



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FEIS – FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**Desenvolvimento de métodos analíticos empregando à espectrometria de
emissão óptica para avaliação dos níveis de contaminantes elementares em
amostras de diversas origens**

DANIEL ARAUJO GONÇALVES

Ilha Solteira – SP

Julho de 2016



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FEIS – FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**Desenvolvimento de métodos analíticos empregando à espectrometria de
emissão óptica para avaliação dos níveis de contaminantes elementares em
amostras de diversas origens**

DANIEL ARAUJO GONÇALVES *

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Cristina dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. George L. Donati

* Bolsista CAPES/PDSE

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP
– Campus de Ilha Solteira, para obtenção do título de
Doutor em Ciência dos Materiais.

Área de conhecimento: Química dos Materiais

Ilha Solteira – SP

Julho de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- G635d Gonçalves, Daniel Araujo.
Desenvolvimento de métodos analíticos empregando à espectrometria de emissão óptica para avaliação dos níveis de contaminantes elementares em amostras de diversas origens / Daniel Araujo Gonçalves. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
130 f. : il.
- Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2016
- Orientador: Mirian Cristina dos Santos
Co-orientador: George Luís Donati
Inclui bibliografia
1. Plasma induzido por micro-ondas. 2. Filamento de tungstênio.
3. Métodos de calibração.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de métodos analíticos empregando à espectrometria de emissão óptica para avaliação dos níveis de contaminantes elementares em amostras de diversas origens

AUTOR: DANIEL ARAUJO GONÇALVES

ORIENTADORA: MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS

CO-ORIENTADOR: GEORGE LUIS DONATI

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

Profa. Dra. MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FAUZE AHMAD AOUADA

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO MALMONGE

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. ANDREA PINTO OLIVEIRA

Departamento de Química / Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. GUSTAVO ROCHA DE CASTRO

Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu

Ilha Solteira, 08 de julho de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Débora S. L. G. pelo amor, carinho, paciência, incentivos prestados nos momentos mais difíceis e o maior dos presentes que eu poderia ganhar... Nossa filha Alice L. G. que dedico este trabalho com todo meu carinho!

“Quem já passou por essa vida e não viveu,
pode ser mais, mas sabe menos do que eu”

Vinicius de Moraes

“O único lugar onde o sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário. ”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edmar Gonçalves e Terezinha da Silva Araujo Gonçalves, por terem me apoiado sempre em toda a minha vida, não medindo esforços para que eu pudesse estar concluindo minha formação acadêmica, e sendo meus exemplos para nunca desistir de lutar e conquistar meus objetivos.

Agradeço à UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais pela oportunidade de formação qualificada e a possibilidade de obter o título de Doutor.

A minha orientadora Mirian Cristina dos Santos por me aceitar como aluno e ter proporcionado grandes transformações em minha vida acadêmica.

Aos meus amigos do Departamento de Física e Química, Thiago Nicolleto, Élton Carvalho, Lincon Zarodosny, Carlos e tantos mais assim como os professores Luiz F. Malmonge, José A. Malmonge, Cláudio Carvalho, Fauze Aouada, Márcia Aouada, Rafael Zarodosny que sempre participaram de momentos de descontração nos churrascos em minha casa, agradeço a cada momento.

O meu muito obrigado a Wake Forest University pela disposição do laboratório, academia e todas as demais dependências que possibilitou grandes momentos de lazer e aprendizagem.

A meu co-orientador George Luís Donati pela grande oportunidade trabalho, paciência e ensinamentos durante as atividades de pesquisa, além do suporte durante toda a estadia nos EUA. E não poderia esquecer de agradecer a Eunice Donati pela atenção dada a minha esposa, a *grande* Carolina G. Donati pelas aulas de inglês para o “tio e a tia” e os passeios.

Ao professor Bradley T. Jones pela bolsa de estudos concedidas e pela hospitalidade em seu laboratório.

Agradeço encarecidamente ao grande amigo Mike Thompson, pela convivência em sua residência, passeios, churrascos, espaguete e o famoso sorvete de neve.

A toda minha família, e família de minha esposa por estarem sempre juntos, mesmo quando estando tão longe.

E um agradecimento especial a Débora S. L. G. que me apoiou nos momentos mais difíceis, sempre me motivando e aguentando minhas crises de nervo, sempre com um sorriso no rosto e agora cuidando de nossa filha Alice.

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (Processo – 99999.002566 / 2014-01).

Agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

Artigos:

GONCALVES, D. A.; GU, J.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T. AND DONATI, G. L. Direct determination of chromium in empty medicine capsules by tungsten coil atomic emission spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 30, 1395–1399, **2015**.

GONCALVES, D. A.; JONES, B. T. DONATI, G. L. The Reversed-Axis Method to Estimate Precision in Standard Additions Analysis. **Microchem. J.**, 124, 155-158, **2016**.

GONCALVES, D.A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, 909, 24-29, **2016**.

GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. **J. Anal. At. Spectrom.**, 31, 1097–1104, **2016**.

Apresentação Oral:

GONCALVES, D. A.; GU, JIYAN; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Determinação de cromo em capsulas de medicamentos por espectrometria de emissão atômica em filamento de tungstênio (WCAES). **4º Congresso Analítica Latin America**. São Paulo Brasil. **2015**.

Apresentação Pôster:

SANTOS, M. C., GONCALVES, D. A., CADORE, S. Determinação de elementos potencialmente tóxicos em polímeros provenientes de resíduos de equipamentos elétricos eletrônicos por espectrometria de absorção atômica em chama. In: **12º Congresso Brasileiro de Polímeros**. Florianópolis. **2013**.

GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; AND DONATI, G. L. Multi-Energy Calibration: Fast matrix-matching determinations in Microwave-Plasma Optical Emission Spectrometry. **Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, Tucson, Arizona, January 10 - 16, **2016**.

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos quatro métodos analíticos visando a determinação de elementos químicos em diversas amostras. O primeiro estudo consistiu na determinação de Cr e Mn em placentônios provenientes de bovinos por espectrometria de emissão atômica em filamento de tungstênio (WC AES). O tempo de integração de sinal para 30 ms, proporcionou LOD 45 vezes menor para Mn e 150 vezes menor para Cr com relação a 500 ms. Testes de adição e recuperação apresentaram desvio padrão (SD) de $\pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e recuperações de 91 a 102%. No segundo foram realizadas quantificações de Cr em cápsulas medicinais produzidas na China, a WC AES. A faixa linear de trabalho para determinação de Cr por WC AES foi de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção foram de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que possibilitou determinações em um nível 28 vezes menor que o valor máximo de Cr recomendado em medicamentos pela Farmacopeia Americana (USP). A precisão (% RSD) foi calculada na faixa de 5,2 – 7,4% e não foram significativamente diferentes através da aplicação de um teste ANOVA fator único a nível de confiança de 95% ($p > 0,05$) quando comparados com a técnica de Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). No terceiro estudo, um Espectrometro de Emissão Óptica com plasma induzido por micro-ondas – MIP OES (MP-AES, Agilent 4200), foi usado em combinação com o método de análise por diluição de padrão (SDA) para determinar Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em amostras de café, chá verde, energético, cerveja, whiskey e cachaça. Não foi necessária preparação da amostra, a não ser uma simples diluição em HNO_3 1% v v⁻¹. A eficiência do SDA foi avaliada por experimentos de adição e recuperação e os resultados foram comparados com os métodos tradicionais de calibração externa (EC), o padrão interno (IS) e adição de padrão (AS). As recuperações médias por SDA para vários elementos avaliadas neste trabalho foram entre 90 e 99%. Para o método tradicional de adições padrão, por exemplo, as recuperações médias entre 101 e 122% foram obtidos para os mesmos analitos e amostras. No quarto estudo um MIP OES (MP-AES, Agilent 4200) foi utilizado para a determinação de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb na matriz de óleo fusel onde emprega-se a calibração externa preparada em solução de 1% HNO_3 e 1-propanol. Soluções contendo 5 e 50% da matriz v v⁻¹ foram diluídas em 1-propanol e solução de óleo fúsel puro foram analisados. Não foram observados efeitos de matriz quando empregou-se a calibração com soluções de 1-propanol mesmo para determinações na amostra não diluída, com recuperações entre 90-109%. Os LODs para Cd, Cr, Cu, Ni e Pb em 1-propanol foram de 0,03; 0,009; 0,01; 0,007 e 0,04 mg L^{-1} , respectivamente. O procedimento descrito para o MIP OES é uma abordagem simples, exata e precisa para rastrear análise de elementos de óleo fúsel.

Palavras Chave: Espectrometria de emissão ótica; Filamento de tungstênio; Plasma induzido por microondas; Placenta bovina; Cápsulas de medicamentos; óleo fúsel, Métodos de calibração.

Abstract

In this work were developed four analytical methods for the determination of chemical elements in several samples. The first study consisted in determination of Cr and Mn in placenta from bovine animals by Atomic emission spectrometry in tungsten filament (WC AES). Signal integration time for 30 ms, provided LOD 45 times lower for Mn and 150 times lower for Cr with respect to 500 ms. Addition and recovery tests presented standard deviation (SD) of $\pm 0,02$ mg L⁻¹ and recoveries of 91 to 102%. In the second were carried out baseline measurements of Cr in medicinal capsule produced in China by WC AES. The linear range for determination of Cr by WC AES was 10 - 100 μ g L⁻¹. The limits of detection were 3 μ g L⁻¹, which allowed determinations in a level 28 times smaller than the maximum value of Cr recommended medicines for the U.S. Pharmacopeial Convention (USP). The precision (% RSD) was estimated in the range of 5,2 – 7,4% and were not significantly different by applying a test ANOVA single factor at the level of confidence 95% ($p > 0,05$) when compared with Optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). In the third study, a Spectrometer of Optical Emission plasma induced by microwave – MIP OES (MP-AES, Agilent 4200), was used in combination with the method of analysis for standard dilution (SDA) to determine Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn in samples of coffee, green tea, energetic, beer, whiskey and cachaça brazilian. It didn't require sample preparation except a simple dilution in HNO₃ 1% v v⁻¹. The efficiency of the SDA was evaluated by experiments of addition and recovery, and the results were compared with the traditional methods of external calibration (EC), the internal standard (IS) and addition of default (AS). Average recoveries for SDA to various elements evaluated in this study were between 90 and 99%. For the traditional method of standard additions, for example, the average recoveries between 101 and 122% were obtained for the same analytes and samples. In the fourth study a MIP OES (MP-AES, Agilent 4200), was used for the determination of Cd, Cr, Cu, Ni e Pb in the array of fusel oil where is used the external calibration solution prepared 1% HNO₃ and 1-propanol. Solutions containing 5 and 50% of the matrix v v⁻¹ were dissolved in 1-propanol and fusel oil pure solution were analyzed. Matrix effects were not observed when it was calibration with 1-propanol solutions even for undiluted sample determinations, with recoveries between 90 - 109%. The LODs for Cd, Cr, Cu, Ni and Pb in 1-propanol were of 0,03; 0,009; 0,01; 0,007 and 0,04 mg L⁻¹, respectively. The procedure described for MIP OES is a simple, accurate and precise approach to trace elements analysis of fusel oil.

Keywords: Optical emission spectrometry; Tungsten coil; Microwave-induced plasma; Bovine placenta; Capsules of medicines; Fusel oil, Calibration methods.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Representação de um espectrômetro de emissão atômica	22
Figura 1.2 - Ilustração de um monocromador modelo Czerny-Turner.	25
Figura 1.3 - Influência da banda de passagem na resolução espectral	26
Figura 1.4 - Avaliação de diferentes FWHM para leituras de Cd por F AES.....	27
Figura 1.5 - Espectrometro de Emissão Atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio – WC AES.....	29
Figura 1.6 - Diagrama esquemático da configuração instrumental do WC AES ligado a um computador para aquisição de dados (a), Célula de atomização (b), Projeção de imagem do filamento sobre a fenda de entrada do espectrometro (c).	30
Figura 1.7 - Sistema de introdução de amostras de um MIP OES 4200 Agilent. (a) Rack de amostras; (b) amostrador automático SPS 3; (c) bomba peristáltica; (d) nebulizador OneNeb; (e) câmara de nebulização ciclônica;.....	34
Figura 1.8 - Visão geral do sistema 4200 MP-AES. (a) tocha de quartzo, sistema pré-óptica, monocromador Czerny-Turner e detector CCD e (b) sistema pré-óptica, EW = janela de entrada, M1 = lente tórica menor, FW = filtro móvel, M2 = lente tórica maior, M3 = espelho plano e ES = fenda de saída.	35
Figura 1.9 - Representação de uma grade de difração de instrumentos ópticos. N é a normal à superfície de grelha, α é o ângulo de incidência medido com respeito a N, e β é o ângulo de difração de medida em relação à N, d representa a largura de uma única ranhura.....	38
Figura 1.10 - Diagrama esquemático de ICP OES com um policromador echelle. (a) Bobina de rádio frequência; (b) Tocha de Ar; (c) espelho coletor; (d) fenda de entrada; (e) espelho colimador; (f) grade echelle; (g) prisma ótico; (h) espelho plano; (i) detector CCD.	39
Figura 3.1 - Procedimento de coleta e preservação de amostras realizados. Coleta de material (a). Etapa de liofilização de amostras (b).	46
Figura 3.2 - Amostras de placentônios trituradas e preservadas para digestão via microondas.	47
Figura 3.3 - Procedimento adotado para determinação de Cr e Mn em placentônios bovinos.	50
Figura 3.4 - Condicionamento do atomizador de filamento de tungstênio fora da cela de atomização (a); Condicionamento dentro da cela de atomização de vidro borossilicato (b).	51
Figura 3.5 - Perfis de otimização de pirólise e atomização para Mn (1 mg L ⁻¹).	55
Figura 3.6 - Perfis de otimização de pirólise e atomização para Cr (1 mg L ⁻¹).	55

Figura 3.7 - Curvas de calibração para Cr e Mn em 500 ms de integração de sinal. — Linearidade esperada para uma curva de calibração normal. --■-- Dados obtidos pela curva de calibração (n = 3).....	58
Figura 3.8 - Espectro de emissão para Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para 500 ms.	59
Figura 3.9 - Espectro de emissão para Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para 30 ms	60
Figura 3.10 - Espectro para o melhor pico de emissão de Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para (a) 500 ms e (b) 30 ms (n = 3 e 1 mg L ⁻¹).....	61
Figura 3.11 - Sinais de emissão em função do tempo de integração de sinal de (a) 500 ms e (b) 30 ms para Mn 403,1 nm. (n = 3 e 1 mg L ⁻¹).	62
Figura 3.12 - Sinais de emissão em função do tempo de integração de sinal de (a) 500 ms e (b) 30 ms para Cr 425,4 nm. (n = 3 e 1 mg L ⁻¹).	62
Figura 3.13 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Micro-ondas Agilent MIP OES.	64
Figura 3.14 - Otimização do fluxo de nebulização para Mn e Cr obtidos por MIP OES.....	64
Figura 3.15 - Otimização da posição de visualização do plasma para Mn e Cr obtidos por MIP OES.....	65
Figura 4.1 - Capsulas medicinais utilizadas para as quantificações de Cr.	74
Figura 4.2 - Procedimento adotado para determinação de Cr em cápsulas de medicamentos.	75
Figura 4.3 - Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente - ICP OES, utilizados para a verificação da precisão analítica de Cr.	76
Figura 5.1 - Procedimento adotado para determinação Cd, Cr, Cu e Pb em óleo fúsel.	85
Figura 5.2 – (a) Otimização do fluxo de nebulização do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L ⁻¹ Cd em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.	87
Figura 5.3 - (a) Otimização do fluxo de nebulização do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L ⁻¹ Cr em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.	87
Figura 5.4 - (a) Otimização do fluxo de nebulização do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L ⁻¹ Cu em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.	87
Figura 5.5 - (a) Otimização do fluxo de nebulização do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L ⁻¹ Ni em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.	88
Figura 5.6 - (a) Otimização do fluxo de nebulização do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L ⁻¹ Pb em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.....	88

Figura 5.7 - Otimização da posição de visualização do plasma utilizando EGCM	89
Figura 5.8 - Otimização do fluxo de nebulização do plasma utilizando EGCM.....	89
Figura 6.1 - Procedimento adotado para as determinações de Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em bebidas por SDA.....	99
Figura 6.2 - Filtragem das amostras de café, chá, energético, cerveja (4,4 % v v ⁻¹ etanol), whisky (40 % v v ⁻¹ etanol) e cachaça (40 % v v ⁻¹ etanol).	99
Figura 6.3 - Amostras de café, chá, energético, cerveja (4,4 % v v ⁻¹ etanol), whisky (40 % v v ⁻¹ etanol) e cachaça (40 % v v ⁻¹ etanol), após a diluição 1:1 v v ⁻¹ em solução de HNO ₃	100
Figura 6.4 - SDA foram preparadas a partir de 2,5 mL de amostra + 2,5 mL solução padrão (Al, Cr, Cu, Mn e Y 2 mg L ⁻¹ (grupo 1); Co, Fe, Ni, Zn 5 mg L ⁻¹ e Y, 2 mg L ⁻¹ (grupo 2)) adicionados a tubos de ensaios do 4200 MIP OES	100
Figura 6.5 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 25 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm, e fluxo de nebulização 0,75 ml L ⁻¹	102
Figura 6.6 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 15 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm, e fluxo de nebulização 0,75 ml L ⁻¹	102
Figura 6.7 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 7 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm, e fluxo de nebulização 0,75 ml L ⁻¹	103
Figura 6.8 - Perfis de sinais para SDA correspondente a diluição da solução 1 com a solução 2.	105
Figura 6.9 - Curvas de calibração obtidas por SDA, para Zn em whisky, Cr em café e Co em cerveja.....	105
Figura 6.10 - Efeitos de matriz para método de calibração por adição de padrão.	108
Figura 6.11 - Efeitos de matriz para método de calibração por adição de padrão interno. ...	109
Figura 6.12 - Efeitos de matriz para método de calibração por calibração externo	109
Figura 6.13 - Efeitos de matriz para método de calibração por diluição de solução padrão.	109

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Efeitos da temperatura no número de átomos excitados para K (I)	24
Tabela 3.1 - Programa de moagem criogênica empregado para as amostras.	47
Tabela 3.2 - Programa de aquecimento usado para a digestão das amostras.	48
Tabela 3.3 - Programa de aquecimento para tratamento térmico e condicionamento.	51
Tabela 3.4 - Dados obtidos para condicionamento do atomizador a partir de aplicação de corrente.	53
Tabela 3.5 – Programa de aquecimento durante as etapas de secagem, pirólise e atomização para as determinações em WC AES.	56
Tabela 3.6 – Avaliação do tempo de integração ($n = 20$) para Mn e Cr a partir de solução de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$	58
Tabela 3.7 – Parâmetros analíticos obtidos por WC AES.	63
Tabela 3.8 - Condições instrumentais para MIP OES.	65
Tabela 3.9 – Desempenho analítico instrumental obtidas por MIP OES.	66
Tabela 3.10 - Resultados obtidos para quantificações de CRM 1577b por WC AES. (Todas as concentrações estão em mg L^{-1} e $n = 3$).	66
Tabela 3.11 - Testes de adição e recuperação para Cr e Mn determinados por WC AES. (Todas as concentrações estão em mg L^{-1} e $n = 3$).	67
Tabela 3.12 – Resultados obtidos a partir de determinação de Mn por WC AES e MIP OES. (Todas as concentrações estão em mg L^{-1} e $n = 3$).	67
Tabela 4.1 - Condições operacionais do ICP OES para determinação da robustez e limite de detecção do plasma.	77
Tabela 4.2 - Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da potência de rádio frequência e vazão da amostra.	78
Tabela 4.3 - Avaliação de condição de plasma robusto e não robusto para leituras de Cr.	79
Tabela 4.4 – Concentração de Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$) em cápsulas de medicamentos determinadas por WC AES e ICP OES. Valores são médias de ± 1 desvio padrão ($n = 3$).	80
Tabela 5.1 – Condições de operação do MIP OES para as determinações de impurezas em óleo fúsel.	90
Tabela 5.2 – Efeito do solvente na sensibilidade do MIP OES.	90
Tabela 5.3 – Recuperações após adição de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de cada analito em HNO_3 1% v v ⁻¹ ($n = 3$).	91

Tabela 5.4 - Recuperações após adição de 1,00 mg L ⁻¹ de cada analito em 1-propanol. (n = 3).	92
Tabela 5.5 – Teste de adição e recuperação cm (1,00 mg L ⁻¹) otimizados a partir de solução solução de 5 % v v ⁻¹ em 1-propanol. (n = 3).	92
Tabela 5.6 – Concentrações de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb determinados em óleo fúsel por MIP OES. Os limites de detecção e limites de quantificação para cada analito foram obtidos em solução de 1-propanol. (n = 3).	93
Tabela 6.1 – Condições de operação para o Agilent 4200 MP-AES para análises de bebidas	103
Tabela 6.2 – Fluxo de nebulização posição de visualização do plasma usados para determinações em EC, IS e SA.....	104
Tabela 6.3 – Limites instrumentais de quantificação e detecção em µg L ⁻¹ para o MIP OES pelos métodos de calibração SDA, EC, IS e SA.	106
Tabela 6.4 – Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em Café determinados por SDA, EC, IS e SA.	107
Tabela 6.5 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em chá determinados por SDA, EC, IS e SA.	107
Tabela 6.6 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em energético determinados por SDA, EC, IS e SA.	107
Tabela 6.7 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em cerveja determinados por SDA, EC, IS e SA.	107
Tabela 6.8 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em whisky determinados por SDA, EC, IS e SA.	108
Tabela 6.9 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L ⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L ⁻¹ para Co, Ni e Zn em cachaça determinados por SDA, EC, IS e SA.	108

Lista de Abreviações

AS	Calibração por adição de padrão
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo
CCD	Dispositivo de Carga Acoplado
CID	Dispositivo de Injeção de Carga
CRM	Material de Referência Certificado
CMP	Plasma de micro-ondas Acoplado Capacitivamente
DCP	Plasma de corrente contínua
EAS	Espectrometria de emissão atômica
EC	Calibração externa
EGCM	Módulo de controle de gás externo
FWHM	Largura Espectral
GF AAS	Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado indutivamente
IS	Calibração por padrão interno
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LDR	Faixa Linear Dinâmica
LOD	Limites de Detecção
LOQ	Limites de Quantificação
LTE	Excitação termodinâmica local
MIP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Micro-ondas
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
PAD	Agrupamentos de Fotodiodos
REM	Radiação eletromagnética
RSD	Desvio padrão relativo
SDA	Análise por diluição de padrão
SB	Desvio padrão do branco
SBR	Razão sinal analítico / sinal de fundo
SD	Desvio padrão
SFDA	State Pharmaceutical Administration of China
SN	Sinal Ruído

Sλ	Passagem de banda espectral
USP	United States Pharmacopeia
WCAES	Espectrometria de Emissão Atômica em filamento de Tungstênio
WFU	Wake Forest University

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	20
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 FUNDAMENTOS DA ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA – AES.....	21
1.1.1 Sistema de introdução de amostras.....	22
1.1.2 Atomizadores.....	23
1.1.3 Separação de comprimento de ondas	25
1.1.4 Detectores	27
1.2 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO – WC AES.....	28
1.3 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS – MIP OES	33
1.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE – ICP OES	36
 CAPÍTULO 2.....	 40
2. OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
 CAPÍTULO 3.....	 42
3. DETERMINAÇÃO DE MN E CR EM PLACENTÔNIOS BOVINOS.....	43
3.1 PLACENTÔNIOS BOVINOS E NUTRIENTES	43
3.2 OBJETIVO	45
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45

3.3.1	Reagentes e soluções	45
3.3.2	Coleta e preservação das amostras	45
3.3.3	Digestão via micro-ondas	47
3.3.4	Quantificação de Cr e Mn por WC AES	49
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.4.1	Otimização para determinação de Mn e Cr por WC AES	50
3.4.2	Codicionamento do atomizador	50
3.4.3	Determinação da temperatura de pirólise e atomização	54
3.4.4	Avaliação do tempo de integração de sinal nas medidas de WC AES	57
3.4.5	Determinação de Mn e Cr em placentônios por MIP OES como método comparativo	63
3.4.6	Determinação de Cr e Mn em placentônios por WC AES	66
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE CR E MN EM PLACENTÔNIOS BOVINOS	68

CAPÍTULO 4..... 70

4. DETERMINAÇÃO DIRETA DE CR EM CÁPSULAS MEDICINAIS	71
4.1 CÁPSULAS DE MEDICAMENTOS	71
4.2 OBJETIVO	72
4.3 MATERIAL E MÉTODO	73
4.3.1 Reagentes e soluções	73
4.3.2 Determinação de Cr em cápsulas de medicamentos por WC AES	74
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.4.1 Otimização de WC AES para certificação de Cr em cápsulas medicinais	75
4.4.2 Otimização de ICP OES para certificação de Cr em cápsulas medicinais.....	76
4.4.3 Determinação de Cr em capsulas medicinais por WC AES.....	79
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE CR EM CÁPSULAS MEDICICINAIS.....	81

CAPÍTULO 5..... 82

5. ANÁLISE DE ÓLEO FÚSEL PURO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS	83
5.1 ÓLEO FÚSEL	83
5.2 OBJETIVO	84
5.3 MATERIAL E MÉTODO	85
5.3.1 Reagentes e soluções	85
5.3.1 Instrumentação.....	86
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.4.1 Otimização de MIP OES para determinações de Cd, Cr, Cu e Pb em óleo fúsel.	86
5.4.1 Determinação de elementos potencialmente tóxicos por MIP OES.....	93
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE CD, CR, CU, NI E PB EM ÓLEO FÚSEL	94

CAPÍTULO 6..... 95

6. ANÁLISE DE DILUIÇÃO PADRÃO – SDA EM BEBIDAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS: SDA-MIP OES	96
6.1 CALIBRAÇÃO ANALÍTICA	96
6.2 OBJETIVO	98
6.3 MATERIAL E MÉTODO	98
6.3.1 Reagentes e soluções	98
6.3.2 Instrumentação.....	101
6.3.3 Medidas instrumentais empregando SDA	101
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
6.4.1 Otimização de MIP OES para determinações de Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em bebidas por EC, IC, AS e SDA.....	101

6.4.2	Determinação de Al, Cr, Co, Fe, Mn e Zn em bebidas empregando EC, IC, AS e SDA por MIP OES	104
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE AL, CR, CO, CU, FE, MN, NI E ZN EM BEBIDAS POR SDA.....	110

CAPÍTULO 7..... 111

CONCLUSÃO..... 112

CAPÍTULO 8..... 113

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 114

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FUNDAMENTOS DA ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA – AES

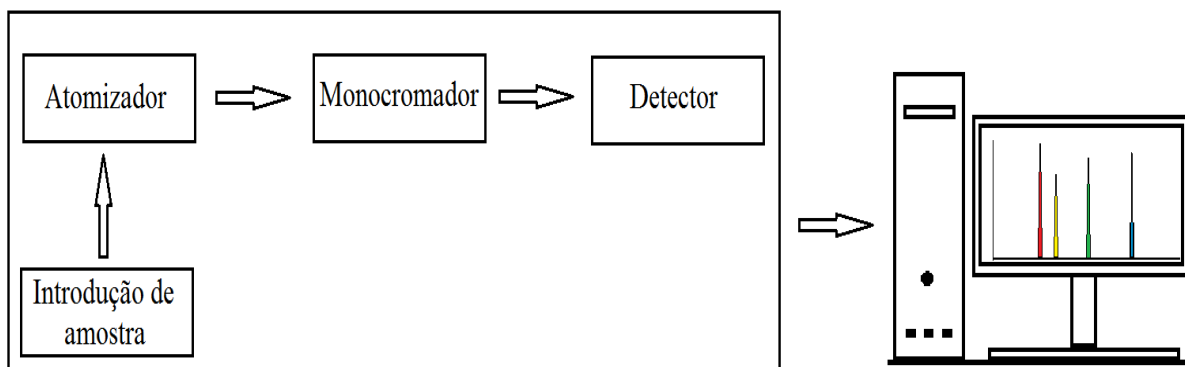
As técnicas espectrométricas mais amplamente utilizadas fazem uso da radiação eletromagnética (REM), que é uma oscilação em fase dos campos elétricos e magnéticos, autossustentando-se, que, encontram-se desacoplados das cargas elétricas que lhe deram origem ¹. As oscilações dos campos magnéticos e elétricos são perpendiculares entre si e podem ser entendidas como a propagação de uma onda transversal, cujas oscilações são perpendiculares à direção do movimento da onda, que podem se deslocar através do vácuo ².

Dentro do ponto de vista da Mecânica Quântica, podem ser entendidas, ainda, como o deslocamento de pequenas partículas, os fótons ³. Quantidades discretas de energia radiante (quantum, $E = h \cdot \nu$) que quando absorvida pelos átomos promovem elétrons de um nível de energia fundamental para um nível excitado. Esses elétrons tendem a retornar aos estados de energia iniciais (processos de relaxação) emitindo energia radiante ($h \cdot \nu$) ^{1,2}.

A teoria quântica, modelo atual da estrutura química, informa que os níveis de energia dos elétrons em átomos neutros são quantizados, isto é, os elétrons assumem estados discretos de energia e só passam de um nível de energia para outro se receber uma quantidade exata ⁴. Cada elemento tem um número específico de elétrons associados com seu núcleo. A configuração mais estável de um átomo é denominado “estado fundamental” e representa a forma como este é comumente encontrado no estado gasoso. Se uma determinada quantidade de energia é aplicada sobre o átomo e esta é absorvida, um dos elétrons mais externos será promovido a um nível energético superior, levando o átomo a uma configuração energética menos estável denominada “estado excitado”. Uma vez que esta configuração é instável, o átomo retorna imediatamente para o “estado fundamental”, liberando a energia absorvida sob a forma de luz ⁵. Esses dois processos (absorção e emissão de luz) são explorados, com fins analíticos, através das técnicas de Emissão Atômica e Absorção Atômica. Métodos de espectrometria de emissão atômica (AES) tem uma vantagem sobre a maioria dos métodos de espectrometria de absorção atômica comum (AAS), pois pode determinar, simultaneamente, mais de um elemento. A técnica de AAS requer tipicamente uma fonte de radiação para cada um dos elementos envolvidos, enquanto AES requer apenas uma única fonte (por exemplo,

plasma, chama, eletrotérmica, etc) para todos os elementos envolvidos. A Figura 1.1 demonstra a instrumentação básica de um espectrômetro de emissão atômica ⁶.

Figura 1.1 - Representação de um espectrômetro de emissão atômica



Fonte: Elaborado pelo autor

Para compreender os processos de absorção e emissão, conceba adicionar sal na chama de um fogão doméstico, ocorrerá uma atomização dos íons de sódio que irão absorver energia da chama, promovendo transições eletrônicas que chamamos de absorção. Quando os elétrons retornarem ao seu estado fundamental devolvem esta energia na forma de energia luminosa (fótons) o que chamamos de emissão. A cor desta transição para o sódio na chama do fogão tem predominância da cor amarela que está relacionada às transições eletrônicas na região visível ⁴. A técnica analítica que se baseia na emissão de radiação eletromagnética das regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético por átomos neutros ou átomos ionizados excitados são chamadas de Espectrometria de Emissão Atômica - AES ou Espectrometria de Emissão Óptica – OES ^{4,6}. Estas técnicas são empregadas em análise quantitativa de elementos químicos, em baixas concentrações em uma larga variedade de amostras, tais como: amostras geológicas, ambientais e água, biológicas, orgânicas, inorgânicas etc. ⁷.

1.1.1 Sistema de introdução de amostras

A introdução da amostra no equipamento de AES é efetuada por meio da aspiração da solução a ser quantificada em acessórios que possibilitam a formação de aerossol, onde a solução aspirada é conduzida a uma câmara de nebulização e em seguida transportada para o atomizador. A passagem da solução para o atomizador pode ser feita por sistema de simples passagem ou dupla passagem. Neste sistema o objetivo é a facilitar apenas a passagem do

aerossol e evitar a máxima possível de partículas maiores dentro do atomizador que poderia reduzir o rendimento analítico ^{4,6,8}.

1.1.2 Atomizadores

Nas técnicas espectroanalíticas, a amostra é atomizada produzindo átomos e/ou íons em fase gasosa. O dispositivo de atomização deve realizar a tarefa complexa de converter as espécies do analito em solução em átomos ou íons elementares, ou ambos, em fase gasosa. Os atomizadores, em geral, dividem-se em atomizadores contínuos, como os plasmas e as chamas, onde as amostras são introduzidas de forma contínua e atomizadores discretos, onde as amostras são introduzidas de forma discreta com um dispositivo como uma seringa ou um auto-amostrador. Os atomizadores discretos mais comuns são o atomizador eletrotérmico, que podem ser em forno de grafite e filamento de tungstênio ⁹. A primeira publicação sobre atomização eletrotérmica foi descrita por L'vov em 1959, mas apenas em 1961 tornou-se bem conhecido, no qual a amostra era depositada em uma superfície de um eletrodo móvel de grafite e, em seguida, introduzida em um tubo de grafite revestido com uma folha de tântalo, o qual é aquecido eletricamente ¹⁰.

Os atomizadores, em grande maioria, são os componentes que determinam a nomenclatura do método de quantificação espectroanalítico. Sistemas de introdução de amostras, monocromadores e detectores podem ser de princípios diferentes, mas não mudam o princípio da técnica. Porém diferentes atomizadores, remetem a diferentes métodos de atomização, por exemplo, atomização por chama, filamento de tungstênio, ICP, MIP, DCP, etc ^{4,6,8}.

No método de Espectrometria de Emissão em Chama - F AES, uma amostra do material a ser analisada é posta em chama sob a forma de uma solução aerossol ou gás. A atomização por Plasma de Corrente Contínua – DCP, envolve o uso de dois eletrodos para produzir uma descarga elétrica. O método de atomização por Plasma Indutivamente Acoplado – ICP, requer uma tocha de plasma, geralmente argônio, em tubos de quartzo concêntricos e utiliza uma potência de rádio frequência para excitação. O Plasma Induzido por Micro-ondas - MIP, não se difere do método de ICP, a não ser que a tocha de quartzo se encontra rodeado por uma cavidade ou uma guia de ondas de micro-ondas para realizar a atomização da solução aerossol. A atomização via filamento de tungstênio, é realizada pela aplicação de uma corrente contínua no filamento de tungstênio e promove a atomização ao elevar a corrente a voltagens próximas de 13 A. Independente da forma de atomização, o mais importante é que se tenha elevada energia

sendo na forma de calor ou fonte eletrotérmica para maior rendimento na atomização dos elementos químicos de interesse. A equação de Boltzmann (equação 1) demonstra exatamente este princípio, quanto maior a temperatura maior o número de átomos excitados e maior sinais de emissão podem ser detectados ^{8,11}.

$$\frac{N_j}{N_o} = \frac{g_j}{g_o} * e^{-\left(\frac{E_j - E_o}{k * T}\right)} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde: N_j = número de átomos no estado excitado; N_o = número de átomos no estado fundamental; g_i/g_o = razão dos pesos estatísticos; E_j = energia de excitação de átomos no estado excitado; E_o = energia de excitação de átomos no estado fundamental; k = constante de Boltzman; T = Temperatura (K).

Somente algumas transições eletrônicas são possíveis e estas definem o espectro de linhas de emissão de cada elemento. Entretanto, a fração de átomos excitados em um determinado nível de energia é uma função da temperatura e do comprimento de onda dado pela distribuição de Boltzmann. As tabelas 1.1 e 1.2 demonstram os efeitos de diferentes fontes de atomização para linhas de K (I) e Ca (II) atômico e iônico respectivamente na equação de Boltzmann. Os dados foram realizados a partir de experimento em F AES e consulta ao National Institute of Standards and Technology (NIST) ¹².

Tabela 1.1 - Efeitos da temperatura no número de átomos excitados para K (I)

Excitação	Chama natural gas-ar		Chama H₂-O₂		ICP	
T (K)	1800		2950		7250	
Espécie	K (I)	Ca (II)	K (I)	Ca (II)	K (I)	Ca (II)
% N_j	5,93x10 ⁻⁰³	3,01x10 ⁻⁰⁷	3,45x10 ⁻⁰³	8,28x10 ⁻⁰⁴	15,03	1,29
% N_o	99,994	99,999	96,546	99,991	84,972	987,098

* número de átomos no estado excitado.

Fonte: elaborado pelo autor

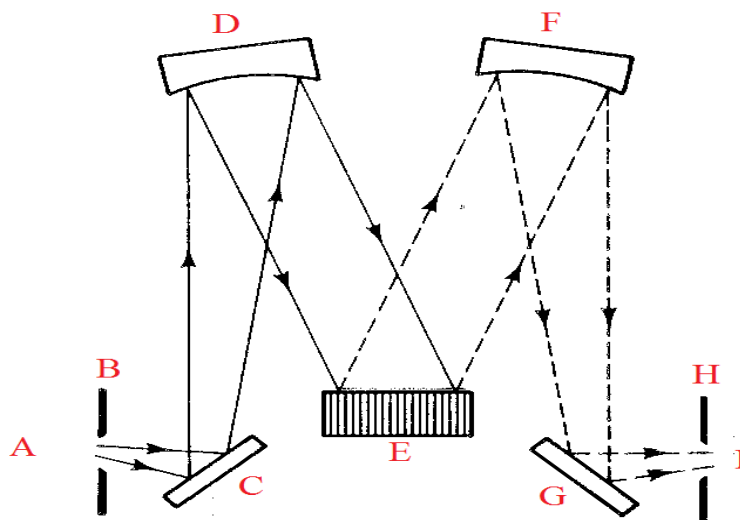
Para K (I), quanto maior a temperatura, maior é a porcentagem de átomos excitados. Ao relacionar as duas espécies do problema anterior (K I e Ca II) vemos que ambas sofrem a mesma transição eletrônica (4s → 4p), deste modo, notamos duas questões: a primeira é que para o K (I) a transição de 4s → 4p, é executada em 766,6 nm e a transição Ca (II) para 4s → 4p é efetuada em 393 nm. Como a energia mínima para uma transição eletrônica de um elétron é

inversamente proporcional ao seu comprimento de onda, Ca (II) terá que receber mais energia para fazer a sua transição eletrônica em relação a K (I). Em outras palavras, a energia necessária para formar íon (Ca II) é muito maior do que a excitação de um átomo no estado gasoso (K I). Por fim, em menores temperaturas a população de íons é menor em K (I) em relação a Ca (II).

1.1.3 Separação de comprimento de ondas

Os monocromadores são de extrema importância para separação dos comprimentos de onda de cada elemento. Este componente está relacionado com a resolução das leituras analíticas. O monocromador é um dispositivo que permite isolar uma banda de comprimento de onda. Geralmente os monocromadores necessitam de um conjunto de fendas e lentes para focalizar a radiação a uma grade de difração que isola o comprimento de onda desejado, Figura 1.2. Quanto mais estreita a fenda de saída e quanto mais distante estiver localizado do prisma melhor será a resolução dos comprimentos de onda ^{6,8}.

Figura 1.2 - Ilustração de um monocromador modelo Czerny-Turner.



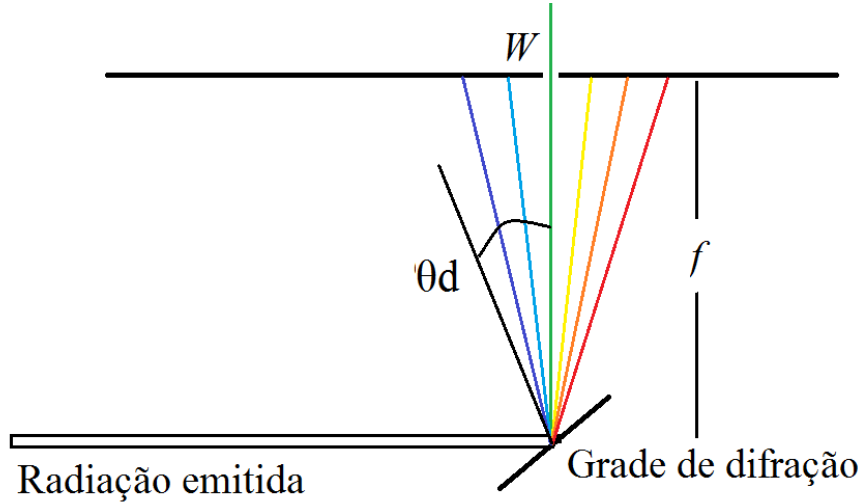
A: Intensidade de emissão. B: Fenda de entrada no monocromador. C e G: espelhos ópticos; D e F: Espelhos focalizadores. E: grade de difração. H: Fenda de saída do monocromador. I: Comprimento de onda selecionado.

Fonte: Adaptado de Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R, Análise espectroquímica, 1ª ed., 1988.

É possível para AES utilizar sistemas com policromador que realiza a separação de $n\lambda$ e espectrograma que são compactos e compõe um sistema de separação de comprimentos de onda e detecção em um único arranjo. Para sistemas de separação, a grade de difração e a fenda de saída influencia na resolução espectral, a banda de passagem espectral $S\lambda$ (equação 2) também pode ser estimada por FWHM (referida como full width at half maximum e demonstra a largura

espectral) de um pico de emissão atômica (Figura 1.3) que determina a resolução do componente de separação espectral ^{4,8}.

Figura 1.3 - Influência da banda de passagem na resolução espectral



Fonte: elaborado pelo autor

O FWHM (equação 3) é utilizado em fenômenos como duração de pulso de ondas e largura espectral de fontes em comunicações e resolução de espectrômetros. Neste caso $\Delta\lambda$ é a largura da resolução de emissão coletada, e a $S\lambda$ pode ser dada pela equação:

$$S\lambda = \frac{W \times d \times \cos \theta_d}{f \times |m|} \quad (\text{eq. 2})$$

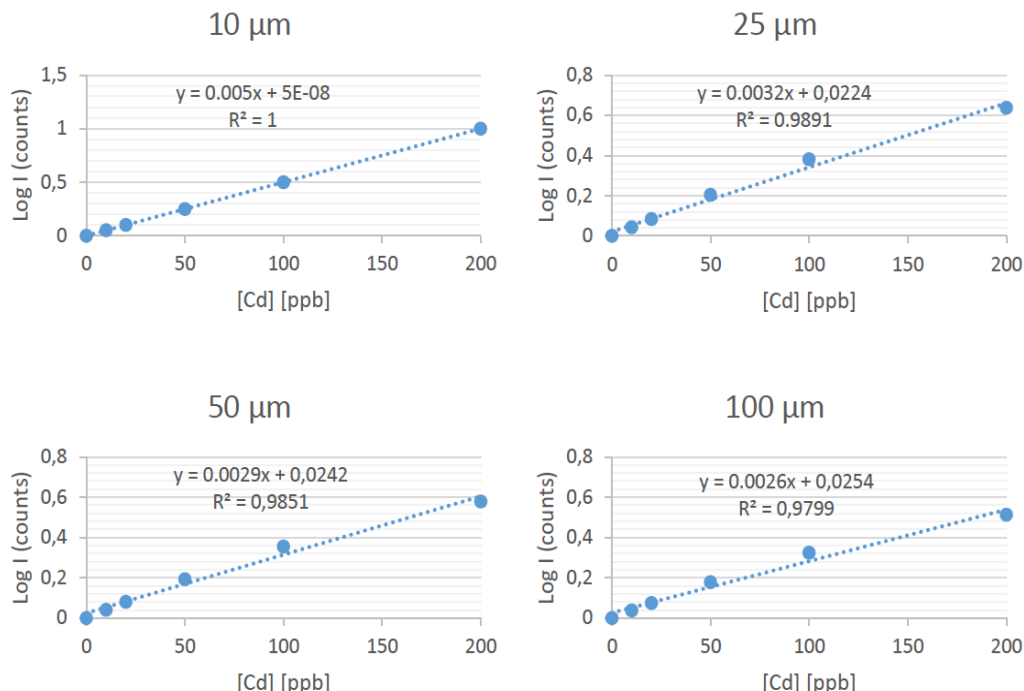
$$FWHM \approx \Delta\lambda = 2S\lambda \quad (\text{eq. 3})$$

Onde: $S\lambda$ = passagem de banda espectrais (nm); W = largura de fenda (mm); d = densidade óptica (espaçamento entre ranhuras nm); θ_d = ângulo de difração; f = distância focal (mm); m = ordem de difração.

Este parâmetro pode ser melhor compreendido ao analisar diferentes FWHM (10, 25, 50 e 100 μm) para uma curva de calibração para Cd por AES, Figura 1.4. Aplicando o log da concentração das soluções pelo log da intensidade obtida, pode-se verificar claramente que os erros aparentes das calibrações são maiores quando utiliza larguras de fenda maiores. Nesta avaliação, pode-se relevar que a maior largura de passagem espectral pode também estar sob

interferências espectrais que não são possíveis de serem separadas por uma distância de resolução suficiente, levando a erros analíticos ^{8,13}.

Figura 1.4 - Avaliação de diferentes FWHM para leituras de Cd por F AES.



Fonte: elaborado pelo autor

1.1.4 Detectores

Outro importante componente óptico para AES, são os detectores. Os detectores fornecem a relação entre potência radiante incidente e concentração da amostra. Este tipo de instrumentos podem ser Dispositivo de Carga Acoplada – CCD (charge-coupled device) que é um sensor semiconductor para captação de imagens formado por um circuito integrado que contém uma matriz de capacitores acoplados. A capacidade de resolução ou detalhe da imagem depende do tamanho e número de células fotoelétricas do CCD. Expressa-se este número em pixels. Quanto maior o número de pixels, maior a área que pode ser coletada; quanto menor o tamanho dos pixels maior a resolução da imagem.

Detector de alto desempenho, como o Dispositivo de Injeção de Carga – CID (*Charge-Injection device*) fornece cobertura completa λ (mais de 250.000 linhas simultaneamente), correção de fundo e correção de interferência espectral que podem ser realizadas após a medição em equipamentos que utilizam este dispositivo. Dispositivo a base de Si também são comuns

para detectores, os Agrupamentos de Fotodiodos – PAD (*Linear Photodiode Array*). Esses dispositivos consistem em centenas de fotodiodos a base de silício, organizados em um arranjo linear, utilizados em uma vasta gama de aplicações. Uma vantagem de agrupamentos de fotodiodos (PDA) é que eles permitem a alta velocidade de leitura para diversos elementos simultaneamente.

Outros detectores podem ser encontrados na literatura em diferentes equipamentos apresentando boa aplicação analítica instrumental. A responsividade é uma função do comprimento de onda da radiação incidente e das propriedades do detector, tais como a banda proibida do material de que é feito o fotodetector. Uma expressão simples para a responsividade R de um fotodetector no qual um sinal ótico é convertido em corrente elétrica (conhecida como fotocorrente) é dado pela equação 4^{8,13}:

$$R = \frac{i_d}{P_o} = \eta \frac{q \cdot \lambda}{h \cdot c} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde: η é a eficiência quântica (a eficiência de conversão de fótons em elétrons) do detector para um determinado comprimento de onda, q é a carga do elétron ($1,6 \times 10^{-19}$ C), c é a velocidade da luz no vácuo ($3,0 \times 10^8$ m s⁻¹), h é constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J s⁻¹), λ é comprimento de onda (m), i_d a corrente do detector (A) e P_o potência do detector (W).

Em geral, estes conceitos são determinantes para o princípio de instrumentação óptica, mais detalhes podem ser encontrados na literatura^{8,13}. Estas variáveis podem ser ajustadas, numa tentativa de aumentar o sinal medido.

1.2 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO – WC AES

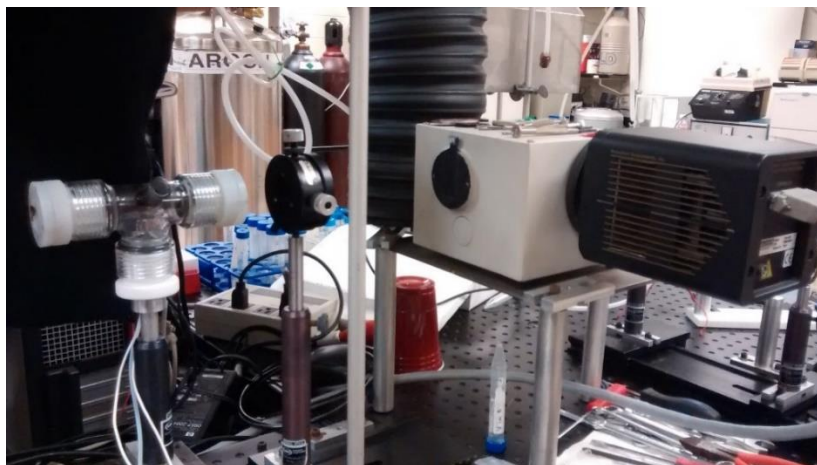
Com o avanço da instrumentação analítica, surgiram diversas formas de atomizadores para espectrometria e suas potencialidades¹⁴. Tradicionalmente, na área analítica a técnica de absorção atômica em chama é a mais difundida, apresentando inúmeros trabalhos por proporcionar simples aplicação analítica¹⁰. Nas últimas décadas os atomizadores eletrotérmicos ganharam destaque por sua facilidade de operação, tanto por absorção quanto por emissão.

Diversos elementos foram utilizados como atomizadores eletrotérmicos (com fonte de corrente contínua), sendo os principais: molibdênio, platina, tântalo e tungstênio. O tungstênio exibe maior ponto de fusão (3680 K), menor pressão de vapor entre todos os metais, alta resistência química, atacado apenas pela mistura de ácidos fluorídrico e nítrico ou por fusão alcalina oxidante. Contudo, atomizadores de tungstênio necessitam da adição de uma mistura de H_2 e argônio como gás de purga durante as etapas de secagem, pirólise e atomização de modo a proteger o metal de processos de oxidação e estender a vida útil do atomizador^{15,16,17,18}.

Entre 2005 e 2006, foi proposto uma nova técnica de medida simultânea de sinais de emissão atômica utilizando um filamento de tungstênio como atomizador - WC AES^{19,20}, alinhado a um monocromador de alta resolução, em uma janela espectral de 4 nm e tempo de integração de 20 ms para material de referência NIST 1643e. Os resultados apresentaram 74 – 114% de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) entre 1,1 e 12,5% se mostrando uma técnica espectroanalítica promissora.

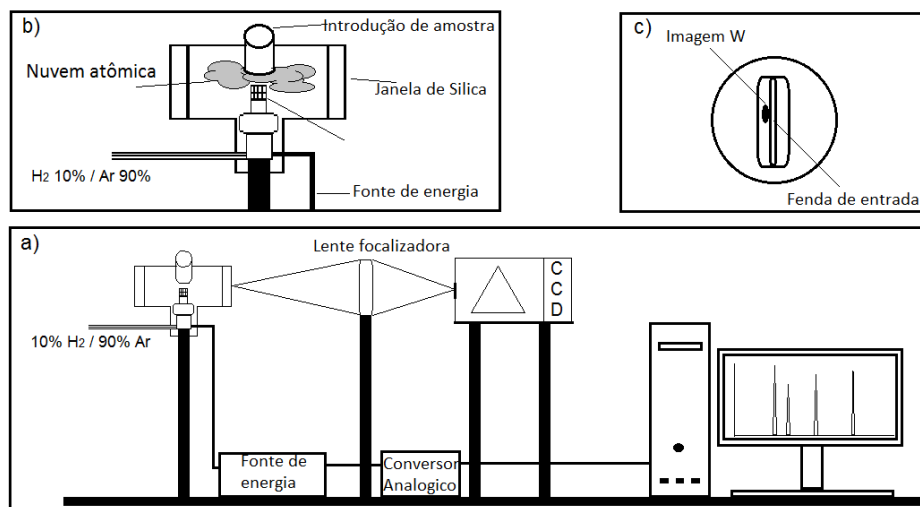
A técnica de WC AES foi utilizada para determinações de 14 lantanídeos (Eu, Yb, Tm, Sm, Ho, Lu, Dy, Er, Ce, Pr, Gd, Tb, La, Nd) em uma janela espectral de 55 nm e tempo de integração de 500 ms, utilizando um monocromador de baixa resolução Czerny-Turner e um detector CCD Figura 1.5. Os resultados obtiveram LOD's na ordem de $\mu g L^{-1}$ em amostras de sólidos NIST 2711, com RSD de 5 – 10%, obtendo melhores valores em comparação com a técnica de F AES²¹. Outro ponto observado pelos autores, foi a proposta de condicionamento por meio de um programa de aquecimento que resulta em uma oxidação forçada, e desta forma cria uma camada protetora de óxido que protege o filamento de tungstênio e aumenta o sinal de emissão em até 50%.

Figura 1.5 - Espectrometro de Emissão Atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio – WC AES.



Fonte: Elaborado pelo autor, Laboratório da Wake Foresty Universyt, Winston Salem, NC, USA.

Figura 1.6 - Diagrama esquemático da configuração instrumental do WC AES ligado a um computador para aquisição de dados (a), Célula de atomização (b), Projeção de imagem do filamento sobre a fenda de entrada do espectrometro (c).



Fonte: Adaptado de GONCALVES et al. 2015 ²².

Um diagrama de WC AES é descrito na Figura 1.6. O atomizador eletrotérmico de tungstênio utilizado possui 150W, 15 V proveniente de uma lâmpada de microscópio (Osram XENOPHOT 64633 HXL, Pullach, Alemanha), retirando a cobertura de vidro, mas mantendo a base de conexão intacta e acoplado a uma fonte de energia em uma cela de borossilicato na forma de T (Ace Glass, produto No. D131703, Vineland, Nova Jersey, EUA). As soluções analíticas são introduzidas em cela de atomização, conforme descrito na literatura ^{22,23}. Uma mistura de gás de purga de 10% de hidrogênio e 90% de argônio fluindo em 1,0 L min⁻¹ é aplicado para elevar a vida útil do filamento de tungstênio ^{21,24}.

A radiação emitida é focalizada por meio de uma lente de sílica fundida com resolução focal de 1:1 de 25 mm de diâmetro e comprimento de 75 mm. A imagem do filamento de tungstênio é mantida aproximadamente 1 mm ao lado da entrada de um monocromador para minimizar sinal-ruído e sinal de fundo ²⁰. O monocromador utilizado é um modelo Czerny-Turner (MonSpec 18, Scientific Measurement Systems Inc., Grand Junction, CO, USA) com uma dispersão linear de cerca de 2 nm/mm à 400 nm. A fenda de entrada do monocromador possui 25 µm de abertura para coleta dos dados analíticos. O detector empregado é um detector de carga acoplado (CCD, Spec-10, Princeton Instruments, Roper Scientific Trenton, NJ, USA). Mais detalhes sobre fonte de energia, cela de atomização, monocromador e detector podem ser encontrados na literatura ²⁵.

A espectrometria de emissão atômica em filamento de tungstênio foi empregada para a determinação simultânea de Cr, Ga, In e V ²⁴. Neste estudo V e In foram detectados por esta técnica pela primeira vez, várias linhas de emissão de todos os 4 elementos foram monitoradas simultaneamente em uma janela espectral de 54 nm. Os limites de detecção foram obtidos na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os elementos, os valores obtidos foram de 10, 2, 0,5 e 0,2 ng para Cr, Ga, In e V, respectivamente. Materiais de referência certificado de solo e de água foram utilizados para verificar a exatidão do método. Depois de uma simples extração ácida, os valores determinados pelo método apresentaram diferenças significativas entre os valores relatados no nível de confiança de 95%.

Determinações indireta de iodo (I) foram realizadas por WC AES ²⁶. Este elemento necessita de alta energia de excitação e é um desafio analítico mesmo quando quantificado por técnicas com energias de excitação mais elevadas como ICP OES. A alternativa utilizada para a quantificação de I foi a utilização de índio (In) em concentrações conhecidas para formação de InI (iodeto de índio). Neste caso ocorre a formação de uma espécie diatômica InI que devido à alta estabilidade ocasiona um decréscimo do sinal analítico de iodo proporcional a sua concentração presente na amostra. Os testes realizados em água de torneira como matriz, foram apuradas em testes de adição com recuperações de até 140%, sendo possíveis as quantificações devido a formação de InCl e/ou InF que podem também ocasionar atenuação no sinal e levar à determinação de concentrações aparentes de iodo mais elevadas e compensar a necessidade de alta energia de excitação necessária para quantificações de iodo.

Um novo arranjo instrumental com dois filamentos de tungstênio com a proposta de reduzir as limitações atribuídas ao comportamento não-isotérmico entre a fase gasosa e a superfície do filamento foi muito bem sucedido ²⁷. As medidas de temperatura utilizando os 2 filamentos alcançaram valores de 500 K maiores do que atingidos com arranjo de apenas um filamento, possibilitando a observação de Ag, Cu e Sn que são dificilmente excitados.

Propondo, a idéia de uma instrumentação portátil para medidas em campo foi desenvolvido um WC AES composto por um detector portátil com uma lente colimadora e uma cela de atomização de Al. Os componentes foram montados em uma base cerâmica e foram operados com uma bateria automotiva de 12 V ²⁸. Os LOD's obtidos foram entre 0,04 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os 15 elementos medidos (Al, Ba, Cr, Cs, Cu, Eu, Fe, Ga, Li, Mg, Mn, Rb, Sr, V e Yb). Para avaliar a exatidão e recuperações foram utilizados materiais de referência certificados de águas e plantas e recuperações entre 72 e 157% foram obtidas.

Com a possibilidade que a técnica de WC AES proporciona, que é realizar a decomposição da matriz durante a etapa de pirólise, foi realizado análises de Ca em amostras

de suco, água mineral e de côco com mínimo pré-tratamento da amostra ²⁹. Utilizando uma mistura oxidante (15% v v⁻¹ H₂O₂ + 1% v v⁻¹ HNO₃) e controle da etapa de pirólise para determinação direta no WC AES, obteve-se recuperações entre 87 – 116 % e não foi observado diferença estatisticamente significativa em comparação com os resultados obtidos por ICP OES.

Elementos como Cs e Sr foram determinados em amostras de peixes por espectrometria de emissão atômica de bobina de tungstênio (WC AES) com limites de detecção de 0,07 e 0,15 µg L⁻¹, respectivamente ³⁰. As leituras analíticas foram feitas em um WC AES portátil composto por uma célula de atomização metálica, uma lente de sílica fundida de 2,54 cm de diâmetro e um espectrômetro de dispositivo carga portátil acoplado obtendo resultados de precisão do método de 6,8 e 7,3% (RSD).

Foi investigada decorrência análoga sobre o sinal de emissão para Cr na presença de Co em WC AES ³¹. Os resultados demonstraram ganhos de até 10x no limite de detecção para Cr e redução de efeitos matriciais apontados como as principais vantagens quando adicionado 1000 mg L⁻¹ de Co como modificador químico para acréscimo de sinais de Cr.

Com a ideia de novos modificadores químicos para melhor sensibilidade analítica, novos estudos publicados demonstram que o WC AES ainda oferece grande potencial com a utilização de agentes modificadores químicos ³². Concentrações de manganês em materiais de referência padrão de plantas obtiveram sinais 2 vezes superiores aos valores certificados para determinações sem o modificador, e também redução do limite de detecção em 17 vezes. Para determinações usando Mg(NO₃), não foi observada diferença estatística significativa entre os valores de Mn determinados e certificadas no nível de confiança de 95%.

Um novo procedimento proposto para controle de temperatura foi empregado para WC AES ³³. Este procedimento foi realizado a fim de otimizar o controle das temperaturas durante o ciclo de aquecimento e a modificação da superfície do atomizador para minimizar as limitações devido o atomizador ser um sistema não isotérmico e melhorar a precisão e exatidão. Um método simples, rápido e eficaz como o de voltametria foi usado para determinar as temperaturas de superfície do atomizador em tempo real durante todas as etapas de um ciclo de aquecimento de WC AES ³⁴. A otimização sistemática de temperatura de pirólise e tempo para matrizes específicas melhorou o desempenho de WC AES para os diferentes elementos.

Recentemente os filamentos de tungstênio podem ser utilizados com facilidade para decompor matriz orgânica de biodiesel, excitar e atomizar os analitos para determinar o sódio, potássio, cromo e vanádio ³⁵. Esta quantificação foi realizada empregando WC AES com apenas uma simples diluição de biodiesel em metanol. Análise direta das alíquotas de amostra 10 µL usando ciclo de aquecimento inferior a 150 s obtiveram limites de detecção, tão baixo como 20,

70, 70 e 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Na, K, Cr e V, respectivamente. O potencial do atomizador de tungstênio para medidas de emissão apresenta algumas limitações, porém pode ser útil devido à sua fácil operação, baixo custo e sem grande geração de resíduo ^{36, 37}.

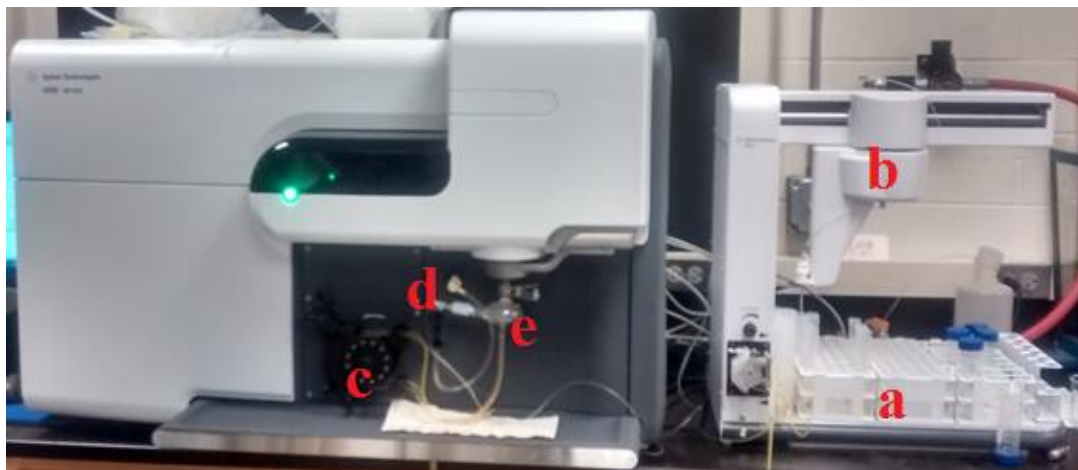
1.3 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS – MIP OES

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas - MIP OES, assim como as técnicas de espectrometria como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP OES, espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente - ICP-MS, espectrometria de absorção atômica - AAS ou espectrometria de fluorescência atômica – AFS, foi projetada para determinações multielementares ³⁸. O MIP OES possui uma história relativamente curta. A primeira instrumentação de um plasma utilizando uma frequência de micro-ondas típica de 2,45 GHz, ocorreu em 1951, usando uma cavidade e um eletrodo para sustentar um plasma. Inicialmente nomeado como Plasma de Micro-ondas Acoplado Capacitivamente - CMP, e somente anos mais tarde conhecida como MIP OES ^{39,40}. A espectroquímica define o plasma como um dos estados físicos da matéria, análogo a gás (gás superaquecido), que provoca a dissociação das ligações moleculares de uma amostra, convertendo-a em seus átomos constituintes no estado gasoso, assim como a possibilidade de formação de íons. Diversas modificações na tentativa de um instrumento robusto e de fácil operação foram avaliadas ao longo das décadas seguintes. E anos mais tarde, em 2011 ocorreu o lançamento comercial como MIP OES utilizando um magnetron como fonte de excitação, e seu baixo custo operacional provocando uma popularidade da técnica colocando-o entre as técnicas de GF AAS e ICP OES ^{38,41,42}.

A Figura 1.7 demonstra os componentes ópticos instrumentais de um MIP OES com base em plasma robusto de N_2 sem a necessidade de gás inflamável, que reduz drasticamente seus custos operacionais. Esta instrumentação é adequada para determinações elementares utilizando um detector de estado sólido CCD. O sistema de introdução de amostra que consiste de um (a) amostrador automático, (b) bomba peristáltica que vaira de 0 - 80 rpm, (c) nebulizador OneNeb com velocidade entre 0,3 e 1,0 L min^{-1} , (d) camara de nebulização ciclônica e (e) tocha de quartzo para alta precisão e sensibilidade. A tocha possui uma base de polímero que faz

automaticamente as conexões de gás e alinha a tocha. O gás de plasma (N_2) é fixada em 20 L min^{-1} e o gás auxiliar (Ar) é fixado em $1,5\text{ L min}^{-1}$ para facilitar a operação ⁴³.

Figura 1.7 - Sistema de introdução de amostras de um MIP OES 4200 Agilent. (a) Rack de amostras; (b) amostrador automático SPS 3; (c) bomba peristáltica; (d) nebulizador OneNeb; (e) câmara de nebulização ciclônica;



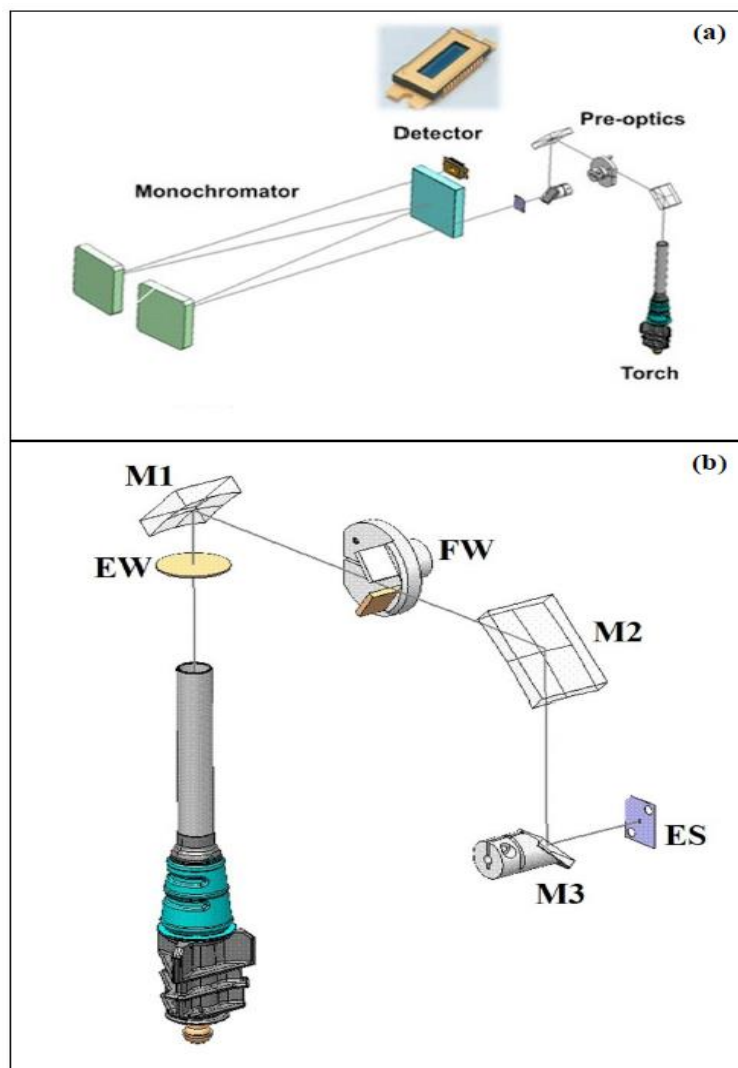
Fonte: Laboratório da Wake Foresty Universyt, Winston Salem, NC, USA. Gentileza Agilent Technologies.

O conjunto de excitação micro-ondas apresenta uma fonte de alimentação de estado sólido e um magnetron resfriado a ar operando a 2450 MHz. A potência do plasma fixado de 1 kW, para facilidade de operação. A vantagem deste sistema é que ele não requer nenhuma fonte de água para resfriamento, pois o gerador de plasma é resfriado a ar.

O plasma atua com configuração axial para melhor sensibilidade e melhores limites de detecção verticalmente orientada. A posição de visualização de plasma é controlada por computador, e que pode ser otimizada para cada comprimento de onda com variações de -120 – 120 mm. A partir do fluxo de nebulização e posição de vizualização do plasma é possível controlar os perfis de temperatura, densidade de elétrons e robustez do plasma ⁴⁴. O fluxo de gás de proteção de ar comprimido (25 L min^{-1}) é usado para desviar o calor do plasma para os espelhos pré-óticos.

A Figura 1.8 demonstra a configuração óptica básica de um MIP OES. Esta configuração possui um sistema de rápida varredura óptica de alta resolução para uma rápida medição. Um monocromador Czerny-Turner com 600 milímetros de comprimento focal e entrada de fenda para facilitar a operação. A rede de difração possui 2400 linhas / mm. Faixa de comprimento de onda de 178 - 780 nm. O sistema óptico pode ser purgado com ar para proteção em ambientes empoeirados ou corrosivos com N_2 a 10 L min^{-1} .

Figura 1.8 - Visão geral do sistema 4200 MP-AES. (a) tocha de quartzo, sistema pré-óptica, monocromador Czerny-Turner e detector CCD e (b) sistema pré-óptica, EW = janela de entrada, M1 = lente tórica menor, FW = filtro móvel, M2 = lente tórica maior, M3 = espelho plano e ES = fenda de saída.



Fonte: © 2016 Agilent Technologies, Inc. Cortesia de Agilent Technologies, Inc.. Adaptado de material suplementar ⁴⁴.

O detector de estado sólido CCD (532 x 128 pixels) foi projetado especialmente para a detecção de nível de baixa luminosidade > 90% de eficiência quântica na sensibilidade, hermeticamente fechado, com operação a 0 °C. O detector CCD recolhe os espectros de analitos e permite a correção de fundo simultânea para melhor estabilidade e precisão analítica.

Após a estabilização como MIP OES, diversas publicações como, determinação de silício em amostras de diesel e biodiesel com simples procedimento de diluição foram descritas. Neste estudo as quantificações foram realizadas por meio de microemulsão em 1-propanol. Os limites de detecção (LOD) obtidos foram de 5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e desvios-padrão relativo (RSD) menores do que 2% em todos os casos ⁴⁵.

Procedimentos para a determinação de Cr, Ni, Pb e V em gasolina e etanol combustível por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas - MIP OES foram bem aplicados com a utilização de um módulo de controle de gás externo – EGCM ⁴⁶. Nestes estudos, o EGCM foi empregado para injetar o ar para o plasma, a fim de minimizar emissões residuais e evitar a deposição de carbono sobre a tocha e na janela de pré-óptico. A exatidão foi verificada por testes de adição e recuperações, obtendo recuperação entre 84 e 123% ⁴⁶.

A análise quantitativa de elementos em produtos agrícolas, como a alimentação animal e de fertilizantes por MIP OES foi realizada e comparado com técnicas reconhecidas e rotineiras como AAS e ICP OES. Os resultados apontaram que a plataforma MIP OES podem oferecer em desempenhos comparáveis ou melhores em comparação com AA e ICP OES com relação as análises de rotina em laboratórios analíticos agrícolas ⁴¹.

Estudos de comparação entre MIP OES e ICP-MS para análise de oligoelementos de girassol digeridos em ácido nítrico foram realizados para Ca, K, Mg, Na, Al, Fe, Mn, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, V e Zn. Os resultados demonstraram grande eficiência do MIP OES com resultados quase idênticos ao ICP-MS ⁴⁷.

O MIP OES foi empregado na determinação de 23 elementos em amostras geológicas. Para os testes de recuperação de material de referência certificado e análise comparativa com fluorescência de raios-X – XRF, e espectrometria de absorção atômica em chama – F AAS, o MIP OES demonstrou ser bastante eficiente, com recuperação de 85 – 115 % e precisão de 0,2 – 1,37 % como RSD ⁴³.

Diversas aplicações para MIP OES foram elaboradas, incluindo-se hifenação com outras técnicas analíticas, descrevendo desde análise de especiação de mercúrio usando HPLC – MIP, como SFC-MIP OES e GC-MIP OES para diversas amostras. Atualmente diversas frentes avaliam aplicações para MIP OES e estudos demonstram grandes aplicações analíticas a serem exploradas ^{48,49}.

1.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE – ICP OES

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP OES, é uma técnica bem confiável para análise multi elementar, utilizando uma bobina de rádio frequência como fonte de excitação de plasma. Esta técnica ressurgiu na última década devido

ao desenvolvimento de equipamentos com detectores de estado sólido (CCD) com de configuração axial, que apresentam melhor sensibilidade ⁵⁰.

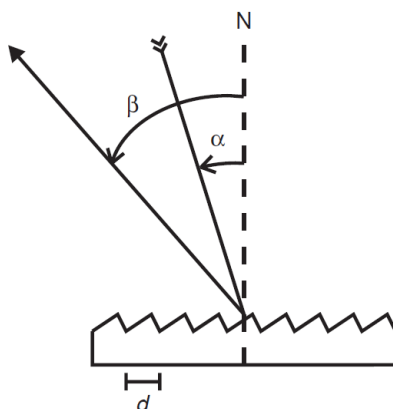
A incorporação do dispositivo de carga acoplada – CCD, aumentou a resolução espectral, obtendo resposta linear e leitura simultânea de uma ampla faixa do espectro electromagnético, obtidos por um ICP OES. A utilização deste tipo de detector tornou-se possível após o desenvolvimento de novos materiais semi-condutores. A proposta de medições com plasma na posição axial foi publicada em 1970. No entanto, apesar de uma melhoria da sensibilidade, o desempenho do sistema foi reduzido devido ao aumento das interferências. Depois de duas décadas, esta proposta torna-se viável devido ao desenvolvimento de sistemas de interface apropriada com base em gás de cisalhamento. Entretanto, como uso da configuração na posição axial para ICP OES obtém-se uma melhor sensibilidade, mas não é recomendado para amostras com uma matriz complexa. Para amostras com matrizes complexas, a melhor opção parece ser a de usar um ICP OES com configuração visualização radial ^{4, 50, 51}.

Em ICP OES, um grande número de elementos, relacionado com o intervalo de comprimento de onda podem ser quantificados com boa resolução dos sistemas ópticos. Os comprimentos de onda acima de 500 nm, devem ser utilizados em casos em que os elementos alcalinos precisam ser determinados, enquanto que para comprimentos de onda inferiores a 190 nm ou mesmo inferior a 160 nm, devem ser utilizados para reduzir problemas de interferências espectrais quando elementos como Cl, Br, N e As são determinados ⁵¹.

A faixa de temperatura usual do plasma gira em torno de 6.000 K e podendo atingir 10.000 K, para atomização, excitação e ionização até mesmo de elementos refratários. A técnica de ICP OES possibilita a determinação simultânea de até 70 elementos em ampla faixa de trabalho (geralmente entre mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). Por exemplo, os 70 elementos mais comumente determinados pela técnica podem dar origem a pelo menos 70 000 linhas totais de emissões na faixa de comprimento de onda de 200 – 600 nm. A consequência desta alta densidade de informação espectral é a necessidade de alta potência de resolução. Os sistemas de dispersão de baixa resolução normalmente empregados em espectrômetros não são suficientes. Essa técnica apresenta como características a baixa suscetibilidade a interferências de matriz, boa sensibilidade, precisão e exatidão ⁵².

Uma melhor resolução é desejável em ICP OES, com passagem de banda espectrais ($\Delta\lambda$) 0,01 nm ou menos se possível. Tradicionalmente, este grau de resolução é realizado utilizando monocromadores planos com longas distâncias focais, Figura 1.9. Considerações geométricas relativamente simples resultam na ordem de difração m .

Figura 1.9 - Representação de uma grade de difração de instrumentos ópticos. N é a normal à superfície de grade, α é o ângulo de incidência medido com respeito a N, e β é o ângulo de difração de medida em relação à N, d representa a largura de uma única ranhura.



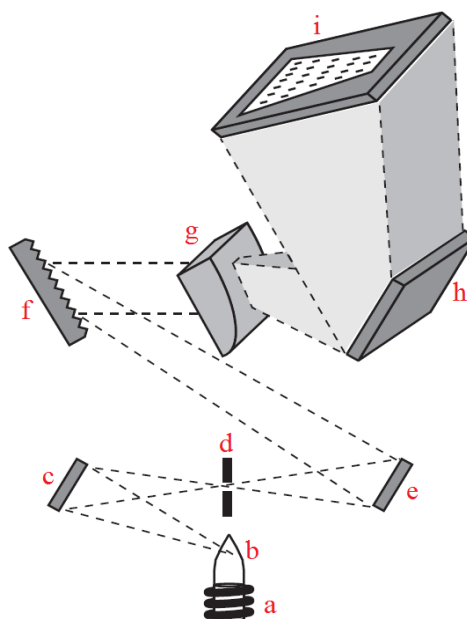
Fonte: Jean-Michel, and Emmanuelle, 1999 ⁵¹.

O vetor normal (N) à superfície da grade é mostrada como uma linha tracejada. Um feixe de radiação incidente às grades com ângulo α em relação a N. A radiação refratada deixa a superfície da grade no ângulo β . O comprimento de onda refletido irá caminhar uma distância diferente de sua trajetória inicial. A equação de demonstram ordem de difração m , para a separação dos comprimentos de ondas pode ser dada pela equação 5.

$$m\lambda = d(\sin\alpha + \sin\beta) \quad (\text{eq. 5})$$

Esta equação mostra a relação entre α e β , o espaçamento de ranhura (d), o comprimento de onda (λ) e a ordem de difração (m). Outro ponto importante da técnica de ICP OES, se fundamenta na introdução de uma amostra, habitualmente no estado líquido, em um plasma gerado por fonte de rádio frequência altamente energética, que proporciona conversão das espécies presentes na amostra em átomos e íons excitados. A radiação emitida destas espécies é captada pelo detector, onde sua concentração é diretamente proporcional às intensidade emitida de cada analitos. A instrumentação óptica e sistema de amostragem é muito similar com as configurações citadas nas seções anteriores, como por exemplo, MIP OES. Porém para ICP OES, o Ar é utilizado como gás ionizante e fonte de rádio frequência como excitação do plasma, Figura 1.10 ⁵³.

Figura 1.10 - Diagrama esquemático de ICP OES com um policromador echelle. (a) Bobina de rádio frequência; (b) Tocha de Ar; (c) espelho coletor; (d) fenda de entrada; (e) espelho colimador; (f) grade echelle; (g) prisma ótico; (h) espelho plano; (i) detector CCD.



Fonte: Zander *et al.*, 1999⁵³.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo principal foi avaliar as potencialidades da espectrometria de emissão óptica por métodos de WC AES e MIP OES para descrever novos métodos de determinação de elementos em baixas concentrações, assim como desenvolver métodos de calibrações com a mínima necessidade de tratamento de amostras.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos almejou-se:

- ❖ Avaliar a redução do tempo de integração de sinais de emissão para aumento da sensibilidade e determinações de Cr e Mn em placentônios bovinos após digestão assistida por micro-ondas e quantificar em WC AES;
- ❖ Descrever um procedimento simples para determinar Cr em amostras de cápsulas medicinais, por meio da decomposição da matriz diretamente sobre o atomizador de tungstênio, com mínima preparação de amostra em WC AES;
- ❖ Descrever um simples procedimento para determinação de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb por MIP OES com o auxílio do módulo de EGCM.
- ❖ Combinar um novo método de calibração com a estabilidade de MIP OES para determinar elementos como Al, Cr, Cu, Co, Fe, Ni, Mn, Zn em amostras de bebidas, sugerindo a configuração SDA-MIP OES.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE Mn E Cr EM PLACENTÔNIOS BOVINOS

3. DETERMINAÇÃO DE MN E CR EM PLACENTÔNIOS BOVINOS

3.1 PLACENTÔNIOS BOVINOS E NUTRIENTES

As exigências de minerais em bovinos variam de acordo com o tipo e nível de produção, a idade do animal, a raça e o grau de adaptação dos animais, a concentração e a forma química do mineral no alimento, e suas relações com os outros nutrientes da dieta durante o período de gestação, lactação e confinamento ^{54,55}. As carências minerais estão entre os fatores que mais contribuem para a baixa produtividade do rebanho, sendo um problema característico da maioria dos sistemas de produção nas diversas partes do mundo, gerando perdas econômicas em razão da diminuição da produtividade do rebanho. Todos os seres vivos necessitam de minerais para o funcionamento normal dos processos biológicos ^{56,57}.

Aproximadamente 3% dos bovinos recém-nascidos têm pelo menos uma má formação congênita grave. Fatores comuns contribuem para a ocorrência de anomalias de desenvolvimento tal como a nutrição mineral desequilibrada durante o desenvolvimento embrionário e fetal. Deficiências minerais podem causar não somente má formação durante o desenvolvimento perinatal, mas também anomalias comportamentais, imunológicas e bioquímicas que persistem na vida adulta ⁵⁸. Estudos em todas as partes do mundo buscam relacionar as concentrações de traços nos bovinos – fígado, carne, leite, sangue e placenta bovina como indicadores de rendimento na produção destes animais ^{59,60,61}.

A placenta de bovinos, como em diversas espécies de animais representa o veículo para troca de nutrientes entre a mãe e o feto durante o período de gestação. Dentre algumas funções que a placenta exerce, estão trocas respiratórias, armazenamento e fornecimento de nutrientes essenciais para o feto. Este último é realizado por meio de placentônio ⁶². O placentônio constitui a união entre a carúncula materna e o cotilédone fetal, sendo a unidade funcional da placenta. Os nutrientes essenciais para desenvolvimento de bovinos são classificados como macronutrientes entre eles Na, Cl, Mg, S, K e micronutrientes como Co, Cu, Mo, Mn e Se ambos supridos por meio de alimentação ^{61, 63}.

Nos bovinos em gestação a deficiência mineral múltipla causada pela baixa concentração presente de vários nutrientes, pode estar relacionada por problemas infecciosos especialmente na deficiência de micronutriente ⁶⁴. Os micronutrientes são os exigidos em pequenas quantidades pelos animais, mas são fundamentais para o desenvolvimento (normal dos animais)

para a estrutura normal dos ossos, reprodução e funcionamento normal do sistema nervoso central, além de serem essenciais para diversas enzimas ^{65,66}. Fêmeas adultas em gestação necessitam de maiores quantidades de manganês para o desenvolvimento normal do feto do que bovinos de confinamento para abate ⁶⁷.

O Mn é essencial para a estrutura óssea, fígado, pâncreas e componentes essenciais de enzimas ⁶⁸. Os principais sintomas da deficiência de manganês são: crescimento retardado, anormalidade de esqueleto, degeneração reprodutiva em ambos os sexos, abortos e anormalidade de recém-nascido ^{69,70}. O monitoramento de Mn, pode ser realizado por meio de controle de novilhas clonadas que são submetidas ao abate, em diferentes fases de gestação para averiguação de concentrações de nutrientes em placentônios e investigar o potencial de transferência de nutrientes ⁷¹.

O Cr é conhecido por duas ações principais nos organismos dos bovinos, sendo que o primeiro fator a tolerância à glicose, que facilita o transporte de glicose nos bovinos e o segundo fator é o anti estresse que minimiza situações de estresse nestes animais. O Cromo natural está presente nas forragens, farelos e grãos, entretanto, em muitas ocasiões não é suficiente para atender os processos nutricionais de animais com metabolismos elevados, como por exemplo, vacas em lactação e em situações sujeitas a estresse, como é o caso de períodos de pré parto e pós-parto ⁷².

O monitoramento destes micronutrientes durante o período gestacional é um desafio devido às baixas concentrações à níveis de traços que necessitam de instrumentação com alta sensibilidade analítica e procedimentos com preparo de amostra complexas ^{65,73,74,75}. Diversos autores descrevem a importância de micronutrientes em bovinos para melhor desenvolvimento do feto, porém existe uma pequena literatura sobre procedimentos analíticos e quantificação de elementos traços durante a fase gestacional de bovinos, devido à complexidade de tratamento de amostras e alta sensibilidade analítica ⁷⁶.

Por estes motivos o presente trabalho busca de quantificar Cr e Mn, micronutrientes essenciais para desenvolvimento do feto em amostras placentônios bovinos pela técnica de WC AES em diferentes fases de gestação e comparar com resultados obtidos e verificar sua precisão com MIP OES para demonstrar a eficiência e simplicidade de operação do WC AES em amostras complexas. As determinações de Cr e Mn em uma matriz complexa, como os placentônios, são possíveis devido as potencialidades de técnicas ópticas para as quantificações, assim como o WC AES, que não necessita de tratamento complexo de amostra. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia simples de análise (digestão direta no atomizador).

3.2 OBJETIVO

Nesta etapa, o objetivo foi desenvolver um procedimento para aumentar a sensibilidade de sinais de emissão para determinação de Cr e Mn em placentônios de bovinos por espectrometria de emissão atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio - WC AES.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e soluções

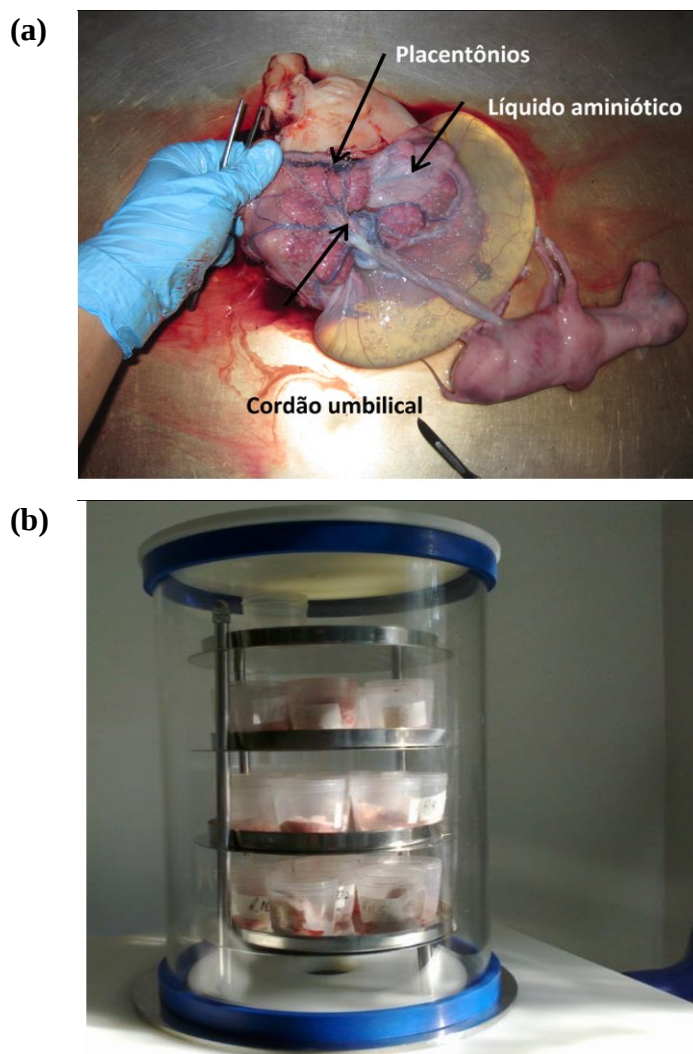
As soluções utilizadas para as digestões e curvas de calibrações foram preparadas com água destilada-deionizada (18 M Ω cm, Milli-Q[®], Millipore, Bedford, MA, USA) e adicionado ácido nítrico de alta pureza (Fisher, Pittsburgh, PA, USA). As soluções de calibração foram preparadas a partir de diluições de solução padrão 1000 mg L⁻¹ de Cr, Mg e Mn (SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, USA). Peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ (Acros, Morris Plains, NJ, USA) e ácido nítrico forma utilizados nas digestões. Todos os materiais utilizados foram descontaminados em solução de ácido nítrico (10% v v⁻¹) por 24 h.

Todas as amostras de placentônio foram coletadas em um frigorífico no município de Ilha Solteira – SP. Os animais escolhidos foram de diferentes regiões para verificar as concentrações em diferentes condições nutricionais, no qual permite uma coleta de amostra de maneira não tendenciosa.

3.3.2 Coleta e preservação das amostras

Foram coletadas amostras de placentônio em 6 distintas bovinos em diferentes fases de gestação de animais enviados para o abate, Figura 3.1 (a). A coleta foi realizada com um bisturi n. 2 e os placentônios acomodados em frascos de amostragem e numerados de 1 a 6. Após a coleta, as amostras foram congeladas em um refrigerador doméstico a -5°C e submetidas a liofilização para preservação das amostras. A liofilização foi realizada a -50 °C por compressor hermético com gás, durante 48 h em um liofilizador Terroni[®] LS 3000 construído em aço inox AISI 304, com polimento sanitário espelhado, ventilação forçada a ar, proteção térmica e sistema de drenagem com válvula de esfera acoplado à bomba de vácuo, Figura 3.1 (b).

Figura 3.1 - Procedimento de coleta e preservação de amostras realizados. Coleta de material (a). Etapa de liofilização de amostras (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na maioria dos casos de quantificação de tecidos de origem animal a liofilização pode ser bastante útil para preservação de amostras, com o princípio de congelamento e desidratação a baixa temperatura com alto vácuo, preservando o tecido que está sendo desidratado ⁷⁷.

Após a liofilização as amostras foram submetidas a digestão. Com o intuito de garantir a homogeneidade das amostras e eficiência da etapa de digestão, foi realizado uma moagem criogênica, utilizando um moinho criogênico SPEX 68000, com o programa de moagem demonstrado na Tabela 3.1.

A diminuição da dimensão das partículas de uma amostra é um componente importante para digestão via micro-ondas. O emprego da moagem criogênica com nitrogênio líquido é um meio eficiente e dinâmico de obter partículas com volume ultrafino e uniforme, enquanto promove melhor condição e a estabilidade para a amostra, bem como aumenta a eficiência de

digestão⁷⁸. Sistemas de moagem criogênica combinam a moagem fina de alto desempenho com o resfriamento criogênico, em adequar um ambiente inerte para preservação da amostra e facilitar a etapa de digestão assistida por micro-ondas, figura 3.2.

Tabela 3.1 - Programa de moagem criogênica empregado para as amostras.

ETAPA	TEMPO (minutos)
Pré-congelamento	2
Moagem a	3
Congelamento entre as moagens	2

^a 2 ciclos por moagem

Fonte: Elaborado pelo autor

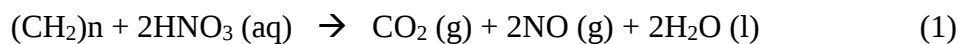
Figura 3.2 - Amostras de placentônios trituradas e preservadas para digestão via microondas.



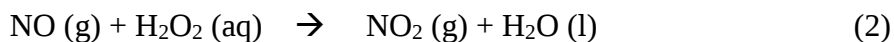
Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.3 Digestão via micro-ondas

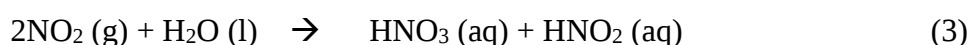
A busca por melhores condições de digestão é bastante discutida, pois, esta etapa é uma das mais importante para uma análise efetiva. Quando se trata de matriz biológica, a quantidade elevada de compostos orgânicos não digeridos podem se reorganizar formando organometálicos e causa sérias interferências analíticas. A digestão de amostras via micro-ondas é uma alternativa na qual pode ser utilizado para a digestão, combinados com misturas oxidante de HNO_3 e H_2O_2 . Este procedimento é uma opção rápida e viável pelo fato de possibilitar a recuperação de HNO_3 durante a etapa de aquecimento em frascos fechados^{79,80}. O aumento da pressão interna nos tubos, durante a rampa de aquecimento causa o aumento do ponto de ebulição da solução a ser digerida, consequentemente, acelera as reações químicas de digestão de compostos orgânicos conforme descrito nas reações 1 - 4^{81,82,83}:



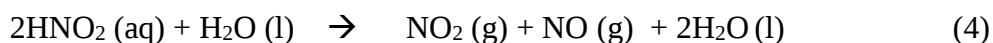
Na reação abaixo o NO (g), resultante da reação 1, reage com o O₂ (g) (H₂O₂ (aq)) presente no sistema para formar o NO₂ (g):



Em seguida, o NO₂ (g) é reabsorvido dentro do sistema e ocorre a formação de HNO₃ (aq) e HNO₂ (aq):



Este ciclo irá continuar enquanto houver O₂ (g) disponível no sistema. Por tanto, quanto maior a quantidade de oxigênio disponível, maior será a recuperação de HNO₃ e mais eficiente será a digestão. Neste caso a adição de H₂O₂ contribui para melhora na oxigenação do sistema.



Para a digestão das amostras de placentônios, aproximadamente 0,25 g foram submetidas a digestão assistida por micro-ondas, empregando 2,5 mL de HNO₃, 1,5 mL de H₂O (Millipore Rios 5[®]) e 1 mL de H₂O₂ em um forno micro-ondas Multiwave Anton Paar[®], equipado com rotor de 6 posições. Após a etapa de digestão os digeridos foram aferidos para 25 mL e seguidos para quantificação.

A verificação de precisão analítica, o mesmo procedimento foi realizado com a CRM 1577b. O programa de aquecimento para digestão é descrito na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Programa de aquecimento usado para a digestão das amostras.

Etapa	Potência (W)	Temperatura (K)	Tempo (min)	Pressão (Bar)
1	100	393	5	75
2	600	510	5	75
3	1000	560	10	75
4	0	298	15	75

Fonte: Elaborado pelo autor.

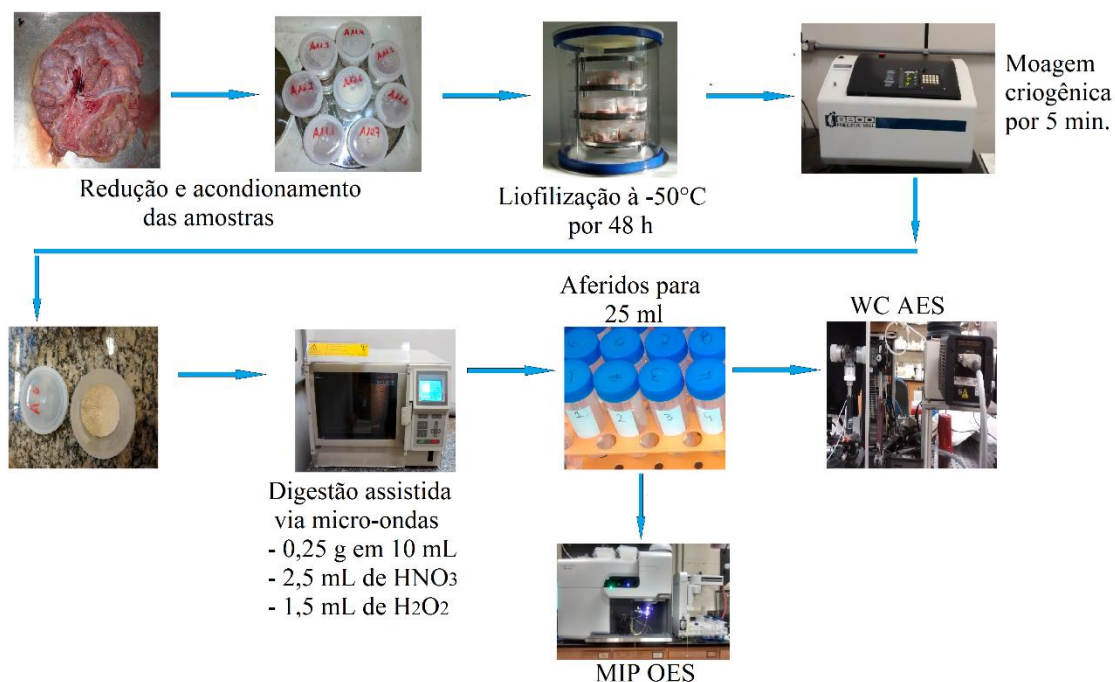
3.3.4 Quantificação de Cr e Mn por WC AES

O WC AES foi utilizado para medidas analíticas com a introdução de 25 μL de amostras adicionadas diretamente no atomizador de tungstênio usando uma micropipeta automática (Eppendorf 10 – 100 mL, Brinkman, Westbury, NY, USA). O ciclo de aquecimento aplicado consiste nas etapas de vaporização do solvente (etapa 1), pirólise da amostra (etapa 2), pré atomização (etapa 3) e excitação e atomização do analito (etapa 4) ^{29,33}.

O filamento de tungstênio utilizado foi proveniente de uma lâmpada comercial de microscópio (Osram Xenophot 64633 HXL, Pullach, Germany), com 15 V e 150 W e aplicação de uma corrente contínua. Cerca de 25 μL de amostras foram inseridos na cela de atomização (Ace Glass, product no. D131703, Vineland, New Jersey, USA) para as etapas de secagem, pirólise e atomização ³³. A emissão gerada foi coletada por espectrômetro modelo Czerny-turner (MonSpec 18, Scientific Measurement Systems Inc., Grand Junction, CO, USA) com tempo de integração de 30 ms, acoplado a um detector CCD (Spec-10, Princeton Instruments, Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) operando em - 40 °C, que possibilita adequada resolução espectral ⁸⁴.

Avaliações de diferentes tempos de integração de sinais de emissão foram realizadas com a finalidade de reduzir o sinal-ruído e aumentar a sensibilidade analítica. Um MIP OES (MP AES 4200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) foi utilizado para checar a exatidão dos dados obtidos. O sistema de introdução de amostras é composto por um amostrador automático SPS 3 - tubulação de fotopolímero-resistente, uma câmara tipo ciclone juntamente com um nebulizador inerte OneNeb e N_2 utilizado como gás de plasma ⁸⁵. O método de curva de calibração externo foi utilizado em todas as determinações. Para verificar a exatidão analítica, amostra certificada de fígado bovino CRM 1577b foi utilizada como referência. A Figura 3.3 demonstra o procedimento analítico adotado para as determinações.

Figura 3.3 - Procedimento adotado para determinação de Cr e Mn em placentônios bovinos.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Otimização para determinação de Mn e Cr por WC AES

Para as leituras analíticas em WC AES foi necessário um pré condicionamento do atomizador de tungstênio, assim como nas etapas de secagem, pirólise e atomização. Estes procedimentos serão discutidos nas seções seguintes.

3.4.2 Codicionamento do atomizador

O filamento de tungstênio necessita de um condicionamento para melhorar a sensibilidade analítica. Este procedimento foi realizado a partir de programa de aquecimento para otimização de atomizador em diferentes atmosferas conforme descrito na tabela 3.3 ^{21,27,33}.

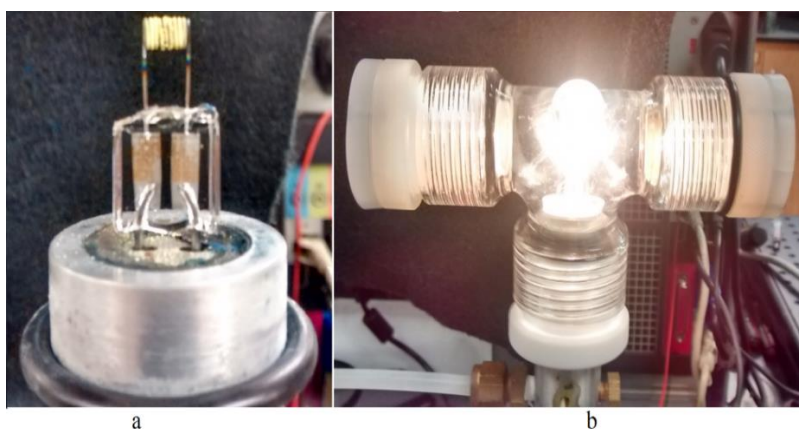
Tabela 3.3 - Programa de aquecimento para tratamento térmico e condicionamento.

Etapa	Corrente aplicada (A)	Tempo (s)	Atmosfera
1	3,0	10	ar
	5,0	5,0	ar
	0	10	ar
	5,0	5,0	ar
2	3,5	250	1 L min ⁻¹ (10% H ₂ / 90% Ar)
	4,5	250	1 L min ⁻¹ (10% H ₂ / 90% Ar)
	5,5	300	1 L min ⁻¹ (10% H ₂ / 90% Ar)
	7,0	150	1 L min ⁻¹ (10% H ₂ / 90% Ar)
	10	35	1 L min ⁻¹ (10% H ₂ / 90% Ar)

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao utilizar um novo atomizador, é necessário estabelecer um programa de aquecimento sobre atmosfera no ar, fora da célula de atomização, que favorece a formação de uma espessa camada de óxido de tungstênio (Figura 3.4 (a)). Com a aplicação de um novo ciclo de aquecimento, o atomizador perde esta primeira camada de óxido formada em uma atmosfera composta de 10% H₂ / 90% Ar, dentro da célula de atomização, (figura 3.4 (b)).

Figura 3.4 - Condicionamento do atomizador de filamento de tungstênio fora da cela de atomização (a); Condicionamento dentro da cela de atomização de vidro borosilicato (b).



Fonte: Elaborado pelo autor. (Laboratório da Wake Foresty University, Winston Salem, NC, USA.).

Atomizadores submetidos a este tratamento conseguem proporcionar melhores sinais de emissão quando comparados a atomizadores sem condicionamento, isso pode ser melhor compreendido devido a superfície de óxido formada e consequentemente removida com o

condicionamento sobre atmosfera de 10% H₂ / 90% Ar. A área do atomizador é reduzida e a condutividade aumenta devido ao maior fluxo de elétrons transportado, figura 3.4.

Para condicionamento de pirólise e atomização, foram realizados testes para verificação da corrente real aplicada no filamento. Esta avaliação permitiu quantificar a corrente real a partir da corrente nominal inserida no programa de aquecimento e consequentemente possibilita a determinação da temperatura na superfície do atomizador. Estes parâmetros permitem o acompanhamento das etapas de pirólise e atomização com maior efetividade durante o procedimento analítico. Conforme descritos em trabalhos anteriores considerando o filamento de W como um fio cilíndrico enrolado na forma de uma espira, foram retirados dados do atomizador de tungstênio como a área da circunferência (m²), o volume do fio (m³); e a densidade do material (kg m⁻³) para determinar a razão L/A para o filamento de tungstênio, onde o L, m e r são o comprimento, a massa e o raio do atomizador de tungstênio, respectivamente e a densidade do tungstênio expressa como d. A razão L/A pode ser representada pela equação 5³⁴:

$$\frac{L}{A} = \frac{m}{d \cdot \pi^2 \cdot r^4} \quad (\text{eq. 5})$$

A massa considerada para os atomizadores condicionados foi de 0,0940 g e o raio do fio constituinte do filamento determinado através de observações por microscopia eletrônica de varredura, foi de valores de 0,144 mm³³. A razão L/A para obtida para o filamento de tungstênio condicionado foi de 1,02 x 10⁶ m⁻¹.

Tabela 3.4 - Dados obtidos para condicionamento do atomizador a partir de aplicação de corrente.

Corrente (A)						
Nominal	Leituras obtidas			Médias	σ	RSD
1,00	2,08	2,06	2,03	2,06	0,02	1,06
1,50	2,09	2,08	2,06	2,08	0,01	0,67
2,00	2,10	2,10	2,11	2,10	0,01	0,35
2,50	2,06	2,21	2,17	2,15	0,06	2,87
3,00	2,44	2,53	2,48	2,48	0,03	1,40
3,50	2,87	2,94	2,88	2,90	0,03	1,04
4,00	3,29	3,39	3,33	3,34	0,04	1,16
4,50	3,74	3,83	3,77	3,78	0,04	1,00
5,00	4,16	3,93	4,21	4,10	0,12	2,97
5,50	4,62	4,54	4,68	4,61	0,06	1,24
6,00	5,07	4,97	5,13	5,06	0,07	1,31
6,50	5,53	5,46	5,61	5,53	0,06	1,11
7,00	5,99	5,94	6,09	6,01	0,06	1,04
7,50	6,46	6,44	6,57	6,49	0,06	0,88
8,00	6,94	6,92	7,04	6,97	0,05	0,75
8,50	7,44	7,42	7,55	7,47	0,06	0,77
9,00	7,87	7,94	8,03	7,95	0,07	0,82
9,50	8,34	8,45	8,52	8,44	0,07	0,88
10,00	8,87	8,96	9,02	8,95	0,06	0,69

σ : desvio padrão; RSD: desvio padrão relativo

Fonte: Elaborado pelo autor

As leituras de corrente não sofreram alterações significativas, com desvio padrão relativo (RSD) entre 0,35 e 2,87 %. A partir dos dados apresentados na tabela 3.4, e utilizando a ferramenta de dados do Microsoft Solver (suplemento do Microsoft Excel) calculou-se o valor de corrente efetivamente aplicada no filamento (I_A), utilizando uma equação polinomial (ordem 3) de ajuste da curva dada pela equação 6:

$$I_A = - 0,0075x^3 + 0,1688x^2 - 0,2479x + 2,0363 \quad (\text{eq. 6})$$

Com os valores medidos de potencial (V) a temperatura da superfície pode ser calculada simplesmente pelo monitoramento do potencial entre o atomizador durante o aquecimento de diferentes ciclos, considerando sua relação com a resistividade do tungstênio (equação 7).

$$\rho = \frac{R}{L/A(m^{-1})} \quad (\text{eq. 7})$$

Rearranjando os valores de ρ e o valor de R ($R = \text{ddp (V)} / i \text{ (A)}$) e para determinar a temperatura do filamento de tungstênio a partir do simples monitoramento do potencial após aplicação de uma corrente elétrica, obtem-se a seguinte equação 8.

$$\rho = 4,5776 \times 10^{-11} \cdot T^{1,2415} \quad (\text{eq. 8})$$

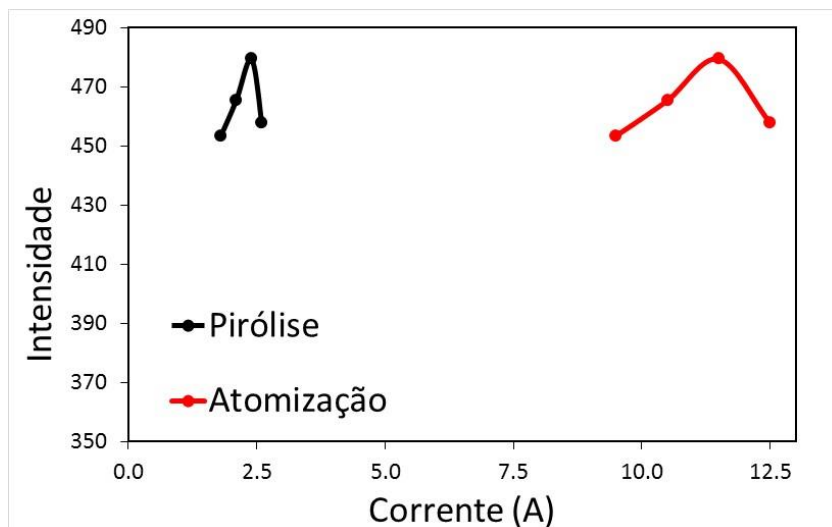
Sendo que R foi obtido com uma fonte constante de alimentação utilizada em todos os experimentos. A partir dos dados da curva de ajuste obtida, obteve-se a equação 9, que correlaciona temperatura T (K) e a resistividade ρ ($\Omega \text{ m}$)⁸⁶:

$$T = \left[\left(\frac{\text{ddp}}{\frac{L}{A} \cdot I_A} \right)^{0,805477245} \right] \cdot 2,128731811 \times 10^8 \quad (\text{eq. 9})$$

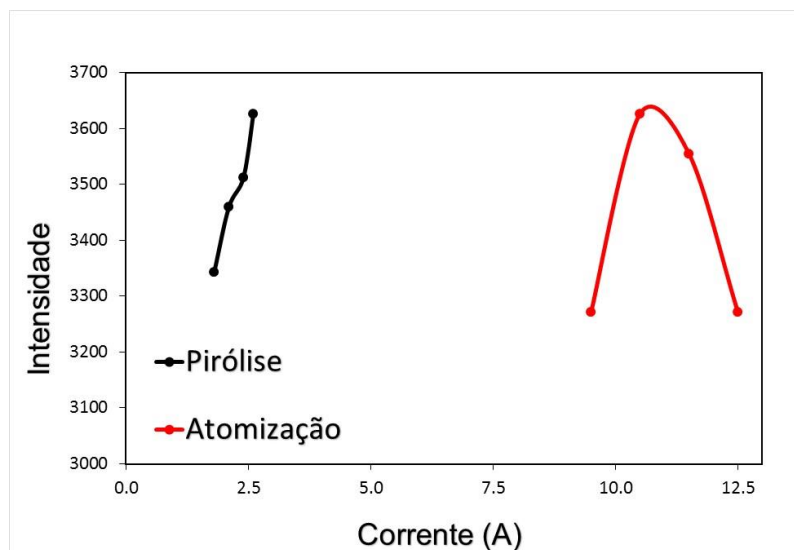
Onde T é a temperatura (K), ddp é o potencial (V), L/A a razão comprimento/área (m^{-1}) e I a corrente aplicada (A)²⁷. Este procedimento foi adotado para determinação da temperatura do atomizador em todas as leituras realizadas.

3.4.3 Determinação da temperatura de pirólise e atomização

Foram realizados testes com soluções de 1 mg L^{-1} dos elementos em estudos para otimizar a temperatura de operação. Para este procedimento os sinais de emissão atômica foram coletados com 1s após o início da atomização. Desta forma, foi possível determinar a temperatura de secagem, pirólise e atomização da superfície do atomizador. As Figuras 3.5 e 3.6 apresentam as intensidades obtidas para os filamentos de tungstênio após otimização de aplicação de corrente.

Figura 3.5 - Perfis de otimização de pirólise e atomização para Mn (1 mg L^{-1}).

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3.6 - Perfis de otimização de pirólise e atomização para Cr (1 mg L^{-1}).

Fonte: Elaborado pelo autor

Para realização dos procedimentos de otimização utilizou-se uma variação de corrente empregada entre 3 – 4 ampéres (A) para secagem; 2 – 3 para pirólise e 9 – 12 para atomização. As melhores condições obtidas são demonstradas para cada etapa na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Programa de aquecimento durante as etapas de secagem, pirólise e atomização para as determinações em WC AES.

Etapa	Corrente A		Voltagem V	Temperatura K	Tempo s
	Norminal	Real			
1	3,0	2,6	0,58	373	30
	2,9	2,5	0,55	373	25
	2,7	2,4	0,63	373	20
2	2,4	2,3	0,92	1472	25
3	-	-	-	-	10
4	10,5	11,7	13,07	3360	3

Fonte: Elaborado pelo autor

Nestas etapas, a secagem constituiu na eliminação gradativa do solvente e pode variar o tempo em função da viscosidade e volatilidade de cada solvente. Na etapa de pirólise ocorre a separação entre componentes da matriz e analito, nesta fase pode-se eliminar matrizes orgânicas devido à elevação da temperatura e com isso reduzir os efeitos de background geralmente altos para análises óticas, em temperaturas próximas ao ponto de fusão do elemento de interesse, fazendo que não tenha perda de sinal ^{20,29,30,33,35}. Já na última etapa, a de atomização, é a fase de fragmentação de um corpo em unidades imperceptíveis.

Para a atomização eletrotérmica a eficiência de formação da nuvem atômica está associada à taxa de aquecimento do atomizador, sendo esta diretamente proporcional à potência da fonte de aquecimento. Em seguida ocorre a emissão e obtenção de dados analíticos, isso é possível podendo atingir valores como 30 K ms^{-1} em filamento de tungstênio sobre alta taxa de aquecimento, permitindo a separação dos sinais analíticos ⁸⁷. Durante o ciclo de aquecimento foi utilizado uma etapa de pré atomização que corresponde a etapa de resfriamento anterior à atomização e possui o emprego de garantir condições análogas e reprodutibilidade da etapa de atomização durante a análise de múltiplas soluções.

Devido a menor sensibilidade de obtenção de sinal de Mn em relação ao Cr, foi estabelecido que as melhores condições para Mn seriam utilizadas para todas as determinações por não verificar perda de sinal analítico de Cr. Isso possibilitou as quantificações simultâneas em uma única solução de curva de calibração, sendo que a temperatura de fusão do Mn é próxima de 1500 K, enquanto a temperatura de fusão do Cr é próxima de 2200 K. Indicando

que a utilização de pirólise a 1472 K favorece as quantificações de Mn sem perda de analito caso utilizado temperaturas maiores.

3.4.4 Avaliação do tempo de integração de sinal nas medidas de WC AES

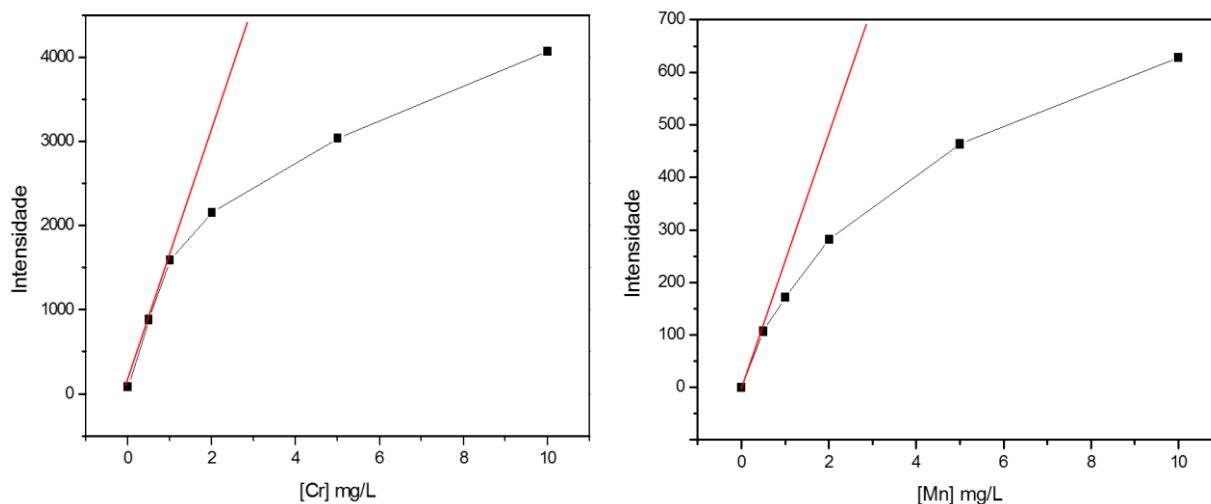
Com a otimização das temperaturas de pirólise e atomização, a melhor eficiência de emissão pode ser relacionada com a temperatura de atomização e o tempo de integração, neste caso diferente para cada elemento a ser analisado. O grande desafio é a quantificação de Mn 403 nm. Por apresentar baixa sensibilidade, como descrito nas secções anteriores esta sensibilidade e em alguns casos necessita de modificadores químicos para possibilitar o aumento de sinal e eliminação de interferências espectrais. Neste contexto avaliou-se a possibilidade de ganho de sinal sem a necessidade de manipulação química, sendo apenas a avaliação de diferentes tempos de integração de sinais como ferramenta de trabalho.

A execução de uma curva de calibração para Mn em tempo de integração de sinal de 500 ms foi utilizada para avaliar a sensibilidade do atomizador após o condicionamento. Para esta coleta de sinal em um faixa linear de 1 – 50 mg L⁻¹, obteve um limite de detecção de 0,9 mg L⁻¹, e em testes realizados para Cr obteve-se um limite de detecção de 0,6 mg L⁻¹, valores relativamente altos quando comparados com outras técnicas ópticas como GF AAS, ICP-OES, MP AES que podem obter valores para LOD's na ordem de µg L⁻¹ com certa facilidade. Esta que esta baixa sensibilidade pode estar relacionada com a LDR (faixa dinâmica linear) ⁸⁸. A LDR é a faixa de concentrações sobre a qual uma curva de calibração é linear. Ela é definida na extremidade inferior pelo LOD, e na extremidade superior pela a concentração do analito. A LDR é geralmente expressa em ordens de magnitude, em método analítico devem ter uma faixa dinâmica normal entre 2 - 6 ordens de magnitude e para filamentos de tungstênio esta ordem é bem menor. Neste caso específico a LDR apresenta valores de 1,7 ordem de magnitude, este resultado é devido à baixa concentração de átomos excitados já que as temperaturas obtidas na superfície do filamento de no máximo 3600 K, sua temperatura de fusão.

Ao avaliar a possibilidade de trabalho em concentrações menores, realizamos testes em uma faixa de trabalho de 1,0 – 10,0 mg L⁻¹ (Figura 3.7). Nesta análise, fica evidenciado que em concentrações menores, tanto para Cr e para Mn ocorre um desvio acentuado da curva de calibração. Uma das razões para este desvio, pode estar relacionado a auto absorção devido a grande densidade de transições eletrônicas e ao alto sinal de fundo. Entretanto, uma possibilidade para esta correção, pode ser realizada com o emprego de tempo de integração de

signal menor, que reduzirá o sinal de fundo e a coleta de sinal de emissão pode ser melhor efetuada.

Figura 3.7 - Curvas de calibração para Cr e Mn em 500 ms de integração de sinal. — Linearidade esperada para uma curva de calibração normal. --■-- Dados obtidos pela curva de calibração (n = 3).



Fonte: Elaborado pelo autor

A utilização das condições descritas nesta seção, para análises de traços ou ultra-traços é praticamente impossível, pois as concentrações a serem analisadas estariam abaixo dos LOD's obtidos para Mn e Cr. Por este motivo, a avaliação de diferentes tempos de integração de sinal foi realizada a partir de soluções de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para Cr e Mn sobre condições citadas nas seções anteriores para secagem, pirólise e atomização. Foi avaliado a relação sinal-ruído ($n = 20$) para determinar a melhor coleta de sinal em 4 diferentes tempos 10, 30, 50 e 100 ms, tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Avaliação do tempo de integração ($n = 20$) para Mn e Cr a partir de solução de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Tempo de integração (ms)	n° de espectros	Elementos	S/N	RSD
10	50	Mn	28	4
		Cr	24	4
30	35	Mn	36	3
		Cr	25	4
50	20	Mn	18	6
		Cr	16	5
100	15	Mn	14	7
		Cr	13	8

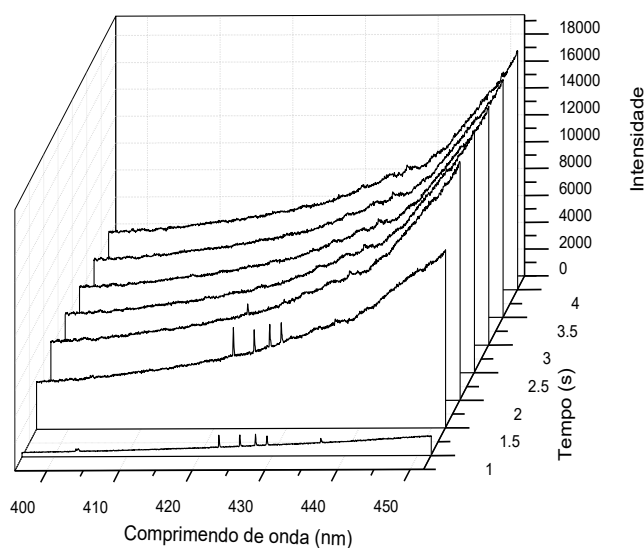
Fonte: Elaborado pelo autor

A relação sinal-ruído (S/N) compara o nível do sinal desejado para o nível de ruído de fundo. Quanto maior relação sinal-ruído, menor será o efeito de fundo ruído sobre a detecção ou o sinal de medição ⁸⁹. A avaliação demonstrada na tabela 3.6 indica que a melhor utilização de integração de tempo foi de 30 ms para obtenção de sinal analítico, apresentando melhor relação sinal ruído de 36 e 25, e desvio padrão relativo de 3 e 4 para Mn e Cr, respectivamente.

As figuras 3.8 e 3.9 demonstram gráficos com coordenadas X para o tempo de emissão, Y para comprimento de onda e Z para a intensidade de emissão. Uma comparação do sinal emitido e sinal de fundo para 500 e 30 ms foram realizados para comparação de eficiência em emissão de sinal. Nesta comparação, as emissões utilizando 500 ms de integração de sinal (Figura 3.8), observa-se sinal de fundo 20 vezes maior em relação à avaliação realizada com 30 ms de integração de sinal (Figura 3.9).

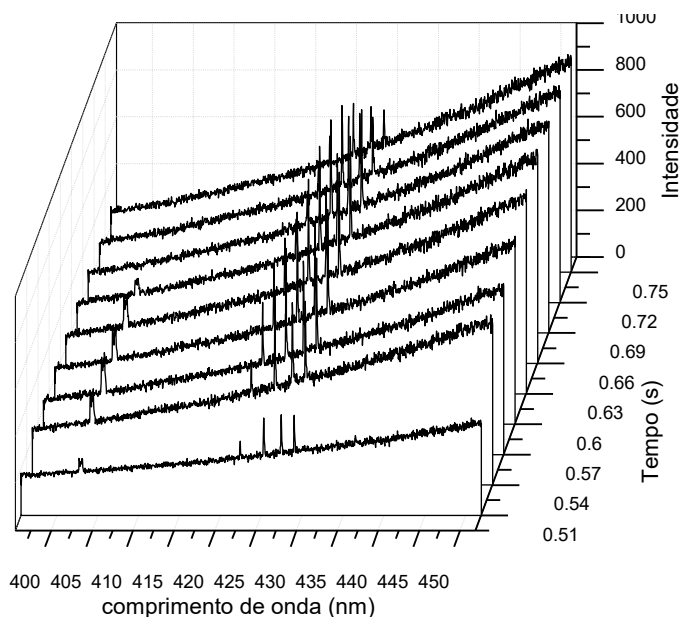
Outro ponto a ser discutido, é que com menor tempo de coleta de sinal, ou seja, o detector coleta sinais de emissão em maior número por um curto intervalo de tempo, obtém-se maior número de espectro de emissão para menores tempos de integração conforme demonstrado na figura 3.9, isso possibilita a maior coleta de dados.

Figura 3.8 - Espectro de emissão para Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para 500 ms.



Fonte: Elaborado pelo autor

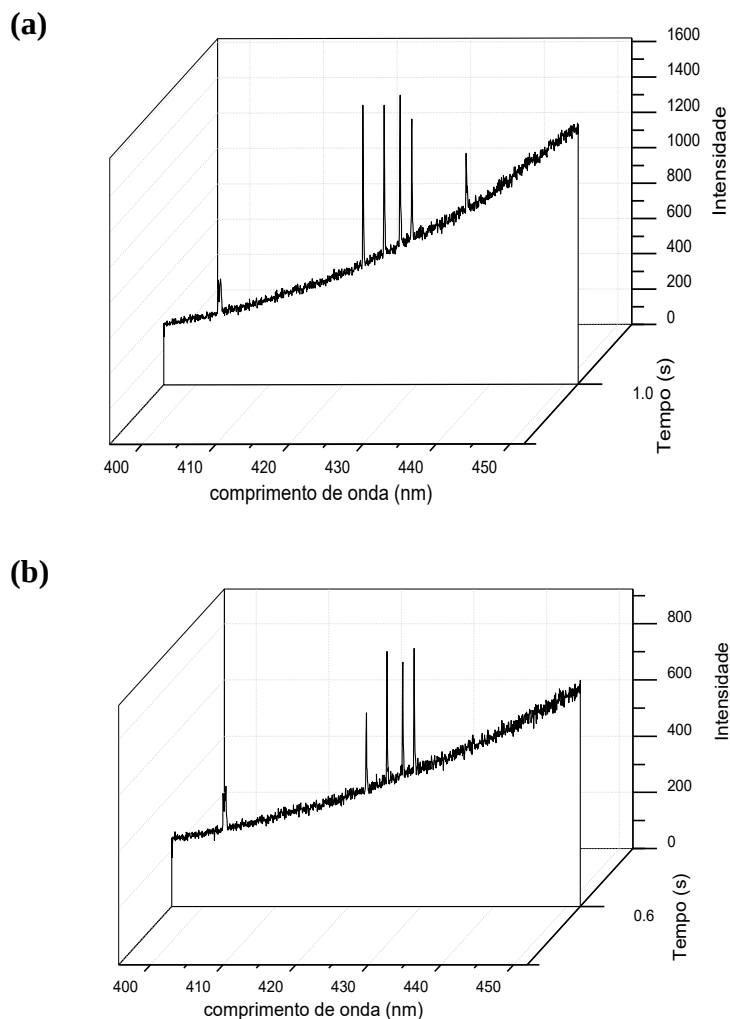
Figura 3.9 - Espectro de emissão para Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para 30 ms



Fonte: Elaborado pelo autor

Nesta avaliação foi possível comprovar que a redução do tempo de coleta de dados aumentou o sinal significativamente possibilitou a quantificação dos analitos em estudo. Utilizando uma integração de sinal de 30 ms gerou-se um total de 35 espectros com 1 segundo de emissão total e para 500 ms obteve-se 8 espectros com 5 segundo de emissão total. Ao avaliar primeiramente integração de 5 segundos possibilitou coletar dados em apenas 2 espectros (tempos entre 0,5 – 1,5 s) para Mn 403,1 nm e e 3 espectros (tempos entre 0,5 – 2,0 s) para emissões de Cr 425,4 nm. Nos espectros de emissão gerados em 1 segundo de emissão total, foi possível coletar dados em 6 espectros (tempos entre 0,51 – 0,66 s) para Mn 403,1 nm e 9 espectros (tempos entre 0,51 – 0,75 s) para emissão de Cr 425,4 nm. Avaliando apenas o tempo com maior pico de emissão para ambos elementos notou-se uma pequena similariedade (Figura 3.10). Porém ao realizar uma curva de calibração, em ambos espectros, apresentaram maior variação do coeficiente linear que deixa as análises imprecisas e com maior erro, devido a obtenção de sinais de emissão de fundo quando comparado a integrações em uma dada faixa de tempo.

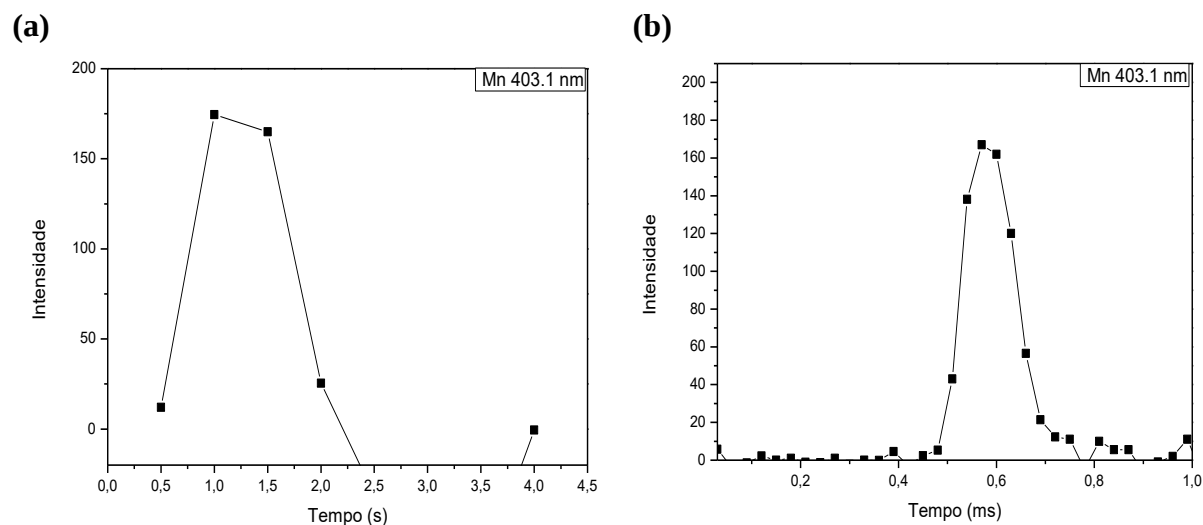
Figura 3.10 - Espectro para o melhor pico de emissão de Mn 403,1 nm e Cr 425,4 nm, em integração de sinal para (a) 500 ms e (b) 30 ms ($n = 3$ e 1 mg L^{-1}).



Fonte: Elaborado pelo autor

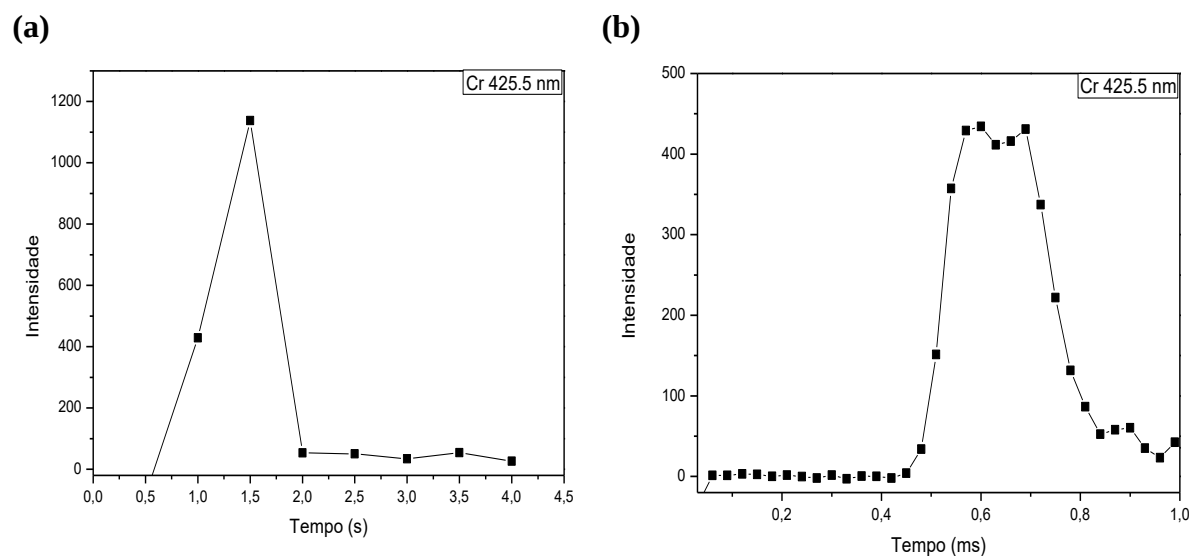
Em todos os pontos de sinais de emissão coletados para Mn 403,1 nm, as emissões geradas com tempo de integração de 30 ms obteve-se um sinal líquido de emissão de 740, enquanto com 500 ms obteve-se sinal líquido de emissão de 244, Figura 3.11. Considerando esta mesma comparação para Cr 425,4 nm constatou-se uma diferença de obtenção de sinal mais expressiva, de 1285 em 500 ms para um total de 3529 em coleta de sinal de emissão utilizando uma integração de sinal de 30 ms e total de 1 segundo de emissão Figura 3.12.

Figura 3.11 - Sinais de emissão em função do tempo de integração de sinal de (a) 500 ms e (b) 30 ms para Mn 403,1 nm. ($n = 3$ e 1 mg L^{-1}).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3.12 - Sinais de emissão em função do tempo de integração de sinal de (a) 500 ms e (b) 30 ms para Cr 425,4 nm. ($n = 3$ e 1 mg L^{-1}).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observou-se que para um maior tempo de integração para Cr, obtem-se um maior pico de emissão, porém com maior número de espectros em menor tempo de integração e maior homogeneidade de sinal resultando em maior sinal líquido. Ainda sobre os sinais de emissão para Cr observou-se a não formação de um pico agudo, este fato pode ser atribuído à formação de nuvem atômica fria por estar combinado com o uso das melhores condições térmicas para Mn como discutido nas seções anteriores e pelo fato de que o WC AES ser um sistema não

isotérmico, fazendo com que reduza a sensibilidade deste elemento. Deste modo, fica evidente a grande vantagem de trabalhar com tempo de integração menores para o WC AES.

A tabela 3.7 demonstra os limites de detecção (LODs) calculado de acordo com as recomendações da IUPAC como 3 vezes o desvio-padrão do sinal em branco (SB) dividido pela inclinação da curva de calibração (m): $LOD = 3 \cdot SB / m$. Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados da mesma maneira, com $n = 15$, $LOQ = 10 \cdot SB / m$ ⁹⁰.

Em trabalhos recentemente publicados, onde foram utilizados modificadores químicos (nitrato de magnésio e cobalto) para aumento da sensibilidade analítica de Mn e Cr, obtiveram limites de detecção 17 vezes menor em suas avaliações para Mn e 10 vezes menor para Cr^{31,32}. Conforme descrito neste estudo comparando o novo tempo de integração em 30 ms e as condições de pirólise e atomização, com as condições normais de operação (500 ms de tempo de integração) obtivemos uma redução de 45 vezes menor para o LOD de Mn, e 150 vezes menor para Cr. Não podemos desconsiderar que em ambos trabalhos citados, que o sistema óptico se difere do utilizado neste trabalho, porém esses dados nos mostram que o WC AES ainda sim, possui um potencial analítico muito grande a ser explorado. Não realizamos teste com a utilização de modificadores químicos porque os resultados obtidos já seriam satisfatórios para continuidade do trabalho.

Tabela 3.7 – Parâmetros analíticos obtidos por WC AES.

	Mn	Cr
Equação da reta (mg L ⁻¹)	$I = 1093,9C + 5,4333$	$I = 4938,3C + 5,0902$
Faixa linear	0,1 – 1,0	0,1 – 1,0
R ²	0,9978	0,9992
LOD (mg L ⁻¹)	0,02	0,004

Fonte: Elaborado pelo autor

3.4.5 Determinação de Mn e Cr em placentônios por MIP OES como método comparativo

Um Agilent 4200 MP-AES foi utilizado para a quantificação de Mn e Cr em placentônios bovinos (figura 3.13). Um tanque líquido de N₂ foi utilizado como fonte de gás para o plasma induzido por micro-ondas. O sistema de introdução de amostra é composto por um amostrador

automático 3 SPS, uma câmara de ação ciclônica de duas passagens e o nebulizador OneNeb inerte.

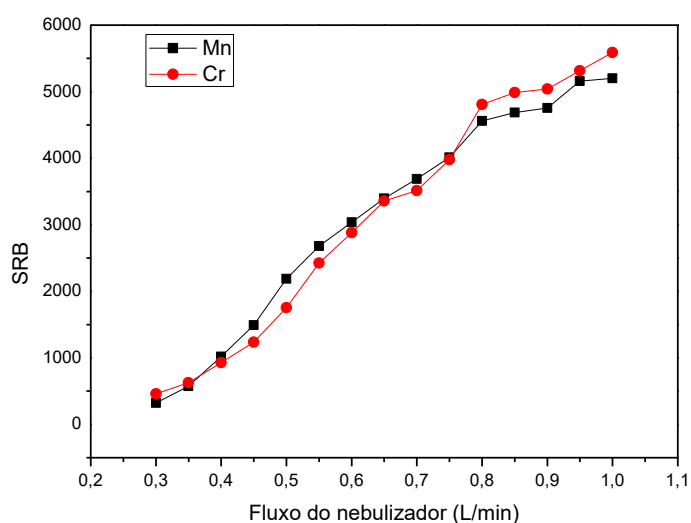
Figura 3.13 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Micro-ondas Agilent MIP OES.



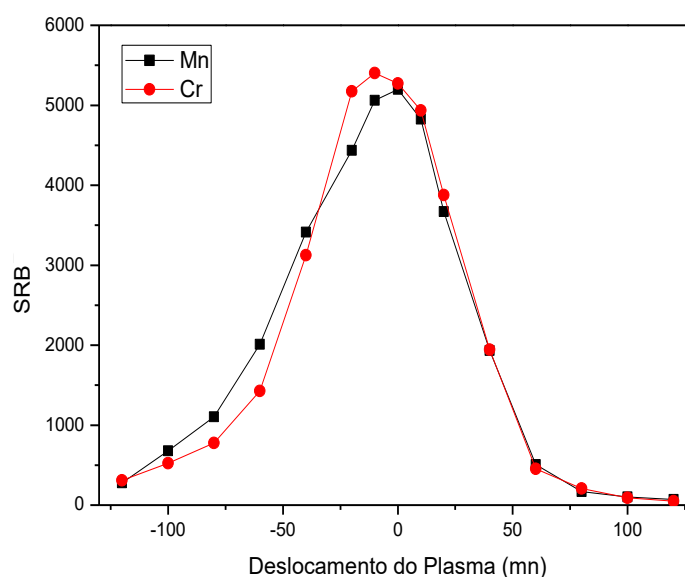
Fonte: Laboratório da Wake Foresty Universty, Winston Salem, NC, USA.

Parâmetros instrumentais tais como a pressão do gás de nebulização e visualização de posição (ou seja, zona de observação analítica) foram otimizados para cada analito separadamente. O software utilizado pelo instrumento é o *MP Expert*, que permite a aplicação da correção de fundo. O fluxo de nebulização (L min^{-1}) foi de 1,0 e a posição de visualização (mm) de -10, utilizada em ambos analitos, Figuras 3.14 e 3.15.

Figura 3.14 - Otimização do fluxo do nebulizador para Mn e Cr obtidos por MIP OES.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3.15 - Otimização da posição de visualização do plasma para Mn e Cr obtidos por MIP OES.

Fonte: Elaborado pelo autor

As condições de operação utilizadas para o MIP OES podem ser observadas na tabela 3.8. Para os limites de detecção, foram adotados os procedimentos de acordo com os referidos nas seções anteriores para ICP OES.

Tabela 3.8 - Condições instrumentais para MIP OES.

Parâmetros instrumentais	Condições de operações
Tempo de integração (s)	3
Velocidade de bomba peristáltica (rpm)	15
Número de replicatas	3
Tempo de estabilização (s)	20
Correção de fundo	Auto
Temperatura do CCD (C °)	-0,3

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a realização das otimizações, foram encontrados os valores de LOD para cada analito. Preparou-se soluções de 10 mL com 1 mg L⁻¹ a partir de padrão estoque monoelementares 1000 mg L⁻¹ de Mg, Mn e Cr (SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, USA) diluídas em água destilada-deionizada Milli-Q (Millipore, EUA). Todas as soluções analíticas foram

preparadas em meio 1% (v v⁻¹) HNO₃ (Fisher Scientific, Canadá). O branco das análises foi obtido a partir de solução de 1 % HNO₃ em água destilada-deionizada. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Desempenho analítico instrumental obtidas por MIP OES.

Elemento/ λ (nm)	Intensidade (branco)	Intensidade (1 mg L⁻¹)	RSDb	BEC	SBR	LOD (mg L⁻¹)
Mn 403,076	26	54541	14	0,0005	2087	0,02
Cr 425,433	21	51593	38	0,0004	2484	0,04

RSDb: RSD do branco

Fonte: Elaborado pelo autor

3.4.6 Determinação de Cr e Mn em placentônios por WC AES

A exatidão foi verificada, comparando os resultados WC AES com aqueles obtidos com o procedimento de MIP OES por método estatístico de teste-t Tabela 3.11. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa, em um nível de confiança de 95% e com t crit. = 4,3027 entre as concentrações de Mn determinado para a amostra de CRM 1577b, obtendo uma recuperação de 101% e um desvio padrão relativo (RSD) de 4,5, tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Resultados obtidos para quantificações de CRM 1577b por WC AES. (Todas as concentrações estão em mg L⁻¹ e n = 3).

λ nm	WC AES	t-test	CRM 1577b	Recp%
403,1	10,65 ±0,49	0,63	10,5 ±1,17	101

Fonte: Elaborado pelo autor

Testes de adição e recuperação foram realizados para Cr, porém como o elemento não está presente na amostra de referência certificada utilizada, esta avaliação ocorreu somente por meio de testes de adição e recuperação tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Testes de adição e recuperação para Cr e Mn determinados por WC AES. (Todas as concentrações estão em mg L⁻¹ e n = 3).

Elemento/ λ (nm)	Amostra	Adicionado	Média	RSD	Recp%
Mn 403,1	A1	0,30	0,29 ±0,02	7,4	98
	A2	0,30	0,28 ±0,02	6,9	94
Cr 425,4	A1	0,30	0,31 ±0,02	6,5	102
	A2	0,30	0,28 ±0,02	7,2	96

Fonte: Elaborado pelo autor

Para a realização dos testes de adição e recuperação utilizou-se soluções de 0,3 mg L⁻¹, esta escolha foi tomada para que fosse realizado testes com concentrações acima dos limites de quantificação de ambos elementos. Desta forma, teríamos menor interferência de sinal ruído mesmo em baixas concentrações para este teste. Duas amostras foram escolhidas para as quantificações. A exatidão obtida para as leituras analíticas realizadas por WC AES foram de ± 0,02 e o desvio padrão relativo variando entre 6,5 e 7,2. As recuperações foram consideráveis ótimas na faixa de 94 a 102% a partir de uma instrumentação aberta e não isotérmica, e que poderia se esperar maiores variações.

A última etapa deste estudo, foi a determinação dos elementos Mn e Cr em amostras de placentônios digeridos e comparar os resultados das análises obtidos por WC AES com os dados obtidos pelo MIP OES. A tabela 3.12 demonstra os resultados das quantificações realizadas para o Mn.

Tabela 3.12 – Resultados obtidos a partir de determinação de Mn por WC AES e MIP OES. (Todas as concentrações estão em mg L⁻¹ e n = 3).

Amostra	WC AES	MIP OES	test-t	Recp. %
A1	2,72 ±0,34	2,96 ±0,01	1,41	92
A2	2,39 ±0,23	2,62 ±0,01	2,02	91
A3	3,14 ±0,19	3,07 ±0,01	0,75	102
A4	3,00 ±0,63	3,02 ±0,04	0,08	99
A5	2,52 ±0,55	2,67 ±0,02	0,56	94
A6	2,09 ±0,50	3,15 ±0,01	0,25	98

Fonte: Elaborado pelo autor

As exatidões obtidas para as leituras analíticas realizadas no WC AES sofreram uma variação entre $\pm 0,23$ e $\pm 0,63$ e não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas quando a aplicação do test – t com um grau de confiança de 95% e $t_{crit.} = 4,3027$. Pode-se então avaliar que as quantificações de Mn com a utilização de um tempo de integração de 30 ms, e condicionamento do atomizador com base na temperatura de pirólise e atomização pode ser facilmente empregada, evitando novas etapas analíticas como necessidade de utilizar agentes modificadores, curva de adição de padrão, micro-extração, pré-concentração para melhor sensibilidade analítica. Ainda sobre as concentrações de Mn, este estudo demonstrou uma média de $2,64 \pm 0,39 \mu\text{g g}^{-1}$ em tecido maternal. Isso demonstra que mesmo coletadas amostras de diferentes animais, não foi apontado grande variação destas concentrações pela genitora. Outros autores, descrevem a relação de concentrações de manganês a partir de amostras de fígado bovino materno e fetal, encontraram concentrações de $3,20 \pm 0,19 \mu\text{g g}^{-1}$ para tecido materno ⁹¹. Avaliando ambos resultados de $2,64 \pm 0,39 \mu\text{g g}^{-1}$ (presebte trabalho) e $3,20 \pm 0,19 \mu\text{g g}^{-1}$ (encontrados na literatura os resultados apontam que existe uma conformidade, e que neste caso as concentrações de Mn encontradas nos placentônios podem estar dentro dos níveis normais de transferências deste micronutriente. As análises para as determinações de Cr foram realizadas para WC AES e MIP OES, porém ambos resultados estão abaixo dos limites de quantificações de cada instrumento analítico. Por este motivo, com a probabilidade de que os resultados não sejam confiáveis, os valores de concentrações para Cr foram descartados e considerado como elemento não presente na amostra.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE Cr E Mn EM PLACENTÔNIOS BOVINOS

Apresentamos neste trabalho um simples procedimento para melhor sensibilidade analítica para determinações de Mn e Cr. A redução do tempo de integração aliado com condicionamento das etapas de pirólise é um procedimento rápido e efetivo para determinações em WC AES, além de possibilitar obtenção de menores limites de detecção e melhor precisão. Uma vantagem do WC AES é a possibilidade de construção de um instrumento espectro analítico em escala menor, isso faz com que a análise possa ser realizada em qualquer local e facilmente transportado.

Para as determinações de Mn e Cr em placentônios, os dados obtidos para os LOD's tanto para Cr e para Mn foram excelentes, porém o WC AES não apresenta sensibilidade suficiente para determinação de Cr em placentônios, isso sugere testes em instrumentos mais sensíveis. Deve-se notar que não foi detectado possíveis interferências espectrais já que os testes de adição e recuperação apresentaram excelentes rendimentos e não foram observados diferença estatísticas para as quantificações de Mn ao aplicar o test-t.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DIRETA DE Cr EM CÁPSULAS MEDICINAIS

4. DETERMINAÇÃO DIRETA DE Cr EM CÁPSULAS MEDICINAIS

4.1 CÁPSULAS DE MEDICAMENTOS

O mercado farmacêutico global tem crescido rapidamente nas últimas décadas. Esta tendência deverá continuar, especialmente devido a fatores como o envelhecimento da população, métodos de diagnóstico avançados, acesso a esses métodos por indivíduos de grupos socioeconômicos de menor poder aquisitivo e iniciativas de muitas organizações em todo o mundo para melhorar a qualidade de vida da população, tornando os tratamentos de saúde eficientes e acessível a toda a população ^{92,93,94}. Um componente importante, mas muitas vezes negligenciado da indústria farmacêutica está associado com cápsulas de medicamentos. Em 2012, 300 bilhões de unidades destes recipientes de medicina foram produzidos somente na China, e em 2014, o mercado global da cápsula representou um mercado de US \$ 1,3 bilhões. Para 2019 espera-se ser gerado um faturamento de US \$ 1,8 bilhões com comercialização deste produto, com perspectivas de um aumento de 7% em apenas cinco anos ⁹⁵.

As cápsulas são recipientes de transporte de medicamentos com composições, formas diferentes e volumes variando entre 0,12 – 1,27 mL para armazenar formulações farmacêuticas em forma de pó ⁹⁶. Os materiais usados para fazer estes recipientes podem ter diferentes consistências, mas deve conter apenas ingredientes inertes na sua composição, o que não é sempre o caso.

Impurezas elementares podem conter componentes tóxicos e se tornar uma fonte de contaminação para pacientes que ingerem medicamentos a base de cápsulas. O rastreamento do produto final, pode indicar a presença de catalisadores metálicos e outros materiais utilizados para produzir estas cápsulas podendo ser quantificados em níveis elevados e então se acumularem no organismo do paciente, causando eventualmente condições potencialmente graves para a saúde ⁹⁷. Neste contexto, a Farmacopéia Americana (USP – United State Pharmacopeia) recentemente tem aumentado suas restrições para as concentrações de consumo máximo para impurezas elementares em formulações de medicamentos. Embora não especificamente direcionados para cápsulas de medicamento, capítulos 232 e 233 regulam de 15 elementos com padrão de limites de concentração (para substâncias de droga e recipientes com dose máxima de $\leq 10 \text{ g dia}^{-1}$) variando de $0,15 \text{ } \mu\text{g dia}^{-1}$ para As inorgânico e $100 \text{ } \mu\text{g dia}^{-1}$ para Cu ^{98,99}.

Em 2012 a Agência Chinesa Reguladora de Alimentos e Drogas (SFDA - State Food and Drug Administration), suspendeu na província costal chinesa de Zhejiang a venda de 13 cápsulas base de medicamentos, por conter níveis excessivos de cromo em sua composição. De acordo com as investigações da origem desta contaminação, concluíram que o uso de gelatina industrial com concentração de cromo elevado era a razão para esta contaminação ¹⁰⁰. A SFDA, fechou fábricas e suspendeu a comercialização de cápsulas, após a descoberta de contaminação de cromo em gelatina industrial em 28 províncias chinesas. Para garantir a qualidade dos medicamentos, a SFDA reestruturou a produção de medicamentos, e exigiu controles mais rígidos sobre a produção de drogas em toda a China ¹⁰¹.

O cromo é um dos elementos incluídos no capítulo da USP 232, principalmente por causa de suas características tóxicas e efeitos cancerígenos quando presente como Cr (VI) ¹⁰². Assim, os procedimentos analíticos capazes de determinar as baixas concentrações de Cr em matrizes complexas tornam-se ferramentas necessárias para monitorar a concentração de Cr em cápsulas, evitando a contaminação do paciente e suas consequências a longo prazo.

Os procedimentos analíticos recomendados pela USP para a determinação de impurezas de oligoelemento em drogas e recipientes (USP 233, 2013) são baseadas na técnica de quantificação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ou detecção por espectrometria de massa (ICP OES ou ICP-MS). Estes são dois dos métodos mais sensíveis, precisos e exatos em espectrometria atômica, com limites de detecção (LOD) nos níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Por outro lado, os custos associados à aquisição, manutenção e execução destes instrumentos podem ser fatores limitantes, especialmente quando estiver interessado em apenas um ou poucos analitos.

A WC AES tem sido utilizada com sucesso para determinar muitos elementos no nível $\mu\text{g L}^{-1}$ em matrizes complexas como solo ^{28, 103}, planta e material biológico (água, lodo de tratamento de esgoto) ^{31,32}, bebidas ²⁹, biodiesel ³⁵ e óleo lubrificante ¹⁰⁴. Embora muitos trabalhos na literatura discutam composição de drogas em produtos farmacêuticos, ainda não foi relacionado com a determinação de impurezas de oligoelemento em cápsulas de medicamento.

4.2 OBJETIVO

Esta etapa descreve um simples procedimento alternativo baseado na digestão ácida com simples diluição para determinar Cr por WC AES, em diferentes concentrações em cápsulas de

medicamentos. Conforme demonstrado neste trabalho, os resultados WC AES serão comparáveis aos valores obtidos por ICP OES para verificação da exatidão do método proposto.

4.3 MATERIAL E MÉTODO

4.3.1 Reagentes e soluções

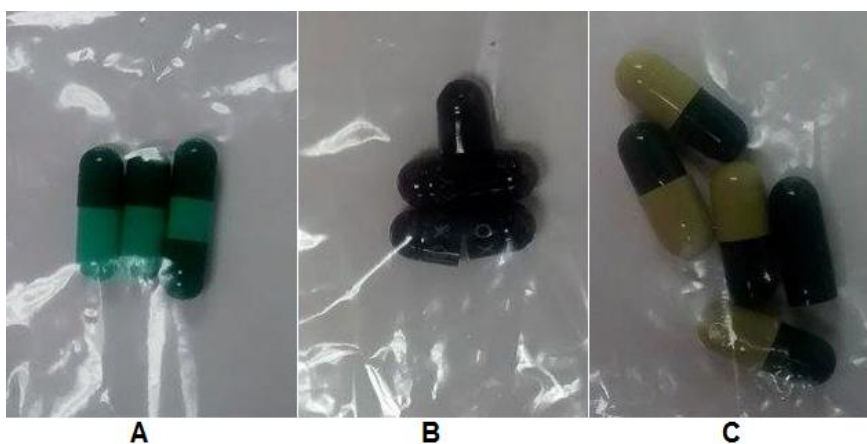
Todas as soluções foram preparadas com água destilada-deionizada (18 M Ω cm, Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA). Para a preparação da curva de calibração, empregamos simples diluição da solução-padrão de Cr 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, USA). Para a digestão das amostras foram aplicadas soluções de peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ (Acros, Morris Plains, NJ, Estados Unidos da América) e ácido nítrico (Fischer, Pittsburgh, PA, Estados Unidos da América). As amostras de cápsulas medicinais foram recebidas da China para análise sem medicamentos em seu interior. Isto facilitou o desenvolvimento do procedimento de análise, pois não foi necessário eliminar qualquer interferência de farmacológicas contida.

O filamento de tungstênio é proveniente de uma lâmpada comercial de microscópio (Osram Xenophot 64633 HXL, Pullach, Germany), com 15 V e 150 W e aplicação de uma corrente contínua, descrito no capítulo anterior. Cerca de 25 μL de amostras são inseridos na cela de atomização (Ace Glass, product no. D131703, Vineland, New Jersey, USA) para as etapas de secagem, pirólise e atomização³³. A emissão gerada é coletada por espectrômetro modelo Czerny-turner (MonSpec 18, Scientific Measurement Systems Inc., Grand Junction, CO, USA) com tempo de integração de 30 ms, acoplado a um detector CCD (Spec-10, Princeton Instruments, Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) operando em - 40 °C o que permite excelente resolução espectral¹⁰⁵. Um Prodigy High Dispersion ICP OES (Teledyne Leeman Labs, Hudson, NH, EUA) foi usado para verificar a exatidão do procedimento utilizando simples teste de ANOVA como parâmetro. O método de calibração externo foi utilizado em todas as determinações.

4.3.2 Determinação de Cr em cápsulas de medicamentos por WC AES

A técnica WC AES permite a digestão de amostras *in situ*, que permite maior velocidade e agilidade na determinação de elementos químicos¹⁰⁶. A possibilidade de preparar amostras sem a necessidade de longas etapas, permite menores erros relacionados a preparação das amostras. Neste trabalho, três tipos de cápsulas são classificados como A, B e C (Figura 4.1), e foram submetidos a digestão e a subsequente medida analítica, figura 4.1. Cerca de 0,4 g da amostra da cápsula de medicamentos vazia foi determinados com precisão usando uma balança eletrônica (Mettler AE 100, Hightstown, NJ, USA). As amostra foram então misturadas com 1,0 mL HNO₃ concentrado (Fisher) e 3,0 mL de H₂O₂ (Acros) por 5 min usando um misturador de efeito vortex (Fisher). Finalmente, as soluções foram diluídas a 50,0 mL com água destilada-deionizada antes da determinação de Cr ou pelo WC AES ou ICP OES Figura 4.2.

Figura 4.1 - Cápsulas medicinais utilizadas para as quantificações de Cr.



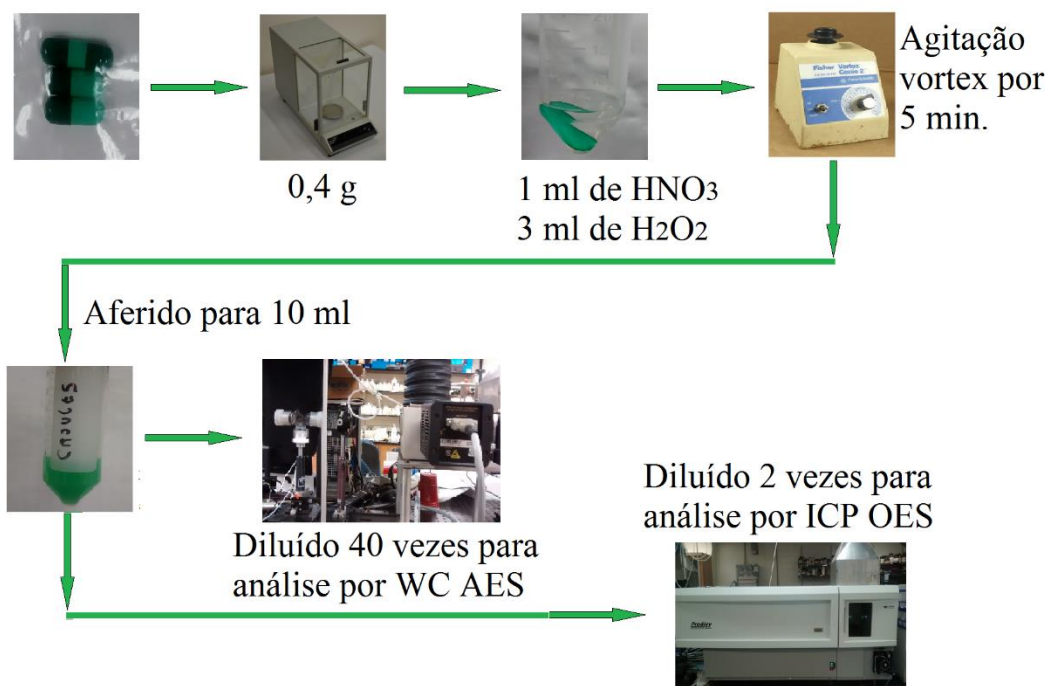
Fonte: Elaborado pelo autor

Alíquotas de 25 μ L das soluções analíticas foram introduzidas diretamente para o atomizador usando uma micropipeta automática (Eppendorf 10 - 100 μ L, Brinkman, Westbury, NY, EUA). O ciclo de aquecimento foi então aplicado para evaporar o solvente, pirolisar a amostra, excitar e atomizar o analito que serão descritos nas seções seguintes.

Um multímetro digital (RadioShack, Fort Worth, Texas, EUA) foi utilizado para monitorar o potencial do atomizador para estimar sua temperatura de superfície durante cada etapa do ciclo de aquecimento^{33, 107}. Um conversor analógico-digital (medição vantagem MiniLab 1008, medição de computação, Norton, MA, EUA) e um programa lab-writte visual basic 6.0 (Microsoft, Seattle, WA, Estados Unidos) também foram usados para controlar o tempo e a corrente constante fornecida pela fonte de alimentação de estado sólido (Vicor).

Um Prodigy High Dispersion ICP OES (Teledyne Leeman Labs, Hudson, NH, EUA) foi utilizado para verificar a exatidão do procedimento. Todas as determinações de Cr por ICP OES foram realizadas em vista axial de plasma, após a otimização de potência de rádio frequência, taxa de fluxo de gás de plasma, pressão do nebulizador e bomba de introdução de amostra. Utilizou o mesmo procedimento de digestão para WC AES, porém diluído duas vezes. A linha de emissão Cr 267,716 nm e um tempo de integração 15 s foram usados em todas as determinações do ICP OES ²².

Figura 4.2 - Procedimento adotado para determinação de Cr em cápsulas de medicamentos.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Otimização de WC AES para certificação de Cr em cápsulas medicinais

Para a determinação dos parâmetros referentes as etapas de secagem, pirólise e atomização para as leituras analíticas em WC AES, foram os mesmos adotados no capítulo anterior.

4.4.2 Otimização de ICP OES para certificação de Cr em cápsulas medicinais

Primeiramente foi desenvolvido um método para determinação de Cr em cápsulas de medicamentos comparativo por ICP OES. Para isso, um ICP OES Prodigy High Dispersion (Teledyne Leeman Labs, EUA) foi utilizado para exatidão das análises de Cr em cápsulas medicinais figura 4.3.

Figura 4.3 - Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente - ICP OES, utilizados para a verificação da precisão analítica de Cr.



Fonte: Elaborado pelo autor, Laboratório da Wake Foresty Universyt, Winston Salem, NC, USA.

Para otimização das condições de robustez do plasma (tabela 4.1), utilizou-se uma solução de 10 mL de Mg a 5 mg L⁻¹ e avaliou-se o método das razões de Mg II (linha iônica) e Mg I (linha atômica). O termo robustez é proposto para representar a eficiência de transferência de energia e resposta do plasma para alterações das condições de excitação, atomização e composição química da solução aspirada para análises em ICPs. A relação MgII/MgI é um critério prático para avaliar o desempenho analítico e robustez do plasma ¹⁰⁸.

Para a avaliação das condições de robustez do plasma e limites de detecção em ICP OES, soluções analíticas foram utilizadas a partir de padrão estoque monoelementares 1000 mg L⁻¹ de Mg e Cr (High Purity Standards, EUA) diluídas em água destilada-deionizada Milli-Q (Millipore, EUA). Todas as soluções analíticas foram preparadas em meio 1% (v v⁻¹) HNO₃ (Fisher Scientific, Canadá). Foram preparadas soluções de 10 mL com 1 mg L⁻¹ de Cr em 1 % HNO₃. O branco das análises foi obtido a partir de solução de 1 % HNO₃ em água destilada-deionizada. Essas soluções foram utilizadas para se determinar os valores de BEC (concentração equivalente ao fundo) e SBR (razão sinal analítico / sinal de fundo), e com isso verificar qual é a melhor vazão de gases necessária para remover de maneira eficiente os

interferentes. Depois de realizada as otimizações, foram obtidos os valores de LOD para cada analito e realizados ensaios de adição e recuperação nas melhores condições encontradas.

Tabela 4.1 - Condições operacionais do ICP OES para determinação da robustez e limite de detecção do plasma.

	Condição do Plasma		S/N	RSD
Parâmetros	1	2	28	4
Potência de RF (W)	1300	1100	24	4
Vazão da amostra (L min ⁻¹)	0,6	1,0	36	3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	18		25	4
Tempo de integração (s)	15		18	6
Tempo de estabilização (s)	60		16	5
Pressão de nebulização (psi)	30		14	7
Modo de visão	Axial		13	8

Fonte: Elaborado pelo autor

Para o cálculo do LOD, utilizou-se o conceito de BEC, empregando as seguintes equações 10, 11 e 12 ¹⁰⁹:

$$SBR = \frac{I_{rs} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (\text{eq. 10})$$

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad (\text{eq. 11})$$

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times RSD}{100} \quad (\text{eq. 12})$$

onde C_{sr} é a concentração da solução de referência multielementar; SBR é a razão sinal analítico / sinal de fundo; I_{rs} e I_{branco} são as intensidades de emissão da solução de referência e do branco analítico, respectivamente, e RSD é o desvio padrão relativo para 10 medidas da solução do branco analítico.

Os coeficientes obtidos foram multiplicados por 1.8 para corrigir as intensidades de resposta, tendo em conta a utilização de uma grade Echelle em um detector de estado sólido

^{108,109}. A tabela 4.2 demonstra os resultados obtidos do plasma para esta avaliação e as linhas de emissão de cada elemento em estudo.

Tabela 4.2 - Avaliação da robustez do plasma e da sensibilidade através da variação da potência de rádio frequência e vazão da amostra.

Configuração		Intensidade		
Vazão da amostra (L min ⁻¹)	Potência de rádio frequência (kW)	Mg I 285,208 nm	Mg II 280,265 nm	Mg II / Mg I
0,6	1,3	1168560	5156309	8
1	1,1	1075836	3630024	6

Fonte: Elaborado pelo autor

A verificação da robustez do plasma é um indicativo das condições de excitação e atomização no ICP. Em geral os valores de LTE (excitação termodinâmica local) são maiores que 8, e pode ser observado que a relação Mg (II) / Mg (I), demonstrou melhor rendimento utilizando a condição 2 para a tocha de ICP OES. Este resultado pode ser descrito, para esta condição, devido a maior temperatura obtida pelo plasma. A temperatura mais elevada é necessária para a emissão de linhas iônicas, isto pode melhor ser compreendido quando comparamos os sinais de Mg II (linha iônica) e Mg I (linha atômica) conforme tabela 4.2. Conforme a equação de Boltzmann, quanto maior for a energia de transição, maior será a temperatura necessária para produzir espécies excitadas. Com menor vazão líquida e maior rádio frequência aplicada (maior energia para excitação) obtém-se maior robustez do plasma, que favorece a maior intensidade de emissão, porque para espectrometria de emissão atômica, quanto maior for a temperatura mais elevadas as intensidades de sinal.

O aumento da concentração de carbono pode produzir emissões não-específicas e deteriorar o poder de detecção, devido ao aumento da radiação de fundo (BEC). Esta desvantagem pode ser mais pronunciada para a condição 2. A tabela 4.3 demonstra a variação dos valores de BEC para as linhas de Cr II (206,149 nm) and Cr II (267,716 nm). Para Cr 206,149 nm, que possui menor comprimento de onda em relação ao Cr 267,716 nm não foi possível obtenção de sinais de emissão para solução de 1 mg L⁻¹, mesmo utilizando a condição robusta do plasma. Esta ausência de sinais pode ser atribuída a necessidades de maior energia para excitação, alto sinal de fundo resultante de emissão de outros compostos orgânicos e interferências espectrais. Entretanto, para Cr 267,716 nm, obtém-se maior qualidade de sinais de emissão, indicando menores interferências para esta linha de emissão. Obteve-se menor

BEC, maior SBR e melhor sensibilidade com $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ quando utilizou-se a condição robusta do plasma em comparação $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ quando utilizou o plasma mais frio.

Tabela 4.3 - Avaliação de condição de plasma robusto e não robusto para leituras de Cr.

	Intensidade (Branco)	Intensidade (1 ppm)	RSDb	BEC	SBR
Cr 206,149 nm ^a	845	c	12,4	c	c
Cr 206,149 nm ^b	1280	c	15,3	c	c
Cr 267,716 nm ^a	274	260864	78,5	0,001	950
Cr 267,716 nm ^b	488	269329	53,9	0,002	551

^a Robusto; ^b Não Robusto; ^c não obtido sinal analítico

Fonte: Elaborado pelo autor

Este simples procedimento pode demonstrar que a utilização de um plasma robusto possibilita alcançar melhor emissão para linhas iônicas. Outro fator positivo é que ele permite o controle de temperatura, o qual controla a eliminação da matriz, sendo que a energia de excitação pode ser controlável usando baixo fluxo de nebulização e maior potência de rádio frequência obtendo melhor performance de sinais de emissão.

4.4.3 Determinação de Cr em capsulas medicinais por WC AES

Uma das principais vantagens do uso de métodos baseados na atomização eletrotérmica é a possibilidade de executar a amostra diretamente sobre o atomizador. Tubos de grafite e filamentos de tungstênio têm sido usados para decompor a matriz da amostra e melhorar a precisão e exatidão nas determinações por ICP-MS ¹¹⁰, ICP OES ¹¹¹ e GF AAS ¹¹².

A decomposição de amostra por WC AES também tem sido aplicado com êxito, e nesta parte do trabalho será apresentado pela primeira vez a determinação de Cr em cápsulas de medicamentos utilizando WC AES (para determinação direta). Conforme descrito nas seções anteriores (Capítulo 3) o solvente é vaporizado, sem variação de temperatura (ou seja, 373 K), conforme condicionamento para a etapa 1. Na segunda etapa, a matriz da amostra é decomposta

e observa-se um pouco de fumaça devido a pirólise de matriz orgânica^{29,113}. Temperaturas de pirólise superiores ou inferiores a 1300 K resultaram em baixa sensibilidade, provavelmente devido aos efeitos de matriz ou perda de analito, respectivamente. Na etapa pré-atomização (etapa 3), o atomizador retorna à temperatura ambiente, que contribui para os perfis de emissão mais simétricos. Finalmente, uma alta corrente é aplicada à bobina para permitir a atomização e a excitação de Cr (etapa 4). O tempo de preparação da amostra foi de 10 min, combinada com o tempo de decomposição da matriz descrita nesta seção e as etapas de atomização e emissão fazem com que todo procedimento tenha um tempo de 12 min para aquisição de sinal analítico. A linha de emissão para Cr foi em 425,4 nm utilizada em todas as determinações em WC AES. A faixa linear dinâmica foi de 3-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com um $R^2 = 0,9992$. Isso corresponde a um procedimento com LOD de 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, e com um limite de quantificação de 1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Assim, supondo que uma pessoa possa ingerir apenas uma cápsula por dia de medicamento com uma massa média de 0,0889 g, o procedimento descrito permite a quantificação em um nível 28 vezes inferior a recomendação máxima de ingestão de Cr pela USP que é de 2,5 $\mu\text{g dia}^{-1}$.

A exatidão do procedimento foi avaliada comparando os resultados obtidos por WC AES com valores obtidos por ICP OES para 3 amostras de cápsulas de medicamento mostrando diferentes concentrações aparentes. Como pode ser visto na tabela 4.4, não foi observado diferença estatística significativa entre WC AES e ICP OES comparando os resultados com a aplicação de um teste ANOVA fator único a nível de confiança de 95% ($p > 0,05$). Usando os dados da tabela 4.4, a precisão do procedimento (% RSD) pode ser calculado como 6,5; 7,4 e 5,2% para as amostras A, B e C, respectivamente. Esses valores podem ser considerados adequados para um sistema aberto, com operação manual e não-isotérmica.

Tabela 4.4 – Concentração de Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$) em cápsulas de medicamentos determinadas por WC AES e ICP OES.

Valores são médias de ± 1 desvio padrão ($n = 3$).

Amostra	WC AES	ICP OES	p*
A	2,76 $\pm$ 0,18	2,51 $\pm$ 0,07	0,08
B	33,38 $\pm$ 2,46	36,66 $\pm$ 0,60	0,09
C	132,78 $\pm$ 6,86	138,21 $\pm$ 0,64	0,24

* p-valor para de ANOVA fator único com $\alpha = 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados mostram uma contaminação significativa de Cr na amostra C. A partir desses resultados e considerando uma massa média para as cápsulas analisadas de 0,0889 g, um

paciente estaria ingerindo uma concentração de Cr aproximadamente 5 vezes maior que o valor máximo estabelecido pela USP a partir da ingestão diária de apenas uma cápsula do tipo C. Apesar de apresentar uma menor concentração, a amostra B também excederia as recomendações da USP, com a ingestão de 2,97 μg de Cr por dia, considerando o mesmo cenário. Em outra análise, um paciente tomando as cápsulas de medicamento da amostra A precisaria ingerir pelo menos 11 comprimidos por dia para exceder as diretrizes USP.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE Cr EM CÁPSULAS MEDICICINAIS

Para determinações de Cr em cápsulas de medicamentos, a técnica de WC AES demonstrou ser uma alternativa simples e eficaz para determinar os níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr. Suas principais vantagens são o baixo consumo de amostra, simplicidade de operação do instrumento, sem geração de resíduos e requisitos de baixo consumo de energia (ou seja, até mesmo uma bateria de carro 12 V pode ser usado como fonte de alimentação em determinações de WC AES). Combinando a preparação das amostras e a decomposição da matriz sobre o filamento descritos neste trabalho, foi possível determinar níveis de Cr em cápsulas de medicamento em menos de 12 min. Considerando a portabilidade potencial WC AES, todo o procedimento pode ser aplicado no campo, para tempos de resposta mais rápidos em situações de emergência. Os resultados deste estudo demonstram a urgência para monitoramento de oligoelementos em produtos farmacêuticos e a importância dos novos regulamentos da USP. Neste contexto, WC AES pode ser uma alternativa simples e eficiente para determinações rápidas e precisas.

CAPÍTULO 5

**ANÁLISE DE ÓLEO FÚSEL PURO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO
ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS**

5. ANÁLISE DE ÓLEO FÚSEL PURO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS

5.1 ÓLEO FÚSEL

A produção industrial de açúcar e etanol gera uma grande quantidade de resíduos. Alguns dos sub-produtos, tais como torta de filtro e vinhaça, são utilizados como fertilizantes, adicionados diretamente ao solo para novos ciclos de produção de cana de açúcar. Este processo de grande escala também gera pequenas quantidades de compostos de misturas complexas que podem ser comercializados como matéria-prima para outras indústrias (por exemplo, indústria de cosméticos), ou misturado com outros produtos para utilização como fertilizante ¹¹⁴. Esta mistura é conhecida como óleo de fúsel, que é um combinado de compostos de elevada massa molecular, em particular álcoois superiores (por exemplo, álcool butílico, isoamílico e isopropílico), que são produzidos como uma fração minoritária do processo de fermentação e destilação ^{114,115}. O óleo fúsel pode ser usado como um agente de fixação de perfumes, cosméticos e outros produtos, e como solvente para preparar aditivos aromatizantes artificiais na indústria alimentícia ^{116,117}. Este produto também demonstrou potencial aplicação como herbicida, quando misturado com o glifosato ¹¹⁸.

No Brasil, para a produção de etanol combustível hidratado (EHC), indústrias realizaram a diluição de 1 L de óleo fúsel em 4000 L de etanol para se obter uma concentração de etanol com cerca de 96,3 % v v⁻¹, e assim, usar o EHC como biocombustível para automóveis. A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por meio da Resolução 19, determinou os níveis máximos tolerados de impurezas como Cu em EHC de 0,07 mg kg⁻¹ ¹¹⁹. A determinação da concentração de cobre é realizada pelo método de absorção atômica, através do uso da Norma Brasileira 11331 (NBR 11331) ¹²⁰. No entanto, para os elementos potencialmente tóxicos, tais como, Cd, Cr, Pb e Ni ou outros elementos, não são controladas em EHC e/ou em óleo de fúsel por qualquer outra agência de controle.

A maioria dos estudos envolvendo óleo fúsel, focam em separar, purificar e identificar seus componentes principais, utilizando técnicas cromatográficas ^{114,115,121}. Considerando suas aplicações recentes como fertilizantes e na indústria de alimentos e cosméticos, esta mistura pode representar uma importante fonte de contaminação com elementos potencialmente tóxicos. No entanto, nenhum procedimento analítico descrevendo determinação de impurezas

em óleo fúsel pôde ser encontrada na literatura. Um grande desafio para a análise de soluções alcoólicas está associado a efeitos de matriz potenciais que podem comprometer a precisão e exatidão para muitas técnicas instrumentais ^{122,123}. Recentemente estudos utilizando eletrodo com nanotubos de carbono para determinar, simultaneamente, Cu e Fe em etanol combustível foi bem avaliado ¹²⁴. Embora simples e eficiente, este processo é limitado a alguns elementos. A espectrometria de emissão óptica como plasma indutivamente acoplado - ICP OES e espectrometria de massa ICP-MS são técnicas de detecção mais eficientes para análise de elementos traço ¹²⁵. Contudo, a introdução direta de solventes orgânicos pode extinguir facilmente o plasma impedido as quantificações ¹²⁶. Assim, uma etapa de preparação de amostra envolvendo as microemulsões ou digestão assistida por micro-ondas é normalmente exigida antes de qualquer determinação por ICPs ¹²⁷. Outras alternativas incluem a utilização de uma câmara de nebulização arrefecida para reduzir a carga do solvente, e a introdução de gás de oxigênio para o plasma queimar a matriz orgânica ¹²⁸.

O MIP OES foi usada com sucesso para a análise de elementos traço de soluções de amostra com solvente orgânico. Elemento como, silício foi determinado em diesel e biodiesel após simples diluição em etanol, com recuperações na faixa de 80 - 103 % e limites de detecção – LOD de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁴⁶. Neste caso, o ar foi introduzido no N₂-MIP para minimizar os efeitos da matriz e evitar a deposição de resíduos de carbono na tocha. Embora apresentando temperaturas mais baixas (5000 K) quando comparado com ICP, o N₂-MIP é significativamente mais tolerante ao solvente orgânico ¹¹. As soluções preparadas em etanol puro, por exemplo, podem ser diretamente introduzidas em um MIP OES sem comprometer a estabilidade do plasma. Devido a este aspecto, bem como os seus custos relativamente baixos de operação e boa sensibilidade, o MIP OES foi recentemente utilizado em muitas outras aplicações ¹²⁹.

5.2 OBJETIVO

Desenvolver um método para determinar impurezas potencialmente tóxicas (Cd, Cr, Cu, Ni e Pb) em óleo fúsel por MIP OES empregando a análise direta de amostras ou a análise de amostras diluídas em 1-propanol.

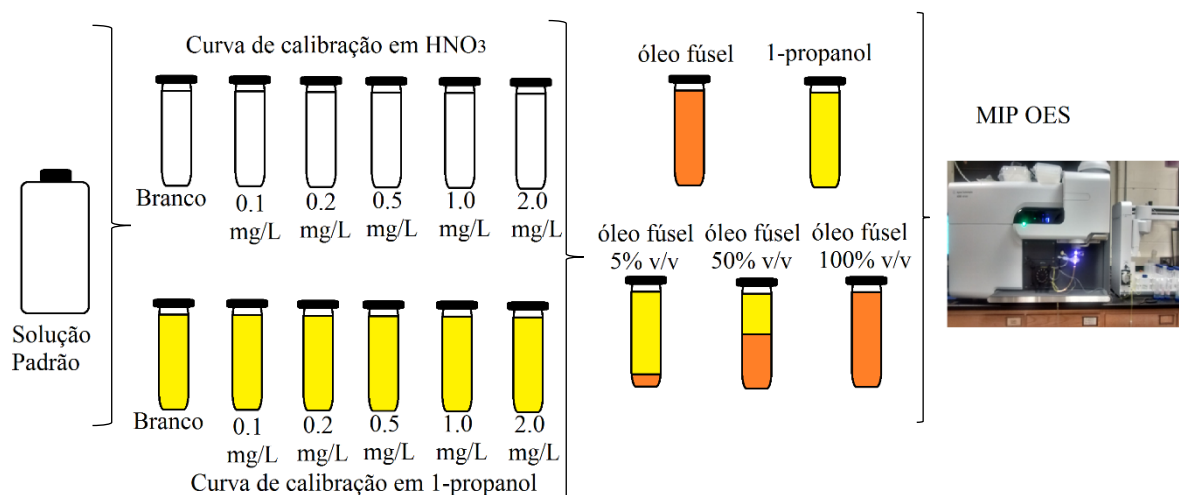
5.3 MATERIAL E MÉTODO

5.3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas usando ácido nítrico (Fisher, Pittsburgh, PA, USA), água destilada-deionizada (18 M Ω cm, Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA), e 1-propanol (GJ Chemicals, Newark, NJ, USA). Soluções estoque de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb (1000 mg L⁻¹, SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, USA) foram utilizados para preparar as soluções padrões de referência utilizadas para calibrações e testes de adição e recuperação. O método de calibração externa foi utilizado em todas as determinações. Soluções da curva de calibração preparada em HNO₃ 1% v v⁻¹ e 1-propanol foram utilizados para avaliar os efeitos de matriz e solvente. Uma solução contendo 5 mg L⁻¹ de cada analito em HNO₃ 1% v v⁻¹ foi utilizada para otimização do fluxo de nebulização e posição de plasma.

Uma amostra de óleo fúsel foi obtida da unidade produtora de etanol na cidade de Pereira Barreto, SP, Brasil. Três níveis de diluição foram utilizados para avaliar o efeito da matriz de amostra e precisão. As determinações foram realizadas com amostras não diluídas ou com soluções que contendo 5 ou 50 % v v⁻¹ de óleo fúsel em 1-propanol. O resumo do procedimento experimental adotado pode ser visualizado na Figura 5.1.

Figura 5.1 - Procedimento adotado para determinação Cd, Cr, Cu e Pb em óleo fúsel.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.1 Instrumentação

Todas as determinações foram efetuadas utilizando um instrumento MIP OES (4200 MP-AES, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) conectado a um tanque de N₂ líquido. O sistema de introdução da amostra empregado era constituído por um amostrador automático SPS 3, uma câmara ciclônica de passo duplo e um nebulizador inerte OneNeb. O fluxo de nebulização e posição de visualização (isto é, zona de observação analítica do plasma) foi otimizado para cada analito usando o software do instrumento (MP Expert). A correção de fundo foi realizada automaticamente usando o recurso de autoconfiguração do software MP Expert. O módulo de controle de gás externo – EGCM foi utilizado para injetar ar no plasma e, assim, minimizar as emissões de fundo e evitar a deposição de carbono na tocha e janelas do sistema pré-óptico. Os níveis de fluxo de ar injetado utilizados foram distintos para cada analito.

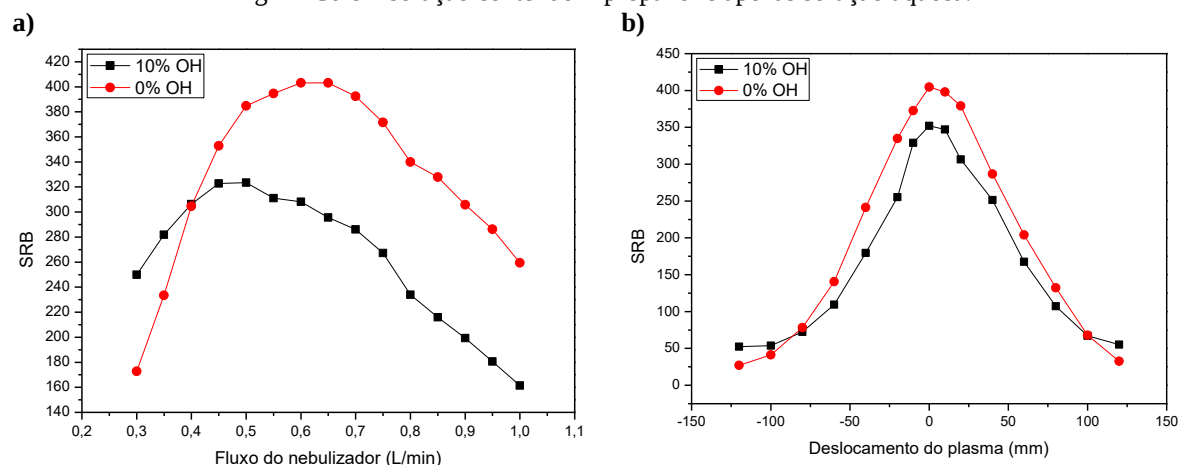
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Otimização de MIP OES para determinações de Cd, Cr, Cu e Pb em óleo fúsel

A nebulização de solventes orgânicos é mais eficiente devido a sua menor tensão superficial (com relação às soluções aquosas) fazendo com que uma maior quantidade do solvente chegue ao plasma. Maiores quantidades de solvente alcançando o plasma requerem mais energia para o processo de vaporização. Portanto, há menos energia disponível para os processos de atomização e excitação e isso irá impactar significativamente na sensibilidade, precisão e faixa linear dinâmica^{129,130}. As Figuras 5.2 a 5.6 demonstram os efeitos da vazão do gás de nebulização e posição de visualização do plasma em relação ao SBR para os analitos na presença de solução orgânica e aquosa.

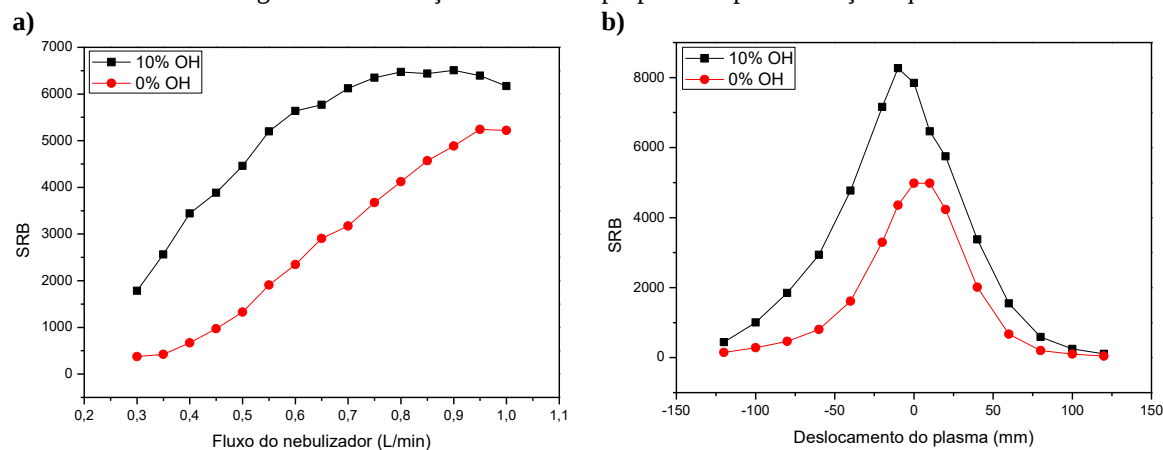
Elementos como Cu, Cr, Ni e Pb apresentaram maiores valores de SBR em soluções de 10% v v⁻¹ de 1-propanol enquanto o Cd teve os valores de SBR reduzidos em soluções de 10% v v⁻¹ de 1-propanol quando comparados com solução de 1% v v⁻¹ de HNO₃. Com isso, a análise química desses elementos sem prévio tratamento da amostra (para minimizar os efeitos de matriz) levaria a erros.

Figura 5.2 – (a) Otimização do fluxo do nebulizador do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L⁻¹ Cd em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.



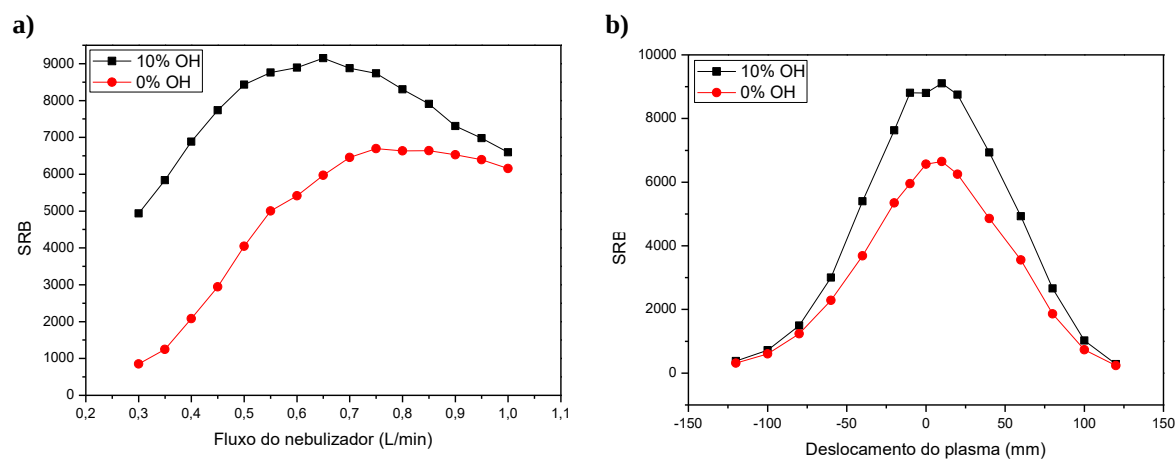
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3 - (a) Otimização do fluxo do nebulizador do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L⁻¹ Cr em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.



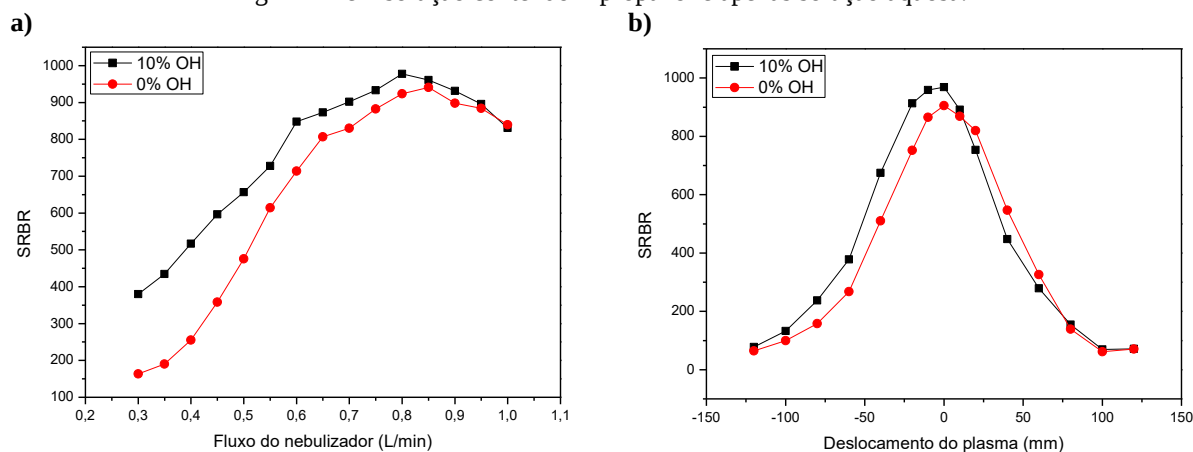
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.4 - (a) Otimização do fluxo do nebulizador do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L⁻¹ Cu em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.



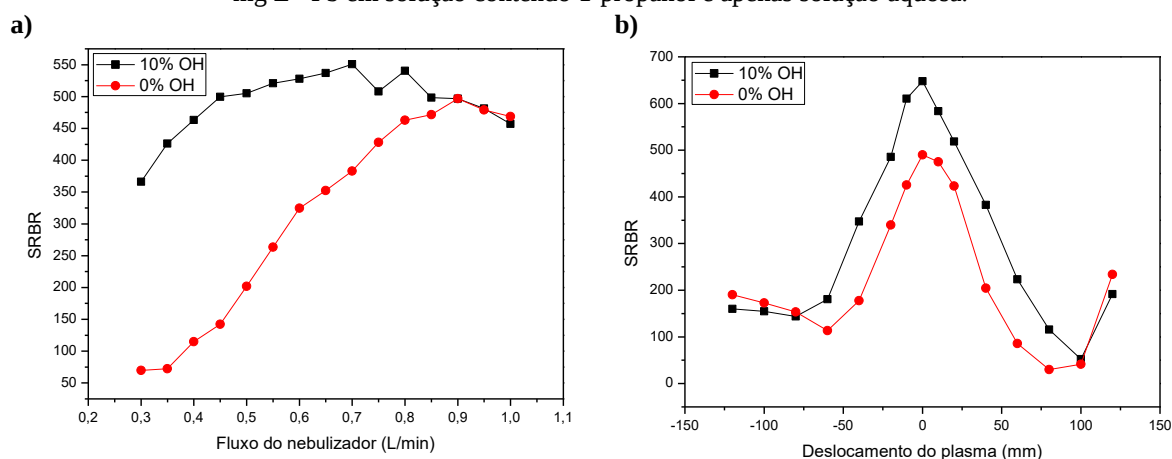
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.5 - (a) Otimização do fluxo do nebulizador do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L⁻¹ Ni em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.



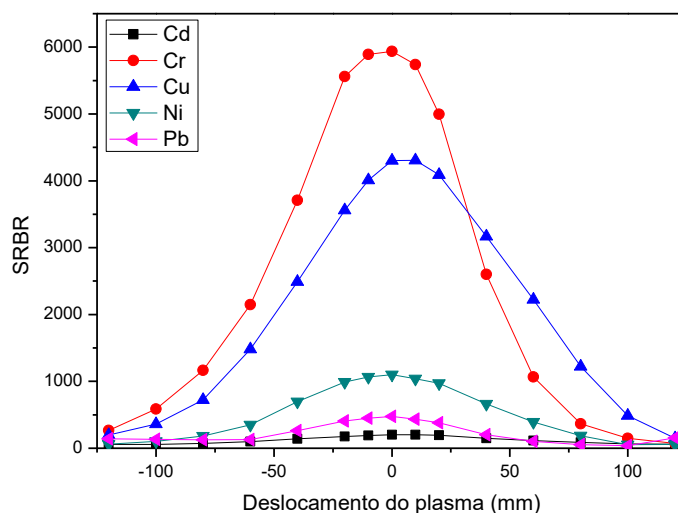
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.6 - (a) Otimização do fluxo do nebulizador do plasma e (b) posição de visualização do plasma para 5 mg L⁻¹ Pb em solução contendo 1-propanol e apenas solução aquosa.

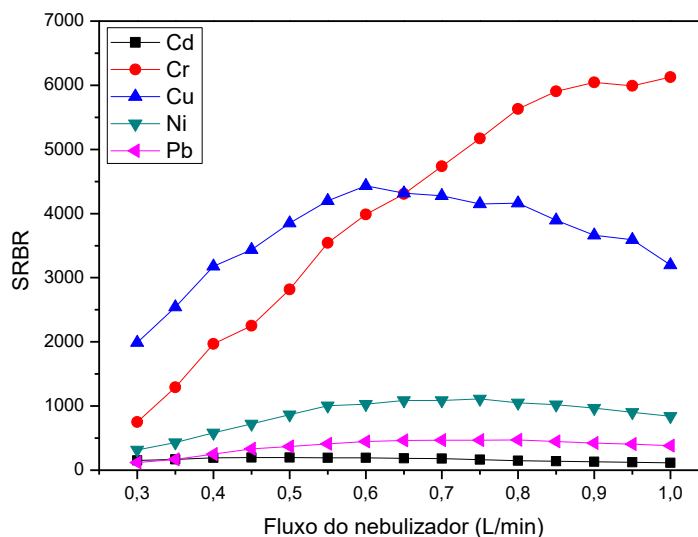


Fonte: Elaborado pelo autor

Por outro lado, se o solvente orgânico é queimado através da introdução de gás oxigênio ou ar no atomizador, por meio de uma reação de combustão exotérmica, a temperatura do plasma irá aumentar. Neste caso, ambos os efeitos, isto é, vazão do gás de nebulização otimizada e temperaturas mais elevadas, afetará positivamente a sensibilidade¹³¹. A combinação desses efeitos no MIP OES pode ser vista nas Figuras 5.7 e 5.8, que mostra a vazão do gás de nebulização e posição de visualização do plasma otimizados utilizando o EGCM para soluções de 10% v v⁻¹ de 1-propanol. Os resultados obtidos desta otimização se aproximam dos valores otimizados para soluções aquosas (solução de 1% v v⁻¹ de HNO₃), demonstrando a eficiência da inserção de ar para queimar compostos orgânicos presentes na amostra e melhorar a sensibilidade analítica.

Figura 5.7 - Otimização da posição de visualização do plasma utilizando EGCM

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.8 - Otimização do fluxo do nebulizador utilizando EGCM

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a otimização do fluxo de nebulização e posição de visualização do plasma, avaliamos as melhores condições para cada analito. A tabela 5.1 demonstra as condições de trabalho utilizadas para o MIP OES neste estudo, nesta otimização, escolhemos EGCM médio para Cd e tempo de integração em 10 segundos para Cd por possuir sensibilidade inferior aos demais elementos. Esperamos que esta modificação possa aumentar o rendimento analítico.

Tabela 5.1 – Condições de operação do MIP OES para as determinações de impurezas em óleo fúsel.

Analito	λ (nm)	Tempo de integração (s)	Fluxo de Nebulização (L min⁻¹)	Posição de visualização	EGCM nível de fluxo de ar
Cd	228,802	10	0,5	10	Médio
Cr	425,433	3	0,9	-10	Alto
Cu	324,754	3	0,65	10	Alto
Ni	352,454	3	0,8	0	Alto
Pb	405,781	3	0,7	0	Alto
Analito	Bomba peristáltica (rpm)	Número de replicatas	Tempo de estabilização (s)	Correção de fundo	
Todos	15	3	20	Auto	

Fonte: Elaborado pelo autor

As curvas de calibração empregando as condições otimizadas foram construídas para demonstrar as variações na sensibilidade decorrente do tipo de solvente empregado na análise (Tabela 5.2). As inclinações de curvas de calibração para soluções preparadas em 1-propanol foram significativamente maiores do que as obtidas com soluções de mesma concentração em meio aquoso preparadas em HNO₃ 1 % v v⁻¹.

Tabela 5.2 – Efeito do solvente na sensibilidade do MIP OES.

Analito	Inclinação da curva de calibração	
	1-propanol	HNO₃ 1 % v v⁻¹
Cd	13832	5733
Cr	90246	33059
Cu	158998	58172
Ni	24236	7212
Pb	7180	3001

Fonte: Elaborado pelo autor

Assim, as determinações empregando a calibração externa com soluções aquosas apresentaram pouca exatidão ao analisar amostras à base de solventes orgânicos como pode ser visto na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Recuperações após adição de 1,00 mg L⁻¹ de cada analito em HNO₃ 1% v v⁻¹ (n = 3).

Analito	Concentração obtida (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Cd	2,20 ± 0,26	220	12
Cr	1,95 ± 0,01	195	0.4
Cu	2,00 ± 0,05	200	2.0
Ni	2,72 ± 0,01	272	0.5
Pb	3,00 ± 0,03	300	0.9

Fonte: Elaborado pelo autor

Testes com curvas de calibração correspondente ao solvente resultaram em exatidões adequadas. As amostras foram submetidas a teste de adição e recuperação, diluídas em 1-propanol, para concentrações finais de 1,0 mg L⁻¹ para cada analito, com diferente diluição de matriz. A tabela 5.4 demonstra os resultados para procedimento adotado, com concentrações de matriz de amostra de 5, 50 ou 100 % v v⁻¹.

As três diluições demonstradas foram utilizadas para avaliar o efeito de matriz de amostra na exatidão e precisão. Nesta avaliação, todas as soluções de calibração foram preparadas em 1-propanol para minimizar efeitos de solventes. Como pode ser visto (tabela 5.4), recuperações adequadas foram obtidas em todos os casos. Estes resultados podem estar diretamente relacionados com a introdução de ar para o plasma usando o EGCM. Além de evitar a deposição de carbono em ambos, tocha e a janela de interface ótica, o fluxo de ar também pode ter contribuído para minimizar os efeitos de matriz por decompor eficientemente qualquer espécie de potencial interferência. Na verdade, observaram-se sinais de fundo mais baixos para todos os analitos em níveis de EGCM médio ou alto. Testes de adição e recuperação para 1,00 mg L⁻¹ obtiveram recuperações na faixa de 90 - 114 % e precisão representados como % RSD, com valores entre 0,09 e 2 % para maioria dos elementos. Cádmio apresentou resultados menos sensível (122 % recuperação) e precisos (16 %) entre os analitos avaliados, o que é provavelmente devido a interferências de fundo mais intensos no seu comprimento de onda de emissão atômica relativamente baixo (228,802 nm). No entanto, recuperações adequadas para Cd foram obtidas para ambas soluções de 5 % v v⁻¹ de óleo fúsel e amostra de óleo puro (isto é, 91 e 109 %, respectivamente).

Tabela 5.4 - Recuperações após adição de 1,00 mg L⁻¹ de cada analito em 1-propanol. (n = 3).

Analito	Matriz diluída (% v v⁻¹)	Concentração obtida (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Cd	5	0,91 ± 0,13	91	14
	50	1,22 ± 0,20	122	16
	100	1,09 ± 0,15	109	14
Cr	5	1,100 ± 0,001	110	0,09
	50	0,980 ± 0,01	98	1,0
	100	0,920 ± 0,001	92	0,1
Cu	5	1,01 ± 0,01	101	1,0
	50	1,14 ± 0,02	114	2,0
	100	0,97 ± 0,01	97	1,0
Ni	5	1,080 ± 0,001	108	0,09
	50	1,010 ± 0,02	101	2,0
	100	0,900 ± 0,01	90	1,1
Pb	5	0,93 ± 0,01	93	1,0
	50	1,07 ± 0,02	107	2,0
	100	1,01 ± 0,01	101	1,0

Fonte: Elaborado pelo autor

Uma nova avaliação sem a utilização do EGCM, por testes de recuperação foi realizada após a otimização da taxa de fluxo de nebulização (L min⁻¹) e visualização de posição do plasma em solução contendo 5 mg L⁻¹ para cada elemento em solução de 5 % v v⁻¹ em 1-propanol são demonstrados na tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Teste de adição e recuperação cm (1,00 mg L⁻¹) otimizados a partir de solução solução de 5 % v v⁻¹ em 1-propanol. (n = 3).

Analito	Matriz diluída (% v v⁻¹)	Concentração obtida (mg L⁻¹)	Recuperação %	% RSD
Cd	5%	1,02 ± 0,01	102	0,57
Cr	5%	0,66 ± 0,001	66	0,34
Cu	5%	0,90 ± 0,01	90	0,68
Ni	5%	--	--	--
Pb	5%	0,14 ± 0,05	14	32,78

Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados evidenciam melhores resultados para preparo de curva de calibração em 1-propanol com utilização de EGCM. Neste caso, comprova que mesmo sendo necessário a otimização das condições instrumentais em 1% HNO₃ (devido ao softwer da instrumentação),

uma curva de calibração compatível com matriz e utilização de EGCM pode-se obter melhor rendimento analítico.

5.4.1 Determinação de elementos potencialmente tóxicos por MIP OES

Os limites de detecção LOD para o MIP OES foram determinados em solução de 1-propanol e calculados de acordo com as recomendações da IUPAC descritos nas seções anteriores. Os resultados para Cd, Cr, Cu, Ni e Pb são demonstrados na tabela 5.6. É interessante notar que, apesar de proporcionar uma sensibilidade de 2 a 3 menor (Tabela 5.2), o uso de 1-propanol resultou em maiores LOD. Os valores apresentados na tabela 24 são 2 - 9 vezes maior do que os valores de LODs calculados em solução de 1% HNO₃ (isto é, 0,005; 0,001; 0,01; 0,003 e 0,007 mg L⁻¹ for Cd, Cr, Cu, Ni e Pb, respectivamente). Este efeito também foi observado para outros solventes orgânicos em ICP OES ¹³⁰. Pode estar relacionado aos sinais de fundo maiores, que resultam em determinações com maior ruído e, conseqüentemente, maior LODs. Outro fator que contribui é o aumento no ruído flicker ¹³² causado pela introdução de taxas de fluxo de ar em relativamente alta para o plasma.

Tabela 5.6 – Concentrações de Cd, Cr, Cu, Ni e Pb determinados em óleo fúsel por MIP OES. Os limites de detecção e limites de quantificação para cada analito foram obtidos em solução de 1-propanol. (n = 3).

Analito	λ (nm)	Concentração (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Cd	228,802	< LOD	0,03	0,09
Cr	425,433	< LOD	0,009	0,03
Cu	324,754	0,14 ± 0,01	0,01	0,04
Ni	352,454	< LOD	0,007	0,02
Pb	405,781	0,05 ± 0,01	0,04	0,13

Fonte: Elaborado pelo autor

A amostra de óleo fúsel não diluída foi analisada utilizando o método de calibração externa e soluções padrão de referência preparadas em 1-propanol. As concentrações de Cd, Cr e Ni foram abaixo de seus respectivos LOD, mas verificou-se um valor relativamente elevado para Cu (0,14 mg L⁻¹) estando acima dos valores mínimos estabelecidos pela NBR 1133. Para a concentração de Pb, o resultado pode ser considerado semi-quantitativo, uma vez que os valores obtidos estão entre LOD e LOQ (Tabela 5.6).

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE Cd, Cr, Cu, Ni E Pb EM ÓLEO FÚSEL

A concentração de Cu encontrada está relacionada com o processo de destilação do etanol^{133,134}. Óleo fúsel usado como fertilizante, pode ser uma provável fonte de contaminação já que Cu pode acumular-se no solo. No entanto, são necessários estudos mais específicos, investigando este efeito potencial de acumulação.

O procedimento utilizado para o MIP OES descrito neste trabalho é uma abordagem simples e eficaz para a análise de elemento traço em óleo fúsel. Não foi necessário preparação da amostra, o que permite maiores potências de quantificação, maior rendimento de amostra e uma alternativa dos princípios de química verde para os métodos tradicionais a base de solventes orgânicos. Uma amostra não diluída pode ser introduzida diretamente para o plasma sem quaisquer problemas relacionados como por exemplo, plasma extinguir, deposição de carbono sobre a tocha ou sistema ótico. O EGCM não requer nenhuma fonte de gás inerte e permite determinações sensíveis, exatas e precisas. A utilização de N₂ líquido como gás em MIP é uma alternativa econômica e estável quando comparados com a utilização de Ar em ICP. O MIP OES pode também ser executado usando um gerador de N₂ e um compressor de ar comum, o que reduz ainda mais os custos de funcionamento.

CAPÍTULO 6

**ANÁLISE POR DILUIÇÃO DE PADRÃO – SDA EM BEBIDAS POR
ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA
INDUZIDO POR MICRO-ONDAS: SDA-MIP OES**

6. ANÁLISE DE DILUIÇÃO PADRÃO – SDA EM BEBIDAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS: SDA-MIP OES

6.1 CALIBRAÇÃO ANALÍTICA

A calibração é um dos passos mais importantes em qualquer procedimento analítico ¹³⁵. Inicialmente, as soluções de calibração devem ser preparadas no mesmo meio em que a amostra foi preparada para evitar efeitos de matriz, mas isto nem sempre é possível. Em calibração com padrão externo - EC supõe-se que os efeitos de matriz são desprezíveis, e as soluções de calibração são preparadas com solvente da amostra. Esta estratégia pode ser utilizada com sucesso na maioria das aplicações, mas é altamente impreciso em determinações envolvendo matrizes complexas.

Quando a causa principal de baixa precisão está relacionada com transporte e nebulização de amostra, a melhor alternativa para EC é o método tradicional de padrão interno (IS) ^{136,137}. Pela adição de uma espécie química (IS) nas soluções de calibração, que se comporta da mesma forma para o analito e amostras, e em seguida constrói-se a curva de calibração usando a relação de sinal do analito por sinal de IS, com isso, podem-se minimizar significativamente as interferências relacionadas com introdução de amostra. A principal limitação do método IS é a sua incapacidade para corrigir efeitos de matriz. Outra dificuldade está relacionada com a escolha da espécie ideal, o que não é uma tarefa fácil.

Para determinações envolvendo efeitos matriz severo, o método de adições padrão (SA) é a estratégia mais comum para assegurar a precisão adequada ¹³⁸. Usando uma fração fixa de volume da amostra como solvente, é preparado um conjunto de soluções de calibração e a concentração do analito na amostra é determinada pela interceptação de eixo x de curva de calibração. Apesar de seu desempenho superior para determinações de matriz complexa, a SA é demorada e trabalhosa, pois é necessária uma curva de calibração para cada amostra diferente. Além disso, a correção das flutuações de sinal analítico, causadas por fatores externos, como variações de temperatura de plasma, alterações no volume de amostra, ou flutuações no transporte da amostra e nebulização, é ineficiente.

Análise de diluição padrão (SDA) é um estratégia de calibração singular que pode melhorar simultaneamente a exatidão e a taxa de transferência de amostra ¹³⁹. Ele combina SA

com o IS, e assim pode corrigir ambos os efeitos de matriz e flutuações devido a fatores externos do sinal. Diferente das estratégias de calibrações tradicionais, somente duas soluções são necessárias para calibração: a primeira solução contém 50 % da amostra e 50 % de uma solução de padrão de concentração conhecida juntamente com um padrão interno (solução 1), e a outra solução contém 50 % da amostra e 50 % de solução *branco da amostra* (solução 2). Durante a calibração, a solução 2 é adicionado ao tubo contendo a solução 1 e uma curva de diluição é produzida ao longo do tempo de análise. Neste caso, a quantidade de amostra nunca muda (ambas as soluções 1 e 2 contêm em cada 50% da amostra), somente analitos e padrão interno (apenas presente na solução 1) são diluídos. Isto permite a melhor exatidão devido a um efeito de matriz correspondente para solução de padrão interno e solução padrão. A curva de calibração é elaborada plotando a razão do sinal do analito por IS no eixo y versus a concentração recíproca do IS no eixo x (S_A/S_{IS} vs. $1/C_{IS}$). As equações 13 a 16, demonstram o tratamento matemático usado para calcular a concentração do analito na amostra.

$$\frac{S_A}{S_{IS}} = \frac{m_A C_A}{m_{IS} C_{IS}} = \frac{m_A (C_A^a + C_A^s)}{m_{IS} C_{IS}} \quad (\text{eq. 13})$$

O sinal analítico (S_A) decorrentes da amostra (a) e a padrão (s), enquanto o sinal IS (S_{IS}) vem somente do padrão interno. Estes sinais são relacionados com as respectivas concentrações, as sensibilidades da curva de calibração (m): $S_A = m_A C_A$ e $S_{IS} = m_{IS} C_{IS}$. Tomando a proporção de sinal analito para IS, S_A/S_{IS} .

Se considerarmos S_A/S_{IS} como a variável dependente (eixo y) e $1/C_{IS}$ como a variável independente (eixo x), a inclinação e o coeficiente linear desta curva de calibração será dada por:

$$\text{inclinação} = \frac{m_A C_A^a}{m_{IS}} \quad (\text{eq. 14})$$

$$\text{coef. linear} = \frac{m_A C_A^s}{m_{IS} C_{IS}^s} \quad (\text{eq. 15})$$

Rearranjando a inclinação e o coeficiente linear, a concentração do analito na amostra (C_A^a) pode ser determinada a partir da multiplicação entre as razões dos parâmetros da curva e as concentrações de analito e padrão interno, como demonstrado:

$$C_A^a = \frac{\text{inclinação}}{\text{coeficiente linear}} \frac{C_A^s}{C_{IS}} \quad (\text{eq. 16})$$

A utilização desta nova estratégia de calibração proporciona determinados benefícios como a possibilidade da correção de efeitos de matriz, implicações de transporte e flutuações, a concentração do analito na amostra é obtida de modo preciso utilizando os parâmetros da curva de calibração, o coeficiente linear é obtido com as concentrações de padrão interno fazendo com que os sinais analíticos fáceis de medir e com menor desvio, o preparo das soluções é facilitado pois são originários de uma mesma solução estoque contendo os padrões analítico e interno. Neste estudo avaliou-se a aplicação do SDA em diferentes amostras de bebidas por estarem, em termos analíticos, sobre efeitos de diferentes matrizes.

6.2 OBJETIVO

Visando uma alternativa rápida e precisa para calibrações analíticas mesmo em condições de severos efeitos de matriz, avaliou-se um novo método de calibração para uma instrumentação óptica sequencial, porém não simultânea como a maioria das demais instrumentações ópticas.

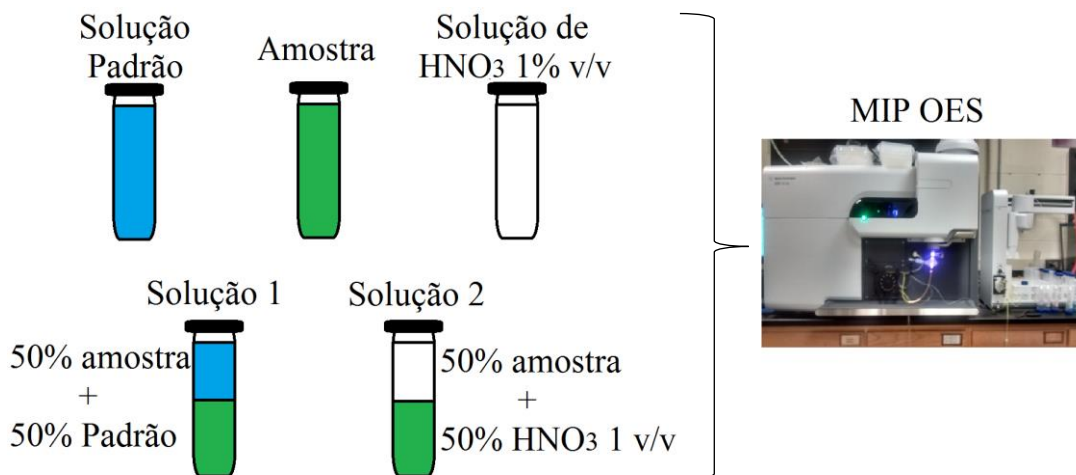
6.3 MATERIAL E MÉTODO

6.3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas usando água destilada-deionizada (18 M Ω cm, Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA) e ácido nítrico (Fisher, Pittsburgh, PA, USA). Soluções padrões monoelementar contendo 1000 mg L⁻¹ de Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Y e Zn (SPEX CertPrep, Metuchen, NJ, USA) foram usadas para preparar soluções de referência padrão e

realizar testes de adição e recuperação. A Figura 6.1 ilustra os procedimentos para determinações de Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em bebidas por SDA.

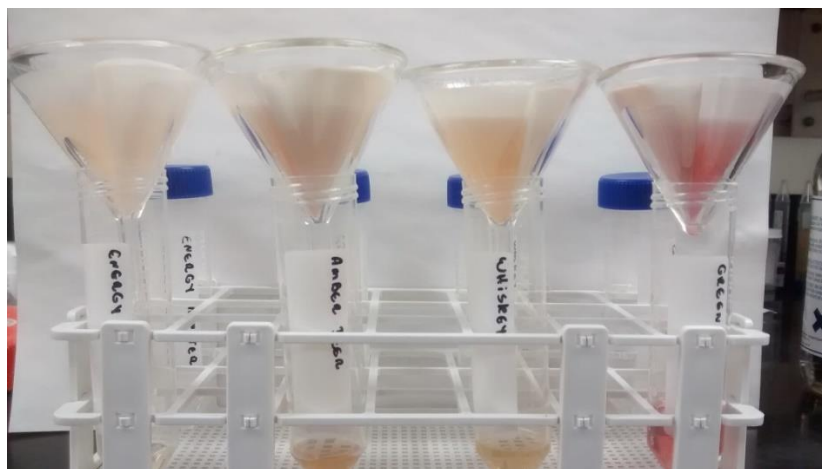
Figura 6.1 - Procedimento adotado para as determinações de Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em bebidas por SDA



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras de café, chá, energético, cerveja (4,4 % v v⁻¹ etanol), whisky (40 % v v⁻¹ etanol) e cachaça (40 % v v⁻¹ etanol) foram filtradas com filtro de papel de diâmetro de poros 0,45 µm e diluídos 4 vezes com HNO₃ 1 % v v⁻¹. Amostras de café e chá foram preparadas em laboratório com água da torneira comum antes da filtração e diluição, Figuras 6.2 e 6.3.

Figura 6.2 - Filtragem das amostras de café, chá, energético, cerveja (4,4 % v v⁻¹ etanol), whisky (40 % v v⁻¹ etanol) e cachaça (40 % v v⁻¹ etanol).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6.3 - Amostras de café, chá, energético, cerveja (4,4 % v v⁻¹ etanol), whisky (40 % v v⁻¹ etanol) e cachaça (40 % v v⁻¹ etanol), após a diluição 1:1 v v⁻¹ em solução de HNO₃.



Fonte: Elaborado pelo autor

As soluções para determinações via SDA foram preparadas a partir de 2,5 mL de amostra + 2,5 mL solução padrão de Al, Cr, Cu, Mn e Y a 2 mg L⁻¹ (grupo 1); Co, Fe, Ni, Zn a 5 mg L⁻¹ e Y a 2 mg L⁻¹ (grupo 2), em seguida foram adicionadas a tubos de ensaios do 4200 MIP OES (Solução 1) Figura 6.4. A Solução 2 foi preparada pela mistura de 2,5 mL de amostra + 2,5 mL de HNO₃ 1 % v v⁻¹ em outro tubo. Durante a análise, Solução 2 foi inserida no mesmo tubo contendo uma solução para produzir a curva de calibração SDA. Testes de adição e recuperação foram realizados em todas as determinações. As estratégias de calibrações tradicionais de EC, IS e SA foram aplicados para as mesmas amostras e testes, em seguida comparando os resultados de com o SDA.

Figura 6.4 - SDA foram preparadas a partir de 2,5 mL de amostra + 2,5 mL solução padrão (Al, Cr, Cu, Mn e Y 2 mg L⁻¹ (grupo 1); Co, Fe, Ni, Zn 5 mg L⁻¹ e Y, 2 mg L⁻¹ (grupo 2)) adicionados a tubos de ensaios do 4200 MIP OES



Fonte: Elaborado pelo autor

6.3.2 Instrumentação

Todas as determinações foram realizadas usando um Agilent 4200 MIP OES. Não foi requerido tratamento da amostra, apenas diluição em solução de água deionizada destilada a 1% de HNO_3 . Para comparação, todas as amostras foram analisadas pelos métodos tradicionais de EC, IS e SA usando o modo de aquisição normal do instrumento. Neste caso, solução multielementar em meio aquoso ou etanol foram usadas para determinar as melhores condições para cada analito e do padrão interno (ítrio). Procedimentos de condicionamento para fluxo de nebulização (L min^{-1}) e posição de visualização (mm) foram realizadas conforme descrito em procedimentos anteriores para o MIP OES.

6.3.3 Medidas instrumentais empregando SDA

Neste estudo, combinou-se a SDA com a estabilidade do plasma do Agilent 4200 MP AES para a determinação direta de oito elementos em amostras de bebidas. O plasma de N_2 (14.534 eV) tem alta tolerância para cargas de solventes, e neste caso, favoreceu para que não houvesse a necessidade nenhuma de preparação de amostra, a não ser uma simples diluição com HNO_3 1 % v/v para amostras contendo até 40 % v/v etanol. Além disso, a eficiência da correção de matriz pelo método SDA, permitiu alta exatidão, precisão e rendimento da amostra, mesmo a temperaturas relativamente baixas no plasma induzida por microondas (5000 K).

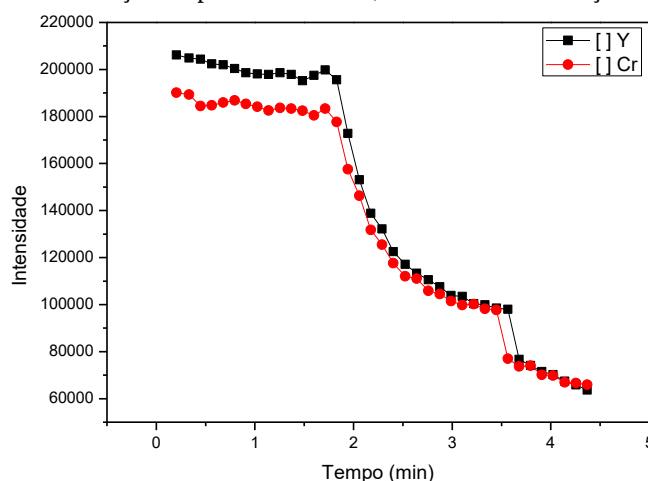
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Otimização de MIP OES para determinações de Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em bebidas por EC, IC, AS e SDA

O 4200 MP-AES é controlada pelo software MP Exper. Em aplicações comuns, um recurso de otimização neste software é usado para definir as melhores condições de vazão de nebulização e posição de visualização do plasma para cada analito. Os parâmetros pré-avaliados foram velocidade de bomba peristáltica, posição de visualização do plasma e fluxo de nebulização. Para o SDA é muito importante que os sinais de cada analito seja sincronizado os sinais do padrão interno.

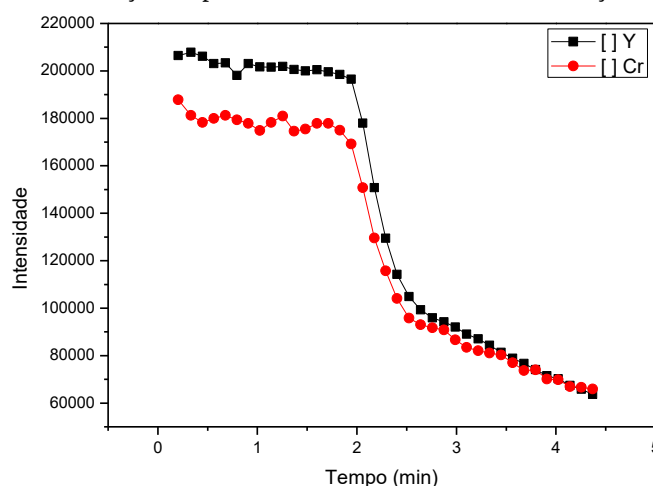
Neste estudo, utilizou-se ítrio como padrão interno por estar bem descrito na literatura ¹⁴⁰. Para as determinações por SDA foram realizadas utilizando esse recurso de otimização, que permite a aquisição de sinal contínuo em tempo real para diversos analitos (um dos principais requisitos para aplicação do SDA). Os sinais analíticos sequencialmente gravados, então foram exportados para processamento de dados e avaliadas as melhores condições de obtenção de dados, Figuras 6.5 a 6.7. Conforme demonstrado, menor velocidade de bomba peristáltica, interfere diretamente no sincronismo dos sinais de emissão, como por exemplo, obtem-se Cr e Y demonstrados na Figura 6.5 e 6.6, e para menor velocidade de bomba peristáltica obtem-se melhor sincronismo nos sinais de emissão demonstrado na Figura 6.7.

Figura 6.5 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 25 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm, e fluxo de nebulização 0,75 ml L⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor

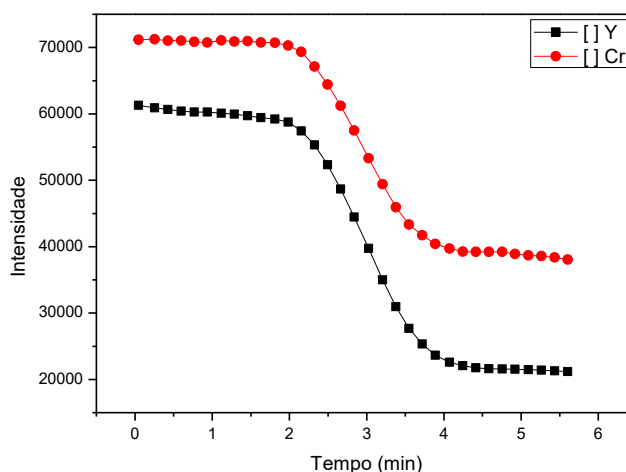
Figura 6.6 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 15 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm, e fluxo de nebulização 0,75 ml L⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor

O mesmo valor de fluxo de nebulização e posição de visualização do plasma foi usado para todos os elementos em todas as determinações de SDA: $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ e 0 mm , respectivamente. Estes valores foram escolhidos para este estudo por serem valores médios das otimizações de cada analito escolhido e a melhor condição para o padrão interno utilizado.

Figura 6.7 - Otimização para obtenção de sinal para Y e Cr com velocidade de bomba peristáltica de 7 rpm, posição de visualização do plasma de 0 mm , e fluxo de nebulização $0,75 \text{ mL L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor

As tabelas 6.1 e 6.2 mostram as condições instrumentais e configurações usadas para determinações de Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em amostras de bebidas por IC, EC, AS e SDA. Conforme utilizamos amostras com teores alcoólicos e conforme efeitos demonstrados nas seções anteriores, foram utilizados otimização em soluções de $20\% \text{ v v}^{-1}$ de cachaça.

Tabela 6.1 – Condições de operação para o Agilent 4200 MP-AES para análises de bebidas

Parâmetros instrumentais	Condição de operação
Tempo de integração (s)	3a, 1b
Bomba peristáltica (rpm)	15a, 7b
Número de replicatas	3a, 1b
Tempo de integração (s)	15a, 0b
Background correction	Auto

^a Utilizados para determinações por EC, IS e AS. ^b Utilizados para determinações por SDA

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6.2 – Fluxo de nebulização posição de visualização do plasma usados para determinações em EC, IS e SA.

Elemento	λ (nm)	Fluxo de nebulização (L min ⁻¹)		Posição de visualização (mm)	
		Aquoso	Etanólico	Aquoso	Etanólico
Al	396,152	1	1	-10	0
Co	340,512	0,8	0,85	-10	-10
Cr	425,433	1	1	-10	-10
Cu	324,754	0,8	0,8	-10	0
Fe	371,993	0,9	0,3	-10	-50
Mn	403,076	0,95	1	-20	0
Ni	341,476	0,8	0,85	0	0
Y	371,029	0,75	0,75	0	0
Zn	213,857	0,5	0,55	10	10

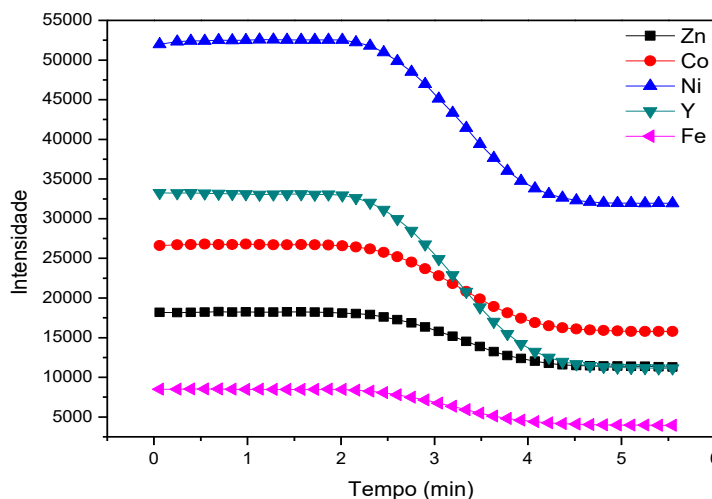
Fonte: Elaborado pelo autor

6.4.2 Determinação de Al, Cr, Co, Fe, Mn e Zn em bebidas empregando EC, IC, AS e SDA por MIP OES

O SDA se inicia, a partir de adição da solução 1 que é introduzida primeiramente no plasma, conseqüentemente os sinais analíticos atingem uma intensidade máxima. Após a estabilização de 2 minutos, adiciona-se a solução 2, e conseqüente produz uma diluição inicial uma inclinação de sinal negativo, que é usada para calibração de SDA Figura 6.8.

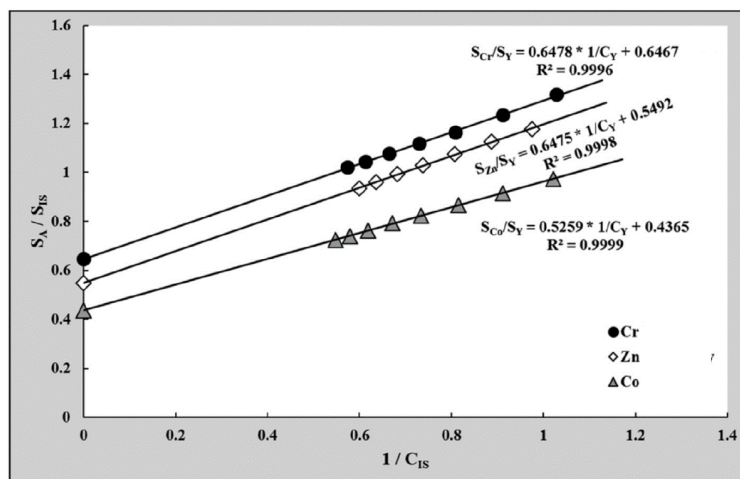
Após a obtenção dos sinais, elaborou-se as curvas de calibração. Os valores no eixo x da Figura 6.9 foram calculados a partir do sinal correspondente a concentração conhecida na solução 1. Os coeficientes de relação linear variam entre 0,9996 e 0,9999, isso demonstra que o padrão interno Y, corresponde simultaneamente com a variação de sinal de cada analíto na amostra. Esta boa relação $[S_A/S_{IS}]$ permite que o SDA corrija as possíveis interferências relacionadas a introdução de amostra ou matriciais.

Figura 6.8 - Perfis de sinais para SDA correspondente a diluição da solução 1 com a solução 2.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6.9 - Curvas de calibração obtidas por SDA, para Zn em whisky, Cr em café e Co em cerveja.



Fonte: Adaptado de Goncalves, et. al. 2016 ¹⁴¹.

No SDA, sinais analíticos devem ser coletados simultaneamente e em tempo real porque o MIP OES registra sinais sequencialmente, e por este motivo, ocorre um pequeno atraso entre as medições em cada comprimento de onda. Considerando-se o período de tempo de diluição padrão, este pequeno atraso resulta em apenas alguns pontos de calibração, o que pode comprometer a precisão e exatidão. Para superar este problema, utilizou-se o menor tempo de integração possível (isto é 1 s) e monitorou 5 elementos de cada vez (4 analitos e o padrão interno Y). Para menores tempos de integração, os analitos não foram determinados em suas taxas de vazão de nebulização ideais e posições de visualização de plasma. A alteração dessas condições de comprimento de onda para outro comprimento de onda durante a análise, como acontece no modo de aquisição normal, causou *delay* entre as medidas conforme descrito na seção de otimização. Assim, as limitações instrumentais associadas a tempos de integração

mais baixos e as condições experimentais podem explicar valores inferiores aos dos limites de detecção mais baixos para o SDA quando comparada com os outros métodos conforme tabela 6.3. Embora relativamente mais elevado, os valores obtidos podem ser considerados adequados para a maioria das aplicações, especialmente considerando que não foi praticamente necessária nenhuma preparação da amostra, a não ser uma simples diluição.

Os limites de detecção - LOD e quantificação – LOQ, foram determinados para SDA com tempo de integração de 1 segundo e comparados com os métodos tradicionais de calibração: EC, IS e AS com tempo de integração de 3 segundos. Os LODs foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC conforme seções anteriores. A tabela 6.3 demonstra as comparações de LOD e LOQ para cada método de calibração.

Tabela 6.3 – Limites instrumentais de quantificação e detecção em $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MIP OES pelos métodos de calibração SDA, EC, IS e SA.

Elemento	SDA ^a		EC, IS, SA ^b	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Al	20	50	6	20
Co	100	300	20	60
Cr	40	100	10	40
Cu	10	40	6	20
Fe	30	100	20	70
Mn	30	100	40	100
Ni	40	100	7	20
Zn	500	2000	400	1000

^{a, b} Condições de operação para análises de bebidas demonstrados na tabela 6.1.

Fonte: Elaborado pelo autor

A precisão para o SDA-MIP OES foi determinada por testes de adição e recuperação, descrito nas tabelas 6.4 a 6.9. Para comparação as mesmas amostras foram, analisadas empregando EC, IS e SA. As concentrações adicionadas foram de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Como pode ser observado, o SDA é comparável com os outros métodos, na maioria dos casos. No entanto, é significativamente mais preciso para aplicações que envolvem matrizes complexas, em especial para aquelas que contêm etanol. Os efeitos de correção do SDA combinados com transporte de amostras e matriz da amostra podem ser responsáveis por tal desempenho superior.

Tabela 6.4 – Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em Café determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	102,2	98,6	98,5	96,8	100,6	82,8	101,6	101,4	97,8
EC	93,3	94,5	89,9	98,2	95,9	93,7	96,3	100,1	95,2
IS	101,3	107,1	106,9	97,3	101,5	111,0	115,2	78,4	102,3
SA	88,8	101,5	87,6	96,0	94,3	110,7	106,3	115,0	100,0

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6.5 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em chá determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	90,2	90,1	92,3	105,0	96,3	102,7	102,0	101,0	97,4
EC	109,9	95,6	102,4	107,7	97,5	103,5	95,4	100,6	101,6
IS	135,3	104,5	112,3	135,3	106,7	113,8	105,7	114,7	116,0
SA	100,5	126,3	104,1	119,0	130,1	101,4	105,9	121,2	113,5

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6.6 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em energético determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	100,1	91,7	94,6	100,5	91,5	100,8	102,2	106,3	98,5
EC	98,9	94,3	99,5	108,7	96,3	98,4	94,3	101,3	99,0
IS	140,4	118,5	125,3	140,4	121,3	124,0	118,6	125,8	126,8
SA	111,6	137,4	105,1	113,0	142,8	108,5	114,1	120,0	119,0

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6.7 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em cerveja determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	105,3	95,4	95,9	89,2	91,6	97,6	93,4	106,5	96,9
EC	114,8	123,7	104,1	115,5	269,7	113,3	103,7	115,3	132,5
IS	126,8	126,8	106,9	118,3	289,7	116,2	106,2	118,8	138,7
SA	122,4	118,6	117,8	128,3	1226,4	122,0	121,3	121,5	259,8

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6.8 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em whisky determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	95,3	90,8	79,1	85,2	80,6	91,4	90,1	97,9	88,8
EC	121,8	113,8	125,5	125,0	1646,9	124,2	108,1	135,1	312,5
IS	98,8	92,3	101,8	98,8	1303,7	100,7	91,8	109,0	249,6
SA	101,1	115,0	102,9	104,2	- ^a	93,4	106,3	118,8	105,9^b

^a Severo efeito de matriz resultou em um valor negativo.; ^b Não considerando Fe. Fonte: Elaborado pelo autor

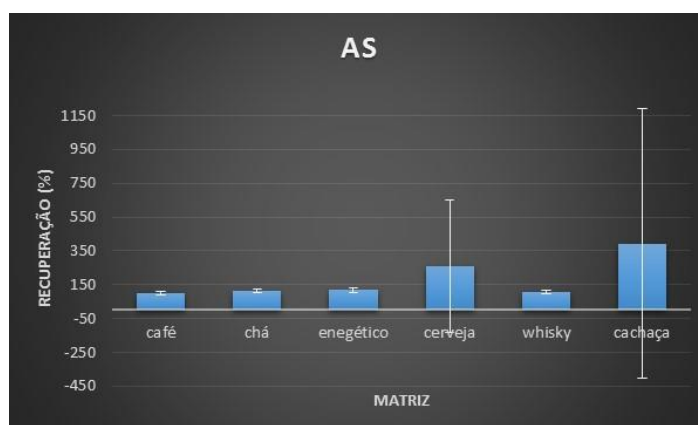
Tabela 6.9 - Recuperações a partir da adição de 1,0 mg L⁻¹ para Al, Cr, Cu, Fe e Mn, e 3,0 mg L⁻¹ para Co, Ni e Zn em cachaça determinados por SDA, EC, IS e SA.

Método	Al	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Média
SDA	92,0	104,2	71,9	87,7	112,9	92,5	90,0	102,6	94,2
EC	121,0	110,9	123,1	126,5	539,5	142,3	112,0	127,1	175,3
IS	95,3	82,5	98,2	82,5	- ^a	110,9	88,8	104,4	94,6^b
SA	108,5	128,0	112,4	125,7	2363,1	104,7	112,7	91,8	393,3

^a Severo efeito de matriz resultou em um valor negativo. ^b Não considerando Fe. Fonte: Elaborado pelo autor

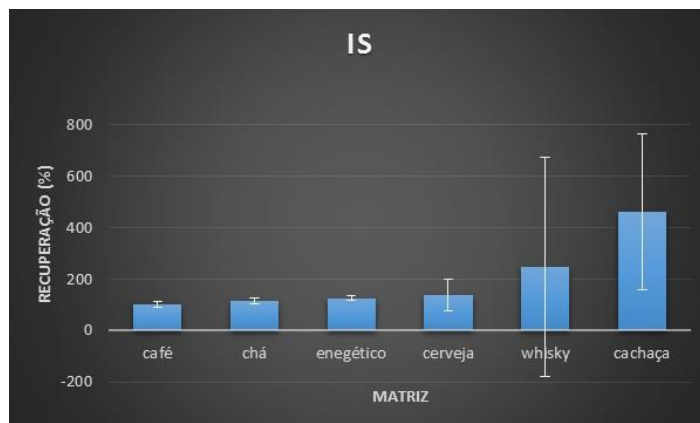
Quando observou-se os efeitos de matriz, obtemos variação de 95,2 – 312,1 %, 94,6 – 249,6% e 100 – 393,3% para os métodos de EC, IS e SA, respectivamente, enquanto o SDA se mantém em uma faixa de recuperação de 88,8 – 98,5%. Os efeitos de matriz podem ser melhor notados comparando as recuperações com o desvio padrão para cada método de calibração conforme Figuras 6.10 a 6.13.

Figura 6.10 - Efeitos de matriz para método de calibração por adição de padrão.



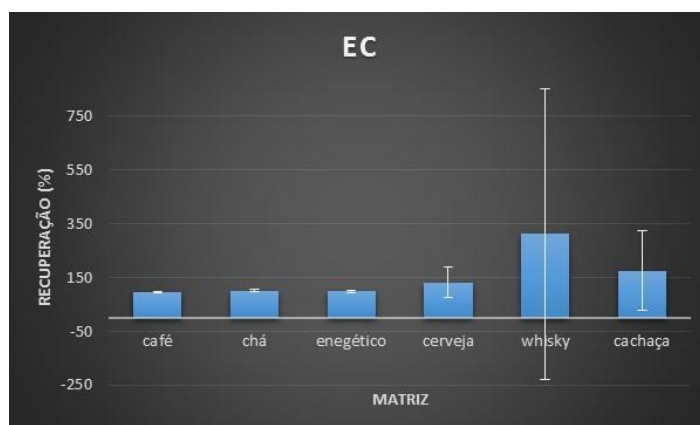
Severo efeito de matriz resultou em um valor negativo para Fe em whisky.

Não considerou Fe para esta avaliação. Fonte: Elaborado pelo autor

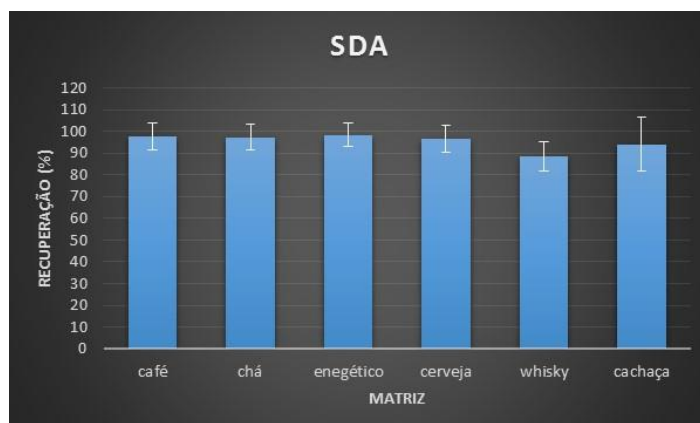
Figura 6.11 - Efeitos de matriz para método de calibração por adição de padrão interno.

Severo efeito de matriz resultou em um valor negativo para Fe em cachaça.

Não considerou Fe para esta avaliação. Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6.12 - Efeitos de matriz para método de calibração por calibração externo

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6.13 - Efeitos de matriz para método de calibração por diluição de solução padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor

Para as amostras de café, chá e energético ambos métodos de calibração apresentam bons rendimentos analíticos, porém para amostras de cerveja, whisky e cachaça os métodos de AS, IC e EC apresentam desvio padrão elevado principalmente para concentrações de Fe por serem interferências matriciais relacionadas a absorção de fundo elevado em soluções com concentrações de etanol descritos nos capítulos anteriores. Os efeitos de correção combinados com transporte de amostras e matriz da amostra podem ser responsáveis por tal desempenho superior para o SDA.

Para a quantificação das amostras foram realizadas diluição, como as utilizadas para os testes de adição e recuperação utilizadas para SDA. Na maioria dos casos, as concentrações de analito estavam abaixo do LOQs. O cobalto, por exemplo, foi o único elemento encontrado em whisky e cachaça: $4,33 \pm 0,05$ e $3,41 \pm 0,03$ mg L⁻¹, respectivamente. Outros elementos como Cr, Ni e Zn obtiveram valores abaixo do LOQ. Concentrações de Al variaram entre $0,24 \pm 0,01$ mg L⁻¹ para cachaça e $7,60 \pm 0,06$ mg L⁻¹ para chá. Concentrações de Cu, Fe e Mn variaram na faixa de 0,30 – 1,84; 1,40 – 13,48; e 0,67 – 2,89 mg L⁻¹, em todas as amostras.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS PARA DETERMINAÇÕES DE Al, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni E Zn EM BEBIDAS POR SDA

Devido a natureza de aquisição de sinal sequencial do MIP OES, são obtidos menos pontos de calibração para SDA. Por outro lado, a precisão do método é superior a métodos de calibrações tradicionais para amostras contendo etanol. O método SDA apresentou recuperações médias para vários elementos entre 90 e 99%. Para o método convencional, por exemplo, as recuperações médias foram obtidas entre 101 e 122% para as mesmas amostras e os analitos.

O método SDA combinou poderosos efeitos de compatibilidade de matriz com a estabilidade do plasma e a robustez do MIP OES, isto possibilitou efetuar análises precisas e exatas em bebidas com apenas uma simples diluição de amostra. Esta estratégia é rápida, simples e pode ser facilmente automatizada para aplicações de rotina em amostras diversas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado o desenvolvimento de diferentes métodos analíticos empregando à espectrometria de emissão óptica para avaliação de possíveis níveis de contaminantes elementares em amostras diversas. Com relação aos procedimentos empregados, não utilizou agentes químicos para aumentar a sensibilidades de leituras analíticas em WC AES e MIP OES, aplicando o conceito de química verde em ambos os casos.

Não existe equipamento comercial de WC AES, por este motivo o alinhamento do sistema óptico requer habilidade do analista. O emprego de filamentos com menores tempo de integração de sinal apresentou excelente exatidão analítica e aumento de sensibilidade e melhoria da precisão sem o uso dos tradicionais modificadores químicos.

A combinação de um novo método de calibração com o MIP OES (SDA-MIP OES) utilizando apenas duas soluções de calibração demonstrou ser um procedimento simples, eficiente e pode ser facilmente automatizado para aplicações em leituras de rotina. Além disso o MIP OES demonstrou robustez e exatidão para determinação de elementos potencialmente tóxicos diretamente em matriz de alta complexidade.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BECKER, J. S. *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley and Sons. West Sussex: 2007. 514p.
- [2] ZEMANSKY, M. W.; SEARS, F. W.; *Física IV - Ótica e Física Moderna*. Editora: Pearson Education, São Paulo, 12ª edição, p. 179-209, 2009.
- [3] HEWITT, P. G., *Física Conceitual* - Editora: BOOKMAN, Porto Alegre, 9ª edição, p. 371-528, 2002.
- [4] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*, Bookman Companhia Editora LTDA. Porto Alegre, 5ª edição, p. 115-274, 2002.
- [5] CALLISTER, W. D. *Ciência e engenharia de materiais: Uma introdução*. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, p.556. 2008.
- [6] EWING, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análise Química* ed. Edgar Bluncher, São Paulo - v. 1, p. 41-188, 1972.
- [7] JOHN W. O.; Peer Reviewed: Fundamental Research in ICP OES and ICP-MS. *Analytical Chemistry*. Washington, DC, v.68, n. 15, p 469A–474A, 1996.
- [8] JAMES D. INGLE, JR. & STANLEY R. CROUCH, *Spectrochemical Analysis*, ed. Prentice-Hall, Inc., 1st edição, Englewood Cliffs, NJ, p. 590, 1988.
- [9] DANIELSSON, L.; MAGNUSSON, B.; WESTERLUND, S. An improved metal extraction procedure for the determination of trace metals in sea water by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 47-57, 1978.
- [10] L'VOV, B. V. The analytical use of atomic absorption spectra, *Spectrochim. Acta Part B*, Oxford, v. 17, n.7, p.761-770, 1961.

-
- [11] JANKOWSKI, J. AND RESZKE, E. *Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry*, 1st ed., RSC Publishing, Cambridge, 2011.
- [12] NIST - National Institute of Standards and Technology, Chemistry WebBook, Standard Reference Database, <http://webbook.nist.gov/chemistry/formser.html> (acesso Janeiro de 2016).
- [13] ROBINSON, J. W.; SKELLY FRAME, E. M.; FRAME II, G. M.; *Undergraduate Instrumental Analysis*, Cleveland, OH, ed. CRC Press, 6th Edition, p. 1269, 2005.
- [14] WALSH, A.; The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v. 7, p. 108-117, 1955.
- [15] HOU, X; LEVINE, K. E; SALIDO, A; JONES, B.T; EZER, M; ELWOOD, S; SIMEONSSON, J. B;. Tungsten coil devices in atomic spectrometry: absorption, fluorescence, and emission. *Analytical Sciences*, Tokyo, v.17, p.175-180, 2001.
- [16] NÓBREGA, J. A.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, P. V.; KRUG, F. J.; BACCAN, N. Espectrometria atômica com atomização eletrotérmica em superfícies metálicas. *Química Nova*, São Paulo, v.18, n. 6, p.555-562, 1995.
- [17] XIANDENG, H.; BRADLEY, T. JONES; Tungsten devices in analytical atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.57, n. 4, p.659–688, 2002.
- [18] ROLDAN, P. S.; J.; NÓBREGA, J. A. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica empregando filamentos de tungstênio. *Analytica (São Paulo)*, v.26, p.82-92, 2006.
- [19] RUST, J. A.; NÓBREGA, J. A.; CALLOWAY JR, C. P.; JONES, B. T. Advances with tungsten coil atomizers: continuum source atomic absorption and emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, Oxford, v.60, n.30, p.589-598, 2005.
- [20] RUST, J. A; NÓBREGA, J. A; CALLOWAY JR; JONES, B. T. Tungsten coil atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.61, n. 2, p.225–229, 2006.

-
- [21] DONATI, G. L.; GU, J. Y.; A.; CALLOWAY JR., C. P.; JONES, B. T. Simultaneous determinations of the Lanthanides by tungsten coil emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, London, v.23, n.3, p.361-366, 2008.
- [22] GONCALVES, D. A.; GU, J.; DOS SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Direct determination of chromium in empty medicine capsules by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* Cambridge, v.30, n.6, p.1395–1399, 2015.
- [23] GONZALEZ, M. H.; SANTOS, L. N.; NOBREGA, J. A. AND ROCHA, F. R. P. Construção de espectrômetro de emissão atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio (WCAES). *Química Nova*, São Paulo, v.33, n. 10, p. 2266-2271, 2010.
- [24] DONATI, G. L.; KRON, B. E.; JONES, B. T. Simultaneous determination of Cr, Ga, In and V in soil and water samples by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, Oxford, v.64, n.6, p.559-564, 2009.
- [25] DONATI, G. L. *Trends in Tungsten Coil Atomic Spectrometry*. ProQuest, Cambridge, p. 262, 2011.
- [26] DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. ; NASCENTES, C. C. ; JONES, B. T. Indirect determination of iodide by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v.93, n.2, p.242-246, 2009.
- [27] DONATI, G. L.; CALLOWAY JR., C. P.; JONES, B. T. Double tungsten coil atomic emission spectrometry: signal enhancement and a new gas phase temperature probe. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.24, n.8, p.1105-1110, 2009.
- [28] GU, J.; OLIVEIRA, S. R.; DONATI, G. L.; GOMES NETO, J. A. AND JONES, B. T. Rugged, portable tungsten coil atomic emission spectrometer. *Analytical Chemistry*, Washington, v.83, n.7, p.2526-2531, 2011.

-
- [29] SANTOS, L. N.; GONZALEZ, M. H.; MOURA, M. F.; DONATI, G. L. AND NÓBREGA, J. A. In situ digestion for the determination of Ca in beverages by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Talanta*, Amsterdam, v.97, n.15, p.285-290, 2012.
- [30] SANTOS, L. N.; DONATI, G. L.; CALLOWAY, JR., C. P.; JONES, B. T. AND NÓBREGA, J. A. Enzymatic proteolysis and in situ digestion as strategies to determine Cs and Sr in fish by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.27, n.12, p.2082-2087, 2012.
- [31] SILVA, S. G.; DONATI, G. L.; SANTOS, L. N.; JONES, B. T.; NÓBREGA, J. A. Cobalt as chemical modifier to improve chromium sensitivity and minimize matrix effects in tungsten coil atomic emission spectrometry. *Analitica Chimica Acta*, Amsterdam, v.780, n.30, p.7-12, 2013.
- [32] SILVA, S. G.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. AND DONATI, G. L. Magnesium nitrate as a chemical modifier to improve sensitivity in manganese determination in plant materials by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.29, n.8, p.1499-1503, 2014.
- [33] VIRGILIO, A.; HEALY, C. K.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. AND DONATI, G. L. Evaluation of atomizer conditioning and pyrolysis and atomization temperature control to improve procedures based on tungsten coil atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v.110, p.758-763, 2013.
- [34] QUEIROZ, Z. F; OLIVEIRA, P. V; NÓBREGA, J. A. SILVA, C. S; RUFINI, I. A.; SOUSA, S. S; KRUG, J. J.; Surface and gas phase temperatures of a tungsten coil atomizer, *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.57, n.11, p.1789–1799, 2002.
- [35] DANCSAK, S. E. ; SILVA, S. G. ; NÓBREGA, J. A. ; JONES, B. T. ; DONATI, G. L. . Direct determination of sodium, potassium, chromium and vanadium in biodiesel fuel by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.806, n.2, p.85-90, 2014.

-
- [36] RUST, J. A.; DONATI, G. L.; AFONSO, M. T.; NÓBREGA, J. A. AND JONES, B. T. An overview of electrothermal excitation sources for atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.64, n.3, p.191-198, 2009.
- [37] DONATI, G. L.; WILDMAN, R.B. ; JONES, B.T. A new atomization cell for trace metal determinations by tungsten coil atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.688, n.1, p.36-42, 2011.
- [38] JIN, Q.; YIXIANG DUAN AND OLIVARES, J. A.. Development and investigation of microwave plasma techniques in analytical atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v. 52, n.2, p. 131-161, 1997.
- [39] COBINE, J. D.; WILBER, D. A.,. The Electronic Torch and Related High Frequency Phenomena. *Journal Applied Physics*, v.22, v.6, p.835, 1951.
- [40] MAVRODINEANU, R. AND HUGHES, R. C., Excitation in radio-frequency discharges. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.19, n.8, p.1309–1317, 1963.
- [41] WEI, L.; PATRICK, S.; DOUG, S.; TIMOTHY J. H.; SUSIE Y. D.,; Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, Amsterdam, v. 112, p. 43–48, 2013.
- [42] ROSENKRANZ, B AND BETTMER, J. Microwave-induced plasma-optical emission spectrometry fundamental aspects and applications in metal speciation analysis. *Trends in analytical chemistry*, vol. 19, n.2-3, p138-156, 2000.
- [43] NIEDZIELSKI, P.; KOZAK, L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, L. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP–OES) in 23 elements determination in geological samples. *Talanta*, Amsterdam, v.132, p.591–599, 2015.
- [44] GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v. 31, n.5, p.1097–1104, 2016.

-
- [45] AMAIS, R. S.; DONATI, G. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A.. A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v. 106, p.318–322, 2013.
- [46] DONATI, G. L, AMAIS, R. S, SCHIAVO, D AND NÓBREGA, J. A. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v. 28, n.5, p.755–759, 2013.
- [47] KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements innitricacid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). *Talanta*, Amsterdam, v.135, p.124–132, 2015.
- [48] HEISTERKAMP, M; AND ADAMS, F. C. In situ propylation using sodium tetrapropylborate as a fast and simplified sample preparation for the speciation analysis of organolead compounds using GC-MIP-AES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.14, n.9, p.1307–1311, 1999.
- [49] BARRIENTOS, E. Y. ; WROBEL, K. ; TORRES GUZMAN, J. C. ; CORRALES ESCOBOSA, A. R; AND WROB, K. Determination of SeMet and Se(IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC-HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.31, n.1, p.203–211, 2016.
- [50] BOSS, C. B; FREDEEN, K. J. *Concept, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 2nd edition, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, 1997.
- [51] JEAN-MICHEL MERMET AND EMMANUELLE POUSSEL, "ICP Emission Spectrometers: 1995 Analytical Figures of Merit," *Applied Spectroscopy*, Frederick, v.49, n.10, p.12A-18A, 1995.

-
- [52] JOHNSON T.C.; PERRY, R.S. ; FICK, L.J. ; FANNIN, H.B. ‘An Examination of Relative Trends of Atomic Detection Limits in the Inductively Coupled Plasma’, *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v. 52, n.1, p.125–129, 1997.
- [53] ZANDER, A.T.; CHIEN, R.L.; COOPER, C.B.; WILSON, P.V. ‘An Image Mapped Detector for Simultaneous ICP-AES’, *Analytical Chemistry*, Washigton, v.71, n. 16, p.3332–3340, 1999.
- [54] REZENDE M., R. G. et al., Composição corporal e exigências de macroelementos minerais (Ca, P, Na, K E Mg) de bovinos Nelore mestiços, não castrados, em confinamento. *Revista Ceres*. Viçosa, n.54, p.453-460, 2007.
- [55] SIMMS, D. D.; et al. Beef cow nutrition guide. Cooperative Extension Service, Kansas State University, 1993. Disponível em: www.oznet.kazu.edu/library/lvstk2/c735.pdf. Acesso em: janeiro 2014.
- [56] MOTTIN, C.; DO PRADO, I. N.; CHEFER, D. M.; EIRAS, C. E.; RIVAROLI, D. C. Suplementação com minerais quelatados em bovinos: Uma revisão. *Campo Digital: Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias*, Campo Mourão, v.8, n.2, p.59-70, 2013.
- [57] CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária, 3º edição, p. 1331-1403, 2004.
- [58] GROMBONI, C. F. Teores dos Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos na Rastreabilidade da Carne Bovina. Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: Química analítica. Universidade Federal de São Carlos; 2012
- [59] NRIAGU, J. N., et al. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, San Diego, v.72, n.2, p.564-571, 2009.
- [60] REY-CRESPO, F.; MIRANDA, M.; LÓPEZ-ALONSO, M. Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.55, p.513–518, 2013.

-
- [61] LEM BORGES, J. J. P. Influencia dos micronutrientes (Cu, Mn, Se e Zn) no sistema imunológico dos bovinos - Cadernos de Pós-Graduação da FAZU, 2013 – disponível em www.fazu.br, Acesso em: janeiro 2014.
- [62] WILL, S. E. A. L.; RICI, R. E. G.; Miglino, M. A.; ANTUNES, A. Trace element of bovine placenta: histological analysis and distribution maps using μ SXRF. In: A. Méndez-Vilas, J. Díaz. (Org.). Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. 1ed. Badajoz, Espanha: FORMATEX Research Center, v.2, p.1039-1046, 2010.
- [63] FERNANDES, V. ; ALOIA, T. ; WILL, S. E. A. L. ; AMBROSIO, C. E. ; FRANCIOLLI, A. L. ; MIGLINO, M. A. ; RICI, R. E. G. . Comparação da imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e clonados. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, v.36, n.3, p.40-58, 2012.
- [64] HIDIROGLOU, M. Trace Element Deficiencies and Fertility in Ruminants: A Review. Journal of Dairy Science. Champaign, v.62, n.8, p.1195–1206, 1979.
- [65] WILL, S. E. A. L.; RICI, R. E. G.; MIGLINO, M. A. CARVALHO, M. L.; ANTUNES, A. Trace elements concentrations on cloned and normal bovine placenta studied by EDXRF. In: European Conference on X-Ray Spectrometry, Portugal. European Conference on X-Ray Spectrometry, 2010.
- [66] VINOD KUMAR. Effect of Minerals on Dairy Animal Reproduction - A Review. International Journal Livestock Research. Rishikesh, v.5, n.6, p.1-10, 2015.
- [67] MACHADO, V.S. et al. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. The Veterinary Journal. Oxford, v.200, n.2, p.299–304, 2014.
- [68] EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Identificação das deficiências minerais <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc112/034icose.html>> acesso em 22/08/2013.

-
- [69] BICALHO, M.L.S. et al. Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *Journal Dairy Science*, Champaign, v.97, n.7, p.4281 – 4295, 2014.
- [70] MARQUES, A. A. L., BOTTEON, R. C. C. M., AMORIM, E. B, BOTTEON, P. T. L.. Deficiência de cobre condicionada a altos teores de zinco, manganês e ferro na região do Médio Paraíba, Semina: Ciências Agrárias. Rio de Janeiro, v.4, n.3, p.1293-130, 2013.
- [71] WILL, S. E. A. DE LIMA. Avaliação da concentração de elementos traço e respectivos mapas de distribuição em placenta bovina. 2010. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-28032011-102928/>>. Acesso em: 2015-10-26.
- [72] VÁSQUEZ, E. F. A, AND HERRERA, Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.4, p.743-747, 2003.
- [73] CEKO, M. J., HUMMITZSCH K., BONNER W. M., AITKEN J.B., SPIERS K. M., RODGERS R.J, HARRIS H. H. Localization of the Trace Elements Iron, Zinc and Selenium in Relation to Anatomical Structures in Bovine Ovaries by X-Ray Fluorescence Imaging. *Microscopy and Microanalysis*. Cambridge, v.21, .3, p.695-705, 2015.
- [74] FERREIRA, K. S. et al. Use of fast alkaline solubilisation to determine copper in bovine liver, fish tissues (salmon), and rolled oats by graphite furnace atomic absorption spectrometry using aqueous calibration. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v.124, __, p.350–355, 2016.
- [75] MELQUIADES, F. L.; ALMEIDA, E. ; PERES J.A. ; SMUCZEK B. ; WOUK L. C. . Análise de metais em sangue de bovinos e no ambiente de criação de bovinos por EDXRF. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, Guarapuava, v.13, n.1, p.9-21, 2011.

-
- [76] SHEETAL, S. K; CHOUDHARY, S. K. AND D. SENGUPTA. Mineral deficiency predisposes occurrence of retention of placenta in crossbred. *Veterinary World, Gujarat*, v.7, n.12, p.1140-1143. 2014.
- [77] NIREESHA, G. R. ; DIVYA, L.; SOWMYA, C.; VENKATESHAN, N;. NIRANJAN BABU, M; AND LAVAKUMAR, V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of novel trends ins pharmaceutical sciences. Tamilnad*, v.3, n.4, p.87 – 98, 2013.
- [78] MASAHIRO O., HIROFUMI S., ATSUSHI T., HIDETAKA T. Fate of metals contained in waste electrical and electronic equipment in a municipal waste treatment process. *Waste Management. Elmsford*, v. 32, n. 1, p. 96-103, 2012.
- [79] NÓBREGA, J.A.; PIROLA, C. ; FIALHO, L. L. ; ROTA, G. ;. DE CAMPOS JORDÃO, C.E.K.M.A; POLLO, F.. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? *Talanta, Amsterdam*, v.98, p.272–276, 2012.
- [80] GONZALEZ, M. H. ; SOUZA, G. B. ; OLIVEIRA, R. V. ; FORATO, L. A. ; NÓBREGA, J.A., NOGUEIRA, A. R. A Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta, Amsterdam*, v.79, p.396–401, 2009.
- [81] BIZZI, C. A.; FLORES, E. M.M.; BARIN, J. S. ; GARCIA, E. E. ; NÓBREGA, J.A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. *Microchemical Journal, Amsterdam*, v.99, ___, p. 193 – 196, 2011.
- [82] BIZZI, C. A., BARIN J. S., MÜLLER E. I., SCHMIDT, L., NÓBREGA, J. A., FLORES, E. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. *Talanta, Amsterdam*, v.83, p.1324 – 1328, 2011.
- [83] SASTRE, J.; SAHUQUILLO, A.; VIDAL, M.; RAURET, G.; Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta, Amsterdam*, v.462, n.1, p.59 – 72, 2012.

-
- [84] BOYLE, W. S. AND SMITH, G. E. Charge Coupled Semiconductor Devices. Bell System Technical Journal. New York, v.49, n.4, p.587–593, 1970.
- [85] JANKOWSKI, J. AND RESZKE, E. *Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry*, 1st ed. RSC Publishing, Cambridge, 2011.
- [86] DESAL, P.D.; CHU, T.K. ; JAMES, H.M. ; HO, C.Y. ; Electrical resistivity of selected elements, Journal Physical Chemical Reference Data, Washigton, v.13, n. 4, p.1069–1096, 1984.
- [87] RIBEIRO, A. N. S.; ARRUDA, M. A. Z. AND CADORE, S.. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio: uma re-visão crítica. Química Nova. São Paulo, v.25, n. 3, p.396-405, 2002.
- [88] RAYMOND, P.W. S. *Detector Linear Dynamic Range*. Scientific Detectors Ltd. 3º ed. DOI: 10.1081/E-ECHR3-120039953. 2009.
- [89] EDWARD VOIGTMAN Comparison of Signal-to-Noise Ratios. Analytical Chemistry, Washigton, v.69, n.2, p.226-234, 1997.
- [90] GARY L. LONG, WINEFORDNER, J. D. Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. Analytical Chemistry, Washigton, v.55, n.7, p.712–724, 1983.
- [91] GRAHAM, T. W. et al. Relationships between maternal and fetal liver copper, iron, manganese, and zinc concentrations and fetal development in California Holstein dairy cows. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Guelph, v.6, p.77-87, 1994.
- [92] JACOBY, A. et al. On behalf of the SANAD Study Group, quality-of-life outcomes of initiating treatment with standard and newer antiepileptic drugs in adults with newonset epilepsy: findings from the SANAD trial, Epilepsia, Oxford, v.56, n.1, p.1–13, 2015.
- [93] LUNARDI, A. AND PANDOLFI, P. P. A co-clinical platform to accelerate cancer treatment optimization, Trends in Molecular Medicine, Berkeley, v.21, n.1, p.1–5, 2015.

[94] MAEDA, H. AND KUROKAWA, T. Acceptance of surrogate end points in clinical trials supporting approval of drugs for cancer treatment by the Japanese regulatory agency, *Annals Oncology*, Oxford, v.26, n.1, p.211–216, 2015.

[95] MARKETS AND MARKETS, empty capsules market by product (hard gelatin, non-gelatin capsules), raw material (pig meat, bovine, HPMC), therapeutic application (antibiotics, vitamins) and by end user (pharmaceutical, health supplements): global forecast to 2019, Report Code: PH 2935, <http://marketsandmarkets.com/Market-Reports/empty-capsules-market-18018190.html>, accessed in February 10, 2015.

[96] B. R. ROHRS, G. E. AMIDON, R. H. MEURY, P. J. SECREAST, H. M. KING AND C. J. SKOUG, Particle size limits to meet USP content uniformity criteria for tablets and capsules, *Journal of Pharmaceutics Sciences*, Oxford, v. 95, n. 5, p.1049–1059, 2006.

[97] RUHOY, I. S. AND DAUGHTON, C. G. Beyond the medicine cabinet: an analysis of where and why medications accumulate, *Environment International*, Oxford, v. 34, n.8, p.1157–1169, 2008.

[98] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL Convention, Chapter 232: elemental impurities – limits, Revision Bulletin, Rockville, 2013.

[99] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL Convention, Chapter 233: elemental impurities – procedures, Revision Bulletin, Rockville, 2013.

[100] BURKITT, L. China halts sale of some drugs, *The Walls Street Journal*, <http://www.wsj.com/articles/SB10001424052702304299304577347563418936068>, accessed in March 11, 2015.

[101] STANTON, D. Chinese drugmakers still suffering from chromium capsule scandal, *In-Pharma Technologist.com*, <http://www.in-pharmatechnologist.com/Regulatory-safety/Chinese-Drugmakers-Still-Suffering-from-Chromium-Capsule-Scandal>, accessed in March 11, 2015.

-
- [102] WELLING, R.; BEAUMONT, J. J.; PETERSEN, S. J.; ALEXEEFF, G. V. AND STEINMAUS, C. Chromium VI and stomach cancer: a metaanalysis of the current epidemiological evidence, *Occupation Environemtal Medicine*, London, v.72, p.151–159, 2015.
- [103] SALIDO, A. L. AND. JONES, B. T Determination of Sr in soil by tungsten coil atomic emission spectrometry, *Microchemical Journal*, Amsterdan, v.101, n.2, p.1–4, 2012.
- [104] VIRGILIO, A.; NOBREGA, J. A.; JONES, B. T AND DONATI, G. L. Chemical modification in atomic emission: determination of V in lubricant oils by tungsten coil atomic emission spectrometry, *Microchemical Journal*, Amsterdan, v.115, p.58–62, 2014.
- [105] BOYLE, W. S. AND SMITH, G. E. Charge Coupled Semiconductor Devices. *Bell System Technical Journal*. New York, v.49, n.4, p.587–593, 1970.
- [106] NAOZUKA, J; AND OLIVEIRA, P. V. Minimization of sample pretreatment for Al, Cu and Fe determination in coconut water by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Journal Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 17, n.3, p.521–526, 2006.
- [107] OLIVEIRA, P. V, NOBREGA, J. A., CATANHO, M. AND LUCCAS, P. O. Evaluation of heating programs for electrothermal atomic absorption spectrometry using a tungsten coil, *Quimica Nova*, São Paulo, v.23, p.706–708, 2000.
- [108] DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J.M. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers, *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.56, n.1, p.101–112, 2001.
- [109] SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A. ; NOBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.57, n.12, p.1905–1913, 2002.

-
- [110] STURGEON, R. E. AND LAM, J. W. The ETV as a thermochemical reactor for ICP-MS sample introduction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v.4, n.5, p.785–791, 1999.
- [111] DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. AND NÓBREGA, J. A. Tungsten coil electrothermal matrix decomposition and sample vaporization to determine P and Si in biodiesel by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Cambridge, v. 28, n. 2, p.280–287, 2013.
- [112] SOLOVYEV, N. D.; IVANENKO, N. B. AND IVANENKO, A. A. Whole blood thallium determination by GFAAS with highfrequency modulation polarization Zeeman effect background correction, *Biological Trace Element Research*, Totowa, v.143, n.1, p.591–599, 2013.
- [113] CHEN, S. Z.; JIANG, Z. C.; HU, B.; LIAO, Z. H. AND PENG, T. Y. Direct determination of trace elements in micro amounts of biological samples using electrothermal vaporization coupled to ICP-AES, *Atomic Spectroscopy*, Norwalk, v.23, n.3, p.86–91, 2006.
- [114] MAYER, F. D.; FERIS, L. A.; MARCILIO, N. R.; STAUDT, P. B.; HOFFMANN, R. AND BALDO, V. Influence of fusel oil componets on the distillation of hydrous fuel (HEF) in a bench column. *Journal Chemical Engineering*, São Paulo, v.32, n.2, p.585 – 593, 2015.
- [115] FERREIRA, M. C.; MEIRELLES, A. J. A. AND BATISTA, E. A. C. Study of the Fusel Oil Distillation Process. *Industrial & Engineering Chemical Research*, Washigton, v.52, n.6, p.2336–2351, 2013.
- [116] LEYVA, F. et al. Kinetics of Propionic Acid and Isoamyl Alcohol Liquid Esterification with Amberlyst 70 as Catalyst. *Industrial & Engineering Chemical Research*, Washigton, v.52, n.6, p.18153–18161, 2013.
- [117] GUVENC, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOGAN, Ö.; MEHMETOGLU, Ü. ENZYMATIC Esterification of Isoamyl Alcohol Obtained from Fusel Oil: Optimization by Response Surface Methodolgy. *Enzyme and Microbial Technologic*, New York, v.40, n.4, p.778–785, 2007.

-
- [118] AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; MARQUES, M. O. AND PAVAN, M. C. M. D. Herbicides and Environment: Herbicidal Potentiality of Fusel Oil. Ed. InTech, ch. 36, p.760, 2011.
- [119] ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução nº 40 de 25 de Outubro, 2013; ANP: Rio de Janeiro, Brazil, 2013.
- [120] ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 11331, Ethyl Alcohol - Determination of Iron and Copper Concentrations - Atomic Absorption Spectrophotometry Method; ABNT: São Paulo, Brazil, 2007.
- [121] DIAS, T. P. V. B.; FONSECA, L. A. A. P.; RUIZ, M. C.; BATISTA, F. R. M.; BATISTA, E. A. C. AND MEIRELLES, A. J. A. Vapor-Liquid Equilibrium of Mixtures Containing the Following Higher Alcohols: 2-Propanol, 2-Methyl-1-propanol, and 3-Methyl-1-butanol. Journal Chemical and Engineering Data. Washigton, v.59, n.3, p.659-665, 2014.
- [122] ROCHA, F. R. P. AND NÓBREGA, J. A. Effects of Solution Physical Properties on Copper and Chromium Signals in Flame Atomic Absorption Spectrometry. Journal Chemical Education, Washigtons, v.73, n.10, p.982-984, 1996.
- [123] TEIXEIRA, L. S. G.; SANTOS, E. S.; NUNES, L. S. Determination of copper, iron, nickel and zinc in ethanol fuel by energy dispersive X-ray fluorescence after pre-concentration on chromatography paper. Analytica Chimica Acta, Amsterdan, v.722, p.29- 33, 2012.
- [124] SILVA, J. J.; PAIM, L. L. AND STRADIOTTO, N. R. Simultaneous Determination of Iron and Copper in Ethanol Fuel Using Nafion/Carbon Nanotubes Electrode. Electroanalysis, Weinheim, v.26, n.8, p.1794 – 1800, 2014.
- [125] ROCHA, M. S. et al. Determination of Cu and Fe in fuel ethanol by ICP OES using direct sample introduction by an ultrasonic nebulizer and membrane desolvator. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Cambridge, v.26, p.456-461, 2011.

-
- [126] IQBAL, J. et al. Metals Determination in Biodiesel (B100) by ICP-OES with Microwave Assisted Acid Digestion. *The Open Analytical Chemistry Journal*, Beijing, v.4, p.18-26, 2010.
- [127] MONTASER, A. AND GOLIGHTLY, D. W. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2nd. ed., Wiley-VCH, New York, 1992.
- [128] HOU, X AND JONES, B. T. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, edited by R. A. Meyers, ed. John Wiley & Sons, Hoboken, 2008.
- [129] YANG ZHAO, et al. Determination of heavy metals in leather and fur by microwave plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.112, p. 6–9, 2015.
- [130] KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). *Talanta*, Amsterdam, v.135, p.124–132, 2015.
- [131] TODOLI, J. L.; MERMET, J. M.; *Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry: A Practical Guide*, 1st ed.; Elsevier Science: Amsterdam, Netherlands, 2008.
- [132] CHAVES, E. S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; CURTIUS, A. J.; VANHAECKE, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. *Spectrochimica Acta Part B*, Oxford, v.66, p.733–739, 2011.
- [133] NEVES, E. F. A.; OLIVEIRA, A.; FERNANDES, A. P.; NÓBREGA, J. A. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. *Food Chemistry*, Oxford, v. 101, n.1, p. 33-36, 2007.
- [134] MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S.; Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. *Ecological Applications*. Washigtons, v.18, n.4, p..885-898. 2008.

-
- [135] H. MARK, Principles and practice of spectroscopic calibration, in J. D. Winefordner and I. M. Kolthoff (Eds.), Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, Wiley-Interscience, New York, 1st ed., v. 118, p.192. 1991.
- [136] ZACHARIADIS, G. A.; VOGIATZIS, C. An overview of the use of yttrium for internal standardization in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, Applied Spectroscopy Reviews. Philadelphia, v.45, n.3, p.220-239, 2010.
- [137] VEENING, H. Quantitative infrared analysis of xylene mixtures: Internal standard method, Journal Chemical Education, Washington, v.43 p.319-320, 1996.
- [138] BADER, M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis, Journal Chemical Education, Washington. v.57 p.703-706, 1980.
- [139] JONES, W. B.; DONATI, G. L.; CALLOWAY JR, C. P.; JONES, B. T. Standard dilution analysis, Analytical Chemistry, Washington, v.87, p.2321-2327, 2015.
- [140] ZACHARIADIS, G. A. AND VOGIATZIS, C. An Overview of the Use of Yttrium for Internal Standardization in Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry. Applied Spectroscopy Reviews. Philadelphia, v. 45, n 3, p.220-239, 2010.
- [141] GONCALVES, D.A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; BRADLEY T. J.; GEORGE L. D., Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, Analytica Chimica Acta, Amsterdam, 909, 24-29, 2016.