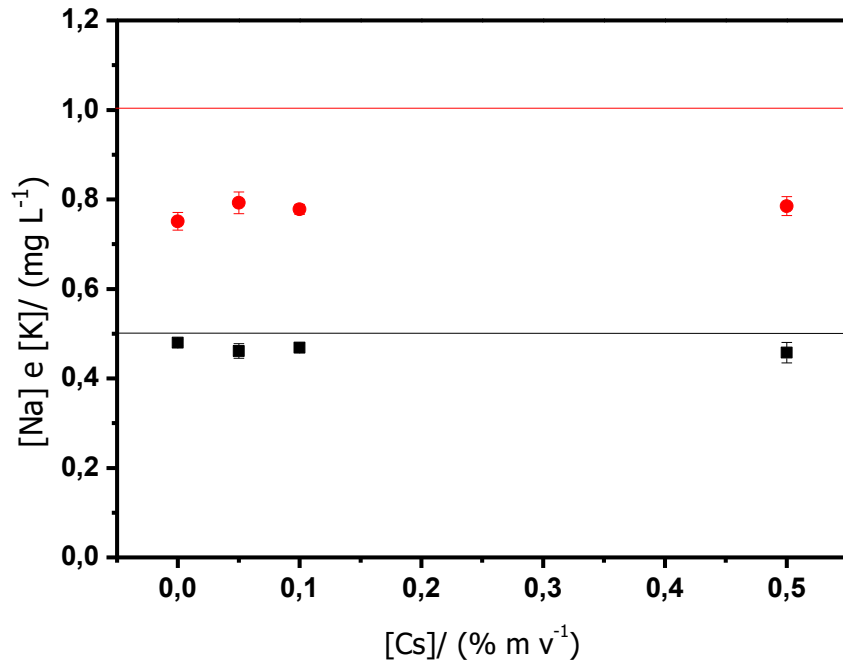
**Tabela 15** - Parâmetros das curvas de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo para amostra 3 utilizando todos os pontos (TP) e pontos centrais (PC) na calibração. Resultado ( $\text{mg L}^{-1}$ ) das determinações de Na e K para cada replicata e desvios padrões relativo para TP e PC.

	Na				K			
	Coef. linear	Coef. angular	[Na]	RSD,	Coef. linear	Coef. angular	[K]	RSD,
<b>PC1</b>	0,9967	0,5065	0,51		0,5132	0,2132	0,83	
<b>PC2</b>	1,0139	0,5054	0,50	1,7	0,5083	0,2143	0,84	0,9
<b>PC3</b>	1,0249	0,5032	0,49		0,5164	0,2139	0,83	
<b>TP1</b>	0,8716	0,5164	0,59		0,3661	0,2285	1,25	
<b>TP2</b>	0,8153	0,5142	0,63	8,4	0,4093	0,2262	1,11	10,3
<b>TP3</b>	0,9591	0,5117	0,53		0,4448	0,2267	1,02	

Fonte: autor

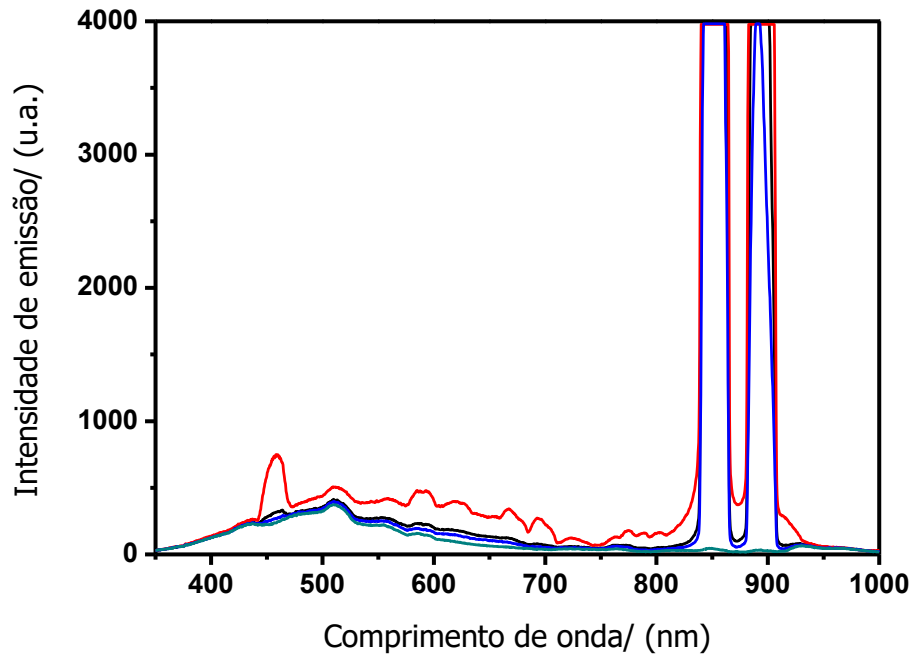
Como Na e K são elementos facilmente ionizáveis CsCl foi avaliado como supressor de ionização em suas determinações pelo método proposto, sendo avaliadas concentrações de CsCl entre 0 e 0,5% m  $V^{-1}$ . Como pode ser observado na Figura 32 os valores obtidos com e sem o uso do supressor de ionização foram muito próximos. Se utilizarmos o valor obtido sem o uso de CsCl como referência, e aplicando o teste  $t$  não pareado, conclui-se que os valores obtidos para Na e K com e sem o uso de supressor de ionização são concordantes ao nível de 95% confiança.

Como as concentrações de Cs utilizadas são relativamente altas, e a emissão proveniente da excitação do Cs, acaba aumentando o sinal de fundo (Figura 33), optou-se por não utilizar o supressor de ionização.



**Figura 32** - Determinação de Na (-■-) e K (-●-) pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando diferentes concentrações do supressor de ionização.

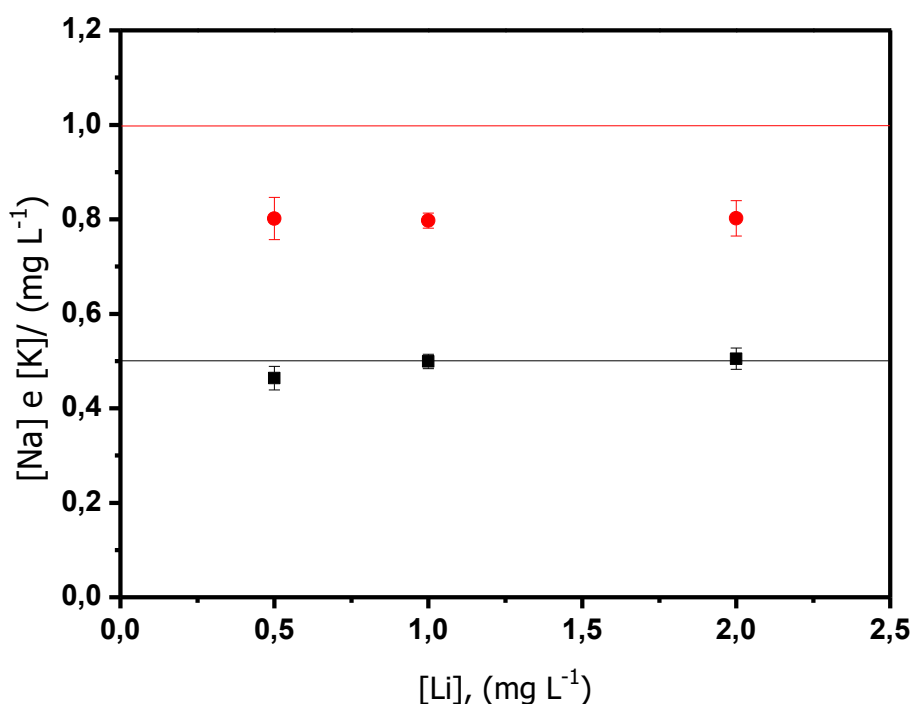
Fonte: autor



**Figura 33** - Sinal de fundo gerado a partir de soluções (—) 0%; (—) 0,05%; (—) 0,1%; (—) 0,5% m V<sup>-1</sup> de CsCl.

Fonte: autor

Por último foi avaliado a influência da concentração do padrão interno na determinação de Na e K. Neste estudo foi empregada uma amostra contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  e o padrão contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$  e concentrações do padrão interno de 0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mg L}^{-1} \text{ Li}$ . A análise da Figura 34 revela que independente da concentração do padrão interno utilizada, os resultados são concordantes, desde que a concentração utilizada esteja dentro da faixa linear de resposta do analito.



**Figura 34** - Determinação de Na (-■-) e K (-●-) pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando diferentes concentrações do padrão interno.

**Fonte:** autor

### 6.3.5 DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO

#### 6.3.5.1 Materiais de referência certificados

Após a otimização do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo sua exatidão foi avaliada através da determinação de Na e K em quatro materiais de referência certificados e um padrão de biodiesel certificado.

Os métodos de adição de padrão, padronização interna e calibração externa foram utilizados para fins comparativos.

Os resultados das determinações de Na nos cinco materiais de referência certificados são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** - Resultados (% m m<sup>-1</sup>) da determinação (n=3) de Na em materiais de referência certificados empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostras	Valor Certificado	Calibração externa	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
Biodiesel	2,5*	5,7 ± 0,3*	1,9 ± 0,1*	2,7 ± 0,3*	2,5 ± 0,2*
Bovine Liver	0,242 ± 0,006	0,253 ± 0,010	0,244 ± 0,011	0,249 ± 0,019	0,241 ± 0,009
Mussel Tissue	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1
Non Fat Milk Powder	0,497 ± 0,010	0,576 ± 0,040	0,528 ± 0,020	0,532 ± 0,060	0,498 ± 0,010
Whole Milk Powder	0,356 ± 0,040	0,430 ± 0,020	0,402 ± 0,020	0,363 ± 0,014	0,365 ± 0,020

\* Valores expressos em mg Kg<sup>-1</sup>

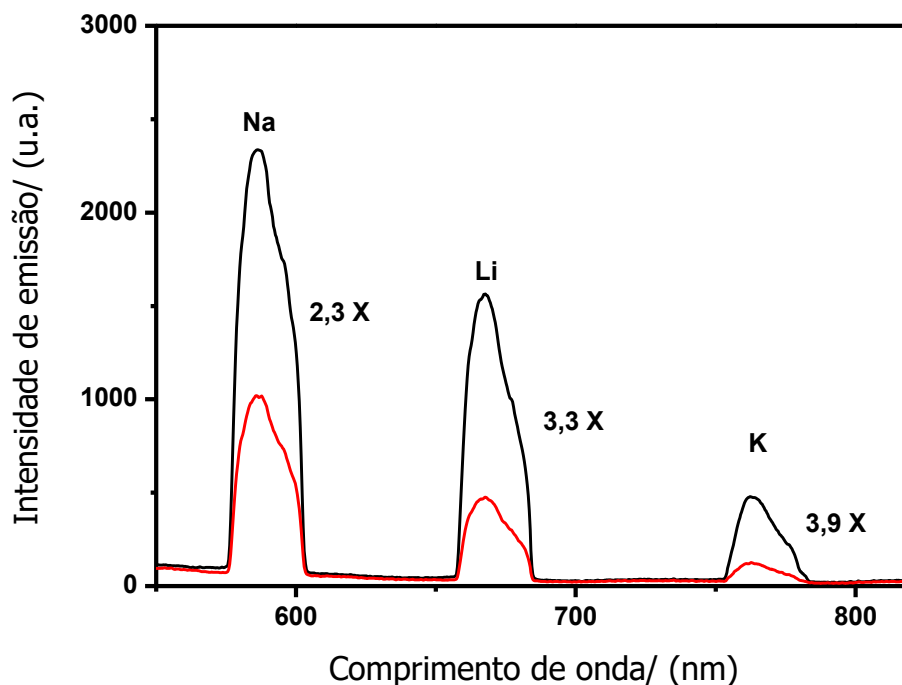
Fonte: autor

A análise destes resultados mostra que para a calibração externa o valor obtido para o padrão de biodiesel certificado estava 2,3 vezes maior que o valor certificado. Esse valor superestimado ocorre devido ao aumento da temperatura da chama ocasionado pela inserção de etanol, e pela diminuição da tensão superficial da solução, facilitando a nebulização da solução e aumentando a população de Na presente na chama<sup>70</sup>. Para os quatro CRMs apenas o *Whole Milk Powder* não foi concordante ao nível 95% de confiança (teste *t* de Student). No entanto, o valor obtido foi relativamente próximo do certificado.

Os resultados obtidos na determinação Na no padrão de biodiesel foi menor que o valor certificado quando utilizada a padronização interna. Esse valor subestimado ocorre porque o Na e o Li não são afetados de maneira semelhante pelo aumento da temperatura da chama (Figura 35). Esse comportamento diferente pode ser relacionado às energias de transições para as linhas de emissão utilizadas: a energia de transição da linha de Na (2,1044 eV) é maior que a energia de transição

da linha de Li (1,8478 eV)<sup>94</sup>. Já para os outros quatro CRMs os valores obtidos foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os valores certificados.

Os resultados obtidos para os cinco CRMs pelos métodos de adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os valores certificados (teste *t* de Student). O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo apresentou os menores RSDs médios (4,4%) quando comparado aos outros métodos utilizados: 5,8% calibração externa, 4,8% padronização interna e 7,3% para adição de padrão.



**Figura 35** - Intensidades de emissão de 1 mg L<sup>-1</sup> Na, 1 mg L<sup>-1</sup> Li e 1 mg L<sup>-1</sup> K em meio de etanol (---) e em meio aquoso (—).

**Fonte:** autor

Os resultados obtidos para a determinação de K nos cinco materiais de referência certificados são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17** - Resultados (% m m<sup>-1</sup>) da determinação (n=3) de K em materiais de referência certificados empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostras	Valor Certificado	Calibração externa	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
Biodiesel	2,5	8,5 ± 0,3	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2
Bovine Liver	0,9994 ± 0,0002	0,9544 ± 0,0210	0,9408 ± 0,0250	0,9786 ± 0,0880	0,8450 ± 0,0100
Mussel Tissue	0,97 ± 0,05	0,96 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,90 ± 0,03	0,88 ± 0,05
Non Fat Milk Powder	1,363 ± 0,047	1,368 ± 0,056	1,363 ± 0,047	1,581 ± 0,413	0,989 ± 0,090
Whole Milk Powder	1,69 ± 0,03	1,70 ± 0,05	1,69 ± 0,03	1,16 ± 0,05	1,39 ± 0,07

\* Valores expressos em mg Kg<sup>-1</sup>

Fonte: autor

Análise destes resultados revela que, assim como observado para Na, a concentração de K determinada para o padrão de biodiesel foi maior que o valor certificado (3,4 vezes) quando utilizado a calibração externa. Já para os quatro CRMs os valores obtidos foram concordantes ao nível de 95% de confiança.

A concentração de K determinada pelo método da padronização interna no padrão de biodiesel foi acima do valor certificado. Assim como observado na determinação de Na, o K e o Li foram afetados pelo aumento da temperatura da chama de maneira diferente (Figura 35). Neste caso, o K foi afetado de forma mais acentuada devido a menor energia de transição da linha de K (1,6171eV) quando comparado a da linha de Li (1,8478 eV)<sup>94</sup>. Para os outros quatro CRMs, os valores obtidos foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os valores certificados.

Para o método de adição de padrão apenas o material *Whole Milk Powder* não foi concordante ao nível de 95 % de confiança. No entanto, observa-se que o método apresenta altos RSDs (12% em média). Esse comportamento se deve ao fato do método de adição de padrão envolver o preparo de um grande número de soluções, tornando-o mais susceptível a erros aleatórios.

Para o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo apenas o CRM *Mussel Tissue* foi concordante ao nível de 95% de confiança. Já

os outros materiais de referência certificados apresentaram recuperações entre 73 e 85% de recuperação.

### 6.3.5.2 Biodiesel

O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foi aplicado na determinação de Na e K em cinco amostras de biodiesel. Para fins comparativos, os analitos também foram determinados nestas amostras empregando a calibração externa, a adição de padrão e a padronização interna.

Todas as amostras de biodiesel analisadas apresentaram concentrações de K menores que o limite de quantificação ( $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ) que corresponde a  $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Os resultados da determinação de Na em biodiesel podem ser observados na Tabela 18.

**Tabela 18** - Resultados ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Na em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostras	Calibração Externa	Padronização Interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
Biodiesel 1	$1,40 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,07$
Biodiesel 2	$1,97 \pm 0,15$	$0,61 \pm 0,06$	$1,54 \pm 0,26$	$1,23 \pm 0,10$
Biodiesel 3	$1,50 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,01$
Biodiesel 4	$1,10 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,04$
Biodiesel 5	$2,04 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,13$	$1,21 \pm 0,11$

**Fonte:** autor

Para a determinação de Na, os resultados obtidos para os quatro métodos apresentaram um comportamento semelhante ao observado para o padrão de biodiesel certificado discutido anteriormente. Os valores obtidos utilizando a calibração externa ( $1,10 - 2,04 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram aproximadamente 2 vezes maiores que os valores obtidos pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Os resultados obtidos para o método da padronização interna variaram entre  $0,30 - 0,61 \text{ mg kg}^{-1}$ . Esses valores são em média 50% menores que os obtidos pelo

método de adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo (0,56 - 1,23 mg kg<sup>-1</sup>).

Os valores obtidos pelo método de adição de padrão foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t* pareado) com os valores obtidos pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Assim como pode ser observado na análise dos CRMs, os RSDs médios obtidos pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (6,9%) foram menores que os obtidos pelos métodos de calibração externa (8,0%), padronização interna (7,6%) e adição de padrão (11,2%).

O desempenho dos métodos foi também avaliado por meio de testes de adição e recuperação dos analitos. Alíquotas apropriadas de soluções padrão de Na e K foram adicionadas nas amostras de biodiesel de modo a preparar soluções contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> K e 0,2 mg L<sup>-1</sup> Na.

As recuperações obtidas para Na estão apresentadas na Tabela 19.

**Tabela 19** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Na em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	202 ± 17	72 ± 6	119 ± 10	98 ± 5
Biodiesel 2	181 ± 8	67 ± 1	111 ± 9	97 ± 6
Biodiesel 3	191 ± 15	67 ± 2	126 ± 11	94 ± 2
Biodiesel 4	198 ± 17	72 ± 8	113 ± 7	94 ± 3
Biodiesel 5	194 ± 14	70 ± 2	117 ± 10	96 ± 3

**Fonte:** autor

Análise da Tabela 19 revela uma tendência no comportamento do Na nas determinações envolvendo os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interna por gradiente de concentração em fluxo. Tanto para as amostras de biodiesel, material certificado e testes de adição e recuperação. O método de calibração externa apresentou recuperações que variaram entre 181 e 202%, sendo o valor recuperado na ordem de duas vezes maior que o

esperado. Essa alta recuperação é causada pelo aumento da temperatura da chama e diminuição da tensão superficial.

Para a padronização interna as recuperações variaram entre 67 e 72%, uma vez que a intensidade de emissão de Li sofre um incremento maior que a de Na, acarretando em recuperações subestimadas (da ordem de 70%).

O método de adição de padrão apresentou recuperações entre 111 e 126%, sendo estas um pouco acima das recuperações aceitáveis para estes níveis de concentrações (80 e 110%)<sup>73</sup>. No decorrer do trabalho, o método apresentou o maior RSD médio entre os métodos empregados, da ordem de 8%.

O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo apresentou boas recuperações para Na (94 - 98%), mostrando uma boa exatidão do método. Além de mostrar uma boa precisão nas medidas (3,9% em média) quando comparado aos desvios médios obtidos para os métodos de calibração externa (7,3%), padronização interna (6,5%) e adição de padrão (8,0%).

Os resultados obtidos para os testes de adição e recuperação para K estão apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para K em biodiesel empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Biodiesel 1	381 ± 10	136 ± 9	81 ± 8	81 ± 9
Biodiesel 2	356 ± 15	130 ± 1	86 ± 9	76 ± 10
Biodiesel 3	381 ± 8	134 ± 4	92 ± 15	78 ± 5
Biodiesel 4	375 ± 7	134 ± 6	81 ± 6	73 ± 7
Biodiesel 5	385 ± 6	132 ± 2	87 ± 9	74 ± 6

**Fonte:** autor

Assim, como observado para o padrão de biodiesel certificado a calibração externa apresentou recuperações entre 356 e 385%, sendo isso atribuído ao aumento da temperatura da chama e a diminuição da tensão superficial.

A padronização interna apresentou recuperações que variaram entre 130 - 136%. Sendo essas altas recuperações obtidas devido as intensidades de emissão

de K serem afetadas de modo mais acentuado que as intensidades de emissão de Li pelo aumento da temperatura da chama.

O método de adição de padrão apresentou recuperações aceitáveis se adotarmos uma faixa de 80 a 110% de recuperação<sup>73</sup>. Porém, assim como discutido anteriormente o método não apresenta uma boa precisão (11% em média).

Assim como observado na análise dos materiais de referência certificados o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo não apresentou um bom desempenho na determinação de K, cujas recuperações variaram entre 73 e 81%.

### 6.3.5.3 Urina

Os resultados das determinações de Na e K em cinco amostras de urina são apresentadas nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

**Tabela 21** - Resultados ( $\text{mg L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de Na em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	728 $\pm$ 55	730 $\pm$ 51	711 $\pm$ 48	756 $\pm$ 46
Urina 2	1705 $\pm$ 26	1749 $\pm$ 15	1734 $\pm$ 30	1789 $\pm$ 40
Urina 3	1620 $\pm$ 26	1640 $\pm$ 41	1591 $\pm$ 50	1533 $\pm$ 20
Urina 4	1733 $\pm$ 30	1773 $\pm$ 33	1805 $\pm$ 26	1744 $\pm$ 50
Urina 5	1800 $\pm$ 47	1838 $\pm$ 40	1818 $\pm$ 21	1840 $\pm$ 41

**Fonte:** autor

As concentrações de Na variaram entre 711 e 1840  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos pelos métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foram concordantes entre si ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* pareado. Para todos os métodos foram obtidas boas precisões, em média 3%.

**Tabela 22** - Resultados ( $\text{mg L}^{-1}$ ) da determinação ( $n=3$ ) de K em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	$1088 \pm 50$	$1187 \pm 45$	$980 \pm 20$	$853 \pm 42$
Urina 2	$998 \pm 32$	$1016 \pm 10$	$868 \pm 22$	$752 \pm 21$
Urina 3	$1025 \pm 40$	$1105 \pm 35$	$968 \pm 63$	$740 \pm 10$
Urina 4	$1295 \pm 103$	$1386 \pm 90$	$1180 \pm 61$	$1022 \pm 34$
Urina 5	$613 \pm 30$	$648 \pm 26$	$474 \pm 50$	$398 \pm 13$

**Fonte:** autor

As concentrações de K apresentadas na Tabela 22 variaram entre 398 e 1386  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos pelos métodos de calibração externa e padronização interna foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t* pareado). Os valores obtidos para os métodos de adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo foram em média 20 e 30% mais baixos que os valores obtidos pelo método de calibração externa.

O desempenho dos métodos foi avaliado por meio de testes de adição e recuperação dos analitos. Alíquotas de soluções padrões de Na e K foram adicionadas as amostras de urina de modo a preparar soluções contendo  $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na} + 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$ . Os resultados obtidos para Na e K estão apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

**Tabela 23** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para Na em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	$101 \pm 2$	$102 \pm 3$	$105 \pm 14$	$107 \pm 7$
Urina 2	$107 \pm 10$	$101 \pm 5$	$122 \pm 21$	$110 \pm 8$
Urina 3	$109 \pm 11$	$104 \pm 3$	$124 \pm 12$	$95 \pm 5$
Urina 4	$111 \pm 18$	$117 \pm 13$	$117 \pm 18$	$102 \pm 8$
Urina 5	$107 \pm 17$	$108 \pm 15$	$125 \pm 9$	$100 \pm 7$

**Fonte:** autor

Para a determinação de Na todos os métodos apresentaram recuperações satisfatórias: calibração externa (101 - 111%), padronização interna (101 - 117%), adição de padrão (105 - 125%) e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (95 - 107%). As melhores precisões (RSD) em média foram obtidas para os métodos de adição de padrão interno por gradiente por concentração em fluxo (6,8%) e padronização interna (7,2%) quando comparados aos métodos calibração externa (10,7%) e adição de padrão (12,1%).

Como o Na está presente em altas concentrações em amostras de urina, foram necessárias diluições da ordem de 2500 vezes. Com estas diluições possíveis efeitos de matriz e/ou transporte não foram observados.

**Tabela 24.** Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para K em urina empregando os métodos de calibração externa, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostras</b>	<b>Calibração Externa</b>	<b>Padronização Interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
Urina 1	101 ± 2	94 ± 2	83 ± 5	85 ± 6
Urina 2	111 ± 9	98 ± 4	94 ± 20	84 ± 2
Urina 3	108 ± 10	96 ± 2	79 ± 3	77 ± 4
Urina 4	107 ± 9	102 ± 6	92 ± 30	86 ± 5
Urina 5	106 ± 10	97 ± 9	84 ± 11	82 ± 6

**Fonte:** autor

Para o K os métodos de calibração externa e padronização interna assim como observado na análise dos materiais de referência certificados apresentaram melhores recuperações 101 – 111% e 94 – 102%, respectivamente. Já quando empregados os métodos de adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo, assim como observado na análise das amostras de urina, as recuperações foram da ordem de 20% mais baixas que as obtidas pelos métodos da calibração externa e padronização interna.

A determinação de K ao longo do trabalho apresentou um erro aleatório fornecendo valores de recuperações da ordem de 80%, estes problemas podem estar associados com a escolha do padrão interno, uma vez que Li mostrou não ser um padrão interno eficiente. Uma alternativa ao uso do Li como padrão interno seria a

utilização de  $\text{Rb}^{68}$ , no entanto, no sistema de emissão atômica utilizado, ambos elementos apresentaram sobreposição espectral, impossibilitando uma avaliação mais aprofundada.

#### 6.4 Conclusões parciais

A adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo mostrou ser um método de calibração viável e eficaz na correção de efeitos de matriz e flutuações analíticas, por combinar os benefícios de dois métodos clássicos: adição de padrão e padronização interna. No entanto, diferente destes, a calibração proposta necessita apenas do preparo de duas soluções para a análise da amostra, diminuindo significativamente o número de soluções a serem preparadas e a quantidade de resíduos gerados.

O método apresentou uma boa exatidão nas determinações de Na em amostras de biodiesel (94 – 98%) e urina (95 – 107%). As concentrações de Na obtidas para os cinco materiais de referência certificados foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os valores certificados. O método ainda mostrou uma boa precisão (RSD) 3,9% para biodiesel, 6,8% para urina e 6,9% para os CRMs quando comparado aos métodos convencionais: calibração externa (7,3%; 8,0% e 10,7%), padronização interna (6,5%; 7,2% e 7,6%) e adição de padrão (8,0%; 12,1% e 11,2%).

A determinação de K pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo, não se apresentou satisfatória: um erro aleatório foi observado no decorrer dos experimentos. Independentemente da matriz utilizada (água, biodiesel, urina, leite, fígado bovino e tecido de mexilhão), as recuperações obtidas sempre variaram entre 70 e 90%.

## 7. DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM GASOLINA EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN ALIADA AOS MÉTODOS DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM FLUXO

### 7.1 Introdução

O etanol é uma fonte renovável de energia, frequentemente utilizada como biocombustível<sup>95</sup>. O etanol hidratado é comumente utilizado em veículos automotivos movidos a etanol e com motores flex, enquanto o etanol anidro é um aditivo importante para veículos movidos a gasolina<sup>95,96</sup>. A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) regula o teor máximo de etanol permitido na gasolina comercial em 27% (V V<sup>-1</sup>)<sup>97</sup>.

Para a determinação de etanol em gasolina a ANP recomenda os métodos ASTM D5501 (American Society for Testing and Materials)<sup>98</sup> e ABNT NBR 13992 (Associação Brasileira de Normas Técnicas)<sup>99</sup>. O método D5501 baseia-se na determinação por cromatografia gasosa, enquanto que o ABNT NBR 13992 baseia-se na extração líquido-líquido. O último é simples, porém requer grandes quantidades de amostra e não é seletivo. O primeiro permite a determinação seletiva do etanol, mas envolve maior investimento inicial (aquisição de instrumentos) e maiores custos operacionais.

A espectroscopia Raman é uma alternativa interessante para aplicações na análise de combustíveis, por ser potencialmente portátil, não destrutiva, não requerer preparo das amostras e apresentar alta especificidade<sup>100,101</sup>. Por outro lado, a espectroscopia Raman é afetada por intensos sinais de fundo causados por fluorescência. Na análise de combustível, por exemplo, muitas moléculas orgânicas na matriz fluorescem, o que resulta em baixa precisão e baixa sensibilidade<sup>102</sup>.

Tendo em vista superar as limitações associadas à espectroscopia Raman foram avaliados a combinação da extração líquido-líquido, análise em fluxo e o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo, considerando que (i) a extração aquosa de etanol a partir da gasolina pode ser eficaz para minimizar ou mesmo eliminar a fluorescência de fundo em medidas do espalhamento Raman; (ii) os sistemas em fluxo são excelentes para gerenciar

soluções e são altamente compatíveis com a extração líquido-líquido<sup>103</sup> e o método de adição de padrão interno; e (iii) o método de adição de padrão interno pode melhorar significativamente a precisão a exatidão dos resultados.

## 7.2 Materiais e métodos

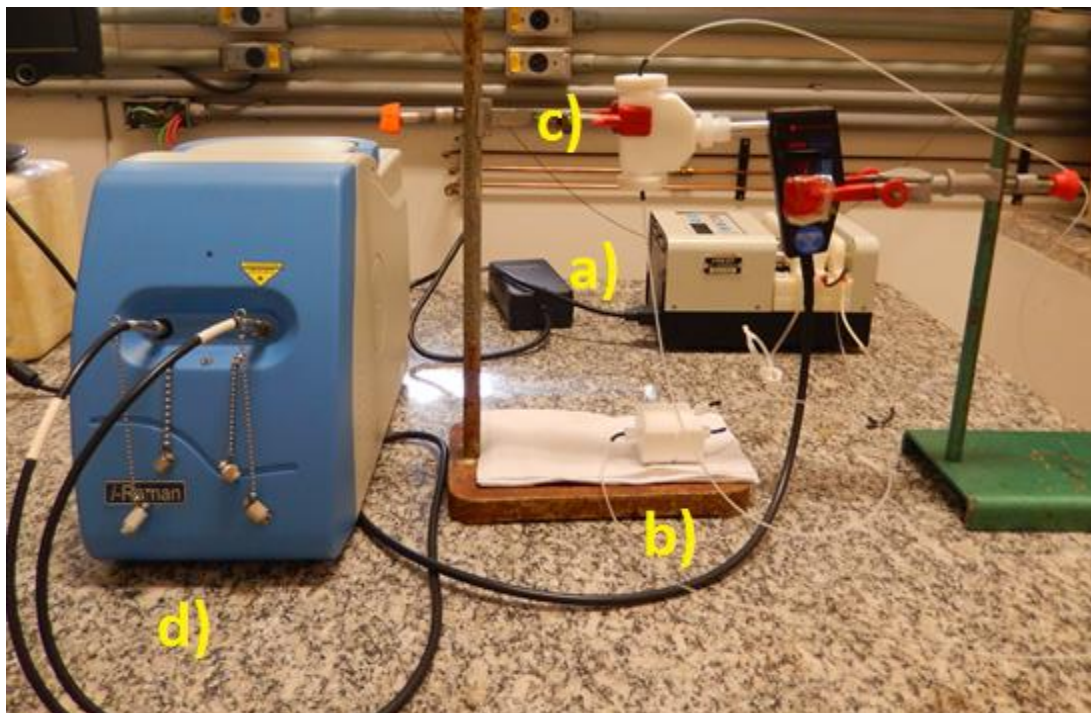
### 7.2.1 INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS

Os espectros Raman foram obtidos empregando um espectrômetro Raman modelo iRaman BWS415-785H (B&W Tek) com fonte de excitação de 785 nm (potência < 350 mW) e resolução espectral de 3,5 cm<sup>-1</sup>. A excitação das soluções e amostras de gasolina, bem como a aquisição dos espectros de espalhamento Raman foi realizada por meio de uma fibra óptica (Raman probe) modelo BAC 100 (B&W Tek) acoplada a uma cela de fluxo de teflon BAC 160 (B&W Tek) adaptada.

Todos os espectros Raman foram coletados em um intervalo de 150 - 2700 cm<sup>-1</sup> utilizando 80 % de potência máxima do laser e 10 segundos de tempo de integração. As áreas de pico utilizadas como sinal analítico foram calculadas integrando os deslocamentos Raman no intervalo de 840 a 910 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-C) e 756 a 826 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-C-C) para etanol e acetona, respectivamente.

Para o sistema de extração líquido-líquido em fluxo foram utilizadas uma bomba peristáltica IPC-8 (Ismatec) para a propulsão das soluções e amostras, tubos de bombeamento Tygon e Tygon MHLL de diferentes diâmetros, tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro utilizados na construção de linhas de transmissão e uma unidade de separação líquido-líquido com uma membrana de PTFE.

O sistema empregado no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo está ilustrado na Figura 36.



**Figura 36** - Sistema empregado nas medidas do espalhamento Raman: a) bomba peristáltica; b) unidade de separação líquido-líquido; c) cela de fluxo e Raman probe; e d) espectrômetro Raman.

**Fonte:** autor

### 7.2.2 REAGENTES, SOLUÇÕES ANALÍTICAS E AMOSTRAS

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5<sup>TM</sup> combinado com deionizador Millipore Milli-Q<sup>TM</sup> academic foi empregado no preparo do padrão utilizado no método proposto e como solvente na extração líquido-líquido.

Gasolina sem etanol foi obtida por meio de múltiplas extrações com H<sub>2</sub>O.

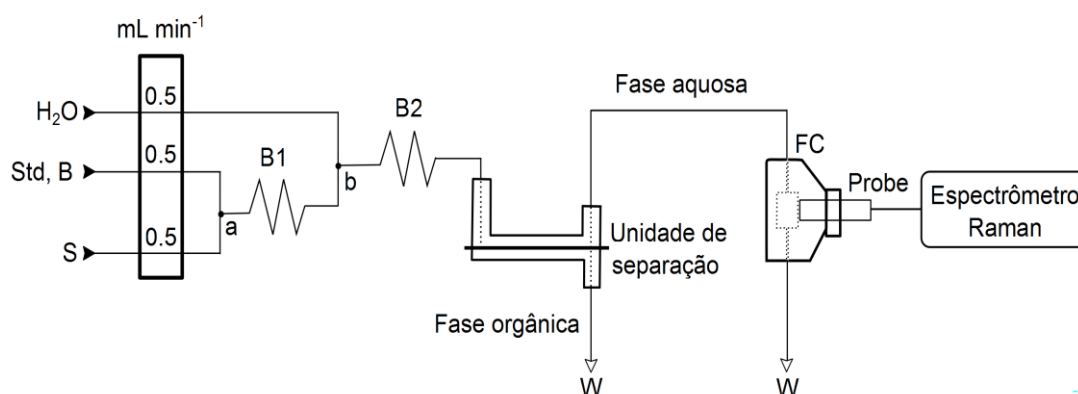
Soluções analíticas utilizadas nos métodos comparativos e o padrão (30 % V V<sup>-1</sup> etanol + 30% V V<sup>-1</sup> acetona) utilizado no método proposto foram preparados por meio das diluições apropriadas de acetona 99,9% V V<sup>-1</sup> de pureza (JT Baker) e etanol 99,8% V V<sup>-1</sup> de pureza (Panreac).

As amostras de gasolina foram adquiridas em diferentes postos de combustíveis na cidade de Araraquara - SP. Todas as amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração (aproximadamente 5°C).

## 7.2.3 METODOLOGIA

### 7.2.3.1 Desenvolvimento do sistema em fluxo

O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utiliza apenas um branco e duas soluções (A e B). A solução A é composta por uma mistura 1:1 de amostra + padrão e a solução B é composta por uma mistura 1:1 de amostra + branco. Para o sistema em fluxo desenvolvido (Figura 37) as soluções A e B foram preparadas em linha, em um primeiro momento é aspirado amostra (S) e o padrão (Std) em uma proporção de 1:1, e em um segundo momento a solução B também é preparada em linha aspirando S e branco (B) em uma proporção de 1:1. O funcionamento do sistema compreende 3 etapas: (i) água (solvente extrator), branco (água) e gasolina sem etanol são aspirados continuamente até se obter uma linha base (cerca de 15 s); (ii) o branco é substituído pelo padrão (30%  $V V^{-1}$  etanol + 30%  $V V^{-1}$  acetona) e a gasolina sem etanol é substituída pela amostra de gasolina, a mistura heterogênea resultante passa através da unidade de separação e a fase aquosa enriquecida com o etanol e acetona é direcionada para a cela de fluxo, e a fase orgânica é descartada; (iii) o padrão é substituído pelo branco, gerando um gradiente de concentração na cela de fluxo, que é utilizado para a construção da curva de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo. Para cada amostra analisada foram gastos 20 minutos.



**Figura 37** - Diagrama de fluxos para determinação de etanol pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aliado a extração líquido-líquido em fluxo. H<sub>2</sub>O: solvente extrator (0,5 mL min<sup>-1</sup>); B: água (0,5 mL min<sup>-1</sup>); S: amostra (0,5 mL min<sup>-1</sup>); a, b: pontos de confluência; B1, B2: bobinas de mistura; FC: cela de fluxo; W: descarte.

**Fonte:** autor

### 7.2.3.2 Otimização do sistema em fluxo

Inicialmente foi avaliada a influência da vazão do sistema em fluxo na precisão das medidas utilizando espectroscopia Raman. Para este estudo foi medido o espalhamento Raman de uma solução de etanol contendo 20%  $V V^{-1}$  variando a rotação da bomba peristáltica de modo a se obter diferentes vazões (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $mL min^{-1}$ )

A fim de se obter uma maior eficiência na extração do etanol pelo sistema em fluxo utilizados foram avaliados o comprimento das bobinas de mistura e a razão gasolina/agente extrator. Para otimizar o comprimento das bobinas de mistura (B1 e B2) foram avaliadas bobinas de 50 a 500 cm de comprimento. Para a otimização da razão gasolina/agente extrator, a vazão da gasolina e do padrão foram fixadas em 0,5  $mL min^{-1}$  e a vazão do agente extrator foi variada entre 0,3 e 1,5  $mL min^{-1}$ . Estes estudos foram conduzidos utilizando água deionizada como agente extrator, padrão contendo 30%  $V V^{-1}$  de etanol + 30%  $V V^{-1}$  de acetona e uma amostra de gasolina contendo 25,7%  $V V^{-1}$  de etanol.

A eficiência de extração do sistema foi avaliada comparando a concentração de etanol em uma amostra de gasolina antes e depois de ser processada no sistema de fluxo. Neste estudo foi utilizado uma amostra de gasolina contendo 25,7% de etanol. A amostra original e a fase orgânica (resíduo) foram analisadas pelo método ABNT NBR 13992<sup>99</sup>.

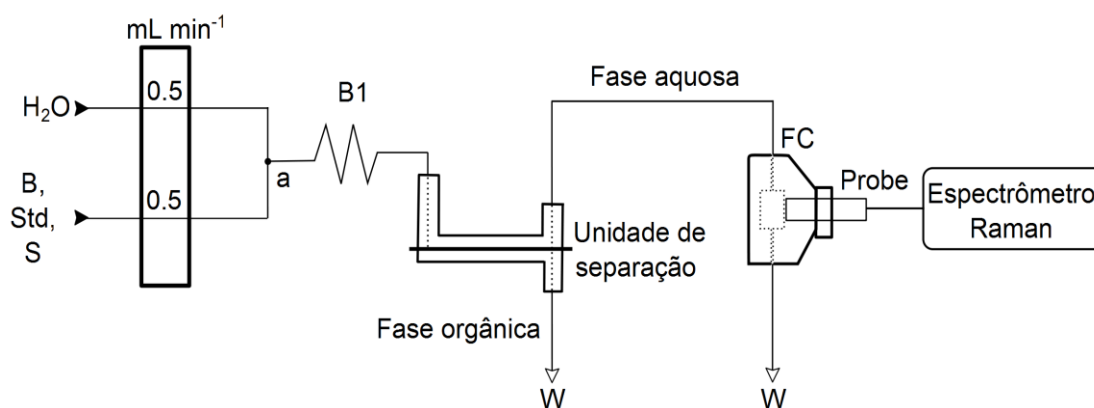
Após otimização do sistema foram avaliados os intervalos de resposta linear (0 - 50%  $V V^{-1}$ ) para etanol e acetona em meio de gasolina.

### 7.2.3.3 Determinação de etanol em amostras de gasolina

Após a otimização do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aliado a extração líquido-líquido em fluxo, etanol foi determinada em 5 amostras de gasolina.

Para fins comparativos as amostras foram também analisadas utilizando um sistema de extração líquido-líquido em fluxo combinado com os métodos de compatibilização de matriz, adição de padrão e padronização interna (Fig. 38). O funcionamento do sistema é similar ao do sistema descrito anteriormente (Fig. 37). Os

espectros Raman neste sistema foram coletados com  $n=5$ , para cada análise das amostras, soluções e brancos foram gastos 8, 8 e 15 minutos para compatibilização de matriz, adição de padrão e padronização interna, respectivamente.



**Figura 38** - Diagrama de fluxos para determinação de etanol pelos métodos de compatibilização de matriz, adição de padrão e padronização interna aliado a extração líquido-líquido em fluxo. H<sub>2</sub>O: solvente extrator (0,5 mL min<sup>-1</sup>); Std: padrão, B: branco, S: amostra (0,5 mL min<sup>-1</sup>); a: ponto de confluência; B1: bobina de mistura; FC: cela de fluxo; W: descarte

**Fonte:** autor

A exatidão dos métodos foi avaliada por meio da comparação dos resultados com os valores obtidos pelo método oficial ABNT NBR 13992<sup>99</sup> e por meio de testes de adição e recuperação. Para os testes de adição e recuperação as amostras de gasolina foram enriquecidas com 25% V V<sup>-1</sup> de etanol e 15% V V<sup>-1</sup> de etanol + 10% V V<sup>-1</sup> de metanol.

O procedimento do método ABNT NBR 13992<sup>99</sup> consiste na mistura de 50 mL de gasolina + 50 mL de uma solução 10% m V<sup>-1</sup> de NaCl em uma proveta graduada de 100 mL com tampa, esta mistura é agita por 10 vezes e após 10 minutos mede-se o volume da fase aquosa. A concentração do etanol é dado pela equação: [etanol] = [(volume da fase aquosa – 50) x 2] + 1.

O procedimento do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo envolveu o preparo das soluções A (amostra + padrão contendo 30% V V<sup>-1</sup> de etanol + 30% V V<sup>-1</sup> de acetona) e B (amostra + branco) em linha. As soluções foram analisadas sequencialmente utilizando o sistema proposto nas condições previamente otimizadas. A curva de adição de padrão interno foi

construída graficamente a partir da razão das áreas de pico etanol/acetona versus  $1/[\text{acetona}]$ .

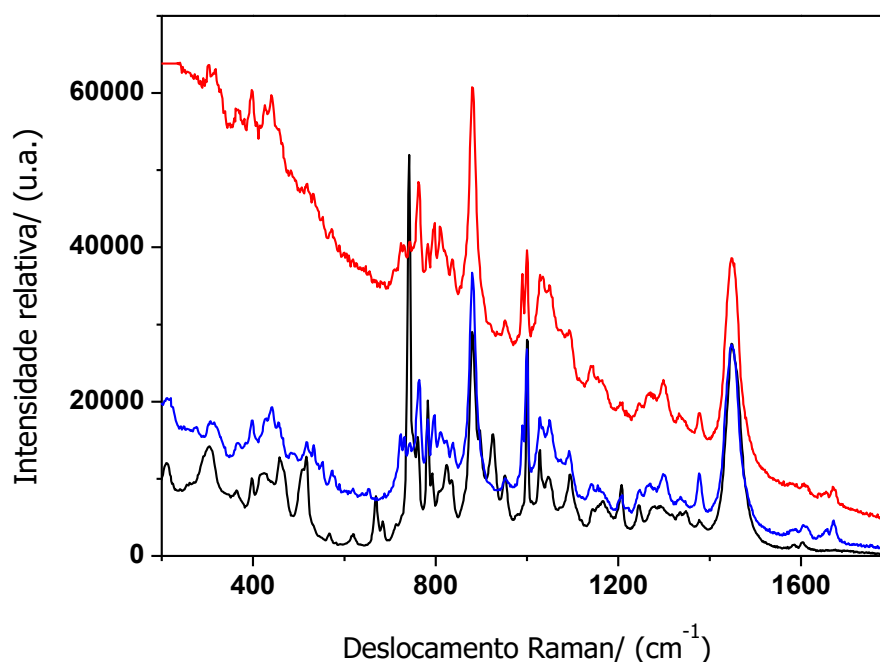
Para o método de compatibilização de matriz o procedimento envolveu o preparo de soluções analíticas e um intervalo de 5 - 30%  $V V^{-1}$  de etanol em meio de gasolina sem etanol. As curvas foram plotadas utilizando a área de pico versus a concentração de etanol.

A padronização interna envolveu o preparo de branco, soluções analíticas (5 - 30%  $V V^{-1}$  de etanol) e amostras de modo a conter 17%  $V V^{-1}$  de acetona. As soluções analíticas e o branco foram preparadas em meio de gasolina sem etanol. As curvas foram plotadas utilizando a razão das áreas de pico etanol/acetona pela concentração do etanol.

O método de adição de padrão envolveu o preparo de cinco soluções a partir de cada amostra: em balões de 10 mL foram adicionados 5 mL de amostra, quantidades apropriadas de etanol para que, após avolumados a 10 mL com gasolina sem etanol, fossem produzidas soluções contendo 0, 5, 10, 12, 15%  $V V^{-1}$  de etanol. As curvas foram plotadas a partir da área de pico versus a concentração de etanol.

### **7.3 Resultados e discussão**

A análise de gasolina por espectroscopia Raman não é uma tarefa trivial, uma vez que, este tipo de matriz apresenta alta fluorescência causada pelos corantes e aditivos presentes em sua composição<sup>102</sup>. Além da fluorescência, outra dificuldade encontrada está relacionada com o fato de diferentes tipos de gasolina apresentarem bandas quase que totalmente sobrepostas (Fig. 39), dificultando a quantificação de qualquer composto utilizando métodos univariados de análise.



**Figura 39** - Espectros Raman para 3 amostras de gasolina de diferentes distribuidoras.

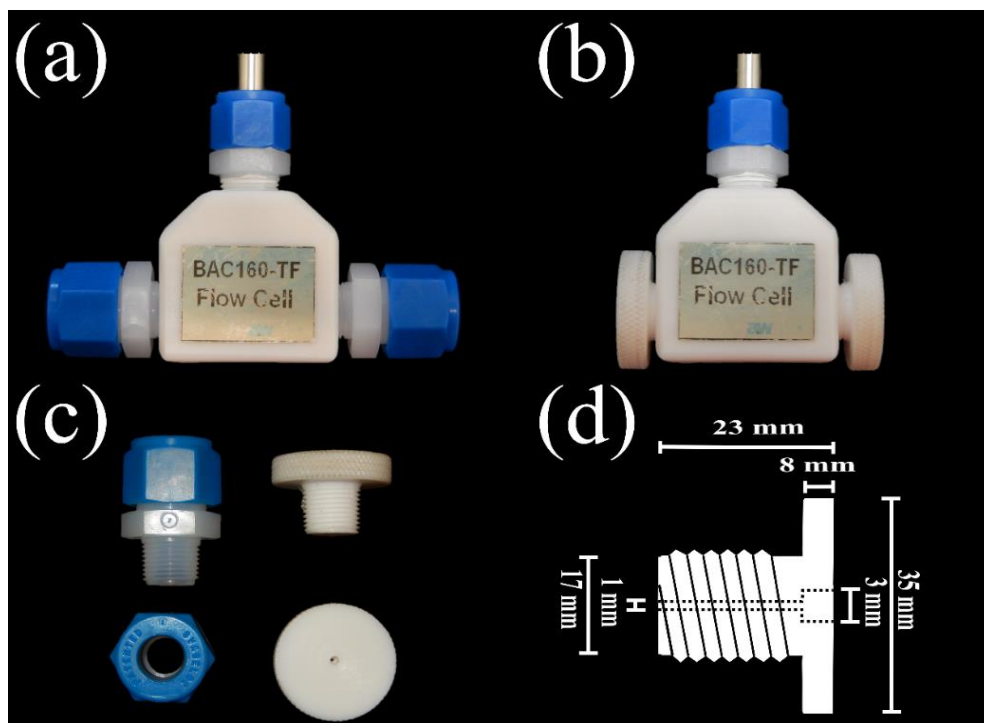
**Fonte:** autor

Dada a dificuldade das medidas do espalhamento Raman em amostras de gasolina, foi avaliado o uso da extração líquido-líquido em fluxo para separação do etanol da gasolina em uma fase aquosa seguida da sua determinação empregando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

### 7.3.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM FLUXO

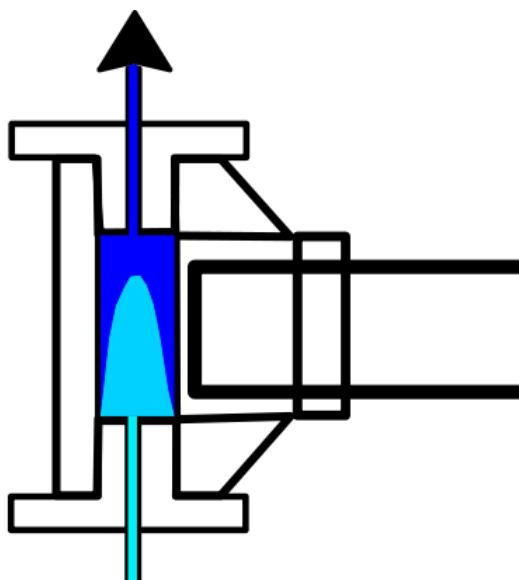
Para o desenvolvimento do sistema de extração líquido-líquido em fluxo acoplado ao espectrômetro Raman utilizado neste trabalho, foi necessário realizar uma adaptação na cela de fluxo BAC 160 para permitir sua conexão com tubos de diâmetro menor (cerca de 0,8 mm) comumente utilizadas em sistemas em fluxo. Os parafusos em ambos os lados da cela de fluxo, que são utilizados para entrada e saída das soluções (Fig. 40a), foram substituídos por parafusos de Teflon caseiros (Figura 40b) projetados para serem adequados para tubos de polietileno de 0,8 mm. Considerando a sua forma e tamanho (Fig. 40c), utilizou-se o volume interno de célula de fluxo (cerca de 2,0 mL) como câmara de diluição (Fig. 41), o que foi essencial para

gerar os gradientes de concentração requerido para o desenvolvimento do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.



**Figura 40** - Parafusos de Teflon projetados para cela de fluxo BAC 160. a) cela de fluxo com parafusos originais, b) cela de fluxo com parafusos projetados, c) vista frontal e lateral dos parafusos originais e projetados e d) dimensões do parafuso projetado.

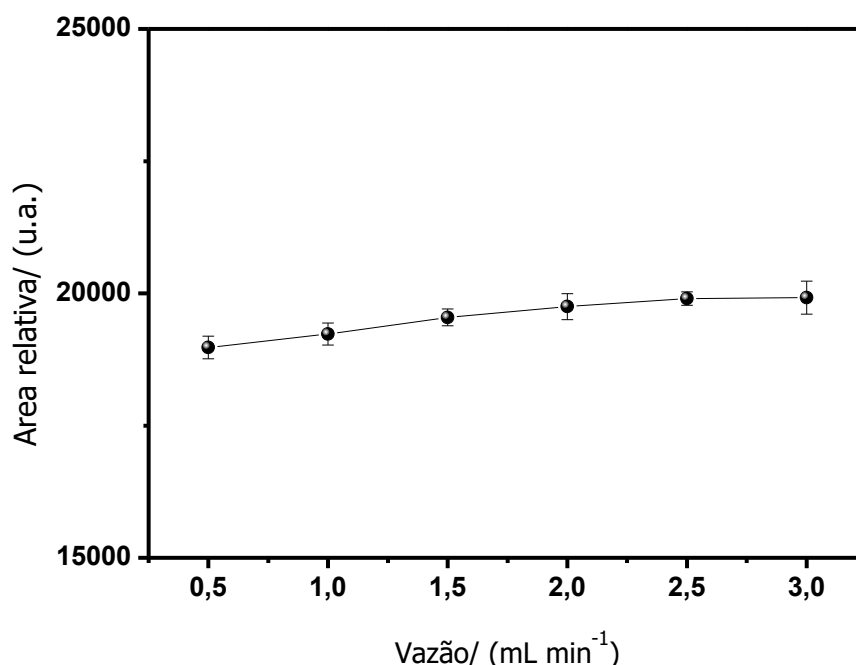
Fonte: autor



**Figura 41** – Produção do gradiente de concentração no volume interno da cela de fluxo.

Fonte: autor

Os primeiros experimentos avaliaram a influência da vazão (0,5 – 3,0 mL min<sup>-1</sup>) na precisão das medidas de espalhamento Raman de uma solução contendo 20% V V<sup>-1</sup> de etanol, para este estudo não foi utilizado a unidade de separação do sistema em fluxo. Como pode ser observado na Figura 42 o aumento na vazão da solução de etanol acarretou em um pequeno aumento sinal do etanol ( $\leq 4,7\%$ ) e o desvio padrão variou entre 0,6 e 1,6%. Considerando que (i) altas taxas de fluxo aumentam a pressão hidrodinâmica do sistema e a possibilidade de vazamentos, (ii) a sensibilidade não foi um parâmetro crítico, e (iii) obteve-se uma boa precisão relativa para todas as taxas de fluxo avaliadas, optou-se por utilizar uma vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup> para os estudos subsequentes.

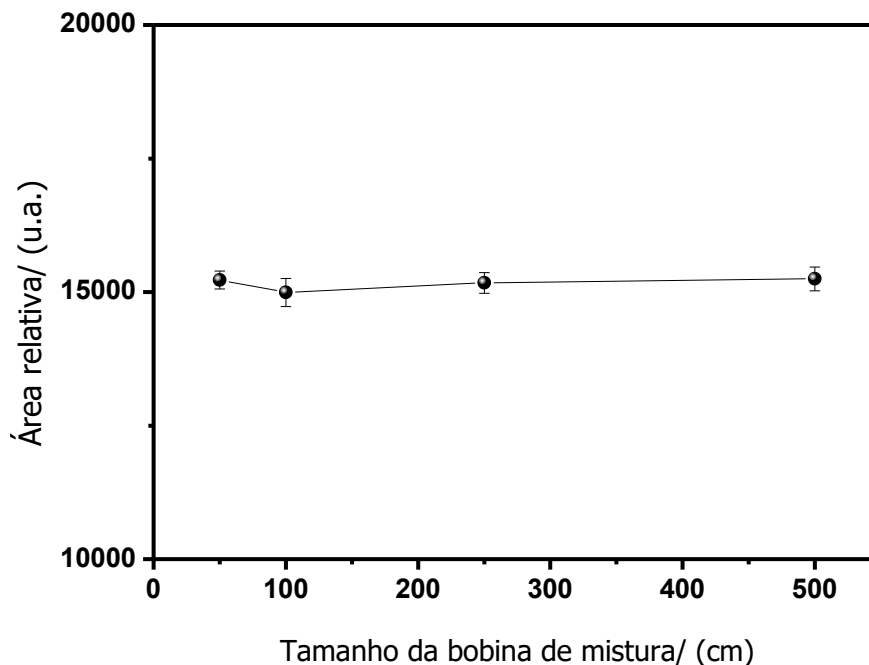


**Figura 42** - Influência da vazão na precisão do espalhamento Raman.

**Fonte:** autor

O sistema para extração líquido-líquido em fluxo proposto (Fig. 37) foi otimizado de modo a se obter a maior eficiência na separação do etanol. Inicialmente foi avaliado o comprimento das bobinas de mistura (B1 e B2), neste estudo foi utilizado água deionizada como agente extrator, uma solução contendo 30% V V<sup>-1</sup> de etanol + 30% V V<sup>-1</sup> de acetona como padrão e uma amostra de gasolina contendo 25,7% V V<sup>-1</sup> de etanol. Como pode ser observado na Figura 43 o aumento do comprimento das bobinas de mistura (50 a 500 cm) não causou nenhum efeito significativo nas áreas

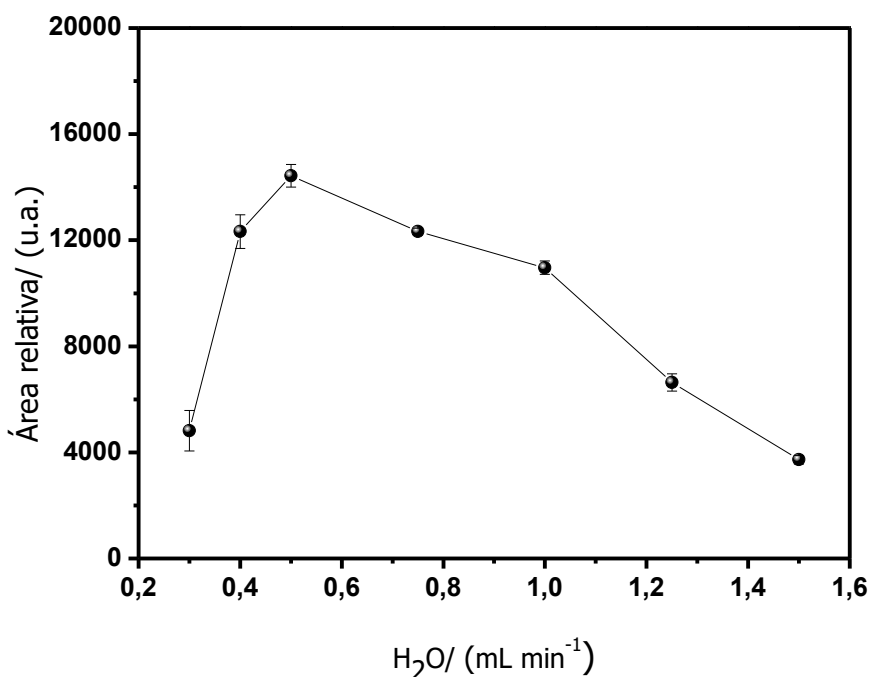
de pico do etanol. Deste modo, as bobinas de mistura de 50 cm foram selecionadas para os estudos posteriores.



**Figura 43** - Avaliação do comprimento das bobinas de mistura B1 e B2 na eficiência de extração.

**Fonte:** autor

Com o tamanho das bobinas de mistura definidos, foi otimizado a razão gasolina/agente extrator que fornece a melhor eficiência de extração. Para este estudo foi utilizado água como agente extrator, padrão contendo 30%  $V V^{-1}$  de etanol + 30%  $V V^{-1}$  de acetona e uma amostra de gasolina contendo 25,7%  $V V^{-1}$  de etanol. Inicialmente a vazão do padrão e da amostra foram fixados em  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  e a vazão da água foi variada entre  $0,3$  e  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Como pode ser observado na Figura 44 o aumento da vazão da água até  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  acarreta no aumento do sinal analítico do etanol, indicando à máxima eficiência de extração. Em vazões maiores que  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  o sinal analítico do etanol começa a sofrer um decréscimo, devido à diluição de etanol na fase aquosa. Assim, as vazões do sistema de extração líquido-líquido em fluxo (Std e Branco; S;  $\text{H}_2\text{O}$ ) proposto foram fixadas em  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .



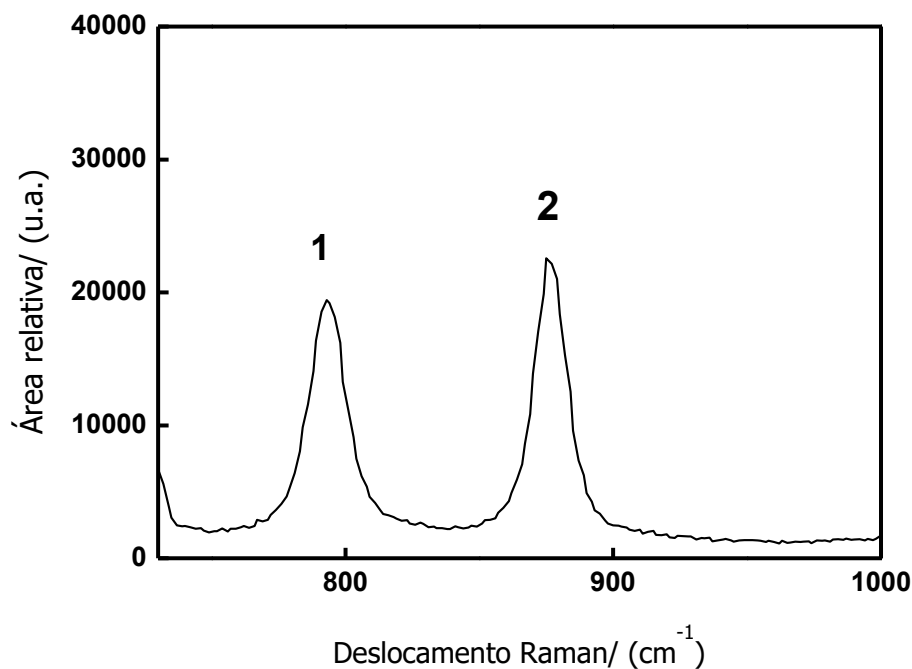
**Figura 44** - Influência da razão gasolina/agente extrator na eficiência de extração.

**Fonte:** autor

A eficiência de extração do sistema proposto foi avaliada comparando a concentração de etanol em uma amostra de gasolina antes e depois de ser processada no sistema de fluxo. Em ambos os casos, a amostra original e a fase orgânica (resíduos) foram analisadas pelo método ABNT NBR 13992. Para uma amostra de gasolina contendo 25,7% ( $V V^{-1}$ ) de etanol, a eficiência de extração do sistema foi  $\geq 97\%$ .

### 7.3.2 ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO E OTIMIZAÇÃO DA FAIXA LINEAR

Acetona, acetonitrila<sup>104</sup>, álcool isopropílico e metanol foram avaliados como potenciais padrões internos para a determinação de etanol pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo. A acetona foi escolhida como padrão interno, considerando a similaridade nos parâmetros físico-químicos de ambos, como: densidade (etanol:  $0,7893 \text{ g cm}^{-3}$ , acetona:  $0,7845 \text{ g cm}^{-3}$ ) e coeficiente de partição (etanol:  $-0,31$ ; acetona:  $-0,24$ )<sup>69</sup>. Além disso, os espectros Raman de acetona e etanol não apresentam sobreposição (Fig. 45).



**Fig. 45** - Espectro Raman de uma solução 50% etanol + 50% acetona com 80% da potência do laser e 10 s de integração. Pico 1: 756-826  $\text{cm}^{-1}$  acetona (estiramento C-C-C); e Pico 2: 840 – 910  $\text{cm}^{-1}$  etanol (estiramento C-C).

**Fonte:** autor

Com o sistema de extração líquido-líquido em fluxo otimizado e o padrão interno selecionado, avaliou-se o intervalo de resposta linear para etanol e acetona. Neste estudo foram avaliadas concentrações entre 0 e 50%  $V V^{-1}$ , uma relação linear entre sinais analíticos e concentrações foi observada de 1 a 40% e 1 a 50%  $V V^{-1}$  para etanol e acetona, respectivamente.

### 7.3.3 DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM AMOSTRAS DE GASOLINA

Após a otimização do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aliado a extração líquido-líquido em fluxo, o método foi aplicado na determinação de etanol em cinco amostras de gasolina. Para fins comparativos as amostras foram também analisadas pelo método oficial (ABNT NBR 13992) e pelos métodos de compatibilização de matriz, adição de padrão e padronização interna.

Os resultados das determinações de etanol nas cinco amostras de gasolina são apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25** - Resultados (%V V<sup>1</sup>) da determinação (n=3) de etanol em amostras de gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostra	ABNT-NBR	Compatibilização de matriz	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
1	26,3 ± 1,2	27,9 ± 0,3	27,5 ± 0,2	32,5 ± 2,0	27,2 ± 0,2
2	25,7 ± 1,2	28,2 ± 0,1	26,9 ± 0,2	32,6 ± 0,5	26,0 ± 0,2
3	25,7 ± 2,3	28,3 ± 0,2	27,0 ± 0,4	34,3 ± 0,7	25,5 ± 0,5
4	25,7 ± 1,2	26,2 ± 0,5	26,7 ± 0,1	33,3 ± 0,2	26,5 ± 1,0
5	25,7 ± 1,2	28,7 ± 0,2	26,6 ± 0,2	33,6 ± 1,2	25,7 ± 1,1

Fonte: autor

A análise da Tabela 25 revela que todos os valores obtidos pelo método de adição de padrão (32,5 - 34,3 V V<sup>1</sup>) foram sistematicamente maiores que os valores obtidos pelo método de referência ABNT-NBR 13992 (aproximadamente 1,2 vezes maiores). Como no método de adição de padrão com extração líquido-líquido em fluxo a vazão da água utilizada como agente extrator é fixa, o volume de etanol extraído varia de acordo com as adições de etanol resultando em diferentes fatores de diluição, afetando assim a inclinação e o intercepto da curva, levando a valores superestimados.

Para o método de compatibilização de matriz (26,2 - 28,3% V V<sup>1</sup>) os valores obtidos foram próximos aos obtidos pelo método ABNT NBR 13992, mas as amostras 2, 4 e 5 não foram concordantes ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste *t* pareado.

Os resultados obtidos pelos métodos de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo e padronização interna foram concordantes ao nível de 95% de confiança com os valores obtidos pelo método ABNT NBR 13992 de acordo com o teste *t Student* (pareado).

Os valores dos desvios padrões relativos (RSDs) para a determinação de gasolina nas amostras de gasolina variaram entre 0,7 e 4,3% (adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo); 4,6 e 8,9% (ABNT NBR 13992); 0,4 e 1,7% (compatibilização de matriz); 0,5 e 1,5% (padronização interna); e 0,6 - 6,2% (adição de padrão).

### 7.3.4 TESTES DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO

O desempenho dos métodos foi também avaliado por meio de testes de adição e recuperação do analito. Para os testes de adição e recuperação as amostras de gasolina foram enriquecidas com 25%  $V V^{-1}$  de etanol.

As recuperações obtidas para etanol são apresentadas na Tabela 26.

**Tabela 26** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para etanol em gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostra	ABNT- NBR	Compatibilização de matriz	Padronização interna	Adição de padrão	Adição de padrão interno
1	97 ± 5	107 ± 1	106 ± 1	124 ± 3	100 ± 3
2	95 ± 9	108 ± 1	107 ± 1	118 ± 7	101 ± 3
3	97 ± 5	112 ± 3	107 ± 1	123 ± 3	99 ± 3
4	95 ± 5	111 ± 1	107 ± 1	121 ± 7	99 ± 5
5	95 ± 9	110 ± 2	106 ± 1	126 ± 1	100 ± 3

Fonte: autor

A análise da Tabela 26 revela que os métodos de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (99 - 101%), ABNT NBR 13992 (95 - 97%), compatibilização de matriz (107 - 112%) e padronização interna (106 - 107%) apresentaram boas recuperações. O método de adição de padrão (118 - 126%), assim como observado para as amostras de gasolina apresentou recuperações aproximadamente 1,2 vezes maiores.

No entanto, se utilizar como parâmetro as porcentagens de recuperações aceitáveis (98-102%) para concentrações entre 10 e 100%  $V V^{-1}$  estipuladas pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists)<sup>73</sup>, apenas o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo apresentou recuperações aceitáveis.

A influência do metanol (utilizado em adulterações) no desempenho dos métodos foi avaliado por meio de testes de adição e recuperação, utilizando amostras enriquecidas com 15%  $V V^{-1}$  de etanol + 10%  $V V^{-1}$  de metanol.

As recuperações obtidas para etanol são apresentadas na Tabela 27.

**Tabela 27** - Resultados (%) dos testes de adição e recuperação para etanol em gasolina empregando o método ABNT NBR 13992 e os métodos de compatibilização de matriz, padronização interna, adição de padrão e adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

<b>Amostra</b>	<b>ABNT- NBR</b>	<b>Compatibilização de matriz</b>	<b>Padronização interna</b>	<b>Adição de padrão</b>	<b>Adição de padrão interno</b>
1	158 ± 8	112 ± 4	106 ± 3	117 ± 4	99 ± 2
2	158 ± 8	107 ± 4	104 ± 3	121 ± 11	104 ± 3
3	162 ± 8	113 ± 8	105 ± 2	115 ± 4	103 ± 2
4	158 ± 8	114 ± 3	108 ± 1	122 ± 4	104 ± 3
5	171 ± 8	110 ± 1	108 ± 1	117 ± 6	104 ± 2

Fonte: autor

Assim, como observado para os testes de adição e recuperação para amostras de gasolina enriquecidas com 25%  $V V^{-1}$  de etanol os métodos de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (99 - 104%), compatibilização de matriz (107 - 114%) e padronização interna (104 - 108%) apresentaram boas recuperações, o método de adição de padrão apresentou recuperações da ordem de 120%. No entanto, as recuperações obtidas pelo método ABNT NBR 13992 (158 - 171%) revelam uma importante limitação do método de referência, uma vez que este determina a fração da gasolina extraída em água e não etanol.

#### 7.4 Conclusões parciais

A extração líquido-líquido em fluxo mostrou ser uma alternativa viável para contornar problemas associados a fluorescência em amostras de gasolina por espectroscopia Raman.

Os métodos de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo e padronização interna aliados a extração líquido-líquido em fluxo apresentaram boa precisão e exatidão na determinação de etanol em amostras de gasolina. No entanto, o método proposto tem a vantagem de combinar os benefícios de dois métodos de calibração clássicos (adição de padrão e padronização interna) com a conveniência de preparar apenas um único padrão para análise das amostras.

## 8. ESTIMATIVA DA INCERTEZA EXPANDIDA DO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO INTERNO POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FLUXO

Esta etapa complementar ao trabalho traz os cálculos para a estimativa da incerteza expandida do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo utilizando como exemplo o método desenvolvido para determinação de etanol em amostras de gasolina por espectroscopia Raman descrito na seção 7.

### 8.1 Materiais e métodos

#### 8.1.1 INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS

Para a propulsão das amostras e soluções, uma bomba peristáltica IPC-8 (Ismatec), tubos de bombeamento Tygon e Tygon MHLL de diferentes diâmetros, tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro para a construção das alças de amostragem e linhas de transmissão e uma unidade de separação foram utilizadas.

Os espectros Raman foram obtidos empregando um espectrômetro Raman modelo iRaman BWS415-785H (B&W Tek) com fonte de excitação de 785 nm (potência < 350 mW) e resolução espectral de  $3,5 \text{ cm}^{-1}$ . A excitação das soluções e amostras de gasolina, bem como a aquisição dos espectros de espalhamento Raman foi realizada por meio de uma fibra óptica (Raman probe) modelo BAC 100 (B&W Tek) acoplada a uma cela de fluxo de teflon BAC 160 (B&W Tek) adaptada.

Todos os espectros Raman foram coletados em um intervalo de  $150 - 2700 \text{ cm}^{-1}$  utilizando 80 % de potência máxima do laser e 10 segundos de tempo de integração. As áreas de pico utilizadas como sinal analítico foram calculadas integrando os deslocamentos Raman no intervalo de  $840 \text{ a } 910 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C) e  $756 \text{ a } 826 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C-C) para etanol e acetona, respectivamente.

#### 8.1.2 REAGENTES, SOLUÇÕES ANALÍTICAS E AMOSTRAS

Água deionizada de alta pureza (resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5<sup>TM</sup> combinado com deionizador

Millipore Milli-Q™ academic foi utilizado no preparo do padrão utilizado no método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo e como solvente na extração líquido-líquido.

O padrão (30 %  $V V^{-1}$  etanol + 30%  $V V^{-1}$  acetona) utilizado no método proposto foi preparado por meio da diluição apropriada de acetona 99,9%  $V V^{-1}$  de pureza (JT Baker) e etanol 99,8%  $V V^{-1}$  de pureza (Panreac) em balão volumétrico de 200 mL.

As amostras de gasolina foram adquiridas em diferentes postos de gasolina na cidade de Araraquara - SP. Todas as amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração (aproximadamente 5°C).

### 8.1.3 METODOLOGIA

Inicialmente foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk<sup>105</sup> para avaliar a normalidade dos resultados obtidos para a determinação de etanol (n=9) em uma amostra de gasolina contendo 25%  $V V^{-1}$  utilizando o método proposto.

Definido uma distribuição normal dos resultados, a estimativa da incerteza de medição do método proposto foi calculada usando como referência o Guia para a Expressão de Incerteza de Medição (GUM)<sup>17</sup>. Para estimar a incerteza de medição são necessários seguir alguns passos, que consistem em: definir o mensurando; identificar as fontes de incerteza; quantificar os componentes de incerteza; calcular a incerteza combinada; e calcular a incerteza expandida.

#### 8.1.3.1 Definição do mensurando

O primeiro passo para calcular as incertezas associadas ao método foi especificar o mensurando (grandeza a ser medida).

#### 8.1.3.2 Identificação das fontes de incerteza

Com o mensurando definido o próximo passo foi identificar todas as fontes de incerteza. A avaliação das incertezas pode ser feita por meio de cada fonte individual e depois combinadas ou pode ser determinada diretamente a contribuição combinado à incerteza associada ao resultado<sup>16</sup>.

### 8.1.3.3 Cálculo das componentes de incerteza

O cálculo das componentes de incerteza permite avaliar cada componente na mesma unidade do mensurando, sendo cada componente calculado utilizando a Equação 12.

$$u(y) = c_i(x_i)u(x_i) \quad \text{Eq. 12}$$

Onde:

$u(y)$  é o componente da incerteza na unidade do mensurando

$u(x_i)$  é a incerteza-padrão da fonte de entrada

$c_i(x_i)$  é o coeficiente de sensibilidade

#### 8.1.3.3.1 Incerteza-padrão

As incertezas-padrão para fontes de entrada podem ser obtidas por meio da análise estatística de uma série de observações (Tipo A) ou considerando uma determinada distribuição em um intervalo de dispersão (Tipo B).

Para o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo, as incertezas associadas ao sistema de extração líquido-líquido em fluxo e ao espectrômetro Raman foram combinadas e avaliadas por meio da repetibilidade do método e da precisão intermediária (Tipo A). Para avaliar a repetibilidade do método uma amostra de gasolina foi analisada 10 vezes consecutivamente. Para a precisão intermediária uma amostra de gasolina foi analisada 10 vezes, sendo estas 10 análises conduzidas em 5 dias diferentes e para cada dia as análises foram conduzidas em dois períodos diferentes.

Para os materiais volumétricos utilizados no preparo do padrão utilizado no método proposto foram utilizadas incertezas-padrão disponíveis na literatura para vidrarias Classe A (Tipo B)<sup>106</sup>.

### 8.1.3.3.2 Coeficiente de sensibilidade

O coeficiente de sensibilidade tem como função estimar a variação do mensurando frente a uma dada variação em uma fonte de entrada<sup>17</sup>.

No balão volumétrico utilizado no preparo do padrão se tem uma relação matemática entre o mensurando (% V V<sup>-1</sup> etanol) e a fonte de entrada (volume do balão), desta forma o C<sub>i</sub> pode ser calculado por meio das derivadas parciais (Equação 13).

$$c_i = \frac{\partial \text{vol. etanol}}{\partial \text{vol. total}} \quad \text{Eq. 13}$$

Para as pipetas volumétricas empregadas para medir os volumes de acetona e etanol utilizadas no preparo dos padrões, a relação entre a fonte de entrada e o mensurando não é direta, sendo assim, o C<sub>i</sub> pode ser determinado experimentalmente.

Para avaliar a influência do erro do volume do etanol utilizado no preparo do padrão, foram preparados 7 padrões, onde o volume de acetona foi fixado em 60 mL e o volume de etanol utilizado foi de 56, 58, 59, 60, 61, 62 e 64 mL. Uma amostra de gasolina foi analisada com cada um dos 7 padrões preparados, no entanto, para o cálculo da concentração de etanol na amostra admitiu-se que os padrões em todos os casos foram preparados utilizando 60 mL de acetona (30% V V<sup>-1</sup>) e 60 mL de etanol (30% V V<sup>-1</sup>).

Para avaliar a influência do erro no volume da acetona utilizado no preparo do padrão, foram preparados 7 padrões, o volume de etanol foi fixado em 60 mL e o volume de acetona utilizado foi de 56, 58, 59, 60, 61, 62 e 64 mL. Uma amostra de gasolina foi analisada com cada um dos 7 padrões preparados, porém para o cálculo da concentração de etanol na amostra admitiu-se que os padrões em todos os casos foram preparados utilizando 60 mL de acetona (30% V V<sup>-1</sup>) e 60 mL de etanol (30% V V<sup>-1</sup>).

Como a incerteza-padrão da precisão intermediária e da repetibilidade já são dadas na mesma unidade do mensurando o coeficiente de sensibilidade (C<sub>i</sub>) é igual a 1.

#### 8.1.3.4 Combinação das componentes

Para o cálculo da incerteza padrão combinada, admitiu-se que todas as grandezas não eram correlacionadas, sendo a incerteza padrão combinada -  $u_c(y)$  - calculada por meio da soma quadrática das incertezas de cada componente  $X_i$  na unidade do mensurando (Equação 14).

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (c_i(x_i) u(x_i))^2} \quad \text{Eq. 14}$$

#### 8.1.3.5 Estimativa da incerteza expandida

A incerteza expandida ( $U$ ) foi calculado em uma determinada probabilidade de abrangência utilizando a Equação 15.

$$U = k_p u_c(y) \quad \text{Eq. 15}$$

Onde:

$k_p$  é o fator de abrangência

$u_c$  é a incerteza padrão combinada

##### 8.1.3.5.1 Determinação do fator de abrangência

O fator de abrangência é selecionado de acordo com o nível de confiança requerido, utilizando os graus de liberdades efetivos calculados e uma tabela de distribuição t.

Os graus de liberdade efetivos ( $v_{eff}$ ) foram calculados utilizando a Equação de Welch-Satterthwaite (Eq. 16)<sup>17</sup>, onde  $u_c$  é a incerteza padrão combinada,  $u_i$  é a incerteza padrão para cada fonte de entrada (na unidade do mensurando) e  $v_i$  é o número de graus de liberdade das fontes de entrada.

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad \text{Eq. 16}$$

## 8.2 Resultados e discussão

Inicialmente, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk<sup>105</sup> para avaliar a normalidade dos resultados obtidos pelo método proposto. Para isso foram analisadas 9 vezes uma amostra de gasolina contendo 25% V V<sup>-1</sup> etanol. O teste de Shapiro-Wilk consiste no cálculo de W utilizando a Equação 17, onde SS é a soma das medias quadráticas dos resultados obtidos (Tabela 28) e b<sup>2</sup> é o quadrado da soma dos valores da diferença de X vezes os coeficientes a (Tabela 29).

$$W = \frac{SS}{b^2} \quad \text{Eq. 17}$$

**Tabela 28** - Concentrações de etanol determinadas pelo método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo (n=9) amostra de gasolina contendo 25% V V<sup>-1</sup> e soma quadrática dos resultados.

	[etanol]/ (V V <sup>-1</sup> )	(X <sub>i</sub> - X <sub>med</sub> ) <sup>2</sup>
X <sub>1</sub>	23,97	1,0816
X <sub>2</sub>	24,17	0,7056
X <sub>3</sub>	24,88	0,0169
X <sub>4</sub>	24,97	0,0016
X <sub>5</sub>	24,97	0,0016
X <sub>6</sub>	25,21	0,04
X <sub>7</sub>	25,26	0,0625
X <sub>8</sub>	25,47	0,2116
X <sub>9</sub>	26,19	1,3924
<b>(X<sub>med</sub>)</b>	25,01	<b>Soma</b> 3,5138

Fonte: autor

**Tabela 29** - Valores dos coeficientes a e valores dos cálculos das diferenças de X e da somatória das diferenças de X multiplicado pelos coeficientes a.

	<b>Coeficientes a</b>		<b>Diferença de X</b>	<b>Diferença de X * a</b>
a1	0,5888	$X_9 - X_1$	2,22	1,307
a2	0,3244	$X_8 - X_2$	1,30	0,422
a3	0,1976	$X_7 - X_3$	0,38	0,075
a4	0,0947	$X_6 - X_4$	0,24	0,023
			<b>Soma</b>	<b>1,827</b>

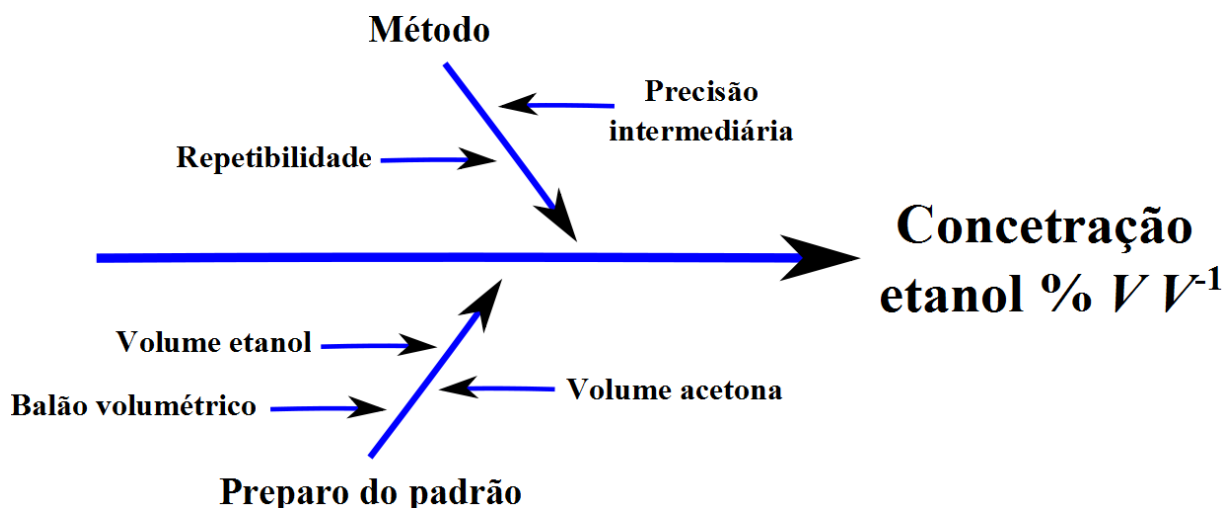
**Fonte:** autor

O valor de W calculado foi de 0,950, sendo W calculado maior que o valor de W tabelado = 0,935 para  $n=9$  e 95% de confiança<sup>105</sup>, pode se inferir que a distribuição dos valores de concentração de etanol obtidos pelo método propostos é normal.

### 8.2.1 DEFINIÇÃO DO MENSURANDO E IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

O primeiro passo para calcular as incertezas associadas ao método proposto foi especificar o mensurando, neste caso, o etanol.

Com o mensurando definido o próximo passo foi identificar todas as fontes de incerteza. As fontes de incertezas associadas ao método de adição de padrão por gradiente de concentração em fluxo são apresentadas na forma de um diagrama de causa e efeito (Diagrama de Ishikawa) na Figura 46.



**Figura 46** - Diagrama de causa e efeito para o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo aplicado na determinação de etanol por espectroscopia Raman.

**Fonte:** autor

A identificação das incertezas associadas ao preparo do padrão utilizado no método foram avaliadas individualmente. Já para avaliação das incertezas do método (sistema de extração líquido-líquido em fluxo e espectrômetro Raman) elas foram combinadas e avaliadas por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

### 8.2.2 CÁLCULO DAS COMPONENTES DE INCERTEZA

Inicialmente para o cálculo das componentes de incerteza foram levantados as incertezas-padrões e coeficientes de sensibilidade ( $C_i$ ) para cada fonte de entrada. As fontes de entrada onde as incertezas-padrões e  $C_i$  não são cobertos adequadamente por dados existentes (certificados, literatura, especificações de equipamentos) foram elaborados experimentos para se obter os dados necessários<sup>17</sup>.

Para o balão volumétrico de 200 mL ( $\pm 0,01$ ) e para as pipetas volumétricas de 10 mL ( $\pm 0,02$ ) e 50 mL ( $\pm 0,05$ ) utilizadas no preparo do padrão foram assumidos os valores das incertezas-padrões para vidrarias classe A<sup>106</sup>.

Para estimar a incerteza-padrão da repetibilidade do método uma amostra de gasolina foi analisada 10 vezes consecutivamente. Para a incerteza-padrão da precisão intermediária uma amostra de gasolina foi analisada 10 vezes, sendo estas 10 análises conduzidas em 5 dias diferentes e para cada dia foram utilizados dois

períodos diferentes. Os resultados obtidos para as análises de repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabela 30, as incertezas-padrões utilizados para o cálculo das componentes de incerteza são dadas pelo desvio padrão (SD) das medidas dividido por n (número de replicatas).

**Tabela 30** - Resultados (% V V<sup>1</sup>) para os testes de repetibilidade e precisão intermediária.

	[etanol]	SD	RSD/ (%)	n	SD/ $\sqrt{n}$
<b>Repetibilidade</b>	24,2697	0,3624	1,49	10	0,11460
<b>Precisão intermediária</b>	27,3338	0,4847	1,77	10	0,15329

Fonte: autor

Como o balão volumétrico de 200 mL utilizado no preparo do padrão tem uma relação matemática direta entre o mensurando (% V V<sup>1</sup> etanol) e a fonte de entrada, como pode ser visto na Equação 18, o  $C_i$  foi calculado utilizando as derivadas parciais do volume de etanol utilizado no preparo do padrão pelo volume total do balão (Equação 19), o resultado dessa divisão é multiplicado por 100, uma vez que o mensurando é expresso em porcentagem.

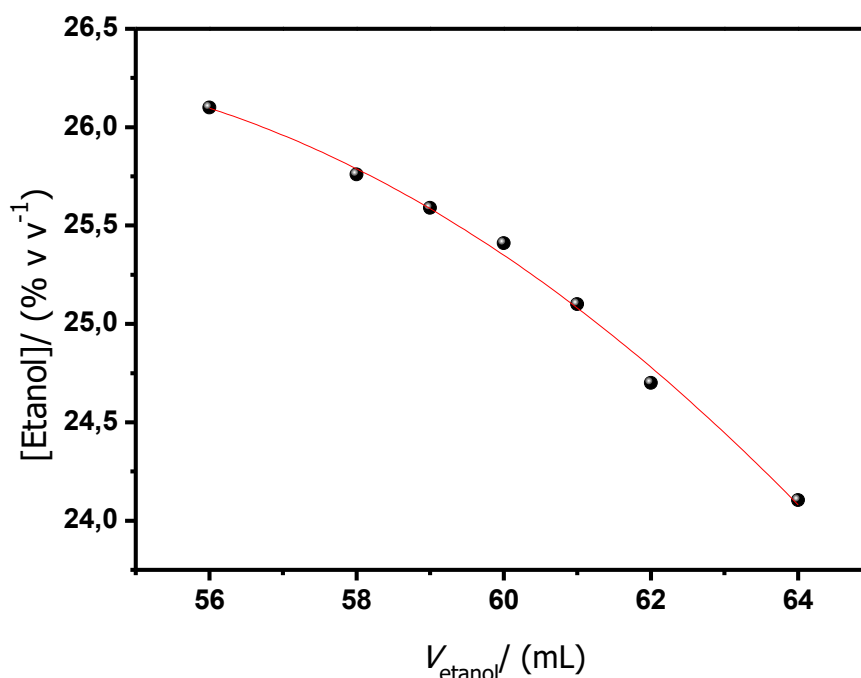
$$[\text{etanol}] = 100 \times \frac{\text{volume de etanol}}{\text{volume total}} \quad \text{Eq. 18}$$

$$c_i = \frac{\partial \text{vol. etanol}}{\partial \text{vol. total}} = - \frac{\text{vol. etanol}}{\text{vol. total}^2} \times 100 = - \frac{60}{200^2} \times 100 = - 0,15 \quad \text{Eq. 19}$$

Para as pipetas volumétricas empregadas para medir os volumes de acetona e etanol utilizadas no preparo dos padrões a relação entre a fonte de entrada e o mensurando não é direta. Para calcular o  $C_i$  das pipetas utilizadas para medir o volume de etanol no preparo do padrão, foi avaliado a influência do erro na medição do volume do etanol na concentração final do mensurando. Para este fim foram preparados 7 padrões, o volume de acetona foi fixado em 60 mL e o volume de etanol utilizado foi de 56, 58, 59, 60, 61, 62 e 64 mL. Uma amostra de gasolina foi analisada com cada

um dos 7 padrões preparados, no entanto, para o cálculo da concentração de etanol na amostra admitiu-se que os padrões em todos os casos foram preparados utilizando 60 mL de acetona (30% V V<sup>-1</sup>) e 60 mL de etanol (30% V V<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos para a análise da amostra de gasolina com cada um dos padrões são apresentados na Figura 47, onde pode se observar uma tendência polinomial de 2° grau. Utilizando a equação desta curva polinomial ( $y = -0,0163x^2 + 1,7058x - 18,263$ ) o Ci foi calculado assumindo-se a variação de uma unidade, sendo o valor x substituído por 60 e 59 mL na equação da curva, e o Ci calculado foi de 0,2339 para as pipetas utilizadas para medir o volume de etanol.

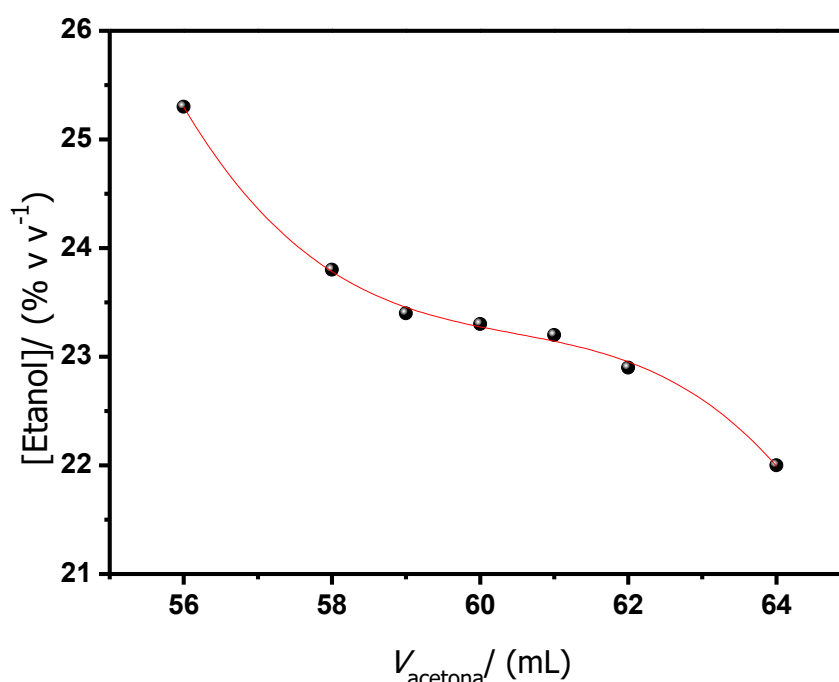


**Figura 47** - Influência do erro na medição do volume do etanol na concentração final do mensurando.

**Fonte:** autor

A influência do erro na medição do volume da acetona foi avaliada utilizando 7 padrões diferentes, onde esses foram preparados com o volume de etanol fixado em 60 mL e o volume de acetona de 56, 58, 59, 60, 61, 62 e 64 mL. Uma amostra de gasolina foi analisada com cada um dos 7 padrões preparados, porém para o cálculo da concentração de etanol na amostra admitiu-se que os padrões em todos os casos foram preparados utilizando 60 mL de acetona (30% V V<sup>-1</sup>) e 60 mL de etanol (30% V V<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos para a análise da amostra de gasolina com cada um dos padrões são apresentados na Figura 48. A análise desta figura revela que os resultados apresentam uma tendência polinomial de 3° grau, onde utilizando a equação desta curva polinomial ( $y = -0,1373x^3 + 12,445x^2 - 376,42x + 3820,8$ ) o  $C_i$  foi calculado assumindo-se a variação de uma unidade. O valor de  $x$  foi substituído por 60 e 59 mL na equação da curva, e o  $C_i$  calculado foi de 0,6346 para as pipetas utilizadas para medir o volume de acetona.



**Figura 48** - Influência do erro na medição do volume de acetona na concentração final do mensurando.

**Fonte:** autor

Como a incerteza-padrão da precisão intermediária e da repetibilidade são dadas na mesma unidade do mensurando o coeficiente de sensibilidade ( $C_i$ ) é considerado igual a 1.

Com os valores das incertezas-padrões e  $C_i$  para cada fonte de entradas definidos as componentes de incerteza podem ser calculadas utilizando a Equação 12 (apresentada no tópico 7.2.3.3). No entanto, no termo  $u(x_i)$  da equação deve ser levado em consideração a probabilidade de distribuição, para os materiais volumétricos assumiu-se uma distribuição retangular ( $\sqrt{3}$ ) e para a precisão intermediária e repetibilidade uma distribuição normal ( $\sqrt{4}$ ), logo o valor de  $u(x_i)$  é dado

pela divisão das incertezas-padrões pelo divisor. Os valores das componentes de incerteza calculados estão descritos na Tabela 31.

**Tabela 31** - Componentes de incerteza utilizadas no cálculo da incerteza padrão combinada.

Fonte	Incerteza padrão	Unidade	Divisor	$C_i$	Incerteza/ (% $V V^{-1}$ )
Balão 200 mL	0,01000	mL	1,73	0,1500	0,00087
Pipeta 50 mL (etanol)	0,05000	mL	1,73	0,2339	0,00675
Pipeta 10 mL (etanol)	0,02000	mL	1,73	0,2339	0,00270
Pipeta 50 mL (acetona)	0,05000	mL	1,73	0,6346	0,01832
Pipeta 10 mL (acetona)	0,02000	mL	1,73	0,6346	0,00733
Repetibilidade	0,11460	%	2,00	1,0000	0,05730
Precisão intermediária	0,15329	%	2,00	1,0000	0,07665

**Fonte:** autor

### 8.2.3 COMBINAÇÃO DAS COMPONENTES

Para o cálculo da incerteza padrão combinada ( $u_c$ ), admitiu-se que todas as grandezas não eram correlacionadas, assim  $u_c$  foi calculada por meio da soma quadrática das incertezas de cada componente, de acordo com a Equação 14 (descrita no tópico 7.2.3.4). A incerteza padrão combinada calculada foi de 0,10.

### 8.2.4 ESTIMATIVA DA INCERTEZA EXPANDIDA

Para estimar incerteza expandida do método inicialmente foi determinado os graus de liberdades efetivos ( $v_{eff}$ ) utilizando a Equação de Welch-Satterthwaite (descrita no tópico 7.2.3.5 – Eq. 16). Para o cálculo dos graus de liberdades efetivos assumiu-se que os graus de liberdade para os materiais volumétricos (balão e pipetas) eram infinitos<sup>17</sup> e para a precisão intermediária e repetibilidade eram iguais a 9 (n-1). O  $v_{eff}$  calculado foi de 18.

O fator de abrangência para 18 graus de liberdades efetivos e 95% de confiança é de  $2,15^{16}$ .

Com a incerteza padrão combinada calculada e com o fator de abrangência definido, a incerteza expandida ( $U$ ) do método foi estimada utilizando a Equação 15 (descrito na seção 7.2.3.5.1), e o valor de  $U$  foi de 0,2107%.

Com  $U$  calculado, os teores de etanol determinados utilizando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo no capítulo 6 são apresentados com sua incerteza expandida na Tabela 32. Como os valores de concentração são expressos com uma casa após a vírgula o valor de  $U$  foi arredondado para 0,3.

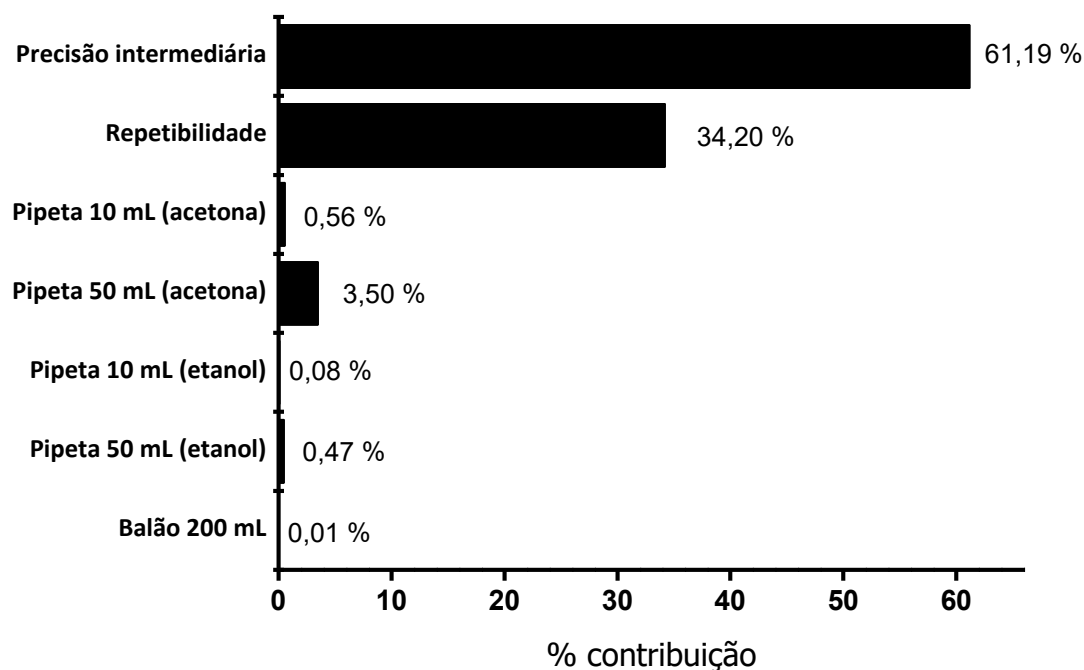
**Tabela 32** - Resultados da determinação ( $n=3$ ) de etanol em amostras de gasolina empregando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo.

Amostra	[etanol]/ (V V <sup>-1</sup> )	U
1	27,2	0,3
2	26,0	
3	25,5	
4	26,5	
5	25,7	

Fonte: autor

### 8.2.5 CONTRIBUIÇÃO DE CADA COMPONENTE NA INCERTEZA EXPANDIDA

Utilizando as componentes de incerteza, calculou-se a contribuição de cada fonte de entrada para o cálculo da incerteza expandida. A contribuição de cada fonte de entrada é apresentada na Figura 49, a análise desta figura mostra que aproximadamente 95% das contribuições para  $U$  são dadas pela precisão intermediária e repetibilidade do método.



**Figura 49** - Contribuição (%) de cada fonte de entrada para o cálculo da incerteza expandida.

**Fonte:** autor

### 8.3 Conclusões parciais

A determinação de etanol em gasolina por espectroscopia Raman utilizando o método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo e extração líquido-líquido em fluxo apresentou uma incerteza expandida de 0,2107%, sendo esta incerteza correspondente a um RSD da ordem de 0,8% para amostras que estejam dentro da legislação vigente no país ( $27\% V V^{-1}$ ).

A incerteza expandida é praticamente descrita pelas incertezas da precisão intermediária e repetibilidade do método, as outras fontes de incerteza tem uma contribuição < 5%.

## 9 CONCLUSÃO

O método de adição de padrão interno convencional ou empregando gradiente de concentração em fluxo mostrou ser uma alternativa viável e eficaz de calibração. O principal benefício deste método está relacionado com a combinação de dois métodos de correção (padronização interna + adição de padrão). O que minimiza os efeitos causados por variações instrumentais, flutuações nos sinais analíticos e efeitos de matriz.

Outro benefício do método de adição de padrão interno, quando comparado a padronização interna convencional, está relacionado com o fato da não necessidade da ausência do padrão interno na amostra original, desde que a concentração do padrão interno na amostra + a concentração de padrão interno adicionada esteja dentro do intervalo de resposta linear da técnica utilizada.

O método de adição de padrão interno convencional (utilizado manualmente) tem como limitação o volume total de amostra utilizado, a quantidade de soluções analíticas a serem preparadas e a baixa frequência analítica. No entanto, estes problemas foram solucionados com a automação do método utilizando sistemas em fluxo e um gradiente de concentração. O método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo necessita do preparo de apenas duas soluções para a análise da amostra, diminuindo significativamente o número de soluções a ser preparadas e a quantidade de resíduos gerados.

Os resultados obtidos utilizando o método de adição de padrão interno (convencional e em fluxo) em todas as aplicações apresentaram precisão e exatidão melhores ou comparáveis aos métodos de calibração convencionais (adição de padrão, padronização interna e calibração externa).

A análise metrológica do método de adição de padrão interno por gradiente de concentração em fluxo e extração líquido-líquido em fluxo apresentou uma incerteza expandida de 0,2107% para a determinação de etanol em gasolina, sendo esta incerteza correspondente a um RSD da ordem de 0,8%. A incerteza expandida é praticamente descrita pelas incertezas da precisão intermediária e repetibilidade do método, outras fontes de incerteza apresentaram uma contribuição < 5%.

## REFEFÊNCIAS

- 1 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira, 2006. 999 p.
- 2 KÓSCIELNIAK, P.; WIECZOREK, M. Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 944, n. 1, p. 14-28, 2016.
- 3 KORN, M. G. A.; SANTOS, D. S. S. dos; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEXEIRA, A. P.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels - a review. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 1-11, 2007.
- 4 IVANENKO, N. B.; GANEEV, A. A.; SOLOVYEV N. D.; MOSKVIN, L. N. Determination of trace elements in biological fluids. **J. Anal. Chem.**, v. 66, n. 9, p. 784-799, 2011.
- 5 KÓSCIELNIAK, P. Univariate calibration techniques in flow injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 438, n. 1/2, p. 323-333, 2001.
- 6 CUADROS-RODRÍGUES, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 20, n. 11, p. 620-636, 2001.
- 7 FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Quím. Nova**, v. 26, n. 2, p. 249-252, 2003.
- 8 JONES, W. B.; DONATI, G. L.; CALLOWAY, C. P. Jr.; JONES, B. T. Standard dilution analysis. **Anal. Chem.**, v. 87, n. 4, p. 2321-2327, 2015.
- 9 GARCÍA, I. L.; VINÃS, P.; CÓRDOBA, M. H. Calibration in flame atomic absorption spectrometry using a single standard and gradient technique. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 9, n. 4, p. 553-561, 1994.
- 10 REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Quím. Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.
- 11 PÉREZ-BUSTAMANTE, J. A. A schematic overview of the historical evolution of analytical chemistry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 357, n. 2, p. 151-161, 1997.
- 12 DANZER, K. **Analytical chemistry: theoretical and metrological fundamentals**. Berlin: Springer, 2007. 315 p.
- 13 HAGE, D. S.; CARR, J. M. **Química analítica e análise quantitativa**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012. 705 p.

- 14 KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. de A. A sequência analítica. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostra: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar.** Piracicaba, 2008. p. 1-12.
- 15 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa.** 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 918 p.
- 16 CHRISTIAN, G. D.; DASGUPTA, P. K.; SCHUG, K. A. **Analytical chemistry.** 7th ed. New York: Wiley, 2014. 826 p.
- 17 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Guia para a expressão de incerteza de medição: GUM 2008: avaliação de dados de medição.** Duque de Caxias, 2012. 141 p.
- 18 HIBBERT, D. B. **Quality assurance for the analytical chemistry laboratory.** New York: Oxford University Press, 2007. 306 p.
- 19 CHRISTIAN, G. D. Evolution and revolution in quantitative analysis. **Anal. Chem.**, v. 67, n. 17, p. 532A-538A, 1995.
- 20 KARAYANNIS, M. I.; EFSTATHIOU, C. E. Significant steps in the evolution of analytical chemistry - is the today's analytical chemistry only chemistry? **Talanta**, v. 102, n. 1, p. 7-15, 2012.
- 21 IHDE, A. J. **The development of modern chemistry.** New York: Dover, 1984. 851 p.
- 22 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.** 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p.
- 23 DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry - part. 1. Fundamentals and single componente calibration. **Pure & Appl. Chem.**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.
- 24 GILBERT, P. T. Determination of cadmium by flame photometry. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 1, p. 110-114, 1959.
- 25 SHATKRAY, A. A critical analysis of the method of successive dilutions in photometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 52, n. 3, p. 547-550, 1970.
- 26 KÓSCIENIAK, P.; WIECZOREK, M.; KOZAK, J.; HERMAN, M. Generalized calibration strategy in analytical chemistry. **Anal. Lett.**, v. 44, n. 1/3, p. 411-430, 2011.
- 27 SILVESTRE, D. M.; NAOZUKA, J.; CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S. Experimento utilizando grãos para explorar a calibração em análises químicas. **Quím. Nova**, v. 37, n. 9, p. 1545-1549, 2014.

- 28 ABBYAD, P.; TROMP, J.; LAM, J.; SALIN, E. Optimization of the technique of standard additions for inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 16, n. 5, p. 464-469, 2001.
- 29 RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y. Evaluation of internal standardization in electrothermal atomic absorption spectrometry. **Anal. Commun.**, v. 36, n. 1, p. 13-16, 1999.
- 30 NUMATA, Y.; LIDA, Y.; TANAKA, H. Quantitative analysis of alcohol-water binary solutions using Raman spectroscopy. **J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.**, v. 112, n. 6, p. 1043-1049, 2011.
- 31 WARREM, M. W.; AVERY, J. P.; MALMSTADT, H. V. Quantitative room-temperature phosphorescence with internal standard and standard addition techniques. **Anal. Chem.**, v. 54, n. 11, p. 1853-1858, 1982.
- 32 SZYSZKA, R.; HANTON, S. D.; HENNING, D.; OWENS, K. G. Development of a combined standard additions/internal standards method to quantify residual PEG in ethoxylated surfactants by MALDI TOFMS. **J. Am. Mass Spectrom.**, v. 22, n. 4, p. 633-640, 2011.
- 33 YAGI, M.; IZAWA, G.; OMORI, T.; MASUMOTO, K.; YOSHIHARA, K. A new internal standard method coupled with the standard addition method for proton-induced X-ray emission analysis and its application determination of Cu, Zn, Rb and S I biological materials. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 116, n.1, p. 213-222, 1987.
- 34 YANG, C.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. Precise blood lead analysis using a combined internal standard and standard addition approach with disposable screen-printed electrodes. **Anal. Biochem.**, v. 338, n. 2, p. 278-283, 2005.
- 35 BROWN, R. J. C.; ROBERTS, M. R.; BRETT, D. J. L. Stripping voltammetry using sequential standard addition calibration with the analytes themselves acting as internal standards. **Anal. Chim. Acta**, v. 635, n. 1, p. 1-5, 2009.
- 36 MASUMOTO, K.; YAGI, M. Instrumental photon activation analysis of soil samples using the internal standard method coupled with the standard addition method. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 116, n. 2, p. 375-388, 1987.
- 37 MASUMOTO, K.; YAGI, M. Revaluation of the internal standard method coupled with the standard addition method applied to soil samples by means of photon activation. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 121, n. 1, p. 131-139, 1988.
- 38 MASUMOTO, K.; YAGI, M. Instrumental photon activation analysis of coal fly ashes using the internal standard method coupled with the standard addition method. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 152, n. 1, p. 55-66, 1991.
- 39 MASUMOTO, K. Application of the internal standard method coupled with the standard addition method in photon activation analysis to trace characterization of environmental materials. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 203, n. 1, p. 37-46, 1996.

40 MASUMOTO, K.; HARA, M.; HASEGAWA, D.; LINO, E.; YAGI, M. Photon and proton activation analysis of iron and steel standards using the internal standard method coupled with the standard addition method. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 217, n. 2, p. 247-253, 1997.

41 SALIN, E. D.; ANTLER, M.; BORT, G. Evaluation of the simultaneous use of standard additions and internal standard calibration techniques for inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 19, n. 11, p. 1498-1500, 2004.

42 ZHU, Y.; CHIBA, K. Internal standard method coupled with a gravimetric standard addition method for elemental measurements by ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 27, n. 6, p. 1000-1006, 2012.

43 O'REILLY, J.; DOUGLAS, D.; BRAYBROOK, J.; SO, P.; VERGUCHT, E.; GARREVOET, J.; VEKEMANS, B.; VINCZE, L.; GOENAGA-INFANTE, H. A novel calibration strategy for the quantitative imaging of iron in biological tissues by LA-ICP-MS using matrix-matched standards and internal standardization. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 29, n. 8, p. 1378-1384, 2014.

44 UGARTE, A.; UNCETA, N.; PÉCHEYRAN, C.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Development of matrix-matching hydroxyapatite calibration standards for quantitative multi-element LA-ICP-MS analysis: application to the dorsal spine of fish. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 26, n. 7, p. 1421-1427, 2011.

45 CHIRINOS, J.; OROPEZA, D.; GONZÁLEZ, J.; ZORBA, V.; RUSSO, R.E. Analysis of plant leaves using laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry: use of carbon to compensate for matrix effects. **Appl. Spectrosc.**, 2016. doi:10.1177/0003702816683686.

46 STEPÁNKOVÁ, K.; NOVOTNÝ, K.; GALIOVÁ, M. V.; KANICKÝ, V.; KAISER, J.; HAHN, D. W. Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: comparison study based on calibration pellets. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 81, n. 1, p. 43-49, 2013.

47 ZHU, Y. Quantitative analysis of trace elements in silicate glass sample by LA-ICP-QMS/QMS with an ORC: silicon as the matrix of calibration solutions and the internal standard for measurement. **Anal. Sci.**, v. 32, n. 11, p. 1237-1243, 2016.

48 POURETEDAL, H. R.; ASEFI, M. H-point standard addition method for simultaneous determination of cobalt(II) and zinc(II) ions. **J. Iran. Chem. Soc.**, v. 5, n. 2, p. 546-552, 2008.

49 HAJIAN, R.; SHAMS, N.; RAD, A. Application of H-point standard addition method for simultaneous spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and propranolol. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 5, p. 860-865, 2009.

50 SHAMS, N.; ABDOLLAHI, H.; YEKEHTAZ, M.; HAJIAN, R. H-point standard addition method in the analysis by differential pulse anodic stripping voltammetry simultaneous determination of lead and tin. **Talanta**, v. 63, n. 2, p. 359-364, 2004.

- 51 CAMPÍNS-FALCÓ, P.; BOSCH-REIG, F.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Determination of theophylline and paraxanthine in urine samples by liquid chromatography using the H-point standard additions method. **Anal. Chim. Acta**, v. 268, n. 1, p. 73-80, 1992.
- 52 CAMPÍNS-FALCÓ, P.; BOSCH-REIG, F.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Development of the H-point standard additions method for coupled liquid chromatography and UV-visible spectrophotometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 257, n. 1, p. 89-98, 1992.
- 53 BOSCH-REIG, F.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; VERDÚ-ANDRÉS, J. Development of the H-point standard additions method for analyte determination in unknown matrix: location of linear matrix spectral interval. **Anal. Chim. Acta**, v. 283, n. 2, p. 831-344, 1993.
- 54 BOSCH-REIG, F.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; MOLÍNS-LEGUA, C. Study of the behavior of the absorbent blanks in analytical procedures by using the H-point standard additions method (HPSAM). **Talanta**, v. 41, n. 1, p. 39-42, 1994.
- 55 HASANI, M.; MOHAMMADI, M.; SHARIATI-RAD, M.; ABDOLLAHI, H. H-point curve isolation method for determination of catechol in complex unknown mixtures. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 96, n. 1, p. 563-568, 2012.
- 56 WIECZOREK, M.; KOSCIELNIAK, P.; SWIT, P.; MARSZATEK, K. Novel multicommuted flow manifold dedicated to the integrated calibration method. **Anal. Methods**, v. 6, n. 23, p. 9276-9282, 2014.
- 57 CHOCHOLOUS, P.; WIECZOREK, M.; SWIT, P.; KOZAK, J.; SOLICH, P.; KOSCIELNIAK, P. Novel approach to two-component analysis based on the generalized calibration strategy. **Anal. Lett.**, 2016.  
doi:10.1080/00032719.2016.1194425.
- 58 WIECZOREK, M.; KOSCIELNIAK, P.; SWIT, P.; PALUCH, J.; KOZAK, J. Solenoid micropump-based system for generalized calibration strategy. **Talanta**, v. 133, n. 1, p. 21-26, 2015.
- 59 VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Evaluation of standard dilution analysis (SDA) of beverages and foodstuffs by ICP OES. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 31, n. 6, p. 1216-1222, 2016.
- 60 GONÇALVES, D. A.; McSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 909, n. 1, p. 24-29, 2016.
- 61 VIRGILIO, A.; SCHIAVO, D.; COSTA, L. M.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Inductively coupled plasma mass spectrometry and standard dilution analysis applied to concentrated acids. **Talanta**, v. 161, n. 1, p. 826-829, 2016.

62 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP N° 14, de 11 de maio de 2012. Especificação do biodiesel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 maio 2012.

63 MAGALHÃES, M. R. L.; BARROS, A. I.; OLIVEIRA, A. P.; SANTOS, A. Dissolution in ethanol as a sample preparation procedure for determination of metals in biodiesel by FAAS. **Curr. Anal. Chem.**, v. 10, n. 1, p. 166-171, 2014.

64 PENIDO, M. G. M. G.; DINIZ, J. S. S.; GUIMARÃES, M. M. M.; CARDOSO, R. B.; SOUTO, M. F. O.; PENIDO, M. G. Excreção urinária de cálcio, ácido úrico e citrato em crianças e adolescentes saudáveis. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 2, p. 153-160, 2002.

65 BORTOLETO, G. G.; SOUSA, R. A.; CADORE, S. Direct and simultaneous determination of Ca, Cl, K, Mg, Na e P in human urine by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **At. Spectrosc.**, v. 31, n. 3, p. 89-91, 2010.

66 CHAVES, E. S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; CURTIUS, A. J.; VANHAECKE, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 66, n. 9/10, p. 733-739, 2011.

67 DULUDE, G. R.; SOTERA, J. J.; KAHN, H. L. Determination of calcium in cement by flame atomic absorption spectrometry with strontium as an internal standard. **Anal. Chem.**, v. 53, n. 13, p. 2100-2102, 1981.

68 TAKADA, T.; NAKANO, K. Internal standard method in flame absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta**, v. 36b, n. 7, p. 735-745, 1981.

69 LIDE, D. R. **CRC handbook of chemistry and physics**. 88th ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 2649 p.

70 ROCHA, F. R. P.; NOBREGA, J. A. Effects of solution physical properties on copper and chromium signals in flame atomic absorption spectrometry. **J. Chem. Educ.**, v. 73, n. 10, p. 982-984, 1996.

71 SZIVÓS, K. Application of organic solvents in atomic-absorption spectrophotometry. **Period. Polytech. Chem.**, v. 25, n. 2, p. 121-132, 1981.

72 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, n. 3, p. 346-349, 2006.

73 AOAC INTERNATIONAL. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). In: \_\_\_\_\_ **AOAC Official methods of analysis**. Gaithersburg, 2012.

- 74 PRATS-ALFONSO, E.; ABAD, L.; CASAÑ-PASTOR, N.; GONZALO-RUIZ, J.; BALDRICH, E. Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples. **Biosens. Bioelecton.**, v. 39, n. 1, p. 163-169, 2013.
- 75 DENG, H.; HONG, G.; LIN, F.; LIU, A.; XIA, X.; CHEN, W. Colorimetric detection of urea, urease, and urease inhibitor based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles. **Anal. Chim. Acta**, v. 915, n. 7, p. 74-80, 2016.
- 76 JESSEN, T. E.; HOSKULDSSON, A. T.; BJERRUM, P. J.; VERDER, H.; SORENSEN, L.; BRATHOLM, P. S.; CHRISTENSEN, B.; JENSEN, L. S.; JENSEN, M. A. B. Simultaneous determination of glucose, triglycerides, urea, cholesterol, albumin and total protein in human plasma by Fourier transform infrared spectroscopy: direct clinical biochemistry without reagents. **Clin. Biochem.**, v. 47, n. 13/14, p. 1306-1312, 2014.
- 77 MITIC, S. S.; MILETIC, G. Z.; KOSTIC, D. A.; RASIC, I. D. A spectrophotometric study of streptomycin effect on the clinical urea determination. **Chin. J. Chem.**, v. 29, n. 1, p. 135-142, 2011.
- 78 YANG, D.; YING, Y. Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: a review. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v. 46, n. 7, p. 539-560, 2011.
- 79 AARNOUTSE, P. J.; WESTERHUIS, J. A. Quantitative Raman reaction monitoring using the solvent as internal standard. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 5, p. 1228-1236, 2005.
- 80 KUDELSKI, A. Analytical applications of Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2008.
- 81 ALMEIDA, M. L. **Dosagens de ureia e creatinina em soro humano através da técnica de espectroscopia Raman comparada com o método bioquímico**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, 2014.
- 82 BISPO, J. A. M.; VIEIRA, E. E. S.; SILVEIRA JUNIOR, L.; FERNANDES, A. B. Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis, **J. Biomed. Opt.**, v. 18, n. 8, p. 087004/1-087004/7, 2013.
- 83 FURUYA, N.; MATSUYUKI, A.; HIGUCHI, S.; TANAKA, S. Determination of nitrate ion in waste and treated waters by laser Raman spectrometry. **Water Res.**, v. 13, n. 4, p. 371-374, 1979.
- 84 FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman spectrometry**. 2nd ed. Florida: Academic Press, 2008. 434 p.
- 85 CHAVES, E. S.; SAINT'PIERRE, T. D.; SANTOS, E. J. dos; TORMEN, L.; BASCUÑAN, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Determination of Na and K in biodiesel by flame atomic emission spectrometry and microemulsion sample preparation. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 5, p. 856-861, 2008.

- 86 LYRA, F. H.; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P.; PESSOA, H. M.; CASTRO, E. V. Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) using microemulsion as sample preparation. **Microchem. J.**, v. 96, n. 1, p. 180-185, 2010.
- 87 NDANUKO, R. N.; TAPSELL, L. C.; CHARLTON, K. E.; NEALE, E. P.; O'DONNELL, K. M.; BATTERHAM, M. J. Relationship between sodium and potassium intake and blood pressure in sample of overweight adults. **Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 1-25, 2016.
- 88 ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A.; WORSFOLD, P. J. **Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection**. Massachusetts: Elsevier, 2012. 472 p.
- 89 BLITZ, J. P.; SHEERAN, D. J. Quantitative flame emission spectrometry using internal standard calibration procedure with multi-channel spectrometer. **Chem. Educ.**, v. 14, n. 5, p. 1-3, 2009.
- 90 FELDMAN, F. J. Internal standardization in atomic emission and absorption spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 42, n. 7, p. 719-724, 1970.
- 91 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Quím. Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.
- 92 WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 941 p.
- 93 GOMES NETO, J. A.; SILVA, J. B. B.; RODRIGUES NETO, R.; CURTIUS, A. J.; SOUZA, I. G. Emprego de nebulizador pneumático de ICP-MS como câmara de diluição em sistemas de injeção em fluxo para determinação multielementares. **Quím. Nova**, v. 21, n. 4, p. 405-409, 1998.
- 94 KRAMIDA, A.; RALCHENKO, Y. U.; READER, J.; NIST ASD TEAM. **NIST atomic spectra database**. Version 5.2. Gaithersburg, 2014. Disponível em: <<http://physics.nist.gov/asd>>. Acesso em: 10 fev. 2015.
- 95 PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, n. 1, p. 99-102, 2012.
- 96 MENDES, L. S.; OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, J. C. Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries. **Anal. Chim. Acta**, v. 493, n. 2, p. 219-231, 2003.
- 97 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP N° 40, de 25 de outubro de 2013. Especificação de gasolina automotiva. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 out. 2013.

98 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **D5501-12**: standard test method for determination of ethanol and methanol content in fuels containing greater than 20% ethanol by gas chromatography. West Conchohocken, 2013.

99 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13992**: gasolina automotiva - determinação do teor de etanol anidro combustível (EAC). Rio de Janeiro, 2015.

100 FRAUSTO-REYES, C.; MEDINA-GUTIERREZ, C.; SATO-BERRU, R.; SAHAGUN, L. R. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. **Spectrochim. Acta**, v. 61, n. 11/12, p. 2657-2662, 2005.

101 YE, Q.; XU, Q.; YU, R.; QU, Z.; FANG, Z. Rapid and quantitative detection of ethanol proportion in ethanol-gasoline mixtures by Raman spectroscopy. **Opt. Commun.**, v. 282 n. 18, p. 3785-3788, 2009.

102 CHOQUETTE, S. J.; CHESLER, S. N.; DUEWER, D. L.; WANG, S.; O'HAVER, T. C. Identification and quantitation of oxygenates in gasoline ampules using Fourier transform near-infrared and Fourier transform Raman spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 20, p. 3525-3533, 1996.

103 FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas em fluxo. **Quím. Nova**, v. 21, n. 1, p. 60-68, 1998.

104 BOYACI, I. H.; GENIS, H. E.; GUVEN, B.; TAMER, U.; ALPER, N. A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy. **J. Raman Spectrosc.**, v. 43, n. 8, p. 1171-1176, 2012.

105 SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

106 SILVA, A. S. da; SANTOS JUNIOR, W. A. dos; FRANCO, E. da C.; SILVA, L. M. da. A metrologia nas análises químicas. **Rev. Anal.**, v. 77, n. 1, p. 61-64. 2015.