UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara

Alan Lima Vieira

Novas estratégias de análise espectroquímica elementar de diferentes amostras

Araraquara - SP

2020

ALAN LIMA VIEIRA

Novas estratégias de análise espectroquímica elementar de diferentes amostras

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

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Alan Lima
V657n Novas estratégias de análise espectroquímica elementar de diferentes amostras / Alan Lima Vieira. – Araraquara : [s.n.], 2020
141 f. : il.

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

1. Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser. 2. Calibração. 3. Espectroscopia de absorção atômica. 4. Espectroscopia de emissão atômica. 5. Preparo de amostras (Química). I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

Instituto de Química

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Novas estratégias de análise espectroquímica elementar de diferentes amostras"

AUTOR: ALAN LIMA VIEIRA

ORIENTADOR: JOSE ANCHIETA GOMES NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE ANCHIETA GOMES NETO
Departamento de Química Analítica / Instituto de Quimica - UNESP – Araraquara

Prof. Dr. FERNANDO BARBOSA JUNIOR
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. MARCOS YASSUO KAMOGAWA
Departamento de Química / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP – Piracicaba

Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 18 de junho de 2020

DADOS CURRICULARES

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: Alan Lima Vieira

Data de nascimento: 12 de julho de 1991

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Patos de Minas - MG

Filiação: Sebastião Donizete Vieira

Geralda de Fátima Vieira

Nome em citações bibliográficas:

VIEIRA, A. L.; VIEIRA, ALAN LIMA; VIEIRA, ALAN L.; VIEIRA, ALAN.

Endereço eletrônico: alan.vieira@hotmail.com

2. Formação acadêmica

2.1. Graduação em Química - Bacharelado
Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba - UFV-CRP,
Rio Paranaíba - MG.
Período: 09/2009 - 02/2014.

2.2. Mestrado em Química.
Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP,
Araraquara - SP.
Período: 03/2014 - 03/2016.

2.3. Doutorado em Química.
Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP,
Araraquara - SP.
Período: 03/2016 - 06/2020

3. Artigos aceitos e submetidos para publicação

3.1. VIEIRA, A.L.; FERREIRA, E.C.; SANTOS JÚNIOR, D.; SENESI, G.S.; GOMES NETO, J.A. Spark discharge-assisted single-standard calibration in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: determination of Al and P in agroindustrial samples. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,** (Submetido).

3.2. FECHNER, D.C.; SILVA, T.V; NESPECA, M.G.; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A.; SANTOS JÚNIOR, D.; PELLERANO, R. G.; FERREIRA, E.C, Protected geographical identification of honey by laser-induced breakdown spectroscopy. **Heliyon,** (Submetido).

3.3. PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; DIRCHWOLF, P.M.; SILVA, T.V; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A.; PELLERANO, R. G.; FERREIRA, E.C, Fast spark discharge-laser-induced breakdown spectroscopy method for rice botanic origin determination. **Food Chemistry,** v. 331, p. 127051, 2020.

3.4. NESPECA, M.G.; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A.; SANTOS JÚNIOR, D.; FERREIRA, E.C. Potential of laser-induced breakdown spectroscopy for detection and quantification of adulterants in honey. **Food Chemistry,** v. 311, p. 125886, 2020.

3.5. VIEIRA, A.L.; MAURÍLIO, G.N.; PAVINI, W. FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. A user-friendly Excel spreadsheet for dealing with spectroscopic and chromatographic data. **Chemometric and Intelligent Laboratory Systems,** v. 194, p. 103816, 2019.

3.6. VIEIRA, A.L.; GONÇALVES, D.A.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E.C.; JONES, B.T.; DONATI, G.L.; GOMES NETO, J.A. Multi-Energy Calibration for the determination of non-metals by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** v. 34, n. 5, p. 972-978, 2019.

3.7. VIEIRA, A.L.; MIRANDA, K.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Evaluation of an improved closed-vessel conductively heated digestion system for the analysis of raw meat samples by ICP techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** v. 33, n. 8, p. 1354-1362, 2018.

3.8. VIEIRA, A.L.; SILVA, T.V.; SOUSA, F.S.I.; SENESI, G.S.; DÁRIO SANTOS JR, D.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Determination of phosphorus in fertilizers by electrical discharge assisted laser-induced breakdown spectroscopy. **Microchemical Journal,** v. 139, p. 322-326, 2018.

3.9. SOARES, F.S.C.; VIEIRA, A.L.; SOARES, M.S.; SANT'ANNA, M.V.; NASCENTES, R.; BOSSU, C.M. Construção de uma bomba peristáltica e de um sistema de detecção utilizando um hardware de código fonte aberto "arduino" para análise em fluxo. **Química Nova,** v. 41, n. 10, p. 1196-1199, 2018.

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, **Microchemical Journal,** v. 133, p. 76-80, 2017.

3.11. 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 Analytical Methods,** v. 9, n. 7, p. 1887-1894. 2015.

3.12. MIRANDA, K.; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A. High-throughput sugarcane leaf analysis using a low cost closed-vessel conductively heated digestion system and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Analytical Methods,** v. 6, n. 23, p. 9503-9508. 2014.

4. Principais trabalhos apresentados em congressos

4.1. NESPECA, M.G.; VIEIRA, A.L.; GOMES NETO, J.A.; SANTOS JR, D.; FERREIRA, E.C. Detection of honey adulteration by laser-induced breakdown spectroscopy assisted by spark discharge (SD-LIBS) associated with chemometrics. 15th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2019, Mendoza, Argentina.

4.2. VIEIRA. A.L.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A., SANTOS JR, D.; SENESI, G.S. Spark discharge-assisted single-standard calibration in laser-induced breakdown spectroscopy: determination of Al and P in agroindustrial samples. 15th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2019, Mendoza, Argentina.

4.3. VIEIRA, A.L.; MAURÍLIO, G.N.; PAVINI, W.D.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Uma planilha do Excel amigável ao usuário para tratar dados espectroscópicos e cromatográficos. 6° Congresso Analitica Latin America, 2015, São Paulo - SP.

4.4. VIEIRA, A. L.; VIRGILIO, A.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A. Dried Blood Spot e determinação de Fe por espectrometria de absorção atômica: um estudo sistemático. 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, 2018, Caldas Novas - GO.

4.5. VIEIRA, A.L.; SILVA, T.V.; SOUSA, F.S.I.; SENESI, G.S.; SANTOS JR, D.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Determination of phosphorus in fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy improved by laser-induced electrical discharge. Pittcon Conference & Expo, 2018, Orlando, Florida, EUA.

4.6. VIEIRA, A.L.; SILVA, T.V.; SANTOS JR, D.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Descarga elétrica induzida por laser como estratégia de melhoria em sensibilidade na determinação de fósforo em fertilizantes por LIBS. 5° Congresso Analitica Latin America, 2017, São Paulo - SP.

- Prêmio de melhor trabalho científico apresentado na forma oral e pôster.

4.7. VIEIRA, A.L.; SILVA, T.V.; MORAIS, C.P.; SANTOS JUNIOR, D.; FERREIRA, E.C.; GOMES NETO, J.A. Evaluation of spark discharge as strategy to improve sensitivity in Laser Induced Breakdown Spectroscopy. 14th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2017, Vitória - ES.

- Prêmio de melhor trabalho na sessão painel. (SAB/ELSEVIER prize by poster presentation).

4.8. VIEIRA, A. L.; MIRANDA, K.; GOMES NETO, J.A. Avaliação de um sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para preparar amostras de carne visando à análise elementar. 4º Congresso Analitica Latin America, 2015, São Paulo - SP.

4.9. VIEIRA, A. L., RIBEIRO, L. L., SANTANA, M. V., SOARES, M. S., BABOS, D. V., CASTRO, J. P., RESENDE, M. O. Análise por injeção em fluxo empregando materiais alternativos e de baixo custo. 3º Congresso Analitica Latin America, 2013, São Paulo - SP.

4.10. CASTRO, J. P., RESENDE, M. O., BABOS, D. V., VIEIRA, A. L., SOARES, M. S., SOARES, F. S. C. Remoção de Cr (VI) de soluções aquosas utilizando adsorventes naturais. 3º Congresso Analitica Latin America, 2013, São Paulo - SP.

5. Outras atividades relevantes

5.1. Palestra “Inovações em Química: estratégias de baixo custo em instrumentação analítica”. 6° Semana Acadêmica de Química - SEAQ, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba - MG, 28 de junho de 2019.

5.2. Pedido Nacional de Invenção: “Patente de Invenção (PI): Aperfeiçoamento em frasco de digestão de amostras por via úmida”, 25 de junho de 2019. Número do processo: BR 10 2019 013186 1.

5.3. Monitor do experimento “Digestão por via úmida assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado (CHDS)”. XII workshop sobre preparo de amostras, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 15 a 18 de abril de 2019.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Sebastião Donizete** e **Geralda de Fátima**, pelo amor, carinho, apoio e estrutura familiar. À minha noiva **Stela Alves** pelo amor e compreensão. Ao meu irmão **Alex Lima** pelo companheirismo, incentivo e amizade. Aos meus avós, minha eterna gratidão.*

É com grande satisfação que lhes dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as graças realizadas em minha vida.

Aos meus pais Fátima e Sebastião pelos ensinamentos ao longo de minha vida e pelo esforço incondicional para que não me faltasse nada.

À minha noiva e eterna companheira Stela, pelo seu amor, carinho, apoio e conselhos dedicados integralmente durante estes anos juntos. Obrigado por nunca medir esforços para tornar a minha vida melhor a cada dia.

As minhas avós Isaura (*In memorian*) e Claudina (*In memorian*), as quais foram os alicerces durante a minha vida, principalmente durante a minha graduação em química.

Ao meu irmão Alex pela amizade e companheirismo ao longo de toda minha vida.

Ao Prof. Dr. José Anchieta pela orientação, oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelo exemplo de profissionalismo, além da nossa forte amizade.

À profa. Dra. Edilene pela amizade e diversas contribuições dadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do grupo de espectroanalítica e automação (GEA), Maisa, João Victor, Sâmia, Leonardo, Raiane, Evilim, Matheus, João Varoni, os quais me ajudaram bastante diretamente e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos que conheci durante na pós-graduação Felipe, Carol, Marcos, Luciana, Tiago, Juliana, Kelber, Eduana, Ariane, Mário, Carla, Thaila, Maurílio, Mariana, Augusto e Michael. Muito obrigado por todo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos da República Etanóis, André, Conrado, Daniel, Rodrigo, Rodolfo e Rosembergue, muito obrigado pelo companheirismo e momentos de descontração vivenciados.

Ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e ao Grupo de Espectroanalítica e Automação pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos 44 meses de bolsa cedidos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos 4 meses de bolsa concedidos.

Aos meus amigos Prof. Dr. Alex V., Me. Felipe S. e Dr. Daniel G. que me ajudaram diretamente na execução de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa pela doação dos papeis *Whatman* 903® utilizados neste trabalho.

Obrigado a todos!

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

Novas estratégias de análise elementar por espectrometria atômica e molecular foram desenvolvidas e propostas visando melhoria em sensibilidade, calibrações mais simples e amostragem de sangue em papel. Um circuito de descarga elétrica (SD) de alta tensão, acoplado a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS), permitiu aumentar a sensibilidade e determinar P em fertilizantes. O circuito elétrico fornece até 4,5 kV e produz descargas elétricas entre dois eletrodos de W durante o pulso do *laser* na amostra. A emissão aumenta por conta de mecanismos ainda pouco compreendidos como evolução prolongada da emissão, aumento do volume do plasma e/ou reaquecimento da pluma do plasma. A linha de emissão P(I) em 214,9 nm foi a escolhida para determinar P em fertilizantes empregando calibração externa com padrões sólidos (4,8 - 33,3% m m^{-1} P_2O_5) preparados a partir da mistura do material de referência 120c Phosphate Rock com um diluente ($CaCO_3$, $CaSO_4$, KCl e ureia). Curvas de calibração com bons coeficientes de correlação ($\geq$ 0,993) foram obtidas com boa precisão (RSD $\leq$ 8%). O limite de quantificação (LOQ) foi 5,3 % m m^{-1}. Os resultados obtidos por SD-LIBS foram concordantes ao nível de 95% de confiança (teste *t-Student* pareado) com aqueles obtidos pelo método comparativo baseado em digestão ácida e espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua (HR-CS FAAS). O sistema SD-LIBS fez parte de outro estudo sobre um novo método de calibração com padrão único (SSC). O método requer a medida da intensidade de emissão (I) do padrão (C^{std}) e da amostra ($C^{amostra}$) a duas voltagens diferentes, de modo que $C^{amostra} = C^{std}(\Delta I^{amostra}/\Delta I^{std})$. Como prova de conceito, Al e P foram determinados em material foliar e fertilizantes, respectivamente. Para fins comparativos, as mesmas amostras foram analisadas empregando-se outras calibrações baseadas na razão das inclinações (SRC) e em multilinhas (MLC). Ainda, o P foi também determinado por HR-CS FAAS. Os resultados obtidos pelo método proposto foram concordantes com os valores certificados para Al, e com os valores obtidos para P por HR-CS FAAS. A precisão (RSD) das medidas foi $\leq$ 7 % para Al, e entre 4 e 10 % para P. Outra estratégia de calibração denominada calibração multi-energética (MEC) foi avaliada na determinação de Cl, N, P, S por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS) via formação de moléculas gasosas diatômicas de CaCl, NO, PO e CS, respectivamente. A determinação de cloreto em leite, e de N, P, e S em fertilizantes e insumos agrícolas pelo método proposto forneceu resultados concordantes (teste *t-Student* pareado) com os obtidos por calibração externa ao nível de 95 % de confiança. Ainda, as recuperações variaram de 97 a 109 % (Cl), 97 a 103 % (P), 99 a 109 % (S) e 98 a 99 % (N). A precisão (RSD) das medidas foi de aproximadamente 6, 3, 2 e 2 % para Cl, N, P e S respectivamente. O preparo de amostras de sangue para análise direta por HR-CS GFAAS denominada *Dried Blood Spot* (DBS) foi avaliada como estratégia para determinação direta e simultânea de Fe e Zn. As linhas alternativas escolhidas foram 446,165 nm e 307,572 nm (Fe) e 307,589 nm (Zn). O modificador permanente W prolongou a vida útil das plataformas e a adição de 3 µL de solução 15 % v v^{-1} H_2O_2 promoveu a estabilidade térmica e melhorou o perfil do pico de absorção transiente do Zn. As curvas analíticas (0,1 - 3 µg Fe; 0,5 - 50 ng Zn) empregaram discos de papel *Whatman 903*® impregnados com solução dos analitos. Os resultados de nove das dez amostras de sangue analisadas pelo método proposto foram concordantes com o método comparativo ao nível de 95 % de confiança. A precisão das medidas (RSD) foi $\leq$ 10 % tanto para Fe como Zn. Os LOQ obtidos para Fe (446,16 nm), Fe (307,572 nm) e Zn (307,589 nm) foram 67, 10,2 e 1,2 mg L^{-1}, respectivamente.

Palavras-chave: LIBS, SD-LIBS, SD-SSC LIBS, Calibração multi-energética, DBS.

ABSTRACT

New strategies for elementary analysis by atomic and molecular spectrometry were developed and proposed to improve sensitivity, simpler calibrations and blood samples on paper. A high voltage spark-discharge (SD) circuit, coupled to laser-induced breakdown spectrometry (LIBS), allowed to increase sensitivity and determine P in fertilizers. The electrical circuit delivers up to 4.5 kV and produces electrical discharges between two W electrodes triggered by laser pulse in the sample. Emission increases due to mechanisms that are still poorly understood, such as prolonged evolution of emission, increased plasma volume and/or reheating plasma plume. The emission line P (I) at 214.9 nm was chosen to determine P in fertilizers using external calibration with solid standards (4.8 - 33.3 % m m^{-1} P_2O_5) prepared from the mixture of the reference material 120c Phosphate Rock with a diluent ($CaCO_3$, $CaSO_4$, KCl and urea). Calibration curves with good correlation coefficients ($\geq$ 0.993) were obtained with good precision (RSD $\leq$ 8 %). The limit of quantification (LOQ) was 5.3 % m/m. The results obtained by SD-LIBS were consistent at a 95 % confidence level (paired Student's t-test) with those obtained by comparative method based on acid digestion and determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry with (HR-CS FAAS). The SD-LIBS system was part of another study on a new calibration method with a single standard (SSC). The method requires the measurement of the emission intensity (I) of the standard (C^{std}) and the sample (C^{sample}) at two different voltages, so that $C^{sanple} = C^{std} (\Delta I^{Sample} / \Delta I^{std})$. As a proof-of-concept, Al and P were determined in leaf material and fertilizers, respectively. For comparative purposes, the same samples were analyzed using other calibrations based on slope ratio (SRC) and multi-line (MLC). In addition, the P was also determined by HR-CS FAAS. The results obtained by the proposed method were in agreement with the values certified for Al, and with the values obtained for P by HR-CS FAAS. The accuracy (RSD) of the measurements was $\leq$ 7 % for Al, and between 4 and 10 % for P. Another calibration strategy called multi-energy calibration (MEC) was evaluated in the determination of Cl, N, P, S by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS) *via* formation of gaseous diatomic molecules of CaCl, NO, PO and CS, respectively. The determination of chloride in milk, and of N, P, and S in fertilizers and agricultural inputs by the proposed method provided concordant results (paired Student's t-test) with those obtained by external calibration at the 95 % confidence level. In addition, recoveries ranged from 97 to 109 % (Cl), 97 to 103 % (P), 99 to 109 % (S) and 98 to 99 % (N). The precision (RSD) of the measurements was approximately 6, 3, 2 and 2% for Cl, N, P and S respectively. The preparation of blood samples for direct analysis by HR-CS GFAAS called Dried Blood Spot (DBS) was evaluated as a strategy for direct and simultaneous determination of Fe and Zn. The alternative lines chosen were 446.165 nm and 307.572 nm (Fe) and 307.589 nm (Zn). The W permanent modifier extended the life of platforms and the addition of 3 µL of H_2O_2 (15 % v v^{-1}) solution promoted thermal stability and improved the profile of the transient absorption peak of Zn. The analytical curves (0.1 - 3 µg Fe; 0.5 - 50 ng Zn) used *Whatman* 903® paper discs impregnated with analyte solution. The results of nine of ten blood samples analyzed by the proposed method were in agreement with the comparative method at a 95 % confidence level. Measurement accuracy (RSD) was $\leq$ 10 % for both Fe and Zn. The LOQ obtained for Fe (446.16 nm), Fe (307.572 nm) and Zn (307.589 nm) were 67, 10.2 and 1.2 mg L^{-1}, respectively.

Keywords: LIBS, SD-LIBS, SD-SSC LIBS, Multi-energy calibration, DBS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos principais componentes de um sistema LIBS. **27**

Figura 2 - Esquema ilustrativo dos principais eventos decorrentes durante o tempo de vida do plasma produzido por um *laser* com regime temporal de ns. **28**

Figura 3 - Esquema ilustrativo sobre a evolução temporal do plasma e as regiões de predominância das emissões relacionadas ao contínuo, átomos no estado fundamental e moléculas. **29**

Figura 4 - Esquema ilustrativo dos componentes utilizados em um sistema SD-LIBS. **34**

Figura 5 - Configurações SD-LIBS utilizadas para a análise de (a) amostras condutoras ou não condutoras e (b) amostras condutoras. **34**

Figura 6 - Esquema ilustrativo dos principais componentes utilizados em um espectrômetro de absorção atômica. **41**

Figura 7 - Ilustração esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) com ênfase nos seus principais componentes. **44**

Figura 8 - Esquemas ilustrativos (a) entre as diferenças nas possibilidades de absorção de átomos e moléculas e (b) das transições vibracionais e (c) rotacionais características de moléculas diatômicas. **46**

Figura 9 - Denominação dos termos espectroscópicos utilizados para moléculas diatômicas. **48**

Figura 10 - Processo envolvendo DBS, da coleta até o laboratório. **49**

Figura 11 - Fotografia do sistema LIBS, (a) fonte do laser, (b) laser Nd:YAG de energia máxima de 50 mJ, (c) câmara de ablação e (d) espectrômetros HR2000+. **58**

Figura 12 - Circuito gerador de alta tensão: (a) diagrama do circuito eletrônico; fotografias das vistas (b) frontal e (c) interior do equipamento. **59**

Figura 13 - Equipamento SD-LIBS: (a) ilustração da configuração experimental e (b) fotografia dos eletrodos, amostra e porta-amostra. **60**

Figura 14 - Fotografias da câmara de amostragem na parte superior e dos eletrodos na parte inferior. As fotos em (a), (b) e (c) correspondem ao sistema SD-LIBS desligado, LIBS em operação e SD-LIBS em operação, respectivamente. **62**

Figura 15 - Espectros LIBS (—) e SD-LIBS (—) obtidos para a amostra 04-14-08 e o espectro SD-LIBS (—) obtido do branco analítico. Os espectros obtidos por SD-LIBS empregaram 4,5 kV. **63**

Figura 16 - Espectro do material de referência certificado (*San Joaquim soil* NIST 2709a) (—) e da amostra 04-14-08 (—) obtidos por SD-LIBS empregando 4,5 kV. **65**

Figura 17 - Intensidade de emissão da linha P (I) 214,9 nm (n = 3) em função da tensão aplicada entre os eletrodos. **66**

Figura 18 - Intensidade da linha de emissão P (I) 214,9 nm (*n* = 3) em função da distância das pontas dos eletrodos empregando a tensão de 4,5 kV. **67**

Figura 19 - Curva de calibração (*n* = 3) obtida por SD-LIBS (4,5 kV) empregando a linha P (I) 214,9 nm para determinação de P_2O_5 em fertilizantes. **69**

Figura 20 - Ilustração de curvas de intensidade versus tensão obtidas para (a) padrão único de calibração, (b) amostra e (c) sobreposição das áreas em ambos os gráficos. **78**

Figura 21 - Perfis dos picos obtidos com LIBS (—) e SD-LIBS (4,5 kV) (—) para (a) P no CRM NIST 120c e (b) Al no CRM NIST 1515. ..... **81**

Figura 22 - Curvas de tensão *versus* intensidade (*n* = 3) para (a) Al (I) 308,2 nm em CRMs de folhas de plantas e (b) P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c e nas amostras. **82**

Figura 23 - Influência do número de espectros nas intensidades médias para (○) a linha de emissão Al (I) 308,2 nm no CRM NIST 1515 e para (●) a linha de emissão P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c obtidas por SD-LIBS empregando 4,5 kV. **84**

Figura 24 - Espectro de absorção molecular obtido por HR-CS GFMAS para a molécula de CaCl (a) e por HR-CS FMAS para as moléculas de NO (b), PO (c) e CS (d) para o branco e as soluções S1 e S2. ..... **95**

Figura 25 - Influência da massa (a) do Ca e (b) do Pd nos sinais de absorbância para a molécula de CaCl determinada por HR-CS GFMAS **97**

Figura 26 - Curvas de pirólise (triângulos) e vaporização (círculos) (a) para amostras de suspensão de leite em pó (NIST-1549, contendo 500 ng Cl) na ausência (—) e presença (—) de Pd e (b) perfis dos pico transientes para a molécula de CaCl sob as mesmas condições. **97**

Figura 27 - Curvas de calibração para PO, NO, CS e CaCl obtidas via MEC sem (à esquerda) e após (à direita) a remoção de *outliers*. **101**

Figura 28 - Efeito da concentração de Ca na determinação de 1000 mg L^{-1} de P utilizando MEC e calibração externa (EC). **103**

Figura 29 - Fotografias do tubo contendo a amostra de sangue (a) e do DBS produzido com papel *Whatman* 903® (b). **108**

Figura 30 - Fotografias de 50 µL de sangue depositado no papel (a), DBS após a retirada de 7 discos menores (b) e destaque de um disco sobre régua (c). **111**

Figura 31 - Correlação entre volume de sangue depositado e área do DBS (*n* = 3) calculada pelo *software ImageJ*. **113**

Figura 32 - Plataforma de grafite contendo discos de DBS antes (a) e depois (b) de um ciclo completo de aquecimento. **115**

Figura 33 - Curvas de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) em meio aquoso (—) e em amostra (—). **116**

Figura 34 - Espectro de absorção resolvido no tempo e comprimento de onda para o Fe na linha 446,165 nm. **116**

Figura 35 - Curvas de temperatura de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) referentes a 20 ng Zn em padrão aquoso sobre papel (—) e em amostra de DBS (—). **117**

Figura 36 - Efeito da presença de Pd/Mg (2,5 µg de Pd e 1,25 µg de Mg) e H_2O_2 (3 µL de solução 15 %, v v^{-1}) em uma amostra de DBS e em um padrão aquoso sobre papel (20 ng Zn). **118**

Figura 37 - Curvas de temperatura de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) para Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm em meio de uma amostra de DBS (—) e em solução aquosa contendo 20 ng Zn e 2 µg Fe (—). Modificador: 3 µL de solução 15% v v^{-1} H_2O_2. ..... **119**

Figura 38 - Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo e comprimento de onda do Zn e do Fe presentes em uma amostra de DBS empregando H_2O_2 como modificador químico. **120**

Figura 39 - Massas de Fe e Zn determinadas em diferentes partes (A, B, C e D) de um DBS obtido após adição de 200 µL e 50 µL de sangue. **121**

Figura 40 - Curvas de calibração para (a) Fe-446,165 nm, (b) Fe-307,572 nm e (c) Zn-307,589 nm obtidas com padrão aquoso depositado sobre papel empregando SS HR-CS GFAAS. **123**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de aumento de sensibilidade em LIBS empregando modificações instrumentais **31**

Tabela 2 - Determinações elementares empregando DBS. **51**

Tabela 3 - Massas de CRM NIST 120c e da matriz empregadas na produção dos padrões sólidos utilizados para determinar P por SD-LIBS **57**

Tabela 4 - Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de P_2O_5 ..... **61**

Tabela 5 - Resultados da determinação (média ± SD, *n* = 3) de P expressos como % (m m^{-1}) P_2O_5 nas amostras e no CRM NIST 120c obtidas por SD-LIBS e HR-CS FAAS **70**

Tabela 6 - Resultados comparativos (média ± desvio padrão) para a determinação (*n* = 3) de P (expresso como % m m^{-1} P_2O_5) em amostras de fertilizantes e de Al (mg kg^{-1}) em CRM de folhas de plantas obtidas por SD-SSC LIBS, SRC e MLC **84**

Tabela 7 - Condições operacionais utilizadas nas determinações de Cl por HR-CS GFMAS e N, S e P por HR-CS FMAS **93**

Tabela 8 - Resultados (média ± desvio padrão, *n* = 3) das recuperações obtidas de Cl em leite por HR-CS GFMAS, e de N, P e S e insumos por HR-CS FMAS, utilizando MEC e calibração externa (EC) **98**

Tabela 9 - Determinações (*n* = 3, média ± desvio padrão, % m m^{-1}) por MEC e calibração externa (EC) para a determinação de Cl por HR-CS GF MAS e N, P (expresso como P_2O_5) e S por HR-CS FMAS **99**

Tabela 10 - Parâmetros instrumentais da HR-CS FAAS utilizados para determinar Fe e Zn simultâneo **110**

Tabela 11 - Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da plataforma de grafite com W como modificador permanente **111**

Tabela 12 - Programas de aquecimento otimizados para a determinação de apenas Fe (446,165 nm) e de Fe (307,572 nm) em conjunto com Zn (307,589 nm) em DBS por SS HR-CS GFAAS **111**

Tabela 13 - Resultados comparativos (média ± sd, *n* = 3) da determinação de Fe e Zn em DBS (mg L^{-1}) pelo método proposto (SS HR-CS GFAAS) e pelo método comparativo (HR-CS FAAS) **123**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS	A*tomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica
CCD	*Charge coupled device*, dispositivo de carga acoplada
CF-LIBS	*Calibration-free* LIBS, LIBS sem calibração
ChemCam	*Chemical camera*
CRM	*Certified reference material*, material de referência certificado
CS	*Continuum source*, Fonte contínua
DBS	*Dried blood spot*, Sangue seco em papel
DDS	*Direct solid sampling*, Análise direta de sólidos
DEMON	*Double-Echelle Monochromator*, monocromador echelle duplo.
DP-LIBS	LIBS *double pulse*, LIBS duplo pulso
F	Farad, unidade de capacitância
FAAS	*Flame atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica em chama
FWHM	*Full width at half maximum*, Largura à meia altura
GC-CVAFS	*Gas chromatography coupled to cold-vapour atomic fluorescence spectrometry*, Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de fluorescência atômica a vapor frio
GFAAS	*Graphite furnace atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
HCL	*Hollow cathode lamp*, Lâmpada de cátodo oco
HR-CS FAAS	*High-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, Espectrometria de absorção atômica em chama com fonte contínua e alta resolução
HR-CS GFAAS	*High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Espectrometria de absorção atômica em chama com fonte contínua e alta resolução
HR-CS MAS	*High-resolution continuum source molecule absorption spectrometry*, Espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução
Hz	Hertz, unidade de medida da frequência
ICP OES	*Inductively coupled plasma optical emisson spectrometry*, Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido
ICP-MS	*Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Espectrometria de massa acoplada ao plasma induzido
IS	*Internal standardization*, Padronização interna
kV	Kilovolts
LA-ICP-MS	*Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*, Ablação a *laser* com espectrometria de massa acoplada ao plasma induzido
LA-ICP-TOF-MS	*Laser ablation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry*, Ablação a *laser* com espectrometria de massas por tempo de voo acoplada ao plasma induzido
Laser	*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação

LIBS	*Laser-induced breakdown spectrometry*, Espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por *laser*
LIFS	*Laser induced fluorescence spectrometry*, Espectrometria de fluorescência induzida por *laser*
LOD	*Limit of detection*, Limite de detecção
LOQ	*Limit of quantification*, Limite de quantificação
LSBC	*Least square background correction*, Correção de fundo por mínimos quadrados.
m m^{-1}	Massa por massa
MAS	*Molecular atomic spectrometry*, espectrometria de absorção molecular
MEC	*Multi-energy calibration*, Calibração com múltiplas energias
MLC	*Multi-lines calibration*, Calibração com múltiplas linhas
MMC	*Matriz-matching calibration*, Calibração com compatibilização de matriz
MS	*Mass spectrometry*, espectrometria de massas
Nd:YAG	Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet, Íon Nd^{+3} incorporado no cristal de YAG - granada de ítrio e alumínio, $Y_3Al_5O_{12}$
NIST	*National Institute of Standards and Technology*, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
OP GSA	*One point gravimetric standard addition*
r	Coeficiente de correlação linear
R^2	Coeficiente de determinação
RELIBS	*Resonance-enhanced* LIBS, LIBS ressonante
RSC	*Slope ratio calibration*, Calibração por razão das inclinações
RSD	*Relative* s*tandard deviation*, desvio padrão relativo
S/R	Razão sinal ruído
SA	*Standard addition*, Adição de padrão
SD-LIBS	*Spark discharge laser-induced breakdown spectrometry*, Descarga elétrica acoplada a espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por *laser*
SD-SSD LIBS	*Spark-discharge assisted single standard calibration*, Calibração com padrão único assistida por descarga elétrica
SIMAAC	*Simultaneous multielement atomic absorption continuum source spectrometer*, Espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua multielementar simultâneo
STPF	*Stabilized Temperature Platform Furnace*, forno plataforma com temperatura estabilizada
TPCT	*Two-point calibration transfer*
UV	Ultravioleta
v v^{-1}	Volume por volume
VIS	Visível
λ	Comprimento de onda
Ω	Ohm, unidade de medida da resistência elétrica

SUMÁRIO

1. Introdução 21

2. Revisão bibliográfica 24

2.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser 24

2.1.1. Histórico **24**
2.1.2. Fundamentos **26**
2.1.3. Estratégias de aumento de sensibilidade **30**
2.1.3.1. LIBS com descarga elétrica **33**
2.1.4. Calibração em LIBS para análise de amostras sólidas **37**

2.2. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua 40

2.2.1. Histórico **40**
2.2.2. Instrumentação **43**
2.2.3. Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua **45**
2.2.4. Análise direta de DBS para determinação elementar **48**

3. Objetivos 53

3.1. Objetivos específicos 53

4. Descarga elétrica como estratégia de aumento de sensibilidade em LIBS: determinação de fósforo em fertilizantes 54

4.1. Introdução 55

4.2. Materiais e métodos 56

4.2.1. Reagentes, preparo de amostras e padrões analíticos **56**
4.2.2. Instrumentação em LIBS **57**
4.2.2.1. Sistema SD-LIBS **58**
4.2.3. Análise das amostras por SD-LIBS **60**
4.2.4. Método comparativo para a determinação de fósforo em fertilizante **61**
4.2.4.1. Digestões ácidas assistida por radiação micro-ondas **61**
4.2.4.2. Determinação de P por HR-CS FAAS **61**

4.3. Resultados e discussão 61

4.3.1. Escolha da linha de emissão de fósforo **63**
4.3.2. Otimização do sistema SD-LIBS **65**
4.3.2.1. Estudo sobre a tensão aplicada **65**
4.3.2.2. Otimização do posicionamento dos eletrodos **66**
4.3.3. Determinação de P por SD-LIBS **68**

4.4. Conclusões parciais 70

5. Calibração com padrão único assistida por descarga elétrica em LIBS: determinação de Al e P em amostras agroindustriais 72

5.1. Introdução **..... 73**

5.2. Materiais e métodos **..... 75**

5.2.1. Instrumentação **75**
5.2.2. Reagentes e amostras **75**
5.2.3. Preparo de amostra e procedimentos analíticos **76**
5.2.4. Fundamentação da metodologia SD-SSC LIBS **77**
5.2.5. Estratégias comparativas de calibração com único padrão **79**

5.3. Resultados e discussão **..... 80**

5.3.1. Escolha das linhas analíticas para determinação de Al e P **80**
5.3.2. Influência da tensão na intensidade de emissão **82**
5.3.3. Influência do número de espectros por replicata **83**
5.3.4. Determinação de Al e P com métodos de calibração com padrão único **83**

5.4. Conclusões parciais **..... 87**

6. Calibração multi-energética para a determinação de não-metais por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução 88

6.1. Introdução **..... 89**

6.2. Materiais e métodos **..... 90**

6.2.1. Instrumentação **90**
6.2.2. Reagentes **91**
6.2.3. Amostras e procedimentos analíticos **91**

6.3. Resultados e discussão **..... 94**

6.3.1. Otimização das condições experimentais **95**
6.3.2. MEC: desempenho analítico **98**

6.4. Conclusões parciais **..... 103**

7. Determinação direta e simultânea de Fe e Zn em sangue por HR-CS GFAAS empregando DBS 105

7.1. Introdução **..... 106**

7.2. Materiais e métodos **..... 108**

7.2.1. Reagentes, soluções e amostras **108**
7.2.2. Instrumentação **109**
7.2.3. Procedimento de determinação de Fe e Zn em DBS **110**
7.2.3.1. Determinação de Fe e Zn pelo método comparativo 112

7.3. Resultados e discussão **..... 112**

7.3.1. Procedimento de amostragem e escolha da linha analítica **112**

7.3.1.1. Cálculo do volume de sangue nos discos removidos para análise **113**
7.3.1.2. Escolha das linhas analíticas para determinações de Fe e Zn **114**
7.3.2. Programa de aquecimento nas determinações de Fe e Zn **114**
7.3.3. Distribuição de Fe e Zn no DBS **120**
7.3.4. Determinação de Fe e Zn em DBS por HR-CS GFAAS **122**
7.4. Conclusões parciais **124**
8. Conclusões **125**
Referências **127**

1. Introdução

A química analítica tem por missão propor os meios para a determinação de uma ou mais espécies químicas em diferentes materiais. De um modo geral, ela desempenha o papel de aprimorar os métodos analíticos estabelecidos, aplicá-los para novos tipos de amostras e desenvolver novos métodos mais robustos e eficientes (1). O químico analítico desempenha um papel que consiste em uma tarefa interminável, não podendo haver vitória final, embora haja muitos sucessos e triunfos ao longo do caminho (2). Por conseguinte, a química analítica é demandada por necessidade crescente de procedimentos analíticos quantitativos que sejam rápidos, exatos, precisos, com pouco ou nenhum consumo de reagentes, com mínimo ou nenhum preparo de amostra, e que não sejam dispendiosos.

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser, conhecida como *Laser Induced Breakdown Spectroscopy* (LIBS), é uma técnica espectroquímica que se destaca por promover análise multielementar direta ou com mínimo preparo da amostra, possuir instrumentação versátil para análise de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, de forma rápida, minimamente destrutiva e com mínima geração de resíduos, permitir aplicações em ambientes laboratoriais, remotos e insalubres (3–5). Portanto, LIBS desempenha um papel importante na área da química analítica, contribuindo com diversas aplicações em que outras técnicas espectroanalíticas consolidadas não são capazes de atingir. Em contrapartida, LIBS contém uma limitação relacionada a baixa sensibilidade, quando comparada a outras técnicas espectroanalíticas (6–8). Além do mais, a análise quantitativa de amostras sólidas, apesar de vantajosa em vários aspectos, tem como limitação a calibração com padrões sólidos, por conta da disponibilidade restrita de material de referência ou padrões sólidos para diferentes matrizes e vários analitos em diferentes concentrações.

Assim como LIBS, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, conhecida como *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry* (HR-CS AAS) é uma técnica com importante presença em química analítica. Entre as suas principais características estão (i) alta resolução obtida pelo arranjo óptico e detector CCD, (ii) fonte contínua de alta intensidade de emissão que possibilita determinações entre 190 nm a 900 nm, (iii) corretor de fundo espectral através do algoritmo de mínimos quadrados, LSBC, (iv) monitoramento dos sinais de absorção em três dimensões, absorbância x comprimento de onda x tempo; (v) amostragem direta de sólidos combinada com atomização eletrotérmica em forno de grafite (HR-CS GFAAS) (9,10). Diferentemente dos equipamentos de absorção atômica convencionais, a HR-CS AAS tornou-se possível a

separação e visualização das diversas linhas rotacionais de moléculas diatômicas tipicamente separadas por apenas 10 a 25 pm (9,11). Neste momento, as linhas de absorção rotacionais passaram a ser utilizadas para fins analíticos e não tratadas como interferências espectrais. Embora várias linhas de absorção molecular estejam disponíveis para fins quantitativos, a maioria dos trabalhos publicados utiliza calibração externa convencional, ou seja, fixa-se um comprimento de onda e mede-se a absorbância de uma série de soluções contendo diferentes concentrações do analito. A calibração externa, como mencionada, é simples, de fácil interpretação e amplamente utilizada. Por outro lado, está sujeita a interferências causadas por efeitos de matriz (*i.e.*, diferenças nas propriedades físicas e químicas entre os padrões de calibração e a amostra) e interferências espectrais (12). Nesse contexto, estudos relativos a novos métodos de calibração apresentam-se como promissores.

A análise direta de amostras sólidas, conhecida como *Direct Solid Sampling* (DSS), associada a HR-CS GFAAS constitui outra vantagem relevante que merece destaque porque requer o mínimo preparo da amostra, podendo até dispensar o preparo convencional da amostra, evitando etapas morosas, reagentes tóxicos e possibilidade de contaminação (13). Esta estratégia tem sido utilizada para análise de sangue seco impregnado em papel filtro especial (DBS), principalmente para a determinação de Pb (14,15). A estratégia DBS é muito promissora para análise de sangue, visto que a amostragem é minimamente invasiva, a qual utiliza apenas alguns microlitros de sangue depositados em papel, que por sua vez permite a coleta em locais remotos sem a necessidade de refrigeração, simplificando o transporte até o local de análise (16). Por conseguinte, a utilização de DBS em HR-CS GFAAS é promissora para determinação de não apenas de elementos tóxicos, mas também no âmbito de elementos essenciais.

Esta Tese de Doutorado descreve o desenvolvimento de quatro estratégias analíticas empregando LIBS e HR-CS AAS que estão divididas e apresentadas em capítulos singulares. Uma síntese de cada estratégia estudada está apresentada a seguir.

Um circuito de descarga elétrica, conhecido como *Spark-Discharge* (SD) de alta tensão foi projetado para ser acoplado ao sistema LIBS como estratégia de aumento de sensibilidade na determinação de fósforo em fertilizantes. Neste trabalho é abordado (i) o desenvolvimento de um circuito elétrico para produção de alta tensão, o qual foi conectado a dois eletrodos de tungstênio, (ii) o estudo sobre as melhores linhas de emissão para a determinação de P, (iii) a otimização da tensão aplicada, e (iv) a otimização da posição dos eletrodos. As amostras foram moídas, secas e compactadas na forma de pastilhas para posterior determinação com o sistema SD-LIBS desenvolvido. O LIBS convencional não

forneceu intensidade de emissão suficiente para as determinações de P. Os resultados obtidos demonstram que a estratégia SD-LIBS é simples, de baixo custo e robusta para aumento de sensibilidade em LIBS, bem como para a determinação de P e fertilizantes comerciais.

O sistema SD-LIBS foi utilizado no desenvolvimento de um novo método de calibração com padrão único, conhecida como *Single Standard Calibration* (SSC). Considerando que o aumento da tensão aplicada entre os eletrodos aumenta a intensidade de emissão, o método se fundamenta na medida da intensidade de emissão (I) do padrão (C^{std}) e da amostra ($C^{amostra}$) a duas voltagens diferentes, de modo que $C^{amostra} = C^{std}(\Delta I^{amostra}/\Delta I^{std})$. O método desenvolvido foi aplicado como prova de conceito para as determinações de Al em amostras de folhas e P em amostras de fertilizantes. Neste trabalho faz-se um estudo comparativo entre o método proposto e outras estratégias de calibração com padrão único recentemente propostas na literatura, como a calibração baseada na razão das inclinações, conhecida como *Slope Ratio Calibration* (SRC) e a calibração multilinhas, conhecida como *Multi Lines Calibration* (MLC). Os resultados obtidos com o método proposto realçam que a estratégia SD-SSC LIBS tem potencial analítico duplo por contornar as limitações relativas a sensibilidade e calibração com padrões sólidos.

Outra abordagem da calibração multilinhas denominada calibração multi-energética, conhecida por *Multi-Energy Calibration* (MEC), foi estudada para a determinação de não metais por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua, conhecida como *High-Resolution Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry* (HR-CS MAS). O capítulo em questão aborda uma nova estratégia de calibração aplicada a determinação não metais utilizando diversas linhas de absorção rotacionais de moléculas diatômicas, as quais são registradas simultaneamente na estreita janela espectral do espectrômetro. Os elementos Cl, N, P e S foram determinados via CaCl, NO, PO e CS, respectivamente. A estratégia MEC utiliza várias linhas de absorção do analito para a calibração, analisando apenas duas soluções, uma contendo uma mistura de amostra e padrão, e outra solução contendo amostra e branco. Neste trabalho foi abordada a possibilidade de MEC corrigir interferências espectrais e não espectrais. Os resultados corroboram que a estratégia MEC é promissora para a determinação de não metais por HR-CS MAS.

A coleta e armazenamento de amostras de sangue em papel cartão, conhecida como *Dried Blood Spot* (DBS) foi avaliada como estratégia para a determinação direta e simultânea de Fe e Zn em sangue empregando DSS HR-CS GFAAS. O procedimento de amostragem DBS é simples e minimamente invasivo no que se refere a coleta do sangue. As amostras em DBS foram introduzidas via amostrador de sólidos do equipamento HR-CS GFAAS. A

detecção e determinação conjunta, simultânea dos elementos Fe e Zn nas linhas de absorção 307,572 nm e 307,589 nm, respectivamente, por HR-CS GFAAS é tratada pela primeira vez na literatura. Um estudo sistemático a respeito da influência do volume depositado de sangue, dos efeitos de migração diferencial (área do DBS escolhida) foi feito e seus resultados sugerem boa correlação entre volume de sangue e área do DBS, o que facilita expressar a concentração dos analitos em mg por litro.

2. Revisão bibliográfica

Considerando os quatro trabalhos que motivaram o desenvolvimento desta Tese de Doutorado, nesta revisão bibliográfica são abordados contextos históricos e fundamentais para as técnicas LIBS e HR-CS AAS. Com relação a primeira, a revisão ainda engloba estratégias de aumento de sensibilidade e de calibração. A respeito da HR-CS AAS, a revisão bibliográfica abrange uma contextualização sobre absorção molecular por espécies diatômicas, bem como uma revisão sobre DBS em determinações elementares.

2.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser

2.1.1. Histórico

A técnica LIBS utiliza um pulso de laser focalizado sobre a superfície da amostra para promover a vaporização, atomização e excitação dos elementos constituintes. Os fundamentos da LIBS remontam nos estudos da emissão estimulada proposta por Einstein em 1917. Entretanto, devido à falta de recursos tecnológicos da época, o primeiro dispositivo de amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, conhecido como *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (*Laser*), foi produzido apenas em 1960 por Theodore Maiman (17).

Posteriormente, em 1962 no X Colóquio Internacional de Espectroscopia em Maryland, Brech e Cross (18) apresentaram um trabalho com o uso de um plasma produzido por um laser de rubi como fonte espectral. Neste trabalho, uma descarga elétrica produzida entre dois eletrodos de cobre conectados a um capacitor carregado foi utilizada como fonte auxiliar de excitação para registrar o espectro do ferro de uma lâmina de barbear (19). Este

fato é considerado como o “nascimento” da técnica LIBS (20). Apesar de Brech e Cross não terem publicado o trabalho em um periódico científico, o resumo apresentado em Maryland está disponível no periódico *Applied Spectroscopy* (21). Nos anos subsequentes, vários avanços significativos foram alcançados.

Em 1963, Debras-Guédon e Liodec (22) relataram o primeiro uso de laser para análise espectroscópica de superfície. No mesmo ano, Rosan, Healy e McNary (23) utilizaram um laser de rubi e dois eletrodos de grafite para fazer a análise simultânea de Be, Ca, Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos biológicos de camundongos. Em 1964, Maker *et al.*, (24) fizeram a primeira observação óptica de um gás utilizando *laser*. Um ano mais tarde, Runge *et al.*, (25) propuseram a primeira aplicação de um *laser* de rubi pulsado, sem o uso de outra fonte de excitação, para a análise Cr e Ni em liga de ferro. Curvas de calibração linear para Cr e Ni foram obtidas com precisão de 3,8 e 5,3 %, respectivamente.

De 1964 a 1967, os equipamentos LIBS mais notáveis comercializados foram Jarrell-Ash (Estados Unidos da América), VEB Carl Zeiss (Alemanha) e JEOL (Japão). Estes equipamentos empregavam um *laser* para vaporização da amostra e dois eletrodos para excitação dos elementos vaporizados (4,19). Contudo, o alto custo desses equipamentos, a dificuldade de competir em precisão com espectroscopia de centelha e a ascensão de outras técnicas espectroanalíticas (*e.g.*, GFAAS e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP OES)), levaram a um declínio no entusiasmo da LIBS até o final da década de 70 (26). De certa forma, até o início da década de 80, LIBS foi tratada mais como uma curiosidade científica, e a literatura se dedicava mais a estudos teóricos sobre plasmas e *lasers* do que aplicações analíticas (3).

Em 1971, Ready (27) publicou a primeira monografia abrangente com o foco em estudos experimentais e teóricos da LIBS. Entre 1960 e 1980, na Rússia houve muitos estudos teóricos importantes sobre plasma e *laser*, o que levou o pesquisador Raizer a fazer uma compilação destes principais estudos em seu livro *Laser-Induced Discharge Phenomena*, publicado em inglês em 1977 (4,28).

A partir de 1980, as aplicações empregando a técnica LIBS passaram a caminhar alinhadas com o desenvolvimento instrumental (26). Em 1989 Radziemski e Cremers (29) editaram o livro *Laser Induced Plasmas and Applications*, no qual condensaram os aspectos físicos, químicos e as aplicações relevantes até o final da década de 80.

No início da década de 90, os avanços tecnológicos relativos a *lasers* mais compactos, robustos e de menor custo, assim como detectores mais sensíveis, com maior resolução espectral e temporal (20,30), proporcionaram aplicações envolvendo a interrogação

da amostra de forma remota, *in situ*, com mínimo ou nenhum preparo, com rapidez e simplicidade, permitindo aplicações antes inconcebíveis por outras técnicas espectroanalíticas.

No início da década de 2000, Lazic *et al.*, (31) propuseram a aplicação da LIBS para análise de amostras submersas em água do mar, sendo empregado um LIBS de duplo pulso para exploração arqueológica *in situ*. Esses autores demonstraram a possibilidade de diferenciar amostras de mármore e de rocha calcária, bem como a análise quantitativa de Cu, Pb, Sn, e Zn em ligas metálicas. Em seguida, Guirado *et al.*, (32) desenvolveram um equipamento LIBS portátil para reconhecimento e identificação de materiais arqueológicos submersos até 30 metros de profundidade em água do mar. Os resultados deste trabalho demonstraram a capacidade da LIBS para análise *in situ* de amostras de bronze com alto grau de oxidação no mar mediterrâneo.

Em 2004, a LIBS foi proposta para o desenvolvimento da *ChemCam* para ser incorporada ao *Rover Curiosity* (33), o qual foi enviado a Marte em 2012 para analisar rochas no solo da cratera de Gale em Marte (5,33,34). Vários espectros de emissão foram enviados a Terra, evidenciando a versatilidade e potencialidade da LIBS para exploração espacial. Talvez esta seja a aplicação mais popular para a LIBS até o momento.

Neste ponto, considerando o sucesso da LIBS em diversas aplicações geológicas, arqueológicas, exploração espacial, entre outras, fica evidente que esta técnica espectroanalítica constitui uma ferramenta analítica importante, principalmente em relação a análise de amostras sólidas, evitando etapas morosas de preparo antes da análise propriamente dita. Portanto, LIBS é uma das técnicas mais promissoras em química analítica qualitativa e quantitativa.

2.1.2. Fundamentos

A LIBS se baseia na espectrometria de emissão óptica, a qual faz a observação da radiação emitida por espécies excitadas em um plasma com temperaturas da ordem de 10000 a 20000 K (3,30,35). Os componentes primordiais desta técnica são: *laser*, controlador do *laser*, lentes de focalização do *laser*, lentes coletoras da radiação emitida pelas espécies excitadas no plasma, cabo de fibra óptica para condução da radiação emitida, espectrômetro para separação dos comprimentos de onda, detector e computador para registro dos espectros de emissão. Um esquema ilustrativo de um sistema LIBS está apresentado na Figura 1. Cabe

informar que, cada sistema LIBS contém suas peculiaridades, a depender da aplicação desejada.

Com relação a instrumentação apresentada, o *laser* é a parte mais importante, visto ser fundamental para promover a ruptura dielétrica das ligações químicas da amostra e formação do respectivo plasma. Neste sentido, há pulsos de *laser* com alta irradiância, da ordem de GW cm^{-2}, e regime temporal entre nano, pico ou femtossegundos (3,30,36).

Embora haja diversos tipos de *lasers* para uso em LIBS, tais como os *lasers* de excímeros (*i.e.* ArF, KrF e XeCl), microchip, N_2, CO_2, Ti:Safira e Nd:YAG (íon Nd^{+3} incorporado no cristal de YAG - granada de ítrio e alumínio, $Y_3Al_5O_{12}$). Em parte, Nd:YAG é o mais comum para aplicações em LIBS, por apresentar características atrativas, tais como: (i) ser compacto, (ii) dispor de alta densidade de energia (>1 J), (iii) possuir baixas flutuações na energia do pulso, (iv) simplicidade operacional, e (v) o comprimento de onda fundamental em 1064 nm que pode ser facilmente alterado por dobradores harmônicos para 532 nm, 355 nm, 266 nm (4). Embora haja evidências de vários benefícios de se utilizar pulsos de *laser* da ordem de femtossegundos (37), até o momento o *laser* de Nd:YAG com regime temporal da ordem de 4 a 15 nanosegundos (ns) é o mais utilizado na literatura (36).

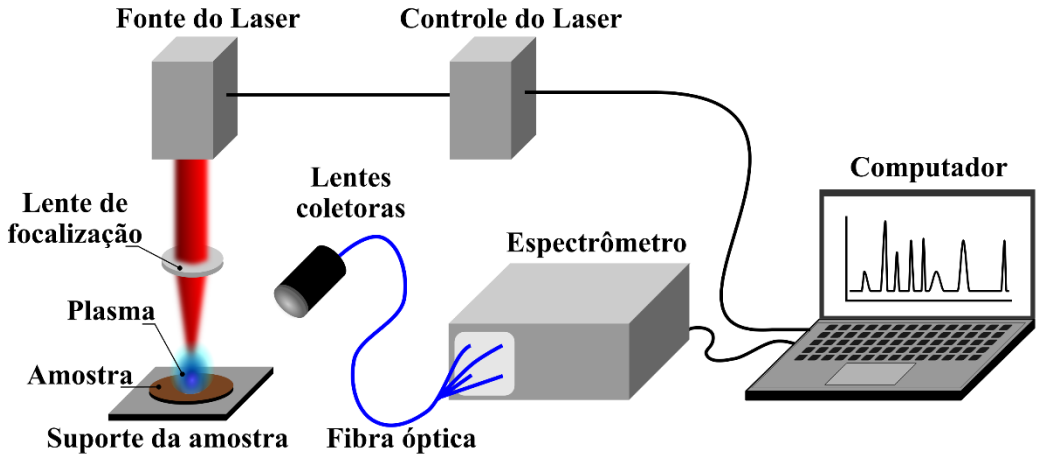

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos principais componentes de um sistema LIBS.

Fonte: Autor

De um modo geral, os processos envolvendo a formação do plasma por um pulso de *laser* de regime temporal da ordem de ns podem ser descritos nas seguintes etapas:

(i) Absorção do pulso de *laser* pela superfície da amostra, provocando um aumento súbito de temperatura (*ca*. 10000 K em apenas ~10^{-13} s), promovendo a vaporização de uma pequena quantidade de amostra e ejeção de elétrons livres (38).

(ii) Os elétrons livres adquirem energia cinética pela interação com a radiação eletromagnética do pulso do *laser* (*Bremsstrahlung* inverso), os quais colidem com os elétrons das ligações químicas da amostra, causando ionização, liberando mais elétrons livres, gerando uma reação em cascata (avalanche de elétrons).

(iii) Expansão rápida do plasma, produzindo ondas de choque e forte emissão de radiação de ampla faixa espectral ("luz branca do plasma"), processo relacionado com a emissão de fótons pela mudança da trajetória dos elétrons do plasma (*Bremsstrahlung*) (38,39).

(iv) Resfriamento até a extinção o plasma (restando a cratera produzida pelo *laser*).

Para fins didáticos, os processos envolvidos desde a formação até a extinção do plasma estão ilustrados na Figura 2.

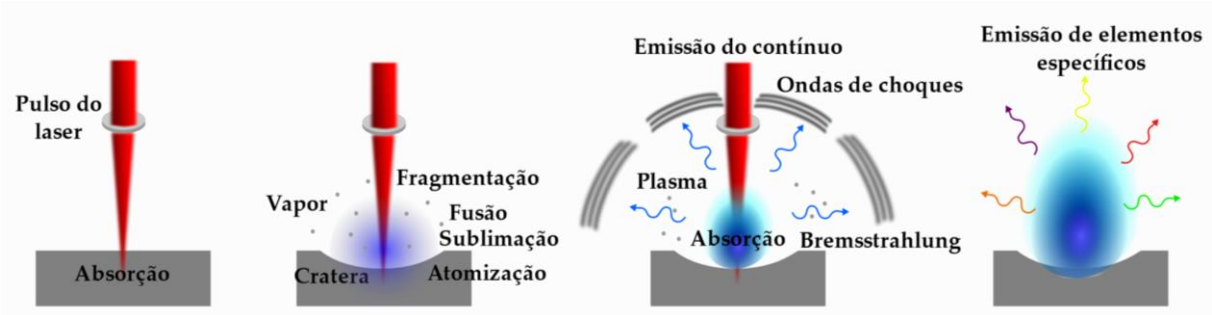

Figura 2 - Esquema ilustrativo dos principais eventos decorrentes durante o tempo de vida do plasma produzido por um *laser* com regime temporal de ns.

Fonte: Autor

Na evolução do plasma ilustrada acima, o espectro de emissão das espécies se altera em função do processo predominante em cada instante, e, portanto, o tempo após a incidência do *laser* é um parâmetro fundamental para o registro do espectro de emissão. Neste sentido, um esquema ilustrativo sobre a intensidade de emissão e a região de predominância das emissões de íons, átomos no estado fundamental e moléculas no plasma está apresentado na Figura 3. Após o pulso do *laser*, há forte emissão de uma "luz branca" proveniente da emissão do contínuo. Neste ponto ocorre a emissão de íons que pouco se distingue da emissão do contínuo, fornecendo pouca informação analítica. Com o decorrer do tempo a intensidade do

contínuo diminui, salientando as linhas de emissão de íons, átomos no estado fundamental e moléculas que são formadas por recombinação ou fragmentação parcial. Na Figura 3 é possível observar os parâmetros fundamentais para coleta dos espectros, sendo estes, (i) o tempo de atraso (início da incidência do *laser* até o momento do início da observação do plasma) e (ii) o tempo de integração (tempo de coleta da radiação do plasma pelo espectrômetro).

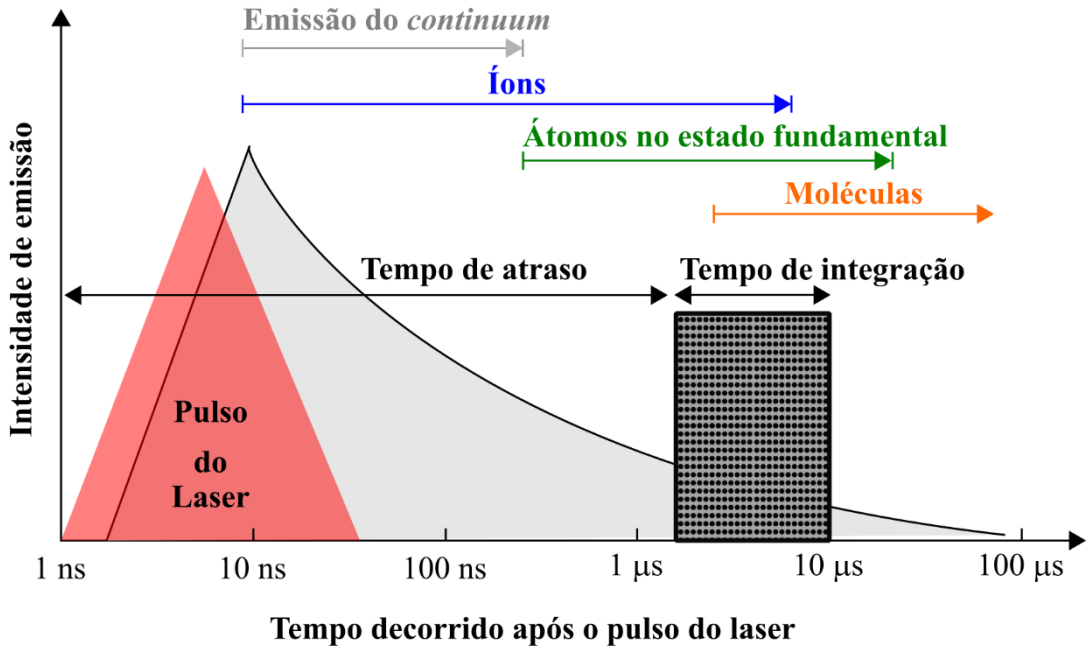

Figura 3 - Esquema ilustrativo sobre a evolução temporal do plasma e as regiões de predominância das emissões relacionadas ao contínuo, átomos no estado fundamental e moléculas.

Fonte: Adaptado de Miziolek, Palleschi e Schechter (3)

Com relação ao registro dos espectros de emissão, o sistema óptico é composto por um monocromador e um detector (30,36). Geralmente, os espectros LIBS são registrados entre 200 a 1000 nm, com resolução entre 0,003 a 0,1 nm e tempo de integração da ordem de microssegundos (µs). Desta forma, os espectrômetros Czerny-Turner, Paschen-Runge e rede Echelle, bem como os detectores de tubos fotomultiplicadores, matriz de fotodiodos, matriz de fotodiodos intensificado, dispositivo de carga acoplado (CCD) e CCD intensificado (ICCD) são os mais utilizados em equipamentos LIBS (30,36,39).

De modo geral, os fundamentos teóricos aliados com a instrumentação atual proporcionam características atrativas aos métodos de análise por LIBS, a saber:

(i) Análise multielementar direta ou com mínimo preparo da amostra, evitando etapas morosas, como a digestão ácida, a qual utiliza reagentes tóxicos, consome tempo e está propensa a contaminação.
(ii) Possui instrumentação versátil para aplicações em ambientes laboratoriais, remotos e insalubres.
(iii) Permite análise da amostra nos três estados (sólido, líquido e gasoso) da matéria.
(iv) Análise rápida e pontual, minimamente destrutiva e com mínima ou nenhuma geração de resíduos.

Com base nestas características, é notório que LIBS desempenha um papel importante para análises químicas, contribuindo com diversas aplicações em que outras técnicas espectroanalíticas consolidadas não são capazes de atingir. Além do mais, essa técnica está em ascensão, atrelada ao desenvolvimento tecnológico, o que torna uma técnica ainda mais promissora.

2.1.3. Estratégias de aumento de sensibilidade

Embora LIBS apresente vários pontos positivos, uma limitação frequentemente relatada na literatura refere-se ao fato de a sensibilidade e os limites de detecção (LOD) serem insuficientes quando comparados a outras técnicas espectroanalíticas já consolidadas (6–8). As principais razões para este fenômeno estão relacionadas com a flutuação da energia do *laser*, superfície irregular da amostra, efeitos de matriz, e a instabilidade e a influência da atmosfera que envolve o plasma (6). Uma das formas geralmente empregadas para melhorar as figuras de mérito em análises qualitativas e quantitativas está relacionada com o aprimoramento instrumental da LIBS.

Em relação às estratégias que utilizam modificações instrumentais para aumento de sensibilidade, as principais são o LIBS duplo-pulso (DP-LIBS), a espectrometria de fluorescência induzida por laser LIBS (LIBS-LIFS), LIBS ressonante (RELIB), confinamento espacial, confinamento magnético e SD-LIBS. De forma sucinta, as principais informações de cada uma destas estratégias estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de aumento de sensibilidade em LIBS empregando modificações instrumentais

Estratégia	Método	Instrumentação necessária	Pontos relevantes	Referência
DP-LIBS	- Dois pulsos de laser são sincronizados, o primeiro faz ablação e formação do plasma e o segundo reaquecer o plasma inicialmente formado	- Um *laser* adicional, ou um sofisticado arranjo óptico para dividir o feixe em dois e atrasar um feixe em relação ao outro - Geometrias dos feixes: geralmente ortogonal e colinear	- Aumento do custo - Complexidade instrumental	(7)
LIBS-LIFS	- Sobre o plasma é disparado um segundo pulso com comprimento de onda ajustado para estimular uma transição eletrônica específica do elemento de interesse	- Um *laser* adicional com comprimento de onda específico ao elemento de interesse	- Análise monoelementar - Aumento do custo - Complexidade instrumental	(6,8)
RELIBS	- Sobre o plasma é disparado um segundo pulso com comprimento de onda ajustado para estimular uma transição eletrônica específica do elemento majoritário da matriz	- Um *laser* adicional com comprimento de onda específico ao elemento da matriz	- Aumento do custo - Complexidade instrumental	(40)
Confinamento espacial LIBS	- O plasma é confinado a um pequeno espaço, limitado por cavidades cilíndrica ou hemisférica	- Cavidade cilíndrica ou hemisférica	- Baixo custo - Simplicidade instrumental	(41)
Confinamento magnético LIBS	- O plasma é gerado entre um campo magnético (~0,5 a 1,1 T) produzido por ímãs de Nd em ar atmosférico ou em câmara de vácuo	- Ímãs de neodímio (NdFeB) para produção do campo magnético	- Baixo custo - Simplicidade instrumental	(42)
SD-LIBS	- Uma descarga elétrica produzida durante o pulso do laser reaquece o plasma, aumentando a temperatura e densidade eletrônica do plasma. - Geralmente emprega-se voltagens > 2 kV	- Circuito de alta tensão com 1 eletrodo para amostras condutoras, e com 2 eletrodos para amostras condutoras ou não	- Baixo custo - Facilidade de acoplamento em qualquer sistema LIBS	(6,43)

A DP-LIBS baseia-se no reaquecimento do plasma por um segundo pulso do laser. O segundo pulso geralmente é disparado por outro *laser*, espaçados temporalmente por alguns microssegundos. Em outros casos, um arranjo óptico pode ser utilizado para divisão do pulso do *laser* em dois e espaçamento temporal entre eles. No qual o primeiro pulso a atingir a amostra provoca a ablação do material e o segundo reaquece o plasma anteriormente gerado. Há diversas configurações para o posicionamento dos feixes, contudo, geralmente as configurações em perpendicular e colinear são as mais utilizadas. Com esta estratégia os LOD geralmente são melhorados em até uma ordem de magnitude (8).

Lee *et al.*, (44) utilizaram DP-LIBS para a determinação de B e Li em soluções aquosas, e conseguiram LOD de 0,8 mg L^{-1} e 0,8 µg L^{-1}, respectivamente. Em relação ao B, uma melhora de duas ordens de magnitude no LOD foi obtida com base em outros trabalhos da literatura.

Yaroshchyk *et al.*, (45) compararam LIBS e DP-LIBS na determinação de 15 elementos em óleo de motor, sendo obtido geralmente uma melhora de duas vezes no LOD relativo ao DP-LIBS. Neste caso, os autores relatam que para esta aplicação é preferível utilizar apenas a LIBS, visto que a ligeira melhora no LOD não justifica o significativo aumento na complexidade da instrumentação requerida para a DP-LIBS. Portanto, a DP-LIBS necessita de uma instrumentação mais elaborada, acarretando inevitavelmente em aumento da complexidade e dos custos da LIBS em questão.

A LIBS-LIFS e a RELIBS utilizam dois pulsos de *laser* sucessivos, sendo o primeiro, utilizado para gerar o plasma da amostra, e o segundo, utilizado com o comprimento de onda específico para estimular uma transição eletrônica do elemento de interesse (*i.e.*, no caso da LIBS-LIFS) ou, para um elemento majoritário da matriz (*i.e.*, no caso da RELIBS). Com relação a LIBS-LIFS o sinal de fluorescência do analito é utilizado para estudos analíticos, e no caso da RELIBS, os átomos excitados com o segundo pulso transferem essa energia através de colisões com outros elementos no plasma, proporcionando um aumento no sinal de emissão.

Laville *et al.*, (8) determinaram Pb em ligas de latão utilizando LIBS-LIFS com acúmulo de 100 pulsos de *laser*. O LOD obtido foi de 0,2 mg kg^{-1} de Pb, correspondendo a um aumento de duas ordens de magnitude quando comparado com LIBS.

Goueguel *et al.*, (40) avaliaram o incremento de sinal obtido para Mg e Si em amostras de ligas de alumínio utilizando a RELIBS. O segundo pulso foi ajustado em 396,15 nm para excitar os átomos de Al. Com RELIBS o LOD para Mg e Si foi 5,7 e 2,5 vezes inferiores em relação aqueles obtidos com LIBS, respectivamente. Cabe destacar que, da

mesma forma que DP-LIBS, o uso de um *laser* adicional tem como consequência o aumento do custo e da complexidade instrumental.

A LIBS com confinamento espacial ou magnético são abordagens simples e econômicas para aumento da sensibilidade em LIBS. O confinamento espacial do plasma geralmente utiliza câmara cilíndrica ou hemisférica para confinamento do plasma. Wang *et al.*, (46) desenvolveram uma estrutura de politetrafluoretileno de forma a produzir uma cavidade cilíndrica, com altura de 1,5 mm e diâmetro de 3 mm, para confinamento do plasma gerado em amostras de carvão. Um aumento significativo na intensidade de emissão das linhas de C, bem como o aumento na repetibilidade entre os espectros foi observado.

Popov *et al.*, (47) usaram uma câmara cilíndrica de 4 mm de diâmetro equipada com parede de latão polido. Os LOD para micronutrientes, As e Hg em solos obtidos com esta estratégia foram de duas a cinco vezes menores que aqueles obtidos com LIBS convencional.

O confinamento magnético do plasma utiliza imãs para produção de um forte campo magnético na região de formação do plasma, que tem influência na densidade eletrônica e no volume do plasma, resultando em melhores condições de excitação das espécies emissoras. Liu *et al.*, (42) fizeram o estudo sobre a influência do campo magnético em diversas condições de pressão sobre a intensidade de emissão de Al e Li em liga metálica, os resultados demonstraram que a intensidade de emissão aumenta em função do aumento do campo magnético, possibilitando o incremento de sinal da ordem de 1,5 a 3 vezes para Al e Li.

A SD-LIBS utiliza um ou dois eletrodos conectados a um circuito elétrico de alta tensão com capacitores carregados. Apesar de possuir complexidade instrumental superior ao confinamento magnético e espacial, ainda é mais simples que a DP-LIBS, LIBS-LIFS e RELIBS. Além do mais, a SD-LIBS possibilita obtenção de incrementos de sinais expressivos em relação ao LIBS (6). Com relação ao custo benefício, a SD-LIBS se destaca das demais e por ter sido escolhida para este trabalho, será abordada mais profundamente a seguir.

2.1.3.1. LIBS com descarga elétrica

A SD-LIBS pode ser implementada utilizando eletrodos geralmente feitos de tungstênio ou cobre, conectados a um banco de capacitores alimentados por uma fonte de alta tensão, como pode ser observado no esquema da Figura 4. Nesta figura, os dois eletrodos são utilizados para aplicar a diferença de potencial sobre a amostra. No momento em que o pulso do *laser* sobre amostras condutoras ou não, há produção de espécies carregadas entre os

eletrodos, induzindo a descarga elétrica. No caso de amostras condutoras, pode ser utilizado apenas um eletrodo, ao qual se aplica potencial positivo; o negativo é aplicado na amostra (Figura 5).

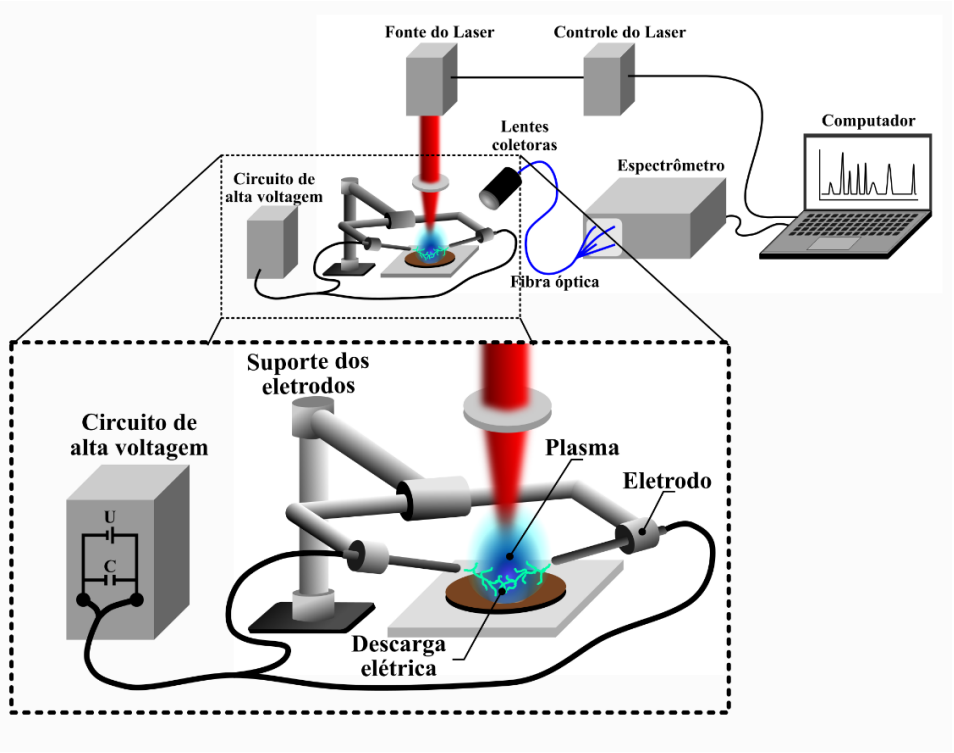

Figura 4 - Esquema ilustrativo dos componentes utilizados em um sistema SD-LIBS.

Fonte: Autor

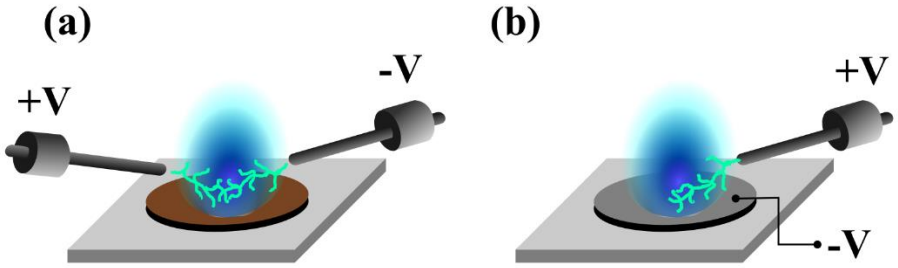

Figura 5 - Configurações SD-LIBS utilizadas para a análise de (a) amostras condutoras ou não condutoras e (b) amostras condutoras.

Fonte: Autor

Brech e Cross (18) foram os primeiros a introduzir uma descarga elétrica no plasma para aumento de sensibilidade, uma vez que os *lasers* disponíveis na época continham baixa energia. Com o avanço da tecnologia e a produção de *lasers* dispondo de feixes mais

energéticos, a reexcitação (ou reaquecimento) do plasma por uma descarga elétrica entrou em desuso até 2005, ano em que Nassef e Elsayed-Ali (43) propuseram um circuito de alta tensão para produzir uma descarga elétrica e reaquecer o plasma. O sistema SD foi desenvolvido utilizando dois eletrodos de tungstênio, um capacitor de 0,250 μF, um resistor de 500 kΩ e uma fonte de alta tensão (de até 10 kV). O SD-LIBS foi utilizado para monitoramento de linhas de Al e Cu em liga de alumínio, obtendo valores de razão sinal/ruído (S/R) de até seis vezes maiores em relação ao LIBS convencional.

O êxito dos resultados apresentados por Nassef e Elsayed-Ali (43) despertou novamente o interesse pela reexcitação do plasma como estratégia de aumento de sensibilidade, e vários trabalhos foram apresentados na literatura.

Zhou *et al.*, (48) propuseram um novo circuito elétrico utilizando dois eletrodos de liga de tungstênio e tório (98% e 2%, respectivamente), um pequeno capacitor de 6 nF, um diodo e um indutor. Este sistema foi utilizado para o estudo da emissão de Si em uma amostra de cristal de silício, e observado um aumento de 52 vezes para uma linha de Si, além de menores RSD. Cabe destacar aqui que este circuito desenvolvido foi utilizado em diversos estudos (49–55)

Kexue *et al.*, (49) avaliaram o aumento da intensidade de emissão de As e Pb em amostras de solo. Em comparação com o LIBS, a reexcitação do plasma pela descarga elétrica proporcionou o acréscimo de 38,5 vezes no sinal do Pb, no caso do As, a comparação não foi possível devido a não ocorrência da linha deste elemento com LIBS convencional.

Li *et al.*, (54) avaliaram o aumento de emissão para os elementos Al, As, Ba, Ca, Co, Fe, Mg, Pb, Si, Sr, Ti e V em amostras de solo. Em relação ao LIBS, a intensidade de emissão foi aumentada em até 223 vezes, dependendo da linha de emissão e do elemento analisado. Além do mais, a razão S/R foi melhorada significativamente, principalmente para os elementos em menor concentração.

Zhou *et al.*, (50) avaliaram a influência da tensão e da capacitância na intensidade de emissão. Neste caso, o aumento destas variáveis proporcionou o aumento do tempo de vida do plasma e da quantidade de espécies excitadas em transições eletrônicas de maior energia.

Li *et al.*, (52) fizeram a análise quantitativa de Mg, Pb e Sn em solo, obtendo os LOD de 34, 1,5 e 0,16 $\mu g\ g^{-1}$, respectivamente.

Zhou *et al.*, (51) compararam a temperatura e a densidade eletrônica do plasma de uma amostra de cristal de silício obtidas com o reaquecimento do plasma e a LIBS convencional. Quando o reaquecimento do plasma é utilizado, a temperatura do plasma

aumenta, provocando o aumento das linhas de emissão, por outro lado, a densidade eletrônica para ambos os métodos foi aproximadamente a mesma.

Eschlböck-Fuchs *et al.*, (56) propuseram um circuito elétrico de baixa tensão e alta corrente para reaquecimento do plasma, utilizando dois eletrodos de cobre, um banco de capacitor com 9,4 mF e a uma fonte com tensão máxima de 63 V. Alumínio, Ca, Fe, Mg e Mn foram monitoraram em amostras de escória de metalurgia para avaliação da proposta. Neste caso, o reaquecimento do plasma obteve aumento significativo na intensidade de emissão, bem como maior tempo de permanência e volume do plasma. Além do mais, apenas com o uso da proposta de reaquecimento do plasma foi possível observar linhas de emissão de F e S, elementos com alta energia de excitação.

Sobral e Robledo-Martinez (57) utilizaram um eletrodo de aço inoxidável, um cabo de 50 m de comprimento, servindo como capacitor (5 nF), e uma fonte de alta tensão para análise de liga de alumínio. Um aumento de sinal de uma ordem de magnitude foi observado devido ao aumento no tempo de vida do plasma.

Bol'shakov *et al.*, (58) desenvolveram um circuito elétrico conectado a dois eletrodos de cobre para reaquecimento do plasma, e constataram que espécies moleculares, como OH, AlO e CaF, tem um aumento significativo na intensidade de emissão causadas pelo reaquecimento do plasma.

He *et al.*, (2018) (59) utilizaram um eletrodo de tungstênio conectado a um circuito elétrico com tensão máxima de 4 kV e 50 mA para determinação de Cu, Cr, Mg e Mn em ligas de alumínio. Os LOD obtidos para estes elementos foram de 9,0, 7,8, 11,1 e 20,1 mg kg^{-1}, respectivamente, sendo estes de 4 a 10 vezes melhores que aqueles obtidos com a LIBS convencional. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa utilizou um circuito elétrico com alta taxa de repetição (1 kHz) para determinação de Al e Pb em ligas de cobre (60). Os LOD obtidos com o plasma reaquecido foram de 1,9 e 15,5 mg kg^{-1} para Al e Pb, respectivamente. Estes valores correspondem em 6 e 11 vezes maiores que aqueles obtidos com a LIBS nas mesmas condições.

Grünberger *et al.*, (61) utilizaram um eletrodo de tungstênio, um circuito elétrico com tensão máxima de 2,5 kV, composto por um capacitor de 25 nF e um resistor de 1 MΩ. Devido ao aumento de sinal proporcionado pela descarga elétrica no plasma, um *laser* de menor energia pode ser utilizado, causando menos danos a superfície da amostra. Esta estratégia foi utilizada para fazer imageamento químico de uma impressão digital sobre a superfície de uma liga de alumínio e de um cartão USAF (utilizado para teste de resolução óptica) sobre a superfície de cobre, bem como o imageamento hiperespectral de camadas de

tinta e óxido de silício sobre alumínio. As imagens obtidas com o reaquecimento do plasma tiveram maior razão S/R, contribuindo para uma imagem química com maior definição em relação as imagens obtidas com a LIBS.

2.1.4. Calibração em LIBS para análise de amostras sólidas

A análise quantitativa representa um grande desafio em LIBS, em parte devido a intensidade de emissão do analito no plasma depender de diversos fatores; além da concentração do analito na amostra, tem as propriedades do plasma, da fonte de excitação (energia, fluência e comprimento de onda) e do ambiente entorno do plasma (3). Portanto, para obter resultados precisos é crucial entender e controlar os processos de ablação, bem como conhecer as propriedades físicas e químicas da amostra. Tais diferenças entre os padrões de calibração e as amostras podem resultar em ablação não estequiométrica e variações na temperatura e densidade eletrônica do plasma, *i.e.*, efeito de matriz, resultando em erros na determinação da concentração dos analitos.

Curvas de calibração externa preparadas com um conjunto de materiais de referência certificados (CRMs) ou com amostras com concentração do analito previamente determinadas por outra técnica de referência, ambos com matrizes similares as das amostras em análise, têm sido eventualmente utilizados para análises quantitativas em LIBS.

Santos *et al.*, (62) desenvolveram um método quantitativo por LIBS para determinação de Cd em amostras de solo. Seis CRMs de amostras de solo, contendo diferentes concentrações de Cd foram utilizados como padrões de calibração. As figuras de mérito obtidas neste trabalho indicam que este método pode ser utilizado para a discriminação de solos contaminados com Cd.

Arantes de Carvalho *et al.*, (63) determinaram Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn em comprimidos de polivitamínicos utilizando como padrões de calibração misturas de amostras com concentrações previamente determinadas por ICP OES. As concentrações determinadas por LIBS obtiveram RSD entre 2 a 16 %, sendo estas concentrações concordantes com àquelas determinadas por ICP OES.

Na existência de efeitos de matriz, outras estratégias têm sido empregadas em LIBS, como por exemplo, a calibração com compatibilização de matriz (MMC) e padronização interna (IS), utilizadas por Morais *et al.*, (64) para determinação de Ca em amostras de biocarvão. Neste caso, apenas a estratégia MMC não foi suficiente para minimizar os efeitos

de matriz, sendo necessário o uso do Na como padrão interno. Por sua vez, as duas estratégias (MMC e IS) proporcionaram concentrações de Ca concordantes com aquelas determinadas por HR-CS FAAS após digestão das amostras. É importante destacar que a escolha do padrão interno deve levar em consideração a taxa de volatilização, energias de ionização e massa atômica, de modo que o padrão interno tenha (i) a mesma energia de excitação que o analito, (ii) não ser afetado com autoabsorção, e (iii) ter intensidades de emissão próximas a do analito (65).

Zivkovic *et al.*, (66) determinaram Ba e Mn em amostras de hortelã pimenta utilizando a estratégia de calibração com adição de padrão (SA) juntamente com o elemento Sr como padrão interno. Porções de aproximadamente 10 g da mesma amostra foram colocadas em cinco frascos contendo 20 mL de soluções multielementares com concentrações crescentes de Ba (0,00, 4,95, 9,90, 19,80 e 39,60 μg g^{-1}) e de Mn (0,00, 24,75, 49,50, 99,01 e 198,02 μg g^{-1}). Após a homogeneização, as amostras foram secas a 60 °C por 12 h e em sequência compactadas na forma de pastilhas, resultando na curva de calibração. O método SA com IS gerou resultados com exatidões de 99,7 % e 102,3 % para Ba e Mn, respectivamente, com relação as concentrações de destes elementos determinadas por ICP OES. Cabe destacar que apesar do êxito obtido com este método, curva de calibração foi necessária para cada amostra, aumentando significativamente o tempo da análise.

Calibration-free (CF-LIBS) foi desenvolvida para a determinação multielementar sem uso de calibração, a qual considera a matriz como parte do problema analítico, analisando-a juntamente com o analito (67). Com esta estratégia, as determinações elementares são realizadas através de algoritmos que se baseiam nas intensidades das linhas de emissão e na temperatura e densidade eletrônica do plasma (*i.e.*, calculados experimentalmente), assumindo que o plasma encontra-se em equilíbrio termodinâmico local (67,68). A CF-LIBS fornece em alguns casos resultados quantitativos satisfatórios, em outros, observa-se carência de precisão (67).

Cavalcanti *et al.*, (69) desenvolveram a calibração monoponto (*one-point calibration*) para CF-LIBS. O método se fundamenta no emprego de um padrão com matriz semelhante a da amostra. Tanto a amostra quanto o padrão são analisados nas mesmas condições, de modo a determinar com maior precisão os parâmetros do plasma. Apesar da obtenção de resultados mais precisos, a concentração da amostra é determinada através de cálculos complexos pela equação de Saha-Boltzmann.

Gaudiuso *et al.*, (70) utilizaram a calibração livre inversa, conhecida como *calibration-free inverse* (CFI) para análises arqueológicas. A CFI-LIBS baseia-se na

suposição de que, diferentes amostras com matrizes semelhantes analisadas nas mesmas condições terão a mesma temperatura de excitação do plasma. Os resultados obtidos com este método foram concordantes com a espectrometria de massas acoplada ao plasma induzido com ablação a *laser* (LA-ICP-MS) para determinação de diversos elementos. Cabe destacar que a complexidade da matriz dificulta a aplicação do método CF-LIBS e CFI-LIBS, sendo estes métodos mais facilmente aplicados para análise de amostras homogêneas, *e.g.*, ligas metálicas.

Recentemente, Babos *et al.*, (71) aplicaram o MEC para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn em suplementos alimentares para bovino. O método utilizou apenas dois padrões sólidos: o primeiro contendo amostra + padrão, o segundo amostra + diluente, ambos em iguais proporção m:m de modo a manter constante a matriz da amostra em ambos. As pastilhas dos dois padrões sólidos preparados para análise das amostras e de CRMs foram analisadas por LIBS, e as respectivas concentrações calculadas. Os resultados obtidos foram concordantes com aqueles determinados por ICP OES e com os valores dos materiais de referência. Os autores destacaram que o método foi eficiente para minimizar os efeitos de matriz e apresentou frequência analítica equivalente a 15 amostras por hora.

Hao *et al.*, (72) propuseram um novo método chamado de *one point and multi-line calibration* (OP-MLC LIBS). Este se baseia na utilização de várias linhas do analito monitoradas tanto na amostra e como no padrão (com matrizes semelhantes). A concentração da amostra é calculada através da multiplicação entre a concentração do padrão e a inclinação obtida pela equação linear entre as intensidades em várias linhas de emissão registradas no padrão (eixo x) e na amostra (eixo y). Com este método foi determinado Cr, Mn, Ni e Ti em seis amostras de aço utilizando o Fe como padrão interno. O RSD variou de 9 a 36 %, mas valores de 79 % foram observados para Cr. De modo geral, as concentrações determinadas por OP-MLC LIBS e as concentrações certificadas foram próximas. Por outro lado, cabe aqui destacar que, a obtenção de êxito desta estratégia depende da escolha do padrão com matriz compatibilizada e da disponibilidade de linhas de emissão do analito.

Yuan *et al.*, (73) propuseram a *single-sample calibration* LIBS, a qual se baseia na simplificação da fórmula de Lomakin-Scherbe, permitindo o uso de apenas um padrão para calibração. A determinação de Cu, Cr, Fe, Ni, Nb, Mo e Zn foi feita em ligas metálicas, sendo os resultados comparados com a estratégia de calibração externa em LIBS. Os melhores resultados foram obtidos quando a *single-sample calibration* LIBS foi utilizada. Novamente, a escolha do padrão é fundamental para que efeitos de matriz não sejam significativos.

Babos *et al.*, (74) aplicaram o método de *one point gravimetric standard addition* (OP GSA), a qual emprega a estratégia de MMC com SA. A intensidade de emissão do analito é mensurada em dois padrões para calibração, sendo o primeiro, constituído por amostra + padrão e o segundo, por amostra + diluente, mantendo constante a matriz da amostra em ambos os padrões. A concentração é obtida de forma similar ao método de SA, através do intercepto e da inclinação da curva de calibração obtida com os dois padrões preparados. As concentrações de Ca e P em amostras de suplemento bovino foram determinadas com as estratégias OP GSA, MEC e MMC com IS e os resultados comparados. As estratégias MEC e OP GSA obtiveram os melhores valores de exatidão, além de não apresentarem diferenças estatísticas entre os valores de referência e os valores determinados com ICP OES. É importante destacar que em ambas as estratégias MEC e OP GSA, a qualidade dos resultados depende da disponibilidade de diluentes e do padrão com concentração adequada.

Nunes *et al.*, (75) propuseram a calibração por razão das inclinações (SRC) que é baseada na utilização de apenas um padrão sólido de calibração. Explorando o efeito do acúmulo de pulsos do *laser* na intensidade de emissão do analito, é utiliza para a calibração a inclinação obtida pelo gráfico do número de pulsos acumulados *versus* a intensidade de emissão do analito, para amostra e padrão. A concentração do analito é determinada através da concentração do padrão multiplicada pela razão entre a inclinação da amostra dividida pela inclinação do padrão. A concentração de B, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn em amostras de folhas de plantas foram determinadas pelo método proposto, sendo estes valores concordantes com aqueles determinados por ICP OES e com os valores certificados dos CRMs. Os autores destacam ainda que estes resultados foram mais precisos que aqueles determinados por calibração externa.

2.2. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

2.2.1. Histórico

O físico Gustav Kirchhoff em 1859 observou que os elementos químicos absorvem radiação eletromagnética que eles próprios emitem. Posteriormente, os trabalhos de Kirchhoff e Robert Bunsen deram início a espectroscopia analítica moderna (76).

Nesse momento em diante, maior empenho foi dado para as técnicas espectroscópicas de emissão, em parte, devido a simplicidade da instrumentação requerida para registro do sinal de emissão em um anteparo escuro. Em contra partida, os instrumentos de absorção atômica utilizavam uma lâmpada de fonte contínua (CS), devido ser a única fonte de radiação confiável disponível na época, bem como espectrômetro de baixa resolução, dificultando o registro da diminuição de intensidade (absorção dos analitos) em um fundo luminoso (10).

Alan Walsh em 1952 chegou à conclusão de que o uso da fonte contínua só seria viável caso o espectrômetro tivesse resolução de aproximadamente de 2 pm. Como estratégia para dar continuidade a AAS, Walsh utilizou a lâmpada de cátodo oco (HCL), produzida com o elemento de interesse, permitindo a emissão de radiação com pequena largura espectral (alguns pm), específico para cada elemento, sendo altamente seletiva e dispensando o uso de monocromadores de alta resolução (9,10).

A concepção de absorção atômica surgiu em 1955, quando Walsh publicou o artigo "*The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*" (77), marcando o nascimento oficial de um novo método de análise instrumental, a AAS (78). Neste equipamento, os átomos do analito no estado gasoso em uma chama de acetileno/ar absorviam a radiação emitida por uma HCL. A radiação transmitida após a chama atravessava um prisma para separar os comprimentos de onda até chegar ao detector de tubo fotomultiplicador. Este detector possibilitou a obtenção de um sinal eletrônico ao invés da impressão fotográfica utilizada anteriormente. Por utilizar uma chama para atomização dos analitos, o nome de espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) foi estabelecido. Neste ponto, o equipamento projetado por Walsh estabeleceu os principais componentes de um espectrômetro de AAS, os quais podem ser observados no esquema ilustrado na Figura 6.

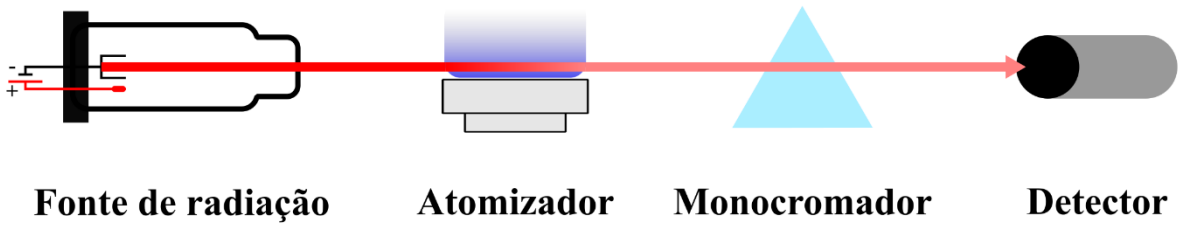

Figura 6 - Esquema ilustrativo dos principais componentes utilizados em um espectrômetro de absorção atômica.

Fonte: Autor

Após um período sendo tratada como uma curiosidade científica, a AAS passou a ser mundialmente aceita como uma técnica instrumental de análise apenas em 1963, quando a Perkin-Elmer fabricou o primeiro espectrômetro de absorção atômica de chama (modelo 303). Nos próximos anos, outras empresas também iniciaram a produção de espectrômetros de absorção atômica, e em 1966 excedeu o número de 2000 unidades destes equipamentos comercializados por ano (78).

Com a grande expansão comercial, vários trabalhos exploratórios da AAS foram desenvolvidos, sendo observado em muitos destes que a AAS apresentava menos interferências do que os métodos de emissão atômica da época, além de maior sensibilidade e seletividade (79).

Em 1961 foi obtido um grande marco em relação a análise de sólidos, quando L'vov propôs o atomizador em forno de grafite aquecido eletricamente e purgado com argônio, dando início a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (80).

O GFAAS ganhou maior atenção quando Slavin, baseado nos estudos de L'vov, propôs em 1981 o conceito forno plataforma com temperatura estabilizada, conhecido como *Stabilized Temperature Platform Furnace* (STPF) (81,82). De modo geral, essas condições contemplam o uso de; (i) modificador químico, (ii) grafite pirolítico, (iii) medida de sinais transientes em área de pico, (iv) corretor de fundo, (v) velocidade de aquecimento na etapa de atomização ≥ 2000 °C s^{-1}, (vi) etapa de atomização com interrupção do gás de purga e (vii) eletrônica compatível com medida de sinais transientes. Esses requisitos conferem condições para gerar uma nuvem densa de átomos (*i.e.*, aumento na sensibilidade), remoção de interferentes (*i.e.*, através do programa de aquecimento) e temperatura controlada (*i.e.*, ambiente isotérmico).

A partir deste momento, as alterações frente aos instrumentos AAS passaram a ter caráter instrumental. Um passo significativo foi dado quando Keliher e Wohlers (1974) propuseram o uso de um espectrômetro de alta resolução com rede Echelle e uma lâmpada de Xe de 150 W como CS. Estes autores demonstraram resultados promissores, contudo, devido à baixa potência da lâmpada de Xe, fornecia baixa intensidade de emissão em comprimentos de onda inferiores a 320 nm, região em que a maioria dos elementos apresentam linhas de absorção mais sensíveis (9,83).

Harnly *et al.*, (84) desenvolveram o SIMAAC (*simultaneous multielement atomic absorption continuum source spectrometer*), o primeiro instrumento de absorção atômica multielementar e simultâneo, o qual utiliza uma lâmpada de Xe de 300 W como CS de radiação. Outra vantagem deste sistema está no fato de ser compatível com a análise em

chama e em forno de grafite. Contudo, a instabilidade do arco elétrico da lâmpada de Xe proporcionava maiores limites de detecção (85).

A instrumentação mais elaborada que permitiu a ascensão CS na AAS foi descrita em 1996, pelo grupo do Becker-Ross, os primeiros a projetar e construir um espectrômetro de alta resolução, bem como os demais componentes, para uso exclusivo para AAS (86,87). Este equipamento trouxe o conceito instrumental em relação a fonte de radiação, o espectrômetro e o detector para a HR-CS AAS.

Recentemente, um equipamento com capacidade multielementar simultânea foi proposto por Labusov *et al.*, (88), o qual é capaz de fornecer um espectro de absorção atômica nas faixas de 190 a 350 nm e 350 a 780 nm, com resoluções de 10 e 30 nm respectivamente. Este equipamento pode ser uma tendência para os novos equipamentos de HR-CS AAS, no entanto, até o momento trata-se de um protótipo.

2.2.2. Instrumentação

Como mencionado, o grupo de Becker-Ross resolveu grande parte dos problemas instrumentais relacionados a HR-CS AAS, obtendo um novo conceito instrumental ilustrado na Figura 7. A lâmpada de arco curto de xenônio de 300 W opera com pressões > 17 bar e produz um plasma de diâmetro < 0,2 mm entre os eletrodos de tungstênio, atingindo temperaturas de aproximadamente 10000 K (9). Esta lâmpada em *hot spot* é capaz de emitir com alta intensidade entre 190 e 900 nm, obtendo radiância de 2 a 3 ordens de magnitude maior que as obtidas com lâmpadas de HCL (dependendo do elemento). O feixe de radiação emitido pela lâmpada possui uma instabilidade intrínseca a flutuação do plasma na superfície do eletrodo, que de modo compensativo é estabilizado por atuadores piezoelétricos conectados aos espelhos elípticos para focalização do feixe na entrada do monocromador, garantindo que a instabilidade não prejudique a análise (10).

O espectrômetro apresentado na Figura 7, refere-se ao modelo DEMON (*Double Echelle Monochromator*), composto por um prisma Littrow e uma rede Echelle. A radiação contínua, após atravessar o atomizador, passa pela fenda de entrada, sendo direcionada a um prisma monocromador, o qual faz uma pré-seleção do comprimento de onda (*e.g.*, 0,3 a 3 nm). No momento seguinte, a radiação pré-selecionada passa por uma fenda secundária, e então é refletida até uma rede Echelle, onde o estreito feixe pré-selecionado é altamente resolvido e integralmente direcionado ao detector CCD com 512 pixels, dos quais 200 são

utilizados para fins analíticos (9,10,89). Com esta configuração óptica é obtido resolução de aproximadamente 1,6 pm por pixel.

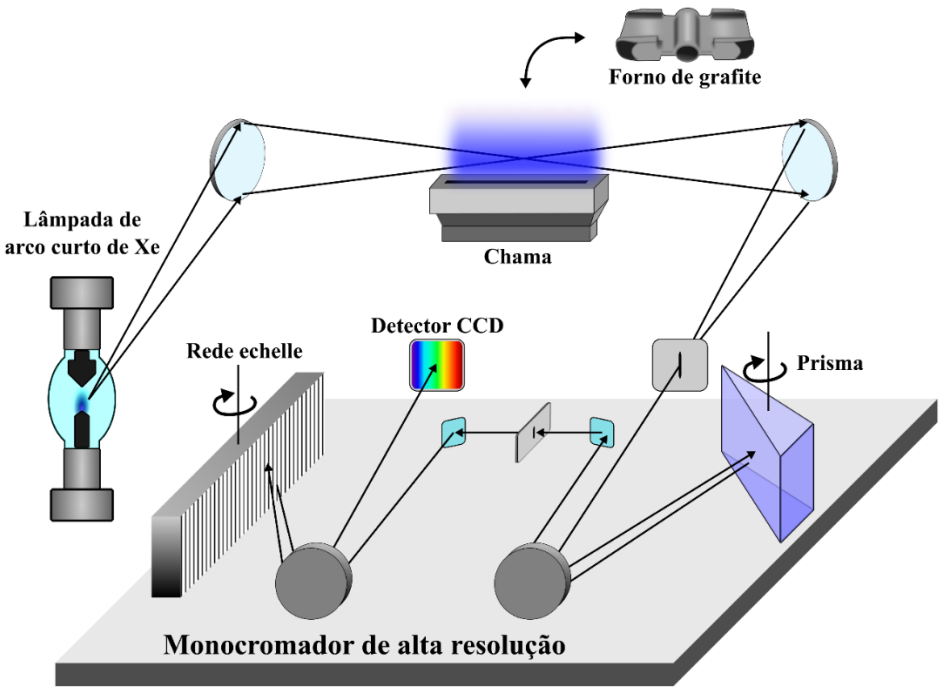

Figura 7 - Ilustração esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) com ênfase nos seus principais componentes.

Fonte: Adaptado de Welz *et al.*, (9)

O prisma e a rede Echelle possuem ajuste de suas posições através de motores de passo, de modo a ajustar o comprimento de onda do analito de interesse, contudo, algumas flutuações no comprimento de onda podem ocorrer durante os ajustes. Tais flutuações são corrigidas com o uso de uma lâmpada de Ne, posicionada em frente a fenda intermediária, a qual fornece pelo menos uma linha de emissão do Ne em cada janela espectral, a qual é atribuída a um pixel do detector, servindo de referência para estabilização dos comprimentos de onda (9,10,89).

Os 200 pixels utilizados para fins analíticos representam outra grande vantagem deste equipamento, os quais funcionam de forma independente, atuando de fato como 200 detectores, cobrindo uma região de aproximadamente 0,2 nm ao redor da linha analítica, na região ultravioleta, e até 0,5 nm na região do visível. Destes 200 pixels, apenas de 1 a 5 são geralmente utilizados para registrar o pico de absorção, os demais permitem visualizar as regiões adjacentes ao pico, permitindo o monitoramento do ambiente espectral, bem como correção de fundo. Deste modo, o sinal analítico pode ser observado de três maneiras

distintas, *e.g.*, (i) absorbância *versus* tempo, (ii) absorbância integrada *versus* comprimento de onda e (iii) em uma imagem tridimensional, com os eixos compostos por absorbância, comprimento de onda e tempo (9,10,89).

O programa utilizado para processamento dos espectros representa outra grande vantagem frente aos equipamentos convencionais. O qual faz a correção automática dos eventos contínuos, *i.e.*, que afetam de forma similar todos os pixels do detector, e deste modo, a radiação de corpo negro emitida pelo atomizador (*i.e.*, efeito contínuo) é removida, não necessitando de um modulador como nos equipamentos convencionais. Além do mais, os efeitos descontínuos (*i.e.*, absorção de outros átomos ou moléculas) podem ser corrigidos através do método de correção de fundo pelo algoritmo de mínimos quadrados (LSBC). Um espectro puro de referência (que simule a matriz) é gerado e para então ser subtraído do espectro bruto da amostra (9,89).

Cabe mencionar que devido a estreita janela espectral (0,2 - 0,5 nm) esse equipamento tem características monoelementares, apesar de algumas medidas simultâneas serem possíveis. Com relação ao atomizador, os equipamentos são atualmente comercializados pela empresa Analytik Jena nos módulos chama (ContrAA 300), forno de grafite (ContrAA 600) ou chama + forno de grafite (ContrAA 700 e ContrAA 800).

2.2.3. Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua

A espectrometria de absorção molecular (MAS) iniciou-se na década de 70, permitindo a determinação de não metais, tais como S e halogênios em espectrômetros de absorção atômica de baixa resolução (9,11). A determinação de não metais com a AAS representa um desafio analítico relevante, principalmente por que esses elementos são de difícil atomização e as linhas mais sensíveis estarem na região o ultravioleta de vácuo (*i.e.*, < 200 nm), a qual é inacessível com instrumentação convencional (9,11). Como alternativa, é possível determiná-los indiretamente a partir da geração de uma molécula diatômica que contenha o elemento de interesse. Isso é conseguido a partir de um reagente formador. E a medida da(s) sua(s) respectiva(s) linha(s) de absorção molecular via AAS de baixa resolução é feita empregando-se lâmpadas de catodo oco de elementos que emitem linhas coincidentes com as das moléculas. Desta forma, houve um grande interesse na determinação de moléculas diatômicas por FAAS e GFAAS, no entanto, os limitados comprimentos de onda disponíveis

(lâmpadas de fonte de linhas), a baixa resolução espectral e a presença de interferências espectrais dificultavam as aplicações (11).

Um ponto de inflexão na evolução da MAS aconteceu com a introdução da HR-CS AAS. A fonte contínua de alta intensidade de emissão e o espectrômetro de alta resolução tornaram acessíveis os comprimentos de onda mais sensíveis para as moléculas diatômicas, bem como a identificação e a correção de interferências espectrais (11), sendo chamada a partir deste momento de espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS).

As linhas de absorção moleculares são compostas por transições eletrônicas, assim como as linhas atômicas, contudo, diferentemente das linhas atômicas, as linhas moleculares contêm transições vibracionais (vibração dos núcleos) e rotacionais (rotação da molécula), como ilustrado na Figura 8.

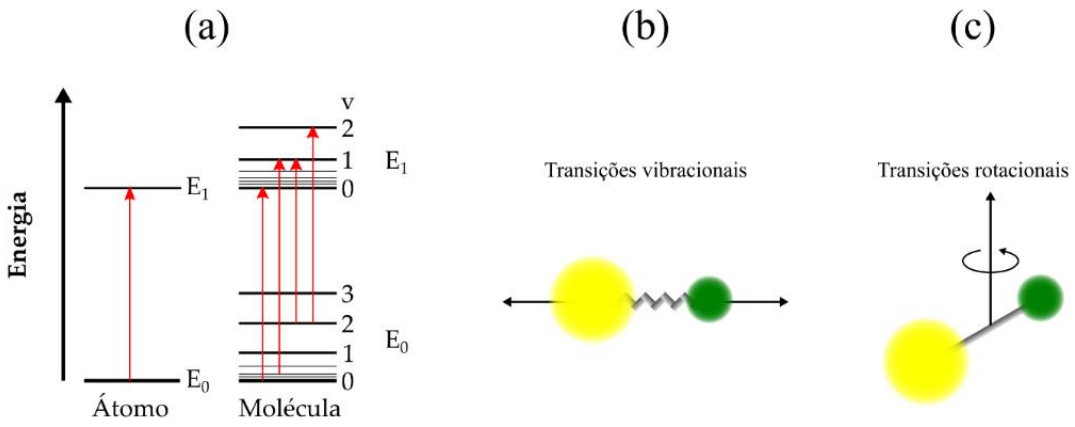

Figura 8 - Esquemas ilustrativos (a) entre as diferenças nas possibilidades de absorção de átomos e moléculas e (b) das transições vibracionais e (c) rotacionais características de moléculas diatômicas.

A energia total envolvida é aproximadamente igual a soma das energias das transições eletrônicas (E_{elet}), vibracionais (E_{vib}) e rotacionais (E_{rot}), as quais contém a seguinte ordem de grandeza $E_{elet} \gg E_{vib} \gg E_{rot}$ (9,11,90). Como resultado, o espectro de uma molécula diatômica é notadamente mais complexo que um espectro atômico. Considerando que as energias eletrônicas das transições de moléculas diatômicas são comparáveis as dos átomos, estas transições estão localizadas na região do ultravioleta-visível do espectro eletromagnético. Por outro lado, cada transição eletrônica das moléculas diatômicas é dividida em energias vibracionais menores (cerca de 10 a 100 < E_{elet}), resultando em uma sequência de bandas vibracionais, as quais são geralmente separadas por alguns nanômetros (9,11). De forma semelhante, cada transição vibracional é dividida em

energias rotacionais menores (cerca de 100 a 1000 < E_{vib}), ocasionando em uma sequência de bandas rotacionais, tipicamente separadas por cerca de 10 a 25 pm (9,11).

Um instrumento com alta resolução espectral é necessário para observar as linhas rotacionais. Consequentemente, com instrumentação de baixa resolução, as linhas rotacionais não são distintas umas das outras, obtendo bandas vibracionais alargadas. Portanto, a HR-CS MAS proporcionou a instrumentação adequada para diversas aplicações envolvendo a determinação de moléculas diatômicas, como pode ser observado na revisão sobre HR-CS MAS desenvolvida por Butcher (11).

Com relação as moléculas diatômicas, é importante mencionar que as transições eletrônicas possuem uma designação própria, com relação ao estado eletrônico inicial e final, sendo as principais informações dadas por:

(i) Ordem energética do estado eletrônico
(ii) O spin total dos elétrons
(iii) Momento angular total dos elétrons em relação ao eixo molecular
(iv) Propriedades de simetria da função de onda

Um estado eletrônico típico de uma molécula diatômica pode ser denominado conforme a ilustração apresentada na Figura 9. Os termos apresentados nesta figura são empregados em HR-CS MAS para elucidar qual é a transição eletrônica utilizada para monitorar a molécula em estudo. Como exemplo, as linhas de absorção da molécula de PO (entre 247,4 - 247,6 nm, referente a bandas vibracionais Δv = 0) é descrita como $X^2\Pi \rightarrow A^2\Sigma^+$, onde a seta da esquerda para a direita descreve o processo de absorção, partindo do estado fundamental “X”, com S = ½, momento angular = Π; para o estado excitado: primeiro nível excitado “A”, com S = ½, momento angular = Σ, e o índice + indicando não inversão da função de onda.

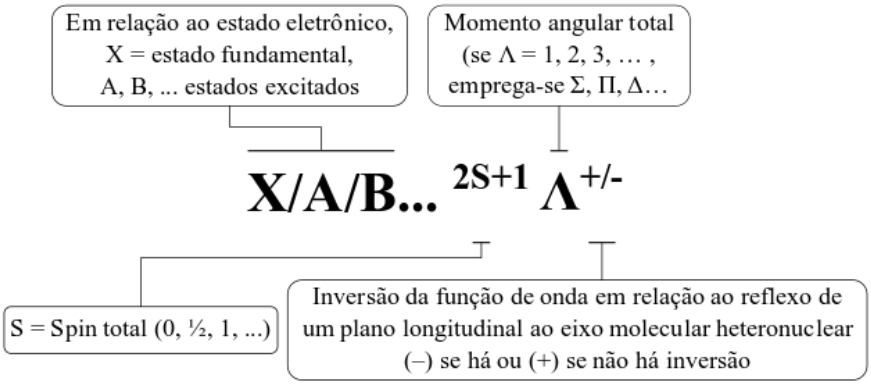

Figura 9 - Denominação dos termos espectroscópicos utilizados para moléculas diatômicas.

Fonte: Autor

2.2.4. Análise direta de DBS para determinação elementar

A DBS é uma técnica de microamostragem em que uma pequena quantidade de sangue é removida do dedo anelar ou calcanhar e depositada em papel filtro especial (91,92). Esta abordagem tem obtido êxito na triagem neonatal desde que foi proposta no início da década de 60 por Guthrie *et al.*, (92) para a determinação de fenilcetonúria em sangue de recém-nascidos. A partir deste momento, DBS passou a ser amplamente utilizada em todo o mundo como forma de análise de sangues de recém-nascidos, sendo um método imprescindível para os programas de saúde pública. A título de curiosidade, nos países desenvolvidos a grande maioria (> 95 %) dos recém-nascidos entre o primeiro e o terceiro dia de vida têm o sangue analisado através da amostragem por DBS (93).

Durante a última década, o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis possibilitou a aplicação da amostragem de sangue por DBS em várias áreas, tais como, em estudos pré-clínicos e clínicos, pesquisa epidemiológica, toxicológica e monitoramento terapêutico de medicamentos (91,93–96).

O aumento do uso da amostragem empregando DBS está relacionado com as vantagens intrínsecas a essa técnica, sendo estas: (i) facilidade de amostragem, (ii) economia em relação a amostragem, transporte e armazenamento das amostras, (iii) interação sangue e papel confere estabilidade da amostra, (iv) necessário apenas alguns microlitros de sangue, (v) amostragem minimamente invasiva, (vi) risco reduzido de infecção, (vii) procedimento simplificado de preparo de amostra e (viii) possibilidade de automação do processamento e

análise das amostras (91). A Figura 10 ilustra um procedimento de análise de sangue por DBS.

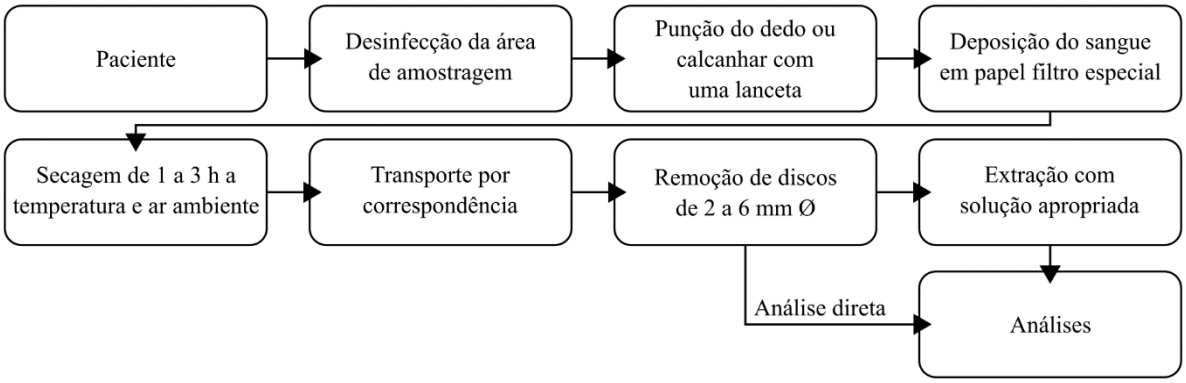

Figura 10 - Processo envolvendo DBS, da coleta até o laboratório.

Fonte: Adaptado de Lehmann *et al.*, (16)

Como observado na Figura 10, a amostragem de sangue por DBS é simples, fácil e de baixo custo, podendo ser realizada pelo próprio paciente sem a necessidade de um profissional especializado (14,16,96–98). Além do mais, a amostra de sangue seco no papel confere estabilidade para maioria dos compostos, evitando o uso de transporte refrigerado em baixas temperaturas (99), facilitando o envio e transporte por correspondência, reduzindo custos (14,16,91,95). Geralmente a análise por DBS é realizada mediante a uma etapa de extração do analito com extrator adequado, ou em alguns casos, através da análise direta do papel ou de parte dele, a depender da técnica utilizada (Figura 10). Os volumes de sangue são da ordem de 10 a 80 µL, o que torna esta técnica muito vantajosa para coleta e manuseio de amostras de sangue para recém-nascidos, bebês, pequenos animais, idosos e/ou pacientes com comorbidades (91,95).

Por outro lado, a estratégia DBS contém alguns percalços relacionados a não conformidade para a determinação de analitos que sejam voláteis, instáveis em contato com ar ou fotossensíveis. Além disso, efeitos relacionados a matriz do sangue podem ocorrer, como é o caso dos efeitos causados por diferentes concentrações de hematócritos em cada paciente, influenciando a dispersão do sangue no papel e, por conseguinte, a distribuição dos analitos (16).

Não obstante, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para reduzir as limitações e aumentar as aplicações clínicas através do monitoramento de espécies orgânicas em DBS. A maioria destes trabalhos utiliza cromatografia líquida ou gasosa acoplado a espectrometria de

massas. Lehmann *et al.*, (16) fizeram uma revisão abrangente com esses trabalhos. Por outro lado, nos últimos anos o interesse pela análise elementar utilizando DBS tem crescido rapidamente, face as vantagens proporcionadas por essa estratégia (100). Na Tabela 2, encontram-se diversos trabalhos relacionados a determinação elementar empregando DBS. Estes trabalhos utilizam a etapa de extração (ou, em alguns casos a digestão ácida) para posterior determinação ou análise direta do papel. A análise direta por LA-ICP-MS e HR-CS GFAAS se destacam por serem originalmente compatíveis com a análise direta de sólidos, eliminando a etapa de extração (ou digestão), a qual consome tempo e reagentes, além de ser uma etapa passível de erros e/ou contaminação.

Cernik e Sayers (101) fizeram a determinação direta de Pb em DBS utilizando um tubo de Ni sobre a chama de acetileno do equipamento FAAS. Os discos de 8 a 9 mm de diâmetro foram inseridos diretamente no tubo de Ni para a determinação de Pb. Os resultados obtidos com esta estratégia foram comparados com a determinação de Pb em sangue venoso, sendo obtido coeficiente de correlação de 0,981 entre estes métodos. Apesar do êxito na determinação o aparato instrumental não é tão simples, demandando extrema habilidade do operador.

Cizdziel (102) utilizou a técnica LA-ICP-TOF-MS para o diagnóstico de intoxicação por Pb. Através da ablação por *laser*, a amostra de DBS é vaporizada e direcionada ao ICP-TOF-MS, permitindo a análise direta e rápida da amostra. Os autores comentam que para o desenvolvimento de um método quantitativo, o uso de um padrão interno é importante para minimizar as flutuações ocasionadas pela ablação do *laser* e do fluxo de transporte do material vaporizado até o ICP.

Hsieh *et al.*,(103) foram adiante com as características multielementar da técnica LA-ICP-MS, os quais fizeram a determinação simultânea de Ba, Be, Bi, Co, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Tl e Zn utilizando padrões de calibração aquosos, sendo apenas para o Cd a necessidade de calibração com materiais de referência certificado.

Com relação a análise direta empregando DBS e GFAAS, o primeiro trabalho foi desenvolvido por Resano e colaboradores para a determinação de Pb (14). Neste trabalho, discos de 3,2 mm de diâmetro foram removidos dos papeis de filtro originas para posterior inserção no forno de grafite. Os resultados obtidos por DBS foram concordantes com aqueles obtidos pelo método convencional (injeção de sangue diluído) utilizando Pt como modificador químico. Neste trabalho foi possível a determinação de Pb utilizando padrão aquoso, simplificando o método de determinação. Os autores comentam que ao final do ciclo

analítico, um resíduo carbonáceo permanece na plataforma de grafite, o qual é removido manualmente pelo analista.

Rello *et al.*,(15), com base no método proposto por Resano *et al.*,(14), utilizaram a HR-CS GFAAS para o monitoramento direto de Pb em DBS, tanto como ferramenta quantitativa quanto como método de triagem. O método de triagem demonstrou alta sensibilidade, com alta taxa de verdadeiro positivo detectados (superior a 95 %) e baixo LOD (*e.g.*, 1 μg L^{-1}), além de demandar pouco tempo para o processamento de uma amostra (*e.g.*, ~10 min).

Tabela 2 - Determinações elementares empregando DBS.

Elemento(s)	Técnica analítica	Forma de análise do DBS	Ano	Ref.
Pb	Tubo de Ni - FAAS	Discos de 8 - 9 mm ø analisados diretamente	1971	(101)
Pb	Tubo de Ni - FAAS	Discos de 8 - 9 mm ø inserido diretamente no tubo de Ni. Amostras com valores anormais de hemoglobina.	1978	(104)
Pb	GFAAS	Extração dos discos de 6,35 mm com solução de HNO_3 5% (v v^{-1}) e 0,75 % (v v^{-1}) Triton X-100.	1995	(105)
Pb	GFAAS	Extração dos discos de 0,6 cm com solução de HNO_3 5% (v v^{-1})	2003	(106)
Pb	GFAAS	Extração dos discos de 6 mm ø com solução de EDTA e $(NH_4)_2HPO_4$, HNO_3 e Triton X-100	2004	(107)
Pb	LA-ICP-TOF-MS	Análise direta	2007	(102)
Pb	ICP-MS	Extração dos discos de 6 mm ø com solução de Triton X-100 e EDTA e posteriormente solução de HNO_3 diluído contendo o elemento Tb como padrão interno	2007	(108)
Pb	GFAAS	Discos de 3,2 mm ø analisados diretamente	2007	(14)
Pb	HR-CS GFAAS	Discos de 3,2 mm ø analisados diretamente	2008	(109)
Cd, Hg e Pb	ICP-MS	Extração dos discos de 6,35 mm ø com solução contendo HCl, L-cisteína e 10 μg L^{-1} de Ir e Rh.	2009	(110)
Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Tl e Zn	LA-ICP-MS	Análise direta	2011	(103)
Ca, Cd, Cr, Cs, Fe, K, Li, Mg, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, S e Zn	SF-ICP-MS	Extração dos discos ~ 8 mm ø (cortado ao meio) com solução de HNO_3	2011	(111)
As, Cd, Pb, Hg e Se	ICP-MS	Digestão com HNO_3 a 90 °C por *overnight*	2012	(112)
Pb	ICP-MS	Pb extraído dos discos de 4,76 mm ø com solução HNO_3 contendo o elemento Tb como padrão interno	2012	(113)

Continua

Continuação

Elemento(s)	Técnica analítica	Forma de análise do DBS	Ano	Ref.
As, Cd, Cu, Pb, Mo, Se e Zn	ICP-MS	Discos digeridos com HNO_3 e H_2O_2 a 65 °C por 4 h	2014	(114)
Cd, Co, Cu e Pb	LA-SF-ICP-MS	Análise direta	2015	(99)
Pb	HR-CS GFAAS	Discos de 3,2 mm ø analisados diretamente	2015	(15)
As, Cu, Fe, K, Mg, Se e Zn	ICP-MS	Extração de dois discos de 3,2 mm ø com solução	2017	(115)
MeHg	GC-CVAFS	Discos de 3 mm ø lavados com HCl 10% (v v^{-1}) e posteriormente digeridos com KOH 25% (v v^{-1} em metanol (aquecimento ~140 °C / 4 h).	2017	(116)
Al, As, Ba, Ca, Cu, Fe, K, I, Li, Mg, Na, P, Pb, Rb, S, Sb, Tl, V e Zn	LA-ICP-MS	Análise direta empregando ^{13}C e ^{32}S como IS.	2017	(117)
Hg	Analisador de Hg	Discos de 3 mm ø analisados diretamente	2018	(118)
Gd	LA-ICP-MS	Análise direta	2019	(119)
Hg	Analisador de Hg	Análise direta	2020	(120)
Li	GFAAS	Extração dos discos de 8 mm ø com solução 1 % de HNO_3 e 0,1 % de Triton X-100	2020	(121)

3. Objetivos

O objetivo desta Tese de Doutorado consiste no desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de análise elementar por espectrometria atômica e molecular com ênfase em sensibilidade, calibração e preparo de amostras.

3.1. Objetivos específicos

(i) Desenvolver e avaliar um circuito de descarga elétrica (SD) para ser acoplado a um sistema LIBS visando o aumento de sensibilidade para a determinação de fósforo em fertilizantes.

(ii) Desenvolver uma nova estratégia de calibração com padrão único utilizando SD-LIBS; como prova de conceito, aplicar a proposta na determinação de Al em folhas de plantas e de P em fertilizantes.

(iii) Avaliar a estratégia MEC para a determinação de N, S, P por HR-CS FMAS e de Cl por HR-CS GFMAS.

(iv) Desenvolver um método minimamente invasivo, simples, rápido e de baixo custo para a determinação de Fe e Zn em amostras de sangue por HR-CS GFAAS empregando análise direta de sólidos (DBS).

4. Descarga elétrica como estratégia de aumento de sensibilidade em LIBS: determinação de fósforo em fertilizantes

4.1. Introdução

O fósforo desempenha um papel importante em vários processos metabólicos das plantas tais como fotossíntese, várias reações enzimática e redox, metabolismo de carboidratos, fixação de nitrogênio (122,123). Como o P geralmente está presente em baixas concentrações nos solos de cultivos (124), a sua reposição via fertilizantes fosfatados é amplamente utilizada na agricultura. Em nível mundial, cerca de 40 bilhões de toneladas de fertilizantes foram consumidos em 2000, e a expectativa para o consumo entre 2030 e 2040 é de 55 a 60 bilhões de toneladas ao ano (123,125). O problema é que as principais fontes de rochas fosfáticas estão se exaurindo, com estimativas de término entre 2060 e 2080 (123).

O procedimento estabelecido pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para a determinação de P em fertilizantes utiliza a digestão ácida de 1,5 g de amostra em 5 mL de H_2SO_4 + 2 mL de H_2O_2, e aquecimento a 250 °C por 3 h (126). Desta forma, o desenvolvimento de um método simples, rápido, direto e robusto é relevante no contexto do aumento do uso de fertilizantes fosfatados devido ao aumento da população global, bem como ao fato das fontes de rochas fosfáticas não serem renováveis.

Nos últimos anos, LIBS foi empregada para a determinação de fósforo em rochas fosfáticas (127,128), fertilizante mineral (129,130) e fertilizante orgânico (131,132). Por outro lado, a aplicação de LIBS para a determinação de P, bem como outros elementos, em grande parte está limitada a falta de sensibilidade, principalmente em equipamentos LIBS com arranjo óptico, espectrômetro, detector e *laser* menos sofisticados. Deste modo, diversos esforços são demandados para obtenção de melhor sensibilidade em LIBS, como é o caso do uso de um detector CCD intensificado (127,128), LIBS duplo-pulso e detector CCD intensificado (131), LIBS multi-pulso (133), RELIBS (40), LIBS-LIFS (8) e SD-LIBS (43,48–51,53,55,58). Por outro lado, muitas dessas estratégias requerem uma fonte de *laser* adicional e/ou arranjo óptico elaborado, os quais acarretam em maior custo e complexidade (48–51,54,55,57).

Em contra partida, o sistema SD-LIBS representa um meio simples e de baixo custo para incremento do sinal de emissão (*i.e.*, aumento da sensibilidade) através do reaquecimento do plasma por uma descarga elétrica (43,48–51,53–55,58). Na última década, muitos esforços foram demandados para o desenvolvimento, estudo e aplicação dos sistemas SD-LIBS para aumento de sensibilidade, os quais incluem o desenvolvimento de um circuito de descarga elétrica rápida (51,55), estudo sobre a influência da descarga elétrica na temperatura e densidade eletrônica do plasma (53), influência da tensão e capacitância da descarga elétrica

(50), para análise isotópica e molecular (58), análise de liga metálica (43), silício (48) e solo (49,52,54). Em todos estes trabalhos houve um expressivo aumento de intensidade de emissão, demonstrando que o SD-LIBS é uma estratégia promissora para o aumento de sensibilidade em LIBS.

Considerando a versatilidade da técnica LIBS para análise de sólidos, com rapidez, sem demandar de etapas morosas de preparo de amostras, bem como o aumento de sensibilidade proporcionado pelo sistema *spark-discharge*, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e acoplamento de um sistema SD-LIBS visando o aumento de sensibilidade para a determinação de P em fertilizantes.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Reagentes, preparo de amostras e padrões analíticos

Seis amostras de fertilizantes comerciais contendo concentração de P entre 6 e 17 % (expressa como % m m^{-1} em P_2O_5) foram adquiridos no comércio local de Araraquara (São Paulo, Brasil).

Padrões sólidos para compatibilização de matriz foram preparados pela mistura do CRM de rocha fosfática (*Florida Phophate Rock* 120c) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, Gaithersburg, MD, EUA), em uma matriz de $(NH_2)_2CO$ (Merck), $CaCO_3$ (Synth, Diadema, Brasil), $CaSO_4$ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e KCl (Mallinckrodt, Xalostoc, México) em proporções iguais de massas (1:1:1:1). A composição da matriz foi escolhida com base nos principais componentes dos fertilizantes comerciais (130,134). As concentrações finais 4,8 %, 11,9 %, 22,9 %, 27,8 % e 33,34 % (m m^{-1}) P_2O_5 foram obtidas a partir de misturas apropriadas o CRM NIST 120c com a matriz acima, conforme Tabela 3. O branco analítico foi obtido através das pastilhas contendo apenas a matriz.

As amostras de fertilizantes comerciais passaram inicialmente por quarteamento para redução da massa amostral (obtendo porções de *ca.* 200 g). Essas porções, bem como os padrões sólidos da matriz compatibilizada, foram moídos e homogeneizados em almofariz de ágata até obtenção de um pó fino e homogêneo. As amostras, padrões sólidos e brancos analíticos foram secos a 105 °C por 12 h em uma estufa com circulação e renovação de ar (TE-394/2 Tecnal, Piracicaba, SP). Em seguida, porções de 300 mg das amostras, padrões sólidos e brancos analíticos foram compactados em um molde de aço inoxidável aplicando 7,5

t cm^{-2} por 3 min em uma prensa hidráulica (Solab SL - 10/15, Piracicaba, SP), produzindo pastilhas de 13 mm de diâmetro.

Tabela 3 - Massas de CRM NIST 120c e da matriz empregadas na produção dos padrões sólidos utilizados para determinar P por SD-LIBS

% de P_2O_5 (m m^{-1})	massa, mg		
	NIST 120c [a]	Matriz [b]	Total [c]
0	0	900	900
4,8	152,7	900,9	1053,6
11,9	345,3	622,2	967,5
22,9	606,3	300,9	907,2
27,8	752,1	150,6	902,7
33,34	900	0	900

[a] 33,34 % (m m^{-1}) de P_2O_5.
[b] Matriz contendo $(NH_2)_2CO$, $CaCO_3$, $CaSO_4$ e KCl em proporções de 1:1:1:1.
[c] Massa empregada para a produção de três pastilhas (*n* = 3) de *ca*. 300 mg cada.

Ácido nítrico (HNO_3 65 %, v v^{-1}), ácido clorídrico (HCl 30 %, v v^{-1}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 %, m m^{-1}), todos da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), foram empregados para a digestão das amostras de fertilizante, padrões analíticos e rocha fosfática (NIST 120c) em um forno com aquecimento assistido por radiação micro-ondas com rotor de 6 posições em frasco de quartzo (Multiwave, Anton Paar, Graz, Áustria).

Água de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida por Millipore Rios 5™ com osmose reversa e sistema Millipore Milli-Q Academic™ (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos) foi utilizada para preparação dos padrões analíticos e diluição das amostras digeridas.

Soluções analíticas de fósforo com concentrações de 100 a 2000 mg L^{-1} foram preparadas por meio da diluição apropriada do padrão espectroscópico monoelementar de 10000 mg L^{-1} de P (SpecSol, São Paulo, Brasil), sendo todas as soluções analíticas acidificadas de forma a obter a concentração final de 5 % de HNO_3 (v v^{-1}).

A análise dos digeridos para a determinação de P_2O_5 foi feita com HR-CS FAAS como método comparativo (detalhes descritos na seção 4.2.4, pág. 61).

4.2.2. Instrumentação em LIBS

O sistema LIBS utilizado (Figura 11) compreende um *laser* pulsado Q-*switched* Nd:YAG (Quantel, Big Sky Ultra 50, Bozeman, EUA) operando no comprimento de onda

1064 nm, e com 50 mJ de energia máxima, 6 ns de duração de pulso e 300 µm de diâmetro de cratera, resultando em fluência de *ca*. 70 J cm^{-2}.

Figura 11 - Fotografia do sistema LIBS, (a) fonte do *laser*, (b) *laser* Nd:YAG de energia máxima de 50 mJ, (c) câmara de ablação e (d) espectrômetros HR2000+.

Fonte: Autor

No interior da câmara de ablação (Figura 11c), a amostra é posicionada sobre um porta-amostra, com movimento nas direções *x-y* controlado automaticamente pelo analista. Uma lente convergente plano-convexa (distância focal de 120 mm) focaliza o feixe do *laser* na superfície da amostra para promover a ablação. Este processo é monitorado pelo analista por meio de câmera de vídeo.

A emissão do plasma é coletada em ângulo de 45° (em relação a superfície da amostra) por uma lente telescópica, e através de fibras ópticas foi direcionada a 4 espectrômetros HR2000+ (Ocean Optics, Dunedin, EUA). Estes espectrômetros compreendem a faixa espectral de 200 a 620 nm com resolução de 0,1 nm (FWHM: *full width at half maximum*).

4.2.2.1. Sistema SD-LIBS

Um circuito de descarga elétrica de alta tensão foi desenvolvido empregando um circuito primário como transformador, um circuito secundário e um divisor de tensão. Um arranjo descritivo deste circuito está ilustrado na Figura 12. O primeiro circuito contém uma chave *On*/*Off*, uma lâmpada que indica quando o circuito está ligado, um fusível e um

potenciômetro para ajuste da tensão de saída. A taxa de amplificação da tensão no primeiro circuito é de 1:1,35 (de 127 V é capaz de ampliar até 171 V no máximo). A tensão de saída sinusoidal do transformador é multiplicada e retificada por um circuito *Walton-Cockroft*, que consiste em 28 capacitores (1 µF/250 V) e 28 Diodos (1N4007), os quais amplificam a tensão de 171 V (corrente alternada, 60 Hz) para uma tensão de até 4,5 kV (corrente contínua). Um resistor (1 Ω) conectado ao terminal de alta tensão reduz a tensão por um fator de 100 vezes, permitindo o registro da tensão de forma segura via multímetro. Os terminais de alta tensão foram conectados a dois eletrodos cilíndricos de tungstênio puro (uma das pontas de cada um arredondadas) com 100 mm de comprimento e 2,6 mm de diâmetro. As pontas dos eletrodos foram posicionadas de forma a ficarem separadas entre si por 4 mm, a 2 mm da superfície da amostra com auxílio de um suporte articulado (Figura 13). O plasma formado entre as pontas dos eletrodos carregados induz a formação da descarga elétrica, como ilustrado na Figura 13a.

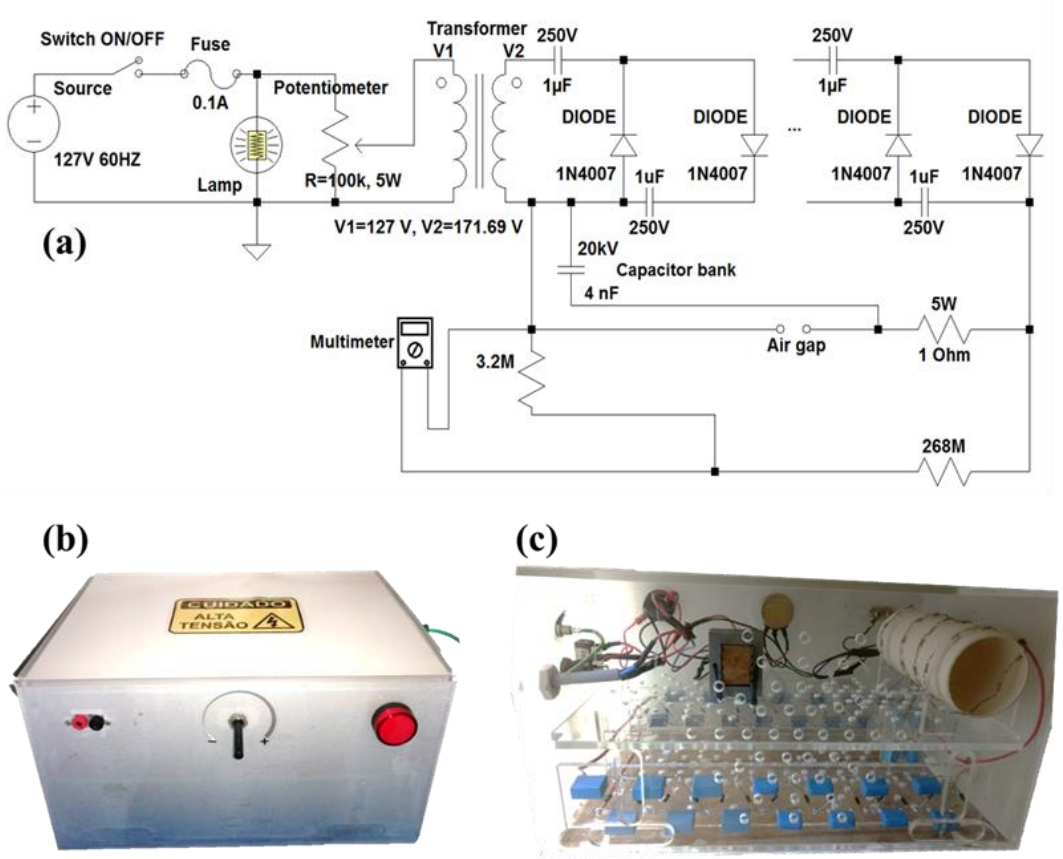

Figura 12 - Circuito gerador de alta tensão: (a) diagrama do circuito eletrônico; fotografias das vistas (b) frontal e (c) interior do equipamento.

Fonte: Autor

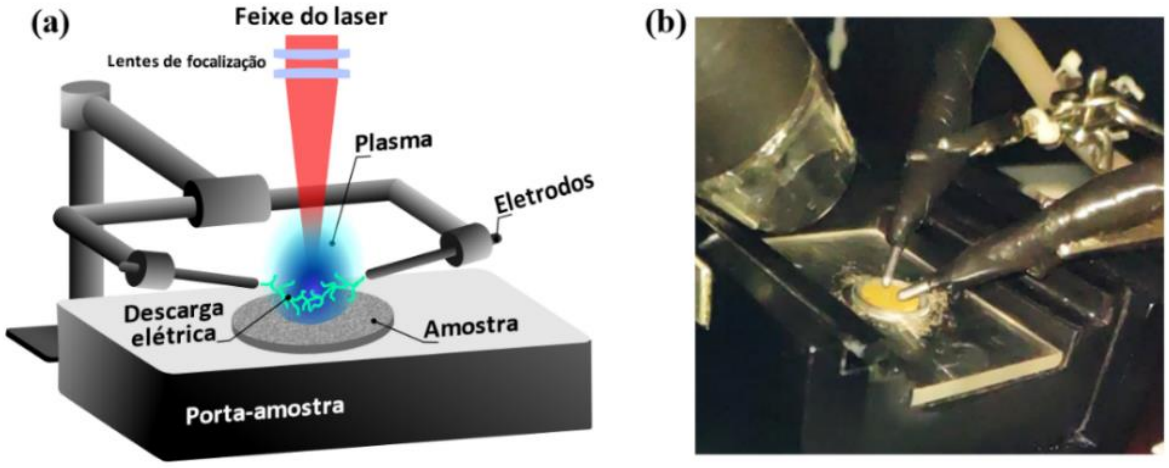

Figura 13 - Equipamento SD-LIBS: (a) ilustração da configuração experimental e (b) fotografia dos eletrodos, amostra e porta-amostra.

Fonte: Autor

Imagens do plasma foram retiradas de um vídeo gravado em 240 frames por segundo por um *smartphone* (Xiaomi Mi 8) para ilustrar o aumento do brilho e volume do plasma quando utilizado o equipamento SD-LIBS. Uma lente de vidro verde empregada em máscara de solda (dimensões 51 x 108 mm; tonalidade 14) foi utilizada como filtro para impedir a saturação do brilho das imagens do plasma.

4.2.3. Análise das amostras por SD-LIBS

As pastilhas preparadas de amostras, padrões sólidos e brancos foram posicionadas manualmente no porta-amostra e analisadas em triplicata (n = 3).

Os espectros de emissão do plasma foram coletados empregando 1 µs de tempo de atraso em relação ao pulso do *laser* e 1 ms de tempo de integração. Todos os experimentos foram conduzidos em atmosfera ambiente.

Trinta espectros foram adquiridos em diferentes posições em cada padrão de calibração e amostra. Estes espectros tiveram a linha base ajustada através dos *softwares* MatLab® (R2010a) e PLS Toolbox empregando a função *Whittaker filter*. Após o ajuste da linha base, a linha P (I) 214,9 nm foi escolhida para as determinações de P_2O_5.

O *software* Excel® (Microsoft Office 2016) foi empregado para a coleta das alturas dos picos da linha P (I) 214,9 nm e tratamento dos dados. Os valores de altura de pico passaram pelo teste de *Grubbs* para identificar possíveis valores anômalos (*outliers*).

4.2.4. Método comparativo para a determinação de fósforo em fertilizante

4.2.4.1. Digestões ácidas assistida por radiação micro-ondas

Porções de 250 mg de cada amostra, padrões sólidos e CRM NIST 120c foram adicionados nos frascos de quartzo do forno mocro-ondas, juntamente com 2,25 mL de HNO_3, 0,75 mL de HCl, 2 mL de H_2O e 1 mL de H_2O_2. Em sequência, os frascos foram fechados, inseridos na cavidade do forno micro-ondas e submetidos ao seguinte programa de aquecimento em três etapas: (i) rampa de 10 min, partindo de 0 até 1000 W; (ii) patamar 10 min em 1000 W; e (iii) 20 min de resfriamento. Os digeridos obtidos foram transferidos para frascos de polipropileno, ajustando o volume final para 20 mL com água deionizada.

4.2.4.2. Determinação de P por HR-CS FAAS

Um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua Analytik Jena ContrAA 300 equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio XBO 301 (GLE, Berlin, Alemanha) foi utilizado para determinação de P nas amostras de fertilizante comercial.

A determinação de P nas amostras foi realizada utilizando a linha 213,617 nm com chama de acetileno (99,7 % de pureza, Air Liquid, SP, Brasil) como combustível e óxido nitroso (99,5 % de pureza, Air Liquid, SP, Brasil) como oxidante. Todas as condições experimentais empregadas para as determinações estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de P_2O_5

Parâmetro instrumental	Condição
Comprimento de onda	213,617 nm
Caminho óptico o queimador	50 mm
Chama de acetileno-óxido nitroso	210 L h^{-1}
Altura de observação	4 mm
Taxa de aspiração	5 mL min^{-1}

4.3. Resultados e discussão

O acoplamento SD-LIBS foi simples, necessitando apenas que o plasma produzido pelo *laser* fosse formado entre os dois eletrodos de tungstênio posicionados sobre o porta-

amostras. Para fins ilustrativos deste acoplamento, fotografias do sistema LIBS com os eletrodos posicionados sobre a amostra, bem como do sistema durante o pulso de *laser* com apenas LIBS e com SD-LIBS (4,5 kV) estão apresentadas na Figura 15.

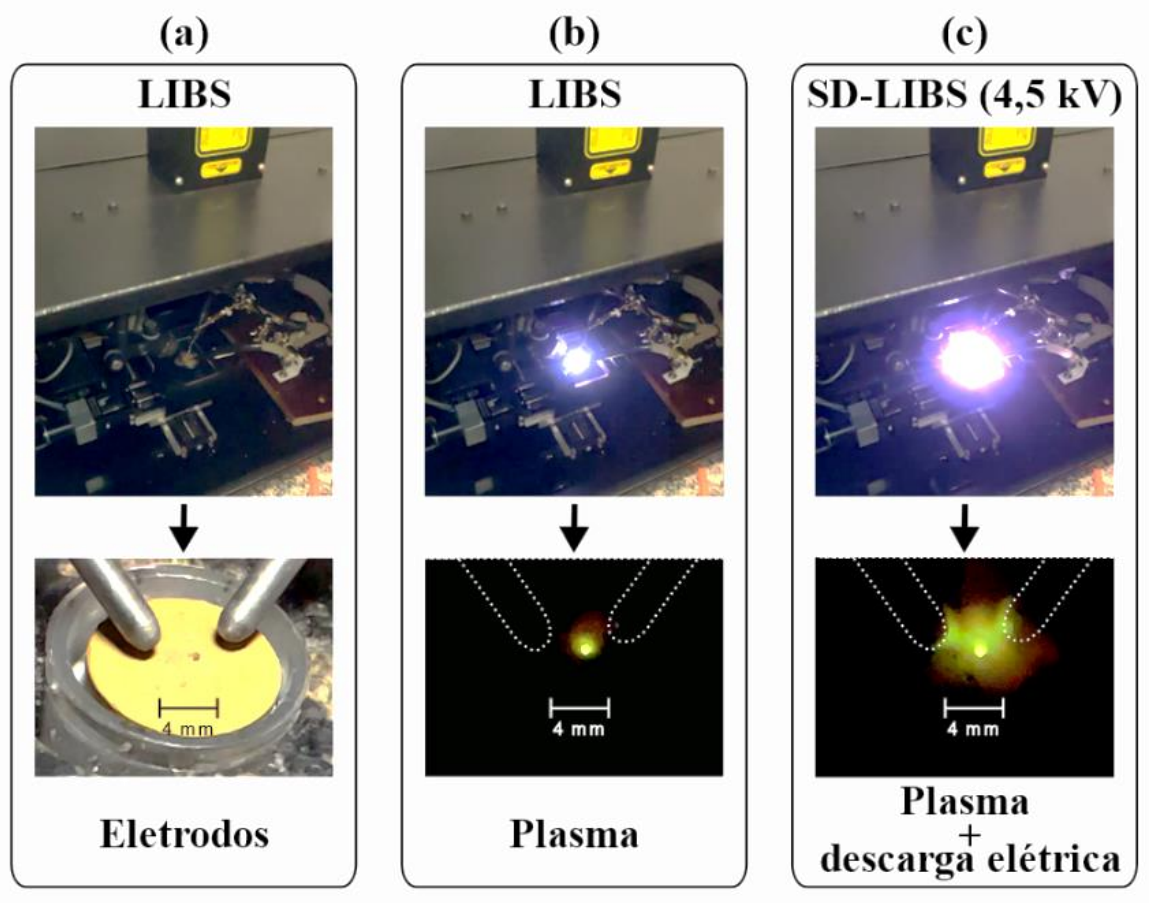

Figura 14 - Fotografias da câmara de amostragem na parte superior e dos eletrodos na parte inferior. As fotos em (a), (b) e (c) correspondem ao sistema SD-LIBS desligado, LIBS em operação e SD-LIBS em operação, respectivamente.

Fonte: Autor

A Figura 15a representa a câmara de amostragem (parte superior) e o posicionamento dos eletrodos sobre a pastilha da amostra (parte inferior). Em mesma perspectiva estão as Figura 15b-c, as quais são referentes ao plasma produzido por LIBS e SD-LIBS. Nestas figuras, na parte inferior, o pontilhado refere-se aos eletrodos, os quais não são visualizados diante do filtro verde utilizado para excluir o excesso de radiação emitida pelo plasma. É possível observar que o SD-LIBS proporciona um aumento expressivo do brilho e do volume do plasma. Estes resultados são similares aos obtidos por

Eschlböck-Fuchs *et al.* (56), os quais registraram imagens do plasma com e sem descarga elétrica, sendo observado um aumento do volume e no tempo de vida do plasma.

Com este sistema o plasma é reaquecido, e as espécies presentes são excitadas em maior número em relação ao LIBS, deste modo é observado um aumento de emissão.

4.3.1. Escolha da linha de emissão de fósforo

O primeiro experimento teve como objetivo identificar uma linha de emissão de fósforo apropriada para a análise quantitativa. Para tanto, a amostra contendo 14 % de P_2O_5 (04-14-08) foi analisada por LIBS e SD-LIBS. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 15. Nesta figura, é possível observar que o sistema LIBS não forneceu linhas de emissão intensas e bem definidas para o fósforo. Por outro lado, cinco linhas de fósforo (213,6, 214,9, 215,4, 253,4 e 253,6 nm) foram observadas com o uso do SD-LIBS (Figura 15), sendo a linha P(I) 253,6 nm a mais intensa.

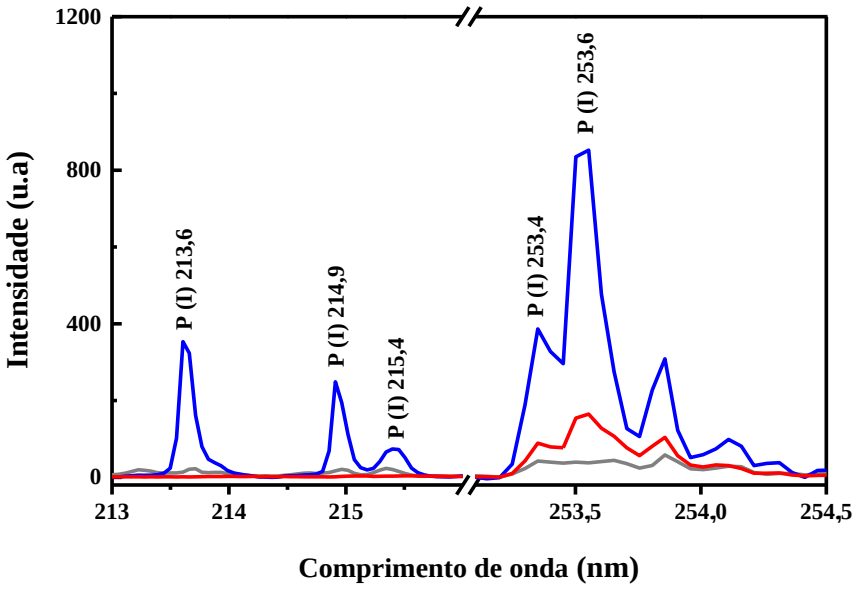

Figura 15 - Espectros LIBS (—) e SD-LIBS (—) obtidos para a amostra 04-14-08 e o espectro SD-LIBS (—) obtido do branco analítico. Os espectros obtidos por SD-LIBS empregaram 4,5 kV.

Fonte: Autor

Para averiguar a possibilidade de algumas destas linhas de emissão serem decorrentes dos eletrodos, um branco analítico (*i.e.*, matriz contendo apenas $(NH_2)_2CO$,

$CaCO_3$, $CaSO_4$ e KCl) foi analisado pelo SD-LIBS empregando 4,5 kV (Figura 15). O espectro obtido pela análise do branco analítico não resultou em linhas de emissões significativas nas proximidades das linhas de emissão do fósforo. Cabe destacar que, em LIBS, interferências espectrais são muito frequentes, as quais dependem principalmente da resolução do espectrômetro e da constituição elementar da matriz. Em alguns casos, interferências espectrais podem prejudicar a exatidão e a precisão do método, em outros, podem inviabilizar a análise quantitativa. Desta forma, as possíveis interferências espectrais causadas pelos elementos comumente presentes em amostras de fertilizantes foram averiguadas utilizando o banco de dados do NIST (135). Neste caso, as prováveis interferências espectrais identificadas são causadas pelo ferro, elemento que é muito comum em amostras de fertilizantes comerciais.

Para confirmar a interferência espectral do ferro nas linhas de fósforo, o material NIST 2709a *San Joaquim Soil* contendo 3,36 ± 0,07 % (m m^{-1}) de Fe e 0,0688 % (m m^{-1}) de P foi analisado por SD-LIBS a 4,5 kV. Os espectros do CRM e da amostra 04-14-08, sobrepostos e apresentados na Figura 16, permite observar que as linhas de emissão do Fe (II) 253,4, 253,7, 253,9 e 254,2 nm causam fortes interferências espectrais na linha mais intensa do fósforo. De modo a confirmar se ferro está presente em elevadas concentrações nas amostras, a ponto de ser um interferente, este elemento foi determinado por HR-CS FAAS e as concentrações obtidas variam de 0,14 a 1,08 % de Fe (m m^{-1}). Estas concentrações são menores que a concentração do CRM NIST 2709a. Contudo, ainda são muito elevadas, o que por sua vez inviabiliza o uso da linha mais intensa de fósforo P (I) a 253,6 nm.

Em contrapartida, na região entre 213 a 216 nm não foram observadas linhas de emissão do ferro (Figura 16). Desta forma, é possível afirmar que o ferro em concentrações inferiores a 3,36 % (m m^{-1}) não causará interferência espectral nesta região, considerando a instrumentação empregada neste trabalho.

Na região de 213 a 216 nm, a linha mais intensa é a P (I) 213,6 nm. Contudo, levando em consideração o espectrômetro empregado, esta linha pode ser interferida pelas linhas de Cu (I) 213,5 nm e Zn (I) 213,9 nm (135). Cabe destacar que, estes elementos fazem parte de algumas formulações de fertilizantes fosfatados (134), e deste modo, a linha P (I) 213,6 poderia ser interferida por esses elementos.

Com relação as linhas P (I) 214,9 e 215,4 nm, interferências espectrais não foram identificadas, tornando-as mais viáveis para as determinações de fósforo em fertilizantes comerciais. Levando em consideração a intensidade relativa, a linha P (I) 214,9 nm (*ca*. de 3,5 vezes mais intensa que a linha 215,4 nm) foi a escolhida para os estudos posteriores.

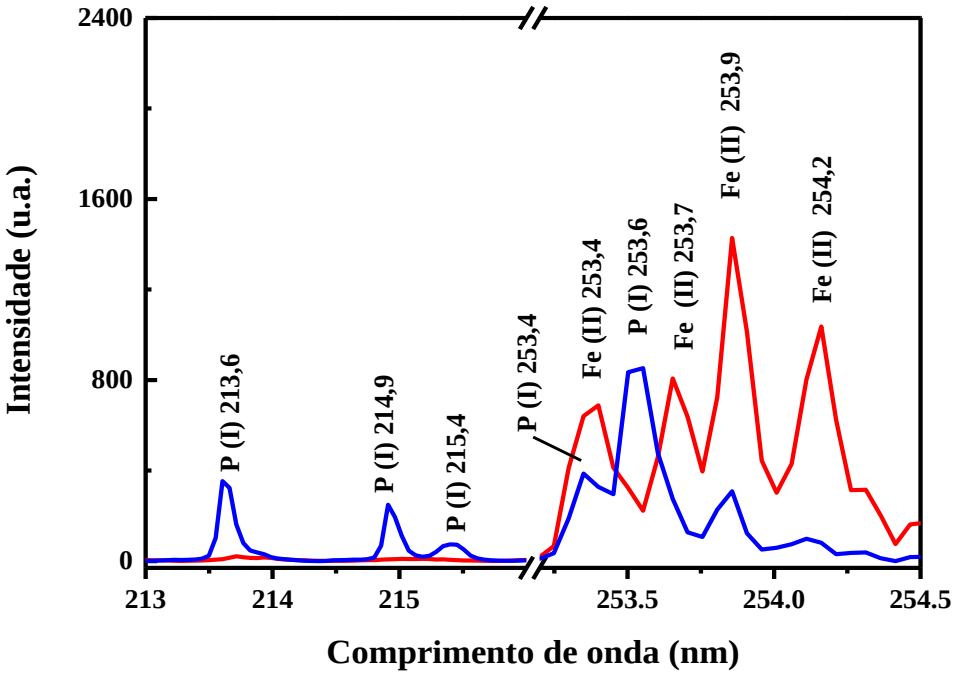

Figura 16 - Espectro do material de referência certificado (*San Joaquim soil* NIST 2709a) (—) e da amostra 04-14-08 (—) obtidos por SD-LIBS empregando 4,5 kV.

Fonte: Autor

4.3.2. Otimização do sistema SD-LIBS

4.3.2.1. Estudo sobre a tensão aplicada

De modo a encontrar a melhor condição para a determinação de fósforo, a intensidade de emissão na linha P (I) 214,9 nm foi monitorada em função da tensão aplicada no intervalo de 0 a 4,5 kV (Figura 17). Neste experimento as pontas dos eletrodos foram fixadas a 4 mm entre si e 2 mm sobre a superfície da amostra. Na Figura 17 é observado que a intensidade de emissão de P (I) 214,9 nm aumenta linearmente com o aumento da tensão no intervalo estudado, com RSD entre 5 % e 40 %. O SD-LIBS, a partir de 2,5 kV, promove um aumento significativo na intensidade de emissão da linha P (I) 214,9 nm em relação ao LIBS (0 kV), devido ao reaquecimento do plasma. Além disso, o aumento da tensão aplicada implica no aumento da intensidade de emissão, uma vez que proporciona o aumento da temperatura e densidade eletrônica do plasma (49–51). Desta forma, a tensão de 4,5 kV foi

escolhida para as análises de fósforo em fertilizante, uma vez que nesta foi obtido a maior intensidade com RSD de 7 %.

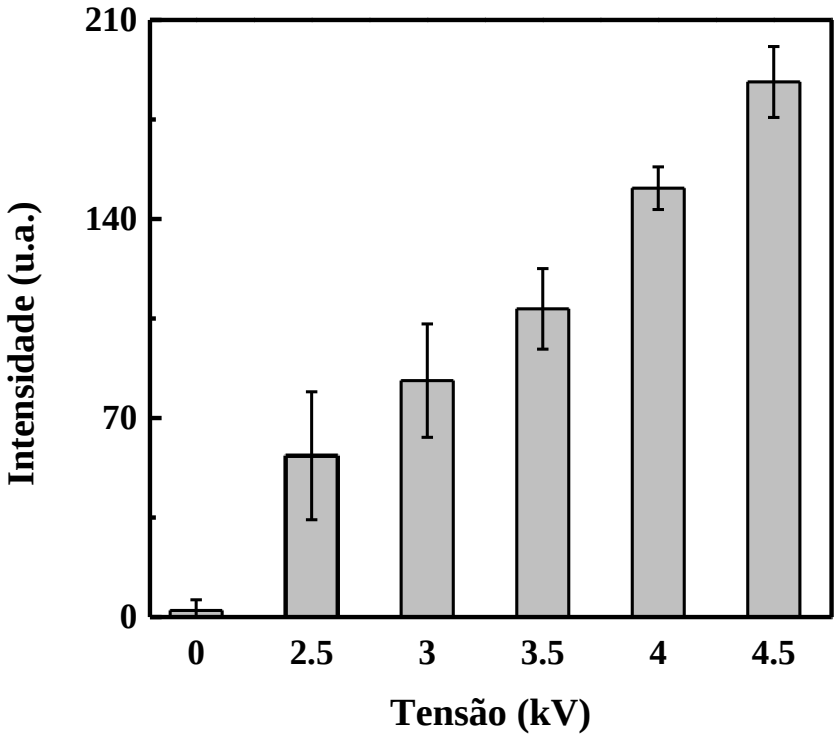

Figura 17 - Intensidade de emissão da linha P (I) 214,9 nm (*n* = 3) em função da tensão aplicada entre os eletrodos.

Fonte: Autor

Cabe destacar que, sem a estratégia do SD (*i.e.*, LIBS convencional) o sinal da linha P (I) 214,9 nm foi muito baixo (2,3 ± 3,7 u.a.), inviabilizando a determinação de P_2O_5 em amostras de fertilizantes comerciais com o sistema LIBS empregado neste trabalho. Por outro lado, a intensidade de 188,2 ± 12,5 (u.a.) foi obtida com o SD-LIBS aplicando 4,5 kV, correspondendo a um incremento de sinal de cerca de 80 vezes em relação ao LIBS. Deste modo, o sistema SD-LIBS proporcionou condições favoráveis para as medidas e determinações do fósforo em fertilizantes comerciais.

4.3.2.2. Otimização do posicionamento dos eletrodos

Com o objetivo de avaliar a influência da distância entre as pontas dos eletrodos na intensidade de emissão da linha P (I) 214,9 nm, os intervalos de 2, 3, 4, 5 e 6 mm foram

avaliados. Neste experimento as pontas dos eletrodos foram mantidas fixas a uma altura de 2 mm sobre a superfície da amostra. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 18. Nesta figura, nota-se que a intensidade de emissão aumenta conforme o espaçamento entre as pontas dos eletrodos aumenta de 2 até 4 mm, e a partir de 4 mm, a intensidade decresce até a distância de 6 mm. Cabe destacar que em distâncias inferiores a 2 mm e superiores a 6 mm, a descarga não ocorre em função da formação do plasma produzido pelo *laser*, sendo esta iniciada antes do plasma em distâncias inferiores a 2 mm e não iniciada em distâncias superiores a 6 mm.

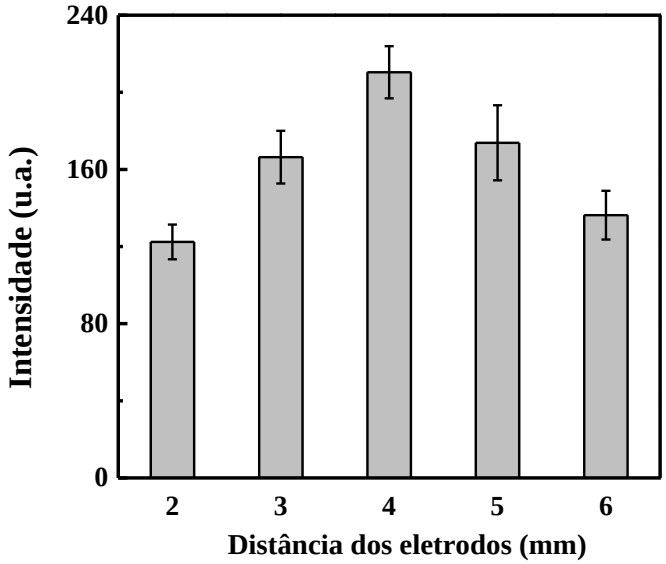

Figura 18 - Intensidade da linha de emissão P (I) 214,9 nm (*n* = 3) em função da distância das pontas dos eletrodos empregando a tensão de 4,5 kV.

Fonte: Autor

Em distâncias mais curtas (entre 2 e 3 mm), a descarga elétrica é formada mais facilmente, de modo que o arco elétrico percorra o menor caminho, passando através do topo do plasma, e não em seu interior. Deste modo, uma parte dos átomos no interior do plasma não são re-excitados pela descarga elétrica, resultando em uma intensidade menor nestas distâncias. Em contra partida, as distâncias superiores (*i.e.*, 5 e 6 mm) ocasionam em perda de eficiência em re-excitar os elementos presentes no plasma, visto que a maior distância proporciona maior rigidez dielétrica, sendo parte da energia da descarga elétrica gasta para ionização dos gases presentes na atmosfera entorno dos eletrodos. Estes resultados são concordantes com a lei de Paschen, a qual afirma que a tensão de ruptura a uma certa

distância entre as pontas dos eletrodos é uma função do produto da pressão do gás e da distância (136).

Portanto, 4 mm de distância entre as pontas dos eletrodos foi a condição escolhida para análise das amostras de fertilizantes, uma vez que nesta condição foi obtido a maior intensidade com RSD de 6 %.

4.3.3. Determinação de P por SD-LIBS

Após as otimizações descritas acima, a curva de calibração externa foi construída para as análises das amostras. Primeiramente, uma curva de calibração empregando concentrações crescentes de P_2O_5, com $NaHPO_4$ como padrão, foi construída sobre uma matriz contendo $(NH_2)_2CO$, $CaCO_3$, $CaSO_4$ e KCl em proporções de massa de 1:1:1:1. Nesta condição, apesar de obtido coeficiente de correlação linear > 0,9, a exatidão foi baixa, resultando em concentrações de fósforo aproximadamente duas vezes menores que àquelas determinadas por HR-CS FAAS. Deste modo, é possível inferir que há forte efeito de matriz entre as amostras e os padrões empregados para calibração, resultando diferentes processos de interação *laser*/amostra e de formação do plasma (4,128).

Considerando que a maioria dos fertilizantes comerciais contém em sua composição rocha fosfática, o $NaHPO_4$ foi substituído pelo CRM de rocha fosfática (*Florida Phosphate Rock*, NIST 120c) para produzir padrões sólidos com 4,8, 11,9, 22,9, 27,8 de 33,34 % (m m^{-1}) de P_2O_5 (Tabela 3). A curva de calibração obtida está apresentada na Figura 19. Esta curva de calibração resultou em coeficiente de correlação > 0,99 e RSD ≤ 8 %.

O limite de quantificação (LOQ) foi calculado de acordo com a IUPAC, ou seja, $LOQ = \frac{10\sigma}{\alpha}$, sendo σ, o desvio padrão de 10 medidas do branco analítico (matriz contendo ureia, $CaCO_3$, $CaSO_4$ e KCl) e α a inclinação da curva analítica. Desta forma, o LOQ foi de 5,3 % (m m^{-1}) P_2O_5, que equivalente a 2,3 % (m m^{-1}) P. Embora o LOQ ser considerado aceitável para as determinações de fósforo em fertilizante comerciais (127,134), este valor pode ser melhorado empregando o procedimento de acúmulo de espectros para aumentar a sensibilidade. Em particular, com uso desta estratégia o LOQ foi reduzido para 3 % (m m^{-1}) P_2O_5 quando se acumulou dez espectros em cada ponto da pastilha. Cabe ressaltar que, devido às limitações do LIBS empregado neste trabalho, o processamento dos dados associados ao acúmulo de sinal foi desenvolvido empregando o programa Microsoft Office Excel (2016).

Contudo, as concentrações determinadas nas amostras analisadas neste trabalho tiveram seus valores superiores ao LOQ sem o acúmulo de espectro, e desta forma, este procedimento não foi necessário.

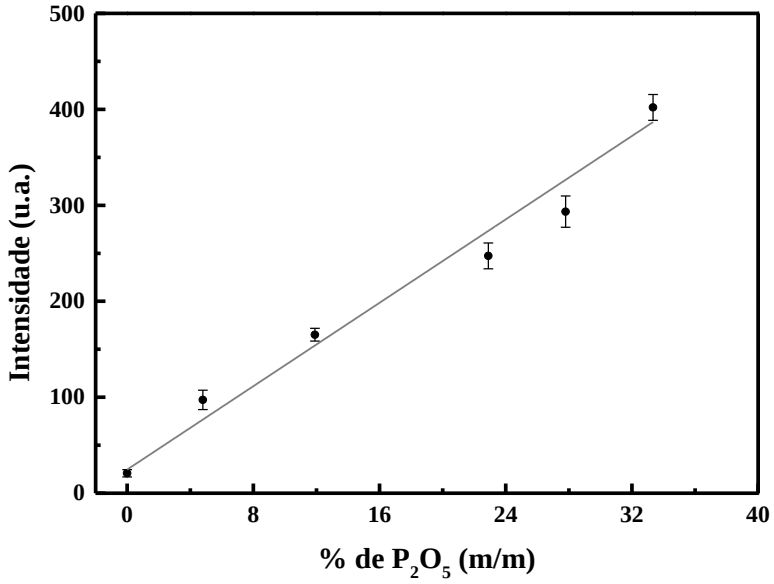

Figura 19 - Curva de calibração (*n* = 3) obtida por SD-LIBS (4,5 kV) empregando a linha P (I) 214,9 nm para determinação de P_2O_5 em fertilizantes.

Fonte: Autor

Após a obtenção de curvas de calibração consistentes por SD-LIBS, as amostras e CRMS foram analisadas e as concentrações de P_2O_5 obtidas estão apresentadas na Tabela 5. As concentrações variaram de 6,8 a 16,6 % (m m^{-1}) P_2O_5 e a precisão variou de 2 a 9 % (RSD). Os teores de P_2O_5 obtidos estão em concordância aqueles especificados pelos fabricantes nos rótulos dos produtos comerciais (134). Ainda, as concentrações determinadas pelo método proposto foram concordantes com àquelas determinadas por HR-CS FAAS ao nível de 95% de confiança (teste *t-Student* pareado). Para a avaliação da precisão e exatidão do método proposto, o material NIST 120c também foi analisado (Tabela 5). A exatidão expressa em % de recuperação, foi de 99 %, e RSD igual a 6 %. Além do mais, a concentração determinada pelo método proposto foi concordante c-om a concentração certificada ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5 - Resultados da determinação (média ± SD, *n* = 3) de P expressos como % (m m^{-1}) P_2O_5 nas amostras e no CRM NIST 120c obtidas por SD-LIBS e HR-CS FAAS

Amostra (N-P-K)[a]	SD-LIBS[b]	HR-CS FAAS[c]
04-14-08	15,0 ± 1,0	14,6 ± 0,4
09-06-09	6,8 ± 0,6	6,5 ± 0,2
08-12-10	10,8 ± 0,3	11,1 ± 0,4
08-09-09	9,7 ± 0,6	9,2 ± 0,1
00-17-00	16,4 ± 0,7	17,2 ± 0,4
00-17-00	16,6 ± 0,3	17,3 ± 0,5
NIST 120c[d]	33,0 ± 2,0	33,6 ± 0,4

[a] % de N, P, K. [b] LOQ = 5,3 %. [c] LOQ = 4,1 %. [d] Valor certificado: 33,34 ± 0,06 %.

4.4. Conclusões parciais

O desenvolvimento do sistema SD acoplado ao LIBS baseou-se no desenvolvimento de um circuito elétrico, capaz de produzir uma tensão modular entre 0 a 4,5 kV, conectado a dois eletrodos de tungstênio puro sobre a superfície da amostra. O acoplamento SD-LIBS não requer nenhuma sincronização entre o pulso do *laser* e a descarga elétrica, sendo a ocorrência desta última em função da formação de espécies condutoras decorrentes do plasma induzido pela interação *laser* e amostra. Isso confere simplicidade a esta estratégia de incremento de sensibilidade, principalmente quando comparado com sistema de DP-LIBS.

Os estudos acerca das otimizações experimentais do sistema SD-LIBS apontam que as melhores condições para análise de fósforo em fertilizante são obtidas empregando 4 mm de distância entre a ponta dos eletrodos e 4,5 kV de tensão.

O sistema LIBS empregado neste trabalho não foi capaz de gerar espectros com linhas de emissão P para determinações quantitativas. Por outro lado, o SD-LIBS foi capaz de fornecer condições favoráveis para o aparecimento das linhas de emissão de fósforo, e em relação a linha de emissão P (I) 214,9 nm, o incremento foi de cerca de 80 vezes.

Apesar de não ser trivial o desenvolvimento de um circuito elétrico de alta tensão em laboratórios de pesquisas, acredita-se que, com base neste estudo, bem como em outros disponíveis na literatura, o sistema SD pode facilmente se tornar um produto comercial, de

modo que o analista possa comprá-lo para acoplar ao LIBS, visto a simplicidade de acoplamento, o baixo custo para confecção e o ganho em informação analítica.

Desta forma, a estratégia SD-LIBS é promissora para mais aplicações a outros analitos e amostras.

5. Calibração com padrão único assistida por descarga elétrica em LIBS: determinação de Al e P em amostras agroindustriais

5.1. Introdução

O interesse em LIBS para a análise elementar aumentou muito nos últimos anos devido a sua capacidade de analisar amostras variadas originadas de ambientes atmosféricos (137), terrestres (138) e aquáticos (20,32) e missões planetárias (5,33). Embora a LIBS tenha diversas virtudes para uma análise química, quando o foco é quantitativo, a falta de padrões sólidos de calibração com matriz semelhante à da amostra, contendo diferentes concentrações do analito, os efeitos de matriz, bem como a falta de sensibilidade, tornam-se um inconveniente desta técnica.

Com relação sensibilidade limitada, muitas estratégias foram propostas para superar esta limitação, como por exemplo o uso do DP-LIBS (131,133), LIBS-LIFS (8), RELIBS (40), *microwave-assisted* LIBS (139), *nanoparticle enhanced* LIBS (140), confinamento magnético (42,141), confinamento espacial (41) e SD-LIBS (54,142). Esta última representa uma estratégia simples e robusta para aumento de sensibilidade, como demonstrado em diversos trabalhos (43,48,142–145,49,51,52,54,55,57,59,60).

No tocante a calibração, as estratégias de calibração multivariada (146,147), MMC (148), SA (149) e calibração externa com IS (64) são geralmente limitadas pela falta de materiais de referência certificados ou falta de padrão e/ou diluentes apropriados para compatibilização de matriz.

De modo a contornar a falta de padrões sólidos para calibração, a estratégia CF-LIBS (67) foi desenvolvida, a qual utiliza a intensidade de emissão do analito, bem como as propriedades do plasma (*i.e.*, temperatura e densidade eletrônica) para determinar a concentração do analito. Apesar de suas vantagens, a imprecisão obtida com a CF-LIBS, a torna uma ferramenta mais adequada para fins qualitativos (67).

Outras estratégias recentes foram propostas para fins quantitativos utilizando apenas um padrão para calibração, por exemplo CFI-LIBS (70), *one-point calibration* para CF-LIBS (69), *single-sample calibration* (73), *two-point calibration transfer* (TPCT) (147), MLC (72) e SRC (75), ou outras que utilizam a adição em duas frações iguais da amostra um padrão e de um diluente, sendo estas a MEC (71) e a *one-point gravimetric standard addition* (OP GSA) (74).

Com relação a CFI-LIBS e *one-point calibration* para CF-LIBS, ambas permitem a determinação empírica de parâmetros experimentais e espectroscópicos essenciais, através da análise de um padrão com matriz semelhante à da amostra. Deste modo, obtém-se uma

melhor precisão da estratégia CF-LIBS em ambos os casos; contudo, estas estratégias são mais promissoras para amostras mais homogêneas, tais como ligas metálicas.

A *single-sample calibration* baseia-se na equação de Lomakin-Scherbe, a qual não necessita do cálculo da temperatura e densidade eletrônica do plasma, tornando a determinação mais simples (73).

Em MLC, as intensidades de várias linhas de emissão do analito, tanto na amostra quanto no padrão, são utilizadas para calibração, neste caso especifico os autores utilizaram um padrão interno para melhorar a precisão dos resultados (72).

A estratégia MEC e OP GSA são baseadas na análise de duas porções da amostra, as quais são constituídas pela mistura da amostra mais diluente e amostra mais padrão. Com relação ao número de linhas de emissão utilizadas para a determinação do analito, em MEC utiliza-se três ou mais, enquanto em OP GSA apenas uma (71,74).

As estratégias SRC e TPCT baseiam-se na inclinação do gráfico gerado pelo acúmulo de sucessivos pulsos do *laser* no padrão e na amostra. No caso da SRC o gráfico é obtido através de cinco níveis de acúmulo de pulsos, e a TPCT são apenas 2 pontos (75,147).

Cabe destacar que em todas as estratégias que utilizam um padrão de calibração, é desejável que a matriz da amostra e do padrão seja a mais similar possível. No caso do MEC e OP GSA, é desejável que o padrão adicionado tenha uma matriz próxima ao diluente, para que as duas porções da amostra (amostra + padrão, e amostra + diluente) tenham matriz compatibilizadas. Embora estes métodos possam minimizar os efeitos da matriz, eles são limitados pela disponibilidade do padrão de calibração e/ou diluente sólido.

Diante das estratégias apresentadas, o uso de apenas um padrão para produzir diferentes intensidades (através do monitoramento de várias linhas de emissão ou através do acúmulo de pulsos do *laser*) parece viável e promissor para ser usado para calibração em LIBS. Além disso, a recente proposta de um sistema SD-LIBS para aumento de sensibilidade na determinação de P em fertilizantes (142) demonstrou que a intensidade de emissão do analito aumenta linearmente com o aumento da tensão, podendo vir a ser uma estratégia promissora para calibração.

Este estudo tem como objetivo desenvolver uma nova estratégia de calibração denominada de *spark-discharge assisted single standard calibration* (SD-SSC) para calibração em LIBS. Este método requer análise da amostra e de um padrão único de calibração em duas voltagens distintas. Este método de calibração é simples e de fácil utilização, o qual teve o desempenho verificado através da determinação de Al em CRMs de

folhas de plantas e de P em amostras de fertilizantes comerciais. Os resultados obtidos foram comparados com os métodos MLC e SRC.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Instrumentação

Um *laser* pulsado Q-*switched* Nd:YAG (Quantel, Big Sky Ultra 50, Bozeman, EUA) operando no comprimento de onda em 1064 nm, com duração de pulso de 6 ns, e potência de 48,7 ± 0,4 mJ (n = 10 pulsos, mensurados com medidor de energia Coherent, FieldMaxII-P, Santa Clara, EUA). Este equipamento contém uma câmara de ablação, e no interior desta, há (i) um porta-amostra, com movimento, nas direções *x*-*y*, controlado automaticamente pelo analista, (ii) uma lente convergente plano-convexa (distância focal de 120 mm) para focalizar o feixe do *laser* na superfície da amostra, e (iii) uma câmera de vídeo para o analista acompanhar e guiar o procedimento de ablação. Uma fotografia do sistema LIBS utilizado neste capítulo está apresentada na Figura 11, pág. 58.

A emissão do plasma foi coletada em ângulo de 45° (em relação a superfície da amostra) por uma lente telescópica, e através de fibras ópticas, direcionada a 4 espectrômetros HR2000+ (Ocean Optics, Dunedin, EUA). Estes espectrômetros compreendem uma faixa espectral de 200 a 620 nm com resolução de 0,1 nm (FWHM).

O circuito SD já apresentado foi o utilizado. Detalhes do sistema SD-LIBS estão descritos no tópico 4, seção 4.2.2.1.

5.2.2. Reagentes e amostras

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida por um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5® com deionizador Millipore Milli-Q Academic® (Bedford, MA, EUA) e ácido nítrico a 65 % (v v^{-1}) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usadas para preparar todas as soluções.

Ácido nítrico 65 % (v v^{-1}), ácido clorídrico 32 % (v v^{-1}) e peróxido de hidrogênio 30 % (m m^{-1}), todos Merck (Darmstadt, Alemanha) foram utilizados para digestão das amostras de fertilizantes.

Para a determinação de P nos digeridos das amostras, soluções analíticas de P com concentrações de 100 a 2000 mg L^{-1} foram preparadas por meio da diluição apropriada do padrão espectroscópico monoelementar de 10000 mg L^{-1} de P (SpecSol, São Paulo, Brasil), sendo todas as soluções analíticas acidificadas de forma a obter a concentração final de 5 % de HNO_3 (v v^{-1}).

Seis amostras de fertilizantes comerciais contendo diferentes teores de P (P_2O_5 %, m m^{-1}) foram adquiridas no comércio local de Araraquara (São Paulo, Brasil).

Os CRMs *Apple Leaves 1515*, *Spinach Leaves 1570a*, *Tomato Leaves 1573a*, todos do NIST, foram utilizados como padrão único de calibração e/ou para validação do método proposto para determinação de Al em amostras de folhas de plantas.

O CRM de rocha fosfática NIST 120c foi utilizado como padrão de referência para a calibração para determinação de P em fertilizantes comerciais.

Carbonato de cálcio (99 % de pureza, Synth, Diadema, Brasil) foi utilizado como branco analítico para calcular o LOQ de P_2O_5.

O CRM de *Rice Flour 1568a* (NIST, Gaithersburg, MD, EUA) foi empregado como branco analítico para calcular o LOQ de Al.

5.2.3. Preparo de amostra e procedimentos analíticos

As amostras de fertilizantes comerciais passaram por uma etapa de quarteamento para redução da massa amostral (cerca de 1 kg), obtendo porções de aproximadamente 250 g. Essas porções foram moídas e homogeneizadas em um almofariz de ágata até obtenção de um pó fino e homogêneo. As amostras e brancos analíticos foram secos a 105 °C por 12 h em uma estufa com circulação e renovação de ar.

Como método comparativo para a determinação de fósforo, as amostras de fertilizantes foram digeridas em forno de micro-ondas e posteriormente analisadas por HR-CS FAAS. Este procedimento foi aquele descrito na seção 4.2.4.

Porções de 250 mg das amostras, CRMs e brancos analíticos foram compactados em um molde de aço inoxidável aplicando 7,5 t cm^{-2} por 3 min através de uma prensa hidráulica, resultando em pastilhas de 13 mm de diâmetro. As pastilhas das amostras, CRMs e brancos analíticos, posicionadas no porta-amostras, foram analisadas em triplicata (n = 3). Todas as medidas foram realizadas em pressão atmosférica com SD-LIBS, sendo os eletrodos posicionados com pontas dispostas a 4 mm entre si e 2 mm acima da superfície da amostra.

Os espectros de emissão do plasma foram coletados empregando 1 µs de tempo de atraso em relação ao pulso do *laser* e 1 ms de tempo de integração. Dez espectros foram coletados em diferentes posições em cada replicata da amostra e material de referência certificado.

As linhas Al (I) 308,2 nm e P (I) 214,9 nm foram utilizadas para a determinação dos analitos. As alturas destes picos foram obtidas mediante ao ajuste da linha base através da planilha *Chromatograms and spectra handling* (*i.e.*, uma planilha em *software* Excel® automatizada para obtenção de área e altura de pico) desenvolvida por Vieira *et al.*, (150).

O *software* Excel® (Microsoft Office 2016) foi empregado para o tratamento dos dados. Os valores de altura de pico passaram pelo teste de *Grubbs* para identificar possíveis valores anômalos (*outliers*).

5.2.4. Fundamentação da metodologia SD-SSC LIBS

Na espectrometria de emissão atômica, a intensidade de emissão em um determinado comprimento de onda ($I_{(\lambda_{ij})}^{ji}$) está diretamente relacionada à concentração do analito (C) e à energia de transição do estado excitado (E_j) (151), de acordo com a Equação 1:

$$I_{(\lambda_{ij})}^{ji} = \frac{FCA_{ji}g_j}{Q(T)} e^{-E_j/k_BT} \qquad \textbf{Equação 1}$$

Onde F, A_{ji}, g_j, $Q(T)$, k_B e T são referentes a constante de proporcionalidade instrumental, probabilidade de transição, degenerescência no estado excitado, função de partição, constante de Boltzmann e temperatura, respectivamente.

Com base na Equação 1, para um determinado analito com concentração C em uma determinada matriz, a intensidade de emissão I em um determinado comprimento de onda, pode ser descrita através da Equação 2 (151).

$$I = mC \qquad \textbf{Equação 2}$$

Onde m é a constante de proporcionalidade instrumental do LIBS.

Considerando a Equação 2, quando SD-LIBS é empregado, melhores condições de temperatura e densidade eletrônica do plasma são atingidas, e consequentemente, maiores intensidades de emissão são obtidas. De forma genérica, quando o sistema SD-LIBS é utilizado, a intensidade de emissão pode ser expressa através da Equação 3.

$$I = mCV \qquad \textbf{Equação 3}$$

Onde V é a tensão aplicada pelo sistema SD-LIBS.

Considerando que o aumento da tensão proporciona um aumento da intensidade de emissão de um analito em uma matriz, e sendo este processo linear, curvas de tensão *versus* intensidade de um padrão único de calibração e uma amostra com diferentes concentrações do analito resultarão em coeficiente angulares iguais, como ilustrado na Figura 20.

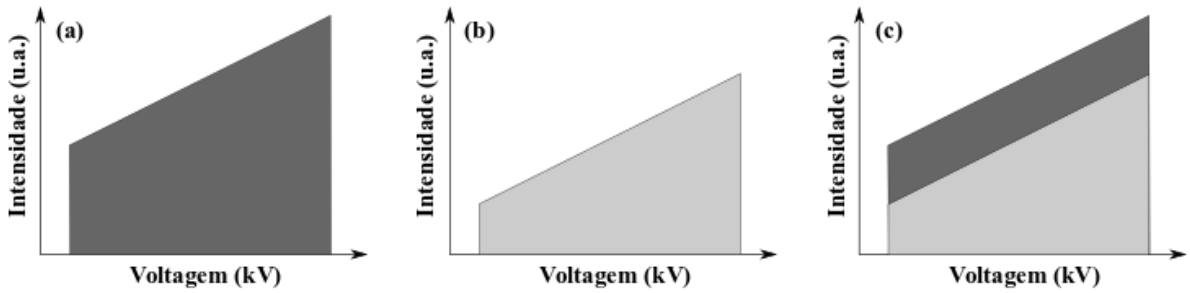

Figura 20 - Ilustração de curvas de intensidade versus tensão obtidas para (a) padrão único de calibração, (b) amostra e (c) sobreposição das áreas em ambos os gráficos.

Fonte: Autor

Desta forma, tanto a intensidade de emissão (I) quanto a área abaixo da reta (A), ilustrada na Figura 20, são proporcionais a concentração do analito (C). Considerando a sessão do gráfico entre uma V_1 e V_2, a área (A) desta sessão pode ser obtida através da Equação 4.

$$A = \frac{V_2 - V_1}{2}(I_1 + I_2) \qquad \textbf{Equação 4}$$

Sendo I_1 e I_2 as intensidades obtidas nas voltagens V_1 e V_2, respectivamente.

Considerando a análise do padrão único de calibração (Figura 20a) bem como a amostra (Figura 20b) nas mesmas condições do plasma, suas respectivas áreas podem ser comparadas (Figura 20c) entre si, e igualadas em função de $\frac{V_2-V_1}{2}$. Os valores das áreas podem então ser substituídos por suas respectivas concentrações, isto é, $A_{padrão} = C_{padrão}$; $A_{amostra} = C_{amostra}$) resultando na Equação 5:

$$C_{amostra} = C_{padrão} \frac{(I_1 + I_2)^{amostra}}{(I_1 + I_2)^{padrão}} \qquad \textbf{Equação 5}$$

Na equação 5, a concentração da amostra ($C_{amostra}$) é facilmente calculada através das intensidades I_1 *e* I_2, obtidas nas voltagens V_1 e V_2, para ambos, amostra e padrão único de calibração, sendo a concentração deste último conhecida ($C_{padrão}$).

O LOQ do método SD-SSC LIBS foi calculado de acordo com a Equação 6:

$$LOQ = C_{branco} + 10SD_{branco} \qquad \textbf{Equação 6}$$

Em que C_{branco} é a concentração média e SD_{branco}, o desvio padrão de 10 medidas da concentração do branco analítico (152). Carbonato de cálcio e o CRM de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568a) foram empregados como brancos analíticos para a determinação de P e Al, respectivamente. O LOQ encontrado para P (expresso como P_2O_5) e Al foi de 2 % (m m^{-1}) e 117 mg kg^{-1}, respectivamente.

5.2.5. Estratégias comparativas de calibração com único padrão

As estratégias SRC (75) e MLC (72) recentemente propostas na literatura foram utilizadas para a determinação de P em amostras de fertilizantes e Al em amostras de folhas.

A estratégia SRC foi aplicada construindo curvas de intensidade de emissão (I) *versus* acúmulo de 5, 10, 15, 20 e 30 pulsos (N_p). A estratégia SD-LIBS empregando 4,5 kV foi utilizada para registrar as linhas de Al e P. A concentração da amostra ($C^{amostra}$) é calculada com base na Equação 7.

$$C^{amostra} = C^{padrão}\ \frac{b^{amostra}}{b^{padrão}} \qquad \textbf{Equação 7}$$

Onde $b^{amostra}$ e $b^{padrão}$ são os coeficientes angulares das curvas de *I versus* N_p da amostra e do padrão único de calibração com concentração $C^{padrão}$. As linhas de emissões de Al (I) 308,2 e P (I) 214,9 nm foram utilizadas para as determinações de Al e P_2O_5, respectivamente.

A estratégia MLC foi empregada monitorando as intensidades obtidas em diferentes linhas de emissão do analito na amostra e no padrão único de calibração, as quais são utilizadas para criar um gráfico com as intensidades da amostra no eixo-*y* e no padrão no eixo-*x*. O coeficiente angular ($\alpha^{amostra\ vs.\ padrão}$) obtido neste gráfico é empregado para calcular a concentração da amostra com base na Equação 8.

$$C^{amostra} = C^{padrão}\ \alpha^{amostra\ vs.\ padrão} \qquad \textbf{Equação 8}$$

Para as determinações de fósforo foram empregadas as linhas P (I) 213,6, 214,9 e 215,4 nm. Por outro lado, haja vista a ausência de linhas de Al no espectro de emissão, os diferentes comprimentos de onda, em 308,01, 308,07, 308,12, 308,17 e 308,22 nm, da mesma linha de emissão de Al (I) 308,2 nm foram utilizadas.

Os LOQ para os métodos SRC e MLC foram calculados de acordo com a Equação 6, empregando $CaCO_3$ e o CRM de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568a) como brancos analíticos. Os LOQ de Al e P_2O_5 foram de 2,3 % (m m^{-1}) e 126 mg kg^{-1} para SRC e de 2,7 % (m m^{-1}) e 269 mg kg^{-1} para MLC, respectivamente.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Escolha das linhas analíticas para determinação de Al e P

Primeiramente a análise dos CRMs de folhas de macieira (NIST 1515) e rocha fosfática (NIST 120c) foram analisados com LIBS e SD-LIBS (4,5 kV) para avaliação dos perfis dos picos e escolha das melhores linhas de emissão para determinação de alumínio e fósforo. Os perfis dos picos para fósforo e alumínio estão apresentados na Figura 21.

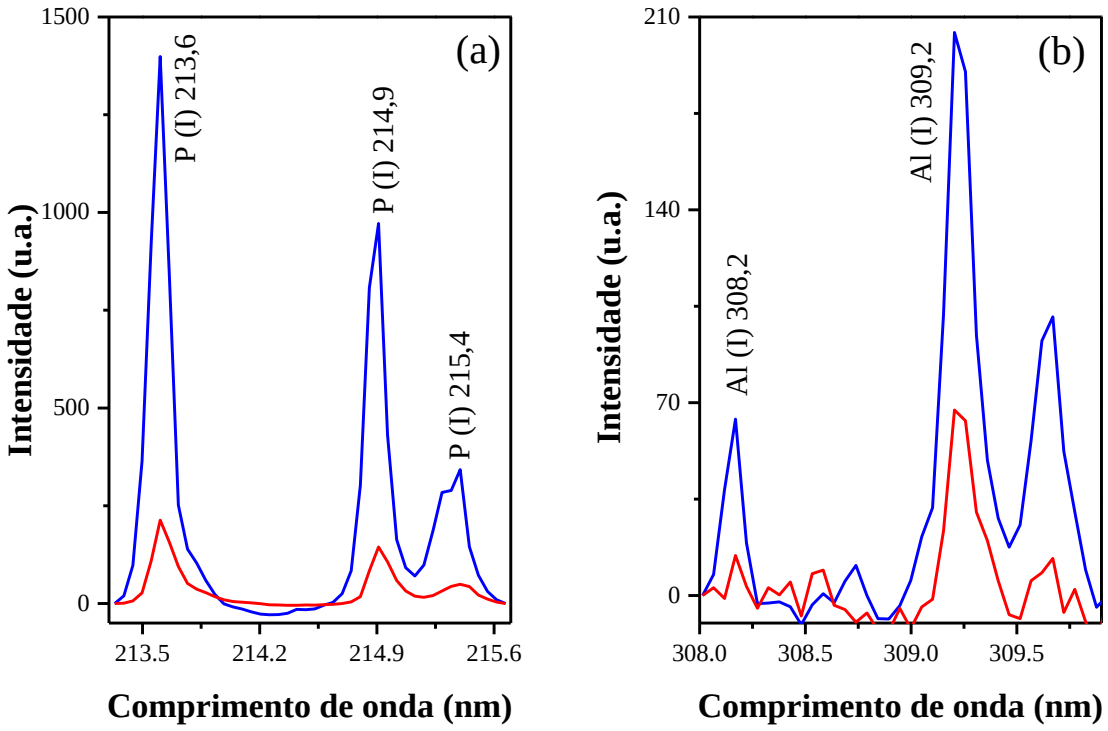

Figura 21 - Perfis dos picos obtidos com LIBS (—) e SD-LIBS (4,5 kV) (—) para (a) P no CRM NIST 120c e (b) Al no CRM NIST 1515.

Fonte: Autor

Com base nos perfis das linhas de Al e P obtidos na Figura 21, o incremento de sinal obtido com o SD-LIBS é bem evidente, sendo este relacionado com o aumento do tempo de vida, a temperatura e a densidade eletrônica do plasma, os quais proporcionaram melhorias nos processos de excitação (53,58).

A linha P (I) 214,9 nm foi selecionada para a determinação de P em fertilizantes com base nos critérios descritos na sessão 4.3.1. Em relação as linhas do alumínio, a mais intensa foi a linha Al (I) 309,2 nm. Contudo, esta linha sofre possíveis interferências espectrais causadas pelo magnésio (309,10, 309,29 e 309,68 nm), que foram identificadas por meio da base de dados no sítio da NIST (135). Além do mais, o magnésio é um elemento presente em tecido vegetal em elevadas concentrações, como exemplo, nos CRMs NIST 1573a e NIST 1515 a concentração deste elemento é de 12000 mg kg^{-1} (valor de referência não certificado) e 2710 ± 120 mg kg^{-1} de Mg, respectivamente. Deste modo, a linha de emissão de Al (I) 308,2 nm foi escolhida para a determinação de Al nos CRMs de folhas de plantas.

O SD-LIBS empregando 4,5 kV proporcionou o aumento de 6,7 vezes na intensidade da linha P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c e de 4,4 vezes para a linha Al (I) 308,2 nm no CRM NIST 1515 (Figura 21).

5.3.2. Influência da tensão na intensidade de emissão

Como mencionado na seção 5.2.4, para utilizar a estratégia SD-SSC LIBS é necessário que a intensidade de emissão do analito seja proporcional ao aumento da tensão. Desta forma, curvas de intensidade *versus* tensão foram construídas monitorando a linha de P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c e a linha de Al (I) 308,2 nm no CRM NIST 1515 no intervalo de 2,0 a 4,5 kV (Figura 22). Os coeficientes de correlação (r) obtidos para Al e P foram de 0,989 e 0,999, respectivamente. Os outros materiais de referência (para Al), e as amostras (no caso do P) foram analisadas também em outras voltagens (3,5, 4,0 e 4,5 kV). Essas voltagens foram escolhidas por serem as que resultam nos maiores valores de intensidade do analito, consequentemente maior sensibilidade. Tanto para o Al, quanto no do P, as curvas de tensão por intensidade obtiveram r > 0,97.

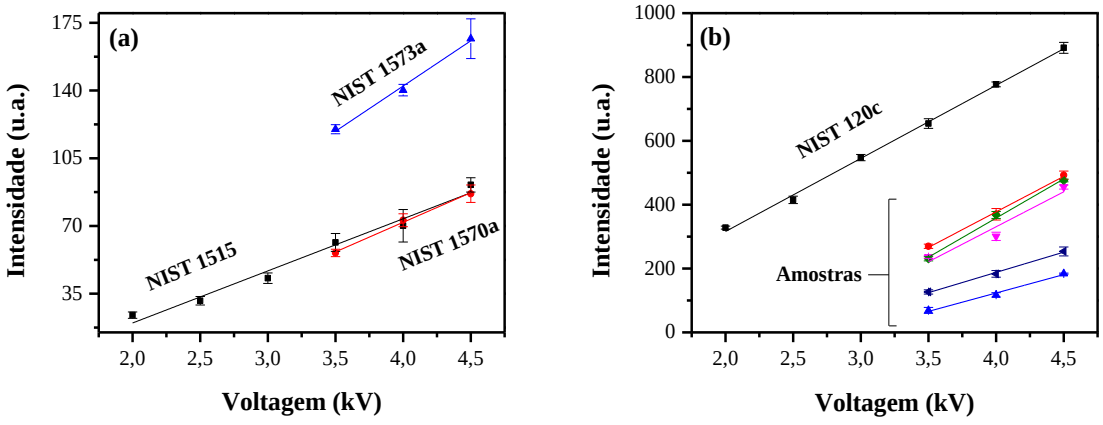

Figura 22 - Curvas de tensão *versus* intensidade (*n* = 3) para (a) Al (I) 308,2 nm em CRMs de folhas de plantas e (b) P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c e nas amostras.

Fonte: Autor

Cabe aqui mencionar que, diferente da estratégia SRC, as inclinações obtidas nos gráficos da Figura 22a e Figura 22b não são correlacionados com a concentração e sim pela intensidade. Para melhor exemplificar, vejamos o caso do fósforo, o qual as inclinações não

diferem muito umas das outras, as quais obtiveram inclinações entre 115,3 a 245,1 (Int. kV^{-1}). Com relação a Figura 22a, fica mais nítido ainda, que a concentração está relacionada com a intensidades ao invés da concentração, como por exemplo, o material NIST 1515 (com 284,5 mg kg^{-1} de Al e inclinação de 26,9 Int. kV^{-1}) e o NIST 1570a (com 310 mg kg^{-1} de Al e inclinação de 30,5 Int. kV^{-1}) tiveram as intensidades e as inclinações muito semelhantes, contudo, para o NIST 1573a (com 598,4 mg kg^{-1} de Al e inclinação de 46,7 Int. kV^{-1}), mesmo com a maior inclinação, esta não é proporcional a concentração. É possível observar que a área abaixo das curvas de intensidade *versus* tensão apresentam correlação com a concentração, como descrito na seção 5.2.4.

5.3.3. Influência do número de espectros por replicata

Antes da aplicação da estratégia SD-SSC LIBS, a influência do número de espectro por replicata foi avaliada monitorando as médias e os respectivos desvios padrões, tendo em vista obter a melhor precisão com o menor número de espectros, proporcionando desta forma um tempo menor de análise.

A média de intensidade das linhas Al (I) 308,2 nm (em NIST 1515) e P (I) a 214,9 nm (em NIST 120c) foram obtidas com 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 espectros, os quais foram coletados empregando SD-LIBS com 4,5 kV. Estes resultados estão apresentados na Figura 23.

Os resultados apresentados na Figura 23 obtiveram médias de RSD de 7 % para a linha de P (I) 214,9 nm e de 18 % para a linha Al (I) 308,2 nm. É possível observar que as médias de intensidade não melhoram em termos de precisão com o aumento do número de espectros. Neste caso, como destacado na Figura 23, a melhor condição foi obtida com a média de 10 espectros, condição a qual resultou em RSD de 6 % para o P e 17 % para o Al. Portanto, o número de 10 espectros registrados em cada replicata foi definido para a análise das amostras e CRMs.

5.3.4. Determinação de Al e P com métodos de calibração com padrão único

Os métodos de calibração com padrão único (*i.e.*, SD-SSC LIBS, SRC e MLC) foram empregados para determinar P_2O_5 em amostras de fertilizantes comerciais e Al em

CRMs de folhas de plantas. Os resultados determinados com os métodos de calibração com padrão único e aqueles determinados por HR-CS FAAS (como método comparativo para a determinação de P_2O_5) estão apresentados na Tabela 6.

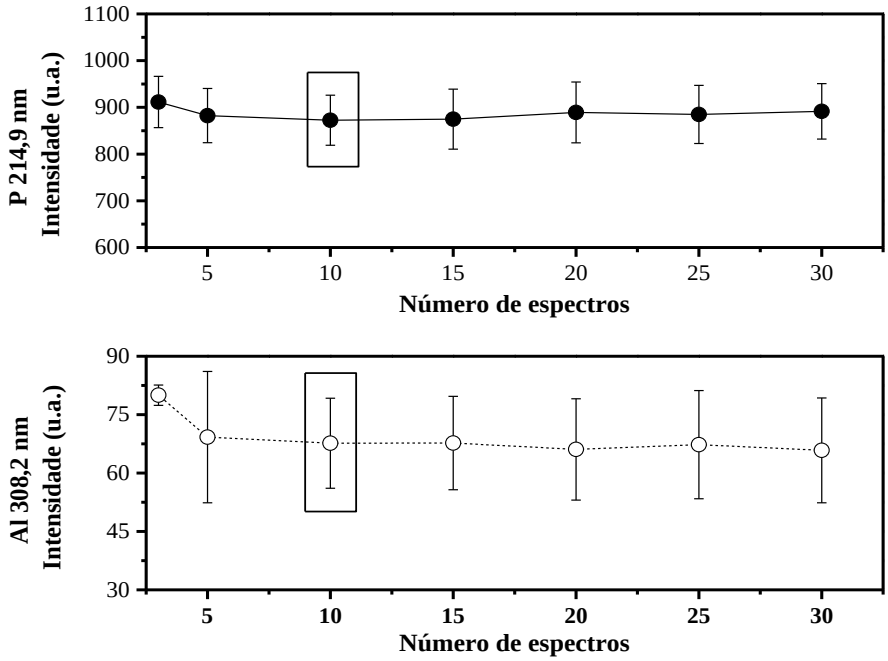

Figura 23 - Influência do número de espectros nas intensidades médias para (○) a linha de emissão Al (I) 308,2 nm no CRM NIST 1515 e para (●) a linha de emissão P (I) 214,9 nm no CRM NIST 120c obtidas por SD-LIBS empregando 4,5 kV.

Fonte: Autor

Tabela 6 - Resultados comparativos (média ± desvio padrão) para a determinação (n = 3) de P (expresso como % m m^{-1} P_2O_5) em amostras de fertilizantes e de Al (mg kg^{-1}) em CRM de folhas de plantas obtidas por SD-SSC LIBS, SRC e MLC

Amostra/CRM	Valores comparativos	SD-SSC LIBS	SRC	MLC	Padrão único de calibração
Fertilizante 1	19,0 ± 0,3 [a]	17,7 ± 0,9	20,5 ± 2,9	15,0 ± 0,1 [c]	NIST 120c
Fertilizante 2	6,5 ± 0,2 [a]	6,9 ± 0,3	6,4 ± 0,4	7,9 ± 0,3 [c]	NIST 120c
Fertilizante 3	17,2 ± 0,4 [a]	17,1 ± 1,1	16,2 ± 1,7	14,0 ± 1,3 [c]	NIST 120c
Fertilizante 4	9,2 ± 0,1 [a]	9,4 ± 0,9	9,5 ± 1,1	11,4 ± 1,8 [c]	NIST 120c
Fertilizante 5	19,0 ± 0,1 [a]	18,5 ± 0,8	19,7 ± 0,8	16,8 ± 1,3 [c]	NIST 120c
NIST 1570a	310 ± 15 [b]	316 ± 2	290 ± 46	343 ± 90	NIST 1515
NIST 1515	284,5 ± 5,8 [b]	280 ± 18	295 ± 25	265 ± 61	NIST 1570a
NIST 1573a	598,4 ± 7,1 [b]	591 ± 41	579 ± 48	685 ± 183	NIST 1515

[a] Valores comparativos determinados por HR-CS FAAS.
[b] Valores de referência certificados.
[c] Diferenças estatísticas entre os valores comparativos ao nível de 95 % de confiança com teste *t-Student* pareado.

O CRM NIST 120c foi empregado como padrão único de calibração para a determinação de P nas amostras. A determinação de Al nos CRMs NIST 1515, NIST 1570a e NIST 1573a empregaram como padrão único de calibração o material NIST 1515, para quantificação dos CRMs NIST 1570a e NIST 1573a e, o NIST 1573a para quantificação do material NIST 1515.

As exatidões dos métodos de calibração com padrão único foram calculadas em termos de recuperação, que foram de 97 a 106 %, de 94 a 108 % e de 81 a 124 % para SD-SSC LIBS, SRC e MLC, respectivamente.

Os resultados das determinações de P obtidos com os métodos de calibração com padrão único foram comparados com aqueles obtidos com o método comparativo (digestão ácida e HR-CS FAAS) ao nível de 95 % de confiança (teste *t-Student* pareado). Dentre os métodos de calibração com padrão único, apenas para MLC foi observado diferenças estatísticas (Tabela 6).

A este último, cabe destacar que, o coeficiente de correlação (r) obtido no gráfico entre as intensidades das linhas P (I) 213,6, 214,9 e 215,4 nm obtidas na amostra (eixo *y*) e no padrão (eixo *x*) variaram entre 0,946 a 0,998. Os valores mais baixos de r (*i.e.*, < 0,95) são causados por pequenos desvios de proporcionalidade entre as intensidades das linhas de emissão da amostra e padrão, que por sua vez podem estar relacionadas com possíveis interferências espectrais. Levando em consideração o espectrômetro utilizado, a linha P (I) 213,6 nm pode ser interferida pelas linhas de Cu (I) 213,5 nm e Zn (I) 213,9 nm (135), sendo estes elementos presentes em algumas formulações de fertilizantes comerciais (134). Portanto, esse deve ter sido o motivo pelo qual os valores de concentração de P_2O_5 determinados pela calibração de MLC apresentaram diferenças estatísticas com os valores determinados pelo HR-CS FAAS.

Com relação às determinações de Al, todos os métodos de calibração com padrão único foram concordantes com os valores certificados ao nível de 95 % de confiança.

Em relação aos desvios padrões relativos nas determinações de Al e P_2O_5, os métodos SD-SSC LIBS, SRC e MLC obtiveram valores na faixa de 1 - 10 %, 4 - 16 % e 1 - 27 %, respectivamente.

O maior RSD foi obtido nas determinações de Al por MLC. Hao *et al.*, (72) também obtiveram RSD > 20 % para os elementos Cr, Ni e Ti determinados em ligas metálicas utilizando esse mesmo método. Segundo os autores, as baixas intensidades das linhas de emissão destes elementos tornam suas respectivas linhas de emissão mais susceptíveis a sofrer interferências espectrais e de fundo contínuo. Devido à baixa intensidade de emissão obtida

para a linha Al (I) 308,2 nm, o mesmo fato pode ter contribuído para obtenção de RSD > 20 % neste trabalho.

Em relação ao SRC e SD-SSC LIBS, ambos apresentaram RSD < 20 %, considerados baixos se for levado em consideração análise direta de sólidos. Vale aqui destacar que quando se emprega SRC, o acúmulo de pulso produz uma maior amplitude do pico do analito, que de certa forma diminui as imprecisões provenientes do fundo espectral.

Com relação ao método SD-SSD LIBS, os resultados apresentados na Tabela 6 foram obtidos aplicando as voltagens de 3,5 e 4,5 kV. A utilização de uma ou três voltagens também foi avaliada. Por exemplo, quando foi utilizado apenas a tensão de 4,5 kV (uma tensão) para as amostras e para o padrão, um leve aumento do RSD de 2 a 4 % foi observado. Com relação ao uso de três voltagens (3,5, 4,0 e 4,5 kV), não foram constatadas melhoras significativas ao método proposto, em relação a exatidão e precisão em relação ao uso de duas voltagens, resultando apenas no aumento do tempo de análise e de tratamento dos dados. Portanto, a melhor condição de análise foi obtida com o uso de duas voltagens, além disso, outros valores de voltagens também podem ser utilizados como 4,0 e 4,5 kV ou 3,5 e 4,0 kV, visto que estas estão contidas na faixa de linearidade entre a intensidade e a tensão (Figura 22).

Em relação ao LOQ para P e Al, os métodos SD-SSC LIBS e SRC apresentaram desempenhos semelhantes: 2,3 % (m m^{-1}) P_2O_5 e 117 mg kg^{-1} Al (SD-SSC LIBS) e 2,3 % (m m^{-1}) P_2O_5 e 126 mg kg^{-1} Al (SRC), respectivamente. Para MLC, os LOQ foram 2,7 % (m m^{-1}) P_2O_5 e 269 mg kg^{-1} Al.

O SRC e o MLC são métodos de calibração simples e interessantes. O SRC pode ser realizado com uma linha de emissão, enquanto o MLC é limitado a elementos que apresentam várias linhas.

O SD-SSC LIBS proposto forneceu melhor precisão, exatidão e LOQ para Al e P. No entanto, esta estratégia requer um dispositivo extra para gerar a descarga elétrica, que não deve ser entendido como uma forte limitação, uma vez que se trata de uma estratégia simples, de baixo custo e robusta para aumento de sensibilidade.

É importante informar que outros elementos não foram determinados devido à baixa resolução do espectrômetro empregado neste trabalho, que aumentam as probabilidades de interferências espectrais. Dessa forma, como prova de conceito da nova proposta de calibração, apenas Al em folhas de plantas e P em fertilizantes comerciais foram determinados.

5.4. Conclusões parciais

O uso de LIBS para a análise de amostras sólidas é muito atraente, principalmente quando um método simples de calibração é aplicado. Neste trabalho, o novo método SD-SSC foi proposto para calibração em LIBS, o qual utiliza apenas um padrão para calibração, necessitando que o padrão e a amostra, ambos com matrizes semelhantes, sejam submetidos a análise por SD-LIBS empregando duas voltagens (*e.g.*, 3,5 e 4,5 kV).

O SD-SSC LIBS foi aplicado para a determinação de Al em folhas de plantas e P em fertilizantes comerciais. Outros métodos de calibração com único padrão, recentemente propostos na literatura, como SRC e MLC, foram utilizados para fins comparativos. Os métodos SD-SSC LIBS e SRC obtiveram resultados estatisticamente semelhantes para o Al, com relação aos valores de referência certificados, e para P, com relação aos valores determinados com o método de comparativo.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam que a estratégia SD-LIBS fornece melhores condições de excitação das espécies presentes no plasma, aumentando significativamente a intensidade de emissão. Além disso, com o SD-LIBS foi possível utilizar novas estratégias de calibração com padrão único, que sem o advento do incremento de sinal não seriam possíveis.

A estratégia de calibração proposta neste trabalho parece muito promissora para várias aplicações analíticas quantitativas em amostras sólidas, não sendo limitada apenas às aplicações aqui demonstradas.

6. Calibração multi-energética para a determinação de não-metais por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução

6.1. Introdução

A espectrometria de absorção atômica (AAS) sofreu uma grande reformulação quando uma lâmpada de arco curto de xenônio, um monocromador duplo proposto por um prisma Littrow e rede Echelle e detector CCD foram adequadamente projetados para o desenvolvimento da HR-CS AAS (9,153–155). A nova instrumentação possibilita a determinação de não-metais (*e.g.*, F, Cl, Br, I, P, S, N) por meio de moléculas diatômicas, através do monitoramento das linhas rotacionais finas, as quais apresentam-se no espectro de forma semelhante as linhas atômicas, podendo ser utilizadas para fins analíticos (11,156,157).

Várias aplicações de HR-CS MAS foram relatadas para B (158), Br (157,159–162), Cl (163,164,173,165–172), F (174–182), I (183), N (184), P (158,184), S (185–193) e Si (194) em diferentes matrizes, incluindo água (159,167,178,179,182,185,192), petróleo (169,172,177,187,195), carvão (157,166,170,176,178,188,190), diesel (189), alimentos (160,164,198,166,168,173,180,185,186,196,197), plantas (166,171,175,185), drogas (160,163,183), polímeros (162,166,199), solo (174), cimento (165), fertilizantes (184), óxido de ferro (166), urina (185), cabelo humano (166), desinfetante (161), creme dental (181), organossilício (194), e ácido bórico (158). Com exceção dos trabalhos (158,162,163) que utilizaram razões isotópicas, a maioria dos demais trabalhos empregou a calibração externa, devido ser um método bem estabelecido e simples.

Apesar de a calibração externa ser amplamente utilizada, em algumas aplicações está susceptível a severos efeitos de matriz, necessitando de métodos de calibração mais eficientes, como a IS ou a SA. Recentemente, um novo método de calibração denominado MEC foi descrito por Virgílio *et al*., (151). Esse método utiliza vários comprimentos de onda de emissão ou absorção do mesmo analito, ou seja, múltiplas energias de transição para calibração.

Semelhante ao SA, o MEC é um método simples e eficaz para minimizar os efeitos de matriz, neste caso, este método utiliza apenas duas soluções para calibração, sendo S1, contendo amostra + padrão (1:1, v v^{-1}), e S2, contendo amostra + branco (1:1, v v^{-1}) (151). As absorbâncias (ou intensidades de emissão) para diferentes comprimentos de onda do analito são monitoradas nas duas soluções para construção da curva de calibração. Neste caso, nos eixos x e y são inseridos os valores das absorbâncias obtidas nas soluções S1 e S2, respectivamente. Com a equação linear de S1 *versus* S2, a concentração do analito na amostra ($C^{amostra}$) é facilmente calculada de acordo com a Equação 9. Onde *m*, é o valor do coeficiente angular e $C^{padrão}$, a concentração do padrão adicionada a solução S1.

$$C^{amostra} = C^{padrão}\frac{m}{1-m} \qquad \textbf{Equação 9}$$

Virgílio *et al*., (151) aplicaram com êxito a estratégia MEC para a determinação de Co, Cr, Cu, Ni, Mn e Fe em chá verde, refrigerante, remédio para tosse, molho de soja e vinho tinto por ICP OES, MIP OES e HR-CS FAAS. Posteriormente, outros trabalhos empregaram a MEC para determinação de As, Ba, Cd, Cr e Pb em amostras de fertilizantes por MIP OES (200), e Ca, Cu, Fe, Mn e Zn em suplementos minerais de bovinos por LIBS (71).

Considerando a disponibilidade de várias linhas de absorção de moléculas diatômicas registradas simultaneamente por HR-CS MAS, a utilização destas linhas para a determinação de não-metais utilizando a estratégia MEC parece promissora. Desta forma, no presente trabalho, a estratégia MEC foi avaliada para a determinação de N, P e S (via NO, PO e CS) em amostras de fertilizantes foliares e sais comerciais por HR-CS FMAS, e para determinação de Cl (via CaCl) em amostras de leite em HR-CS GFMAS. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com os valores obtidos pelo método de calibração externa. Testes de adição e recuperação e análise de CRMs foram usados para avaliar a precisão e a exatidão do método.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte contínua e alta resolução (ContrAA 300, Analytik Jena, Jena, Alemanha) foi utilizado para as medidas das absorbâncias das moléculas $NO_{(g)}$, $PO_{(g)}$ e $CS_{(g)}$. Chama de ar/acetileno foi utilizada para formação e monitoramento das moléculas NO, PO e CS para as respectivas determinações de N, P e S. As determinações empregaram um queimador com caminho óptico de 100 mm, gás acetileno de alta pureza (99,7 %, Air Liquid, São Paulo, Brasil) e fluxo de ar comprimido fixado em 434 L h^{-1}.

Um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua (ContrAA 700, Analytik Jena, Jena, Alemanha), com aquecimento transversal,

plataformas de amostragem de sólidos e um amostrador automático (SSA 600) foi utilizado para as determinações de CaCl.

Argônio de alta pureza 99,999 % (White Martins, Sertãozinho, Brasil) foi empregado como gás de purga e proteção.

6.2.2. Reagentes

Água deionizada de alta pureza obtida por um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5® e um deionizador Millipore Milli-Q™ Academic® (resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore, EUA) foi empregada para preparar todas as soluções.

Todas as vidrarias e frascos de polipropileno foram descontaminados em banho de HNO_3 10 % (v v^{-1}) por 24 h e em seguida lavados abundantemente com água de alta pureza.

Soluções padrão de P e S contendo 10000 mg L^{-1} (SpecSol, São Paulo, Brasil) foram diluídas individualmente para 2000 mg L^{-1} em água de alta pureza para preparar as soluções analíticas utilizadas neste trabalho.

Solução estoque de N de 20000 mg L^{-1} foi preparada dissolvendo 42,880 g de ureia pura (99,5 %, Merck Darmstadt, Alemanha) com água de alta pureza em balão volumétrico de 1,00 L.

Soluções analíticas contendo 10000 mg L^{-1} de N foram preparadas diariamente em 5 % (v v^{-1}) de H_2O_2 (30 % m m^{-1} Merck Darmstadt, Alemanha).

A solução padrão de 32,02 mg L^{-1} de Cl foi preparada dissolvendo 0,0528 g de NaCl (99,3 %, Mallinckrodt, México) em balão volumétrico de 1,00 L com água de alta pureza.

Solução estoque de 10000 mg L^{-1} de Ca (SpecSol, São Paulo, Brasil) foi utilizada como reagente de formação da molécula de CaCl.

O elemento paládio foi utilizado como modificador químico a partir da solução de 100 mg L^{-1} de Pd, a qual foi preparada por diluição apropriada da solução estoque de 10000 mg L^{-1} de Pd ($Pd(NO_3)_2$ em 15 % HNO_3 v v^{-1}, Merck Darmstadt) em água de alta pureza.

6.2.3. Amostras e procedimentos analíticos

As amostras de fertilizantes líquidos (A, B e C) foram adquiridas no comércio local de Araraquara (São Paulo, Brasil) para a determinação de N e P. Para as determinações de N e

P, 0,382 g da amostra A, contendo 30 % de P_2O_5 m m^{-1} (Nutrifolha N_{00}-P_{30}-K_{20}, Samarita, Brasil), 0,354 g da amostra B, contendo 40 % de P_2O_5 m m^{-1} (Nutrifolha N_{00}-P_{40}-K_{20}, Samarita, Brasil) e 0,3125 g da amostra C, contendo 8 % de N m m^{-1} (Fertilizante Raiz, Vida Verde, Brasil) foram pesadas com precisão e individualmente diluídas em balões volumétricos de 50 mL com água de alta pureza.

Para as determinações de N e S em sais comerciais, 0,769 g de $MgSO_4.7H_2O$ (98 %, Synth, Diadema, Brasil), 0,412 g de $(NH_4)_2SO_4$ (99,0 %, Synth, Diadema, Brasil) e 3,034 g de $NaNO_3$ (99,5 %, Synth, Diadema, Brasil) foram pesados com precisão e individualmente diluídas em balões volumétricos de 50 mL com água de alta pureza.

Quatro amostras de leite em pó integral e uma de leite em pó desnatado foram adquiridas no comércio local em Araraquara (São Paulo, Brasil) para determinação de Cl.

Os CRMs de leite em pó integral (*Whole Milk Powder*, NIST 8435) e leite em pó desnatado (*Non-Fat Milk Powder*, NIST 1549) foram analisados para validação do método proposto.

Suspensões das amostras e dos materiais de referência certificados foram preparadas individualmente utilizando massas de 0,1500 g em balões volumétricos de 50 mL com água de alta pureza, seguido de sonicação por 15 min antes das análises.

Para determinação de N, P e S por MEC utilizando a HR-CS FMAS, a solução S1 foi preparada pela mistura de 5 mL da amostra com 5 mL da solução padrão (5000 mg L^{-1} para N; 1000 mg L^{-1} para P e S). A solução S2 foi preparada pela mistura de 5 mL da amostra com 5 mL de água de alta pureza.

Para determinação de Cl por MEC utilizando a HR-CS GFMAS, a solução S1 foi preparada misturando 0,5 mL da suspenção da amostra (ou CRM) com 0,5 mL da solução padrão de 32,02 mg L^{-1} de Cl. A solução S2 foi preparada misturando 0,5 mL de suspenção da amostra (ou CRM) com 0,5 mL de água de alta pureza.

As determinações de N, P e S e Cl foram realizadas através do monitoramento das respectivas linhas moleculares descritas na Tabela 7.

Como método comparativo, curvas de calibração externa para N (via a molécula de NO em 215,360 nm), P (via a molécula de PO em 247,620 nm) e S (via a molécula de CS em 257,595 nm) nas faixas de 100 - 2000 mg L^{-1} (P e S), e 500 - 5000 mg L^{-1} (N) foram utilizadas para as determinações destes elementos nas amostras utilizando a HR-CS FMAS.

Tabela 7 - Condições operacionais utilizadas nas determinações de Cl por HR-CS GFMAS e N, S e P por HR-CS FMAS

Instrumento	**Parâmetro instrumental**	**Condições operacionais**		
HR-CS FAAS	Tipo de chama	ar/acetileno		
	Fluxo de ar (L h^{-1})	434		
	Fluxo de acetileno (L h^{-1})	120 (CS); 100 (PO); 45 (NO)		
	Caminho óptico (mm)	100		
	Altura do queimador (mm)	7,0 (CS); 9,0 (NO e PO)		
	Taxa de aspiração (mL min^{-1})	5,0		
	Número de pixel	3		
	λ (nm)	**CS**: 257,818; 257,834; 257,845; 257,861; 257,876; 257,892; 257,906; 257,922; 257,491; 257,958; 257,974; 257,993; 258,014; 258,033; 258,056; 258,078. **NO**: 215,137; 215,149; 215,169; 215,180; 215,185; 215,197; 215,223; 215,246; 215,268; 215,288; 215,306; 215,320; 215,333; 215,343; 215,362. **PO**: 247,371; 247,382; 247,402; 247,418; 247,460; 247,473; 247,486; 247,498; 247,531; 247,540; 247,550; 247,559; 247,580; 247;593; 247,624.		
HR-CS GFAAS	**Programa de aquecimento**			
Etapa	Temperatura (ºC)	Rampa (°C s^{-1})	Patamar (s)	Fluxo de Ar (L min^{-1})
Secagem 1	90	3	20	2.0
Secagem 2	130	5	10	2.0
Pirólise	1100	300	10	2.0
Auto zero	1100	0	5	0
Vaporização	2200	1200	6	0
Limpeza	2450	500	4	2.0
	Tempo de integração (s)	7		
	Número de pixel	3		
	λ (nm)	**CaCl**: 620,545; 620,585; 620,622; 620,666; 620,723; 620,787; 620,860; 620,945; 621,042; 621,147.		

As determinações de Cl por MEC utilizando a HR-CS GFMAS foram realizadas dispensando diretamente na plataforma de grafite (i) 3 µL do modificador químico $Pd(NO_3)_2$, (ii) 12 µL do agente formador da molécula (solução padrão de Ca) e (iii) 10 µL da solução S1, ou S2. Na sequência, a plataforma de grafite foi conduzida através do amostrador automático (SSA 600) para o interior do forno de grafite, sendo em seguida acionado o programa de

aquecimento. O programa de aquecimento empregado para as determinações de Cl está descrito na Tabela 7. O branco analítico foi avaliado pela análise das soluções contendo o agente formador da molécula e o modificador químico nas mesmas condições descritas acima. Em todos os casos, os sinais de absorbância do branco foram subtraídos das absorbâncias obtidas para S1 e S2.

Como método comparativo para a determinação de Cl nas amostras, curvas de calibração externa para Cl (via a molécula de CaCl em 621,147 nm), no intervalo de massa de 60 a 600 ng, foram construídas usando a suspensão do CRM NIST 1549 com a adição de 3 µL do modificador químico, 12 µL do agente formador da molécula e 10 µL da suspensão da amostra. O programa de aquecimento utilizado está descrito na Tabela 7.

As condições operacionais utilizadas nas determinações de Cl por HR-CS GFMAS e N, S e P por HR-CS FMAS são apresentadas na Tabela 7. Em ambos os métodos de análise, os sinais de absorbância para cada linha empregada para calibração foram registrados com 3 pixels de integração.

6.3. Resultados e discussão

Ao contrário dos métodos convencionais de calibração, que geralmente utilizam várias soluções de calibração em um comprimento de onda fixo, o MEC faz o monitoramento de várias linhas de absorção (ou emissão) do mesmo analito em apenas duas soluções, S1 e S2. Esta estratégia faz a compatibilização de matriz, uma vez que as soluções S1 e S2 contém a mesma quantidade da amostra. Contudo, esta estratégia exige que o analito tenha várias linhas de absorção (emissão ou isótopos, dependendo da técnica espectroscópica empregada) (71,151,200–202).

Por outro lado, a determinações de não metais por AAS confere um grande desafio analítico, visto que as linhas ressonantes para estes elementos estarem localizadas abaixo de 190 nm. Desta forma, a determinação dos elementos fósforo (177,435, 178,223 e 178,705 nm), enxofre (180,671, 181,974 e 182,565 nm), nitrogênio (90 - 175 nm) e cloro (118 - 140 nm) por espectrometria de absorção atômica é impraticável sem algumas modificações instrumentais.

Alternativamente, a técnica HR-CS MAS permite a determinação desses analitos através da absorção molecular, como por exemplo, PO na faixa de 247,4 - 247,6 nm (bandas vibracionais $\Delta v = 0$, referente a transição eletrônica $X^2\Pi \rightarrow A^2\Sigma^+$) (155), CS na faixa de 257,5

- 258,5 nm (bandas vibracionais Δv = 0, referente a transição eletrônica $X^2\Pi \rightarrow A^2\Sigma^+$) (155), NO na faixa de 215,1 - 215,3 nm (bandas vibracionais Δv = +1, relacionadas a transição eletrônica $X^2\Pi \rightarrow A^2\Sigma$)(203) e CaCl na faixa de 605 - 635 nm (bandas vibracionais Δv = 0, relacionadas a transição eletrônica $X^2\Sigma \rightarrow A^2\Pi$) (165). Essas bandas vibracionais apresentam vários comprimentos de onda para fins analíticos, como pode ser observado na Figura 24.

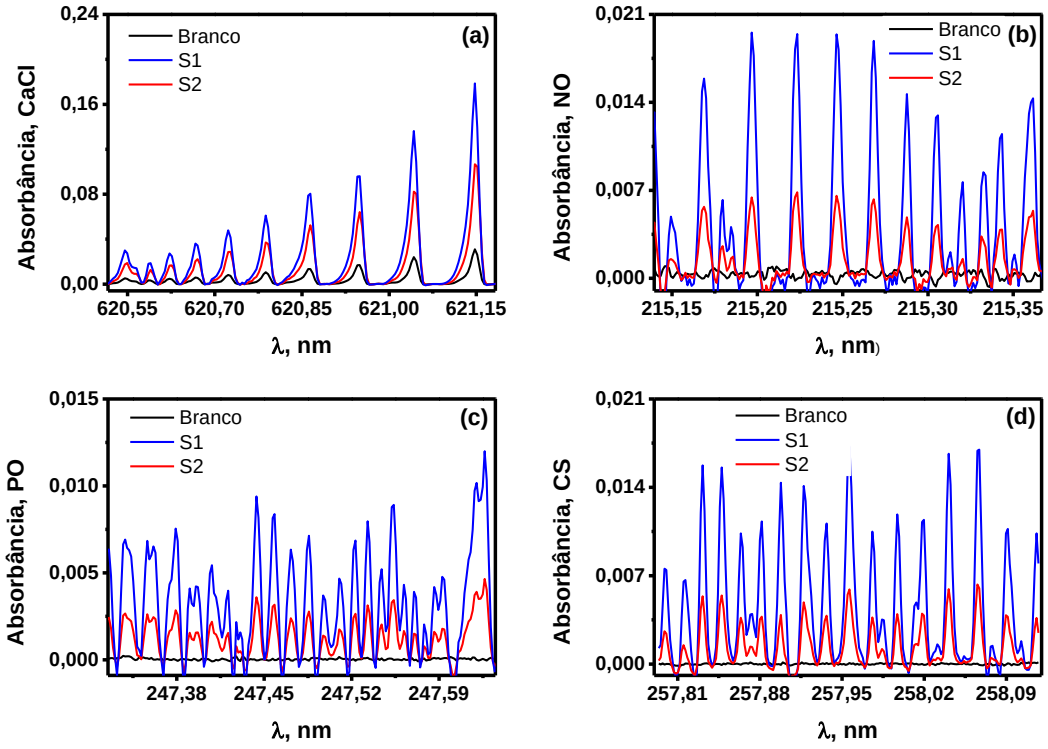

Figura 24 - Espectro de absorção molecular obtido por HR-CS GFMAS para a molécula de CaCl (a) e por HR-CS FMAS para as moléculas de NO (b), PO (c) e CS (d) para o branco e as soluções S1 e S2.

Fonte: Autor

6.3.1. Otimização das condições experimentais

Em relação a HR-CS FMAS, as moléculas diatômicas são diretamente formadas a partir de reações com componentes do combustível e/ou do oxidante durante o processo de queima, portanto, não há necessidade de adicionar agentes formadores de moléculas ou modificadores químicos. No entanto, a composição da chama é um parâmetro importante para aumentar as taxas de formação de moléculas diatômicas, como PO, NO e CS, e consequentemente, alcançar melhores sensibilidades e/ou precisão das medidas. Além disso, parâmetros como a composição química e a temperatura, podem mudar de acordo com a

altura de observação da chama. Desta forma, uma otimização feita de forma automática pelo *software* AspectCS (*software* dos equipamentos HR-CS AAS) foi utilizada para obter as melhores condições de altura de observação, razão combustível/oxidante e vazão dos gases para cada molécula em estudo. As melhores condições para as análises foram obtidas usando (i) altura de observação de 9,0 mm para PO e NO e 7,0 mm para CS, (ii) fluxo de ar de 434 L h^{-1} para CS, NO e PO, e (iii) vazão de acetileno de 120, 100, e 45 L h^{-1} para CS, PO e NO, respectivamente.

Em relação a HR-CS GFMAS, a taxa de formação de moléculas está diretamente correlacionada com o programa de aquecimento do atomizador, a concentração do agente formador de moléculas e o uso de modificadores químicos (166,172,204). Desta forma, neste trabalho foi avaliado a adição de Ca como agente formador de CaCl e Pd como modificador químico, como descrito anteriormente na literatura (166).

Para os testes a seguir, as medidas das absorbâncias foram realizadas em triplicata no comprimento de onda de 621,147 nm e com o programa de aquecimento descrito na Tabela 7.

Inicialmente, na plataforma de grafite, massas de Ca na faixa de 0 - 200 μg foram avaliadas pela adição de volumes crescentes deste elemento (a partir da solução estoque de 10000 mg L^{-1} de Ca), justamente com o volume fixo de 7,6 μL da suspensão do NIST 1549, correspondendo a 250 ng de Cl. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25a. Estes resultados demonstram que a adição de 50 μg de Ca causa um aumento significativo na absorbância da molécula de CaCl, e o aumento da massa de Ca causa um decréscimo moderado. Levando em consideração as maiores absorbâncias e os menores RSD, a adição de 120 μg Ca foi definida para as análises posteriores.

A influência da massa de Pd como modificador químico foi avaliada no intervalo de 0 a 500 ng, mantendo-se constante as massas de Cl e Ca em 250 ng e 120 μg, respectivamente. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 25b. Nesta figura, é possível observar que os valores de absorbância de CaCl crescem com o aumento da massa de Pd até 300 ng, sendo este aumento pouco pronunciado para massas superiores, *i.e.* 500 ng. Empregando o mesmo critério para a otimização da massa de Ca, a massa de 300 ng de Pd foi definida para as análises posteriores.

A otimização do programa de aquecimento foi realizada através de curvas de pirólise e vaporização na faixa de 700 a 2400 ºC, empregando alíquotas da suspenção do CRM NIST 1549 (contendo 500 ng Cl) na presença e ausência de 300 ng de Pd. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 26. Nesta figura, é possível observar que sem o uso do Pd, as melhores condições de pirólise e vaporização foram obtidas nas temperaturas de 1300 °C e

2200 °C, respectivamente. Em relação ao uso do Pd, as melhores condições de pirólise e vaporização foram obtidas nas temperaturas de 1100 °C e 2200 °C, respectivamente. Estes resultados demonstram que o Pd é incapaz de fornecer maior estabilidade térmica ao analito, *i.e.*, aumentar a temperatura de pirólise, o que por outro lado, ocasionou em uma sutil redução na temperatura de pirólise. Todavia, o emprego do Pd proporcionou sinais de absorbância de cerca de 3 vezes maiores em relação a sua ausência.

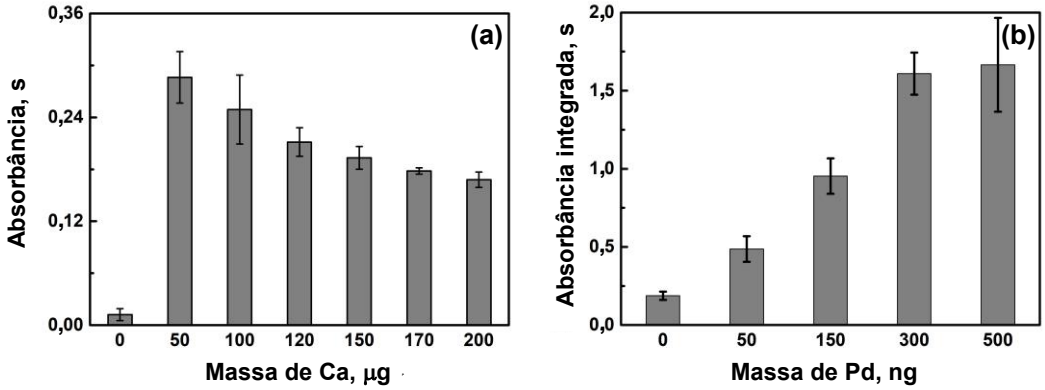

Figura 25 - Influência da massa (a) do Ca e (b) do Pd nos sinais de absorbância para a molécula de CaCl determinada por HR-CS GFMAS.

Fonte: Autor

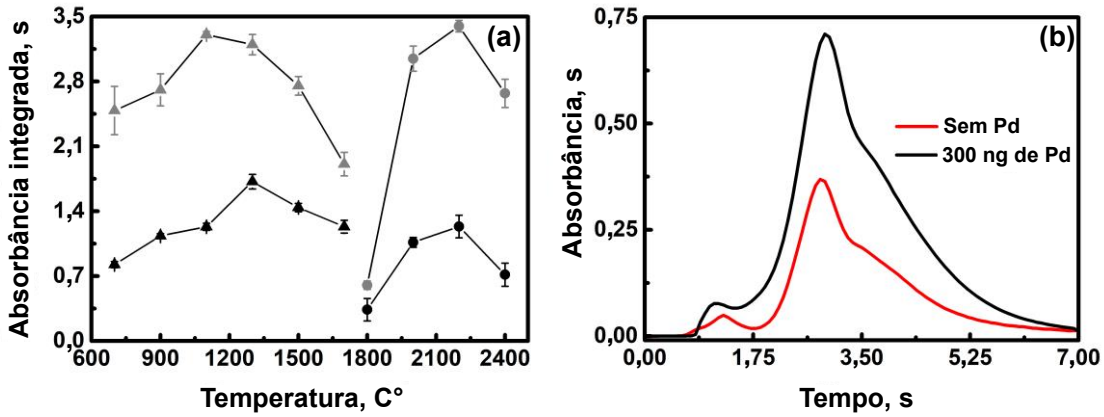

Figura 26 - Curvas de pirólise (triângulos) e vaporização (círculos) (a) para amostras de suspensão de leite em pó (NIST-1549, contendo 500 ng Cl) na ausência (—) e presença (—) de Pd e (b) perfis dos pico transientes para a molécula de CaCl sob as mesmas condições.

Fonte: Autor

O perfil transiente do pico de absorção da molécula de CaCl em 621,147 nm foi avaliada na presença e ausência de 300 ng de Pd. Os perfis dos picos estão apresentados na Figura 26b. Nesta figura, nota-se que na presença de Pd é observado um pico maior e mais

amplo. Com relação ao tempo de vaporização, entre 1,0 - 1,75 s, é observado um pequeno pico de absorção em ambas as condições, sugerindo que a formação de CaCl pode ocorrer em um mecanismo que envolve duas etapas. Considerando os resultados supramencionados, as condições definidas para as análises foram (i) 120 µg de Ca, (ii) 300 ng de Pd, (iii) 1100 °C de pirólise e (iv) 2200 °C de vaporização.

6.3.2. MEC: desempenho analítico

O método MEC HR-CS MAS foi aplicado para as determinações de Cl em leite, N em fertilizante comercial e nitrato de sódio ($NaNO_3$), P em fertilizantes e S em sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$) e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$). As análises dos CRMs e testes de adição e recuperação foram realizados para avaliar a precisão e exatidão dos métodos propostos. Estas determinações também foram feitas através da calibração externa para fins comparativos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados (média ± desvio padrão, *n* = 3) das recuperações obtidas de Cl em leite por HR-CS GFMAS, e de N, P e S e insumos por HR-CS FMAS, utilizando MEC e calibração externa (EC)

Amostra	**Analito (molécula)**	**Concentração**	**Exatidão, %**	
			MEC	**EC**
NIST 1549	Cl (CaCl)	10,9 ± 0,2[a]	107 ± 5	103 ± 3
NIST 8435	Cl (CaCl)	8,42 ± 0,44[a]	109 ± 4	102 ± 1
Fertilizante C	N (NO)	1000[b]	99 ± 2	99± 2
Fertilizante A	P (PO)	1000[b]	97 ± 1	96 ± 1
$MgSO_4.7H_2O$	S (CS)	1000[b]	99 ± 2	100 ± 1

[a] Concentração certificada (g kg^{-1})
[b] Concentração adicionada (mg L^{-1})

Como pode ser observado na Tabela 8, as concentrações determinadas por MEC e calibração externa foram próximas das concentrações de referência certificadas ou adicionadas (exatidão próxima a 100 %). As exatidões obtidas para o MEC e calibração externa encontraram-se entre 97 a 110 % e de 96 a 103 %, respectivamente. Cabe destacar que os resultados obtidos por MEC e calibração foram concordantes com os valores de referência certificados ou os valores adicionados ao nível de 95 % de confiança (teste

t-Student). Além do mais, os desvios padrões relativos foram aceitáveis para determinações moleculares para ambos os métodos.

Diante dos resultados obtidos, as estratégias MEC e a calibração externa foram aplicadas para as determinações de Cl, N, P e S nas amostras, sendo os resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Determinações (n = 3, média ± desvio padrão, % m m^{-1}) por MEC e calibração externa (EC) para a determinação de Cl por HR-CS GF MAS e N, P (expresso como P_2O_5) e S por HR-CS FMAS

Analito	**Amostra**	**Concentração determinada (% m m^{-1})**		**Teste *t-Student* (pareado)[a]**
		MEC	**EC**	
Cl	Leite integral 1	0,922 ± 0,061	0,945 ± 0,078	0,402
	Leite integral 2	1,129 ± 0,054	1,111 ± 0,027	0,516
	Leite integral 3	0,931 ± 0,077	0,836 ± 0,034	1,955
	Leite integral 4	1,148 ± 0,110	1,102 ± 0,092	0,555
	Leite desnatado 5	1,396 ± 0,084	1,303 ± 0,069	1,482
P	Fertilizante A	30,89 ± 1,08	29,12 ± 0,26	0,1468
	Fertilizante B	38,85 ± 0,93	38,22 ± 0,14	0,4116
S	$MgSO_4.7H_2O$	24,04 ± 0,43	24,17 ± 0,36	0,5442
	$(NH_4)_2SO_4$	14,17 ± 0,22	14,05 ± 0,09	0,3105
N	$NaNO_3$	16,29 ± 0,25	16,33 ± 0,28	0,5613
	Fertilizante C	7,82 ± 0,12	8,15 ± 0,09	0,0880

[a] Valor crítico do teste *t-Student* pareado ($T_{crítico}$ = 2,776).

Análise dos resultados da Tabela 9 revela não haver diferenças estatísticas entre os resultados obtidos pelos dois métodos MEC e EC ao nível de 95 % de confiança. Apesar da semelhança nos resultados, o MEC opera com compatibilização de matriz, tornando-o mais robusto que a calibração externa no caso de análise de amostras com matriz mais complexa. Além do mais, o MEC permite a identificação de interferência espectral nas linhas de absorção empregadas na determinação. Havendo interferência espectral, deve ocorrer perda de proporcionalidade nas medidas no comprimento de onda interferido; como consequência observa-se um ponto fora da curva MEC (o ponto no comprimento de onda interferido se distancia da equação linear entre S1 *versus* S2). Cabe destacar que alguns *outliers* podem ser oriundos de flutuações instrumentais, imprecisão de algumas linhas de absorção, e valores de absorbância fora da faixa linear de trabalho.

Portanto, dos pontos acima mencionados, o analista deve preparar as soluções S1 e S2 de forma a garantir que ambas estejam na mesma faixa linear, e para isso é importante uma busca prévia na literatura (ou programa do instrumento quando disponível) sobre as faixas lineares de cada elemento. No caso de *outliers*, ao serem identificados, podem ser removidos através da análise dos resíduos da equação linear; e uma nova equação linear é obtida, este procedimento proporciona melhor precisão e exatidão nos resultados.

Como exemplo, a curva MEC para a determinação de P usando as linhas 247,371, 247,382, 247,402, 247,418, 247,460, 247,473, 247,486, 247,498, 247,531, 247,540, 247,550, 247,559, 247,580, 247,593 e 247,624 nm obteve-se uma equação linear com coeficiente de determinação R^2 de 0,9945, exatidão de 90 % e RSD de 5 %. A análise dos resíduos desta curva de calibração identificou algumas linhas de absorção como *outliers*, sendo estas as linhas 247,460, 247,473, 247,550, 247,559, 247,580 e 247,593 nm. Uma nova curva MEC foi gerada considerando os 9 pontos restantes, obtendo assim o R^2 de 0,9995, exatidão de 96 % e um RSD de 1 %.

Um procedimento semelhante foi aplicado para a determinação de Cl, N e S e em todos os casos, uma ligeira melhora foi observada na linearidade, exatidão e precisão, como pode ser observado na Figura 27. Nesta figura, estão as curvas MEC para PO, NO, CS e CaCl, sendo à esquerda, os gráficos empregando todas as linhas de absorção molecular analisadas, e à direita, os mesmos após a remoção dos *outliers*.

Com relação a molécula de NO, esta pode ser considerada a mais suscetível a interferências, uma vez que a transição eletrônica $X^2\Pi \rightarrow A^2\Sigma^+$ desta molécula encontra-se na região próxima a 200 nm, região a qual há um fundo espectral produzido por várias moléculas. Neste caso, apenas sete comprimentos de onda foram selecionados para a construção da curva MEC (Figura 27).

Por outro lado, em métodos tradicionais de calibração, como EC, IS e SA, a identificação de interferências espectrais durante a análise de rotina não é trivial. Além de um conhecimento prévio de possíveis sobreposições de sinais, seria necessário executar experimentos de adição/recuperação para cada linha analítica para identificar tais interferências espectrais. No entanto, a ocorrência de interferência espectral no MEC é feita pela simples identificação de eventuais *outliers* no gráfico de S1 *versus* S2. Nesse caso, a análise de várias linhas de absorção proporciona maior seletividade do método.

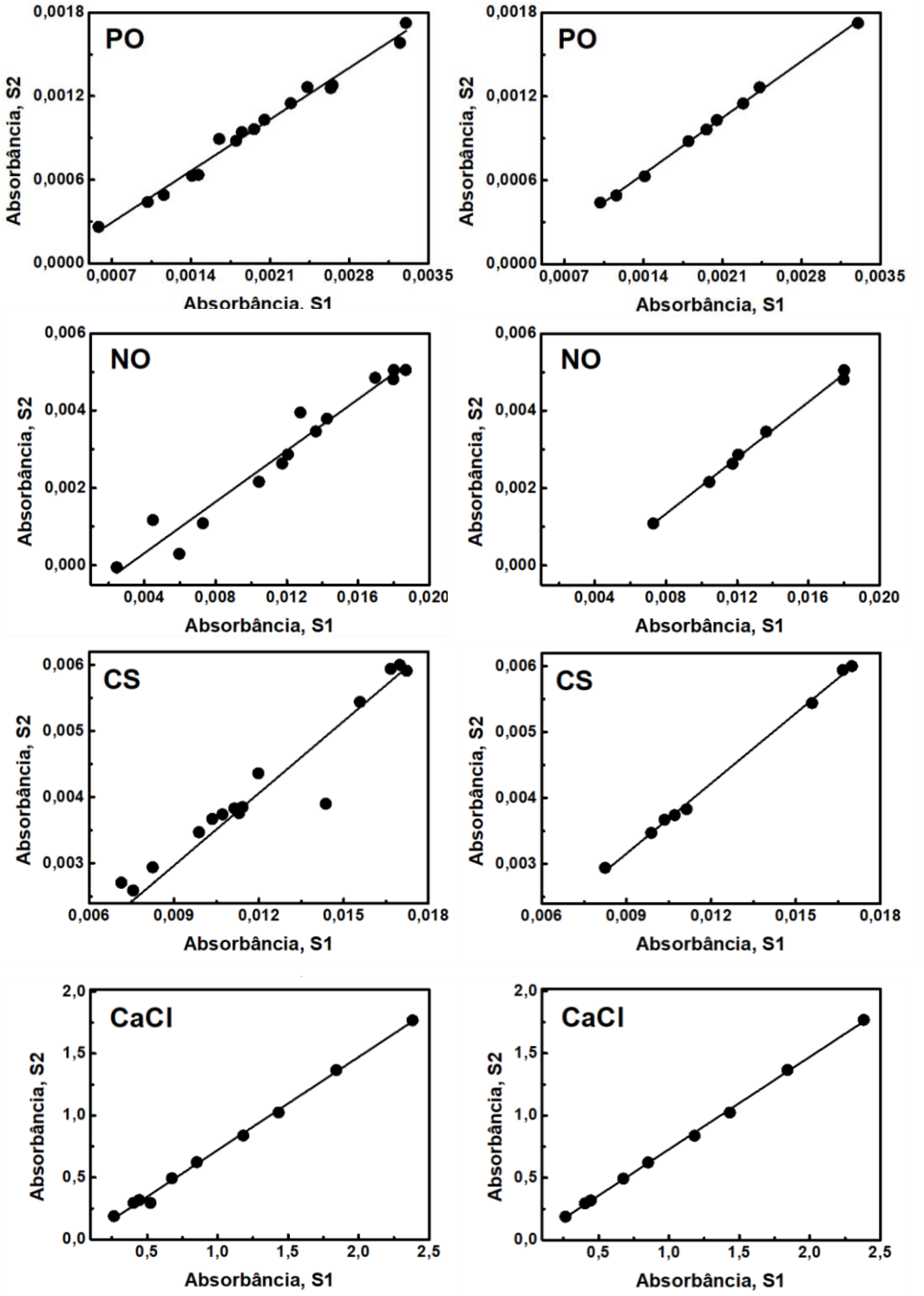

Figura 27 - Curvas de calibração para PO, NO, CS e CaCl obtidas via MEC sem (à esquerda) e após (à direita) a remoção de *outliers*.

Fonte: Autor

No MEC, a razão 1:1 da solução da amostra e padrão (S1) ou amostra e branco (S2) foi empregada apenas para simplificar o preparo das soluções. Outras proporções de misturas

usando quantidades menores de amostra, *e.g.*, 1:2, 1:3, 1:10 (v v^{-1}), ou quantidades maiores de amostra, *e.g.*, 2:1, 3:1, 10:1 (v v^{-1}), podem ser utilizadas desde que a quantidade de amostra seja mantida constante em ambas as soluções. Desta forma, o MEC é versátil para lidar com amostras que contém baixa concentração do analito, as quais necessitam de menor diluição, ou amostras que contém elevada concentração do analito e/ou alta concentração de sais ou ácidos, condições estas que necessitam de maior diluição para evitar absorbância de fundo, comportamento não linear ou danos no equipamento. Deste modo, a proporção empregada nas análises influencia no LOD do método.

Com relação ao LOD empregando a razão 1:1 (S1:S2), este foi calculado através da análise de 10 brancos analíticos (*i.e.*, água ultrapura preparada e analisada de forma similar a amostra). A partir destes resultados, empregou-se a equação $LOD = 3\,SD_{br}^{MEC}$, sendo SD_{br}^{MEC} correspondente ao desvio padrão da concentração de 10 brancos analíticos.

No que se refere a calibração externa, o LOD foi calculado usando a equação $LOD = 3\,\frac{SD_{br}^{EC}}{m}$, sendo SD_{br}^{EC}, o desvio padrão de 10 medidas do branco e m, a inclinação da curva de calibração.

Os LOD para PO (9 linhas de absorção), CS (8 linhas de absorção) e NO (7 linhas de absorção) obtidos com a MEC foram de 10, 10 e 100 mg L^{-1}, respectivamente. Estes valores foram comparáveis aos LOD obtidos pela calibração externa, sendo estes de 10, 10 e 200 mg L^{-1} para PO (λ, 247,620 nm), CS (λ, 257,595 nm) e NO (λ, 215,360 nm), respectivamente.

Os LOD obtidos para a determinação Cl por MEC (9 linhas de absorção) e calibração externa (621,147 nm) foram de 0,05 e 0,06 g kg^{-1}, respectivamente.

Uma visão geral dos dados acima sugere que os desempenhos para MEC e calibração externa são semelhantes. No entanto, em análises de rotina em grande escala, interferências não espectrais podem ocorrer, comprometendo a precisão e/ou exatidão do método. Neste contexto, a estratégia MEC pode ser uma ferramenta valiosa na minimização de interferências não espectrais para amostras contendo razões inesperadas de interferência/analito.

Para verificar esta hipótese, um experimento foi conduzido para demonstrar a potencialidade do MEC em minimizar a interferência de Ca na determinação de P, que por sua vez, ocasiona a redução do sinal de PO devido à formação de fosfato de cálcio estável. Desta forma, uma solução de 1000 mg L^{-1} de P foi analisada por MEC e calibração externa na presença de 0, 100, 500, 1000 e 2000 mg L^{-1} de Ca. Estes resultados estão expostos na Figura 28. As determinações destas soluções por MEC e por calibração externa utilizaram os mesmos procedimentos empregados para as determinações das amostras.

Como pode ser observado na Figura 28, o MEC, em relação a EC, é menos susceptível à interferência não espectral causada pelo Ca. Este fato está relacionado com a compatibilização da matriz, no qual a concentração de Ca é a mesma em ambas as soluções S1 e S2. Em relação a estratégias MEC e calibração externa, exatidões próximas a 100 % foram obtidas em 0 e 100 mg L^{-1} de Ca. Quando a concentração de Ca foi aumentada para 500 mg L^{-1}, as exatidões na determinação de P empregando MEC mantiveram próximas de 100 %, enquanto as exatidões obtidas para calibração externa caíram para 81 %. A maior diferença entre a MEC e a calibração externa foi obtida na concentração de 2000 mg L^{-1} de Ca, as quais obtiveram exatidões de 91 % e 51 %, respectivamente.

Diante destes resultados, é possível inferir que a compatibilização de matriz empregada pelo MEC proporciona maior robustez quando comparado com a calibração externa, principalmente levando em consideração a possibilidade de minimizar possíveis interferências não espectrais, como foi ilustrado na determinação de P na presença de Ca.

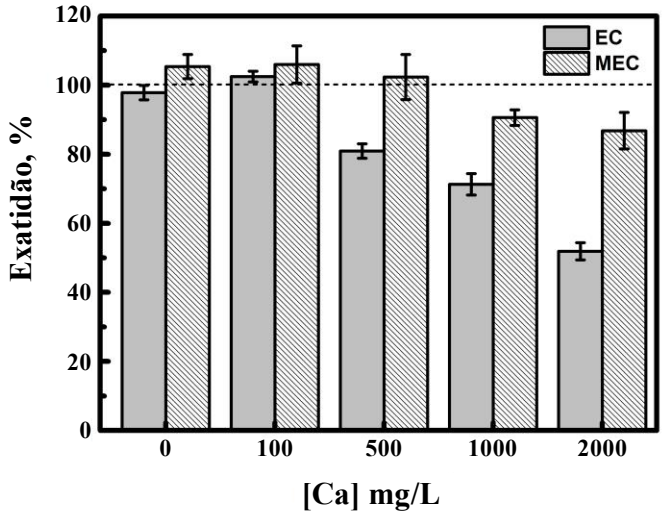

Figura 28 - Efeito da concentração de Ca na determinação de 1000 mg L^{-1} de P utilizando MEC e calibração externa (EC).

Fonte: Autor

6.4. Conclusões parciais

O uso de várias linhas de absorção molecular de espécies diatômicas observadas pelo HR-CS MAS é geralmente negligenciado em métodos convencionais de calibração, e pela primeira vez, essas linhas de absorção foram empregadas para aplicação do MEC em HR-CS

MAS para determinação de não-metais. A utilização do MEC em HR-CS FMAS e HR-CS GFMAS é atrativo devido as várias linhas de absorção molecular serem registradas simultaneamente na estreita janela espectral (0,2 - 0,5 nm) destes equipamentos.

A MEC forneceu resultados com precisão e exatidão adequados para as determinações de PO, CS, NO e CaCl, os quais foram concordantes estatisticamente com aqueles obtidos com a calibração externa e valores de referência certificados.

Neste trabalho foi demonstrado que a estratégia MEC permite a identificação de interferências espectrais através de *outliers* na regressão linear do gráfico S2 *versus* S1. Além disso, demonstrou-se, pela primeira vez, que o MEC, diferentemente da calibração externa, é capaz de minimizar interferências não espectrais, obtendo exatidões próximas a 100 % na determinação de P (via PO) na presença de Ca (até 2000 mg L^{-1}). Essa estratégia não é limitada a interferência de Ca na formação da molécula de PO, outros interferentes na taxa de formação de molécula diatômica podem apresentar resultados semelhantes.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a potencialidade de aplicação da estratégia MEC para determinações de não metais por HR-CS FMAS e HR-CS GFMAS.

7. Determinação direta e simultânea de Fe e Zn em sangue por HR-CS GFAAS empregando DBS

7.1. Introdução

Uma pequena fração do corpo humano (cerca de 0,02 % do peso total de um adulto) é constituída por elementos essenciais, os quais exercem funções cruciais nos processos fisiológicos. A maioria deles participa de reações bioquímicas vitais, atuando como cofator ou catalisador de muitas enzimas, bem como centros estruturais de estabilização de enzimas e proteínas (205). O Fe, como exemplo, é responsável por diversas funções no organismo tais como transporte do oxigênio, funções enzimáticas, entre outras. A carência deste elemento no organismo é mais prejudicial do que qualquer outro, resultando em anemia, que pode provocar insuficiência cardíaca, comprometimento da atenção, perda de memória e atrofia do epitélio, sendo esta responsável por 20 % das mortes maternais na Índia (205).

O Zn é outro elemento essencial, o qual faz parte de mais de 300 enzimas e desempenha funções estruturais em proteínas relacionadas com a replicação do DNA (206). Os sintomas relacionados a deficiência deste elemento incluem (i) comprometimento do metabolismo energético, (ii) intoxicação alcoólica, (iii) acidose, e (iv) bloqueio da biossíntese de proteínas (205). Embora o zinco seja um elemento essencial, distúrbios metabólicos crônicos podem resultar no excesso ou deficiência desse metal (207).

Com relação ao aspecto clínico, há um interesse crescente pelo monitoramento destes elementos no sangue visando a prevenção, diagnóstico ou tratamento de diversas doenças. As análises de sangue geralmente utilizam alguns mililitros obtidos por punção venosa, uma prática considerada inadequada em algumas situações para idosos, bebês ou pacientes com veias danificadas (16). Neste sentido, um método clínico minimamente invasivo utilizando pequeno volume de sangue depositado em papel (DBS) foi desenvolvido em 1963 para diagnóstico da doença metabólica fenilcetonúria em recém-nascidos (92). Desde então, o DBS foi implementado em larga escala em programas de triagem neonatal em todo o mundo, possibilitando o diagnóstico de mais de trinta distúrbios (99).

O DBS fundamenta-se na análise de alguns microlitros de sangue depositado sobre a superfície de um papel filtro. É um procedimento minimamente invasivo, simples, de baixo custo; e a interação sangue-papel confere estabilidade da amostra por vários dias, permitindo a coleta em locais remotos (208). Métodos tradicionais utilizam maior volume de amostra, requer baixas temperaturas (geralmente de -20 até -80 °C) para garantir a preservação, que por sua vez dificulta o transporte e o armazenamento (16,99).

Deve ser ressaltado que a maioria das técnicas analíticas analisam amostras liquidas. Quando no estado sólido, ela dever ser convertida em solução. Esta etapa de preparo da

amostra consume reagentes, energia e tempo, implicando em mais custos, além do risco de contaminação (109). Algumas técnicas analíticas, como a HR-CS GFAAS, podem ser utilizadas em associação com a amostragem de material sólido, conhecida como *Solid Sampling* (SS) (109).

A SS HR-CS GFAAS permite analisar a amostra diretamente (sem preparo prévio) ou após mínimo preparo, evitando etapas de extração ou dissolução e/ou diluição, minimizando o resíduo gerado ao final da análise. Além do mais, análise elementar por SS HR-CS GFAAS possui alta sensibilidade (a amostra não é diluída) e o programa de aquecimento do atomizador permite eliminar a matriz da amostra (tende a melhorar a precisão e exatidão) (9). A SS HR-CS GFAAS é adequada para a amostragem por DBS pois requer apenas a remoção de um pequeno disco do papel (~3,2 mm de diâmetro) e deposição do mesmo sobre a plataforma de grafite para análise (14).

Resano *et al.,* (14) utilizaram a HR-CS GFAAS para a determinação de Pb em sangue por DBS. Os autores compararam os resultados obtidos por DBS com a análise direta de sangue intravenoso, e concluíram que ambos os métodos produziram resultados concordantes entre si. O LOD obtido foi de 2,5 μg L^{-1} e a precisão calculada como RSD foi ≤ 10 %.

Rello *et al.*, (209) utilizaram SS HR-CS GFAAS para determinação simultânea de Mo e Ti em urina impregnada em papel filtro para monitorar desgaste de próteses implantadas em humanos. Os LODs para Mo e Ti foram 1,5 e 6,5 μg L^{-1}, respectivamente. O método desenvolvido não detectou Ti nas amostras analisadas, mas tem potencial em eventual desgaste das próteses.

Com base no método proposto por Resano *et al.,* (14), Rello *et al.*, (15) utilizaram a HR-CS GFAAS para determinar Pb e estabelecer protocolo de triagem. O método apresentou alta sensibilidade (LOD = 1 μg L^{-1}), alta taxa (> 95 %) de verdadeiro positivo detectados e frequências analíticas da ordem de 6 amostras por hora.

Tendo em vista as vantagens da SS HR-CS GFAAS para análises via DBS, bem como a importância clínica na determinação de Fe e Zn em sangue, foi proposto um método simples, rápido e minimamente invasivo para determinação simultânea de Fe e Zn em sangue utilizando SS HR-CS GFAAS e DBS.

7.2. Materiais e métodos

7.2.1. Reagentes, soluções e amostras

Dez amostras de sangue humano foram coletadas em tubos de coleta a vácuo e cedidas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O DBS de cada amostra de sangue foi produzido por deposição de 50 µL de sangue em cartões de coleta de sangue da marca *Whatman* 903® (LOTE: 6940712 W113, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Uma fotografia de uma das amostras em tubo de coleta está apresentada na Figura 29a, e o respectivo DBS na Figura 29b.

Um perfurador de papel foi utilizado para remoção manual de discos com 3,4 mm de diâmetro do papel *Whatman* 903® original. Esses discos foram depositados no amostrador de grafite para análise.

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida pelo sistema de osmose reversa Millipore (Bedford, EUA) foi utilizada para a diluição dos padrões analíticos e amostras.

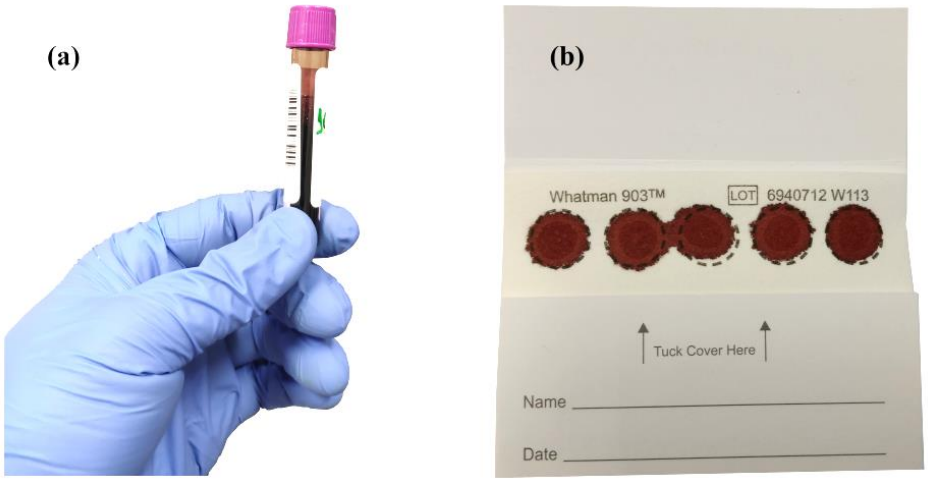

Figura 29 - Fotografias do tubo contendo a amostra de sangue (a) e do DBS produzido com papel *Whatman* 903® (b).

Fonte: autor

A curva analítica de Fe foi preparada no intervalo de 0,1 a 3 µg Fe por meio da deposição de alíquotas de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 µL do padrão 1000 mg L^{-1} Fe (SpecSol, São Paulo, Brasil) sobre discos de 3,4 mm de diâmetro do papel *Whatman* 903® sem sangue previamente posicionados na plataforma de grafite.

A curva analítica de Zn foi preparada no intervalo de 5,2 a 50 ng de Zn por meio da deposição de alíquotas de 1,3, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 µL da solução 4 mg L^{-1} Zn (obtida por diluição do padrão 1000 mg L^{-1}, SpecSol, São Paulo, Brasil) sobre discos de 3,4 mm de diâmetro do papel *Whatman* 903® sem sangue previamente posicionados na plataforma de grafite.

Padrão espectroscópico 1000 mg L^{-1} de W (SpecSol, São Paulo, Brasil) foi utilizado para recobrimento da plataforma de grafite pirolítico.

Ácido nítrico 65 % (v v^{-1}) e peróxido de hidrogênio 30 % (m m^{-1}) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram empregados no procedimento de digestão das amostras de sangue.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas e descontaminadas por submersão em uma solução de HNO_3 10 % (v v^{-1}) por 24 h, sendo enxaguadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente.

7.2.2. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua (ContrAA 700, Analytik Jena, Jena, Alemanha), com aquecimento transversal, plataformas de amostragem de sólidos e um amostrador automático (SSA 600) foi utilizado para registro das linhas de absorção de Fe e Zn. Este instrumento é equipado com (i) lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade (XBO 301, GLE, Berlim, Alemanha) como fonte de radiação contínua operando em modo "*hot-spot*" com emissão de 190 a 900 nm, (ii) monocromador DEMON, constituído de um prisma Littrow e uma rede de difração Echelle, e (iii) detector CCD.

Argônio de alta pureza 99,999 % (White Martins, Sertãozinho, Brasil) foi empregado como gás de purga e proteção.

Um forno micro-ondas (Multiwave Anton Paar, Graz, Áustria) com frascos de PFA ($T_{máx}$ = 200 °C e $P_{máx}$ = 20 bar) e rotor de 48 posições (MF50) foi utilizado para decomposição das amostras de sangue.

Um espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte contínua e alta resolução (ContrAA 300, Analytik Jena, Jena, Alemanha) foi utilizado para as determinações de Fe e Zn nas amostras de sangue digeridas.

Acetileno de alta pureza (99,7 % de pureza, Air Liquid, SP, Brasil) foi utilizado com gás combustível para as análises em HR-CS FAAS.

Os principais parâmetros instrumentais da técnica HR-CS FAAS utilizada como comparativa na determinação de Fe e Zn estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros instrumentais da HR-CS FAAS utilizados para determinar Fe e Zn simultâneo

Parâmetro instrumental	**Condição**	
	Fe	Zn
Comprimento de onda (nm)	302,107	213,857
Caminho óptico do queimador (mm)	100	100
Fluxo de ar comprimido (L h^{-1})	434	434
Fluxo de acetileno (L h^{-1})	95	120
Altura de observação (mm)	4	8
Taxa de aspiração (mL min^{-1})	5	5
LOQ (mg L^{-1})	11,8	0,91

O fundo espectral causado pela molécula de NO, que sobrepõe a linha do Zn em 213,857 nm, foi removido pelo método de correção LSBC. Para isso foi gerado em espectro de absorção da molécula de NO de referência a partir de uma solução 1% (v v^{-1}) de HNO_3.

7.2.3. Procedimento de determinação de Fe e Zn em DBS

Cada círculo pontilhado do papel *Whatman* 903® gerou um DBS pela deposição de 50 µL de sangue no centro do círculo (Figura 30a). Após a secagem, de seis a sete discos de 3,4 mm de diâmetro foram removidos do DBS com auxílio de um perfurador de papel (Figura 30b-c) para posterior análise por SS HR-CS GFAAS.

A plataforma de grafite pirolítico foi recoberta com 200 µg W por meio da aplicação de 5 ciclos do programa de aquecimento descrito na Tabela 11. Em cada ciclo foram injetados 40 µL do padrão 1000 mg L^{-1} W.

Os discos de 3,4 mm de diâmetro foram inseridos diretamente na plataforma de grafite revestida com W, e esta conduzida até o interior do forno de grafite com auxílio do amostrador automático.

A linha de absorção de Fe a 446,165 nm, bem como as linhas de Fe a 307,572 nm e do Zn a 307,589 nm (estas duas na mesma janela espectral) foram registradas em triplicata com absorbância integrada no volume de pico equivalente a três *pixels*.

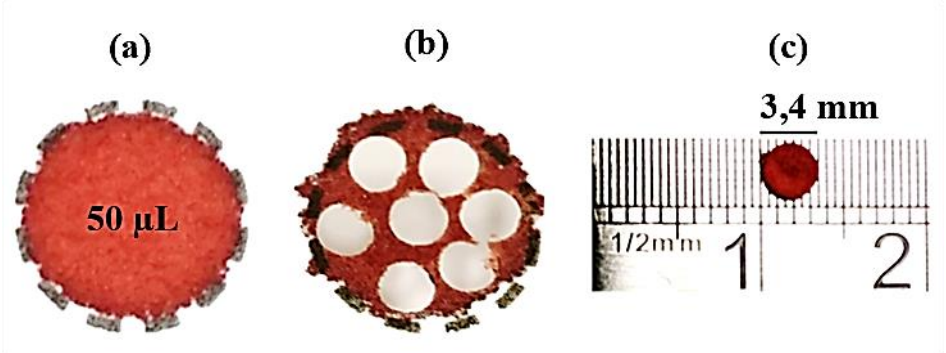

Figura 30 - Fotografias de 50 µL de sangue depositado no papel (a), DBS após a retirada de 7 discos menores (b) e destaque de um disco sobre régua (c).

Fonte: Autor

Tabela 11 - Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da plataforma de grafite com W como modificador permanente

Etapa	Temperatura °C	Rampa °C s^{-1}	Permanência s	Fluxo de argônio L min^{-1}
1	130	30	20	2
2	400	30	20	2
3	1000	100	10	2
4	2000	100	5	2

Os programas de aquecimento para a determinação de Fe e Zn foram otimizados e estão apresentados na Tabela 12. As curvas analíticas foram construídas na faixa de 0,1 a 3 µg de Fe, e de 5,2 a 50 ng de Zn.

Os LOQs foram calculados seguindo as recomendações da IUPAC, $LOQ = 10\frac{SD_{br}}{m}$, em que SD_{br} corresponde ao desvio padrão de dez brancos (dez discos de 3,4 mm de papel sem sangue) e *m* a inclinação da curva analítica (210).

Tabela 12 - Programas de aquecimento otimizados para a determinação de apenas Fe (446,165 nm) e de Fe (307,572 nm) em conjunto com Zn (307,589 nm) em DBS por SS HR-CS GFAAS

Etapa	Temperatura °C	Rampa °C s^{-1}	Permanência s	Fluxo de argônio L min^{-1}
Secagem 1	110	5	15	2
Pirólise	1600[a] / 900[b]	300	30	2
Auto-Zero[c]	1600[a] / 900[b]	0	5	0
Atomização	2400	2000	7	0
Limpeza	2500	500	4	2

[a] Condições empregadas para a determinação de Fe (446,165 nm).
[b] Condições empregadas para a determinação simultânea de Fe e Zn.
[c] Etapa para garantir que a atomização comece sem o fluxo de argônio.

7.2.3.1. Determinação de Fe e Zn pelo método comparativo

Todas as amostras de sangue foram digeridas em triplicata em um forno micro-ondas utilizando 0,5 mL de sangue, 2 mL de HNO_3, 1 mL de H_2O_2 e 3 mL de H_2O. O programa de aquecimento utilizado consistiu de 3 etapas: (i) aquecimento, partindo da temperatura ambiente até 200 °C em 20 min; (ii) permanência, em 200 °C por 15 min; (iii) resfriamento de 200 °C a 60 °C em 25 min. Após a etapa de resfriamento, as amostras digeridas foram transferidas para frascos de polipropileno, sendo o volume ajustado para 20 mL com água deionizada.

As concentrações de Fe e Zn nos digeridos foram determinadas por HR-CS FAAS empregando as condições instrumentais descritas na Tabela 10.

As curvas analíticas para as determinações de Fe e Zn foram construídas na faixa de 1 a 20 mg L^{-1} Fe e de 25 a 300 µg L^{-1} Zn, a partir da diluição apropriada do padrão espectroscópico de 1000 mg L^{-1} de cada elemento.

7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Procedimento de amostragem e escolha da linha analítica

A determinação de Fe e Zn em DBS por HR-CS GFAAS constitui um desafio analítico por conta das altas concentrações desses elementos. Em trabalho sobre a determinação desses elementos em sangue humano por ICP-MS, Harrington e colaboradores relataram concentrações da ordem de 445 - 521 mg L^{-1} Fe, e 5,7 - 8,8 mg L^{-1} Zn (211). A exatidão na determinação desses elementos depende então da quantidade de sangue contida no disco de DBS analisado (para expressar a concentração em massa por volume de sangue), e a escolha adequada da linha de absorção (faixa linear de trabalho em consonância com as absorbâncias dos elementos nas amostras). Neste sentido, estudos relativos à determinação do volume de sangue contido nos discos removidos do DBS original, e a escolha da linha de absorção para a determinação destes elementos foram feitos e estão detalhados a seguir.

7.3.1.1. Cálculo do volume de sangue nos discos removidos para análise

Em princípio, a quantidade de Fe e Zn retido por mm^2 de DBS deve ser proporcional a concentração dos elementos no sangue, e esta quantidade não ser influenciada por outros fatores, como exemplo o volume de sangue depositado (212). Para verificar esta hipótese, deposições de volumes crescentes de 25 a 200 µL de sangue foram feitas sobre o papel e as respectivas áreas de DBS (mm^2) produzidas determinadas empregando o *software ImageJ*. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 31. Nesta figura, o volume de sangue *versus* a área do DBS resultou na equação linear $y = 2{,}27x + 0{,}45$, a qual obteve r = 0,998. Portanto, neste estudo a quantidade de sangue por mm^2 mantêm-se constante, independente do volume depositado.

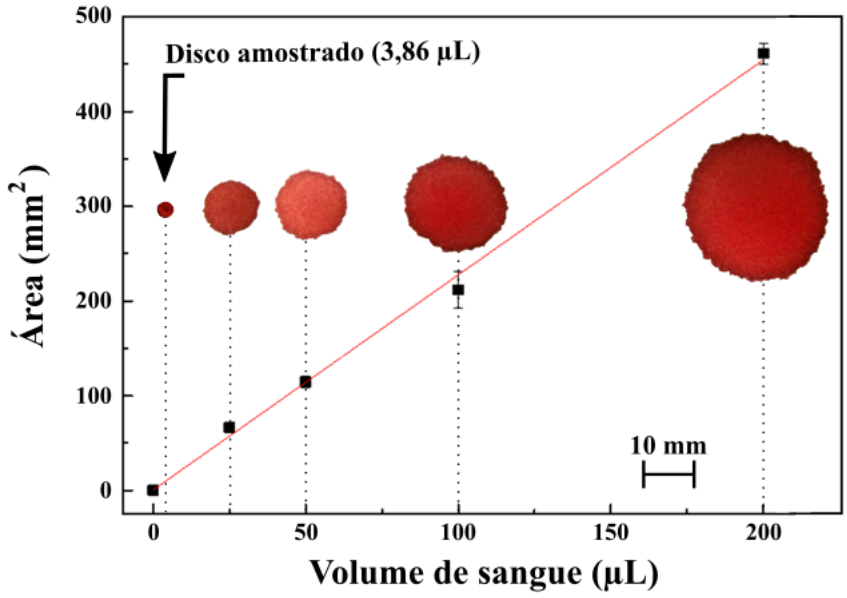

Figura 31 - Correlação entre volume de sangue depositado e área do DBS (n = 3) calculada pelo *software ImageJ*.

Fonte: Autor

O volume do disco de 3,4 mm de diâmetro foi determinado interpolando a sua área de 9,2 ± 0,2 mm^2 (n = 3) no gráfico apresentado na Figura 31, sendo obtido o volume correspondente a 3,86 ± 0,13 µL de sangue. A relação do volume de sangue por área de DBS obtida neste trabalho está muito próxima das encontradas na literatura (14,15,109). O resultado desse estudo é importante porque não requer controle do volume exatamente depositado sobre o papel, o que permite o desenvolvimento de métodos mais simples e rápidos.

7.3.1.2. *Escolha das linhas analíticas para determinações de Fe e Zn*

Em HR-CS GFAAS, há a opção de seleção de linhas com diferentes sensibilidades relativas. Deste modo, linhas alternativas com menores sensibilidades foram avaliadas para a determinação de Fe e Zn em função das altas concentrações esperadas desses elementos nas amostras de sangue (211). O estudo inicial empregou a análise de uma amostra (DBS) com programas de aquecimento para Fe e Zn fornecidos pelo fabricante, otimizados para meio aquoso (fornecido pelo *software* ASpect CS).

Com relação ao Fe, a linha de absorção em 446,165 nm com 0,0083 % de sensibilidade foi inicialmente escolhida, e em seguida o programa de aquecimento foi otimizado.

O *software* ASpect CS lista apenas duas linhas de absorção disponíveis para o elemento Zn, a linha principal em 213,857 nm e outra alternativa 307,589 nm (0,02 % de sensibilidade relativa). Análise preliminar da amostra de DBS revelou que a linha de absorção principal fornecia absorbâncias muito elevadas, mostrando que a utilização era inviável. A linha em 307,589 nm proporcionou leituras de absorbâncias com valores adequados as necessidades do método, e foi a escolhida para os estudos posteriores relacionados com a otimização do programa de aquecimento

7.3.2. Programa de aquecimento nas determinações de Fe e Zn

A plataforma de grafite foi previamente revestida com o modificador permanente W com o intuito de prolongar a vida útil da mesma. O papel do DBS não era totalmente eliminado ao término do programa de aquecimento, havia a formação de pequeno resíduo carbonáceo na plataforma de grafite após a etapa de limpeza (Figura 32). A formação desse resíduo é favorecida pelo ambiente redutor do forno de grafite; a sua eliminação completa poderia ser tentada empregando-se uma etapa de pirólise assistida por ar, mas essa estratégia poderia reduzir significativamente o tempo de vida útil do conjunto plataforma-forno de grafite (213). Esse resíduo também foi encontrado em trabalhos semelhantes que empregam DBS (14) e foram facilmente removidos manualmente com auxílio de uma pinça no momento da introdução de amostra seguinte. Desta forma, esta foi a opção adotada neste trabalho.

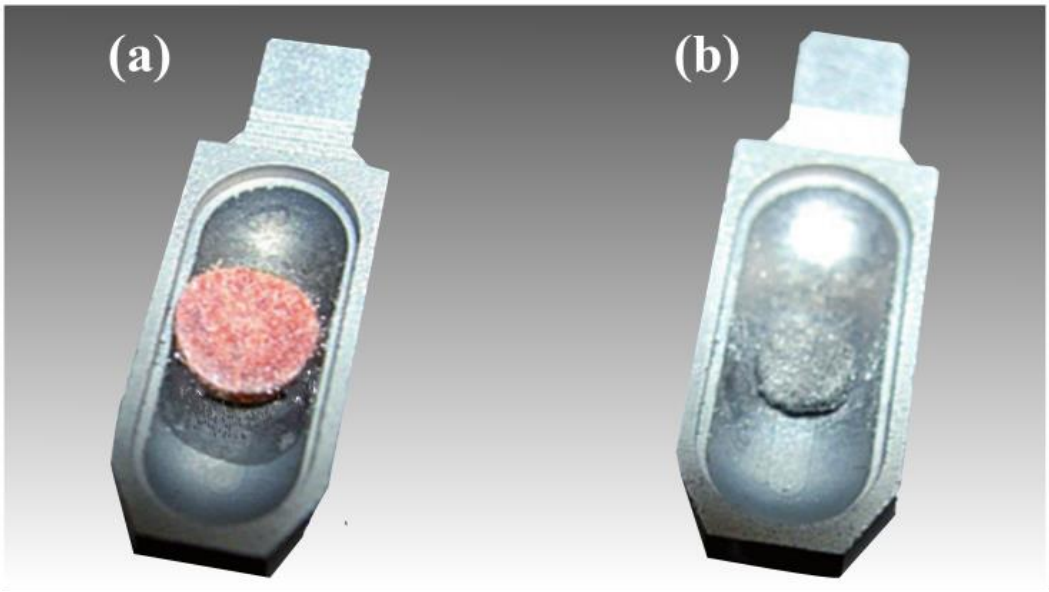

Figura 32 - Plataforma de grafite contendo discos de DBS antes (a) e depois (b) de um ciclo completo de aquecimento.

Fonte: Autor

Uma amostra de DBS contendo 521 ± 18 mg L^{-1} Fe determinada preliminarmente pelo método comparativo empregando amostras digeridas e HR-CS FAAS foi utilizada para otimização do programa de aquecimento. Nesse caso, o disco de 3,4 mm de diâmetro continha o equivalente a 2,01 ± 0,07 µg Fe.

Uma alíquota de 1,5 µL do padrão aquoso de Fe (equivalente a 1,5 µg Fe), foi depositado sobre papel (isento de sangue) para a otimização do programa de aquecimento.

As curvas de pirólise e de atomização nas faixas de 800 a 2000 °C e de 1800 a 2500 °C, respectivamente, foram construídas em meio de amostra (DBS) e em meio do padrão aquoso (Figura 33). Para ambos os meios, as melhores condições para a temperatura de pirólise e de atomização foram atingidas em 1600 °C e 2400 °C, respectivamente. Essas temperaturas forneceram as máximas absorbâncias integradas (atomização) com precisão satisfatória. Com o programa de aquecimento otimizado, um espectro resolvido no tempo e comprimento de onda típico para o Fe em DBS está apresentado na Figura 34. Em geral, os perfis dos picos de absorção do Fe em meio do padrão aquoso foram muito similares àqueles obtidos na Figura 34. Nesta figura é possível observar a obtenção de um pico de absorção intenso e com baixos valores de fundo nas regiões adjacentes.

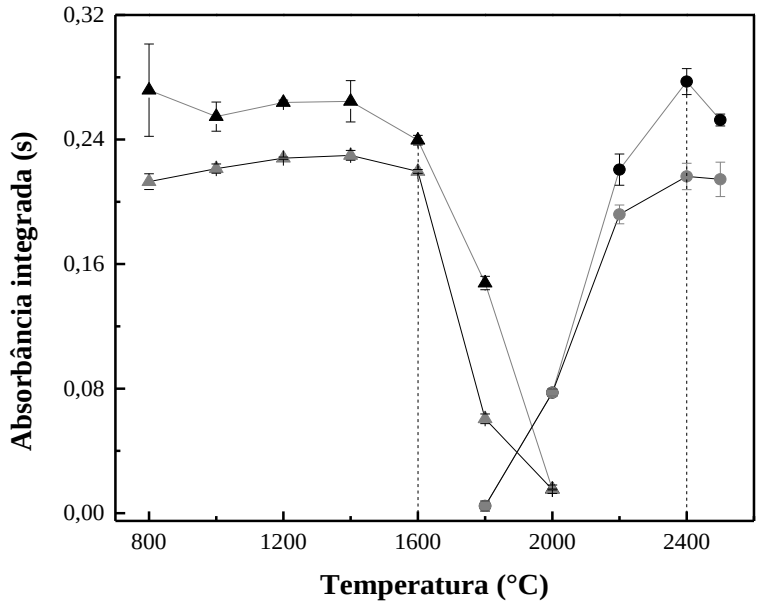

Figura 33 - Curvas de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) em meio aquoso (—) e em amostra (▬).

Fonte: Autor

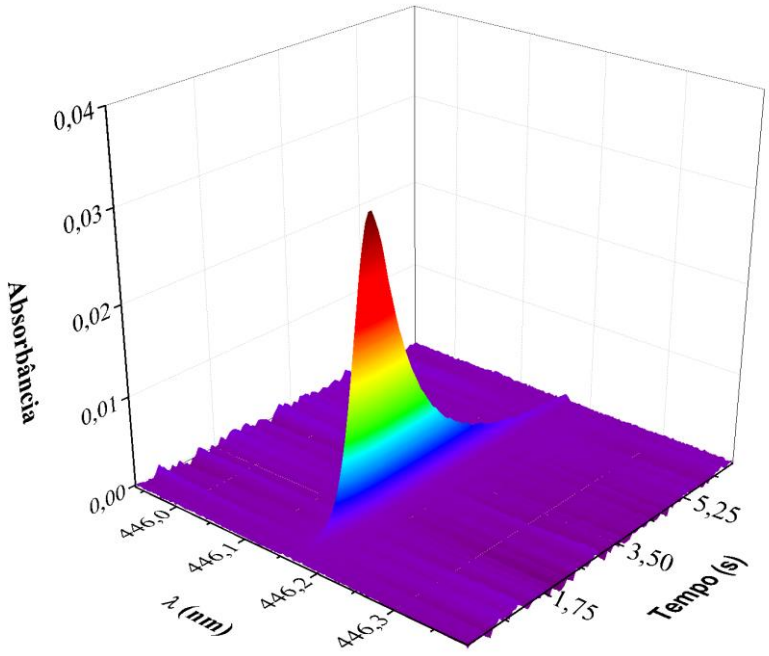

Figura 34 - Espectro de absorção resolvido no tempo e comprimento de onda para o Fe na linha 446,165 nm.

Fonte: Autor

Posteriormente, a otimização das temperaturas de pirólise e atomização foram feitas empregando apenas a linha de Zn em 307,589 nm em meio de uma amostra de DBS e de um padrão aquoso sobre papel sem empregar modificador químico. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 35.

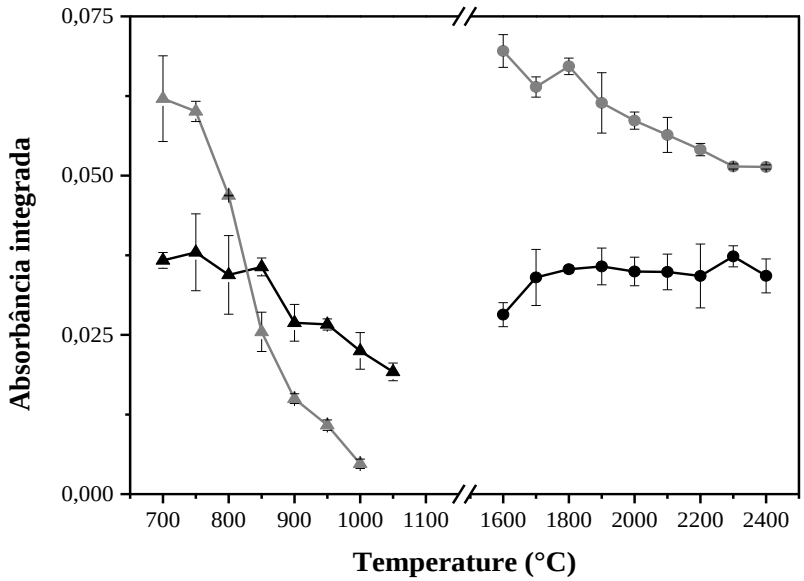

Figura 35 - Curvas de temperatura de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) referentes a 20 ng Zn em padrão aquoso sobre papel (—) e em amostra de DBS (━).

Fonte: Autor

As curvas de temperatura de pirólise variaram de 700 a 1050 °C (DBS) e de 700 a 1000 °C (padrão aquoso em papel). As curvas de temperatura de atomização variaram de 1600 a 2400 °C para ambos os meios (Figura 35). O DBS estabilizou o Zn em maior proporção que o papel apenas. Ainda, os perfis de absorção transientes obtidos para o Zn nos dois meios foram bem diferentes entre si. Considerando esses efeitos de matriz, foi então avaliada a influência da presença de Pd/Mg como modificador, e de H_2O_2, no perfil de absorção do Zn em ambos os meios. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 36.

Análise da Figura 36 revela que os perfis transientes obtidos para Zn em amostra e no padrão aquoso são diferentes. Para a amostra de DBS, o sinal é bem definido, enquanto em meio aquoso há 2 máximos, indicando que a atomização ocorre em duas etapas. Para contornar esse efeito de matriz, foi primeiramente avaliado o efeito da adição de 3 µL de uma solução 15 % (v v^{-1}) H_2O_2 sobre a amostra (DBS) e padrão aquoso. Deve ser informado que solução 30 % (v v^{-1}) H_2O_2 sobre o DBS produz um excesso de espuma e deve ser evitado.

Como observado na Figura 36, o perfil do sinal do Zn em DBS não sofreu alteração significativa. Por outro lado, houve uma melhora expressiva no perfil do pico em solução aquosa. A presença de H_2O_2 deve fragilizar as interações Zn-papel ou até mesmo promover a formação de óxidos termicamente mais estáveis do que o íon, levando a atomização em etapa única. Para o meio aquoso, a presença da mistura Pd/Mg produziu sinais transientes ligeiramente mais intensos, porém com tempos de aparecimento mais longos (de 1,3 s para 2,1 s). No caso do transiente do Zn na amostra, o modificador Pd/Mg diminuiu a sua intensidade significativamente e promoveu a atomização em três etapas. Considerando esses efeitos, o uso do Pd/Mg foi desconsiderado, e o programa de aquecimento foi finalmente otimizado empregando-se 3 µL de solução 15 %, v v^{-1} H_2O_2 em meio de amostra e em meio aquoso.

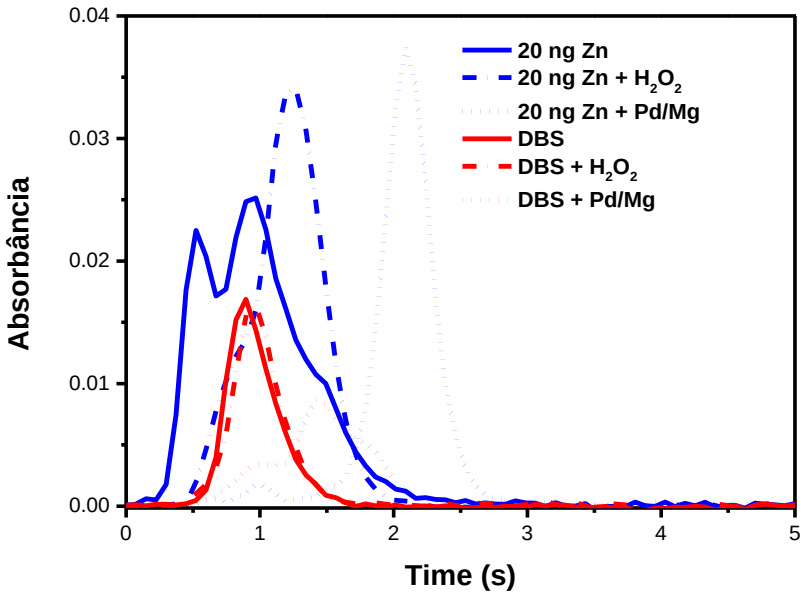

Figura 36 - Efeito da presença de Pd/Mg (2,5 µg de Pd e 1,25 µg de Mg) e H_2O_2 (3 µL de solução 15 %, v v^{-1}) em uma amostra de DBS e em um padrão aquoso sobre papel (20 ng Zn).

Fonte: Autor

Durante a otimização da temperatura de atomização (Figura 35), quando a temperatura ultrapassou 2200 °C surgiu o pico de absorção do Fe em 307,572 nm, com sensibilidade relativa de 0,043 %, ao lado do pico de absorção do Zn. Deste modo, a linha do Fe em 307,572 nm também foi monitorada para a otimização da temperatura de pirólise e atomização empregando H_2O_2.

As curvas de temperatura de pirólise e de atomização do programa de aquecimento otimizado para a determinação simultânea de Fe e Zn estão apresentadas na Figura 37. Observa-se na figura que a presença de H_2O_2 aumenta a estabilidade térmica do Zn na solução aquosa, um comportamento similar aquele observado na amostra de DBS. Em relação ao Fe, o comportamento térmico foi similar ao obtido na ausência de H_2O_2 (Figura 33).

Com relação a pirólise, a absorbância do Zn começa a cair a partir de 900°C, mais acentuadamente na solução aquosa. O Fe permanece praticamente estável entre 700 e 1100 °C.

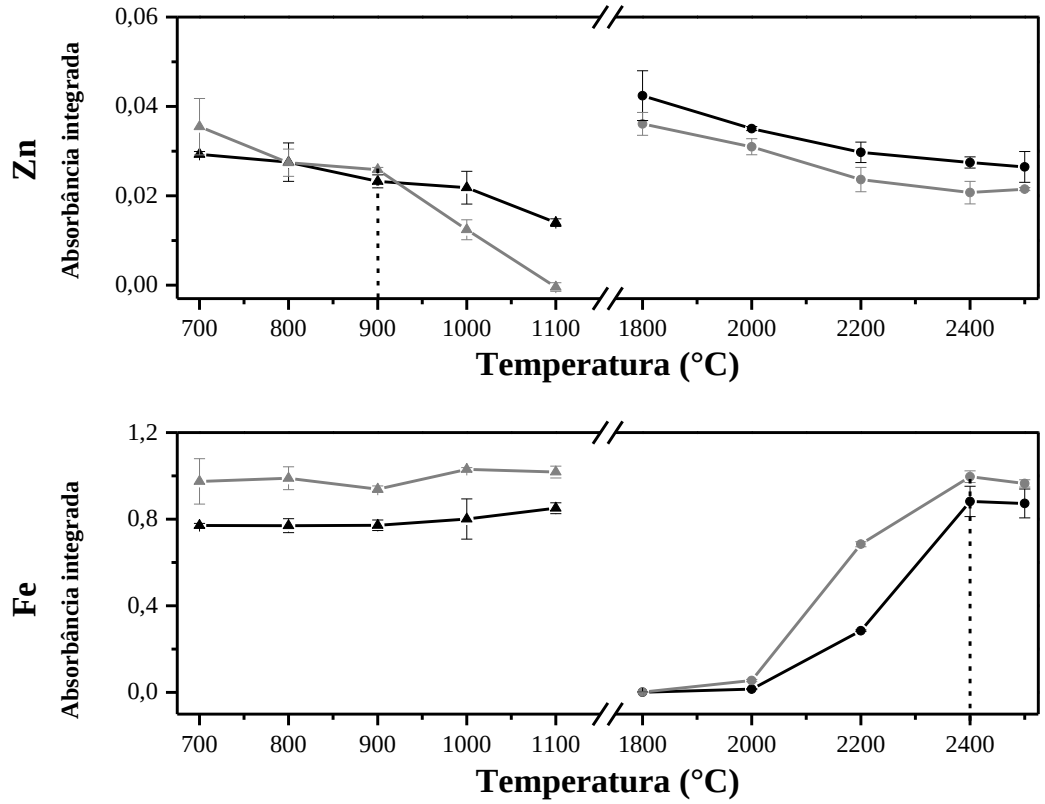

Figura 37 - Curvas de temperatura de pirólise (triângulos) e de atomização (círculos) para Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm em meio de uma amostra de DBS (▬) e em solução aquosa contendo 20 ng Zn e 2 µg Fe (▬). Modificador: 3 µL de solução 15% v v^{-1} H_2O_2.

Fonte: Autor

Com relação a atomização, a absorbância do Fe começa a aumentar em temperaturas > 2000 °C, atingindo o máximo em 2400°C. As máximas absorbâncias do Zn foram obtidas para atomização em aproximadamente 1800 °C, e decaem ligeiramente até 2400 °C. Considerando que medidas simultâneas requerem o estabelecimento de uma condição intermediaria entre as ótimas de cada analito, a temperatura de pirólise e de atomização foram

definidas em 900 °C e 2400 °C, respectivamente. A escolha recaiu na melhor condição de pirólise para o Zn e de atomização para o Fe. Com o programa de aquecimento do atomizador definido, uma amostra de DBS contendo 3 µL de H_2O_2 foi processada e os perfis dos transientes do Fe e do Zn foram registrados (Figura 38). De forma geral, os picos de absorção atômica desses elementos em meio aquoso e em DBS foram bem semelhantes, estando próximas e bem resolvidas (em relação ao tempo e comprimento de onda), sem fundo mensurável nas adjacências dos picos.

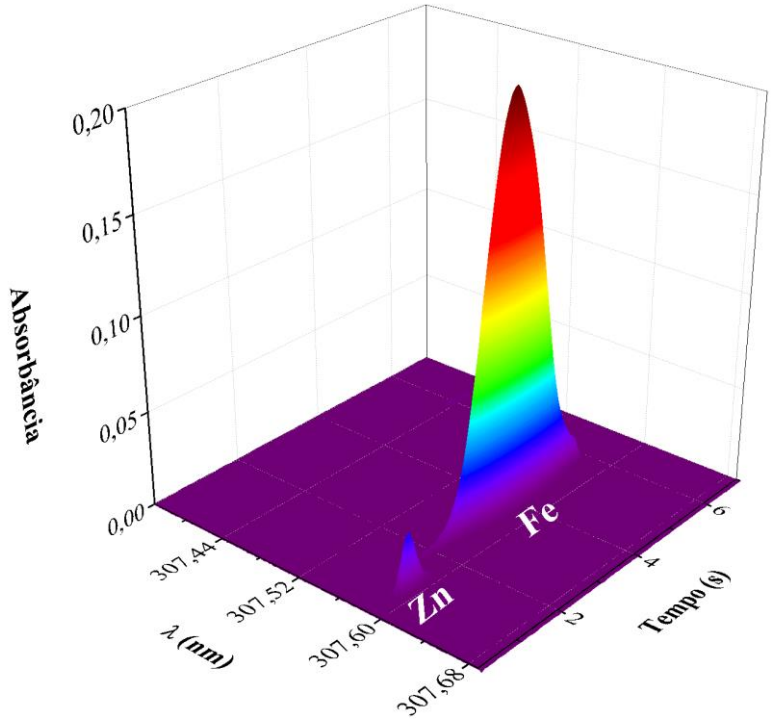

Figura 38 - Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo e comprimento de onda do Zn e do Fe presentes em uma amostra de DBS empregando H_2O_2 como modificador químico.

Fonte: Autor

7.3.3. Distribuição de Fe e Zn no DBS

A migração das espécies de Fe e de Zn na superfície do papel do DBS (efeitos cromatográficos ocasionados pela percolação do sangue no papel) pode levar a uma distribuição não homogênea dos analitos no DBS, influenciando na região amostrada e resultando em erros significativos.

A homogeneidade da distribuição de Fe e Zn no DBS em função da percolação do sangue foi avaliada pela medida (n = 3) das massas de cada elemento contidas em discos retirados em diferentes posições (*A, B, C, D*) do DBS (Figura 39). As regiões *A, B* e *C* correspondem a uma condição incomum, que emprega grande volume de sangue (200 µL). A região D refere-se à condição mais usual, que deposita cerca de 50 µL de sangue no papel. Os analitos foram determinados nos discos A, B, C e D empregando-se a calibração externa (padrões aquosos sobre papel). As massas médias obtidas neste estudo estão apresentadas na Figura 39.

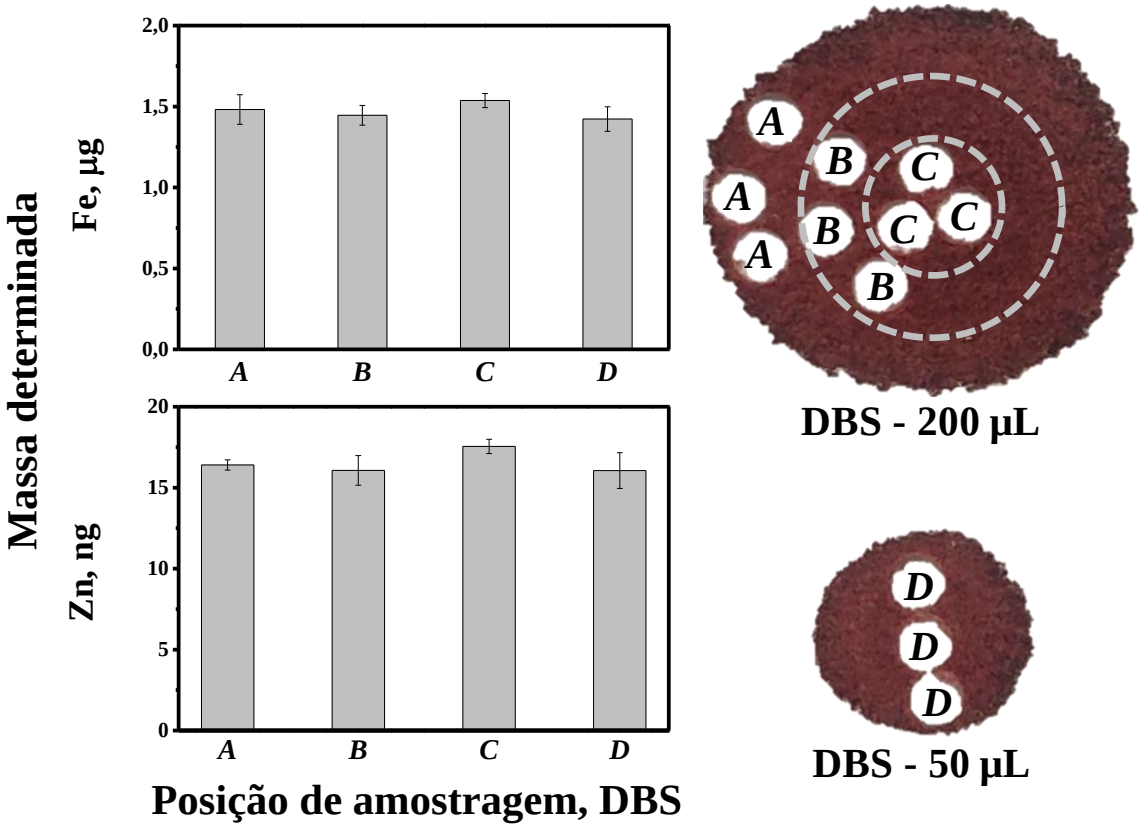

Figura 39 - Massas de Fe e Zn determinadas em diferentes partes (A, B, C e D) de um DBS obtido após adição de 200 µL e 50 µL de sangue.

Fonte: Autor

Análise da Figura 39 revela que a posição de amostragem influenciou pouco a medida da massa dos analitos. O RSD das medidas de Fe e Zn foram em geral < 5%. Para o Fe, as massas determinadas nas diferentes regiões apresentaram resultados semelhantes ao nível de 95% de confiança. Em relação ao Zn, apenas as posições *A* e *C* apresentaram diferenças estatísticas, apontando que o Zn pode sofrer efeitos cromatográficos (a

concentração do elemento depende do local de amostragem). Nesse caso, volumes de aproximadamente 200 µL devem ser evitados na determinação deste elemento. O papel coletor contém uma área demarcada que é totalmente preenchida por 50 µL ou 1 gota de amostra (Figura 30). Então do ponto de vista prático, a linha pontilhada orienta a quantidade a ser depositada, dificilmente sendo exigidas alíquotas além de 1 - 2 gotas de sangue. A coleta não requer um volume preciso, o que simplifica tanto a forma como a aplicação do método para ambientes remotos, fora do ambiente hospitalar ou do laboratório.

Cabe ainda mencionar que estes resultados foram obtidos avaliando apenas uma amostra de sangue, a qual não foi determinada a concentração de hematócrito. Como sugerido por outros autores (214), a concentração de hematócrito pode resultar em efeitos cromatográfico para diversos elementos, no entanto, para a amostra empregada neste estudo não foram observado efeitos cromatográficos para Fe e Zn quando o volume de 50 µL foi utilizado.

7.3.4. Determinação de Fe e Zn em DBS por HR-CS GFAAS

Nos últimos anos, a análise direta da amostra com espectrômetros de absorção atômica em forno de grafite tem demonstrado que, a calibração em meio aquoso fornece resultados com exatidão e precisão adequados a diversas aplicações (215). Esta estratégia de calibração foi utilizada com êxito para a determinação de Pb em DBS (14). Além do mais, encontrar padrões sólidos de calibração não é algo trivial para DBS. Nesta Tese, a determinação de Fe e Zn nas amostras de DBS empregou calibração externa aquosa, sendo os padrões preparados por deposição de alíquotas de solução padrão no papel (papel de 3,4 mm de diâmetro sem sangue).

As curvas de calibração foram preparadas nos intervalos de massa de 0 a 3,0 µg Fe e de 0 a 50 ng Zn. As curvas de calibração obtidas para Fe-446,165 nm, Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm estão apresentadas na Figura 40. Em todos os casos, os coeficientes de correlação variaram de 0,997 a 0,999. Os RSDs médios obtidos para Fe-446,165 nm, Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm foi de 4, 8 e 13 %, respectivamente.

Para fins de comparação de resultado, todas as amostras de sangue foram analisadas (n = 3) por um método alternativo baseado na espectrometria de absorção atômica em chama. Para isso, amostras foram digeridas em meio ácido assistidas por radiação micro-ondas. Os resultados obtidos pelo método HR-CS FAAS estão apresentados na Tabela 13. As

concentrações obtidas para Fe e Zn nas amostras variaram entre 386 a 541 mg L^{-1} e 5,4 e 9,1 mg L^{-1}, respectivamente. Essas concentrações são condizentes com aquelas descritas na literatura (211,212). Além do mais, as concentrações de Fe e Zn determinadas pelo método proposto foram concordantes com as determinadas pelo método comparativo (exceto a amostra 5) ao nível de 95 % de confiança (teste *t-Student* pareado).

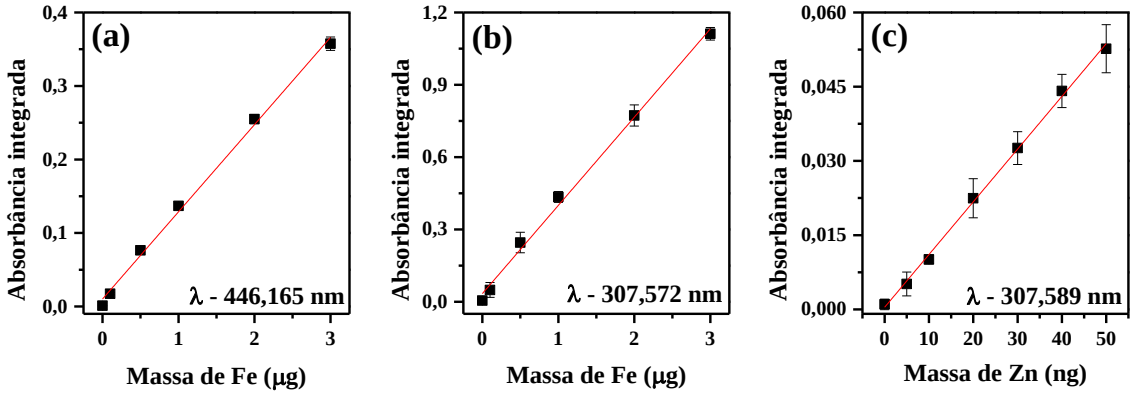

Figura 40 - Curvas de calibração para (a) Fe-446,165 nm, (b) Fe-307,572 nm e (c) Zn-307,589 nm obtidas com padrão aquoso depositado sobre papel empregando SS HR-CS GFAAS.

Fonte: Autor

Tabela 13 - Resultados comparativos (média ± sd, *n* = 3) da determinação de Fe e Zn em DBS (mg L^{-1}) pelo método proposto (SS HR-CS GFAAS) e pelo método comparativo (HR-CS FAAS)

Amostras	SS HR-CS GFAAS			HR-CS FAAS	
	Fe $^{446,165\ nm}$	Fe $^{307,572\ nm}$	Zn ^{307,589nm}	Fe	Zn
1	480 ± 19	490 ± 41	9,1 ± 0,5	521 ± 18	8,6 ± 0,3
2	393 ± 20	369 ± 36	5,7 ± 0,6	420 ± 11	5,2 ± 0,1
3	489 ± 35	395 ± 43	7,5 ± 0,3	466 ± 18	7,0 ± 0,2
4	401 ± 12	385 ± 19	5,4 ± 0,4	404 ± 14	4,7 ± 0,2
5	386 ± 17	406 ± 32	7,7 ± 0,5	440 ± 11	6,6 ± 0,2
6	471 ± 16	424 ± 32	8,1 ± 0,4	482 ± 2	7,8 ± 0,1
7	420 ± 15	424 ± 38	8,9 ± 0,6	400 ± 20	9,0 ± 0,3
8	541 ± 22	516 ± 55	8,7 ± 0,8	555 ± 17	8,3 ± 0,2
9	439 ± 34	447 ± 36	7,2 ± 0,4	441 ± 11	6,7 ± 0,2
10	411 ± 28	386 ± 22	6,7 ± 0,3	429 ± 16	6,3 ± 0,3

A precisão (RSD) das medidas foi de 5, 8 e 6 % para Fe-446,165nm, Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm, respectivamente. Esses RSDs são aceitáveis para essas determinações principalmente levando em consideração a análise direta e DBS. Os LOQs calculados para a mesma sequência (Fe-446,165, Fe-307,572 nm e Zn-307,589 nm) foram 67, 10,2 e 1,2 mg L^{-1}. Cabe destacar que devido as altas concentrações dos analitos no sangue

requereram linhas de menor sensibilidade (0,0083 % para Fe-446,165 nm, 0,043 % para Fe-307,572 nm e 0,02 % para Zn-307,589 nm), resultando em altos valores de LOQ, mas adequados e suficientes para resolver o problema analítico em questão. Isso mostra inclusive a versatilidade da técnica HR-CS GFAAS em ajustar a sensibilidade ao problema analítico.

Outro ponto que merece ser destacado no método proposto refere-se ao uso de apenas alguns discos removidos do DBS original, possibilitando a utilização do restante do DBS para análises por outros métodos, ou podendo este ser armazenado para análises futuras.

7.4. Conclusões parciais

A técnica HR-CS GFAAS se apresentou útil no desenvolvimento de um método para determinação de Fe e Zn em sangue empregando amostragem de sólidos (DBS). A seleção de linhas alternativas ($Fe^{307,572\ nm}$ e $Zn^{307,589nm}$) na mesma janela espectral possibilitou a determinação direta e simultânea de Fe e Zn, com boa precisão e exatidão.

O estudo sobre a área do DBS *versus* o volume de sangue demonstrou que a quantidade de sangue por mm^2 mantêm-se constante, independente do volume depositado, permitindo o preenchimento do papel através da remoção de algumas gotas de sangue do dedo ou calcanhar. Além do mais, foi determinado que o disco de 3,4 mm de diâmetro empregado para a análise direta contém o equivalente a 3,86 ± 0,13 µL de sangue, permitindo expressar a concentração de Fe e Zn em mg L^{-1}. Efeitos cromatográficos significativos não foram observados para Fe e Zn quando volumes próximos a 50 µL de sangue foram utilizados.

A adição de 3 µL de solução 15 % v v^{-1} H_2O_2 aumentou a estabilidade térmica do Zn e minimizou efeitos de matriz nas etapas de pirólise e de atomização, permitindo o uso da calibração externa com padrões aquosos depositados sobre papel.

O desempenho do método proposto foi avaliado por meio da análise das amostras por outra técnica analítica, no caso a espectrometria de absorção atômica em chama (HR-CS FAAS). As amostras digeridas e analisadas por esta técnica forneceram resultados concordantes com os obtidos pelo método proposto ao nível de 95 % de confiança para 9 das 10 amostras analisadas.

Os parâmetros de desempenho analítico obtidos para o método proposto reforçam a sua viabilidade e potencial na determinação de Fe e Zn em DBS por SS HR-CS GFAAS.

8. Conclusões

Os resultados apresentados nesta Tese destacam o desenvolvimento de novas estratégias de aumento de sensibilidade em LIBS, calibração em LIBS e em HR-CS MAS e amostragem direta de DBS em HR-CS GFAAS.

No primeiro trabalho, a estratégia SD-LIBS foi aplicada para a determinação de P em amostras de fertilizantes comerciais. Um circuito elétrico modular com tensão máxima de 4,5 kV foi desenvolvido e conectado a dois eletrodos de tungstênio posicionados sobre o porta-amostra. É importante destacar a simplicidade de acoplamento do sistema SD em LIBS, uma vez que a descarga elétrica ocorre em função do surgimento do plasma. Com a formação de espécies químicas carregadas e condutoras, não há a necessidade de sincronizar a descarga elétrica e o pulso do laser. O sistema SD-LIBS, promovendo o reaquecimento do plasma, melhorou as condições de excitação do P, o que foi muito importante se for levando em consideração que o sistema LIBS empregado apresenta sensibilidade limitada para P. A estratégia SD-LIBS possibilitou o desenvolvimento de um método analítico para determinar P em amostras de fertilizantes empregando um equipamento simples e de baixo custo relativo. A estratégia SD-LIBS é bastante promissora para outras aplicações no âmbito de outros analitos e/ou matrizes. Ainda, ela proporciona um aumento de intensidade de emissão em todo o espectro, tornando-a uma estratégia promissora para métodos quimiométricos.

No segundo trabalho, a SD-LIBS foi utilizada para o desenvolvimento de uma estratégia de calibração SD-SSC LIBS, baseada no princípio da linearidade entre tensão aplicada e intensidade de emissão do analito. Com esta estratégia, a área do trapézio obtida para a análise da amostra e do padrão empregando duas voltagens foi utilizada e correlacionada com a concentração do analito na amostra. A estratégia proposta foi aplicada para determinação de Al em folhas de plantas e P em amostras de fertilizantes. A limitação do método reside na escolha de um padrão de calibração com matriz semelhante à da amostra. Devido à dificuldade para encontrar padrões sólidos para calibração, a estratégia de calibração com padrão único proposta nesta Tese é bastante promissora, visto a sua simplicidade e robustez dos resultados.

No terceiro trabalho a estratégia MEC foi aplicada pela primeira vez em HR-CS MAS para determinar Cl, N, P e S (via moléculas diatômicas CaCl, NO, PO e CS), mas não é limitada a esses analitos. A MEC é uma estratégia de calibração capaz de contornar os efeitos de matriz entre padrões de calibração e amostra, uma vez que esta estratégia utiliza duas soluções com matriz compatibilizada. Além de corrigir os efeitos de matriz, a estratégia MEC,

por utilizar de diversos comprimentos de onda de absorção, foi capaz de identificar interferências espectrais, resultando em maior robustez e seletividade do método. Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez que, em comparação com a calibração externa, a estratégia MEC minimiza interferências não espectrais, como demonstrado no caso da interferência do cálcio na determinação de fósforo via a molécula de PO. Cabe aqui destacar que, a estratégia MEC necessita de três ou mais linhas de absorção para as determinações, e em relação as moléculas diatômicas isso não é um empecilho, visto que mais de 10 linhas de absorção geralmente são registradas simultaneamente pelo equipamento HR-CS MAS. A MEC, aliada as suas vantagens, facilidade de aplicação e robustez dos resultados, configura uma estratégia promissora para determinações elementares via moléculas diatômicas por HR-CS MAS em chama e em forno de grafite.

No último trabalho apresentado nesta Tese, um método de determinação simultânea de Fe e Zn em sangue humano através da análise direta de DBS por HR-CS GFAAS foi desenvolvido. O método é simples, não havendo necessidade de etapas morosas de preparo de amostras, como extração ou digestão ácida, que requerem tempo e são propensas a erros e contaminação. Cabe destacar que o método proposto utiliza apenas alguns discos de 3,4 mm de diâmetro removidos do DBS original, permitindo a utilização do restante para outras análises. A estratégia de coleta de sangue em DBS é muito promissora, e tem ganhado maior atenção nos últimos anos, visto ser um método minimamente invasivo, e a interação do sangue com o papel proporcionar estabilidade para diversos analitos, simplificando a coleta, transporte e armazenamento. A análise direta do DBS por HR-CS GFAAS é uma estratégia muito promissora para determinações de outros elementos em sangue.

Referências

1 Harvey, D. **Modern Analytical Chemistry**. McGraw-Hill, 2000.

2 Irving, H.M.N.H. Centenary lecture. One hundred years of development in Analytical Chemistry. **The Analyst**, v. 99, n. 1185, p. 787–801, 1974.

3 Miziolek, A.W.; Palleschi, V.; et al. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

4 Cremers, D.A.; Radziemski, L.J. **Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. Tucson: John Wiley & Sons, 2013.

5 Maurice, S.; Wiens, R.C.; et al. The ChemCam instrument suite on the Mars Science Laboratory (MSL) rover: Science objectives and mast unit description. **Space Science Reviews**, v. 170, n. 1–4, p. 95–166, 2012.

6 Li, Y.; Tian, D.; et al. A review of laser-induced breakdown spectroscopy signal enhancement. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 53, n. 1, p. 1–35, 2018.

7 Babushok, V.I.; DeLucia, F.C.; et al. Double pulse laser ablation and plasma: Laser induced breakdown spectroscopy signal enhancement. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 999–1014, 2006.

8 Laville, S.; Goueguel, C.; et al. Laser-induced fluorescence detection of lead atoms in a laser-induced plasma: An experimental analytical optimization study. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 347–353, 2009.

9 Welz, B.B.; Becker-Ross, H.; et al. **High-resolution continuum source AAS: The better way to perform atomic absorption spectrometry**. Weinheim: VHC, 2005.

10 Borges, D.L.G.; Curtius, A.J.; et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 1, n. 18, p. 58–67, 2005.

11 Butcher, D.J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 1–15, 2013.

12 Carter, J.A.; Barros, A.I.; et al. Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. November, p. 1–25, 2018.

13 Kurfürst, U. Direct Solid Sampling with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS). In: **Solid Sample Analysis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, p. 129–190.

14 Resano, M.; Rello, L.; et al. Minimally-invasive filter paper test in combination with solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Pb determination in whole blood. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 22, n. 10, p. 1250–1259, 2007.

15 Rello, L.; Miguel, A. Lead screening in DBS by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: application to newborns and pregnant women. **Bioanalysis**, v. 7, p. 2057–2070, 2015.

16 Lehmann, S.; Delaby, C.; et al. Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 10, p. 1897–1909, 2013.

17 MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493–494, 1960.

18 BRECH, F.; CROSS, L. Optical microemission stimulated by a Ruby laser. **Applied Spectroscopy**, v. 16, n. 2, p. 1, 1962.

19 Baudelet, M.; Smith, B.W. The first years of laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 624, 2013.

20 Radziemski, L.; Cremers, D. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 87, p. 3–10, 2013.

21 Xth Colloquium Spectroscopicum Internationale. **Applied Spectroscopy**, v. 16, n. 2, p. 44–45, 1962.

22 DEBRAS-GUÉDON, J.; LIODEC, N. De l'utilisation du faisceau d'un amplificateur a ondes lumineuses par émission induite de rayonnement (laser á rubis), comme source énergetique pour l'excitation des spectres d'émission des elements. **Comptes Rendu de l'Academie des Sciences**, v. 257, p. 3336–3339, 1963.

23 Rosan, R.C.; Healy, M.K.; et al. Spectroscopic ultramicroanalysis with a laser. **Science**, v. 142, n. 3589, p. 236–237, 1963.

24 Maker, P.D., Terhune, R.W. , Savage, C.M. Optical Third Harmonic Generation. In: **Quantum Electronics Paris 1963 Conference**. 1964, p. 1559–1576.

25 Runge, E.F.; Minck, R.W.; et al. Spectrochemical analysis using a pulsed laser source. **Spectrochimica Acta**, v. 20, n. 4, p. 733–736, 1964.

26 Winefordner, J.D.; Gornushkin, I.B.; et al. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 9, p. 1061–1083, 2004.

27 Ready, J. **Effects of High-Power Laser Radiation.** Elsevier Science, 1971.

28 Raĭzer, I.P. **Laser-induced discharge phenomena**. Consultants Bureau, 1977.

29 Radziemski, L.J.; Cremers, D.A. **Laser-induced plasmas and applications**. M. Dekker, 1989.

30 Costa, V.C.; Augusto, A.S.; et al. Laser induced-breakdown spectroscopy (libs): History, fundamentals, applications and potentialities. **Quimica Nova**, v. 42, n. 5, p. 527–545, 2019.

31 Lazic, V.; Colao, F.; et al. Recognition of archeological materials underwater by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 7–8, p. 1014–1024, 2005.

32 Guirado, S.; Fortes, F.J.; et al. Chemical analysis of archeological materials in submarine environments using laser-induced breakdown spectroscopy. On-site trials in the Mediterranean Sea. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 74–75, p. 137–143, 2012.

33 Wiens, R.C.; Maurice, S.; et al. The ChemCam instrument suite on the Mars Science Laboratory (MSL) rover: Body unit and combined system tests. **Space Science Reviews**, v. 170, n. 1–4, p. 167–227, 2012.

34 Melikechi, N.; Wiens, R.; et al. Zapping Mars. **Optics and Photonics News**, n. January, p. 26–33, 2013.

35 Santos Junior, D.; Tarelho, L.V.G.; et al. Espectrometria De Emissão Óptica Com Plasma Induzido Por Laser (Libs) -. **Revista Analytica**, n. 24, p. 72–80, 2006.

36 Musazzi, S. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

37 Gurevich, E.L.; Hergenröder, R. Femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy: Physics, applications, and perspectives. **Applied Spectroscopy**, v. 61, n. 10, p. 233A-242A, 2007.

38 Zorov, N.B.; Popov, A.M.; et al. Qualitative and quantitative analysis of environmental samples by laser-induced breakdown spectrometry. **Russian Chemical Reviews**, v. 84, n. 10, p. 1021–1050, 2015.

39 Thakur, S.N., Singh, J.P. Fundamentals of Laser Induced Breakdown Spectroscopy. In: **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. Elsevier, 2007, p. 3–21.

40 Goueguel, C.; Laville, S.; et al. Investigation of resonance-enhanced laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of aluminium alloys. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 5, p. 635–644, 2010.

41 Guo, L.B.; Li, C.M.; et al. Plasma confinement by hemispherical cavity in laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 13, p. 131501, 2011.

42 Liu, P.; Hai, R.; et al. The enhanced effect of optical emission from laser induced breakdown spectroscopy of an Al-Li Alloy in the presence of magnetic field confinement. **Plasma Science and Technology**, v. 17, n. 8, p. 687–692, 2015.

43 Nassef, O.A.; Elsayed-Ali, H.E. Spark discharge assisted laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 12, p. 1564–1572, 2005.

44 Lee, D.-H.; Han, S.-C.; et al. Highly Sensitive Analysis of Boron and Lithium in Aqueous Solution Using Dual-Pulse Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9456–9461, 2011.

45 Yaroshchyk, P.; Morrison, R.J.S.; et al. Quantitative determination of wear metals in engine oils using LIBS: The use of paper substrates and a comparison between single- and double-pulse LIBS. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 11, p. 1482–1485, 2005.

46 Wang, Z.; Hou, Z.; et al. Utilization of moderate cylindrical confinement for precision improvement of laser-induced breakdown spectroscopy signal. **Optics Express**, v. 20, n. S6, p. A1011, 2012.

47 Popov, A.M.; Colao, F.; et al. Spatial confinement of laser-induced plasma to enhance LIBS sensitivity for trace elements determination in soils. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 837–848, 2010.

48 Zhou, W.; Li, K.; et al. Optical emission enhancement using laser ablation combined with fast pulse discharge. **Optics express**, v. 18, n. 3, p. 2573–2578, 2010.

49 Kexue, L.I.; Zhou, W.; et al. Signal enhancement of lead and arsenic in soil using laser ablation combined with fast electric discharge. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 420–424, 2010.

50 Zhou, W.; Li, K.; et al. Effect of voltage and capacitance in nanosecond pulse discharge enhanced laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied optics**, v. 51, n. 7, p. 42–48, 2012.

51 Zhou, W.; Su, X.; et al. Discharge character and optical emission in a laser ablation nanosecond discharge enhanced silicon plasma. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 702–710, 2013.

52 Li, X.; Zhou, W.; et al. Laser ablation fast pulse discharge plasma spectroscopy analysis of Pb, Mg and Sn in soil. **Optics Communications**, v. 285, n. 1, p. 54–58, 2012.

53 Li, X.F.; Zhou, W.D.; et al. Temperature and electron density of soil plasma generated by LA-FPDPS. **Frontiers of Physics**, v. 7, n. 6, p. 721–727, 2012.

54 LI, K.; Zhou, W.; et al. Laser ablation assisted spark induced breakdown spectroscopy on soil samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 9, p. 1475–1481, 2010.

55 Zhou, W.; Li, K.; et al. Development of a nanosecond discharge-enhanced laser plasma spectroscopy. **Optics Letters**, v. 36, n. 15, p. 2961–2963, 2011.

56 Eschlböck-Fuchs, S.; Kolmhofer, P.J.; et al. Boosting persistence time of laser-induced plasma by electric arc discharge for optical emission spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 109, p. 31–38, 2015.

57 Sobral, H.; Robledo-Martinez, A. Signal enhancement in laser-induced breakdown spectroscopy using fast square-pulse discharges. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 124, p. 67–73, 2016.

58 Bol'shakov, A.A.; Mao, X.; et al. Spectral emission enhancement by an electric pulse for LIBS and LAMIS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 3, p. 657–670, 2017.

59 He, X.; Chen, B.; et al. Femtosecond laser-ablation spark-induced breakdown spectroscopy and its application to the elemental analysis of aluminum alloys. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 12, p. 2203–2209, 2018.

60 He, X.; Li, R.; et al. Elemental analysis of copper alloy by high repetition rate LA-SIBS using compact fiber spectrometer. **Plasma Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 034005, 2019.

61 Grünberger, S.; Watzl, G.; et al. Chemical imaging with Laser Ablation – Spark Discharge – Optical Emission Spectroscopy (LA-SD-OES) and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Optics & Laser Technology**, v. 123, n. November, p. 105944, 2020.

62 Santos, D.; Nunes, L.C.; et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 10, p. 1073–1078, 2009.

63 Arantes de Carvalho, G.G.; Nunes, L.C.; et al. Evaluation of laser induced breakdown spectrometry for the determination of macro and micronutrients in pharmaceutical tablets. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 803, 2010.

64 Morais, C.P. de; Barros, A.I.; et al. Calcium determination in biochar-based fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy using sodium as internal standard. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 370–373, 2017.

65 Guezenoc, J.; Gallet-Budynek, A.; et al. Critical review and advices on spectral-based normalization methods for LIBS quantitative analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 160, n. August, p. 1–8, 2019.

66 Zivkovic, S.; Savovic, J.; et al. Alternative analytical method for direct determination of Mn and Ba in peppermint tea based on laser induced breakdown spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 410–417, 2018.

67 Tognoni, E.; Cristoforetti, G.; et al. Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 1, p. 1–14, 2010.

68 Aguilera, J.A.; Aragón, C.; et al. Application of calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy to radially resolved spectra from a copper-based alloy laser-induced plasma. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 7, p. 685–689, 2009.

69 Cavalcanti, G.H.; Teixeira, D. V.; et al. One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 87, p. 51–56, 2013.

70 Gaudiuso, R.; Dell'Aglio, M.; et al. Laser-induced breakdown spectroscopy of archaeological findings with calibration-free inverse method: Comparison with classical laser-induced breakdown spectroscopy and conventional techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 813, p. 15–24, 2014.

71 Babos, D.V.; Virgilio, A.; et al. Multi-energy calibration (MEC) applied to laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, p. 1753–1762, 2018.

72 Hao, Z.Q.; Liu, L.; et al. One-point and multi-line calibration method in laser-induced breakdown spectroscopy. **Optics Express**, v. 26, n. 18, p. 22926–22933, 2018.

73 Yuan, R.; Tang, Y.; et al. Accuracy improvement of quantitative analysis for major elements in laser-induced breakdown spectroscopy using single-sample calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 1064, p. 11–16, 2019.

74 Babos, D.V.; Barros, A.I.; et al. Calibration strategies to overcome matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy: Direct calcium and phosphorus determination in solid mineral supplements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 155, p. 90–98, 2019.

75 Nunes, L.C.; Rocha, F.R.P.; et al. Slope ratio calibration for analysis of plant leaves by laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 11, p. 2314–2324, 2019.

76 G.L.Moore Introduction to Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry - Vol 03. **Journal of the American Chemical Society**, v. 3, n. 1, p. 340, 1989.

77 Walsh, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochimica Acta**, v. 7, p. 108–117, 1955.

78 L'vov, B. V. Fifty years of atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 382–392, 2005.

79 Welz, B., Vale, M.G.R., et al. High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry-Theory and Applications. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010, p. 1–34.

80 L'vov, B.V. The analytical use of atomic absorption spectra. **Spectrochimica Acta**, v. 17, n. 7, p. 761–770, 1961.

81 Slavin, W.; Manning, D.C. The L'vov platform for furnace atomic absorption analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 35, n. 11–12, p. 701–714, 1980.

82 Slavin, W.; Manning, D.C.; et al. The stabilized temperature platform furnace. **Atomic Spectroscopy**, v. 2, n. 5, p. 137–145, 1981.

83 Keliher, P.N.; Wohlers, C.C. High resolution atomic absorption spectrometry using an echelle grating monochromator. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 682–687, 1974.

84 Harnly, J.M.; Miller-Ihli, N.J.; et al. Simultaneous multielement atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2–3, p. 305–320, 1984.

85 Hamly, J.M. Multielement Atomic Absorption with a Continuum Source. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 933A-943A, 1986.

86 Heitmann, U.; Schütz, M.; et al. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 9–10, p. 1095–1105, 1996.

87 Becker-Ross, H.; Florek, S.; et al. Influence of the spectral bandwith of the spectrometer on the sensitivity using continuum source AAS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 355, n. 3–4, p. 300–303, 1996.

88 Labusov, V.A.; Boldova, S.S.; et al. High-resolution continuum-source electrothermal atomic absorption spectrometer for simultaneous multi-element determination in the spectral range of 190-780 nm. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 5, p. 1005–1010, 2019.

89 Welz, B.; Borges, D.L.G.; et al. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 873–883, 2007.

90 Welz, B., Lepri, F.G., Araujo, R.G.O., Ferreira, S.L.C., Huang, M.D., Okruss, M., & Becker-Ross, H. (2009). Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces-A review. *Analytica Chimica Acta*, 647(2) , 137–148.

91 Kesel, P.M.M. De; Sadones, N.; et al. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions. **Bioanalysis**, v. 5, n. 16, p. 2023–2041, 2013.

92 Guthrie, R.; Susi, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of infants. **Pediatrics**, v. 32, n. 3, p. 338–43, 1963.

93 Stove, C.P.; Ingels, A.S.M.E.; et al. Dried blood spots in toxicology: From the cradle to the grave? **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 230–243, 2012.

94 Edelbroek, P.M.; Heijden, J. Van Der; et al. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: Methods, assays, and pitfalls. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 3, p. 327–336, 2009.

95 Li, W.; Tse, F.L.S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 1, p. 49–65, 2010.

96 Demirev, P.A. Dried blood spots: Analysis and applications. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 779–789, 2013.

97 Thevis, M.; Geyer, H.; et al. Sports drug testing using complementary matrices: Advantages and limitations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 130, p. 220–230, 2016.

98 Nys, G.; Kok, M.G.M.; et al. Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 326–332, 2017.

99 Aramendía, M.; Rello, L.; et al. Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 1, p. 296–309, 2015.

100 Resano, M.; Belarra, M.A.; et al. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 99, p. 75–87, 2018.

101 Cernik, A.A.; Sayers, M.H. Determination of lead in capillary blood using a paper punched disc atomic absorption technique. Application to the supervision of lead workers. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 28, n. 4, p. 392–398, 1971.

102 Cizdziel, J. V. Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: A feasibility study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 3, p. 603–611, 2007.

103 Hsieh, H.F.; Chang, W.S.; et al. Using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 6–10, 2011.

104 Carter, G.F. The paper punched disc technique for lead in blood samples with abnormal haemoglobin values. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 35, n. 3, p. 235–240, 1978.

105 Yee, H.Y., Srivuthana, K., Elton, R., Bhambhani, K., & Kauffman, R.E. (1995). Capillary Blood Collection by Paper for Lead Analysis by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Microchemical Journal*, 52(3) , 370–375.

106 Shen, X.M.; Zhang, Y.W.; et al. Applicability of a filter paper method to measure blood lead levels in large populations of Chinese children. **Clinica Chimica Acta**, v. 328, n. 1–2, p. 99–104, 2003.

107 Martino, M.T. Di; Michniewicz, A.; et al. EDTA is essential to recover lead from dried blood spots on filter paper. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, n. 1–2, p. 143–150, 2004.

108 El-Hajjar, D.F.; Swanson, K.H.; et al. Validation of use of annular once-punched filter paper bloodspot samples for repeat lead testing. **Clinica Chimica Acta**, v. 377, n. 1–2, p. 179–184, 2007.

109 Rello, L.; García-ruiz, E.; et al. Dried blood spots for Pb determination using solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrscopy Europe**, v. 20, n. 5, p. 11–14, 2008.

110 Chaudhuri, S.N.; Butala, S.J.M.; et al. Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercury and cadmium in newborns. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 298–316, 2009.

111 Langer, E.K.; Johnson, K.J.; et al. Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 21, n. 4, p. 355–364, 2011.

112 Shlosberg, A.; Wu, Q.; et al. Examination of eurasian griffon vultures (Gyps fulvus fulvus) in Israel for exposure to environmental toxicants using dried blood spots. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 3, p. 502–511, 2012.

113 Archer, N.P.; Bradford, C.M.; et al. Relationship between prenatal lead exposure and infant blood lead levels. **Maternal and Child Health Journal**, v. 16, n. 7, p. 1518–1524, 2012.

114 Vacchina, V.; Huin, V.; et al. Use of dried blood spots and inductively coupled plasma mass spectrometry for multi-element determination in blood. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 3, p. 255–259, 2014.

115 Pedersen, L.; Andersen-Ranberg, K.; et al. Quantification of multiple elements in dried blood spot samples. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 703–709, 2017.

116 Basu, N.; Eng, J.W.L.; et al. Development and application of a novel method to characterize methylmercury exposure in newborns using dried blood spots. **Environmental Research**, v. 159, n. August, p. 276–282, 2017.

117 Moreda-Piñeiro, J.; Cantarero-Roldán, A.; et al. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multi-elemental determination in dried blood spots. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 8, p. 1500–1507, 2017.

118 Perkins, M.; Basu, N. Dried blood spots for estimating mercury exposure in birds. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 236–246, 2018.

119 Kröger, S.; Sperling, M.; et al. Quantitative dried blood spot analysis for metallodrugs by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 51, n. August 2018, p. 50–56, 2019.

120 Nakadi, F. V.; Garde, R.; et al. A simple and direct atomic absorption spectrometry method for the direct determination of Hg in dried blood spots and dried urine spots prepared using various microsampling devices. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, n. 1, p. 136–144, 2020.

121 Manfro, I.D.; Tegner, M.; et al. Determination of lithium in dried blood spots and dried plasma spots by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Method development, validation and clinical application. **Talanta**, v. 216, n. 2755, p. 120907, 2020.

122 Suh, S.; Yee, S. Phosphorus use-efficiency of agriculture and food system in the US. **Chemosphere**, v. 84, n. 6, p. 806–813, 2011.

123 Vance, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant physiology**, v. 127, n. 2, p. 390–397, 2001.

124 Ashley, K.; Cordell, D.; et al. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. **Chemosphere**, v. 84, n. 6, p. 737–746, 2011.

125 Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.; et al. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 423–447, 2003.

126 Horwitz, W.; Lartimer, G.W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

127 Asimellis, G.; Giannoudakos, A.; et al. Phosphate ore beneficiation via determination of phosphorus-to-silica ratios by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 12, p. 1253–1259, 2006.

128 Rosenwasser, S.; Asimellis, G.; et al. Development of a method for automated quantitative analysis of ores using LIBS. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 6, p. 707–714, 2001.

129 Marangoni, B.S.; Silva, K.S.G.; et al. Phosphorus quantification in fertilizers using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a methodology of analysis to correct physical matrix effects. **Anal. Methods**, v. 8, n. 78, p. 78–82, 2015.

130 Yao, S.; Lu, J.; et al. Multi-elemental analysis of fertilizer using laser-induced breakdown spectroscopy coupled with partial least squares regression. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 11, p. 1733–1738, 2010.

131 Nicolodelli, G.; Senesi, G.S.; et al. Double pulse laser induced breakdown spectroscopy: A potential tool for the analysis of contaminants and macro/micronutrients in organic mineral fertilizers. **Science of The Total Environment**, v. 565, p. 1116–1123, 2016.

132 Senesi, G.S.; Romano, R.A.; et al. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Associated with Multivariate Analysis Applied to Discriminate Fertilizers of Different Nature. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 84, n. 5, p. 923–928, 2017.

133 Giacomo, A. De; Dell'Aglio, M.; et al. Experimental and theoretical comparison of single-pulse and double-pulse laser induced breakdown spectroscopy on metallic samples. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 7, p. 805–816, 2008.

134 Trani, P.E.; Trani, A.L. **Fertilizantes: cálculo de fórmulas comerciais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2011.

135 NIST, National Institute of Standards and Tecnology. **NIST Atomic Spectra Database**. Disponível em: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html>. Acesso em: 5 dez 2019.

136 Henry, A.P. **College Physics**. New York: Copyright, 1947.

137 Gallou, G.; Sirven, J.B.; et al. Aerosols analysis by libs for monitoring of air pollution by industrial sources. **Aerosol Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 918–926, 2011.

138 Harmon, R.S.; Russo, R.E.; et al. Applications of laser-induced breakdown spectroscopy for geochemical and environmental analysis: A comprehensive review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 87, p. 11–26, 2013.

139 Liu, Y.; Baudelet, M.; et al. Elemental analysis by microwave-assisted laser-induced breakdown spectroscopy: Evaluation on ceramics. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 8, p. 1316–1323, 2010.

140 Dell'Aglio, M.; Alrifai, R.; et al. Nanoparticle Enhanced Laser Induced Breakdown Spectroscopy (NELIBS), a first review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 148, n. May, p. 105–112, 2018.

141 Guo, L.B.; He, X.N.; et al. Enhancement of laser-induced breakdown spectroscopy signals using both hemispherical cavity and a magnetic field. **Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering**, v. 8244, n. February 2012, p. 82440I, 2012.

142 Vieira, A.L.; Silva, T.V.; et al. Determinations of phosphorus in fertilizers by spark discharge-assisted laser-induced breakdown spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 139, p. 322–326, 2018.

143 Chen, Y.; Zhang, Q.; et al. Laser ignition assisted spark-induced breakdown spectroscopy for the ultra-sensitive detection of trace mercury ions in aqueous solutions. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 12, p. 1969, 2010.

144 Pérez-Rodríguez, M.; Dirchwolf, P.M.; et al. Brown rice authenticity evaluation by spark discharge-laser-induced breakdown spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124960, 2019.

145 Nespeca, M.G.; Vieira, A.L.; et al. Detection and quantification of adulterants in honey by LIBS. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125886, 2020.

146 Braga, J.W.B.; Trevizan, L.C.; et al. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 1, p. 66–74, 2010.

147 Castro, J.P.; Babos, D.V.; et al. Calibration strategies for the direct determination of rare earth elements in hard disk magnets using laser-induced breakdown spectroscopy. **Talanta**, v. 208, n. October, p. 120443, 2020.

148 Godoi, Q.; Santos, D.; et al. Preliminary studies of laser-induced breakdown spectrometry for the determination of Ba, Cd, Cr and Pb in toys. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 573–581, 2009.

149 Yi, R.X.; Guo, L.B.; et al. Background removal in soil analysis using laser- induced breakdown spectroscopy combined with standard addition method. **Optics Express**, v. 24, n. 3, p. 2607, 2016.

150 Vieira, A.L.; Nespeca, M.G.; et al. A user-friendly excel spreadsheet for dealing with spectroscopic and chromatographic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 194, p. 103816, 2019.

151 Virgilio, A.; Gonçalves, D.A.; et al. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 31–36, 2017.

152 Miller, J.; Miller, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow: Pearson, 2010.

153 Becker-Ross, H.; Florek, S.; et al. Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 1015–1030, 2006.

154 Welz, B.; Vale, M.G.R.; et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, present and future aspects-a critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 799–821, 2014.

155 Welz, B.; Morés, S.; et al. High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry-A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 5, p. 327–354, 2010.

156 Akaman, S., Welz, B., et al. CHAPTER 5 Fluorine determination in Milk, Tea and Water by High-Resolution, High-Temperature molecular Absorption Spectrometry. In: **Fluorine : Chemistry, Analysis, Function and Effects**. The Royal Society of Chemistry, 2015, p. 75–95.

157 Pereira, É.R.; Castilho, I.N.B.; et al. Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 96, n. September 2016, p. 33–39, 2014.

158 Abad, C.; Florek, S.; et al. Determination of boron isotope ratios by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry using graphite furnace vaporizers. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 136, p. 116–122, 2017.

159 Cacho, F.; Machynak, L.; et al. Determination of bromide in aqueous solutions via the TlBr molecule using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 144, p. 63–67, 2018.

160 Gunduz, S.; Akman, S. Determination of bromine by high resolution molecular absorption of strontium mono bromide generated in a graphite furnace. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 1–6, 2014.

161 Limburg, T.; Einax, J.W. Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 31–36, 2013.

162 Nakadi, F. V; Veiga, M.A.M.S. da; et al. Br isotope determination via the monitoring of CaBr transitions using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. Potential for direct determination of Br in solid samples using isotope dilution. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 31, n. 7, p. 1381–1390, 2016.

163 Nakadi, F. V.; Veiga, M.A.M.S. Da; et al. Chlorine isotope determination via the monitoring of the AlCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry - a case study. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 7, p. 1531–1540, 2015.

164 Medeiros, R.L. da S.; Souza, S.O.; et al. Chlorine determination via MgCl molecule in environmental samples using high resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Talanta**, v. 176, n. July 2017, p. 227–233, 2018.

165 Bechlin, M.A.; Ferreira, E.C.; et al. Determination of chlorine in cement via CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample analysis. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 130–135, 2017.

166 Guarda, A.; Aramendía, M.; et al. Determination of chlorine via the CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Talanta**, v. 162, p. 354–361, 2017.

167 Machyňák, Ľ.; Čacho, F.; et al. Determination of trace concentrations of chlorine in aqueous solutions by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 125, p. 140–145, 2016.

168 Ozbek, N.; Akman, S. Determination of Chlorine in Milk via Molecular Absorption of SrCl Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 28, p. 5767–5772, 2016.

169 Enders, M.S.P.; Gomes, A.O.; et al. Determination of Chlorine in Crude Oil by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry Using AlCl, InCl, and SrCl Molecules. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 5, p. 3637–3643, 2016.

170 Pereira, É.R.; Rocha, L.M.; et al. Determination of chlorine in coal via the SrCl molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 114, p. 46–50, 2015.

171 Pereira, É.R.; Welz, B.; et al. Strontium mono-chloride — A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 102, p. 1–6, 2014.

172 Oliveira, I.K.S.; Medeiros, R.L.S.; et al. Determination of chlorine in crude oil emulsified via the MgCl molecule by HR-CS MAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 3, p. 571–578, 2018.

173 Fechetia, M.; Tognon, A.L.; et al. Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 71–72, p. 98–101, 2012.

174 Boschetti, W.; Dessuy, M.B.; et al. New analytical method for total fluorine determination in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 276–280, 2017.

175 Ozbek, N.; Akman, S. Optimization and Application of a Slurry Sampling Method for the Determination of Total Fluorine in Flour Using a High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometer. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 10, p. 2925–2932, 2016.

176 Machado, P.M.; Morés, S.; et al. Fluorine determination in coal using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 105, p. 18–24, 2015.

177 Borges, A.R.; François, L.L.; et al. Determination of fluorine in plant materials via calcium mono-fluoride using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 9, p. 1564–1569, 2014.

178 Ozbek, N.; Akman, S. Molecule Formation Mechanisms of Strontium Mono Fluoride in High-Resolution Continuum Source Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 29, n. 7, p. 741–746, 2013.

179 Ozbek, N.; Akman, S. Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 69, p. 32–37, 2012.

180 Morés, S.; Monteiro, G.C.; et al. Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2681–2685, 2011.

181 Gleisner, H.; Einax, J.W.; et al. A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 5, p. 1040–1046, 2011.

182 Gleisner, H.; Welz, B.; et al. Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 9–10, p. 864–869, 2010.

183 Zanatta, M.B.T.; Nakadi, F.V.; et al. CaI and SrI molecules for iodine determination by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry: Greener molecules for practical application. **Talanta**, v. 179, p. 563–568, 2018.

184 Bechlin, M.A.; Fortunato, F.M.; et al. A simple and fast method for assessment of the nitrogen-phosphorus-potassium rating of fertilizers using high-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 101, n. November, p. 240–244, 2014.

185 Pereira, É.R.; Welz, B.; et al. A systematic look at the carbon monosulfide molecule and chemical modifiers for the determination of sulfur by HR-CS GF MAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 8, p. 1394–1401, 2018.

186 Oliveira, M.L.; Brandao, G.C.; et al. Determination of free and total sulfur(IV) compounds in coconut water using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in gas phase. **Talanta**, v. 179, p. 810–815, 2018.

187 Camera, A.S.; Passos Arcênio, P.; et al. Method development and validation for sulfur determination via CS molecule in petroleum green coke by high resolution continuum source molecular absorption spectrometry ☆. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 301–308, 2017.

188 Baumbach, G.; Einax, J.W. Determination of sulfur in coal by solid sampling graphite furnace high-resolution molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 89–93, 2014.

189 Nakadi, F.V.; Carcinoni Soares, A.L.; et al. Determination of sulfur in diesel via CS molecule by high-resolution molecular absorption spectrometry applying palladium nanoparticles as chemical modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 10, p. 1871–1879, 2014.

190 Nakadi, F. V.; Rosa, L.R.; et al. Determination of sulfur in coal and ash slurry by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 80–84, 2013.

191 Mior, R.; Morés, S.; et al. Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace. **Talanta**, v. 106, p. 368–374, 2013.

192 Baumbach, G.; Limburg, T.; et al. Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 295–299, 2013.

193 Huang, M.D.; Becker-Ross, H.; et al. Investigation of high-resolution absorption spectra of diatomic sulfides of group 14 elements in graphite furnace and the comparison of their performance for sulfur determination. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 135, p. 15–21, 2017.

194 Kowalewska, Z. Feasibility of high-resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry for silicon determination in organic solutions: Via the SiO molecule. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 2, p. 260–273, 2018.

195 Cadorim, H.R.; Pereira, É.R.; et al. Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace. **Talanta**, v. 146, p. 203–208, 2016.

196 Pires, L.N.; Brandão, G.C.; et al. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 225, p. 162–166, 2017.

197 Ozbek, N.; Akman, S. Determination of fluorine in Turkish wines by molecular absorbance of CaF using a high resolution continuum source atomic absorption spectrometer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 112–116, 2015.

198 Ozbek, N.; Akman, S. Determination of fluorine in milk samples via calcium-monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 650–654, 2013.

199 Gois, J.S. de; Malderen, S.J.M. Van; et al. A comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry for the direct determination of bromine in polymers. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 132, p. 50–55, 2017.

200 Machado, R.C.; Silva, A.B.S.; et al. Multi-energy calibration as a strategy for elemental analysis of fertilizers by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 7, p. 1168–1172, 2018.

201 Virgilio, A.; Nóbrega, J.A.; et al. Multi-isotope calibration for inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 3, p. 1157–1162, 2018.

202 Williams, C.B.; Donati, G.L. Multispecies calibration: A novel application for inductively coupled plasma tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 5, p. 762–767, 2018.

203 Resano, M.; Flórez, M.R.; et al. Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 9–10, p. 2239–2259, 2014.

204 Ozbek, N.; Baysal, A. Determination of sulfur by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry: Review of studies over the last 10 years. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 62–76, 2017.

205 Chitturi, R.; Baddam, V.R.; et al. A review on role of essential trace elements in health and disease. **Journal of Dr. NTR University of Health Sciences**, v. 4, n. 2, p. 75, 2015.

206 Coleman, J. Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 897–946, 1992.

207 Raghunath, R.; Tripathi, R.M.; et al. Retention times of Pb, Cd, Cu and Zn in children's blood. **Science of The Total Environment**, v. 207, n. 2–3, p. 133–139, 1997.

208 Freeman, J.D.; Rosman, L.M.; et al. State of the Science in Dried Blood Spots. **Clinical Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 656–679, 2018.

209 Rello, L.; Lapeña, A.C.; et al. A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 81, p. 11–19, 2013.

210 Currie, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods , including detect ion and quantification capabilities ' (IUPAC Recommendations 1995). **Pure & Applied Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 1699–1723, 1995.

211 Harrington, J.M.; Young, D.J.; et al. Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: Development of a mineralomics method. **Biological Trace Element Research**, v. 160, n. 1, p. 132–142, 2014.

212 Marguí, E.; Queralt, I.; et al. Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the direct multi-element analysis of dried blood spots. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 139, p. 13–19, 2018.

213 Wójciak-Kosior, M.; Szwerc, W.; et al. Optimization of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of selected trace elements in whole blood samples. **Talanta**, v. 165, n. December 2016, p. 351–356, 2017.

214 Velghe, S.; Delahaye, L.; et al. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 188–196, 2019.

215 Vale, M.G.R.; Oleszczuk, N.; et al. Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry - A critical review of the development between 1995 and 2005. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 4, p. 377–400, 2006.