

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo de parâmetros associados à análise direta de
sólidos por espectrometria de absorção atômica com
atomização eletrotérmica

Cassiana Seimi Nomura
Tese de Doutorado

Pedro Vitoriano de Oliveira
Orientador

São Paulo, 03 de março de 2006

*Aos meus pais Cecília e Ademar,
ao meu irmão Nilton
e ao meu eterno companheiro Jorge*

Pela felicidade de ter uma família tão especial

Dedico

*Ao meu orientador Pedro,
responsável pela minha formação
e pelo meu enorme desejo de
fazer pesquisa na Química Analítica*

Pela felicidade de ter uma família científica tão especial

Dedico

Agradecimentos

Ao meu grande mestre e querido amigo, Prof. Pedro Vitoriano de Oliveira, pela amizade, orientação, parceria, e apoio irrestrito durante toda minha vida científica. Além dos ensinamentos de vida e de luta por uma pesquisa e por uma didática rica e cada vez mais perfeita.

À Prof. Elisabeth de Oliveira pela amizade e apoio irrestrito durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Prof. Francisco José Krug, meu “avô científico”, pelo respeito, amizade e pela recepção calorosa que recebi no CENA-USP em Piracicaba.

Ao Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega pelas ricas contribuições e por sempre ter me recebido com muito carinho em seu laboratório na UFSCAR-São Carlos.

À Profª Ana Rita de Araújo Nogueira pela parceria, ricas colaborações durante o desenvolvimento do trabalho e na defesa de tese, e por sempre ter me recebido de braços abertos em seu laboratório na EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE em São Carlos.

Aos Drs. Robert Greenberg e Rolf Zeisler por todo o respeito, ensinamento e por ter me recebido tão bem na minha visita ao NIST.

Ao Prof. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha pela amizade, convivência, conversas e ricas contribuições no Exame de Qualificação e na Defesa de Tese.

Ao Prof. Jivaldo do Rosário Mattos pela apreciação crítica do trabalho durante o Exame de Qualificação e pelo agradável convívio no IQ-USP.

Ao Prof. Érico Marlon de Moraes Flores pela cuidadosa leitura do presente trabalho e pelas ricas e valiosas contribuições na Defesa de Tese.

Ao Prof. Claudimir Lúcio do Lago pelo agradável convívio no IQ-USP e pela avaliação crítica do presente trabalho.

Ao Prof. Paulo Rogério Correia Miranda, meu querido amigo e “irmão científico” pela amizade verdadeira desde o primeiro momento da minha vida científica e pelo apoio irrestrito durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos demais docentes da Área de Química Analítica do IQ-USP, pela amizade, pelos ensinamentos oferecidos e pela agradável convivência desde os tempos de graduação.

A todos os docentes do IQ-USP, pela sólida formação em Química, que me permitiu ingressar com segurança no Programa de Pós-Graduação.

À minha amiga muito especial, Profª Márcia Andreia Mesquita da Veiga, pela amizade, colaboração e momentos muito agradáveis dentro e fora do laboratório durante todos esses anos.

À minha querida amiga e “irmã científica”, Juliana Naozuka, pela amizade verdadeira desde os tempos de graduação e por estar sempre presente em todos os bons e maus momentos da minha vida, me aconselhando e apoiando.

À amiga Cíntia Soares da Silva pela convivência no laboratório e pela valiosa contribuição durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À assessoria científica da FAPESP pelas valiosas contribuições desde a concepção desse projeto de pesquisa.

A todos funcionários da Seção de Graduação, de Pós-Graduação e Assistência Acadêmica do IQ-USP, pelo atendimento cordial e eficiente.

Aos amigos do IQ-USP Margareth, Giovana, Thiago e Rodrigo pela agradável convivência e momentos divertidos.

Aos amigos do laboratório Alexandre, Angerson, Daniela, Danielle e Gilson pela convivência, conversas e bons momentos no “café”.

À Dona Kayoko, Sr. Takeshita, Haruko, Oscar e Carlos pela harmoniosa convivência, amizade, respeito e família maravilhosa que estão me dando a chance de ter.

À minha amada família pelo incentivo permanente, pelo enorme amor e respeito.

Ao meu eterno companheiro Jorge Yukio Takeshita pelo amor eterno, respeito e cumplicidade.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e por acreditar nesse projeto de pesquisa (processo: 02/00666-4).

A FAPESP, CNPq, CAPES e Pró-Reitoria de Pesquisa da Pós-Graduação pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada

SUMÁRIO

GLOSSÁRIO	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Análise direta de sólidos: Aspectos gerais.....	3
2.1.1 Homogeneidade e massa de amostra	3
2.1.1.1. Avaliação da microhomogeneidade.....	5
2.1.2. Influência do tamanho de partícula na homogeneidade.....	8
2.1.3. Influência do tamanho de partícula na atomização eletrotérmica	9
2.2. Análise direta de sólidos.....	11
2.2.1. Espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos - Abordagem histórica	14
2.2.2. Análise direta de sólidos por ETAAS: Características e aplicações.....	16
2.2.2.1. Análise de materiais refratários de difícil solubilização	16
2.2.2.2. Análise de materiais de alta pureza	17
2.2.2.3. Análise de pequenas quantidades de amostra	18
2.2.2.4. Avaliação da microhomogeneidade de materiais.....	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1. Instrumentação	23
3.2. Reagentes e soluções.....	25
3.3. Amostras e materiais de referência certificados	26
3.4. Procedimento experimental.....	26
3.4.1. Descontaminação dos materiais	26
3.4.2. Preparo das amostras	27
3.4.2.1. Fígado e músculo bovino	27
3.4.2.2. Cabelo	28
3.4.3. Determinação do tamanho de partícula.....	29
3.4.4. Estudo do comportamento térmico dos elementos.....	30
3.4.5. Avaliação da homogeneidade de fígado e músculo bovino.....	31
3.4.6. Avaliação da homogeneidade do material particulado urbano.....	32

3.4.7. Digestão de amostras de fígado e músculo bovino em fornos de microondas e determinação por ETAAS e FAAS.....	33
3.4.8. Calibração	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino	35
4.1.1. Otimização do programa de aquecimento.....	35
4.1.1.1 Otimização do programa de aquecimento para cádmio	36
4.1.1.2. Otimização do programa de aquecimento para crômio.....	40
4.1.1.3. Otimização do programa de aquecimento para cobre.....	42
4.1.1.4. Otimização do programa de aquecimento para alumínio	44
4.1.1.5. Otimização do programa de aquecimento para chumbo	45
4.1.1.6. Otimização do programa de aquecimento para zinco.....	47
4.1.1.7. Otimização do programa de aquecimento para arsênio.....	49
4.1.1.8. Otimização do programa de aquecimento para níquel.....	50
4.1.2. Curvas de calibração	52
4.1.3. Validação dos métodos	58
4.1.4. Limite de detecção e massa característica.....	59
4.1.5. Avaliação da homogeneidade.....	61
4.1.5.1.Preparo das amostras e efeito do tempo de moagem no tamanho de partícula.....	61
4.1.5.2. Avaliação da massa mínima representativa e fator de homogeneidade	68
4.1.6. Análise de fígado e músculo bovino por ETAAS e SS-ETAAS	79
4.2. Determinação de As, Cd, Cr e Pb em cabelo.....	81
4.2.1. Otimização do programa de aquecimento.....	81
4.2.2. Calibração	85
4.2.3. Determinação de Cd e Pb ao longo de fios de cabelo	88
4.3. Produção de CRM.....	92
4.3.1. Determinação do tamanho de partícula de espinafre em processo de certificação	92
4.3.2. Avaliação da homogeneidade do material particulado urbano.....	93
5. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

GLOSSÁRIO

CBR: do inglês, Community Bureau of Reference

CRM: do inglês, Certified Reference Material

ETAAS: do inglês, Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

FAAS: do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry

GSR: do inglês, Gunshot Residues

IAEA: Institute Atomic of Energy Agency

ICP OES: do inglês, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

ICP-MS: do inglês, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ISO: do inglês, International Organization of Standardization

LEEAA/IO-USP: Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

NAA: do inglês, Neutron Activation Analysis

NBS: do inglês, National Bureau of Standards

NRCC: National Research Council Canada

NRCCRM: National Research Center for Certified Reference Materials

NIST: National Institute of Standard and Technology

PF: Ponto de fusão

RIA: do inglês, Radio Imuno Ensaio

RSD: do inglês, Relative Standard Deviation

SRM: do inglês, Standard Reference Material

SLS: do inglês, Lauril Sulfato de Sódio

SS OES: do inglês, Spark Source Atomic Optical Spectrometry

SSMS: do inglês, Spark Source Mass Spectrometry

SS-ETAAS: do inglês, Solid Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

T_P: Temperatura de pirólise

T_A: Temperatura de atomização

t_P: Tempo de pirólise

t_A: Tempo de atomização

T_L: Temperatura de limpeza

XRFS: do inglês, X-Ray Fluorescence Spectrometry

RESUMO

Neste trabalho foi feito um estudo sistemático para avaliar a influência dos principais parâmetros associados à análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Os parâmetros avaliados foram secagem, moagem, tamanho de partículas, massa de amostra e homogeneidade na determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni e Zn em fígado e músculo bovino. Além desses estudos foram desenvolvidos métodos para a determinação de As, Cd, Cr e Pb em cabelo e de As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb e Zn em material particulado urbano. A adequada otimização dos programas de aquecimento e o uso de modificadores químicos permitiram que, na maioria dos casos, a calibração do espectrômetro fosse feita com soluções de referência. O fígado e o músculo bovino foram preparados seguindo diferentes procedimentos de secagem: (1) liofilização e (2) secagem em forno de microondas doméstico seguida pela estufa a 60°C até atingir massa constante. O moinho de bolas e o moinho criogênico foram utilizados para a moagem. Todos os materiais apresentaram homogeneidade adequada para serem aplicados em análises de massas inferiores a 100 µg, exceto o Pb, cuja massa mínima foi de 600 µg. O fígado seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho criogênico foi o que apresentou a melhor homogeneidade, podendo ser aplicado para análise de massas em torno de 30 µg, no caso da determinação de Cu. Devido à capacidade da SS-ETAAS analisar diminutas massas de amostras, foi possível avaliar a distribuição de Cd e Pb ao longo do fio de cabelo. Esse estudo mostrou que, por meio desse tipo de análise, é possível obter informações a respeito dos episódios do passado relevantes à saúde, mesmo que a ação já tenha cessado, podendo ser utilizado em investigações forenses. O trabalho envolvendo a análise de material particulado urbano faz parte do processo de certificação de um novo material de referência certificado para microanálise (SRM 1648a), em processo de produção no National Institute of Standard and Technology (NIST). Resultados da avaliação de homogeneidade indicaram que massas de amostra inferiores a 50 µg podem ser utilizadas.

ABSTRACT

In this work, a systematic study to evaluate the influence of the main parameters associated to solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry was done. The parameters evaluated were the sample drying and grinding, the particle size, the sample size and the homogeneity and their influence on Al, As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni and Zn determinations in bovine liver and muscle. Beyond these studies, methods for As, Cd, Cr and Pb determinations in hair and As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn determinations in urban particle matter were developed. The heating program optimization and the adoption of some strategies such as the use of chemical modifier allowed, in the most of cases, analyzing solid samples against aqueous calibration. Bovine liver and muscle were prepared following different drying procedures: (1) freeze-drying process and (2) drying in a domestic microwave oven followed by drying in a stove at 60⁰C until constant mass. Ball and cryogenic mills were used to grind the samples. All prepared materials presented good homogeneity to be applied in analysis of sample mass size lower than 100 µg, except to Pb. In this case, the minimal sample mass size was 600µg. Bovine liver dried in a microwave oven followed by drying in a stove and ground in a cryogenic mill presented the best homogeneity. For Cu determination, 30 µg of this material could be used. Due to the capacity of SS-ETAAS in analyzing very low sample mass size, it was possible to evaluate the Cd and Pb distribution through the extent of the hair. This study showed that it is possible to retrieve information about past health issues, even if its cause has ceased. In this way, it can be applied in a forensic science. The urban particle matter analysis is related to certification process of the new certified reference material for microanalysis (SRM 1648a) in production process at National Institute of Standard and Technology (NIST). Results of homogeneity evaluation showed sample mass size lower than 50 µg can be used without affecting the precision and accuracy of the results.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos de amostras submetidas à análise elementar, uma grande parte se encontra na forma sólida. A forma mais usual de realizar esse tipo de análise tem sido a conversão da amostra sólida em uma solução por meio de procedimentos de decomposição por via seca ou via úmida para compostos orgânicos, dissolução ácida para sólidos inorgânicos ou por fusão para matrizes inorgânicas refratárias^{1,2}. No entanto, de um modo geral, esses métodos de tratamento de amostra consomem muito tempo, podendo variar de 5 min a 48 h ou mais, dependendo da complexidade da matriz. Além disso, sempre há um maior risco de ocorrência de erros sistemáticos como contaminações ou perdas por volatilização com prejuízo para a exatidão e a precisão dos resultados analíticos.

Nesse contexto, a possibilidade para se analisar diretamente as amostras sólidas sem nenhum ou com o mínimo tratamento prévio deve ser vista como uma boa alternativa³. De um modo geral, a análise direta de sólidos apresenta importantes vantagens quando comparada aos procedimentos convencionais: (1) simplificação no pré-tratamento da amostra diminuindo-se o tempo gasto nessa etapa, aumentando-se, assim, a frequência analítica, (2) minimização dos riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes, pouca manipulação ou baixa exposição ao ambiente, (3) minimização das perdas do analito de interesse, (4) menor periculosidade devido à não necessidade de utilizar reagentes tóxicos ou corrosivos, (5) minimização da geração de resíduos, (6) maior poder de detecção, uma vez que as amostras não são diluídas, e (7) possibilidade de se analisar pequena quantidade de amostra⁴.

Apesar das diversas vantagens associadas à análise direta de sólidos, existem algumas dificuldades que ainda precisam ser vencidas. A análise de diminutas massas de amostras reflete em resultados com baixa precisão devido, principalmente, à falta de homogeneidade do material. Nessa situação, é importante considerar que a massa mínima para análise represente a amostra como um todo sem prejuízos para a precisão e exatidão dos resultados.

A calibração é um outro desafio da análise direta de sólidos que merece destaque. Embora soluções de referência possam ser empregadas nas calibrações, em muitos casos, materiais de referência certificados (CRM) são necessários. No entanto, os CRM disponíveis comercialmente apresentam homogeneidade garantida para massas que variam entre 100 e 500 mg⁵, muito superiores às aquelas

comumente empregadas em análise direta de sólidos. Nesse contexto, é importante produzir novos materiais e avaliar a aplicabilidade dos materiais existentes nas calibrações ou validações de métodos em procedimentos de microanálise, ou seja, análises que envolvem massas inferiores a 10 mg de amostra. Cabe ressaltar que o NIST (National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, MD, USA) está direcionando esforços para produzir esses novos materiais. Atualmente, existe disponível no mercado um material certificado para microanálise, o sedimento marinho (NIST SRM 2703), cuja homogeneidade é garantida para massa igual ou superior a 0,7 mg⁶.

1.1. Objetivos

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de métodos para a determinação direta de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino, As, Cd, Cr e Pb em cabelo e As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em material particulado urbano por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólidos.

Outros objetivos do presente trabalho envolveram a avaliação da influência da secagem, moagem, homogeneidade, tamanho de partícula e massa de amostra na precisão e exatidão de Cd, Cu, Pb e Zn em fígado e músculo bovino e a homogeneidade de material particulado urbano, em processo de certificação pelo NIST, para As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Análise direta de sólidos: Aspectos gerais

2.1.1 Homogeneidade e massa de amostra

Considerando a quantidade de amostra, a SS-ETAAS pode ser classificada como a técnica que pratica a semimicro ou a submicroanálise. Esses termos estão inseridos dentro do contexto de microquímica que pode ser definida como uma parte da química analítica que extrai informações analíticas a partir de quantidades de amostra muito pequenas ($< 10 \text{ mg}$)⁷. Algumas dessas classificações estão apresentadas na Tabela 1⁸.

Tabela 1 - Magnitude da análise expressa com relação à massa de amostra empregada

Nome	Massa de amostra (g)
Macroanálise	$> 0,1$
Mesoanálise (semimicroanálise)	$0,1 - 0,01$
Microanálise	$10^{-2} - 10^{-3}$
Submicroanálise	$10^{-3} - 10^{-4}$
Ultramicroanálise	$< 10^{-4}$

Apesar da possibilidade de analisar massas de amostras tão pequenas ser uma das grandes vantagens associadas à SS-ETAAS, essa mesma característica se torna um grande desafio, pois obter resultados precisos e exatos nessas condições não é uma tarefa trivial. Em geral, massas muito pequenas ($< 100 \text{ mg}$) tendem a comprometer a representatividade e a homogeneidade, uma vez que os elementos traços podem não estar homogeneamente distribuídos nos materiais⁹. Quando a amostra é subdividida em porções cada vez menores, ela tende a se tornar cada vez mais não homogênea, pois a probabilidade de se encontrar a mesma concentração média de uma determinada espécie na porção é menor (Figura 1).

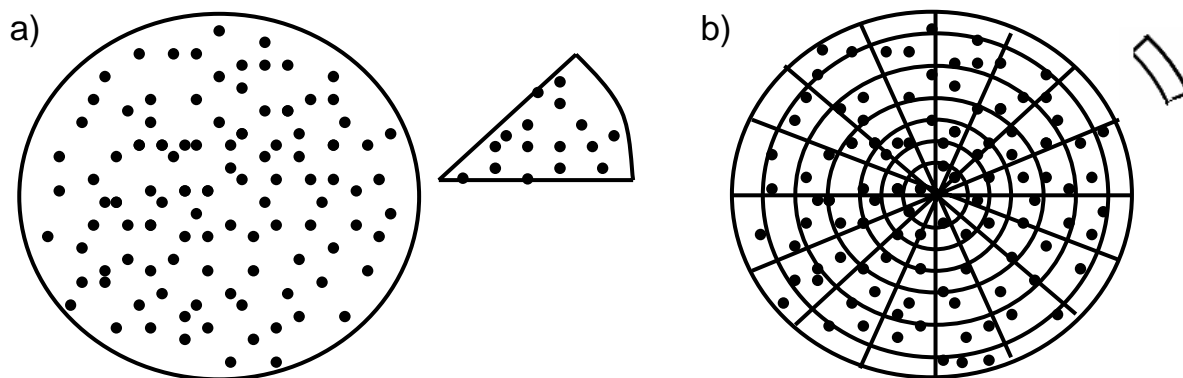


Figura 1 - Diagrama representativo da homogeneidade de um analito (•) para diferentes sub-amostragens: (a) grande massa de amostra e (b) pequena massa de amostra

Quando um material homogêneo se torna heterogêneo para pequenas massas de amostra, deve-se estabelecer uma massa mínima que seja representativa do todo para garantir a precisão e a exatidão dos resultados analíticos⁹.

A influência da massa de amostra sobre a precisão dos resultados analíticos foi avaliada por Rossbach e colaboradores¹⁰, quando verificaram que o desvio padrão relativo (RSD) das medidas diminuiu de 50% para 0,5% quando massas de amostras analisadas foram aumentadas de 0,01 mg para 100 mg.

Considerando a homogeneidade de materiais, pode-se dizer que a maioria dos sólidos, com raras exceções, como algumas ligas metálicas e vidros, é uma mistura heterogênea. Materiais biológicos, geológicos e ambientais são caracteristicamente não homogêneos sendo as rochas, os solos e os sedimentos, os materiais que apresentam composições mais heterogêneas³.

A boa homogeneidade é pré-requisito para análise direta de amostras sólidas⁵. Esse parâmetro depende de fatores como o tipo de material, a massa de amostra a ser utilizada e a concentração do elemento de interesse. Experiências têm mostrado que a heterogeneidade encontrada em pequenas massas de amostras é geralmente consequência da presença de partículas grandes chamadas "*nuggets*", nas quais podem estar contidas concentrações de elementos traços muito maiores do que aquelas encontradas em toda a amostra¹¹. Uma maneira de contornar esse tipo de problema é reduzir o tamanho das partículas das amostras, utilizando eficientes procedimentos de moagem.

A homogeneização é uma das etapas mais importantes e críticas do processo de produção de CRMs. Esses materiais são muito importantes na Química Analítica

e atuam como a principal fonte de avaliação da exatidão dos métodos propostos. Desse modo, é importante que as características desses materiais, entre elas, a homogeneidade sejam bem definidas. A maioria dos CRMs atualmente disponíveis comercialmente apresenta homogeneidade garantida somente para massas elevadas de amostra, variando entre 100 e 500 mg⁵. Isso é um problema, pois técnicas que praticam a microanálise utilizam massas de amostra, geralmente, inferiores a 10 mg. Considerando a escassez de CRMs para microanálise, é necessário que esforços sejam direcionados nesse sentido.

2.1.1.1. Avaliação da microhomogeneidade

De acordo com o Guia ISO 35¹², um material é perfeitamente homogêneo com relação a uma determinada característica, se ao comparar duas partes distintas do mesmo material, não houver diferença nos valores dessa característica. Na prática, um material pode ser considerado homogêneo com relação a uma característica se a diferença entre o valor de uma parte com relação à outra parte não puder ser identificada experimentalmente. O conceito básico de homogeneidade, portanto, engloba tanto a característica como o parâmetro da medida (geralmente o desvio padrão), incluindo a massa de amostra da porção testada.

Na prática, o grau de homogeneidade pode ser determinado fazendo-se medidas de uma propriedade (por exemplo, concentração de um elemento) em uma pequena unidade (por exemplo, massa de amostra), utilizando uma técnica de precisão relativamente elevada. Segundo Pauwels e colaboradores⁹ a escolha da técnica é um fator importante e deve ser realizada considerando-se alguns requisitos:

- Não deve requerer pré-tratamento da amostra para evitar perda de analitos e riscos de contaminações. Desse modo, incertezas provenientes de processos de digestão não influenciarão na variação das medidas.
- Deve possibilitar uma análise suficientemente precisa de pequenas massas de amostras, preferencialmente menor que 1 mg.
- Deve apresentar, preferencialmente, uma elevada frequência analítica, para que um grande número de análises possa ser efetuado em um curto espaço de tempo.

Considerando essas características, a SS-ETAAS é uma técnica que se mostra bastante conveniente para essa tarefa. Por isso vem sendo utilizada na avaliação da homogeneidade de diversos tipos de materiais.

Informações a respeito da homogeneidade de amostras foram inicialmente propostas por Igamells e Switzer¹³, quando apresentaram a constante de amostragem (K_S) para estimar a imprecisão de resultados devido a erros de amostragem:

$$RSD = (K_S/m)^{1/2} \quad \text{(Equação 1)}$$

De acordo com essa equação, K_S pode ser estimada pelo RSD das medidas das sub-amostragens de massa m . Porém, um grande problema dessa aproximação é que erros aleatórios provenientes dos procedimentos analíticos não são considerados. Nesse caso, dever-se-ia considerar essas outras incertezas (S_H) de acordo com a Equação 2.

$$S_H^2 = RSD^2 - \Sigma(\text{outras incertezas})^2 \quad \text{(Equação 2)}$$

Enquanto K_S foi originalmente proposta para estimar a homogeneidade de massas relativamente altas de amostras geológicas, Kurfürst¹⁴ introduziu o conceito de constante de homogeneidade (H_e) visando pequenas massas de amostras:

$$H_e = S_H * m^{1/2} \quad \text{(Equação 3)}$$

O erro de amostragem S_H de uma determinada massa de amostra m (em mg) pode ser estimado diretamente a partir dos valores de RSD das medidas, considerando os erros randômicos do procedimento analítico. Como a massa de amostra m empregada nessa avaliação é tipicamente 1 mg, H_e representa a imprecisão devido ao erro de amostragem para uma unidade de massa (1 mg). Quando o fator de homogeneidade é menor do que 10 ($H_e < 10$), o material pode ser considerado suficientemente homogêneo.

Aplicando essa equação, Rossbach e colaboradores¹⁰ investigaram a homogeneidade de materiais de referência de algas. Nesse estudo, os autores observaram que os materiais apresentavam boa homogeneidade ($H_e < 10$) para As, Cd, Co, K e Zn e eram não homogêneos para Na, Cr, Fe e Br. Ainda nesse estudo,

os autores observaram que enquanto H_e assegura a incerteza somente devido à heterogeneidade do material, o coeficiente de variação estaria relacionado à incerteza devido à massa de amostra utilizada. Nesse caso, os valores certificados poderiam ser escritos como:

$$\text{média} \pm H_e m^{-1/2} \%, \quad m = \text{massa de amostra (mg)} \quad (\text{Equação 4})$$

Por exemplo, estabelecendo $H_e = 5$ e concentração de Cd igual a 200 ng g^{-1} , o coeficiente de variação poderia ser calculado substituindo-se o valor da massa de amostra empregada na equação 2. Desse modo, nas determinações de Cd em algas, os autores verificaram que o coeficiente de variação quando 0,01 mg de amostra eram analisadas, era de 50%, enquanto que, para massas de 10 e 100 mg, os desvios não ultrapassam de 1,58% e 0,5 %, respectivamente.

Do mesmo modo, na avaliação da microhomogeneidade de Cd em amostras de plásticos certificados proposta por Pauwels¹⁵, foi verificado que massas de 13 a 27 mg de amostra poderiam ser utilizadas sem comprometer a representatividade da mesma. Em revisão sobre a técnica de amostragem direta de sólido por espectrometria de absorção atômica escrita por Lamgmyhr¹⁶, também consta que amostragens de massas de amostra entre 0,1 e 10 mg podem ser feitas para diversos tipos de materiais sem comprometer a representatividade e os resultados analíticos.

Por outro lado, Belarra e colaboradores¹⁷ demonstraram que massas muito elevadas também podem gerar resultados inexatos em SS-ETAAS. O estudo que visava a determinação de cobre em complexo vitamínico mostrou que o uso de elevadas massas de amostra gerava resultados superestimados, provavelmente devido à influência do resíduo da matriz presente no atomizador. Para Nakamura e colaboradores¹⁸, 0,2 a 1 mg (dependendo do analito) de amostra de rochas silicosas eram suficientes para serem analisadas. Segundo os autores, elevadas massas de amostra introduzida no atomizador podem inibir a difusão do vapor atômico. Por outro lado, Hinds e Kogan¹⁹ atribuíam a obtenção de baixo sinal analítico para o silício na sua determinação em ouro, ao fato das partículas agirem como superfícies absorvedoras dos átomos dos analitos na fase gasosa.

2.1.2. Influência do tamanho de partícula na homogeneidade

Muitos autores têm observado que há melhora da precisão, entre replicatas da mesma amostra, quando o tamanho das partículas é reduzido. Em geral, a homogeneidade desejada é assegurada pela estreita distribuição do tamanho de partículas, preferencialmente inferiores a 10 μm ^{4,5}.

Fuller e colaboradores²⁰ mostraram que as partículas das amostras de dióxido de titânio deveriam apresentar diâmetros médios inferiores a 25 μm , enquanto Nakamura e colaboradores¹⁸ observaram melhora na precisão quando as amostras de rochas foram moídas até um tamanho de partícula que variavam de 0,3 a 25 μm .

A diminuição do tamanho de partícula é uma forma de homogeneizar o material e pode ser feita por meio de procedimentos de moagem. Existem diversos tipos de moinhos que podem ser utilizados para essa finalidade entre eles, os moinhos de jato de ar, criogênicos e mecânicos. A escolha do moinho depende de diversas propriedades da matriz como a dureza e a quantidade de fibras e gorduras presentes na mesma.

Dentre os moinhos mecânicos, pode-se citar o liquidificador e o processador, o almofariz e pistilo, os moinhos de facas, disco e bolas. Nesses últimos, a moagem ocorre devido ao atrito entre o moinho e a amostra, podendo resultar no aquecimento do sistema e conseqüentemente na perda de elementos voláteis. No entanto, Lima e colaboradores²¹ não observaram perdas de elementos quando utilizaram o moinho de bolas para homogeneizar amostras liofilizadas de peixe, visando à determinação de Cd. Resultado semelhante foi observado por Januzzi e colaboradores²² ao moerem amostras de peixe com almofariz e pistilo para determinação de Se.

A homogeneização de materiais biológicos ou daqueles que apresentam alto teor de fibras ou gorduras é preferencialmente feita por moagem criogênica. Esse tipo de moagem ocorre em baixas temperaturas, na presença de nitrogênio líquido (- 196 °C), o qual provoca falhas nas estruturas cristalinas dos materiais tornando-os mais quebradiços²³. Além disso, como não há aquecimento devido ao atrito, como ocorre nos moinhos mecânicos, as perdas de elementos voláteis são minimizadas. Esse sistema foi introduzido por Iyengar e Kasperek²⁴ no estudo de homogeneidade de alguns elementos em materiais biológicos. Os autores

verificaram que a distribuição de Fe, Mn, Rb, Se e Zn era da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e de Ag e Co, da ordem de ng g^{-1} .

A influência da temperatura sobre a eficiência de moagem foi verificada por De Boer e Maessen²⁵. Nesse estudo, os autores moeram placenta humana em ambiente de nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de acetona ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Resultados mostraram uma relação direta entre o tamanho de partículas para menores temperaturas. Mierzwa e colaboradores²⁶ também observaram que a baixa temperatura melhorava a eficiência de moagem, quando testou um processador associado a um sistema de resfriamento gerado por nitrogênio líquido para moer amostras de folhas de chá.

Para Fajgelj e Zeisler²⁷, dentre os diversos moinhos existentes, o moinho de jato de ar é o mais apropriado para moer amostras biológicas e ambientais. Eles chegaram a essa conclusão depois de avaliarem a distribuição do tamanho de partícula de diversos materiais certificados pelo IAEA (International Atomic Energy Agency, Viena, Áustria) e NIST. Os materiais moídos com moinho de jato de ar foram os que apresentaram as menores distribuições no tamanho de partículas e, portanto, são os mais adequados para serem aplicados em microanálises.

2.1.3. Influência do tamanho de partícula na atomização eletrotérmica

Sinais transientes de absorvância provenientes de elementos que se encontram em solução e daqueles que estão associados à matriz, muitas vezes, apresentam diferenças distintas no tempo de aparecimento e na duração. Na Figura 2 estão apresentados os sinais de absorção de Pb provenientes de solução aquosa preparada com $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Figura 2a) e de suspensão de sedimento de rio (Figura 2b)³. O sinal de absorvância para o Pb, proveniente da suspensão, possui um maior tempo de duração em relação ao sinal obtido com solução aquosa. Essas diferenças se devem principalmente às condições do forno, aos efeitos de transferência de calor, à cinética de evaporação do analito e às forças físicas e químicas existentes entre o analito e a matriz sólida³. Muitas vezes, quando a amostra é introduzida na forma de solução, a etapa de secagem do programa de aquecimento resulta em uma deposição uniforme dos microcristais dos sais. A maioria dessas partículas entra em contato direto com a superfície da plataforma de grafite e como os tamanhos das partículas são muito menores, quando comparado a grande massa

de grafite, o efeito de transferência de calor se torna desprezível. No entanto, quando uma amostra sólida é introduzida, a distribuição das partículas sobre a plataforma já não é mais tão uniforme. Nesse caso, a transferência de calor para partículas maiores, em relação aos microcristais obtidos das soluções, é menor, resultando, assim, no alargamento do sinal de absorvância.

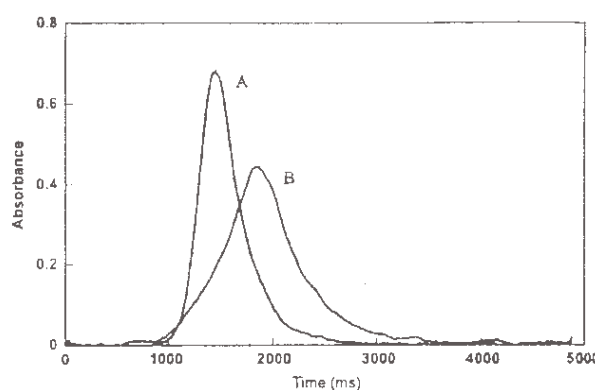


Figura 2 - Sinais de absorvância de Pb (1 ng) introduzido no forno de grafite como (A) solução aquosa, e (B) suspensão de sedimento de rio⁴.

FONTE: Kurfüst, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, 1998

Um outro aspecto que dificulta o processo de atomização é a velocidade de difusão do analito através da amostra. Nesse contexto, o tamanho da partícula se torna um parâmetro crucial, uma vez que o tempo de migração do analito dependerá do diâmetro médio da partícula, ou seja, quanto maior a partícula, maior será a dificuldade para o analito se libertar da mesma, alterando, assim, a cinética de atomização. Em soluções aquosas, essas variações cinéticas são desprezíveis quando a medida do sinal analítico de absorvância for feita em área de pico. No entanto, para a análise direta de sólidos, o alargamento do pico pode estar relacionado não somente a parâmetros cinéticos, como difusionais e de oclusão.

A baixa eficiência de atomização, provocada pela dificuldade de difusão do analito, foi verificada por Bendicho e Loos-Vollebregt²⁸ na determinação de Cu, Co, Cr, Mn, Fe e Ni em vidro. O tempo de aparecimento do sinal de absorvância de Mn e Fe, em amostras de pó de vidro introduzidas na forma de suspensão, era maior em relação àqueles obtidos com soluções aquosas. Estudos de microscopia revelaram que as partículas de vidros se fundiam durante a etapa de secagem e se aglomeravam formando gotas grandes. Essas, por sua vez, atuavam como uma barreira aos analitos, dificultando sua libertação.

Takada e Hirokawa²⁹ observaram que a área superficial das partículas exerce importante influência sobre o processo de atomização do Cu em amostras de aço. Segundo os autores, quando sucessivos procedimentos de atomização são aplicados a uma amostra com partículas de forma esférica, somente após n atomizações, o sinal de absorção desaparece. Isso ocorre, pois cada esfera é subdividida em várias camadas com uma determinada espessura (d), como apresentado na Figura 3.

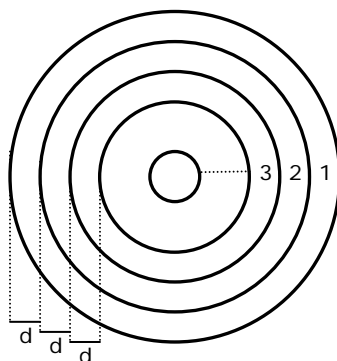


Figura 3 - Modelo das repetidas atomizações para amostras com partículas esféricas²⁹.

FONTE: Takada, K.; Hirokawa, K; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **312** (1982) 109-113.

Durante a primeira atomização, o Cu presente na camada mais externa é vaporizado (camada 1) enquanto o Cu da segunda camada se difunde para a primeira e da terceira, para a segunda e assim sucessivamente. Na segunda atomização, o Cu da camada mais externa é atomizado e todo o processo de difusão se repete. Sendo assim, de acordo com o modelo proposto é possível entender que, quanto maior o tamanho da partícula, maior tempo ou temperatura de atomização serão necessários para atomizar todo o analito.

2.2. Análise direta de sólidos

A análise direta de sólidos pode ser feita seguindo dois procedimentos distintos: via suspensão ou amostragem direta³⁰. Os dois procedimentos apresentam todas as vantagens da análise direta de sólidos, como já foi mencionado anteriormente. A grande vantagem do procedimento que emprega o preparo das suspensões é que o mesmo combina a amostragem sólida com a líquida, ou seja, as amostras podem ser introduzidas no equipamento utilizando o sistema de amostragem de soluções, por exemplo, com um nebulizador

pneumático³¹. No caso da amostragem direta, é necessário um sistema especial para a introdução da amostra.

Apesar de reunir diversas vantagens, o procedimento de suspensão não está isento de algumas dificuldades. Entre eles, pode-se destacar como fator crítico, a estabilidade da suspensão que pode comprometer a reprodutibilidade na amostragem e conseqüentemente, a precisão dos resultados. Um outro fator que deve ser rigorosamente controlado é o tamanho de partículas, pois esse pode prejudicar a eficiência no transporte ou causar entupimento dos nebulizadores.

A análise direta de sólido seja na forma de suspensão ou amostragem direta pode ser efetuada utilizando-se diversas técnicas analíticas. Algumas mais tradicionais como a espectrometria de emissão óptica com fonte de arco e centelha (SS OES) possui baixa precisão³, a espectrometria de fluorescência de raio-X (XRFS) apresenta baixa sensibilidade e a análise por ativação de nêutron (NAA), requer instrumentação complexa e de alto custo³. Nos últimos anos, muitos esforços foram centralizados na tentativa de adaptar a análise direta de sólidos a outras técnicas espectroanalíticas, como a espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio induzido (ICP OES), a espectrometria de massas acoplada a fonte de plasma (ICP-MS), ou a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e com atomização eletrotérmica (ETAAS)⁵.

Apesar dos inúmeros esforços que tem sido realizados para adaptar essas técnicas espectroscópicas à análise direta de sólidos, pode-se dizer que nenhuma delas se mostra inteiramente satisfatória. Idealmente, um método de análise direta de sólidos deve apresentar alguns atributos listado a seguir⁴:

- (i) Deve ser aplicável a uma grande variedade de amostras
- (ii) Deve ser relativamente rápido
- (iii) A padronização deve ser simples
- (iv) Deve possibilitar a análise de elevadas massas de amostra para evitar problemas de homogeneidade
- (v) É desejável que seja multielementar
- (vi) O custo por análise deve ser o mais baixo possível
- (vii) Deve apresentar boa precisão e exatidão

A ICP OES e ICP-MS são excelentes fontes de vaporização, atomização, ionização e excitação de espécies químicas. Na maioria das aplicações analíticas, a amostra é convertida em solução antes de ser introduzida no equipamento. Esse

requerimento deriva da vasta experiência da nebulização dos líquidos que facilitou o desenvolvimento inicial dos plasmas analíticos. No entanto, não há nenhuma limitação que impeça o uso dos ICPs para análise direta de sólidos. Pelo contrário, as características dessas fontes como a elevada energia do plasma, que melhora a eficiência de atomização, torna os ICPs potencialmente atrativos para essa função. Em análise direta de sólidos por ICPs, é importante adaptar os espectrometros com sistemas de introdução de amostra específicos.

Os nebulizadores com ranhura em V e fluxo cruzado são comumente empregados para introdução de soluções ou suspensões³³, enquanto a ablação a laser³⁴ e vaporização eletrotérmica³⁵ possibilitam a amostragem direta de sólidos. Segundo Silva e colaboradores³⁶, a principal dificuldade encontrada na utilização de nebulizadores para a introdução de suspensões está relacionada ao tamanho de partículas que deve ser rigorosamente controlado para que a eficiência no transporte e a sensibilidade não sejam prejudicadas.

No sistema de ablação a laser, a introdução da amostra ocorre após a volatilização de uma pequena fração de amostra a partir da ação de um laser de baixa frequência. Embora esse sistema apresente como as principais vantagens a possibilidade de utilizar pequenas massas de amostras (~ microgramas), e permitir a caracterização espacial de homogeneidade da amostra, ela apresenta algumas limitações que impedem a sua larga utilização em laboratórios de rotina. O alto custo, a baixa eficiência no transporte, a necessidade de um rigoroso controle sobre o tamanho de partículas e a dificuldade encontrada na calibração são alguns exemplos.

A atomização eletrotérmica, por sua vez, apresenta algumas vantagens quando comparada aos nebulizadores pneumáticos ou sistemas de ablação a laser. Sua elevada eficiência no transporte (100%) possibilita analisar pequenas massas de amostras e fornece limites de detecção superiores àqueles obtidos por técnicas que empregam nebulizadores pneumáticos. Adicionalmente, o programa de aquecimento possibilita a remoção da matriz, o qual minimiza os problemas de interferências.

Assim como os ICPs, a FAAS que também é conhecida por analisar, comumente, amostras na forma de solução, possibilita a análise na forma de suspensão ou sólido direto. No entanto, a nebulização de suspensões apresenta baixa eficiência de transporte e baixa eficiência de atomização, pois as partículas sólidas são mais difíceis de serem dissociadas quando comparadas às soluções.

Adaptando um sistema especial para introdução de amostra sólida na chama, Flores e colaboradores³⁷⁻³⁹ tornaram possível a determinação direta de Cd, Cu e Mn em sedimentos, fígado bovino e carvão, respectivamente. Os resultados obtidos foram satisfatórios, mas a necessidade de um controle rigoroso no tamanho das partículas visando à eficiência do transporte foi uma das dificuldades que teve que ser superada. Outro problema relacionado ao procedimento proposto é a necessidade de construir a curva analítica de calibração com materiais de referência que possuíssem composição semelhante às das amostras, pois a composição da matriz afetava os processos de transporte e atomização. Desse modo, o uso de materiais de referência certificados foi praticamente obrigatório.

A ETAAS apresenta algumas características que favorecem a amostragem direta de sólidos, seja na forma de suspensão ou na forma de introdução direta de sólidos⁶: (1) o programa de aquecimento que permite o pré-tratamento térmico da amostra, sobretudo durante a etapa de pirólise, facilita a remoção de parte dos concomitantes que podem provocar interferências durante a atomização; (2) pequenas quantidades de amostras podem ser analisadas; e (3) apresenta boa seletividade e sensibilidade. Além disso, os problemas relacionados ao sistema de transporte são praticamente inexistentes, uma vez que o transporte das suspensões é feito por amostragem discreta (não depende de nebulizadores), enquanto os sólidos são pesados diretamente nas plataformas de grafite que são, posteriormente, introduzidas no atomizador eletrotérmico. A adequada otimização dos programas de aquecimento, aliada ao uso de modificadores químicos tem possibilitado a calibração do equipamento com soluções de referência. Devido à todas essas características, SS-ETAAS tem se mostrado muito atrativa e promissora para a determinação de elementos em níveis de traços e ultra-traços em diversos tipos de amostras sólidas e vem se concretizando como uma alternativa rápida e simples^{3,4}.

2.2.1. Espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos - Abordagem histórica

A SS-ETAAS é quase tão antiga quanto à própria técnica de AAS. Boris L' Vov foi um dos pioneiros, quando testou o desempenho do seu modelo de forno de grafite após a amostragem direta de NaCl, visando à determinação elementar de Cu^{40,41}. O primeiro forno de grafite idealizado por L'Vov apresentava uma

configuração que era bastante adequada para amostragem direta de sólidos⁴². Na simplificação do modelo, posteriormente proposta por Massmann, e que foi aquela adotada pela maioria dos fabricantes, a amostragem direta de sólidos não era tão trivial⁴³. Acredita-se que por esse motivo, a técnica de ETAAS é utilizada até hoje predominantemente para a análise de amostras na forma de solução aquosa³.

Ao longo do desenvolvimento instrumental da ETAAS, diversos acessórios e modificações nos fornos surgiram na tentativa de facilitar e permitir a análise direta de sólidos^{4,44}. É conveniente salientar que nesses trabalhos iniciais as adaptações eram feitas no sentido de viabilizar a introdução de amostra sólida em um atomizador convencional utilizado para amostragem de soluções aquosas.

Apesar do interesse na análise direta de sólidos por ETAAS, as pesquisas que culminaram em um modelo de forno de grafite designado para essa finalidade se intensificaram a partir da década de 80³. Dois fatores podem ser atribuídos a esse crescente interesse: o surgimento dos tubos de grafite com aquecimento transversal, que conferem maior isothermicidade durante a atomização, e o uso de corretores de radiação de fundo baseados no efeito Zeeman, que apresentam melhor eficiência do que os corretores com lâmpada de deutério.

Atualmente, encontra-se comercialmente disponível um modelo de espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica que opera no modo convencional, com solução aquosa, ou com amostragem direta de sólidos. Nesse equipamento, a amostra sólida é pesada diretamente sobre uma plataforma de grafite pirolítico (Figura 4), que é inserida no interior do tubo de grafite por uma janela lateral com auxílio de uma pinça⁴⁵. Esses sistemas de amostragem podem ser muito simples, com operação manual (Figura 5a), ou mais sofisticados, com as operações totalmente automatizadas (Figura 5b).



Figura 4 - Plataforma de grafite pirolítico utilizada em SS-ETAAS

FONTE: manual da AnalytikJenaAG

a)



b)



Figura 5 - Fotografias de amostradores de sólidos: (a) manual e (b) automático.

FONTE: manual da AnalytikJenaAG

2.2.2. Análise direta de sólidos por ETAAS: Características e aplicações

Considerando todas as características associadas à SS-ETAAS, pode-se inferir que existem algumas situações específicas nas quais a sua aplicação é conveniente³⁵:

- (i) Análise de materiais refratários de difícil decomposição
- (ii) Análise de materiais de alta pureza
- (iii) Análise de pequenas quantidades de amostra
- (iv) Avaliação da microhomogeneidade

2.2.2.1. Análise de materiais refratários de difícil solubilização

A possibilidade de analisar materiais sólidos diretamente sem a necessidade de digestão é um atrativo da SS-ETAAS, principalmente nos casos em que as amostras são de difícil decomposição. Em geral, esse tipo de amostra requer condições drásticas para que a solubilização completa seja alcançada. A elevada temperatura e/ou pressão, e a necessidade de utilizar misturas de diferentes reagentes são alguns exemplos. Existem ainda situações nas quais a solubilização da amostra é alcançada somente mediante procedimentos de fusão. É importante salientar que, nesses casos, a introdução de contaminação é bastante provável e o elevado teor salino da solução final pode comprometer a posterior detecção.

Schäffer e Krivan⁴⁶ verificaram que a determinação direta de alguns elementos em amostra de carbeto de silício por SS-ETAAS era muito mais atrativa, simples e rápida do que aquela obtida após submetê-la a digestão ácida. No procedimento desenvolvido, a determinação era efetuada em alguns minutos, enquanto o processo de digestão demorava cerca de 12 h e deveria ser feito em sistema fechado (alta pressão) utilizando misturas de ácidos concentrados (HF, HNO₃ e H₂SO₄). A digestão de amostras de óxidos de tungstênio também é bastante demorada (6 horas) e requer condições drásticas para ocorrer (sistema de alta pressão, alta temperatura e uso de mistura de reagentes). No entanto, Hornung e Krivan⁴⁷ desenvolveram um procedimento rápido (3 a 6 minutos) para determinação direta de algumas impurezas nesse tipo de amostra. Da mesma maneira, Krivan e Janickova⁴⁸ determinaram 9 impurezas em óxido de zircônio de alta pureza. Segundo os autores, a técnica SS-ETAAS apresenta limites de detecção muito melhores que os procedimentos convencionais. Além disso, por possibilitar a separação analito/matriz *in situ*, o tempo de análise pode ser reduzido de algumas horas para somente alguns minutos.

2.2.2.2. Análise de materiais de alta pureza

Ao contrário do que ocorre em procedimentos de digestão, o risco de contaminação em SS-ETAAS é muito menor, uma vez que a manipulação e o uso de reagentes são mínimos. Com isso, a técnica pode ser caracterizada por apresentar baixo valor do branco analítico e de limite de detecção. Além disso, como a SS-ETAAS apresenta a elevada sensibilidade como uma de suas principais características, ela tem sido intensamente empregada nas determinações de alguns elementos em materiais tecnológicos de alta pureza. O carbeto de silício⁴⁶ e óxido de tungstênio⁴⁷, anteriormente mencionados são alguns exemplos.

Huang e Krivan⁴⁹ também desenvolveram um procedimento que possibilitou a determinação de algumas impurezas como Al, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, e Zn em amostras de pentóxido de nióbio de alta pureza. Muitos desses metais devem estar presentes na amostra em concentrações inferiores a 0,2 µg g⁻¹, pois dependendo da sua aplicação, a pureza exigida desse material varia de 99,9 a 99,999%. Para cada determinação, massa de aproximadamente 15 mg de amostra foi necessária. Os limites de detecção obtidos variaram de 0,5 a 2 ng g⁻¹, ou seja, 330 vezes melhores do que os obtidos após digestão e análise por ETAAS.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lucic e Krivan⁵⁰, na determinação de alguns elementos em óxido de alumínio de alta pureza. Enquanto os limites de detecção obtidos na análise de suspensões por ETAAS e por ICP OES foram de 5 e 130 ng g⁻¹ e 2,1 e 900 ng g⁻¹, respectivamente, para SS-ETAAS, o menor e o maior valor encontrado foi de 0,5 (Zn) e 25 (Co) ng g⁻¹.

Dong e Krivan⁵¹ também fizeram uso da SS-ETAAS para determinar Si em amostras de óxido de nióbio, titânio e zircônio. Como esses materiais têm importantes aplicações no campo da alta tecnologia, suas purezas devem ser superiores a 99,997%, especificamente para Si, a concentração deve ser inferior a 1 µg g⁻¹. Dentre várias técnicas testadas como a análise de suspensão por ETAAS e ICP OES, ou a análise direta de sólidos por XRF e SSMS, a SS-ETAAS foi a que apresentou menores valores de limite de detecção e a única que possibilitou a quantificação de Si em amostra de óxido de nióbio (1,1 µg g⁻¹).

2.2.2.3. Análise de pequenas quantidades de amostra

Em certos casos, a determinação de baixa concentração é acompanhada de um complicador, a quantidade de material disponível para análise. Como exemplo, pode-se citar as investigações de intoxicação por exposição a metais tóxicos por meio de análises de cabelo, pele, unha, dente, osso, fluidos biológicos, tecidos biológicos e saliva. Devido ao fato de muitos desses materiais serem obtidos por meio de procedimentos como a necrópsia ou biópsia, nas quais a quantidade retirada é muito pequena, o uso da SS-ETAAS para a determinação elementar se torna uma opção conveniente.

Na tentativa de simular uma situação real de biópsia, Herber e colaboradores⁵² fizeram a determinação de Cd em placenta de rato utilizando dois procedimentos diferentes: análise direta e determinação após decomposição da amostra por ETAAS. Como resultado, o autor concluiu que a análise direta era mais rápida e menos susceptível à contaminação, sendo por isso a mais conveniente nessas situações. Nordahl e colaboradores⁵³ também fizeram uso da SS-ETAAS e obteve sucesso na determinação de Al em cérebro proveniente de necrópsia e em mucosas retiradas por procedimentos de biópsia.

A análise química aplicada às investigações forenses é uma outra situação na qual a disponibilidade de amostra, geralmente, é baixa. A análise de resíduos de armas de fogo (GSR, do inglês, *gunshot residues*) é um exemplo que contribui

significativamente na investigação de casos criminais envolvendo a utilização de armas de fogo. GSR são substâncias liberadas das armas durante o disparo e que podem, posteriormente, ser analisadas por diferentes métodos analíticos. Os elementos comumente analisados são o Pb, Ba e Sb, seguido pelos Sn, Ti, Mn, Hg, Al, Cu, Fe, Si, K e S, pois os mesmos fazem parte da composição das armas e projéteis. De um modo geral, a análise de GSR permite desvendar alguns fatos como a reconstrução do evento, encontrar alguma informação sobre o autor do disparo e obter informações sobre o tipo de arma e munição utilizadas.

Nesse contexto, muitas técnicas analíticas tem sido utilizadas na determinação de GSR. Lichtenberg⁵⁴ avaliou a distribuição de Pb e Sb por SS-ETAAS na mão de um suspeito que fez disparos com armas de fogo. Nesse estudo, foi possível fazer a determinação da concentração desses elementos ao longo do dedo indicador até parte da mão onde a arma é apoiada. Os resultados mostraram que a concentração do elemento de interesse é maior na ponta do dedo e na mão, sendo que os menores valores encontravam-se ao longo do dedo. Estudo parecido foi proposto por Lücker⁵⁵ quando verificou a distribuição de Pb nos tecidos musculares de patos, após disparos com arma de fogo.

A avaliação de penas de aves como biomonitorios de contaminação é um outro exemplo de aplicação da SS-ETAAS na forense ambiental. No estudo conduzido por Hahn e colaboradores⁵⁶, amostragens de pequenas massas ao longo das penas de aves foram feitas e os resultados mostraram que o Cd e Pb estavam presentes em maiores concentrações na parte externa da pena (região mais distante da raiz), indicando que a contaminação dos animais era exógena (por exemplo, pelo meio ambiente). Ao contrário, a concentração de Hg era praticamente a mesma ao longo de toda a pena, indicando contaminação endógena, proveniente de alimentos, por exemplo.

A análise de cabelo para fins forenses é um outro importante exemplo que merece destaque. O primeiro caso de investigação de envenenamento através da análise de cabelo foi publicado em 1858, por Hoppe, na Inglaterra, quando determinou As no cabelo de um cadáver exumado 11 anos após o sepultamento⁵⁷. Aproximadamente 100 anos depois, em 1954, Goldblum determinou anfetamina em pelos de cobaia. No entanto, a publicação que realmente garantiu a relevância do uso de cabelo para determinação de drogas ocorreu em 1979, quando Baumgartner e colaboradores analisaram opiáceos em cabelo por radioimunoensaio (RIA) após extração com metanol⁵⁸.

Um fato que merece destaque é a investigação sobre a morte de Napoleão Bonaparte na qual, sua sucessiva exposição a As pôde ser verificada através da análise de seu cabelo por NAA. Segmentos do cabelo foram analisados de modo que foi possível verificar as diferentes exposições de Napoleão ao As. Isso foi possível, pois o As ligou-se irreversivelmente às proteínas do cabelo, cujo crescimento diário do folículo é de aproximadamente 0,35 mm, fazendo com que a distribuição do elemento ocorresse de forma segmentada⁵⁹. Partindo dessa mesma idéia, cabelos de uma população de um vilarejo no Iraque também foram analisados para comprovar a contaminação por Hg proveniente do trigo (utilizado na fabricação de pães) tratado com fungicida à base de compostos de mercúrio⁶⁰.

Segundo vários autores, o cabelo é um “dosímetro biológico” que registra o ambiente no qual o indivíduo foi exposto. Isso ocorre porque se o indivíduo for exposto a um determinado elemento químico e droga, por contaminação externa ou por ingestão, a substância estará presente no cabelo depois de um período. O sangue e a urina são as amostras mais comumente utilizadas na avaliação da concentração de elementos traços no ser humano. No entanto, a análise desse tipo de amostra permite avaliar somente a exposição atual, enquanto a análise do cabelo permite reconstruir episódios do passado relevantes à saúde, mesmo que a ação já tenha cessado^{61,62}. Além disso, muitas outras vantagens estão ligadas à utilização do cabelo para determinação de elementos-traços: (a) é uma matriz mais simples e de fácil estocagem, transporte e manuseio, (b) é estável e não requer ambiente refrigerado nem uso de preservantes, (c) os analitos estão, muitas vezes, contidos em concentrações mais elevadas, fato que facilita a análise. Devido à essas características, a análise de cabelo tem se mostrado como uma boa alternativa para diagnosticar carência nutricional de elementos traços bem como intoxicação e exposição a metais tóxicos⁶³.

O grande aumento no interesse em analisar cabelos, resultou no surgimento de diversas redes de laboratórios comerciais. No entanto, é sabido que desde 1854 até hoje, a análise do cabelo têm gerado muitas controvérsias⁶⁴. Isso ocorre devido a uma grande dificuldade em diferenciar a contaminação endógena da exógena. Além disso, as concentrações de elementos traços no cabelo podem ser, consideravelmente, influenciadas por alguns fatores como sexo, raça, pigmentação e tipo de cabelo, idade, localização geográfica, hábitos alimentares, uso de medicamentos e cosméticos^{59,63}. No entanto, conhecendo-se o histórico do

indivíduo e efetuando-se a lavagem adequada das amostras de cabelo, resultados que diferenciam a contaminação endógena da exógena podem ser obtidos⁶⁵.

São muitas as aplicações voltadas à análise de cabelo. Dentre elas pode-se destacar a determinação de elementos traços como uma ferramenta para avaliar o estado nutricional ou toxicológico^{66,67}, o impacto ambiental sobre a saúde humana^{68,69}, e para desvendar crimes e investigar casos de morte por envenenamento^{70,71}.

Dentre todas as aplicações, a possibilidade em desvendar crimes ou reconstruir episódios nutricionais ou toxicológicos do passado torna essa amostra bastante atraente para ser aplicada na química forense. Em geral, nessas situações, pequenas quantidades de amostras de cabelo são analisadas, requerendo, portanto uma técnica como a SS-ETAAS, que apresenta de elevada sensibilidade e possibilita analisar com precisão e exatidão, diminutas massas de amostras.

2.2.2.4. Avaliação da microhomogeneidade de materiais

Os CRMs têm papel fundamental no controle de qualidade analítico e têm sido intensamente utilizados na Química Analítica. A necessidade em comparar resultados entre laboratórios e entre países cresceu a partir de 1906, período no qual a NBS (US National Bureau of Standards) começou o programa de fornecimento desse tipo de material. Desde então, a confiança em todos os resultados analíticos é fortemente dependente da disponibilidade desse tipo de material⁷², uma vez que, eles apresentam características e concentrações de analitos bem definidas, podendo ser utilizado como parâmetro para verificar a confiabilidade de um método analítico.

Os CRMs são produtos relativamente caros⁷³. Isso se deve ao fato da sua produção ser bastante complexa e exigir muitos cuidados para que a qualidade analítica do mesmo seja mantida. Evitar perdas de compostos ou contaminações durante a transformação do material ou manter a composição química da mesma são alguns dos cuidados requeridos⁷⁴. Além disso, muitos desses materiais, principalmente os biológicos, requerem condições de estocagem especiais como temperaturas e umidade controladas⁷³.

Como os CRMs são materiais ou substâncias cuja propriedade e homogeneidade são bem definidas e estabelecidas e por esse motivo, utilizado para

certificações de métodos⁷⁵, o controle sobre o processo de sua produção é de extrema importância e ele deve ser feito de forma a avaliar a composição do material antes, durante e depois da produção. A detecção de eventual contaminação ou perda do analito de interesse durante a produção do material e a avaliação das mudanças na microdistribuição dos elementos nas amostras são alguns dos controles mais comumente realizados^{76,77}.

A SS-ETAAS vem sendo intensamente utilizada para realizar tais controles na produção e padronização de diversos tecidos animais utilizados como materiais de referência certificados (CRMs). Segundo Pauwells e colaboradores⁹, essa técnica apresenta 3 características importantes que são exigidas nessa situação: (1) o método não deve requerer pré-tratamento de amostra para que contaminações ou perdas de analitos por volatilização sejam evitadas; (2) análises precisas devem ser realizadas utilizando massas de amostras muito pequenas (<1 mg); e (3) o procedimento deve ser rápido e permitir que grande número de análises seja feito em curto espaço de tempo.

A aplicação da SS-ETAAS na avaliação da microhomogeneidade de materiais é um dos estudos mais explorados na literatura. No estudo visando avaliar a homogeneidade na distribuição de Cd e Pb em materiais certificados de farinha de trigo e de arroz, fígado e músculo bovino, leite em pó, rim suíno, pão e peixe, proposto por Mohl e colaboradores⁷⁸, as massas de amostras variaram de 0,04 a 5 mg. Dentre os materiais avaliados, os autores observaram que a distribuição de Cd em farinha de milho e arroz era homogênea, enquanto em fígado bovino, a heterogeneidade era predominante. Com relação ao Pb, o rim suíno mostrou-se o mais homogêneo e o fígado bovino, o menos. Da mesma maneira, Pauwells e colaboradores⁷⁹ verificaram que Cd e Pb não estão homogeneamente distribuídos em amostras de músculo de bacalhau certificado. Por outro lado, a distribuição de Hg, Fe e Zn é homogênea. Bagschick e colaboradores⁸⁰, por sua vez, demonstraram que a homogeneidade de Cd, Cu, Ni e Pb em diversos vegetais era bastante satisfatória, mesmo quando massas de amostra inferiores a 2 mg foram utilizadas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

Todas as determinações foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica, modelo ZEE nit[®] 60 (AnalytikJena AG, Jena, Alemanha) equipado com corretor Zeeman de 2 e 3 campos, atomizador recoberto com grafite pirolítico, aquecido transversalmente e plataforma de grafite pirolítico. O espectrômetro foi operado com lâmpadas de cátodo oco de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn utilizando os parâmetros apresentados na Tabela 2. Todas as medidas foram baseadas em valores de absorbância integrada. O gás de purga utilizado foi argônio 99,998% (v/v) (Air Liquide Brasil, São Paulo, Brasil).

As amostras foram pesadas diretamente nas plataformas em uma microbalança, modelo Auto Balance AD-4 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) e essas, transferidas para o tubo de grafite utilizando um amostrador mecânico de sólidos, modelo SSA-6 Z (AnalytikJenaAG, Jena, Alemanha). A transferência da amostra para a plataforma foi realizada com uma microespátula de aço inoxidável.

A secagem das amostras foi efetuada em forno de microondas doméstico (Consul – 300 W), estufa (Fanen, 300^oC) e liofilizador (E – C Micro Módulo).

Um moinho criogênico Spex 6750 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, USA) e um moinho de bolas 8000 M Spex CertPrep (Spex, Metuchen, NJ, USA) equipado com frascos e bolas de carbeto de tungstênio e/ou aço inoxidável foram utilizados para moagem das amostras de fígado e músculo bovino.

As determinações da distribuição do tamanho de partícula foram feitas utilizando a técnica de espalhamento de luz de baixo ângulo (LALLS, Low Angle Laser Light Scattering), em equipamento da Master Instruments, Ltd. A característica dessa técnica é que todas as partículas são tratadas como esferas, portanto, todas as medidas das partículas são fornecidas em diâmetros.

Para comparação dos resultados, as amostras de fígado e músculo bovino foram digeridas em forno de microondas com cavidade, modelo Microwave 3000 (AntonPaar, Graz, Áustria). As determinações de Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb foram feitas no mesmo espectrômetro com os mesmos parâmetros instrumentais utilizados para análise direta de sólido, porém equipado com o amostrador automático de soluções, modelo AS 52, (AnalytikJena, Jena, Alemanha). O Cu e o Zn, foram determinados em um espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo AA5-

FL (AnalytikJenaAG, Jena, Alemanha) equipado com amostrador automático (AS 52, AnalytikJena AG), utilizando os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Parâmetros instrumentais para determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn nas amostras por SS-ETAAS.

Analito	Amostra	λ (nm)	Resolução (nm)
Al	Fígado/Músculo bovino	309,3	0,5
As	Hepatopâncreas de lagosta/Cabelo	193,7	0,8
	Material particulado	197,2	0,8
Cd	Fígado/Cabelo	228,8	0,8
	Material particulado	326,1	0,8
Cr	Fígado/Músculo bovino/Cabelo	357,9	0,2
Cu	Fígado	216,5	0,8
	Músculo*	324,8	0,8
	Material particulado	216,5	0,5
Ni	Fígado/Músculo bovino	232,0	0,5
	Material particulado	234,6	0,5
Pb	Fígado/Cabelo	217,0	0,5
	Material particulado	368,3	0,2
Zn	Fígado/Músculo bovino	307,6	0,8
	Material Particulado	307,6	0,2

2 campos e intensidade de 0,8 T

*3 campos

Tabela 3 - Parâmetros instrumentais para determinação de Cu e Zn em fígado e músculo bovino por FAAS.

	Cu	Zn
Corrente da lâmpada (mA)	4,0	4,0
Comprimento de onda (nm)	324,8	213,9
Resolução (nm)	0,8	0,5
Altura de observação (mm)	6	5
Vazão de C₂H₂ (L h⁻¹)	70	70
Vazão de ar (L h⁻¹)	430	430

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza (18 MΩ cm) obtida pelo sistema de ultrapurificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico como o H₂O₂ e Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha). O HNO₃ (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição utilizando subdestilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil).

Soluções analíticas de referência de Al(III), As(III), Cd(II), Cr(III), Cu(II), Pb(II), Ni(II) e Zn(II), foram preparadas em meio de 0,1% v/v de HNO₃ por sucessivas diluições da solução estoque 1000 mg L⁻¹ Al(NO₃)₃, As₂O₃, CdCl₂, Cr(III), CuCl₂, NiCl₂, Pb(NO₃)₂ e ZnCl₂ (Tritisol, Merck)

Os modificadores químicos foram preparados por diluição de soluções contendo 10 g/L de Pd(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂, NH₄H₂PO₄, Na₂WO₄.2H₂O (Suprapur, Merck), RhCl₆ (Sigma, St. Louis, MO, USA) e Ir (Na₂IrCl₆, Merck) em meio de HCl. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno descontaminados (Nalge Company, Rochester, NY, USA).

3.3. Amostras e materiais de referência certificados

Um fígado inteiro de boi (~ 5 kg) e pedaços de músculo bovino (~ 3 kg) foram comprados em açougue da cidade de São Paulo. Amostras de cabelo foram obtidas de indivíduos do próprio laboratório.

Para validação dos métodos desenvolvidos para amostragem direta de sólido, foram utilizados CRMs fornecidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), National Research Council Canada (NRCC), National Research Center for Certified Reference Materials (NRC CRM) e Community Bureau of Reference (CBR):

- ✓ Fígado bovino, NIST (SRM 1577b)
- ✓ Músculo bovino, NIST (SRM 8414)
- ✓ Hepatopâncreas de lagosta, NRCC (TORT-1 e TORT-2)
- ✓ Cabelo humano, NRC CRM (GBW 09101)
- ✓ Cabelo humano, BCR (BCR 397)
- ✓ Espinafre, NIST (SRM 1570)
- ✓ Sedimento marinho, NIST (SRM 2703)
- ✓ Espinafre, NIST (SRM 1570a) - em processo de certificação
- ✓ Material particulado urbano, NIST (SRM 1648 a) - em processo de certificação

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Descontaminação dos materiais

Toda a vidraria e frascos de polipropileno utilizados para preparo e armazenamento das soluções analíticas de referência e amostras foram lavados com detergente, enxaguados com água destilada, preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v durante 24 horas, novamente, enxaguados três vezes com água desionizada, e levados para secar em uma capela de fluxo laminar.

3.4.2. Preparo das amostras

3.4.2.1. Fígado e músculo bovino

Amostras de fígado e músculo bovinos foram preparadas seguindo um procedimento similar àquele utilizado no preparo de material de referência certificado⁷⁶. As amostras foram compradas e devidamente lavadas com água desionizada. Utilizando uma lâmina de aço inoxidável, a película protetora que envolvia o fígado e os nervos e as gorduras presentes no músculo foram retirados. Em seguida as amostras foram quarteadas em pequenos cubos de aproximadamente 1 cm. Uma parte das amostras foi guardada como testemunho (1/2), outra parte (1/4) foi liofilizada durante 48 horas, e uma terceira parte (1/4), seca inicialmente em forno de microondas doméstico (30 min para fígado e 60 min para músculo, 10% de potência – 30W), seguida pela secagem em estufa a 60°C até peso constante (aproximadamente 48 horas para fígado e 72 horas para músculo).

Depois de secas, as amostras foram moídas para torná-las mais homogêneas. Um estudo comparativo utilizando moinho de bolas e criogênico foi feito, visando avaliar a influência do tipo e tempo de moagem.

O moinho de bolas utilizado era composto por um frasco e duas bolas maciças feitas de carbeto de tungstênio ou aço inoxidável. Uma massa de 5 g de amostra foi colocada no interior do frasco juntamente com as bolas e o impacto entre elas resultava na sua moagem. Cabe ressaltar que para evitar problemas de contaminação entre amostras, uma etapa de limpeza, que consistia em moer e descartar uma porção da amostra, era efetuada. Diferentes tempos de moagem foram adotados (5, 15, 30 e 60 minutos) para avaliar sua influência na eficiência de moagem, ou seja, no tamanho de partícula e principalmente na homogeneidade dos analitos nessas amostras.

Para a moagem criogênica, massas de amostras em torno de 1 ou 2 g foram introduzidas em um tubo cilíndrico de policarbonato juntamente com uma barra magnética de aço inoxidável. O tubo foi fechado nas extremidades com duas tampas de aço inoxidável. Após um período de pré-congelamento do conjunto, imerso em nitrogênio líquido, um campo magnético alternado foi aplicado fazendo com que a barra magnética atingisse as tampas do tubo em alta velocidade com uma frequência média de 20 impactos por segundo. A cominuição da amostra foi

realizada pelo impacto da barra magnética com as tampas do tubo cilíndrico de policarbonato. O programa de moagem utilizado foi: 5 min de pré-congelamento e 3 ciclos de 2 min de moagem sendo esse intercalado com 1 min de congelamento. Estudos prévios mostraram que esse tempo é suficiente para uma eficiente moagem das amostras liofilizadas⁸¹.

3.4.2.2. Cabelo

O cabelo foi cortado próximo à raiz na região da nuca com uma tesoura de aço inoxidável. A lavagem do cabelo foi feita seguindo dois procedimentos distintos: o primeiro seguindo o método estabelecido pelo IAEA que envolve a lavagem seqüencial com acetona, água e acetona e o segundo utilizando o método IAEA seguida pela lavagem com HCl 0,1 mol L⁻¹^{59,65}.

Para a lavagem seguindo o método IAEA, aproximadamente 2 g de cabelo foram inicialmente imersos em aproximadamente 30 mL de acetona e mantido sob constante agitação durante 10 min, em temperatura ambiente. Em seguida, o cabelo foi enxaguado três vezes com água desionizada. Posteriormente, foi novamente repetida a lavagem com acetona. Feito isso, o cabelo foi novamente enxaguado, embrulhado em papel de filtro e colocado em uma estufa a 60°C durante 48 h.

O segundo procedimento de lavagem foi feito utilizando o procedimento da IAEA associado à lavagem com HCl 0,1 mol L⁻¹. Amostra previamente lavada seguindo o método IAEA foi colocada em 15 mL de solução de 0,1 mol L⁻¹ HCl, mantendo-a sob agitação por 30 minutos. Após enxaguar 3 vezes com água desionizada, o cabelo foi enrolado em papel filtro e levado à secagem em estufa a 60°C durante 48 h.

Após a lavagem, Cd e Pb foram determinados ao longo de fios de cabelo visando avaliar a distribuição desses elementos ao longo do fio. Para isso, segmentos de 0,5 cm de cabelo cortados desde a raiz até as pontas foram submetidos à análise, como apresentado na Figura 6.

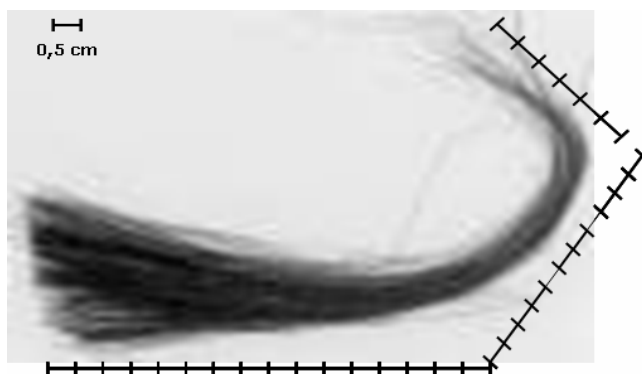


Figura 6 - Segmentos de 0,5 cm de cabelo cortados da raiz à ponta, submetidos à análise por SS-ETAAS

3.4.3. Determinação do tamanho de partícula

As determinações dos tamanhos das partículas foram feitas para as amostras de fígado e músculo bovino, espinafre e material particulado urbano.

Para determinar o tamanho das partículas, foram preparadas suspensões de 10 mg das amostras em 10 mL de água destilada, contendo duas gotas do surfactante Triton X-100. Após sonicação por aproximadamente 10 min ou 1 h, dependendo do material, as suspensões foram analisadas. A utilização do Triton X-100 assim como a sonicação foram importantes para a formação de suspensões mais estáveis e homogêneas.

Para realizar as medidas do tamanho das partículas, as amostras foram introduzidas na célula de medida de modo que as partículas em suspensão ficassem em frente a um feixe de luz. Quando esse feixe é incidido sobre a suspensão, sofre um espalhamento devido às partículas sólidas nela existentes, o qual é detectado. O ângulo de difração do feixe espalhado é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. Sendo assim, cada detector converte a difração de luz de uma determinada partícula. A frequência da detecção é proporcional ao número de partículas com certo intervalo de diâmetro, e essa é a base para o cálculo da distribuição do tamanho médio das partículas da amostra.

Resultados da distribuição do tamanho de partícula são expressos em porcentagem de fração de volume (equivalente às esferas).

3.4.4. Estudo do comportamento térmico dos elementos

A otimização dos programas de aquecimento foi efetuada através do estudo do comportamento térmico dos analitos (curvas de temperatura de pirólise e atomização) em soluções aquosas e nas amostras sólidas. Volume de 10 μL de soluções de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al, 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ni e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb foram utilizadas para verificar o comportamento térmico dos elementos em soluções aquosas. A avaliação de Cu e Zn foram feitas em soluções de 1,5 mg L^{-1} e 3 mg L^{-1} , respectivamente. A elevada concentração para esses elementos se deve ao fato de os mesmos terem sido analisados utilizando-se comprimento de onda menos sensível como estratégia de perda de sensibilidade.

Massas de aproximadamente 100 μg de amostras de fígado e músculo bovino secas em forno de microondas seguida pela estufa e moídas por 30 minutos em moinho de bolas foram utilizadas para avaliar o comportamento térmico de Al, Cd, Cu, Cr, Ni e Zn e massas de aproximadamente 300 μg para o Cr e Pb. Devido às baixas concentrações de As nessas amostras, o estudo desse elemento foi feito em hepatopâncreas de lagosta. Para isso, massas em torno de 100 μg foram utilizadas.

Para o cabelo, o comportamento térmico de As, Cd, Cr e Pb foi avaliado utilizando-se massas que variaram de 70 a 500 μg , dependendo da concentração do analito. Para o material particulado urbano, massas de aproximadamente 30 μg foram empregadas.

A ação dos modificadores químicos em solução ou permanente também foi avaliada. Volume de 10 μL das soluções dos modificadores químicos em solução 5 $\mu\text{g Pd} + 3 \mu\text{g Mg}$, 20 $\mu\text{g Pd}$ ou 25 $\mu\text{g NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foram adicionados, com auxílio de uma pipeta, sobre a solução aquosa ou sobre a amostra sólida, previamente pesada na plataforma de grafite. O mesmo procedimento foi utilizado para adicionar o surfactante Triton X-100 ou o oxidante H_2O_2 sobre a amostra sólida, quando necessário.

Nos estudos envolvendo uso de modificadores químicos permanentes, a deposição de 200 μg de Ir e 250 $\mu\text{g W} + 200 \mu\text{g Rh}$ foi feito seguindo procedimento encontrado na literatura^{82,83}.

Todo estudo térmico foi realizado utilizando os parâmetros instrumentais e programa de aquecimento apresentados nas Tabelas 2 e 4, respectivamente.

Tabela 4 - Programa de aquecimento geral para estudar o comportamento térmico do Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em cabelo, fígado ou músculo bovino por SS-ETAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s⁻¹)	Patamar (s)	Vazão de Argônio (L min⁻¹)
Secagem	130	10	10	1,0
Pirólise	T _P	100	t _P	1,0
Auto Zero	T _P	0	6	0
Atomização	T _A	2600	t _A	0
Limpeza	T _L	1200	3	1,0

T_P = Temperatura de pirólise; T_A = Temperatura de atomização; t_P = Tempo de pirólise; t_A = Tempo de atomização; T_L = Temperatura de limpeza

3.4.5. Avaliação da homogeneidade de fígado e músculo bovino

Para avaliar a homogeneidade do material, fez-se um estudo da influência da massa de amostra sobre a precisão e exatidão dos resultados, nas determinações de Al, Cd, Cu, Pb e Zn em fígado bovino e Cu e Zn em músculo bovino. Para isso, diferentes e crescentes massas dessas amostras foram analisadas por SS-ETAAS. As determinações foram feitas nas amostras preparadas no laboratório, seguindo diferentes procedimentos de secagem e moagem. Estudo similar foi efetuado para o fígado e músculo bovino certificado para que comparações com os materiais preparados no laboratório pudessem ser realizadas.

Para avaliar a massa mínima representativa da amostra na determinação de Al, Cd, Cu e Zn em fígado e músculo bovino, massas de amostras variando entre 1 e 200 µg foram analisadas. Devido às dificuldades em pesar sempre as mesmas massas de amostra, intervalos de massas foram definidos: intervalo 1 (1 a 20 µg), intervalo 2 (21 a 30 µg), intervalo 3 (31 a 40 µg), intervalo 4 (41 a 50 µg), intervalo 5 (51 a 60 µg), intervalo 6 (61 a 70 µg), intervalo 7 (71 a 80 µg), intervalo 8 (81 a 90 µg), intervalo 9 (91 a 100 µg), intervalo 10 (101 a 120 µg), intervalo 11 (121 a 200 µg).

Para a determinação do Pb, intervalos de massas maiores foram utilizados devido à sua baixa concentração na amostra. Os intervalos definidos foram:

intervalo 1 (30 a 50 μg), intervalo 2 (51 a 100 μg), intervalo 3 (101 a 200 μg), intervalo 4 (201 a 400 μg), intervalo 5 (401 a 600 μg), intervalo 6 (601 a 800 μg), intervalo 7 (801 a 1000 μg), intervalo 8 (1001 a 1200 μg), intervalo 9 (1201 a 1400 μg).

Para cada intervalo foram feitas cinco determinações e através dos resultados dos desvios padrões obtidos, as avaliações da exatidão e precisão foram efetuadas.

3.4.6. Avaliação da homogeneidade do material particulado urbano

O material particulado urbano, coletado em St. Louis (MO, USA), está em processo de certificação pelo NIST para dar origem ao SRM 1648a. Esse material está sendo certificado para microanálise ($m \sim 1 \text{ mg}$). O material que estava estocado desde 1973, foi novamente homogeneizado e empacotado em 4160 pequenos frascos contendo cerca de 2 g de amostra cada um. Feito isso, iniciou-se um minucioso estudo visando a avaliação da homogeneidade do material, que consistiu na determinação do fator de homogeneidade (H_e) proposto por Kurfürst¹⁴, utilizando a equação 1 apresentada na revisão bibliográfica, seção 2.1.1.1.

As determinações para se chegar ao fator de homogeneidade foram feitas por análise por ativação neutrônica (NAA) no NIST e por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólidos (SS-ETAAS) no Instituto de Química (IQ/USP - São Paulo, SP).

A avaliação da homogeneidade foi feita por meio da análise de 12 sub-amostras (frascos) selecionadas aleatoriamente (dentre as 4160). Em uma primeira etapa, avaliou-se a homogeneidade entre os frascos. Para isso, 100 mg de amostra de cada um dos 12 frascos foram analisadas em duplicata por NAA. Se os resultados obtidos forem concordantes entre si em nível de confiança de 95%, parte-se para a segunda etapa que consiste na avaliação da microhomogeneidade entre os frascos.

A avaliação da microhomogeneidade entre os frascos também foi feita por NAA. Analisou-se, em duplicata, massas de 2 mg de amostra de cada um dos 12 frascos previamente selecionados. O mesmo procedimento foi repetido para massas de 1 mg de amostra.

Por fim, avaliação da microhomogeneidade para encontrar o valor do H_e da amostra foi efetuada. Para isso, selecionou-se somente uma sub-amostra, dentre

os 12. No estudo com NAA, 12 replicatas de massas de 1 mg de amostra foram analisadas. No estudo envolvendo SS-ETAAS, foram realizadas 20 medidas dessa sub-amostra, cuja massa variou de 10 a 50 μg , dependendo do analito. Considerando o desvio padrão relativo (RSD) das 12 (NAA) ou 20 (SS-ETAAS) medidas obtidas experimentalmente, obteve-se o valor do desvio experimental ($u_{\text{experimental}}$).

O desvio instrumental ($u_{\text{instrumental}}$) por SS-ETAAS, foi determinado pelo RSD de 20 medidas de uma solução de referência (10 μL). As concentrações das soluções utilizadas para esse estudo foram: 0,4 mg L^{-1} As, 0,3 mg L^{-1} Cd, 0,6 mg L^{-1} Cu, 0,15 mg L^{-1} Ni, 8,0 mg L^{-1} Pb, 8,0 mg L^{-1} Zn em 0,1% v/v HNO_3 .

Os outros desvios (u_{outros}) considerados são aqueles provenientes da incerteza na pesagem e no volume da pipeta. Conhecendo-se todos esses parâmetros, foi possível calcular o valor de H_e .

3.4.7. Digestão de amostras de fígado e músculo bovino em fornos de microondas e determinação por ETAAS e FAAS

Para comparação dos resultados, 200 mg de fígado e músculo bovino foram misturados a 1 mL HNO_3 , 2 mL H_2O_2 e 3 mL H_2O e digeridos em forno de microondas com cavidade utilizando o seguinte programa de aquecimento (Temperatura, $^{\circ}\text{C}$; Rampa, min; Patamar, min): (140, 5, 1), (180, 8, 2) e (220, 4, 10). Após diluição para volume final de 15 mL, as determinações de Al, As, Cd, Pb, Cr e Ni foram feitas por ETAAS e as determinações de Cu e Zn, por FAAS, utilizando os parâmetros instrumentais descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Os programas de aquecimento para a determinação de Al, As, Cd, Pb, Cr e Ni por ETAAS estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de aquecimento para determinação de Al, As, Cd, Pb, Cr e Ni por ETAAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)	Vazão de Argônio (L min ⁻¹)
Secagem I	100	10	10	1,0
Secagem II	130	10	5	1,0
Pirólise	1400 ^a , 1200 ^b , 500 ^c , 600 ^d , 1000 ^{e,f}	50	15	1,0
Auto zero	1400 ^a , 1200 ^b , 500 ^c , 600 ^d , 1000 ^{e,f}	0	6	0
Atomização	2400 ^{a,b} , 1600 ^c , 1800 ^d , 2500 ^{e,f}	2600	4	0
Limpeza	2200 ^{c,d} , 2600 ^{a,b,e,f}	1200	3	1,0

^aAl, ^bAs, ^cCd, ^dPb, ^eCr, ^fNi

3.4.8. Calibração

Curvas analíticas de calibração foram construídas com soluções de referência e com os CRMs para avaliar a possibilidade de analisar os materiais sólidos utilizando calibração aquosa.

As soluções de referência utilizadas para a calibração continham 10-80 µg L⁻¹ de Al, 2,5-50 µg L⁻¹ de As, 0,5-5,0 µg L⁻¹ e 1-8 µg L⁻¹ de Cd, 2,0-20 mg L⁻¹ de Cr, 0,5-3,0 e 10-40 µg L⁻¹ mg L⁻¹ de Cu, 10-40 µg L⁻¹ de Ni, 2,5-20 µg L⁻¹ de Pb e 1-6 mg L⁻¹ de Zn em meio de 0,1% HNO₃.

As curvas analíticas construídas com amostra sólidas foram feitas pesando-se massas crescentes dos CRMs. O intervalo de massa de fígado bovino certificado utilizado foi de 60 a 400 µg para Al, de 60 a 160 µg para Cd, de 60 a 180 µg para Cu, de 400 a 1000 µg para Pb e de 80 a 600 µg para Zn. No caso do músculo bovino certificado, as massas utilizadas foram 500 a 1000 µg para Cd, 50 a 180 µg para o Cu e 80 a 400 µg para o Zn. As massas de hepatopâncreas de lagosta certificado foram de 60 a 400 µg para determinação do As e de 25 a 250 µg para Ni.

As massas dos cabelos certificados utilizadas variaram de 100 a 600 µg para As, 25 a 150 µg para Cd, 10 a 50 µg para Cr e 20 a 90 µg para Pb.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino

4.1.1. Otimização do programa de aquecimento

A otimização do programa de aquecimento é um dos processos mais importantes quando se deseja utilizar a ETAAS como uma técnica quantitativa para determinação elementar. Temperaturas de pirólise e de atomização e os tempos de duração de cada uma dessas etapas são os principais parâmetros que devem ser controlados. Esse fato se torna ainda mais crítico quando estão envolvidas análises diretas de amostras sólidas, pois diferentemente do que ocorre com as soluções aquosas, elas são inseridas no atomizador sem qualquer tipo de tratamento prévio que possibilite a remoção de parte da matriz ou a separação do analito. No geral, a análise direta de amostras sólidas é acompanhada de grande quantidade de concomitantes no atomizador, o que pode provocar aumento no sinal de fundo, assim como o risco de interferências químicas e espectrais⁴⁴.

Em geral, as curvas de temperatura de pirólise e atomização são construídas a partir de sinais de absorvância versus temperatura, oriundos de amostragens de alíquotas da solução de referência, com variações crescentes das temperaturas de pirólise ou atomização. Processo semelhante de amostra é conduzido na obtenção da curva de pirólise e atomização de um material sólido. No entanto, devido à dificuldade de se pesar massas semelhantes, na obtenção desses gráficos usa-se a razão entre o valor da absorvância e a massa de amostra (mg) correspondente.

Modificadores químicos permanentes ou em solução foram utilizados para tentar aumentar a estabilidade térmica dos elementos estudados. A adição de modificadores químicos em solução sobre a amostra não é trivial devido à dificuldade de interação entre a solução e a amostra causada pelo efeito eletrostático. Para as amostras de fígado, músculo e hepatopâncreas, essa dificuldade foi observada, sobretudo quando massas de amostra superiores a 200 µg eram utilizadas. Para massas inferiores, a adição dos modificadores químicos em solução pôde ser efetuada. No caso da amostra de cabelo, a interação entre a solução do modificador e a amostra (na forma de um pó muito fino) foi possível somente mediante a presença de um surfactante como o Triton X-100. Devido a

todos esses problemas, a utilização de modificadores químicos em solução foi evitada sempre que possível.

Os modificadores químicos permanentes, além de não causarem os problemas observados para os modificadores em solução, descritos anteriormente, apresentam outras vantagens⁸³: menor risco de contaminação, menor valor do branco analítico, maior frequência analítica devido à redução no tempo de secagem; e maior tempo de vida da plataforma de grafite, uma vez que, o modificador químico depositado forma um filme metálico sobre a plataforma protegendo-a. O uso desse tipo de modificador tem sido bastante eficiente para análises de amostras em soluções^{84,85}, suspensões^{84,86} e também para análise direta de sólidos⁸⁷.

Cabe ressaltar que toda a otimização do programa de aquecimento foi feita considerando o comportamento térmico do analito na solução aquosa e na matriz, uma vez que era um dos objetivos alcançar uma condição em que fosse possível analisar amostras sólidas utilizando uma curva de calibração construída com soluções de referência.

4.1.1.1 Otimização do programa de aquecimento para cádmio

Utilizando o programa de aquecimento da Tabela 4, e fixando 5 s como tempo de pirólise e 1600°C como temperatura de atomização, foi efetuado o estudo do comportamento térmico de Cd em solução aquosa (Figura 7a) e em amostra de fígado bovino (Figura 7b), na presença e na ausência de modificadores químicos.

O Cd é volatilizado em baixas temperaturas ($T > 400$ °C) quando modificadores químicos não são utilizados (Figura 7a). No entanto, pode-se observar que a estabilidade térmica desse elemento na presença da matriz (Figura 7b) é maior ($T_p = 600$ °C) do que em solução aquosa. O Cd está presente no fígado na forma de metalotioneínas que são proteínas com grande quantidade de cisteínas⁸⁸. A ligação do Cd com esses grupos tióis pode ser responsável pela maior estabilidade desse elemento na presença da matriz de fígado, mesmo na ausência de modificador químico.

A estabilidade térmica do Cd aumentou na presença de modificadores químicos, sendo que sua ação foi menos evidente em solução aquosa e mais pronunciada nas amostras sólidas (Figura 7a e 7b).

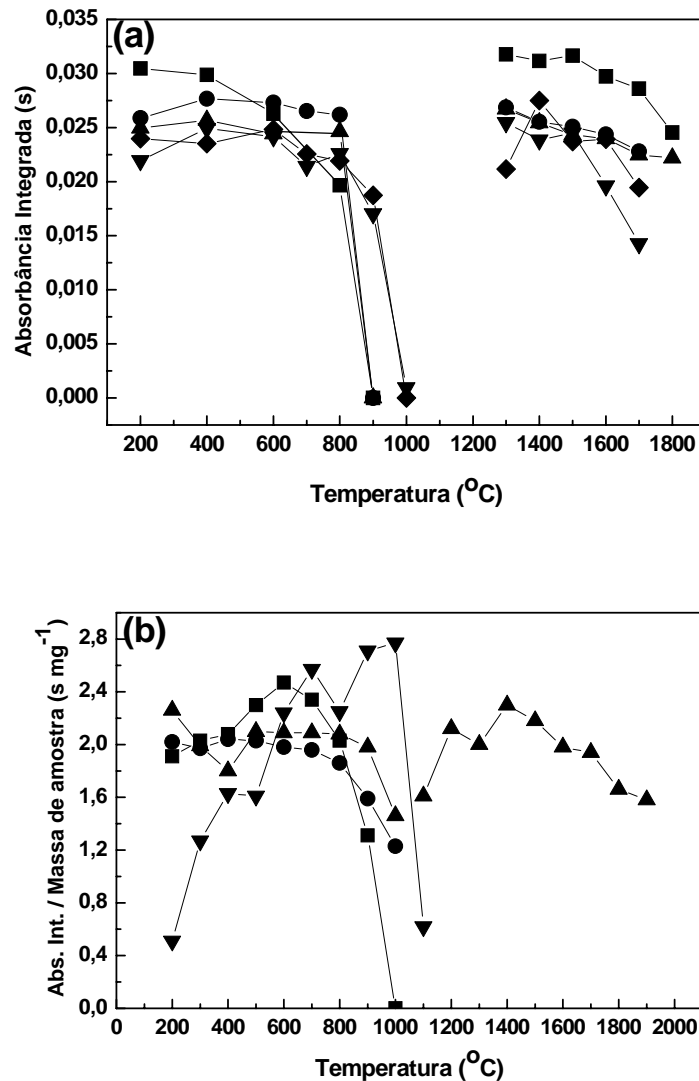


Figura 7 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cd em (a) solução aquosa e em (b) fígado bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir, (▲) W + Rh, (▼) Pd + Mg e (◆) NH₄H₂PO₄.

Paralelamente aos estudos da temperatura de pirólise, a variação dos sinais de fundo foi monitorada. Embora resultados de absorbância mostrassem boa estabilidade térmica do Cd (até 800°C), os sinais de fundo para o fígado bovino apresentavam valores negativos, indicando problemas na correção dos sinais de fundo. Além disso, picos duplos e com longo tempo de duração eram observados para os sinais de absorbância de Cd. Na Figura 8, estão representados os gráficos de variação dos sinais de fundo durante a obtenção das curvas de temperatura de pirólise (Figura 7b). Os elevados valores das razões entre as absorbâncias integradas e as massas de amostra (1,5 – 9), observados em temperaturas inferiores a 500°C, demonstram que essas temperaturas de pirólise não são

suficientes para eliminar a matriz. Entre 500 e 900°C, observam-se depressões nos gráficos, atingindo valores de até -40 (700°C). Para essa região foram observados valores de absorvância dos sinais de fundo negativos. A partir de 900 °C, as razões dos sinais passaram a valores muito baixo (~ 0,1 – 0,6), indicando correção de fundo mais eficiente.

Uma maneira de contornar esse problema da correção do sinal de fundo foi aumentar o tempo de pirólise. Utilizando W+Rh como modificador químico e mantendo-se 700 e 1700 °C como temperatura de pirólise e atomização, respectivamente, variou-se o tempo de pirólise (Figura 9).

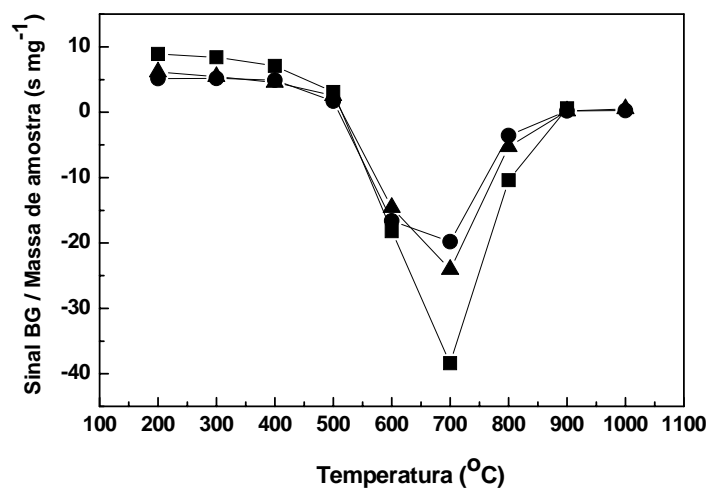


Figura 8 - Variação do sinal de fundo para determinação direta de Cd em fígado bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir e (▲) W+ Rh como modificador químico permanente.

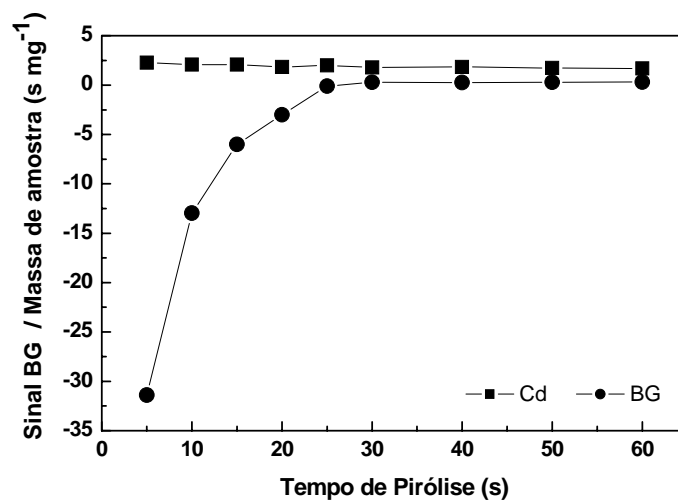


Figura 9 - Variação das razões dos sinais de absorvância e de fundo de Cd para fígado bovino.

A correção do sinal de fundo (sinal de fundo positivo e constante) foi obtida empregando-se 30 s de pirólise. No entanto, nessas condições ainda persistia um sinal de fundo que não seguia perfeitamente a linha base (Figura 10), o que foi conseguido adotando-se 40 s de tempo de pirólise. Resultados semelhantes foram observados em presença de Ir como modificador químico.

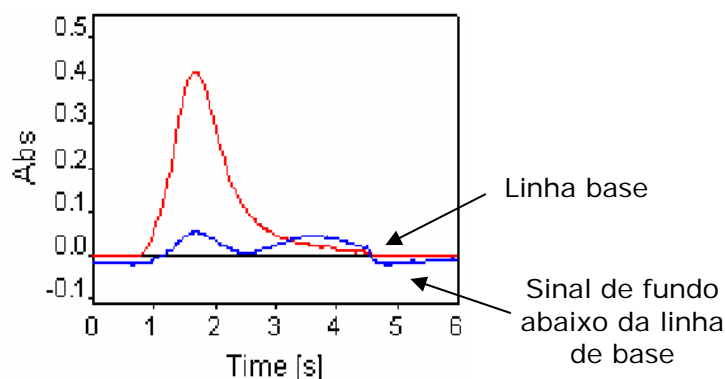


Figura 10 - Sinal transiente do Cd em 70 μg de fígado CRM utilizando 700°C e 30 s como temperatura e tempo de pirólise.

Uma vez estabelecido o melhor tempo de pirólise, o estudo da temperatura de pirólise foi novamente efetuado para as amostras de fígado bovino ($t_p=40$ s e $T_A = 1700^\circ\text{C}$). A Figura 11 mostra que a perda de Cd ocorreu progressivamente desde 500°C, exceto na presença de W + Rh ($T_p = 600^\circ\text{C}$).

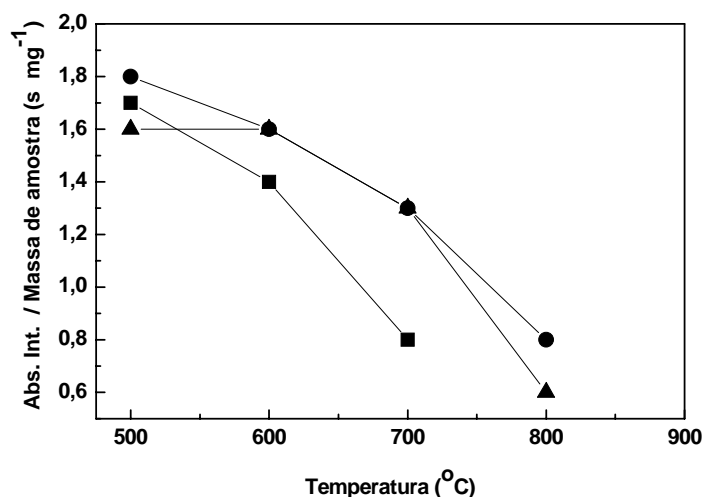


Figura 11 - Curvas de temperatura de pirólise para Cd em fígado bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir e (▲) W+ Rh como modificador químico permanente, utilizando 40 s e 1700°C como tempo de pirólise e temperatura de atomização.

Uma outra importante informação obtida com esse estudo foi que 600°C é a mínima temperatura na qual a matriz de fígado e músculo bovino é eficientemente eliminada. Abaixo dessa temperatura, somente uma parte dos concomitantes é eliminada mesmo se o tempo de pirólise utilizado for muito longo ($t_p > 120$ s). Esse fato explica os elevados valores dos sinais de fundo observados na Figura 8, quando temperaturas inferiores a 500°C foram empregadas. O sinal analítico obtido a 500°C apresentou picos duplos com longo tempo de duração (Figura 12a), enquanto aquele obtido a 600°C apresentou sinal transiente bem comportado com curto tempo de duração e sinal de fundo quase inexistente (Figura 12b).

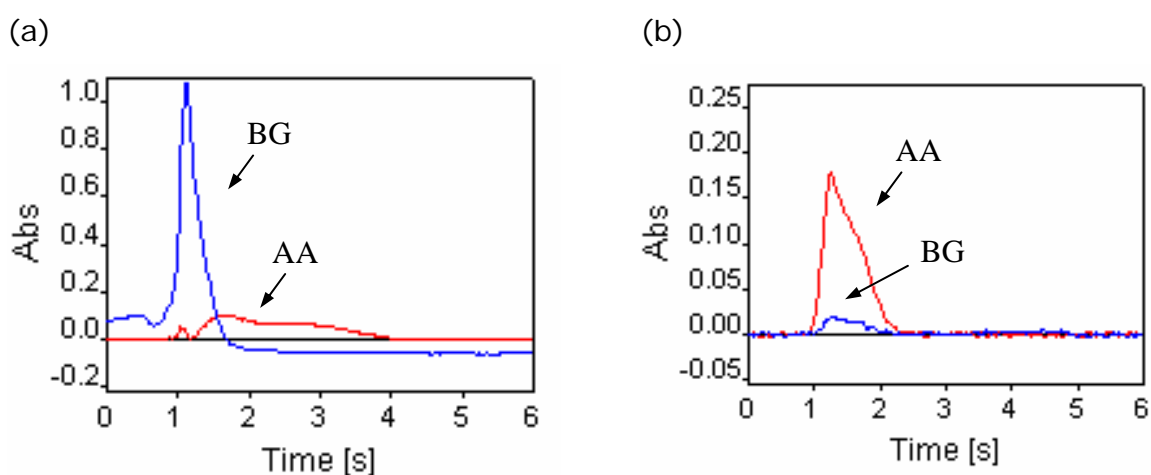


Figura 12 - Sinais transientes de Cd e de fundo para 70 µg de fígado CRM utilizando (a) $T_p = 500^\circ\text{C}$ e $t_p = 40$ s e (b) $T_p = 600^\circ\text{C}$ e $t_p = 40$ s

Experimento similar foi realizado para a determinação de Cd em músculo bovino, obtendo-se resultado parecido. O programa de aquecimento otimizado para a determinação do Cd em fígado e músculo bovino foi baseado naquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram respectivamente $T_p = 600^\circ\text{C}$, $t_p = 40$ s, $T_A = 1700^\circ\text{C}$ e $t_A = 4$ s em presença de modificador químico W + Rh depositados por impregnação.

4.1.1.2. Otimização do programa de aquecimento para crômio

As curvas de temperatura de pirólise e atomização para o Cr em solução aquosa, fígado e músculo bovino estão apresentadas na Figura 13.

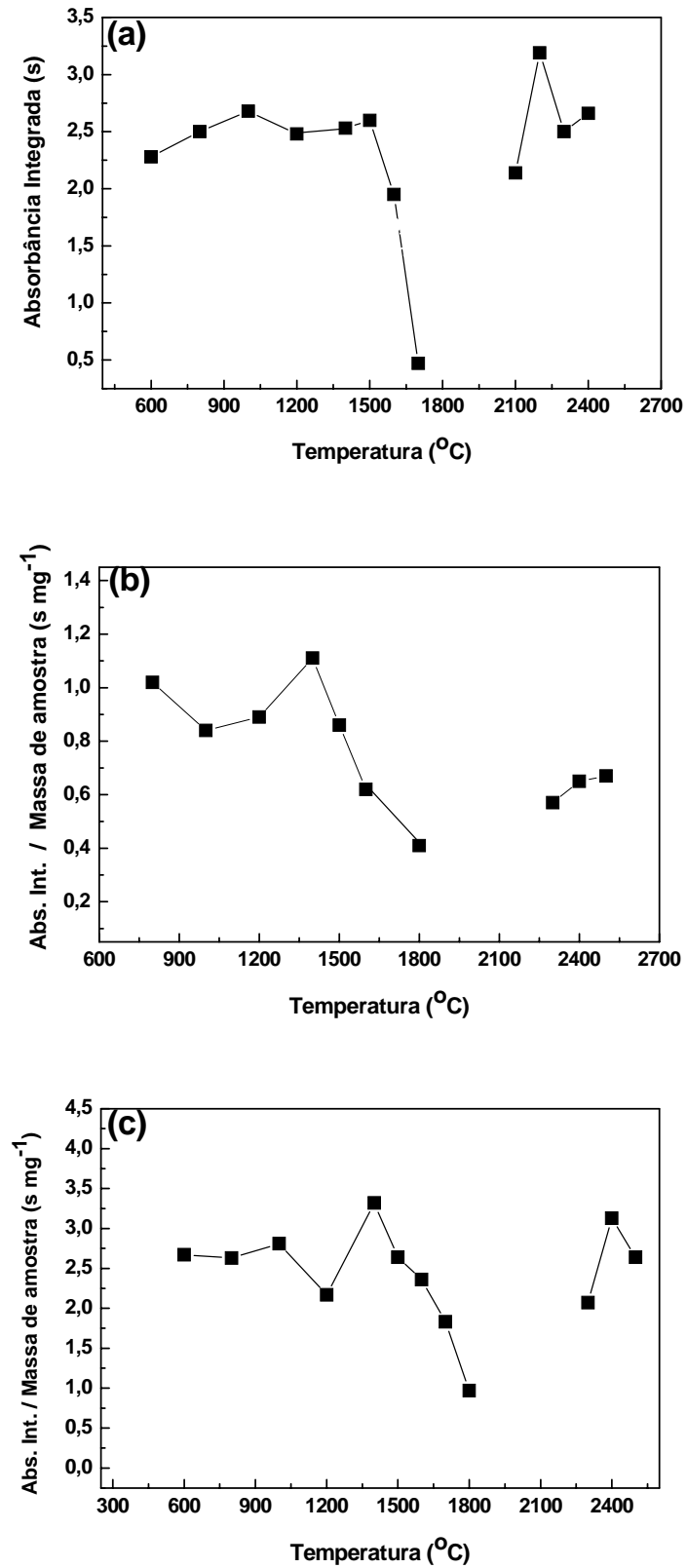


Figura 13 - Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cr em (a) solução aquosa (b) fígado bovino e (c) músculo bovino na ausência de modificador químico.

Devido à característica refratária do Cr, o comportamento térmico desse elemento foi avaliado na ausência de modificador químico. A temperatura de pirólise no fígado (Figura 13b) e no músculo bovino (Figura 13c) foi de 1400°C, ligeiramente inferior àquela observada para a solução aquosa (1500°C). Esse fato pode estar associado à forma na qual o Cr se encontra ligado na matriz.

O programa de aquecimento utilizado para a determinação do Cr em fígado e músculo bovino, foi aquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram respectivamente $T_p = 1400\text{ }^\circ\text{C}$, $t_p = 20\text{ s}$, $T_A = 2400\text{ }^\circ\text{C}$ e $t_A = 4\text{ s}$ na ausência de modificador químico.

4.1.1.3. Otimização do programa de aquecimento para cobre

As curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cu em solução aquosa, em fígado e em músculo bovino, na presença e ausência de modificadores químicos estão apresentadas na Figura 14. Devido à sua característica refratária, o Cu apresenta alta estabilidade térmica mesmo na ausência de modificadores químicos, sendo ligeiramente superior na presença de músculo bovino (1200°C). Por outro lado, na presença de fígado bovino (Figura 14b), o cobre é volatilizado a temperaturas menores do que em solução (1000°C), indicando que, nessa matriz, o Cu deve estar associado a alguma espécie mais volátil.

A atuação dos modificadores químicos sobre a estabilidade do Cu foi mais eficiente no fígado bovino, pois a temperatura de pirólise aumentou em até 300°C quando W+Rh ou Ir foi utilizado (Figura 14b). O principal problema associado ao uso de W+Rh como modificador químico para determinação de cobre foi a temperatura de atomização. Na presença desse modificador, o Cu tornou-se ainda mais refratário e, embora as curvas de atomização indiquem 2200°C como a melhor temperatura de atomização (Figura 14), a essa temperatura, o sinal de absorvância apresentava um longo tempo de duração (8 s) e não retornava à linha base. Sendo assim, uma maior temperatura de atomização foi necessária. No entanto, como o tempo de vida do modificador W+Rh diminui progressivamente em temperaturas superiores a 2200°C⁸³, a utilização de maiores temperaturas de atomização tornou-se inviável. Na presença de Ir ou na ausência de modificador químico, 2300°C foi a melhor temperatura de atomização. Como o perfil do sinal analítico da solução aquosa e da amostra sólida foram mais parecidos na ausência de modificador químico, essa foi a condição adotada.

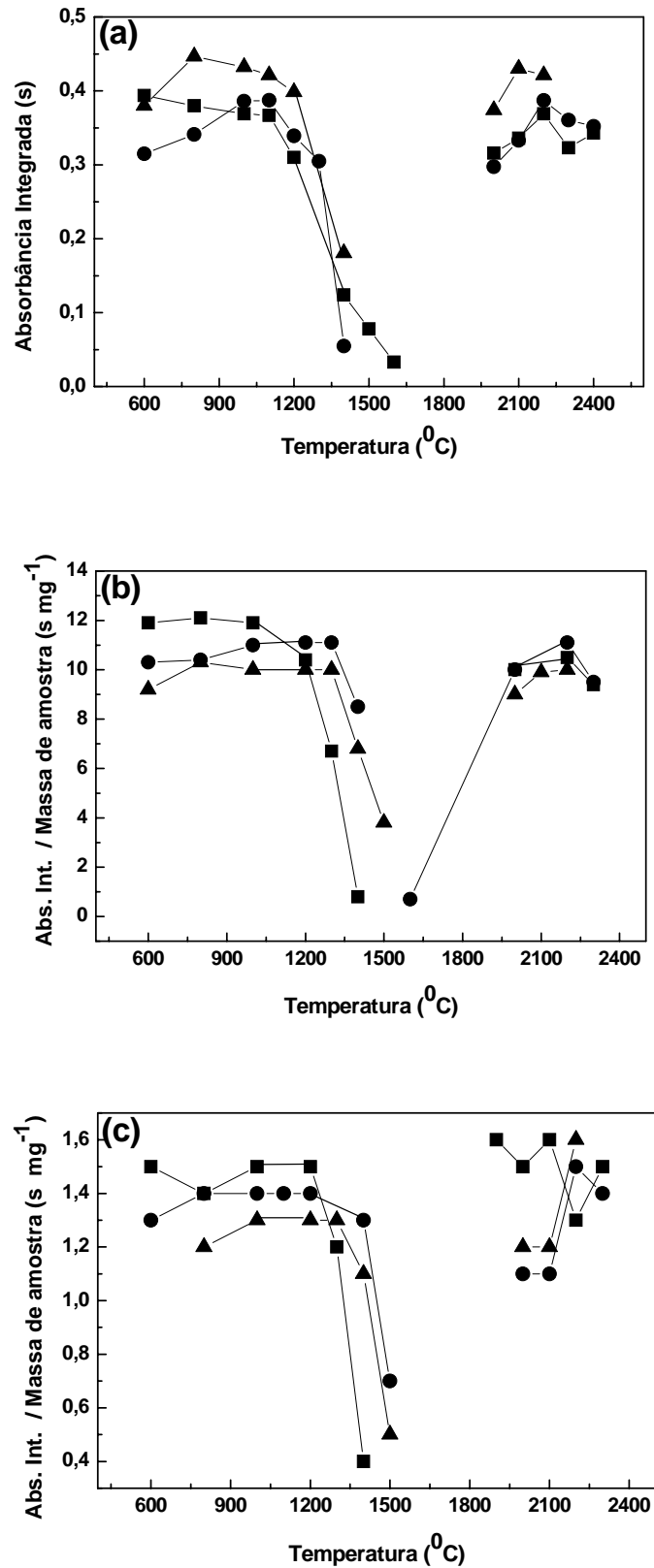


Figura 14 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cu em (a) solução aquosa, (b) fígado bovino e (c) músculo bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir e (▲) W+ Rh como modificadores químicos permanentes.

Os programas de aquecimento otimizados para a determinação do Cu em fígado e músculo bovino, foram baseados naquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram respectivamente $T_P = 1000^\circ\text{C}$, $t_P = 20\text{ s}$, $T_A = 2300^\circ\text{C}$ e $t_A = 5\text{ s}$ na ausência de modificador químico.

4.1.1.4. Otimização do programa de aquecimento para alumínio

No estudo do comportamento térmico do Al, optou-se por não utilizar modificadores químicos, devido à característica refratária desse elemento. Na presença de modificadores químicos permanente, havia a formação de compostos que necessitavam de elevadas temperaturas de atomização ($> 2500^\circ\text{C}$), comprometendo a estabilidade do filme metálico.

Na Figura 15 estão apresentadas as curvas de temperatura de pirólise e atomização para o Al em solução aquosa e no fígado bovino. Nos gráficos é possível observar, claramente, as diferenças dos perfis das curvas de temperatura de pirólise do Al, na ausência e na presença da matriz.

Em solução aquosa (Figura 15a) existem dois patamares, o primeiro entre 600 e 1200°C com menores valores de absorvância e o segundo entre 1500 e 1800°C com maiores valores de absorvância. Em 1200°C inicia-se a formação de sinais de absorvância duplos que só volta a apresentar o perfil transiente característico da absorção atômica em 1500°C . Esse fato é um forte indicativo que o Al em solução aquosa segue duas vias de atomização, que são via óxido ($P_F = 2072^\circ\text{C}$) e via carbetos (Decompõe a 2200°C)^{44,50}. A perda do sinal analítico pode ser observada a partir de 1700°C .

Diferente daquela observada em solução aquosa, na presença da matriz de fígado bovino a curva de pirólise apresentou somente um patamar entre 600 e 1400°C (Figura 15b). Esse fato é indicativo de que o Al é, provavelmente, atomizado por uma única via de atomização, no caso, a partir de carbetos como precursores atômicos. A perda desse elemento por volatilização inicia-se em 1500°C , ligeiramente inferior àquela observada para solução aquosa (1700°C).

O programa de aquecimento estabelecido para a determinação do Al foi aquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e tempo o de atomização foram respectivamente $T_P = 1500^\circ\text{C}$, $t_P = 20\text{ s}$, $T_A = 2500^\circ\text{C}$ e $t_A = 5\text{ s}$ na ausência de modificador químico.

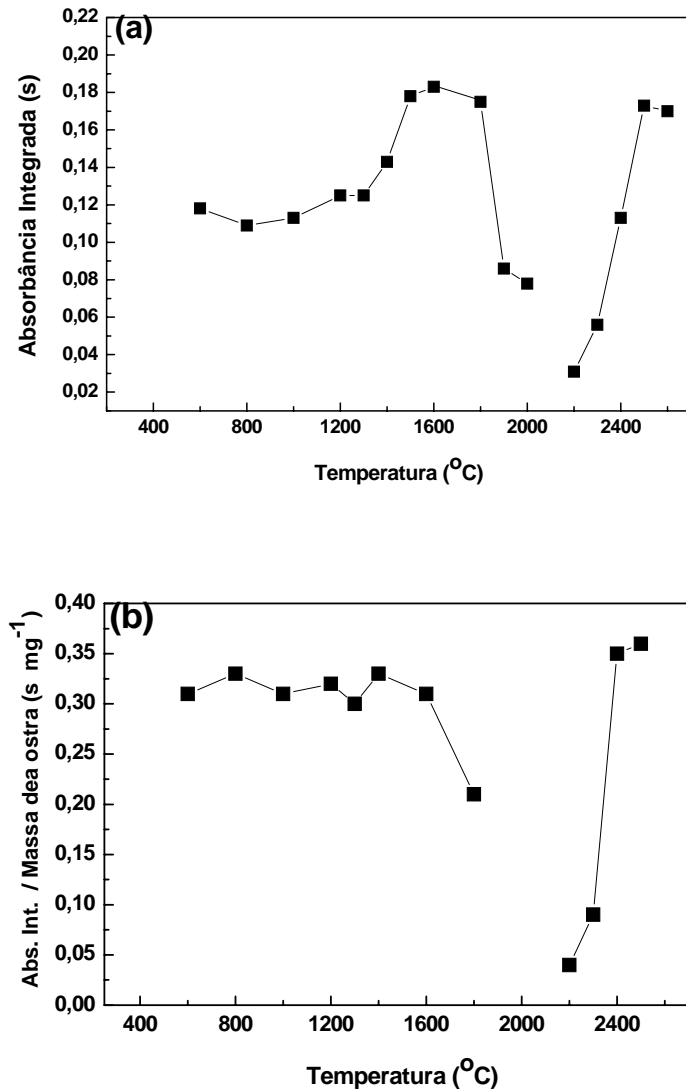


Figura 15 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Al em (a) solução aquosa e em (b) fígado bovino na (■) ausência de modificadores químicos.

4.1.1.5. Otimização do programa de aquecimento para chumbo

Na Figura 16 estão apresentados os gráficos de temperaturas de pirólise e atomização para o Pb em solução aquosa e em fígado bovino na ausência e presença de diferentes modificadores químicos. Na presença de W+Rh ou Ir, a temperatura de pirólise observada foi de aproximadamente 800°C (Figura 16a), valor inferior ao observado por outros autores (1100°C)⁸³.

Na presença da matriz, 700 e 1700°C foram respectivamente as melhores temperaturas de pirólise e atomização. Nesse estudo, embora uma elevada massa de amostra tenha sido utilizada (300 µg) a interação da amostra com o filme do

modificador químico depositado sobre a plataforma parece ter sido eficiente (Figura 16b), pois em sua presença a temperatura de pirólise aumentou em até 100°C. Como o comportamento térmico e os perfis dos sinais analíticos do Pb na solução aquosa e na matriz de fígado foram parecidos na ausência de modificador químico, essa foi a condição adotada. O programa de aquecimento utilizado para essa finalidade está apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram $T_P = 700^\circ\text{C}$, $t_P = 30\text{ s}$, $T_A = 1700^\circ\text{C}$ e $t_A = 3\text{ s}$, respectivamente.

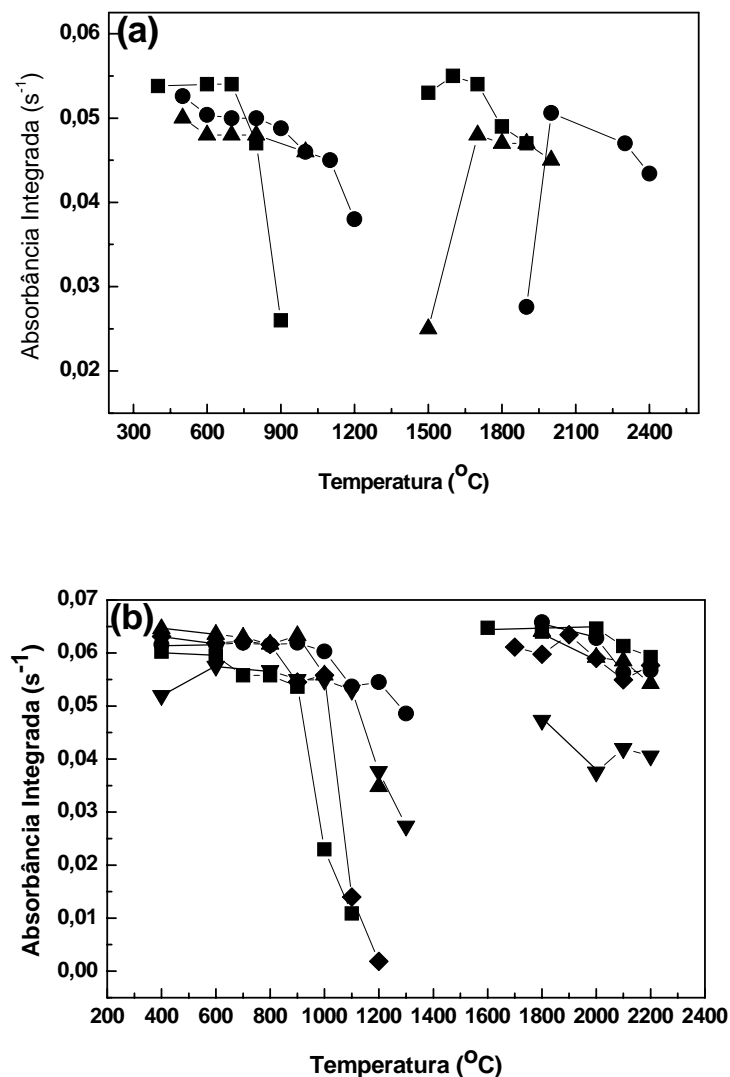


Figura 16 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Pb em (a) solução aquosa e em (b) fígado bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir, (▲) W+Rh, (▼) Pd+Mg e (◆)NH₄H₂PO₄.

4.1.1.6. Otimização do programa de aquecimento para zinco

A estabilidade térmica do Zn é muito parecida com a do Cd, pois ele é um elemento facilmente volatilizado mesmo em baixas temperaturas (350°C, Figura 17a). Na presença da matriz, o Zn suporta maiores temperaturas sendo 500°C para o fígado (Figura 17b) e 700°C para o músculo (Figura 17c). Comparando o comportamento térmico do Zn nas duas matrizes estudadas, pode-se observar maior estabilidade no músculo, sugerindo que a interação entre o Zn e o músculo é maior do que aquela observada com o fígado. No músculo, o Zn compõe a estrutura fisiológica do tecido muscular onde exerce a importante função de promover a contração das fibras desse tecido. Por outro lado, o Zn presente no fígado se encontra associado a diversas proteínas e enzimas, principalmente na forma de metalotioneínas e é onde fica armazenado. No entanto, como o Zn associado a essas proteínas pode ser facilmente substituído por outros metais bivalentes como o Cu^{2+} , supõe-se, então, que a interação desse elemento no fígado é mais fraca do que aquela observada para o músculo⁸⁹.

Em presença de W + Rh ou Ir, a estabilidade térmica do zinco em solução aquosa foi possível até 800°C (Figura 17a), revelando uma possível interação do analito com o modificador. No fígado, a estabilidade térmica do Zn foi aumentada para 700°C, enquanto no músculo a atuação do modificador químico foi menos evidente, reforçando a afirmação de que o analito se encontra fortemente ligado à estrutura do músculo e por isso não interage facilmente com o modificador químico.

Quanto às temperaturas de atomização, a primeira conclusão que poderia ser tirada é a de que 1500°C seria a melhor escolha para as determinações em solução aquosa, fígado ou músculo (Figura 17), uma vez que é nessa temperatura que maiores valores de absorbância foram obtidos. Entretanto, o alto valor de absorbância é resultante de um sinal analítico largo, e em alguns casos, duplo (solução aquosa na ausência de modificador químico). Considerando o perfil do sinal analítico e o valor de absorbância, 1700°C foi a temperatura de atomização estabelecida. O programa de aquecimento utilizado para os estudos posteriores com o Zn foi aquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram respectivamente $T_p = 700^\circ\text{C}$, $t_p = 20\text{ s}$, $T_A = 1700^\circ\text{C}$ e $t_A = 5\text{ s}$ em presença de modificador químico de W + Rh ou Ir depositados termicamente.

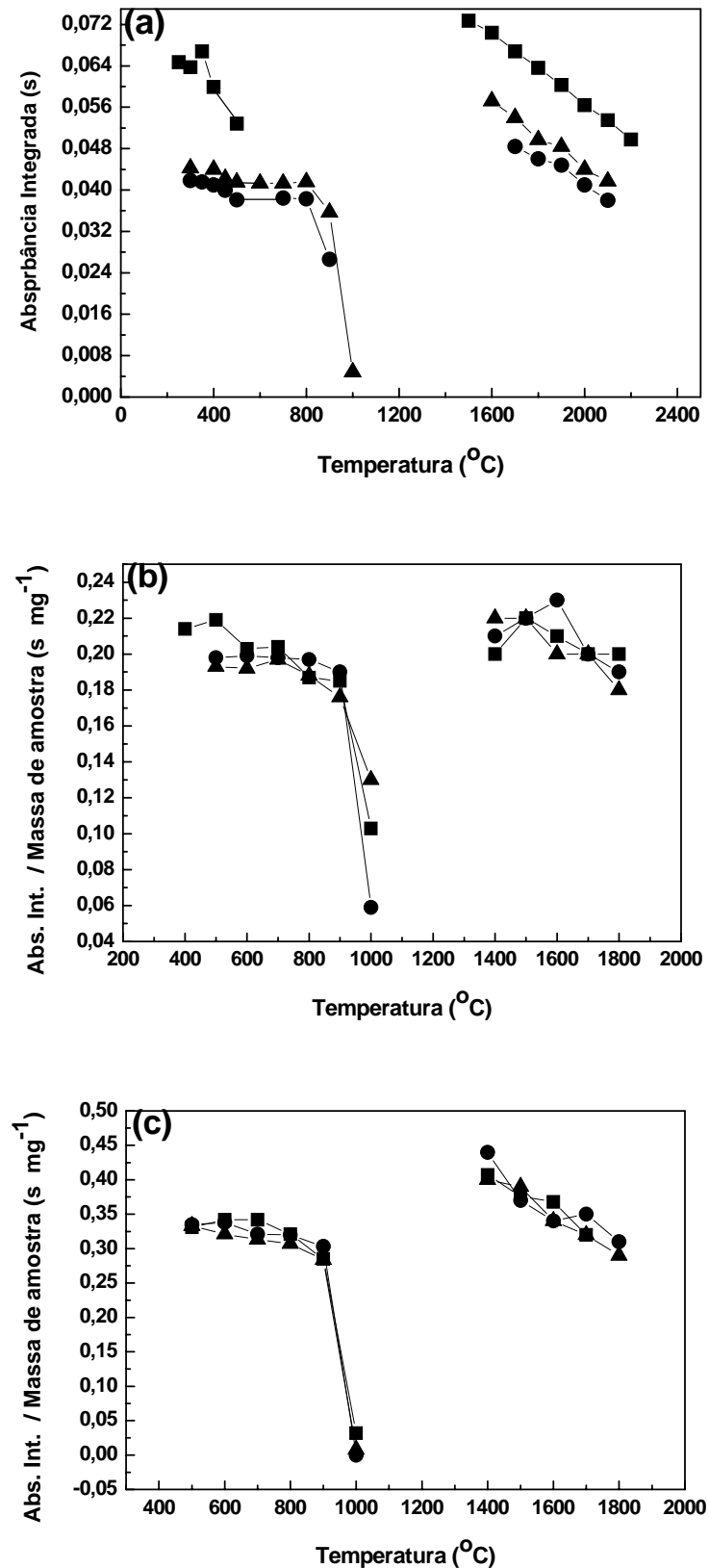


Figura 17 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Zn em (a) solução aquosa, (b) fígado bovino e (c) músculo bovino na (■) ausência e na presença de (●) Ir e (▲) W+Rh como modificador químico permanente.

4.1.1.7. Otimização do programa de aquecimento para arsênio

Devido à baixa concentração do As no fígado e no músculo bovino, não foi possível avaliar o comportamento térmico desse elemento nessas matrizes. Desse modo, essa avaliação foi efetuada em hepatopâncreas de lagosta que possui composição matricial similar ao fígado. Na Figura 18 estão apresentadas as curvas de pirólise e de atomização do As em solução aquosa e no hepatopâncreas de lagosta.

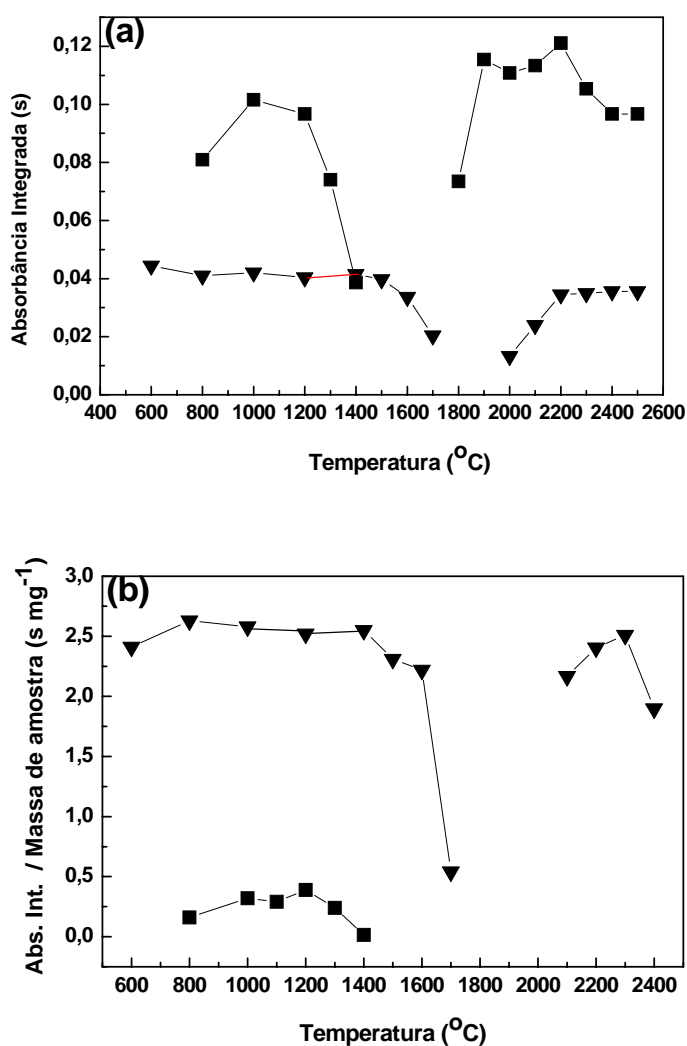


Figura 18 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para As em (a) solução aquosa e (b) hepatopâncreas de lagosta na (■) ausência e na (▼) presença de Pd+Mg como modificador químico.

O modificador químico Pd+Mg aumentou a estabilidade térmica do As na solução aquosa em até 400°C. A temperatura de pirólise obtida na ausência de modificador químico foi de 1000°C, e na sua presença, 1400°C. Na presença da

matriz de hepatopâncreas, as temperaturas encontradas foram de 1200 e 1400°C na ausência e presença de modificador químico, respectivamente. Na Figura 18a, observa-se que houve supressão no sinal analítico do As em solução aquosa quando Pd+Mg foi utilizado. Esse fato contradiz com estudos prévios apresentados na literatura⁴⁴. Uma possível hipótese que pode ser sugerida é que, na presença de Pd+Mg pode haver a formação de compostos estáveis que apresentam eficiência de atomização comprometida, principalmente quando a atomização é feita na plataforma do tipo boat, comumente empregada em SS-ETAAS. Essa plataforma possui uma massa superior à plataforma utilizada em análise de soluções por ETAAS, requerendo, portanto, maior temperatura para atomizar o analito.

Ao contrário, na presença da matriz hepatopâncreas de lagosta, houve aumento do sinal analítico. O menor valor do sinal analítico do As no hepatopâncreas na ausência de Pd+Mg pode estar relacionado à perda do analito por volatilização durante a etapa de pirólise, resultando na perda de sinal analítico. Por outro lado, quando Pd+Mg é utilizado, a espécie que antes era volatilizada, passa a ser estabilizada pelo modificador, gerando, assim, um sinal analítico maior.

O programa de aquecimento utilizado para os estudos posteriores com o As foi aquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e tempo de pirólise bem como a temperatura e tempo de atomização foram respectivamente $T_p = 1400^\circ\text{C}$, $t_p = 20\text{ s}$, $T_A = 2300^\circ\text{C}$ e $t_A = 5\text{ s}$ utilizando Pd + Mg como modificador químico.

4.1.1.8. Otimização do programa de aquecimento para níquel

O estudo do comportamento térmico do Ni em solução aquosa e no hepatopâncreas de lagosta está apresentado na Figura 19. Nesse caso também foi avaliado o W depositado termicamente como modificador químico, pois existem estudos na literatura que mostram supressão de interferência química e diminuição do sinal de fundo quando esse tipo de modificador químico é utilizado⁹⁰. Na presença de W, uma ligeira queda no sinal analítico foi observada a partir de 800°C. Quando Pd+Mg foi utilizado, temperatura de pirólise de 1500°C foi obtida, porém houve uma degradação no sinal analítico e piora na sua repetibilidade. Dentre todas as condições estudadas, a utilização de W ou a ausência de modificadores químicos foram as que apresentaram os melhores resultados.

Na Figura 19b, na qual está apresentada a curva de pirólise para o Ni na presença da matriz, 1500°C foi a temperatura de pirólise encontrada na ausência de modificador e 1400°C, na presença de W depositado termicamente. Como o

comportamento térmico do Ni na presença de W ou na ausência de modificador químico foi muito parecido em termos de temperatura de pirólise e perfil do sinal analítico, optou-se por utilizar o W para proteger a superfície da plataforma.

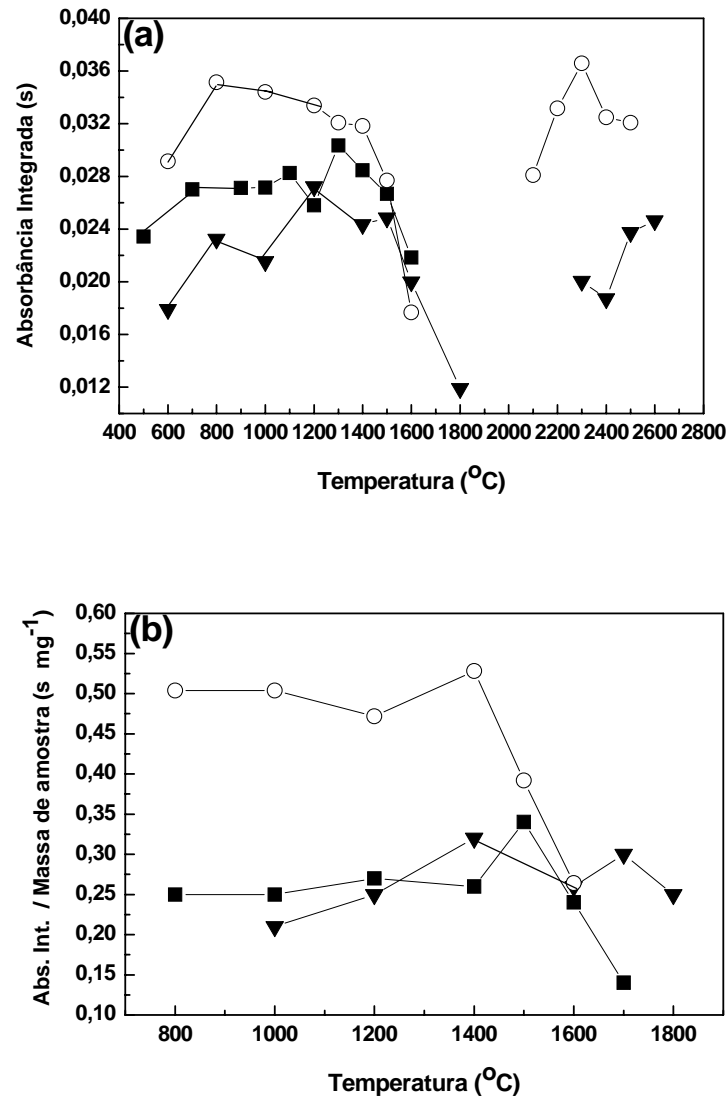


Figura 19 - Curva de temperatura de pirólise e atomização para Ni em (a) solução aquosa e (b) hepatopâncreas de lagosta na (■) ausência de modificador químico ou na presença de (▼) Pd+Mg, (○) W depositado termicamente

O programa de aquecimento utilizado para os estudos posteriores com o Ni foi aquele apresentado na Tabela 4. A temperatura e o tempo de pirólise bem como a temperatura e o tempo de atomização foram respectivamente $T_p = 1400^\circ\text{C}$, $t_p = 20\text{ s}$, $T_A = 2500^\circ\text{C}$ e $t_A = 4\text{ s}$ na presença de W como modificador químico permanente.

Na tabela 6 estão apresentadas as temperaturas de pirólise e atomização, a duração de cada uma dessas etapas e os modificadores químicos adotados para a determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino e hepatopâncreas de lagosta.

Tabela 6 - Temperatura de pirólise (T_p), tempo de pirólise (t_p), temperatura de atomização (T_A) e tempo de atomização (t_A) otimizados para determinação elementar em fígado e músculo bovino e hepatopâncreas de lagosta.

	T_p (°C)	t_p (s)	T_A (°C)	t_A (s)	Mod. Quim
Al	1500	20	2500	4	-
As	1400	20	2300	5	Pd+Mg
Cd	600	40	1700	4	W+Rh
Cr	1400	20	2400	4	-
Cu	1000	20	2300	5	-
Ni	1400	20	2500	4	W
Pb	700	30	1700	3	-
Zn	700	20	1600	5	W+Rh

4.1.2. Curvas de calibração

Em análise direta de sólidos, a calibração é crítica, pois a forma na qual o analito se encontra na amostra sólida determina a temperatura de pirólise e os processos de atomização, dificultando a calibração com soluções de referência. Em muitos casos, a calibração é feita com padrões sólidos ou materiais de referência certificados. Nesses casos, a curva de calibração pode ser construída utilizando-se massas crescentes de um mesmo material ou a mesma massa de materiais contendo diferentes concentrações dos analitos. No entanto, existem ainda algumas dificuldades que precisam ser vencidas. Por exemplo, alguns materiais “não usuais” não dispõem de CRM com composição matricial similar. Além disso, a maioria dos CRM disponíveis comercialmente apresenta homogeneidade para massas de amostras superiores a 100 ou 500 mg⁵, tornando difícil a sua aplicação em SS-ETAAS.

A maneira mais simples, barata e atrativa para calibrar um equipamento é, certamente, utilizando soluções de referência. O procedimento de calibração é fácil, rápido e não apresenta problemas de heterogeneidade. Entretanto, empregar as soluções de referência para analisar materiais sólidos depende de muitos fatores e alcançar o sucesso não é trivial. A principal dificuldade encontrada está relacionada à interferência causada pela matriz. Enquanto a atomização dos analitos provenientes de soluções ocorre em ambientes com baixa presença de concomitantes e os precursores químicos são geralmente conhecidos, em amostras sólidas o mesmo não acontece. Em muitos casos, na presença de matriz, ocorrem perdas dos elementos de interesse, durante a etapa de pirólise, devido à volatilização de compostos. Além disso, os mecanismos de atomização nesses casos podem ser diferentes daqueles observados para as soluções. No entanto, se o programa de aquecimento for otimizado e outras estratégias como uso de modificadores químicos forem adotadas, problemas de interferência causada pela matriz podem ser minimizados, tornando possível a análise direta de sólido por SS-ETAAS empregando curvas analíticas de calibração construídas com solução de referência.

Os métodos desenvolvidos possibilitaram a determinação direta de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em amostras de fígado bovino, músculo bovino e hepatopâncreas de lagosta utilizando curvas analíticas de calibração construídas com solução de referência. Para a determinação do Al e Cr, CRMs foram necessários para calibrar o equipamento.

Para a determinação de Cd e Zn, o uso do modificador químico permanente 250 µg W + 200 µg Rh foi indispensável. Nas Figuras 20 e 21 estão apresentadas as curvas analíticas de calibração para Cd e Zn construídas com solução de referência, fígado e músculo certificados. Devido à diferença de concentração de Cd no fígado ($0,50 \pm 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$) e no músculo ($0,013 \pm 0,011 \text{ mg kg}^{-1}$), as curvas analíticas de Cd foram apresentadas separadamente.

Na Figura 22 estão apresentadas as curvas analíticas de calibração para o Cu construídas com solução de referência, músculo e fígado bovino certificados. É importante ressaltar que, como as amostras de fígado e músculo apresentam concentrações de Cu muito distintas, foram utilizados comprimentos de onda alternativos.

As curvas analíticas de calibração para a determinação do Pb também foram construídas com solução de referência e com o fígado certificado (Figura 23).

Devido à baixa homogeneidade do Pb nesse CRM, obteve-se uma curva analítica de calibração com baixo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9560$) quando esse material foi empregado. A sobreposição das curvas analíticas de calibração indica a possibilidade de analisar amostra sólida utilizando calibração aquosa.

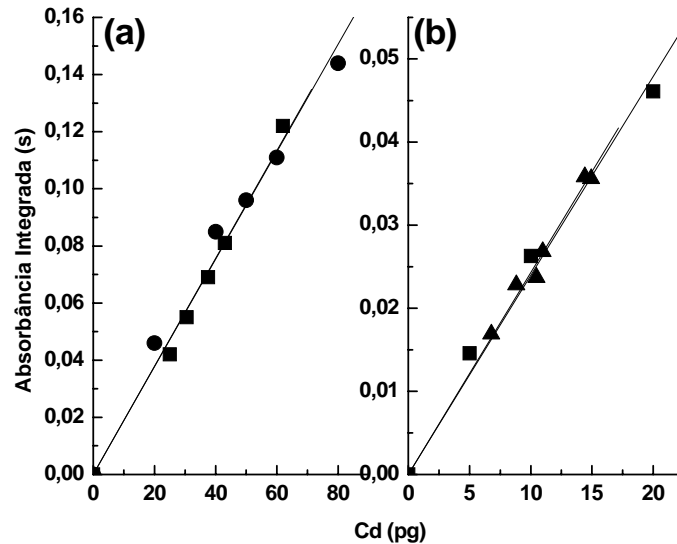


Figura 20 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Cd em (a) fígado bovino: ■ solução de referência ($y = 0,00188 x$, $R^2 = 0,9940$) e ● fígado certificado ($y = 0,00189 x$, $R^2 = 0,9970$); (b) músculo bovino: ■ solução de referência ($y = 0,00240 x$, $R^2 = 0,9957$) e ▲ músculo certificado ($y = 0,00243 x$, $R^2 = 0,9894$).

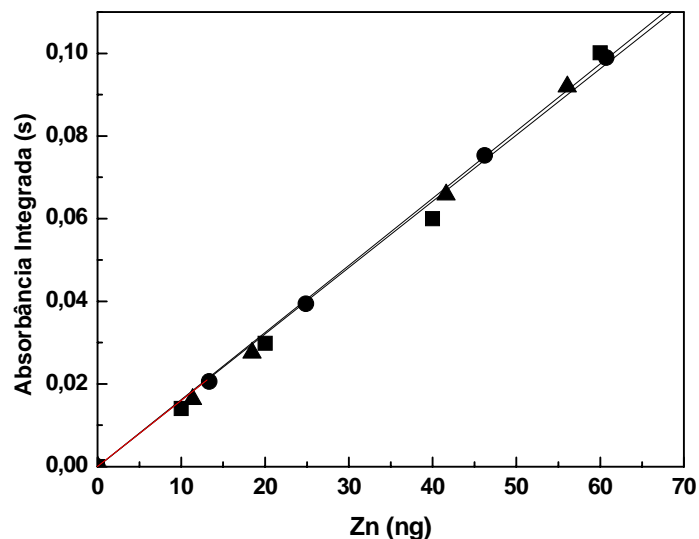


Figura 21 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Zn em fígado e músculo bovino: ■ solução de referência ($y = 0,00160 x$, $R^2 = 0,9976$), ● fígado certificado ($y = 0,00162 x$, $R^2 = 0,9999$) e ▲ músculo certificado ($y = 0,00161 x$, $R^2 = 0,9994$).

O sucesso no emprego da curva analítica de calibração construída com solução de referência para a determinação direta de As em hepatopâncreas de lagosta se deve ao uso do Pd+Mg como modificador químico (Figura 24). É importante salientar que a atuação do modificador químico sobre o As presente na amostra só foi possível devido à baixa massa de amostra utilizada (< 200µg).

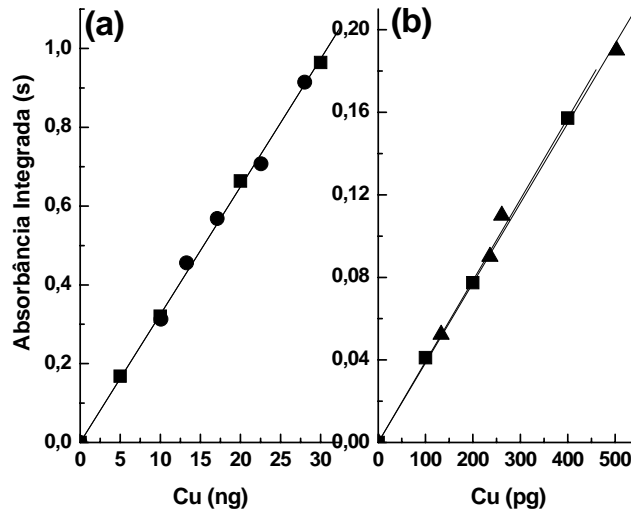


Figura 22 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Cu em (a) fígado bovino: ■ solução de referência ($y = 0,03246 x$, $R^2 = 0,9997$) e ● fígado certificado ($y = 0,003232 x$, $R^2 = 0,9984$); (b) músculo bovino: ■ solução de referência ($y = 0,00039 x$, $R^2 = 0,9997$) e ▲ músculo certificado ($y = 0,00039 x$, $R^2 = 0,9947$).

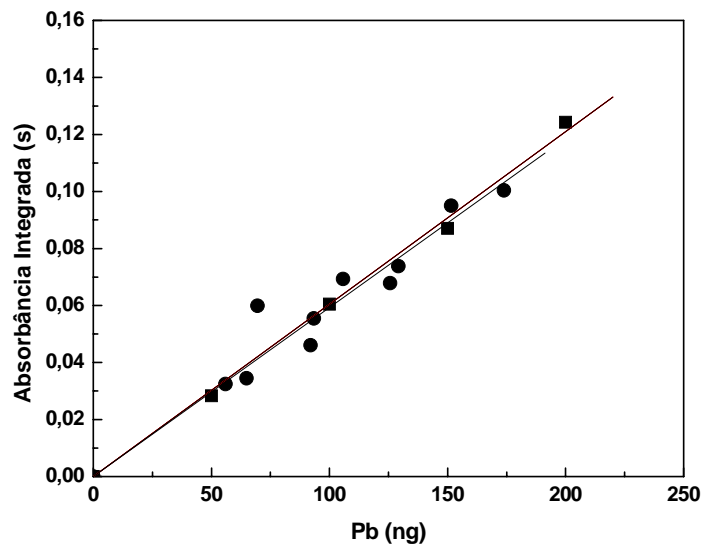


Figura 23 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Pb em fígado bovino: ■ solução de referência ($y = 0,000605 x$, $R^2 = 0,9987$) e ● fígado certificado ($y = 0,000593 x$, $R^2 = 0,9664$).

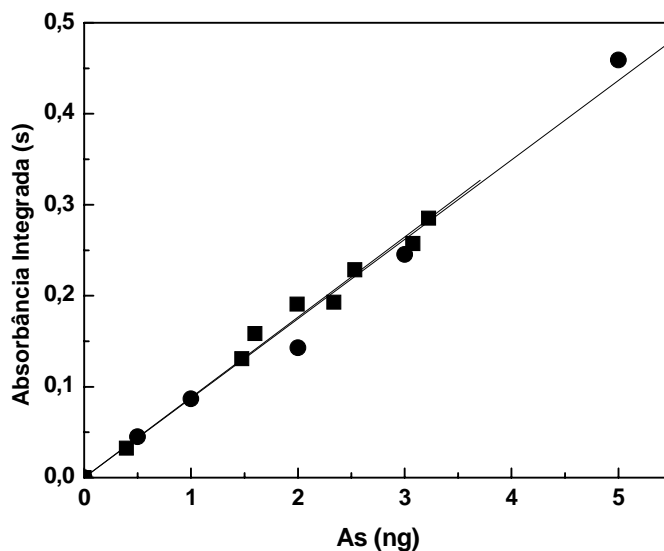


Figura 24 - Curva analítica de calibração para determinação de As em hepatopâncreas de lagosta: ■ solução de referência ($y = 0,08732 x$ e $R^2=0,9944$) e ● hepatopâncreas de lagosta certificada ($y = 0,08823 x$ e $R^2=0,9941$).

A determinação direta do Ni em hepatopâncreas de lagosta, utilizando curva analítica de calibração construída com solução de referência, foi possível somente mediante a adição de um oxidante, uma solução contendo 15% v/v H_2O_2 (Figura 25). Para melhorar a molhabilidade da amostra, o oxidante foi adicionado juntamente com surfactante (0,5% m/v Triton X-100). Esse oxidante favoreceu a eliminação dos concomitantes durante a etapa de pirólise, resultando na diminuição de problemas de interferências de matriz. Na ausência do oxidante, as curvas analíticas de calibração obtidas com solução de referência ($y = 2,91 \cdot 10^{-4} x$) e com CRM ($y = 2,41 \cdot 10^{-4} x$) não se sobrepunham.

Devido aos bons resultados obtidos para a determinação do Ni, o emprego do oxidante também foi avaliado na determinação do Al e Cr. Na ausência do oxidante, a curva analítica de calibração para o Al construída com solução de referência apresentava o valor de $4,08 \cdot 10^{-4}$ como coeficiente angular, enquanto o valor de $2,98 \cdot 10^{-4}$ foi encontrada para a curva construída com fígado certificado. Na presença do oxidante, as curvas analíticas de calibração construídas com CRM e com solução de referência tenham apresentado inclinações muito próximas (Figura 26). Embora o procedimento tenha se mostrado viável para a determinação do Al, ainda não se pode obter uma conclusão definitiva. A falta de homogeneidade do CRM gerou uma curva analítica com baixo coeficiente de correlação (Figura 26). Com relação ao Cr, nem mesmo a utilização da mistura oxidante tornou possível a

construção da curva analítica de calibração com solução de referência para analisar amostra sólida (Figura 27). Esse fato pode estar associado à interferência de matriz.

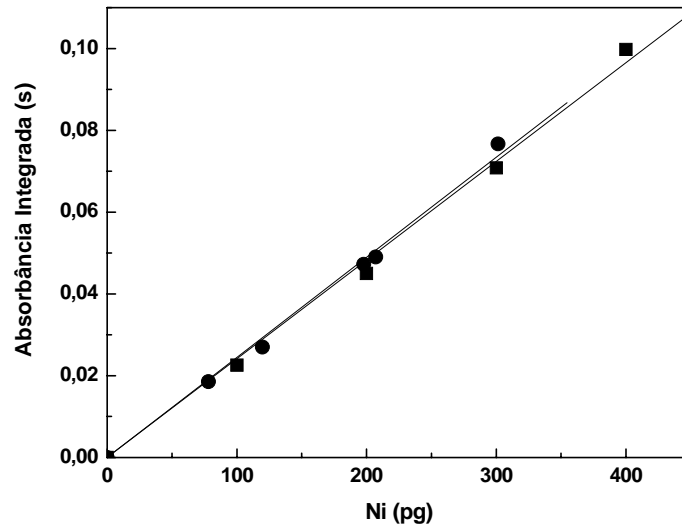


Figura 25 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Ni em hepatopâncreas de lagosta: ■ solução de referência ($y = 0,000241 x$, $R^2 = 0,9969$) e ● hepatopâncreas de lagosta certificado ($y = 0,000245 x$, $R^2 = 0,9560$).

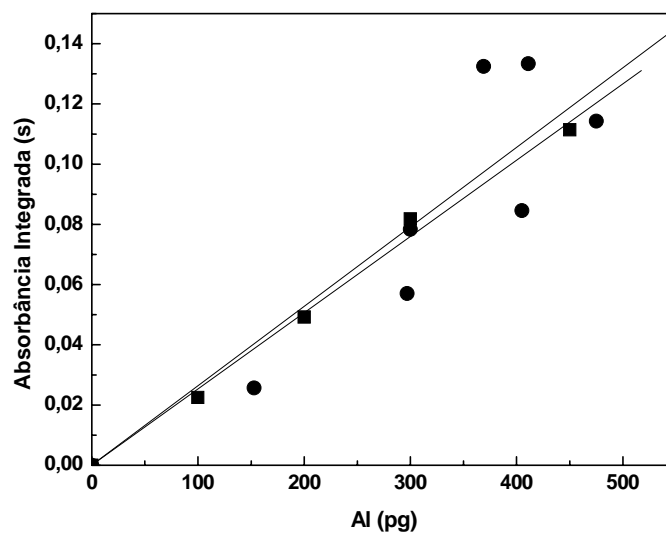


Figura 26 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Al em fígado bovino certificado: ■ solução de referência ($y = 0,000253 x$, $R^2 = 0,9969$) e ● fígado bovino certificado ($y = 0,000264 x$, $R^2 = 0,9030$).

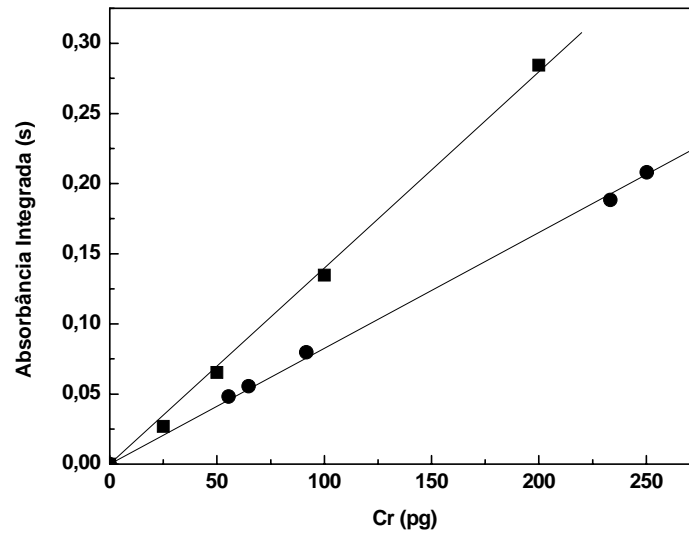


Figura 27 - Curvas analíticas de calibração para determinação de Cr em hepatopâncreas de lagosta: ■ solução de referência ($y = 0,00140 x, r = 0,9994$) e ● hepatopâncreas de lagosta certificado ($y = 0,000826 x, r = 0,9995$)

4.1.3. Validação dos métodos

Para certificar que as curvas analíticas de calibração construídas com soluções de referência realmente podem ser empregadas na análise direta de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino, de modo a fornecer resultados exatos, os CRMs foram analisados. Os resultados das determinações diretas desses elementos por SS-ETAAS em fígado, músculo e hepatopâncreas certificados estão apresentados na Tabela 7.

Exceto para a determinação de Pb em músculo, os resultados apresentados na Tabela 7 concordam em nível de confiança de 95%, indicando que os métodos propostos podem ser aplicados na determinação direta de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni e Zn em fígado e músculo bovino por SS-ETAAS.

Tabela 7 – Resultados para a concentração de Al, As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino.

	Fígado Bovino (NIST 1577b)		Músculo Bovino (NIST 8414)	
	Certificado (mg kg ⁻¹)	Encontrado (mg kg ⁻¹)	Certificado (mg kg ⁻¹)	Encontrado (mg kg ⁻¹)
Al	(3)	3,89 ± 0,98	-	-
As*	24,6 ± 2,2	25,7 ± 2,3	-	-
Cd	0,50 ± 0,03	0,51 ± 0,07	0,013 ± 0,011	0,010 ± 0,002
Cu	160 ± 8	154 ± 15	2,84 ± 0,45	2,84 ± 0,10
Ni*	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,6	-	-
Pb	0,129 ± 0,004	0,129 ± 0,070	0,38 ± 0,24	0,186 ± 0,075
Zn	127 ± 16	135 ± 12	142 ± 14	144 ± 8

*análise de hepatopâncreas de lagosta

4.1.4. Limite de detecção e massa característica

De acordo com a definição da IUPAC, o limite de detecção, expresso em termos de quantidade de analito a_L , está relacionado à menor resposta R_L que pode ser detectada com razoável certeza por um dado procedimento analítico⁴. Em geral, o limite de detecção é obtido com base nas medidas do branco analítico. Idealmente, a resposta do branco analítico pode ser obtida a partir de materiais que possuem composição matricial similar à amostra que está sendo analisada, porém, isento do analito de interesse. Efetuar as medidas em condições idênticas à amostra, inclusive na presença da mesma matriz é importante, pois a matriz pode influenciar nas medidas.

Quando as amostras são líquidas, encontrar o branco analítico não é crítico. Nesse caso, um branco sintético composto pode facilmente ser preparado assim como é feito com a amostra, por exemplo, misturando solventes e elementos majoritários presentes na matriz. Por outro lado, em análise direta de sólido, a obtenção desse branco não é trivial, pois o material a ser utilizado para prepará-lo não existe ou é difícil de ser preparado sinteticamente.

Muitos trabalhos da literatura fazem uso de diferentes ferramentas para calcular o limite de detecção associado às técnicas de análise direta de sólidos. A

forma mais usual tem sido o cálculo do limite de detecção a partir de uma solução de referência e seu correspondente branco⁹¹. Entretanto, esse tipo de aproximação dificilmente pode ser utilizado como um guia real da análise direta de sólido.

Uma alternativa seria medir o "branco da amostra", por meio da obtenção do sinal do branco a partir de uma amostra com mesma composição matricial, porém com concentração muito baixa do analito de interesse⁴. Na dificuldade de encontrar esse tipo de material, é possível substituí-los por outros materiais sintéticos. O SiC aquecido a 2200°C para eliminar as impurezas, por exemplo, é um candidato a branco analítico. Da mesma maneira, outros materiais como o grafite e a celulose de grau analítico são algumas boas opções⁴.

Uma outra forma de medir o branco analítico introduzida por Verrept e colaboradores⁹² e que foi adotada nesse trabalho, é o uso da plataforma de grafite vazia como o branco, o qual é referido como sinal referente à "massa zero". Nessa situação, o desvio padrão do branco analítico é aquele proveniente do "ruído" inerente ao equipamento. No caso das determinações envolvendo comprimentos de onda mais sensíveis, o desvio padrão está diretamente relacionado às contaminações aleatórias.

Conhecendo-se o valor do desvio padrão de 20 medidas do branco analítico (σ), pode-se calcular a massa do analito referente a esse desvio (a_L) através da equação $3\sigma/S$, na qual S é a inclinação da curva analítica de calibração. Por fim, o valor do limite de detecção (em concentração) pode ser obtido utilizando-se a equação $C_L = a_L/m_{\max}$, na qual m_{\max} se refere à máxima massa de amostra analisada.

Os valores das massas características (m_0) e os limites de detecção (LD) obtidos para o método estabelecido para a determinação de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn estão apresentados na Tabela 8. As massas características foram calculadas baseadas em 0,0044 (1 % de absorção) de absorbância integrada.

De um modo geral, os limites de detecção obtidos em SS-ETAAS foram inferiores àqueles observados para ETAAS. Esse fato está associado à característica de maior poder de detecção da técnica, já que a amostra não é diluída como ocorre em ETAAS. Os valores de m_0 e LD para o Cu e Zn foram elevados pois utilizou-se comprimentos de onda alternativos (menos sensíveis) para efetuar a análise. Com relação aos outros elementos, somente o Al apresentou elevado limite de detecção. Esse fato pode estar associado ao aumento do ruído do sinal analítico, proveniente

principalmente de contaminações aleatórias que pode ter ocorrido durante o transporte da plataforma da balança para o interior do tubo de grafite.

Os valores das massas características encontrados em SS-ETAAS foram praticamente os mesmos ou, em algumas situações, ligeiramente piores do que aqueles observados para a ETAAS. Em geral, analitos presentes nas amostras sólidas requerem temperaturas de atomização superiores àqueles que se encontram na forma de solução. No entanto, como tem-se como objetivo empregar curva analítica de calibração construída com solução de referência para analisar diretamente o sólido, deve-se adotar uma condição compromissada (T_A) entre a solução de referência e a amostra sólida. Como consequência, pode haver uma ligeira degradação na massa característica e, conseqüentemente na sensibilidade.

Tabela 8 – Valores estimados de massa característica (m_0) e limite de detecção (LD) para Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn

	SS-ETAAS		ETAAS	
	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	m_0 (pg)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	m_0 (pg)
Al	0,28	50,0	0,18	35,2
As*	0,29	42,7	7,7	21,0
Cd	0,021	2,34	0,10	2,17
Cr	0,037	5,33	0,78	7,10
Cu	9,93 ^a e 0,066 ^b	1360 ^a e 11,3 ^b	-	-
Ni*	0,22	30,1	1,55	12,2
Pb	0,016	7,27	1,12	13,8
Zn	63,7	2750	-	-

^aafígado; ^bmúsculo; *hepatopâncreas de lagosta

4.1.5. Avaliação da homogeneidade

4.1.5.1. Preparo das amostras e efeito do tempo de moagem no tamanho de partícula

Em determinações elementares por SS-ETAAS, os procedimentos de solubilização de amostras não são necessários, no entanto, não se pode dizer que a

etapa de tratamento de amostra é completamente isenta. Materiais que contêm alto teor de água, como os tecidos biológicos em estudo, precisam ser secos antes de serem submetidos à análise. Evitar os riscos de contaminação, perdas dos analitos por volatilização e não causar alterações na composição do material (no caso da especiação química) durante a etapa de secagem ou moagem são alguns cuidados que devem ser tomados durante as etapas de preparo das amostras.

A secagem por evaporação e por liofilização foram os dois processos utilizados. No primeiro caso, as amostras foram inicialmente secas em forno de microondas (30 a 60 min a 30 W) e posteriormente em estufa (60 °C) até atingir o peso constante (48 h para fígado e 72 h para músculo). A utilização de forno de microondas na etapa inicial foi uma forma de acelerar o processo de secagem e eliminar microorganismos responsáveis pela decomposição do material.

Entre os dois procedimentos, a secagem por evaporação parece estar mais susceptível às perdas de compostos voláteis, devido ao aumento da temperatura. No entanto, Yanan⁹³ utilizou, com sucesso, um jato de ar com temperatura entre 80 e 85°C para secar amostras de fígado suíno candidato a material de referência. A liofilização é um procedimento comumente empregado para secar materiais biológicos. Embora ocorra a baixa temperatura e pressão, estudos da literatura mostraram que a volatilização de compostos também pode ocorrer durante esse processo⁹⁴.

A comparação visual das amostras de fígado e músculo bovinos secas pelos dois procedimentos propostos mostrou uma nítida diferença no aspecto físico da amostra. As amostras secas em microondas seguido pela estufa eram mais duras e devido à carbonização apresentavam coloração bastante escura. As amostras liofilizadas, por outro lado, apresentavam uma coloração mais clara (marrom claro) e menos densa, com aspecto de isopor. Nos dois casos de secagem utilizados no presente trabalho, a boa exatidão encontrada entre os resultados analíticos é um forte indício de que não ocorreram perdas ou contaminação durante os processos (resultados na seção 4.1.4).

A moagem é um outro importante procedimento que faz parte da etapa de preparo de amostra, pois é a responsável pela homogeneização do material. Esse processo é indispensável principalmente quando a massa de amostra a ser analisada é muito pequena. Considerando massas de amostras inferiores a 1 mg, os elementos traços tendem a não ter uma distribuição homogênea e a representatividade será função do tamanho das partículas¹⁰.

Os sistemas de moagem utilizados no desenvolvimento do presente projeto foram os moinhos de bolas e o criogênico. No primeiro caso a moagem ocorre devido ao impacto das bolas com a amostra. O atrito gera uma ligeira elevação da temperatura, a qual aumenta com o tempo de moagem. Porém esse aquecimento não foi suficiente para volatilizar elementos como o Cd como foi observado por Lima e colaboradores²¹.

A moagem criogênica tem sido a mais utilizada para moer amostras com alto teor de fibras e gorduras. Como ocorre em ambientes de baixa temperatura (-196°C), o risco de eventuais perdas de compostos por volatilização é muito menor. A baixa temperatura empregada provoca falhas nas estruturas cristalinas do material tornando-as mais quebradiças, facilitando, assim, a moagem²³.

Para avaliar a influência do tempo de moagem sobre a homogeneidade e tamanho das partículas, as amostras de fígado e músculo bovino secas em microondas seguida pela estufa e liofilizadas foram moídas em moinho de bolas e em moinho criogênico. Na moagem utilizando moinho de bolas, diferentes tempos de moagem foram testados (5, 15, 30 e 60 min) para avaliar a sua influência sobre o tamanho das partículas e sobre a homogeneidade.

Na Figura 28 e 29 estão apresentadas, respectivamente, as distribuições do tamanho de partículas para o fígado certificado (SRM 1577b) e para algumas das amostras de fígado bovino preparadas no laboratório. Resultados da determinação do tamanho de partícula mostraram que o tamanho de partícula médio do fígado certificado é de aproximadamente 86 μm . Esse material, que foi liofilizado e moído em blenda, apresenta uma distribuição de partícula bi-modal (Figura 28), fato que pode ser prejudicial à homogeneidade do material.

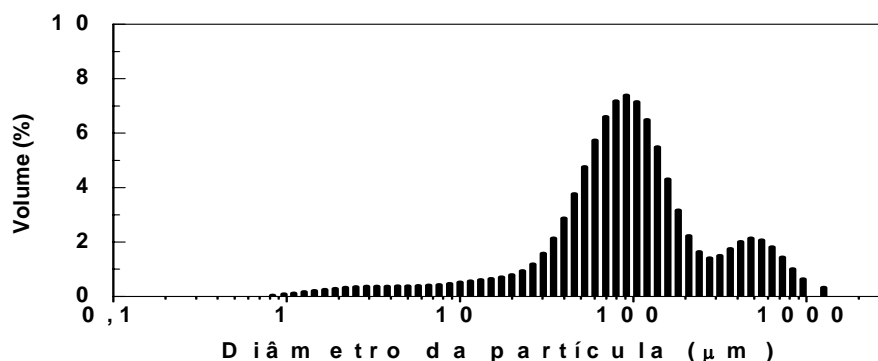


Figura 28 - Distribuição do tamanho de partícula em fígado bovino certificado (NIST SRM 1577b)

Com relação às amostras de fígado preparadas no laboratório, observa-se que o diâmetro médio das partículas das amostras secas em microondas seguida pela estufa e moídas por 5 minutos em moinho de bolas é de aproximadamente 130 μm (Figura 29a), enquanto daquelas moídas por 30 minutos é em torno de 100 μm (Figura 29b). Amostras liofilizadas, por sua vez, apresentam tamanhos médios de partículas em torno de 100 μm quando moídas por 5 minutos em moinhos de bola e 80 μm quando moídas por 30 min. Esses resultados mostram que o aumento do tempo de moagem de 5 para 30 min reduziu o tamanho das partículas em até 33%. No entanto, quando moagem de 60 minutos foi empregada, nenhuma melhora significativa foi observada quando comparada àquelas moídas por 30 min. Para as amostras moídas criogenicamente, o tamanho médio das partículas foi 94 μm e 70 μm , respectivamente para o fígado seco em microondas seguida pela estufa e para o fígado liofilizado. Esses valores foram similares àqueles obtidos para amostras moídas por 30 minutos em moinho de bolas. Considerando que o tempo de moagem em moinho criogênico foi de 6 minutos, pode-se dizer que esse moinho é mais eficiente que o moinho de bolas. Essa eficiência está associada à baixa temperatura utilizada durante o processo de criogenia (-196°C), o qual provoca quebra de estruturas tornando-a mais quebradiça e, portanto, mais fácil de serem moídas²³.

Com relação às amostras de músculo bovino, não houve mudança significativa nos resultados das determinações do tamanho de partícula (Figura 30). Para a maioria das amostras de músculo, o tamanho médio das partículas foi de 80 μm . Somente o músculo liofilizado e moído criogenicamente apresentou partículas da ordem de 70 μm . Esses resultados podem estar associados à presença de nervos e gorduras, que dificultam o processo de homogeneização. Embora, grande parte deles tenha sido retirada durante a etapa de limpeza.

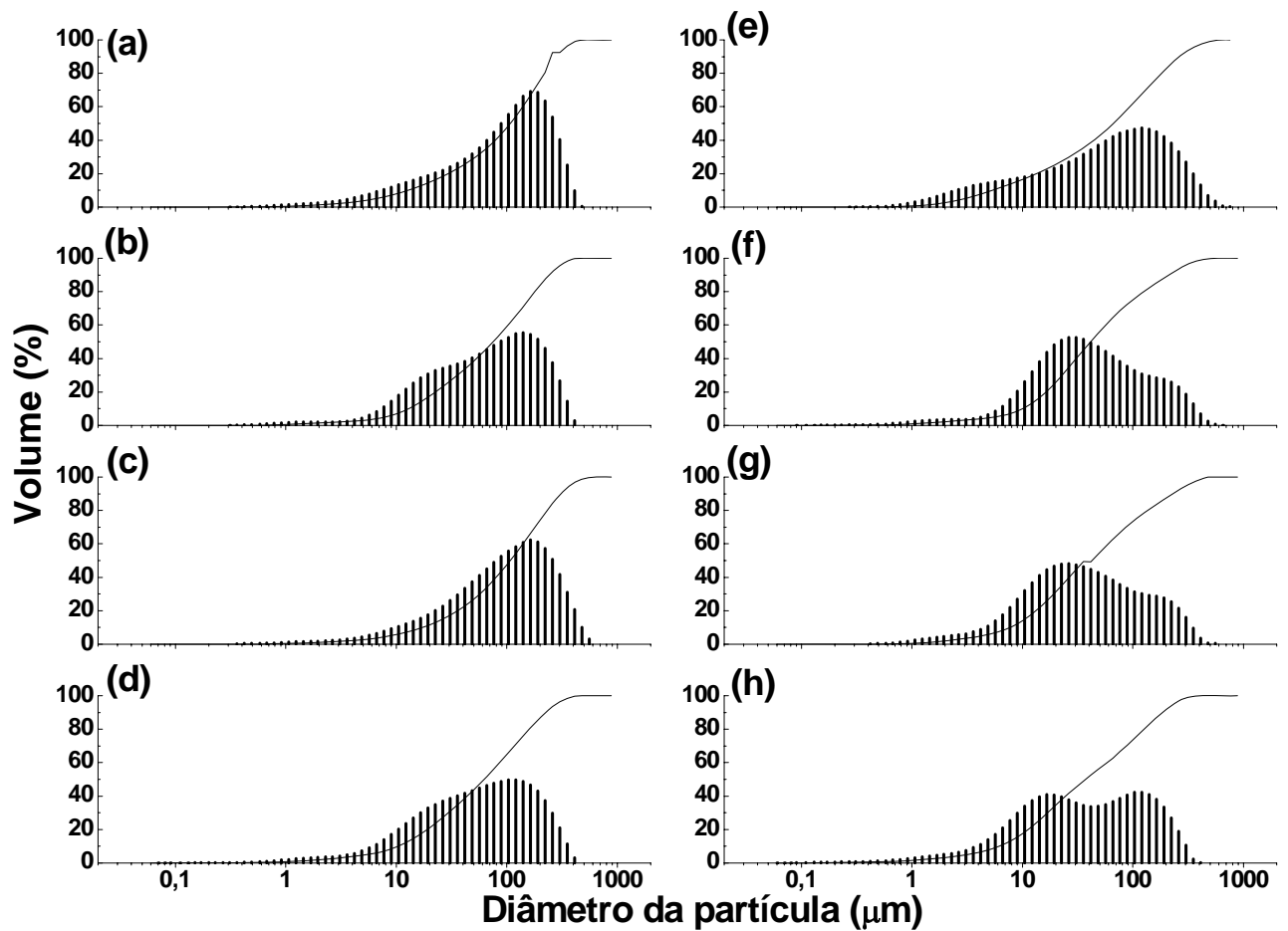


Figura 29 - Distribuição do tamanho de partículas em amostras de fígado secas em microondas seguida pela estufa e moídas em (a) moinho de bolas por 5 min, (b) moinho de bolas por 30 min, (c) moinho de bolas por 60 min e em (d) moinho criogênico por 6 min; fígado liofilizado e moído em (e) moinho de bolas por 5 min, (f) moinho de bolas por 30 min, (g) moinho de bolas por 60 min e em (h) moinho criogênico por 6 min.

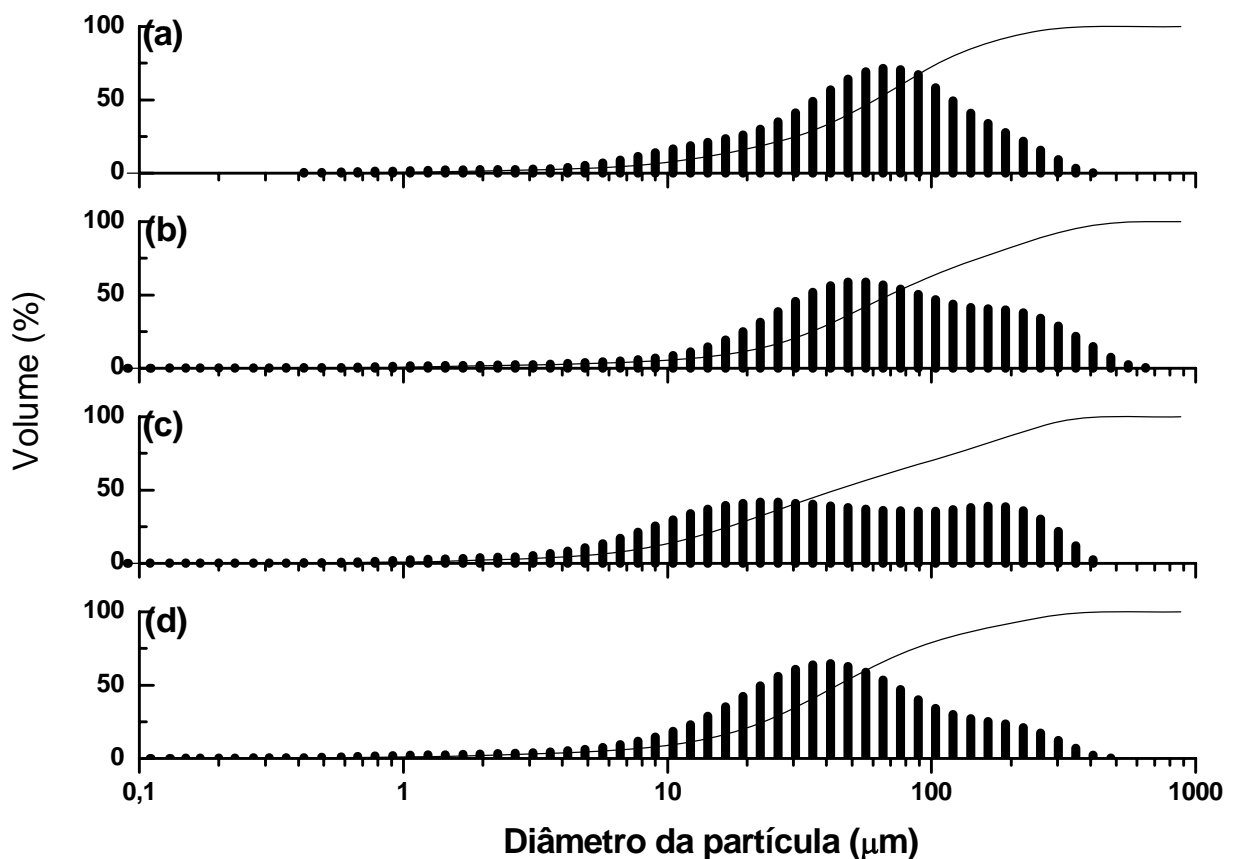


Figura 30 - Distribuição do tamanho de partícula em amostras de músculo secas em microondas seguida pela estufa e moídas em (a) moinho de bolas por 30 min e (b) moinho criogênico; liofilizadas e moídas em (c) moinho de bolas por 30 min e em (d) moinho criogênico.

Embora o tamanho médio das partículas obtido para as amostras de fígado e músculo bovino, preparados em laboratório, tenham sido superiores aos citados por Zeisler⁵ (10 μm), pode-se considerar 80 μm suficiente para garantir a homogeneidade desses materiais. Nancy e Miller-Ihli⁹⁵ mostraram que para amostras biológicas, o tamanho médio das partículas é menos importante do que para outros tipos de materiais, pois nesses casos, os analitos estão fracamente retidos e podem se libertar mais facilmente da matriz.

Um outro aspecto importante que deve ser considerado durante a etapa do preparo da amostra é o problema de contaminação. Como a moagem ocorre basicamente por impacto entre a amostra e o material que compõe o moinho, os riscos de contaminação são bastante elevados. Embora o moinho tenha sido

devidamente limpo, resultados das análises de Cr e Ni em fígado (Figura 31) e músculo bovino (Figura 32) mostram que houve contaminação durante a moagem especialmente quando a moagem foi feita em moinho de bolas.

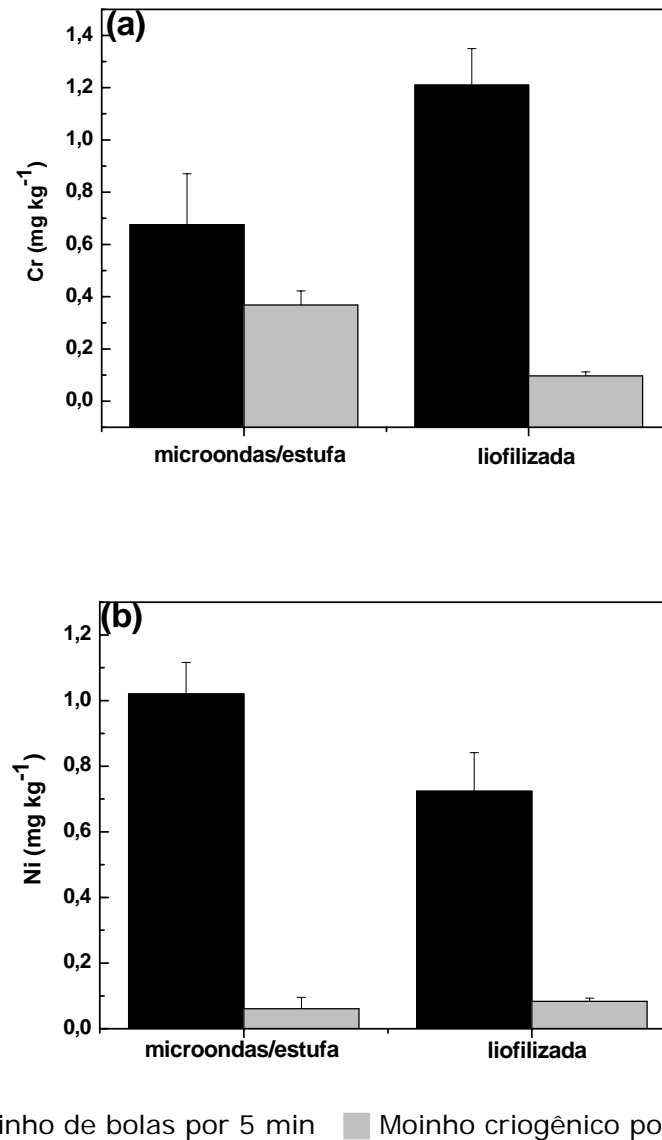


Figura 31 – Determinação de (a) Cr e (b) Ni em fígado bovino moído em moinho de bolas e em moinho criogênico.

Uma possível contaminação proveniente do moinho criogênico era esperada, uma vez que, as tampas laterais do tubo de policarbonato e a barra magnética são compostos por aço inoxidável. No entanto, o grau de desgaste desses materiais aumenta com a dureza da amostra. No caso, o fígado e o músculo bovino que são materiais de baixa dureza, a contaminação observada foi pequena. O moinho de bolas feito de carbeto de tungstênio não é uma fonte de Cr e Ni. No entanto, a

contaminação observada foi superior àquela provocada pelo moinho criogênico e pode ter sido proveniente de outros materiais que foram moídos anteriormente nos mesmos.

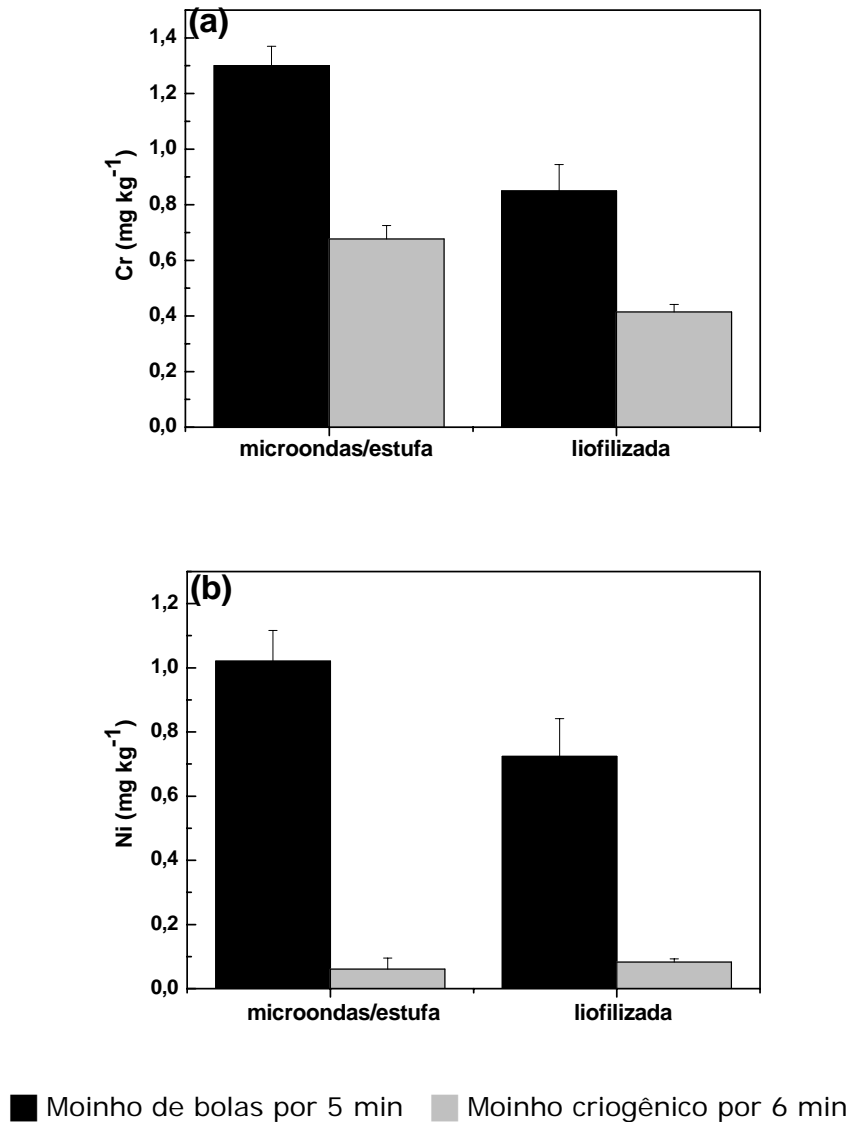


Figura 32 – Determinação de (a) Cr e (b) Ni em músculo bovino moído em moinho de bolas e em moinho criogênico.

4.1.5.2. Avaliação da massa mínima representativa e fator de homogeneidade

Juntamente como o pré-tratamento da amostra, a amostragem, assim como a subamostragem são outras etapas bastante críticas dentro da seqüência analítica. A massa de amostra a ser analisada deve ser adequada de modo a garantir a representatividade e gerar resultados exatos e precisos. A massa adequada de amostra depende de diversos fatores como da densidade do material, da

concentração do analito e principalmente da sua homogeneidade. Em geral, a utilização de massas muito pequenas tende a comprometer a representatividade, sendo, por esse motivo necessário considerar uma massa mínima.

Pauwels e colaboradores^{9,96} propuseram uma equação utilizada para calcular a massa mínima representativa (M) de materiais de referência certificado:

$$M=(k'_2*S_m/UNC)^2*m, \quad (\text{Equação 5})$$

na qual k'_2 é um fator relacionado ao limite de tolerância do estudo da microhomogeneidade do material (tabelado), UNC é a incerteza do certificado e S_m é o desvio padrão do estudo da homogeneidade das amostras de massa m . O fator de homogeneidade (H_e) é um outro parâmetro que deve ser considerado para avaliar a homogeneidade das amostras. Os cálculos envolvidos para encontrar o fator estão apresentados na seção 2.1.1.1.

Nesse trabalho, a avaliação da massa mínima representativa foi feita experimentalmente por meio de análise de massas crescentes de amostras. Nas Figuras 33 a 37 estão apresentados os gráficos da influência da massa de amostra sobre os resultados da determinação de Al, Cd, Pb, Cu e Zn em fígado bovino. Cada ponto presente nos gráficos representam a concentração média de 5 medidas com seu respectivo desvio padrão. A linha cheia representa o valor certificado (para o fígado certificado) ou determinado nas amostras por ETAAS após digestão, enquanto as linhas tracejadas, o intervalo de confiança. Na Figura 37a, o intervalo de confiança não foi apresentado por que o valor de concentração de Al representa um valor de referência e não o valor certificado. Para a realização desse estudo, as determinações foram feitas utilizando os programas de aquecimento otimizados para SS-ETAAS (Tabela 4 e 6). As amostras utilizadas para esse fim foram o CRM, o fígado e músculo seco em microondas seguido pela estufa e moído em moinho de bolas por 30 min e em moinho criogênico, e o fígado e o músculo liofilizado e moído em moinho de bolas por 30 min.

As Figuras 33 a 37 mostram que, de um modo geral, quanto menor a massa, pior a exatidão e a precisão dos resultados, comprovando a afirmação previamente feita por Pauwels e colaboradores⁹. Somado a isso, existe ainda a dificuldade da pesagem que é muito mais crítico para menores massas de amostra.

Para o Cd (Figura 33a), na amostra de fígado certificado foi encontrado um valor de $H_e < 10$, mesmo quando massas em torno de 20 μg foram amostradas,

indicando boa homogeneidade do material. Embora o certificado de análise desse material, fornecido pelo NIST, recomende que no mínimo 250 mg dessa amostra seja usado para garantir o valor certificado, a massa mínima representativa calculada conforme a equação de Pauwels⁹, indicou uma massa de 1,17 mg. No estudo de massa apresentado na Figura 31a, observa-se um valor de massa ainda menor, 70 μg de amostra. O valor do RSD quando essa massa é aplicada é inferior a 8%.

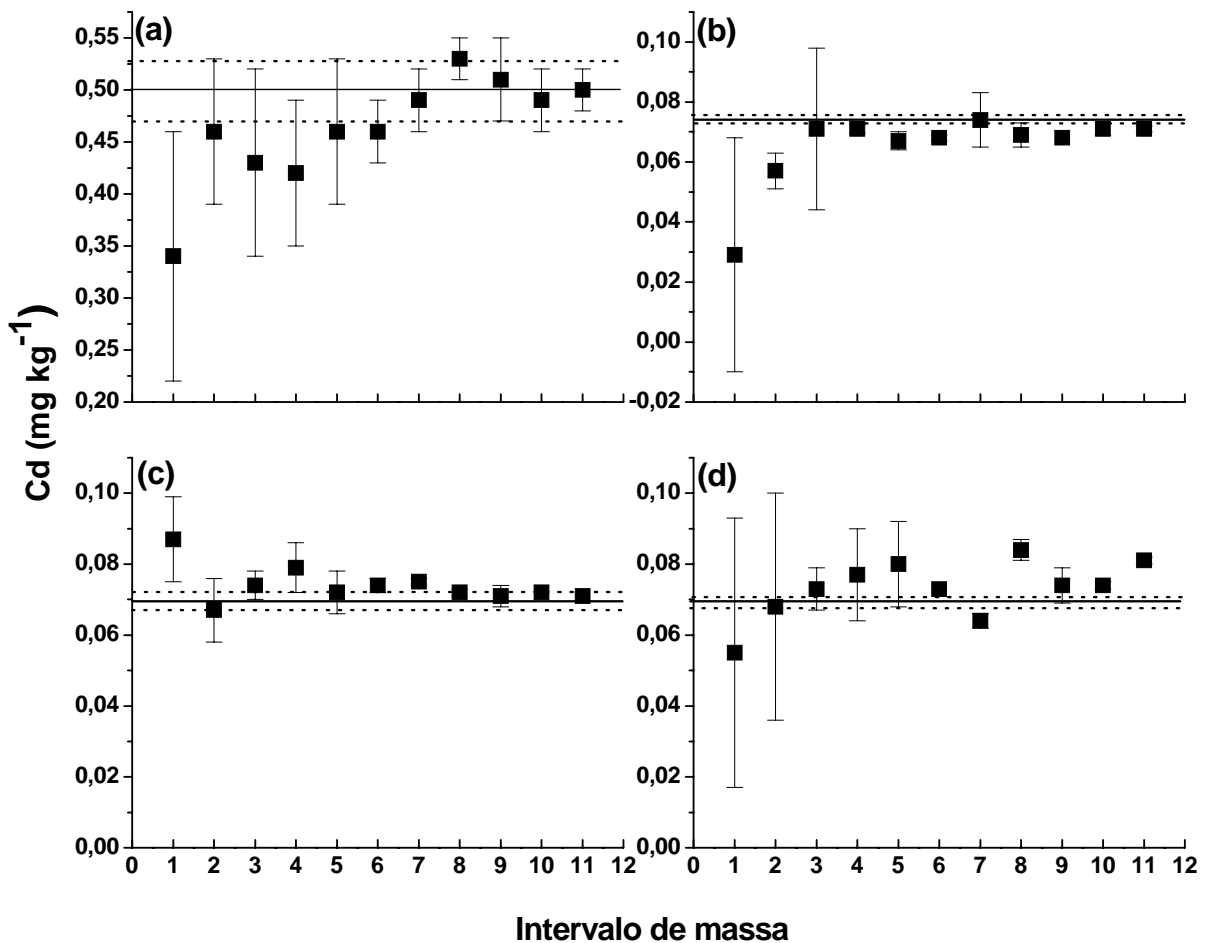


Figura 33 - Estudo de homogeneidade para Cd em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bola por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Os valores de H_e encontrados para o Pb no fígado certificado (Figura 34a) foram superiores a 10, mesmo para massas em torno de 900 μg . Esses resultados

indicam que o material não apresenta uma homogeneidade suficiente do Pb para massas tão pequenas.

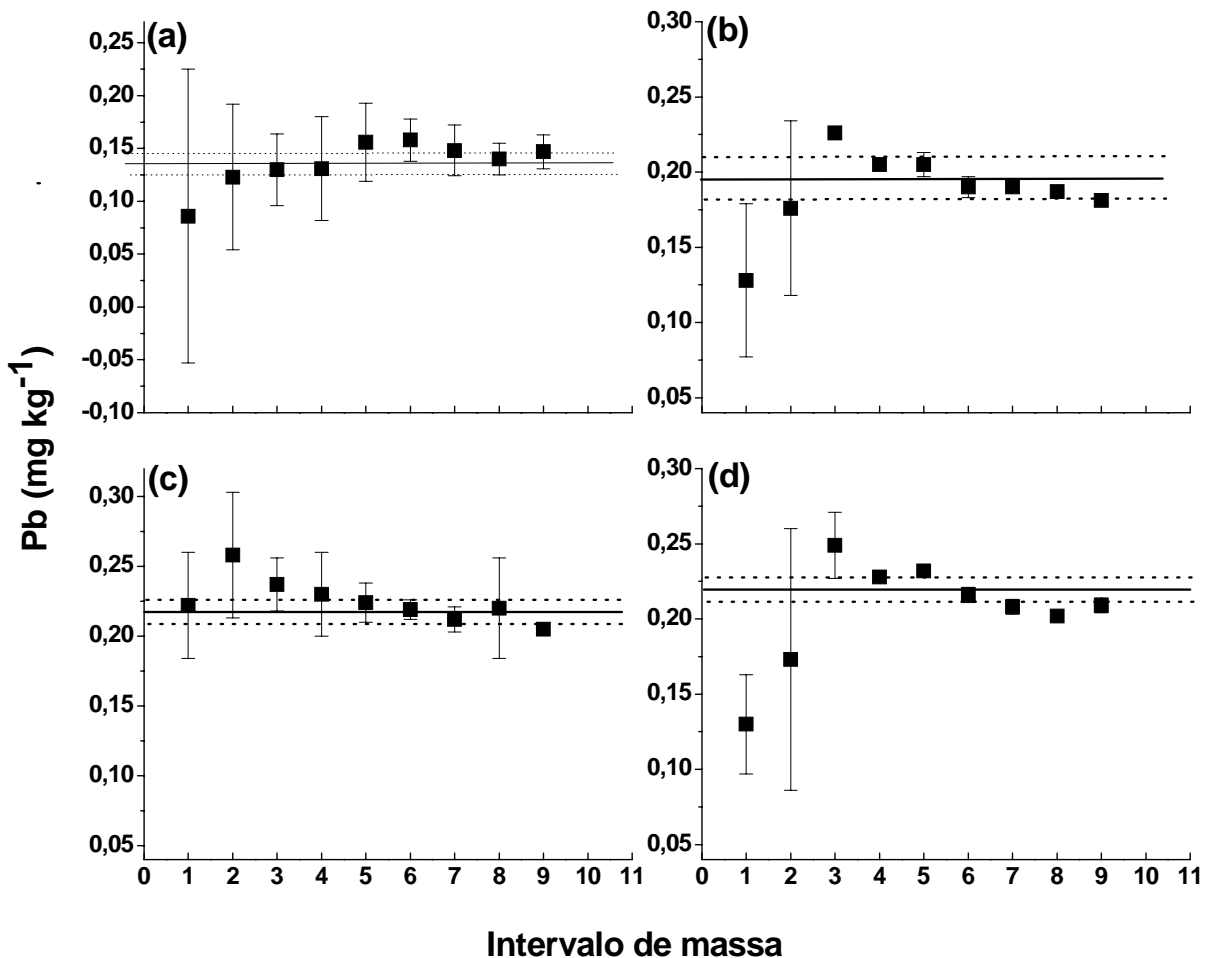


Figura 34 - Estudo de homogeneidade para Pb em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bola por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Os resultados das determinações de Cd nos diferentes intervalos de massas das amostras de fígado, seco em forno de microondas seguida pela estufa e moídas em moinho de bolas (Figura 33b) ou criogênico (Figura 33d) seguiram uma mesma tendência. Para massas de amostra inferiores a 40 μg , elevados desvios foram observados. Quando o fígado liofilizado e moído em moinho de bolas (Figura 33c) foi analisado, observaram-se resultados exatos e com baixo desvio padrão somente

quando massas de amostra superiores a 90 µg foram utilizadas. Apesar de o fator de homogeneidade encontrado para o Cd nessa amostra ter sido inferior a 10 para todos os intervalos de massa avaliados, massas muito pequenas geraram resultados inexatos.

As massas mínimas de fígado necessárias para a determinação de Pb foram maiores do que aquelas observadas para o Cd. A menor sensibilidade do Pb em ETAAS, comparado com o Cd, é um dos fatores que deve ser considerado para justificar essas maiores massas. Comparando-se os resultados obtidos para os materiais preparados no laboratório, observa-se que o comportamento das amostras secas em forno de microondas seguida pela estufa (Figuras 34b e 34d) também seguiu uma mesma tendência, independente do procedimento de moagem utilizado. Nessas amostras, os desvios padrão foram superiores a 25%, quando massas de amostras inferiores a 400 µg foram analisadas. Para massas maiores, obteve-se $H_e < 10$ (Figura 34b e 34d).

O perfil do gráfico para o Pb na amostra liofilizada (Figura 34c), foi muito semelhante àquele obtido para o CRM (Figura 34a), cujo preparo também utiliza a liofilização para secagem. Nesse caso, resultados dentro do nível de confiança (95%) foram obtidos somente quando massas superiores a 600 µg foram analisadas.

Resultados similares podem ser observados para o Cu e Zn, nas Figuras 35 e 36, respectivamente. No geral, a precisão e a exatidão dos resultados são pioradas quando pequenas massas de amostras são utilizadas.

O tipo de secagem ou moagem utilizado no preparo da amostra de fígado parece não ter afetado significativamente na homogeneidade do Cu (Figuras 35b, 35c, 35d). Os melhores valores de fator de homogeneidade, com boa precisão e exatidão, foram obtidos para massas superiores a 50 µg. Os melhores resultados encontrados foram para o fígado seco em microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bolas ou criogênico (Figura 35b e 35d).

Para o Zn, o tipo de procedimento de preparo de amostra afetou significativamente a sua determinação no fígado bovino. Na Figuras 36a e 36c estão apresentadas as determinações de Zn no fígado certificado e no fígado liofilizado moído em moinho de bolas, respectivamente. Ambos apresentam o mesmo comportamento, mas são diferentes da amostra seca em microondas seguida pela estufa e moída em moinho de bolas (Figura 36b). Quando pequenas massas dessa amostra (Figura 36b) foram analisadas, observou-se perdas de precisão e exatidão.

Ao contrário, para as outras duas amostras (Figuras 36a e 36c), somente a precisão era afetada. No entanto, quando a amostra seca em microondas seguida pela estufa foi moída em moinho criogênico seu comportamento se tornou similar à amostra liofilizada. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de a amostra ter sido submetida à baixa temperatura (-196°C) durante a moagem, o qual, provavelmente, facilitou o processo de homogeneização. Desse modo, pode-se inferir que submeter a amostra à baixa temperatura, seja por meio da liofilização ou por meio da criogenia durante a moagem, é importante para alcançar um material mais homogêneo.

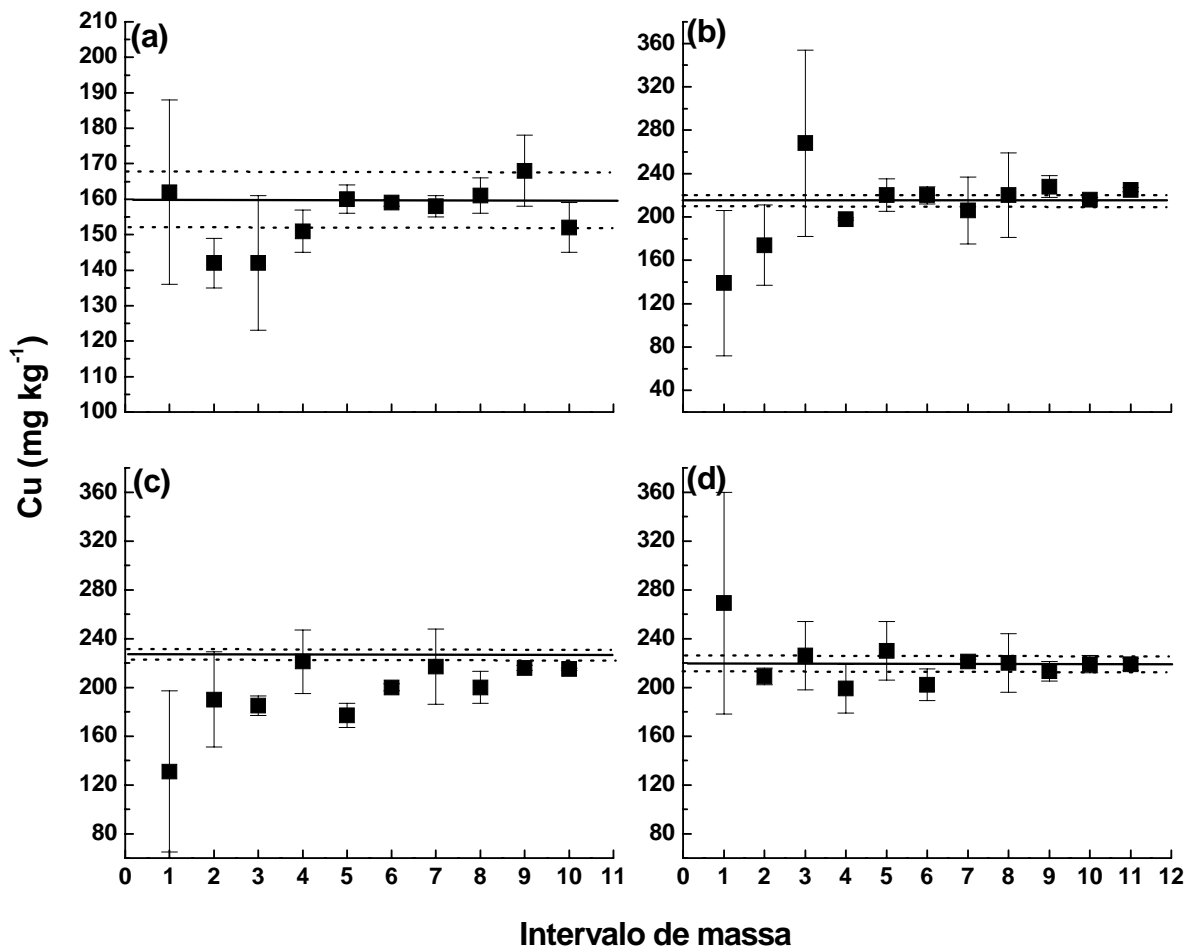


Figura 35 - Estudo de homogeneidade para Cu em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bolas por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

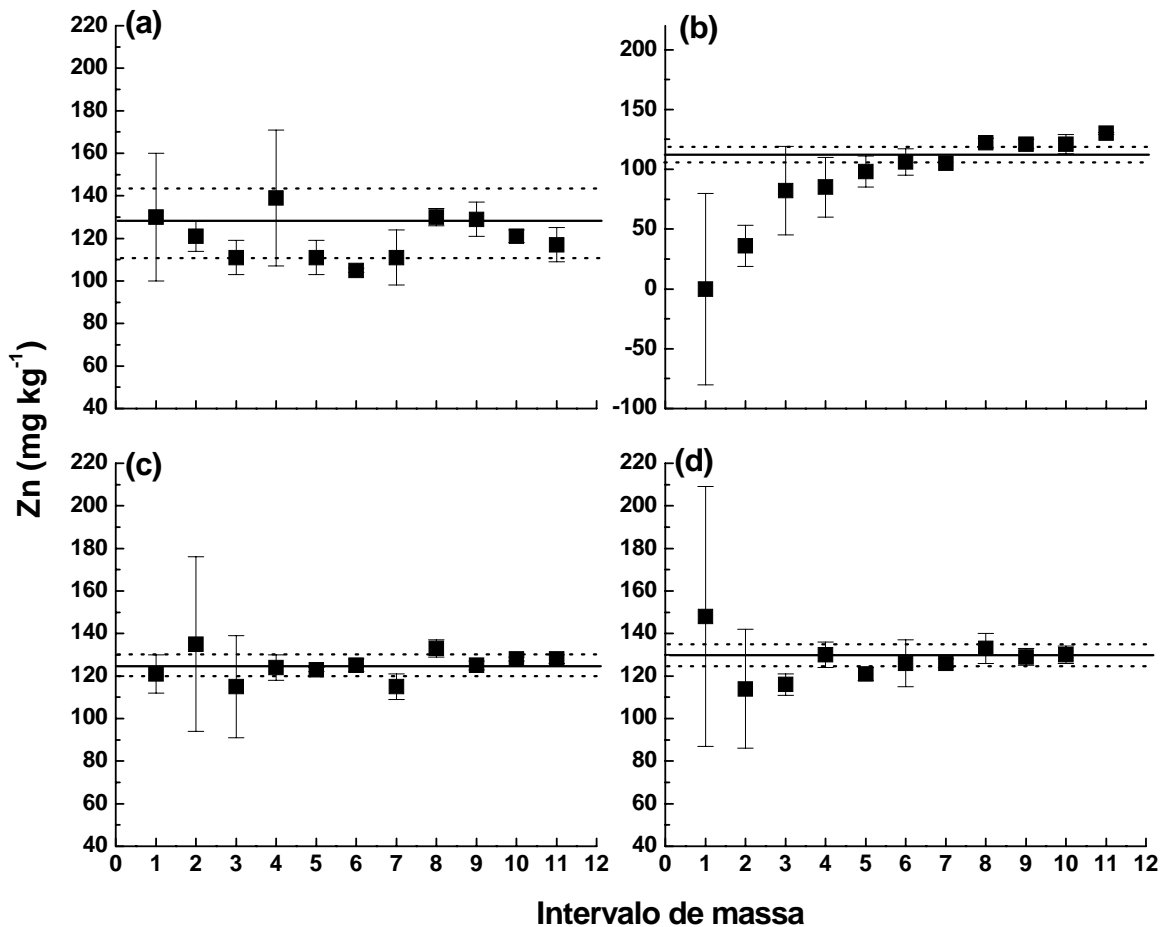


Figura 36 - Estudo de homogeneidade para Zn em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bola por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bolas por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Os resultados apresentados para o Al foram os mais críticos, principalmente, devido a problemas de contaminação. Como o fígado liofilizado foi contaminado durante a moagem em moinho de bolas, o estudo envolvendo a determinação do Al nessa amostra não foi efetuado. A influência da massa de amostra sobre a homogeneidade da distribuição do Al no fígado certificado e no fígado preparado no laboratório estão apresentadas na Figura 37. Observa-se que os desvios das medidas começaram a diminuir no intervalo 8, que indica massas superiores a 80 μg . Comparando-se os resultados para o fígado seco em microondas seguida pela estufa moídos em moinho de bola (Figura 37b) e em moinho criogênico (Figura 37c), percebe-se que no segundo caso, os desvios padrão obtidos são menores,

indicando melhor homogeneidade do material. Entretanto, para essa amostra, além de o resultado obtido por SS-ETAAS ser superior ao da amostra moída em moinho de bolas, ele não confere com aquele obtido por ETAAS. Esse fato sugere uma possível contaminação durante a análise, proveniente do transporte da amostra da balança para dentro do tubo de grafite.

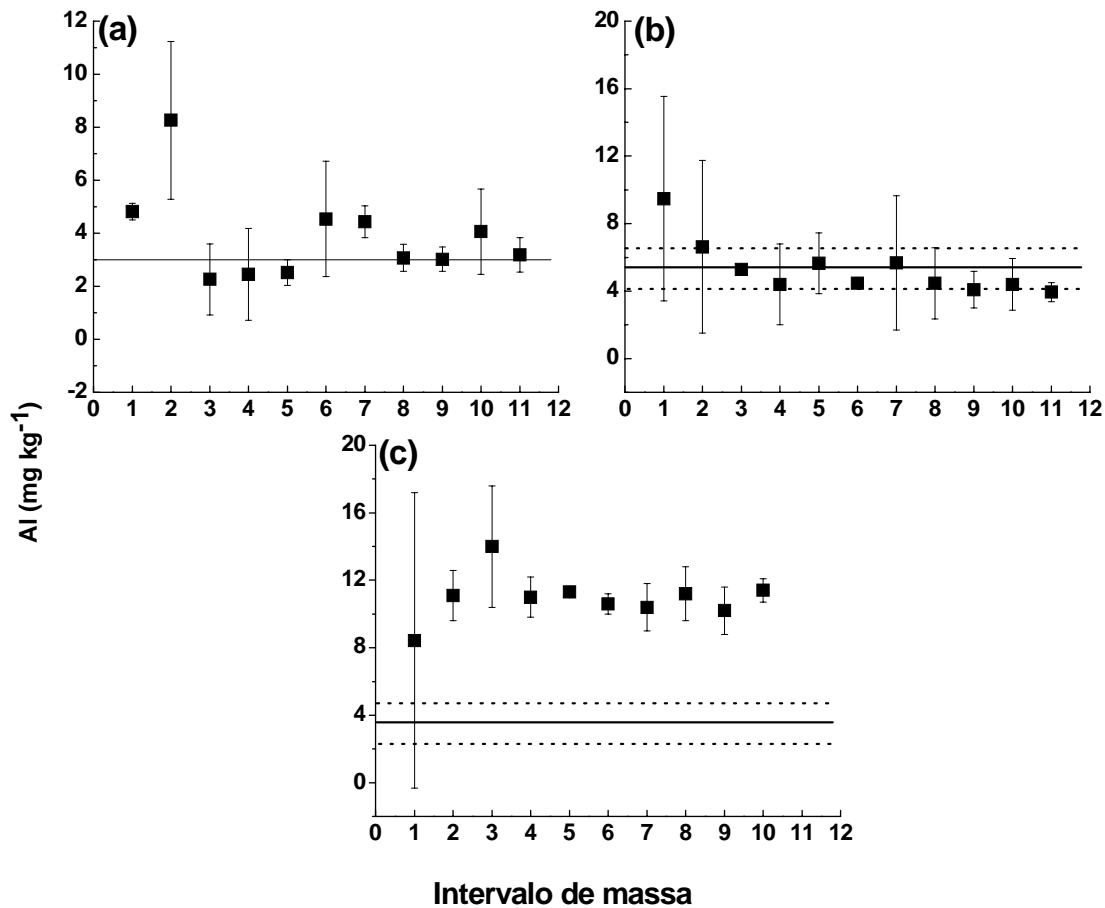


Figura 37 - Estudo de homogeneidade para Al em fígado bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bolas por 30 min; (c) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Estudos similares foram feitos para a determinação de Cu e Zn no músculo bovino certificado. Embora os cálculos de H_e tenham sido menores que 10, mesmo para massas muito pequenas, elevado desvio padrão foi observado para massas inferiores a 70 μg (Figuras 38 e 39). Apesar desse material também ter sido certificado para massas superiores a 250 mg, calculando-se a massa mínima representativa segundo a equação proposta por Pauwels, encontrou-se 200 e 690

μg de amostra para a determinação de Cu e Zn, respectivamente. Por outro lado, nas Figuras 38a e 39a, verifica-se que resultados próximos do valor de referência e com menor valor de RSD ($< 7\%$) são obtidos mesmo quando massas em torno de 60 e 70 μg são empregadas para determinação de Cu e Zn, respectivamente.

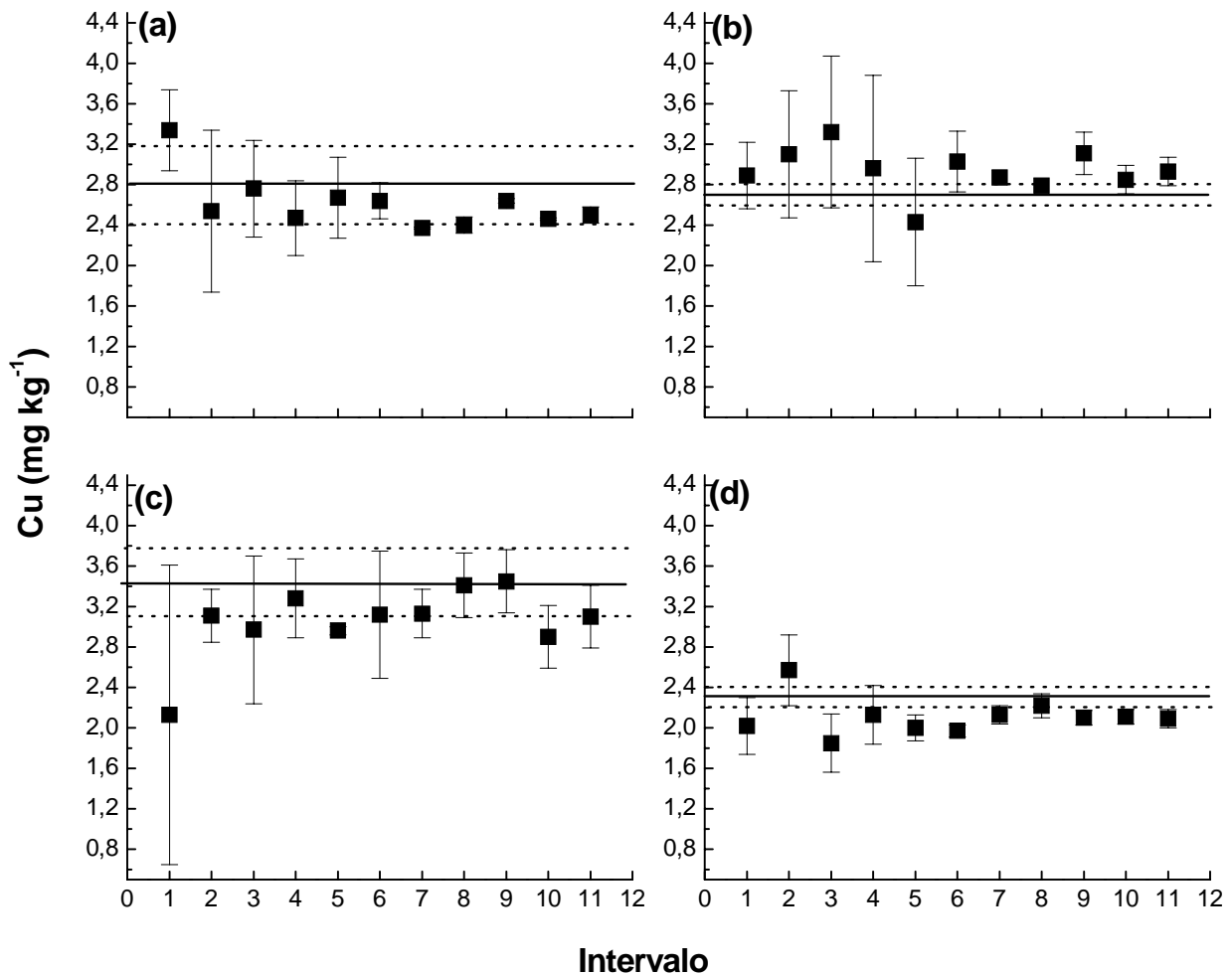


Figura 38 - Estudo de homogeneidade para Cu em músculo bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bolas por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bolas por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Os fatores de homogeneidade dos materiais preparados no laboratório também apresentaram valores inferiores a 10 ($H_e < 10$), indicando boa homogeneidade do material. Assim como no fígado, o tipo de preparo de amostra parece não ter afetado significativamente na homogeneidade do Cu presente no

músculo (Figura 38). Resultados mais próximos do valor adotado como referência foram obtidos para o fígado seco em microondas seguida pela estufa (Figura 38b) e para o fígado liofilizado (Figura 38c), ambos moídos em moinho de bola por 30 min.

No estudo desenvolvido para o Zn, os melhores resultados foram encontrados para o músculo liofilizado e moído em moinho de bolas (Figura 39c). As amostras secas em microondas seguida pela estufa apresentaram resultados diferentes daqueles analisados por FAAS após digestão ácida (Figura 39b e 39d).

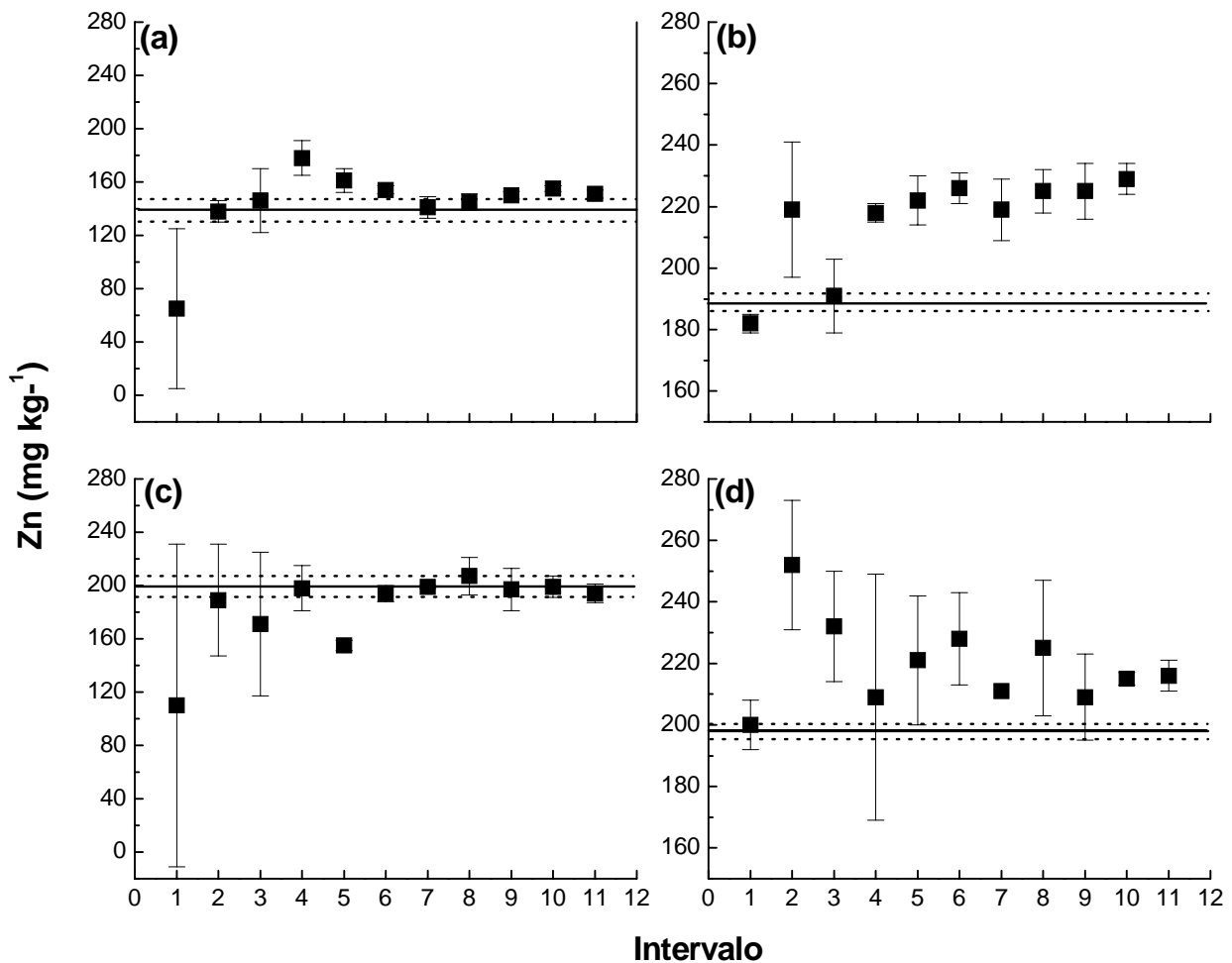


Figura 39 - Estudo de homogeneidade para Zn em músculo bovino: (a) certificado (NIST 1577b); (b) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bolas por 30 min; (c) liofilizado e moído em moinho de bolas por 30 min; e (d) seco em forno de microondas seguida pela estufa e moído moinho criogênico. Intervalos descritos na seção 3.4.5.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores das massas mínimas representativas dos materiais preparados no laboratório. Utilizando essas massas, os fatores de homogeneidade (H_e) foram calculados, seguindo a equação proposta por Kürfurst¹⁴.

Tabela 9 - Massa mínima representativa (m) e fator de homogeneidade (H_e) para a determinação de Al, Cd, Pb, Cu e Zn em fígado bovino e Cu e Zn em músculo bovino.

	amostra	m (mg)	H_e (%mg ^{1/2})		amostra	m (mg)	H_e (%mg ^{1/2})
<i>Fígado bovino</i>							
Al	A	0,080	15				
	B	0,100	8,5				
	C	-	-				
	D	0,040	2,5				
Cd	A	0,060	1,6	Pb	A	0,900	12
	B	0,040	1,0		B	0,200	1,4
	C	0,060	0,5		C	0,600	5,6
	D	0,080	0,8		D	0,600	1,6
Cu	A	0,050	0,6	Zn	A	0,040	0,9
	B	0,050	1,5		B	0,060	0,9
	C	0,090	0,3		C	0,080	0,2
	D	0,020	0,5		D	0,040	0,9
<i>Músculo Bovino</i>							
Cu	A	0,070	1,0	Zn	A	0,040	1,0
	B	0,070	2,8		B	0,060	2,8
	C	0,070	1,2		C	0,080	1,2
	D	0,070	0,2		D	0,040	1,5

A. Certificado

B. Seco em microondas seguida pela estufa e moído em moinho de bolas

C. Liofilizado e moído em moinho de bolas

D. Seco em microondas seguida pela estufa e moído em moinho criogênico

Resultados da Tabela 9 indicam que todos os materiais preparados no laboratório apresentam valor de H_e inferior a 10, indicando uma boa homogeneidade.

Apesar de o material produzido no laboratório apresentar H_e inferior a 10 para o Al, a sua aplicação em microanálises ainda é restrita devido ao seu elevado desvio padrão (Figura 37 b e 37c).

Para o fígado certificado, Al e Pb apresentaram valor de H_e superior a 10, indicando que a homogeneidade é insuficiente para massas inferiores a 0,080 (para o Al) e 0,900 (para o Pb). A não homogeneidade desses analitos no fígado certificado torna seu uso inapropriado para ser aplicado em análises por SS-ETAAS na qual a massa de amostra requerida é pequena.

4.1.6. Análise de fígado e músculo bovino por ETAAS e SS-ETAAS

Para comparação dos resultados, fígado e músculo bovino foram analisados por SS-ETAAS e por ETAAS após digestão das amostras.

Os resultados das determinações do As em fígado e músculo bovino não estão apresentados, pois a sua concentração nessas amostras se encontra abaixo do limite de detecção.

Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentados os resultados das determinações de Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Ni e Zn em fígado e Cu, Cr, Ni e Zn em músculo bovino por SS-ETAAS (n=5) e por ETAAS (Al, Cd, Cr, Ni, Pb) ou FAAS (Cu e Zn) após procedimento de digestão (n=3).

Os resultados de análise por SS-ETAAS e ETAAS concordam em 95% no nível de confiança, exceto para a determinação do Al em fígado seco em microondas seguida pela estufa e moído em moinho criogênico. As análises realizadas em SS-ETAAS apresentaram resultados maiores do que aquelas obtidas por ETAAS, possivelmente devido a problemas de contaminação.

Tabela 10 - Resultados das determinações de Al, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado bovino por SS-ETAAS e por ETAAS ou FAAS

Elemento	Secagem	Moinho	SS-ETAAS ^a	ETAAS, FAAS ^b
			(mg/kg)	(mg/kg)
Al	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	4,85 ± 0,95	4,88 ± 0,71
		<i>Criogênico</i>	9,56 ± 0,46	3,75 ± 0,82
Cd	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	0,074 ± 0,001	0,075 ± 0,002
		<i>Criogênico</i>	0,076 ± 0,006	0,070 ± 0,001
	Liofilizado	<i>Bola</i>	0,071 ± 0,002	0,070 ± 0,002
		<i>Criogênico</i>	0,064 ± 0,002	0,074 ± 0,002
Cr	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	0,725 ± 0,327	0,637 ± 0,119
		<i>Criogênico</i>	0,368 ± 0,054	0,220 ± 0,028
	Liofilizado	<i>Bola</i>	1,14 ± 0,30	0,868 ± 0,092
		<i>Criogênico</i>	0,097 ± 0,015	0,109 ± 0,002
Cu	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	221 ± 10	215 ± 6
		<i>Criogênico</i>	223 ± 12	222 ± 4
	Liofilizado	<i>Bola</i>	232 ± 5	229 ± 6
		<i>Criogênico</i>	235 ± 10	235 ± 3
Ni	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	0,103 ± 0,019	< L.D.
		<i>Criogênico</i>	0,035 ± 0,020	< L.D.
	Liofilizado	<i>Bola</i>	0,448 ± 0,127	0,391 ± 0,060
		<i>Criogênico</i>	0,043 ± 0,012	< L.D.
Pb	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	0,198 ± 0,010	0,194 ± 0,011
		<i>Criogênico</i>	0,220 ± 0,028	0,210 ± 0,005
	Liofilizado	<i>Bola</i>	0,240 ± 0,018	0,222 ± 0,001
		<i>Criogênico</i>	0,248 ± 0,006	0,218 ± 0,006
Zn	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	125 ± 5	113 ± 3
		<i>Criogênico</i>	128 ± 6	128 ± 4
	Liofilizado	<i>Bola</i>	128 ± 2	126 ± 5
		<i>Criogênico</i>	127 ± 6	124 ± 2

^an = 5; ^bn = 3; ETAAS = Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb; FAAS = Cu e Zn

Tabela 11 - Resultados das determinações de Cr, Cu, Ni e Zn em músculo bovino por SS-ETAAS e por ETAAS

Elemento	Secagem	Moinho	SS-ETAAS ^a	ETAAS ^b
			(mg/Kg)	(mg/Kg)
Cr	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	4,04 ± 1,57	3,49 ± 0,27
		<i>Criogênico</i>	0,750 ± 0,093	0,677 ± 0,048
	Liofilizado	<i>Bola</i>	4,44 ± 0,39	3,10 ± 0,26
		<i>Criogênico</i>	0,955 ± 0,031	0,414 ± 0,027
Cu	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	3,04 ± 0,14	2,74 ± 0,04
		<i>Criogênico</i>	2,06 ± 0,23	2,19 ± 0,17
	Liofilizado	<i>Bola</i>	3,14 ± 0,15	3,46 ± 0,33
		<i>Criogênico</i>	2,48 ± 0,10	2,35 ± 0,02
Ni	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	4,00 ± 1,47	2,66 ± 0,81
		<i>Criogênico</i>	0,061 ± 0,034	< L.D.
	Liofilizado	<i>Bola</i>	2,27 ± 0,37	1,91 ± 0,08
		<i>Criogênico</i>	0,083 ± 0,010	< L.D.
Zn	Microondas/Estufa	<i>Bola</i>	206 ± 18	199 ± 8
		<i>Criogênico</i>	225 ± 16	183 ± 9
	Liofilizado	<i>Bola</i>	190 ± 8	191 ± 8
		<i>Criogênico</i>	243 ± 10	197 ± 4

4.2. Determinação de As, Cd, Cr e Pb em cabelo

4.2.1. Otimização do programa de aquecimento

O estudo do comportamento térmico do As em solução aquosa (Figura 18a), indicou 1200 e 1500°C como as temperaturas de pirólise na ausência e na presença de Pd+Mg como modificador químico. Na presença do cabelo, a estabilidade do As aumentou mesmo quando nenhum modificador químico foi utilizado (Figura 40). Esse resultado indica que o As deve apresentar fortes ligações com a estrutura capilar. Essa elevada afinidade pode estar relacionada às ligações do As aos grupos SH dos aminoácidos⁶⁸.

Quando o modificador Pd+Mg foi adicionado, a estabilidade do As foi aumentada para 1600 °C, além de apresentar uma ligeira melhora no sinal analítico.

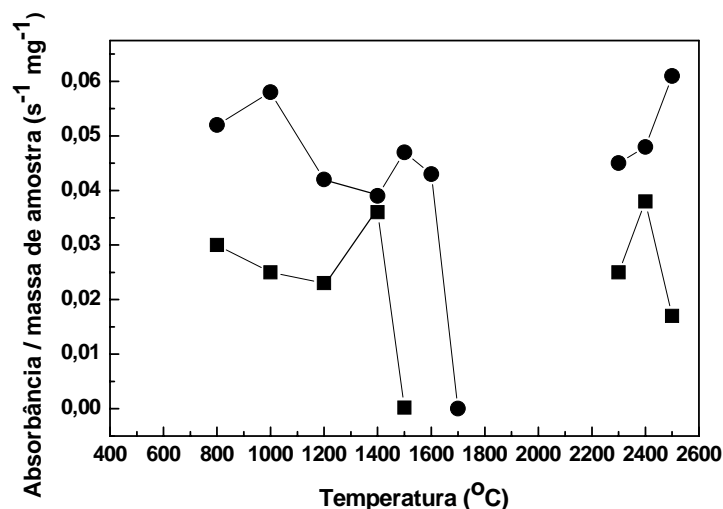


Figura 40 - Curva de temperatura de pirólise e atomização de As em cabelo na (■) ausência e na (●) presença de Pd+Mg+0,5% Triton X-100 como modificador químico.

As otimizações dos programas de aquecimento do Cd em solução aquosa e no cabelo estão apresentadas nas Figuras 7 e 41, respectivamente. Na ausência de modificador químico, a estabilidade do Cd na solução aquosa (400°C) é inferior àquela encontrada no cabelo (600°C), mostrando mais uma vez, a interação entre o analito e a estrutura capilar. Em solução aquosa, a temperatura de pirólise do Cd na presença de W + Rh ou Ir (800°C) foi ligeiramente maior do que na presença de modificadores químicos em solução (600°C). Entretanto, na presença da matriz de cabelo, os modificadores químicos permanentes não exerceram nenhuma influência na estabilização desse elemento. A temperatura de pirólise encontrada na presença de W+Rh ou Ir foi de 500°C, enquanto 700°C foi a temperatura obtida, quando Pd+Mg foi empregado.

Resultados muito semelhantes foram observados para o Pb. Apesar de os modificadores químicos permanentes terem apresentado uma boa atuação sobre o Pb em solução aquosa (Figura 16a), o mesmo não ocorreu em meio da amostra (Figura 42), mostrando, mais uma vez, que W+Rh e Ir não alteraram o comportamento térmico do analito no cabelo. Ao contrário, modificadores químicos em solução, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e Pd+Mg estabilizaram o Pb em solução aquosa até 800 e

1000°C, respectivamente. No cabelo, 800°C (Pd+Mg) e 900°C ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) foram as temperaturas de pirólise selecionadas.

Apesar do $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ter apresentado uma estabilidade ligeiramente superior, preferiu-se adotar o Pd+Mg, pois o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ gerava um sinal de fundo bastante elevado.

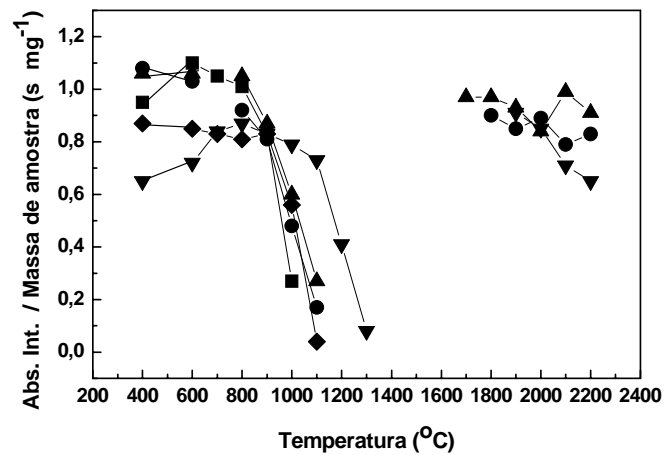


Figura 41 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cd em cabelo na (■) ausência e na presença de (●) Ir, (▲) W+Rh, (▼) Pd+Mg e (◆) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

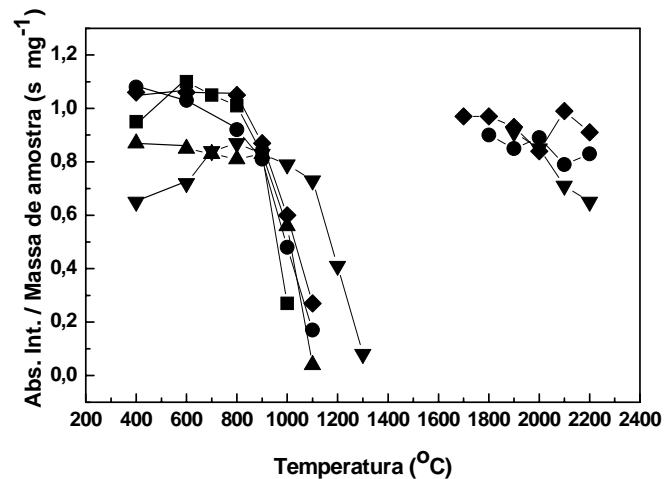


Figura 42 - Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Pb em cabelo na (■) ausência e na presença de (●) Ir, (▲) W+Rh, (▼) Pd+Mg e (◆) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Para o Cr, a melhor condição de trabalho em solução aquosa foi na ausência de modificador químico (Figura 13a). O mesmo comportamento térmico foi encontrado na presença do cabelo (Figura 43). A presença do Pd+Mg ou W não

exerceu influência sobre a estabilidade térmica do Cr. Em ambos os casos, o sinal de absorbância diminuiu.

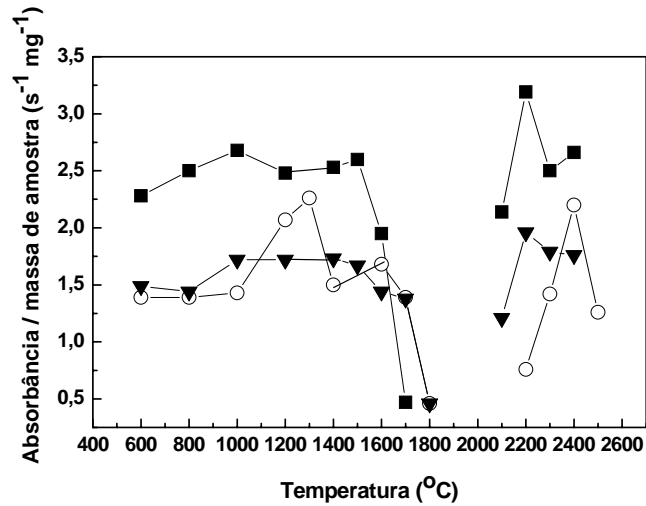


Figura 43 - Curva de temperatura de pirólise e atomização para o Cr em cabelo na (■) ausência e na presença de (▼) Pd + Mg e (○) W como modificadores químicos.

Após a obtenção das curvas de pirólise e atomização, fez-se a otimização do tempo dessas etapas, visando à calibração do equipamento com solução aquosa para análise de amostras sólidas. As melhores condições obtidas nesse estudo estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Temperaturas e tempos de pirólise e atomização utilizados para a determinação de As, Cd, Cr e Pb em cabelo.

	T _P (°C)	T _A (°C)	t _P (s)	t _A (s)	T _L (°C)	Mod. Quim.
As	1400	2400	20	5	2500	Pd+Mg*
Cd	600	1700	40	5	2200	Pd+Mg*
Cr	1400	2400	10	5	2500	-
Pb	800	2100	30	3	2200	Pd+Mg*

T_P = temperatura de pirólise; T_A = temperatura de atomização; t_P = tempo de pirólise; t_A = tempo de atomização; T_L = Temperatura de limpeza

*0,05% m/v Triton X-100

Para a determinação direta de As, Cd e Pb em cabelo, utilizando calibração aquosa, a mistura Pd+Mg como modificador químico foi indispensável. Porém, 0,05% m/v de Triton X-100 foi necessário para melhorar a molhabilidade da amostra, facilitando a interação entre amostra e modificador químico. Para a determinação do Cr, nenhum modificador químico foi necessário.

4.2.2. Calibração

As curvas analíticas de calibração para o As, Cd, Cr e Pb obtidas em meio aquoso e a partir de amostragem direta do sólido estão apresentadas nas Figuras 44 a 47.

Uma hipótese que pode explicar a boa atuação da mistura Pd+Mg+Triton X-100 na determinação direta de As, Cd e Pb em cabelo utilizando calibração construída com solução de referência, é o fato de a mesma ter atuado como um extrator desses elementos. Quando a mistura era adicionada sobre o cabelo finamente moído sobre a plataforma formava-se uma pequena suspensão nas quais os elementos eram extraídos. Esse fato foi comprovado pesando-se 8 mg do cabelo certificado e adicionando-se 500 μL de solução contendo 0,5 mg L^{-1} Pd + 0,3 mg L^{-1} Mg + 0,05% m/v Triton X-100. Após agitação somente o sobrenadante foi analisado. Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram que As, Cd e Pb foram quantitativamente extraídos.

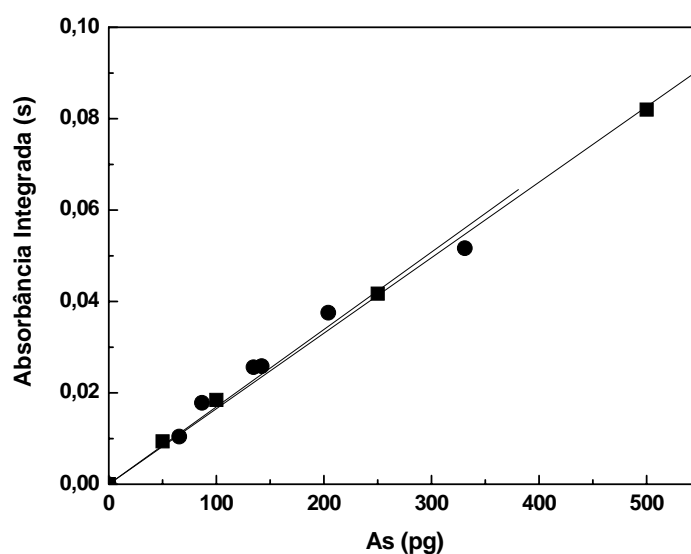


Figura 44 - Curvas analíticas de calibração para As: ■ solução de referência ($y = 1,65 \cdot 10^{-4} x$; $R^2=0,9997$) e ● cabelo certificado ($y = 1,69 \cdot 10^{-4} x$; $R^2 = 0,9895$)

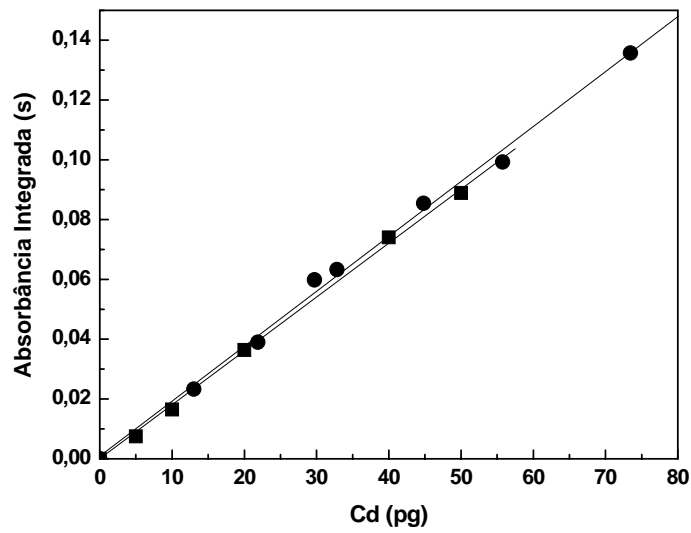


Figura 45 - Curvas analíticas de calibração para Cd: ■ solução de referência ($y = 0,00180 x$; $R^2 = 0,9994$) e ● cabelo certificado ($y = 0,00186 x$; $R^2 = 0,9980$)

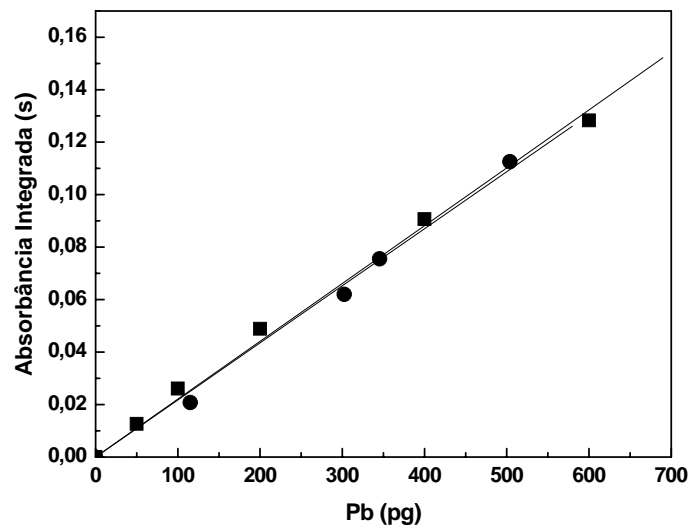


Figura 46 - Curvas analíticas de calibração para Pb: ■ solução de referência ($y = 0,000221 x$ e $R^2 = 0,9985$) e ● cabelo certificado ($y = 0,000217 x$ e $R^2 = 0,9982$)

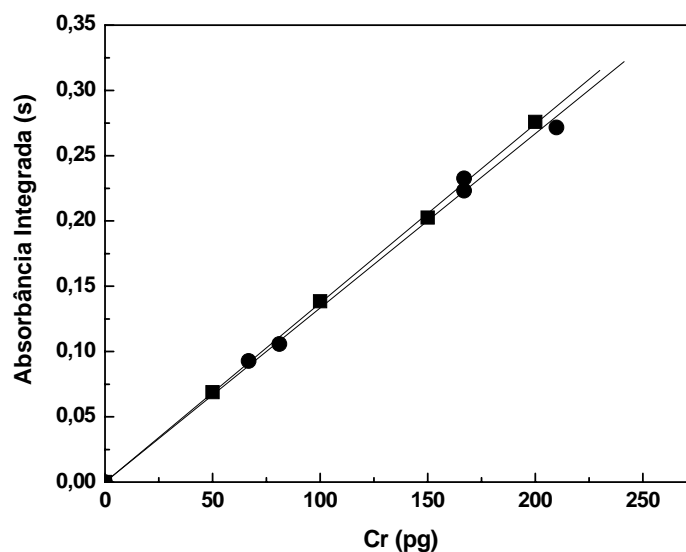


Figura 47 - Curvas analíticas de calibração para Cr: ■ solução de referência ($y = 0,00137 x$ e $R^2=0,9999$) e ● cabelo certificado ($y = 0,00133 x$ e $R^2 = 0,9984$)

Tabela 13 - Determinação de As, Cd e Pb em cabelo após extração com a mistura de modificador químico

Elemento	Material	Certificado (mg kg^{-1})	Encontrado (mg kg^{-1})
As	GBW09101	$0,59 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,07$
Cd	BCR 397	$0,521 \pm 0,024$	$0,55 \pm 0,02$
Pb	BCR 397	$33 \pm 1,2$	$30,2 \pm 1,7$

Para validar o procedimento proposto, os CRMS foram analisados. Os resultados estão apresentados na Tabela 14. Os resultados concordam em 95% no nível de confiança (*test-t student*), indicando que o método desenvolvido pode ser aplicado em análise direta de As, Cd, Cr e Pb em cabelo.

Os valores das massas características (m_0) e os limites de detecção (LD), obtidos para os procedimentos estabelecidos, estão apresentados na Tabela 15. As massas características foram calculadas baseadas em 0,0044 (1 %) de absorbância integrada. Os limites de detecção foram calculados de acordo com a equação $3\sigma/S$, na qual σ é o desvio para 10 medidas consecutivas da plataforma vazia e S , a inclinação da curva analítica de calibração.

Tabela 14 – Resultados da determinação de As, Cd, Cr e Pb em cabelo por SS-ETAAS

	GBW09101 (mg kg⁻¹)		BCR 397 (mg kg⁻¹)	
	<i>certificado</i>	<i>encontrado</i>	<i>certificado</i>	<i>encontrado</i>
As	0,59 ± 0,07	0,62 ± 0,07	-	-
Cd	0,095±0,012	-	0,521±0,024	0,54±0,03
Cr	4,77±0,38	4,70±0,51	-	-
Pb	7,2±0,7	7,4±0,6	33±1,2	-

Tabela 15 - Massas características (m_0) e limites de detecção (LD) para a determinação direta de As, Cd, Cr e Pb em cabelo por SS-ETAAS

	As	Cd	Cr	Pb
L.D. (pg)	16,9	1,1	3,3	38,9
m₀ (pg)	26,6	2,4	3,2	21,5

4.2.3. Determinação de Cd e Pb ao longo de fios de cabelo

Embora a concentração elementar no cabelo seja intensamente utilizada como um indicativo nutricional ou toxicológico, ainda existem muitas controvérsias sobre a sua validade. Existe ainda uma dificuldade muito grande em distinguir a contaminação endógena da exógena. Nesse contexto, a etapa da lavagem de cabelo pode ser considerada como uma das mais importantes e críticas.

O método do IAEA (International Atomic Energy Agency) é o mais tradicionalmente utilizado e envolve a lavagem seqüencial com acetona, água e acetona. No entanto, Chatt e colaboradores^{60,65} mostraram que esse método é provavelmente adequado para remover sujeiras e gorduras presentes no cabelo, enquanto elementos traços ligados exogenamente ao cabelo parecem não serem removidos.

Considerando todos os problemas e controvérsias relacionadas à lavagem de cabelo, Morton e colaboradores⁶⁵ estudaram diferentes procedimentos de lavagens para avaliar a sua eficiência na remoção de As, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb e Se ligados ao cabelo exogenamente. Para isso, o cabelo foi mergulhado em soluções contendo os analitos para simular a contaminação exógena, posteriormente lavados e em

seguida analisados por ICP MS. Os vários procedimentos de lavagens utilizados incluíam uso de diferentes solventes: água desionizada, 1% (v/v) SLS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (m/v) EDTA, isopropranol, 0,1% (v/v) HNO₃, 0,1 mol L⁻¹ HCl e shampoo comercial. Dentre os métodos avaliados, o uso de 0,1 mol L⁻¹ HCl mostrou ser a mais eficiente para remover Cr, Cd e Pb, possibilitando assim, a distinção entre a contaminação endógena e exógena. Por outro lado nenhum procedimento de lavagem foi capaz de remover As, Hg, Sb e Se adsorvidos no cabelo.

Considerando os resultados obtidos por Morton e colaboradores⁶⁵, dois procedimentos de lavagem de cabelo foram adotados: o método IAEA e a lavagem utilizando 0,1mol L⁻¹ de HCl. A adoção desses dois procedimentos de lavagem foi feita para permitir a distinção entre contaminação endógena e exógena ao longo dos fios de cabelo.

Na Figura 48 estão apresentados os resultados das determinações de Cd nos cabelos lavados pelos procedimentos da IAEA (Figura 48a) e com 0,1mol L⁻¹ HCl (Figura 48b). O perfil da concentração de Cd observado (Figura 48a) a partir da raiz até a ponta do cabelo é um indicativo de que esse indivíduo vem sendo exposto frequentemente a uma atmosfera contendo Cd. Quando o cabelo foi lavado com HCl, ou seja, quando o Cd ligado ao cabelo exogenamente foi removido, a concentração desse elemento diminuiu drasticamente, passando a apresentar um nível constante ao longo de todo o fio de cabelo.

O mesmo estudo foi efetuado para o Pb (Figura 49). É possível verificar um perfil gráfico semelhante ao observado para o Cd, porém menos ascendente (Figura 49a). Como a concentração normal desse elemento no cabelo pode variar de 0,004 a 95 mg kg⁻¹,⁵⁹ verifica-se que os resultados obtidos se encontram dentro da faixa de normalidade. No entanto, após os 9 primeiros centímetros, a concentração de Pb encontrada foi sistematicamente maior. Esses resultados podem estar associados a alguma fonte de contaminação endógena de Pb.

Os resultados obtidos nesse estudo ainda são preliminares e não foram aplicados a um grupo de diferentes amostras. No entanto, o método desenvolvido permitiu analisar pequenas frações do cabelo, mostrando ser uma possibilidade para verificar episódios do passado relevantes à saúde, mesmo que a ação já tenha cessado. Poucas são as técnicas que possibilitam analisar diminutas massas de amostras sem prévio procedimento de digestão. A SS-ETAAS, por sua vez, permitiu analisar diretamente pequenas frações de cabelo utilizando calibração construída com solução de referência.

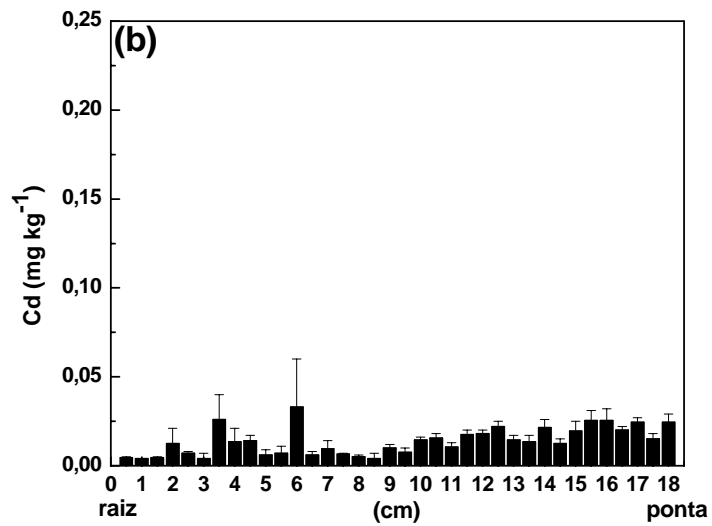
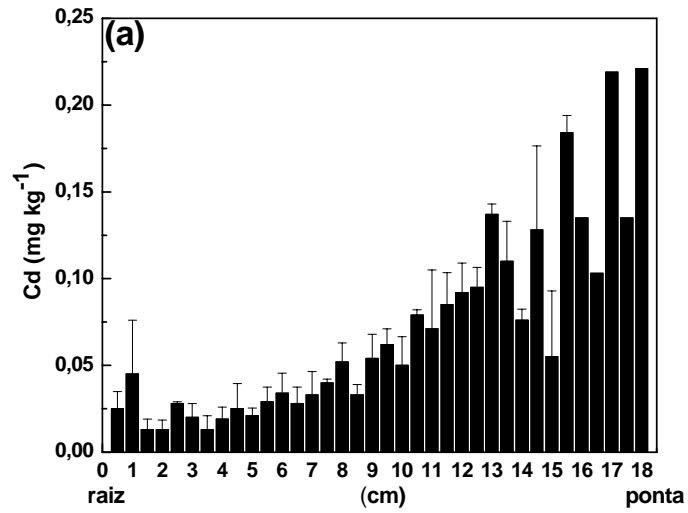


Figura 48 - Determinação de Cd ao longo de fios de cabelo: (a) lavagem com procedimento IAEA e (b) lavagem com procedimento IAEA + 0,1 mol L⁻¹ HCl

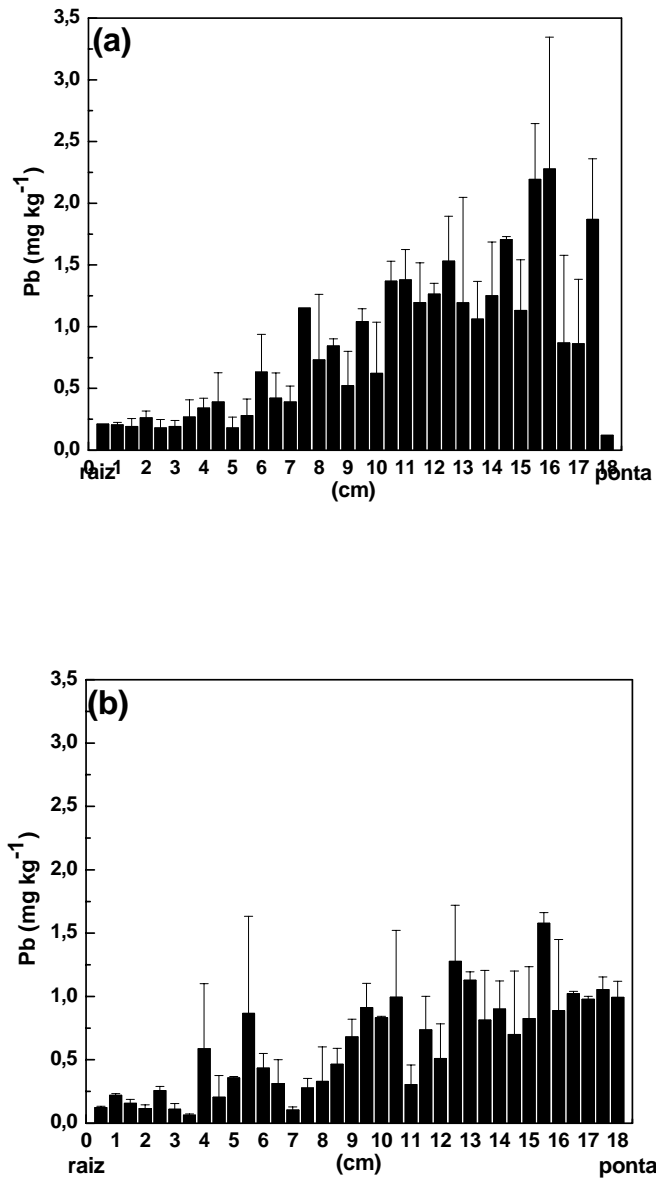


Figura 49 – Determinação de Pb ao longo de fios de cabelo: (a) lavagem com procedimento IAEA e (b) lavagem com procedimento IAEA + 0,1 mol L⁻¹ HCl

4.3. Produção de CRM

4.3.1. Determinação do tamanho de partícula de espinafre em processo de certificação

Como já discutido na seção 2.1.2., o tamanho de partícula e a sua distribuição é uma das características físicas mais importantes de um material candidato a material de referência, pois ele afeta fortemente a sua homogeneidade. Em geral, partículas de diâmetro médio em torno de 10 μm são requeridas para que se obtenha um material suficientemente homogêneo para ser aplicado em microanálise⁵. Dentre os diversos moinhos que podem ser utilizados, o de jato de ar tem se mostrado o mais adequado para obter materiais mais homogêneos e com menores tamanhos de partícula²⁷.

Conhecer a distribuição do tamanho das partículas e o diâmetro médio é uma das primeiras etapas dentro do processo de produção e certificação de um CRM. Nas Figuras 50 e 51 estão apresentadas as distribuições do tamanho de partículas de amostras de espinafre moídas em blenda e em moinhos de jato de ar. Enquanto as amostras moídas em blenda apresentam partículas em torno de 100 μm (Figura 50), aquelas moídas em moinhos de jato de ar apresentam partículas com tamanhos bem inferiores: 14 μm (Figura 51).

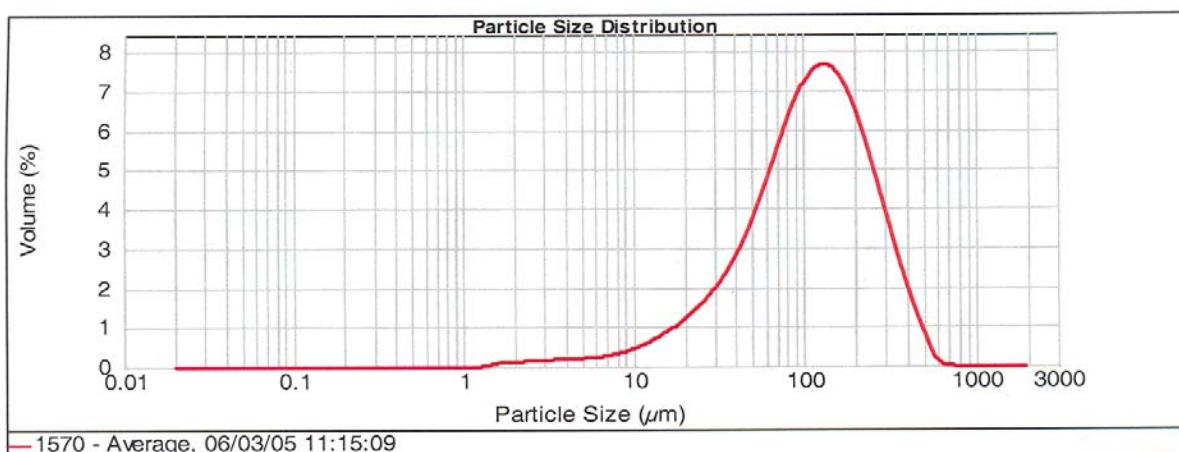


Figura 50 - Distribuição do tamanho de partícula para espinafre certificado (NIST 1570) moído em blenda

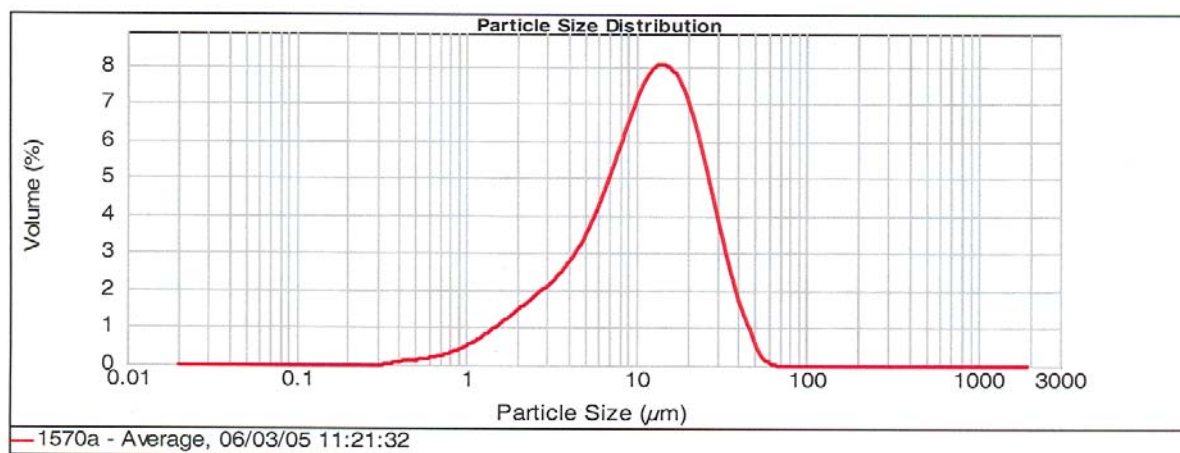


Figura 51 - Distribuição do tamanho de partícula para espinafre em processo de certificação (NIST 1570a) moído em moinho de jato de ar

Diferente dos outros moinhos, na moagem utilizando moinho de jato de ar, a redução do tamanho de partícula é proporcionada pelo choque entre as partículas da própria amostra e não entre a amostra e o moinho como ocorrem nos outros moinhos. Como o contato entre a amostra e o moinho é praticamente inexistente, problemas relacionados à contaminação são minimizados. Por esse motivo, ele tem se mostrado como um dos mais convenientes para ser utilizados na moagem de materiais candidatos a CRMs.

Para a produção do novo fígado bovino certificado, Bovine Liver SRM 1577c, o NIST utilizará o moinho de jato de ar. Como resultado, um material mais homogêneo com tamanho de partícula bem menor que o material disponível atualmente, o SRM 1577b moído em blenda (Figura 28, tamanho de partícula $\approx 86 \mu\text{m}$), deverá ser obtido. Além disso, o NIST pretende obter a certificação para o Cr, elemento não certificado nos materiais anteriores devido a problemas de contaminação.

4.3.2. Avaliação da homogeneidade do material particulado urbano

O novo material particulado urbano (SRM 1648a) em processo de certificação no NIST será produzido para ser aplicado em microanálise. Por meio das determinações do tamanho de partícula, verifica-se na Figura 52, que o diâmetro médio da partícula dessa amostra é de aproximadamente $12 \mu\text{m}$, um tamanho muito próximo ao ideal ($10 \mu\text{m}$)⁵.

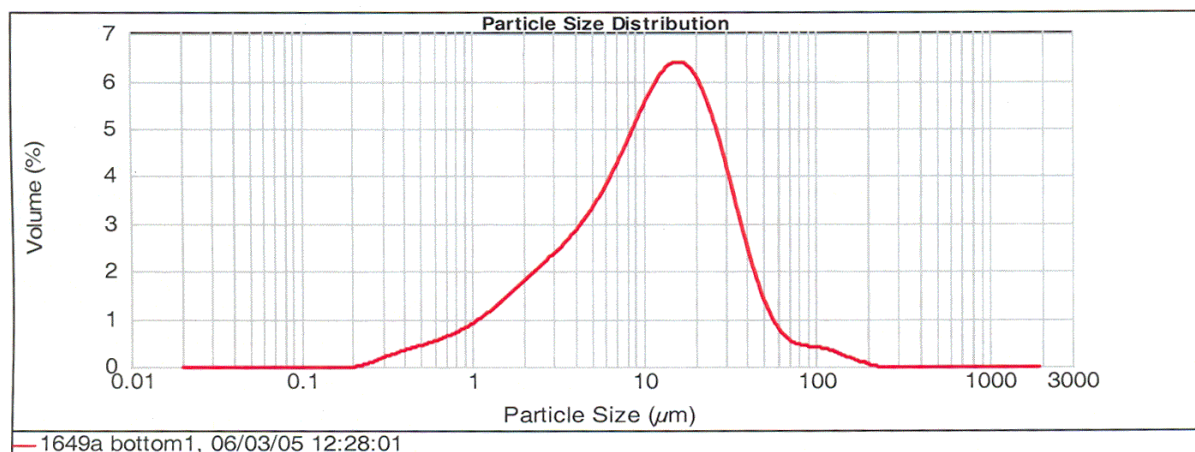


Figura 52 - Distribuição do tamanho de partícula para material particulado urbano em processo de certificação no NIST (SRM 1648a).

A avaliação da micro-homogeneidade de alguns analitos foi realizada por NAA no NIST e a micro-homogeneidade de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn, por SS-ETAAS no Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (LEEAA/IQ-USP). Na Tabela 16 estão apresentados os principais parâmetros avaliados no estudo da homogeneidade do material particulado urbano por SS-ETAAS: massa de amostra (m), incerteza experimental ($u_{\text{experimental}}$), incerteza instrumental ($u_{\text{instrumental}}$), outras incertezas (u_{outros}), incerteza devido a heterogeneidade (u_{H}) e o fator de homogeneidade de Kurfürst calculado (H_e).

Tabela 16 - Fator de homogeneidade de Kurfürst em material particulado determinado por SS-ETAAS com seus respectivos valores de incertezas (%).

Elemento	Massa (mg)	$u_{\text{experimental}}$	$u_{\text{instrumental}}$	u_{outros}	u_{H}	H_e
As	0,036	11,2	2,70	0,7	10,8	2,06
Cd	0,037	11,9	2,04	0,7	11,7	2,25
Cu	0,020	19,9	2,55	0,7	19,7	2,75
Ni	0,022	14,0	3,98	0,7	13,4	1,99
Pb	0,026	11,4	3,90	0,7	10,7	1,72
Zn	0,028	14,6	2,38	0,7	14,4	2,41

Considerando a definição de Kurfürst na qual materiais com fator de homogeneidade inferior a 10 são considerados homogêneos, observa-se que o

presente material apresenta homogeneidade adequada para ser empregado em microanálises ($m < 10$ mg) e sub-microanálises ($m < 1$ mg).

Posteriormente à avaliação da homogeneidade, esse material foi distribuído para diferentes laboratórios com o intuito de iniciar o processo de certificação. As análises efetuadas no LEEAA foram feitas em 5 sub-amostras do lote desse material. Os programas de aquecimento otimizado para a determinação direta de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn estão apresentados na Tabela 17. Para a determinação de As e Cd, a presença de modificador químico Pd+Mg foi imperativa para tornar possível a análise utilizando calibração com soluções de referência. Elementos como o Cu, Pb e Zn foram determinados com calibração obtida com sedimento marinho certificado para microanálise (SRM 2703).

Tabela 17 - Programa de aquecimento e condições analíticas para a determinação de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em material particulado urbano (SRM 1648a) por SS-ETAAS

	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)	Vazão Ar (L min ⁻¹)
Secagem	130	10	15	1
Pirólise	T _P	100	20	1
Atomização	T _A	2600	t _A	0
Limpeza	T _L	1200	3	1

Condições analíticas						
	T _P (°C)	T _A (°C)	t _A (°C)	T _L (s)	Mod. Quim	Calibração
As	1200	2500	5	2600	20µg Pd	solução
Cd	600	1700	4	2200	5µg Pd + 3µg Mg	solução
Cu	1000	2400	6	2500	-	SRM 2703
Ni	1200	2600	6	2600	-	solução
Pb	600	2400	3	2500	-	SRM 2703
Zn	700	2400	4	2300	-	SRM 2703

Na Tabela 18 estão apresentados os resultados das determinações de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn por SS-ETAAS. Os resultados obtidos concordam em 95% no nível de confiança com o valor de referência mesmo utilizando massas inferiores a 0,100 mg. Esse fato é um indicativo de que esse material poderá ser empregado em microanálises.

Tabela 18 - Resultados das determinações de As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em material particulado urbano (SRM 1648a) por SS-ETAAS

	Concentração (mg kg ⁻¹)				Concentração (%)	
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
m (mg)	0,022 ± 0,007	0,083 ± 0,028	0,026 ± 0,009	0,025 ± 0,012	0,024 ± 0,008	0,036 ± 0,019
Valor de Referência	115 ± 10	75 ± 7	609 ± 27	82 ± 3	0,655 ± 0,008	0,476 ± 0,014
#2297^a	113 ± 15	72 ± 8	511 ± 99	85 ± 23	0,603 ± 0,076	0,482 ± 0,065
#5^b	109 ± 10	68 ± 3	560 ± 87	72 ± 8	0,585 ± 0,076	0,452 ± 0,013
#277^b	115 ± 12	70 ± 9	551 ± 70	83 ± 13	0,564 ± 0,066	0,492 ± 0,028
#3147^b	106 ± 7	66 ± 5	542 ± 82	74 ± 12	0,618 ± 0,057	
#4002^b	111 ± 4	67 ± 5	506 ± 20	56 ± 6	0,583 ± 0,065	

^an =20; ^bn =5, #sub-amostra

5. CONCLUSÕES

A maioria dos métodos propostos para a determinação direta de Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn em fígado e músculo bovino por SS-ETAAS utilizou calibração com solução de referência. Para a determinação de As, Cd e Zn, modificadores químicos foram indispensáveis. Da mesma maneira, para o Ni, foi necessária a adição de um oxidante. A pirólise foi a etapa mais crítica do programa de aquecimento. No caso do fígado e do músculo bovino, temperatura mínima de 600 °C foi necessária para a efetiva eliminação da matriz.

Por possibilitar análises de diminutas massas de amostras, a SS-ETAAS se mostrou bastante conveniente para avaliar a microhomogeneidade de materiais. Em situações que envolvem microanálises, parâmetros como a homogeneidade, o tamanho de partícula e a massa de amostra se tornam ainda mais críticos e apresentam implicações imediatas na precisão e na exatidão dos resultados analíticos.

Todos os procedimentos empregados para a secagem e a moagem do fígado e do músculo bovino apresentaram bons resultados. De um modo geral, a submissão das amostras à baixa temperatura (-196 °C), seja na liofilização ou na criogenia, facilitou a moagem. Ao serem moídas, as amostras liofilizadas resultaram em tamanhos de partículas ligeiramente menores do que aquelas secas por microondas seguida pela estufa. No entanto, amostras liofilizadas eram mais difíceis de serem manipuladas devido à atração eletrostática.

Entre os dois moinhos utilizados, o moinho criogênico foi mais eficiente do que o moinho de bolas, pois forneceu amostras com partículas menores em um menor período de tempo. No entanto, a quantidade de amostra possível de ser moída torna esse moinho inadequado para ser aplicado em preparo de materiais de referência. Em geral, para a preparação de materiais de referência recomenda-se moagem de massas maiores que 10 kg.

Todos os materiais preparados no laboratório apresentaram homogeneidade e massa mínima representativa melhores dos que os respectivos CRMs. Os valores do H_e desses materiais são indicativos de que os mesmos podem ser aplicados em microanálise ou submicroanálise. Considerando a determinação dos sete elementos em questão, o fígado seco em microondas seguida pela estufa e moído em moinho criogênico foi o que apresentou os melhores resultados de homogeneidade. Os resultados obtidos nas amostras preparadas no laboratório indicaram a

possibilidade de produzir fígado bovino com boa homogeneidade para o Cd, Pb, Cu e Zn.

Assim como na análise dos tecidos biológicos, o programa de aquecimento otimizado possibilitou a determinação direta de As, Cd, Cr e Pb em cabelo por SS-ETAAS. Para todos os elementos foi possível a determinação com solução de referência. Nesse caso, a utilização de modificador químico de Pd+Mg em meio de 0,05% Triton X-100 foi imperativa na determinação de As, Cd e Pb.

Por ser uma técnica que possui elevada sensibilidade e que permite analisar diminutas massas de amostras com mínima manipulação, a SS-ETAAS se mostrou bastante atrativa e promissora para ser aplicada em análise de cabelo para fins forense. No procedimento proposto, pequenas frações do cabelo foram analisadas, de modo que foi possível avaliar as distribuições de Cd e Pb ao longo de fios de cabelo. Dessa maneira, pode-se obter informações a respeito dos episódios do passado relevantes à saúde, mesmo que a ação já tenha cessado. Dentre todas as etapas, o processo de lavagem de cabelo foi o mais crítico e determinante para distinguir possível contaminação exógena ou endógena.

Os métodos desenvolvidos para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Pb e Zn em material particulado urbano por SS-ETAAS permitiram avaliar a microhomogeneidade desse candidato a CRM para microanálise (SRM 1648a). Os resultados obtidos fazem parte da análise interlaboratorial do processo de certificação desse material, promovido pelo NIST.

Apesar de a maioria dos CRMs, comercialmente disponíveis, garantir precisão e exatidão somente para massas superiores a 100 ou 500 mg de amostra, o presente estudo mostrou que controlando-se alguns parâmetros importantes como a secagem, a moagem e o tamanho de partículas, é possível preparar materiais que possibilitem análises de massas inferiores a 1 mg.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apostila do curso de "Preparação de amostras visando técnicas espectroscópicas", Associação Brasileira de Química, 04 - 06 de setembro de 2001, Instituto de Química - Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
2. Sulcek, Z.; Povondra, P.; *Methods of decomposition in inorganic analysis*, 1^a ed., CRC Press, Boca Raton
3. Jackson, K. W., *Electrothermal atomization for analytical atomic spectrometry*, John Willey & Sons, New York, 1999.
4. Kurfüst, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, 1998.
5. Zeisler, R.; Reference material for small-sample analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 376-379.
6. May, W. E.; Watters, R. L.; Standard Reference Material 2703 - Sediment for solid sampling (small sample) analytical techniques, *Certificate of Analysis*, National Institute of Standard and Technology, 2004
7. Stoepler, M.; Wolf, W. R.; Jenks, P. J. (eds.), *Reference Materials for Chemical Analysis – Certification, Availability, and Proper Usage*, 1^a ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2001
8. Grant, R.; Grant C.; *Grant and Hackh's Chemical Dictionary*, 5^a ed., McGraw-Hill, Texas, 1987
9. Pauwels, J.; Hofmann, C.; Vandecasteele, C.; On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's, *Fresenius. J. Anal. Chem.* **348** (1994) 418-421
10. Rossbach, M.; Ostapczuck, P.; Emons, H.; Microhomogeneity of candidate reference materials: Comparison of solid sampling Zeeman-AAS with INAA, *Fresenius J. Anal. Chem* **360** (1998) 380-383
11. Kurfürst, U.; Potential relevance of imprecise data from solid sample analysis with graphite furnace AAS, *Fresenius J. Anal. Chem* **346** (1993) 556-559

12. ISO Guia 35, Certification of Reference Materials General and Statistical Principles, ISSO, Geneva (1989)
13. Ingamells, C.O.; Switzer, P.; Proposed sampling constant for use in geochemical analysis, *Talanta* **20** (1973) 547-568
14. Kurfürst, U.; Pauwels, J.; Grobecker, K.H.; Stoepler, M.; Muntau, H.; Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials – determination and statistical evaluation, *Fresenius J. Anal. Chem.* **345** (1993) 112-120
15. Pauwels, J.; Hofmann, C.; Grobecker, K. H.; Homogeneity determination of Cd in plastic CRMs using solid sampling atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **345** (1993) 475-477.
16. Langmyhr, F. J.; The solid sampling technique of atomic absorption spectrometry – What can the method do?, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **322** (1985) 654-656.
17. Belarra, M. A.; Crespo, C.; Martínez-Garbayo, M. P.; Castillo, J. R.; Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results?, *Spectrochim. Acta Part B* **52** (1997) 1855-1860.
18. Nakamura T.; Oka, H.; Morikawa, H.; Sato, J.; Determination of lithium, beryllium, cobalt, nickel, copper, rubidium, cesium, lead and bismuth in silicate rocks by direct atomization atomic absorption spectrometry, *Analyst* **117** (1992) 131-135.
19. Hinds, M. W.; Kogan, V. V.; Determination of silicon in fine gold by solution and solid sample graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively plasma atomic emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **9/3** (1994) 451-455.
20. Fuller, C. W.; Hutton, R. C.; Preston, B.; Comparison of flame, electrothermal and inductively coupled plasma atomization techniques for the direct analysis of slurries, *Analyst* **106** (1981) 913-920.
21. Lima E. C.; Krug, F. J.; Ferreira, A. T.; Barbosa Junior, F.; Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in fish slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 269-274.

22. Januzzi, G. S. B.; Krug, F. J.; Arruda, M. A. Z.; Application of the slurries technique to the determination of selenium in fish samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 375-378.
23. Koglin, D.; Backhaus, F.; Schladot, J. D.; Particle size distribution in ground biological samples, *Chemosphere* **34** (1997) 2041-2047.
24. Iyengar, G. V.; Kasperek, K.; Application of the brittle fracture technique (BFT) to homogenize biological samples and some observations regarding the distribution behavior of the trace elements at different concentration levels in a biological matrix, *J. Radioanal. Chem.* **39** (1977) 301-316.
25. De Boer, J. L. M.; Maessen, F. J. M.; Optimum experimental conditions of the brittle fracture technique for homogenization of biological materials, *Anal. Chim. Acta* **117** (1980) 371-375.
26. Mierzwa, J.; Sun, Y. C.; Chung, Y. T.; Yang, M. H.; Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurries sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Talanta* **47** (1998) 1263-1270.
27. A. Fajgelj, R. Zeisler, Particle size determination of some IAEA and NIST environmental and biological reference materials, *Fresenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 442-379.
28. Bendicho, C.; De Loos-Vollebregt, M. T. C.; The influence of pyrolysis and matrix modifiers for analysis of glass materials by GFAAS using slurry sample introduction, *Spectrochim. Acta Part B* **45** (1990) 679-693.
29. Takada, K.; Hirokawa, K.; Atomization and determination of traces of copper, manganese, silver and lead in microamounts of steel. Atomic-absorption spectrometry using direct atomization of solid sample in a graphite-cup cuvette, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **312** (1982) 109-113.
30. Cal-Prieto, M. J.; Felipe-Sotelo, M.; Carlosena, A.; Andrade, J. M.; López-Mahía, P.; Muniategui, S.; Prada, D.; Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000, *Talanta* **56** (2002) 1-51.

31. Alves, F. L.; Jardim, W. F.; Cadore, S.; Arruda, M. A. Z.; Emprego da amostragem de suspensão na determinação de Cu e Zn em lapa antártica e Ni em sedimento de rio por espectrometria de absorção atômica com chama, *Quim. Nova*, **24/6** (2001) 756 – 760.
32. Boumans, P. W. J. M. (ed), *Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry Part 2 – Applications and fundamentals*, 1a ed., John Willey & Sons, New York, 1987
33. Montasser, A.; Golightly, D. W.; *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry – Second Edition*, VCH Publishers, New York, 1992.
34. Russo, R. E.; Mao, X.; Liu, H.; Gonzalez, J.; Mao, S. S.; Laser ablation in analytical chemistry – a review, *Talanta* **57** (2002) 425-451.
35. Belarra, M. A.; Resano, M.; Vanhaeche, F.; Moens, L.; Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?, *Trends in Anal. Chem.* **21** (2002) 828 - 839.
36. Silva, C. S.; Blanco, T.; Nóbrega, J. A.; Analysis of cement slurries by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing, *Spectrochim. Acta Part B* **57** (2002) 29-33.
37. Flores, E. M. M.; Paniz, J. N. G.; Martins, A. F.; Dressler, V. L.; Müller, E. I.; Costa A. B.; Cadmium determination in biological samples by direct solid sampling flame atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* **57** (2002) 2187-2193.
38. Flores, E. M. D.; Costa, A. B.; Barin, J. S.; Paniz, J. N. G.; Martins, A. F.; Direct flame solid sampling for atomic absorption spectrometry: determination of copper in bovine liver, *Spectrochim. Acta Part B* **56/10** (2001) 1875-1882.
39. Flores, E. M. M.; Paniz, J. N. G.; Saidelles, A. F.; Barin, J. S.; Dressler, V. L.; Müller, E. I.; Costa, A. B.; Direct solid sampling by flame atomic absorption spectrometry: Determination of manganese in coal samples, *J. Braz. Chem. Soc.* **15/2** (2004) 199-204.
40. L' Vov, B. V.; Twenty-five years of furnace atomic absorption spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* **39/2-3** (1984) 149-157.

41. L' Vov, B. V.; Trace characterization of powder by atomic-absorption spectrometry, *Talanta*, **23** (1976) 109-118.
42. L' Vov, B.V; The investigation of atomic absorption spectra by complete vaporization of the sample in a graphite cuvette, *Spectrochim. Acta Part B*, **39/2-3** (1984) 159.
43. Massmann, H.; Vergleich von atomabsorption und atomfluoreszenz in der graphitküvette, *Spectrochim. Acta Part B*, **23/4**, (1968) 215-226.
44. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry – Third, Completely Revised Edition*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.
45. Friese, K. C.; Krivan, V.; A solid-sampling system for a transversely heated graphite furnace and its application to trace element analysis of high-purity tantalum powders by atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* **53/6-8** (1998) 1069-1078.
46. Schäffer, U.; Krivan, V.; Analysis of high purity graphite and silicon carbide by direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **371** (2001) 859-866.
47. Hornung, M.; Krivan, V.; Solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for analysis of high-purity tungsten trioxide and high-purity tungsten blue oxide, *Spectrochim. Acta Part B* **54** (1999) 1177-1191.
- 48: Krivan, V.; Janickova, P.; A direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometric method for determination of trace elements in zirconium dioxide, *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 1949-1957
49. Huang, M. D.; Krivan, V.; Direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for the analysis of high-purity niobium pentaoxide, *Fresenius J. Anal. Chem.* **368** (2000) 227-234.
50. Lucic, M.; Krivan, V.; Solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for analysis of aluminium oxide powers, *J. Anal. At. Spectros.* **13** (1998) 1133-1139.

51. Dong, H. M.; Krivan, V.; Direct solid-sampling electrothermal atomic absorption spectrometry methods for the determination of silicon in oxide of niobium, titanium and zirconium, *Spectrochim. Acta Part B* **56** (2001) 1645-1656.
52. Herber, R. F. M.; Roelofsen, A. M.; Roelfzema, W. H., Peere-Stegeman, J. H. J. C.; Direct determination of cadmium in placenta. Comparisson with a destruction atomic absorption spectrometry methods, *Fresenius Z. Anal. Chem* **322** (1985) 743–746.
53. Nordahl, K.; Radziuk, B.; Thomassen, Y.; Weberg, R.; Determination of aluminium in human biopsy and necropsy specimens by direct solid sampling cup-in-tube electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **337** (1990) 310-315.
54. Lichtenberg, W.; Determination of gunshot residues (GSR) in biological samples by means of Zeeman atomic absorption spectrometry, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **328** (1987) 367-369.
55. Lücker, E.; Direct solid sampling ETAAS determination of lead in muscle tissue contaminated by gun-shot residues, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1731-1735
56. Hahn, E.; Hahn, K.; Mohl, C.; Stoepler, M.; Zeeman SS-GFAAS – An ideal methods for the evaluation of lead and cadmium profiles in bird's feathers, *Fresenius J. Anal. Chem.* **337** (1990) 306-309.
57. Casper, J. L.; *Praktishes Handbuch der Gerichtlin Medizin* (2 vols). A. Hirschwald, Berlin, 1857-1858, *apud*, Sachs, H.; History of hair analysis, *Forensic Sc. Int.* **84** (1997) 7-16.
58. Baumgartner, A. M.; Jones, P. F.; Baumgartner, W. A.; Black, C. T.; Radioimmunoassay of hair for determining opiate abuse histories, *J. Nucl. Med.* **20** (1979) 748-752, *apud*, Sachs, H.; History of hair analysis, *Forensic Sc. Int.* **84** (1997) 7-16.
59. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Curtius, A. J.; Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações, *Quim. Nova* **22/6** (1999) 838-846
60. Chatt, A; Katz, S. A.; *Hair Analysis*, VCH, New York, 1988, *apud*, Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Curtius, A. J.; Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos

para a determinação de elementos traço e aplicações, *Quim. Nova* **22/6** (1999) 838-846

61. Arnold, W.; Sachs, H.; Hair analysis for medicaments – the best proof for a drug career, *Fresenius J. Anal. Chem.* **348/8-9** (1994) 484-489, *apud*, Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Curtius, A. J.; Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações, *Quim. Nova* **22/6** (1999) 838-846

62. Williams, G.; Hall, L.; Addae, J.; Evaluation of scalp and pubic hair as bioindicators for estimating exposure to lead, *Env. Geochem. Health* **20** (1998) 179-184

63. Miekeley, N.; Carneiro, M. T. W. D.; Silveira, C. L. P.; How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *Sc. Tot. Env.* **218** (1998) 9-17

64. Sachs, H.; History of hair analysis, *Forensic Sc. Int.* **84** (1997) 7-16.

65. Morton, J.; Carolan, V. A.; Gardiner, P. H. E.; Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **455** (2002) 23-34

66. Pereira, R.; Ribeiro, R.; Gonçalves, F.; Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal), *Sc. Tot. Env.* **327** (2004) 81-92

67. Carneiro, M. T. W. D.; Silveira, C. L. P.; Miekeley, N.; Fortes, L. M. C.; Intervalos de referência para elementos menores e traços em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro – Brasil, *Química Nova* **25/1** (2002) 37-45

68. Senofonte, O.; Violante, N.; D’Illo, S.; Caimi, S.; Peri, A.; Caroli, S.; Hair analysis and the early detection of imbalances in trace elements for members of expeditions in Antarctica, *Microchem. J.* **69** (2001) 231-238

69. Morrissette, J.; Takser, L.; St-Amour, G.; Smargiassi, A.; Lafond, J.; Megler, D.; Temporal variation of blood and hair mercury levels in pregnancy in relation to fish consumption history in a population living along the St. Lawrence River, *Env. Research* **95** (2004) 363-374

70. Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, A. M.; Application of multivariate methods to scalp hair metal data to distinguish between drug-free subjects and drug abusers, *Anal. Chim. Acta* **455** (2002) 253-265
71. Daniel III, C. R.; Piraccini, B. M.; Tosti, A.; Jackson, M. D.; The nail and hair in forensic science, *J. Am. Acad. Dermatol.* **50/2** (2004) 258-261
72. Zschunke, A.; *Reference materials in analytical chemistry - A guide for selection and use*, Springer.
73. Venelinov, T.; Quevauviller, P.; Are certified reference materials really expensive?, *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 15-18.
74. Pauwels, J.; Kramer, G. N.; De Angelis, L.; Grobecker, K. H.; The preparation of codfish candidate reference material to be certified for Pb, Cd, Hg, Fe and Zn, *Fresenius J. Anal. Chem.* **338** (1990) 515-519.
75. Zschunke, A.; The role of reference materials in analytical chemistry, *Acc. Qual. Assur.* **8** (2003) 247-251.
76. Lücker, E.; Rosopulo, A.; Kreuzer, W.; Analytical quality control by solid sampling GFAAS in the production of animal tissue reference materials: lead and cadmium in bovine liver reference materials, *Fresenius J. Anal. Chem.* **340** (1991) 234-241.
77. Pauwels, J.; De Angelis, L.; Grobecker, K. H.; Solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry in production and use of certified reference materials, *Pure Apply Chem.* **63/9** (1991) 1199-1204.
78. Pauwels, J.; Hofmann, C.; Vandecasteele, C.; On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's, *Fresenius J. Anal. Chem.* **348** (1994) 418-421.
79. Mohl, C.; Grobecker, K. H.; Stoepler, M.; Homogeneity studies in reference materials with Zeeman solid sampling GFAAS, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **328** (1987) 413-418.

80. Pauwels, J.; Kurfürst, U.; Grobecker, K. H.; Quevauviller, P.; Microhomogeneity study of BCR candidate reference material CRM-422 – cod muscle, *Fresenius J. Anal. Chem* **345** (1993) 478-481.
81. Bagschik, U.; Quack, D.; Stoepler, M.; Homogeneity studies in a variety of reference materials using solid sampling Zeeman graphite furnace AAS, *Fresenius J. Anal. Chem.* **338** (1990) 386-389.
82. Santos Jr, D.; Moagem criogênica para o preparo de suspensões de alimentos visando à determinação de Cd, Cr e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, *Dissertação de mestrado*, Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, 2001, São Carlos, SP.
83. Vassileva, E.; Baeten, H.; Hoenig, M.; Advantages of the iridium permanent modifier in fast programs applied to trace-element analysis of plant samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **369** (2001) 491-495.
84. Lima, E. C.; Krug, F. J.; Jackson, K. W.; Evaluation of tungsten-rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead, and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* **53/13** (1998) 1791-1804.
85. Lima, E. C.; Barbosa Jr, F.; Krug, F. J.; Tavares, A ; Copper determination in biological material by ETAAS using W – Rh permanent modifier, *Talanta* **57** (2002) 177 – 186.
86. Lima, E. C.; Barbosa, F.; Krug, F. J.; The use of tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in decomposed samples of biological materials and sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **409/1-2** (2000) 267-274.
87. Meeravali, N. N.; Kumar, S. J.; Zirconium-iridium coating as a permanent modifier for determination of tin in stream sediment, oyster tissue and total diet slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 704-709.

88. Vale, M. G. R.; Silva, M. M., Welz, B.; Lima, E. C.; Determination of cadmium, copper and lead in mineral coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta.Part B* **56/10** (2001) 1859-1873.
89. Stillman, M. J.; Metallothioneins, *Coord. Chem. Reviews* **144** (1995) 461-511.
90. Kendrick, M. J.; May, M. T.; Plishka, M. J.; Robinson, K. D.; Metals in Biological Systems, Simon & Schuster International Group, Chichester, England, 1992.
91. Volynskii, A. B.; Chemical modifier in modern electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Chem.* **58/10** (2003) 1015-1032
92. Mitchell, P. G.; Sneddon, J.; Direct determination of metals in milligram masses and microlitre volumes by direct-current argon-plasma emission spectroscopy with sample introduction by electrothermal vaporization, *Talanta* **34** (1987) 849-855
93. Verrept, P.; Dams, R.; Kürfurst, U.; Electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the analysis of solid samples: contributions to instrumentation and methodology, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **345** (1993) 1035-1041
94. Yanan, C.; Preparation and certification of a pig liver reference material, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **326** (1987) 705-706
95. Uchino, E.; Jin, K.; Tsuzuki, T.; Inue, K., Evaluation of the stability of some elements during lyophilisation of rat liver using atomic absorption spectrometry, *Analyst* **112** (1987) 291-293.
96. Nancy, J.; Miller-Ihli, N. J.; Graphite furnace atomic absorption spectrometry for the analysis of biological materials, *Spectrochim. Acta Part B* **44** (1989) 1221-1227.
97. Pauwels, J; Vandercastele, C.; Determination of the minimum sample mass of a solid CRM to be used in chemical analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.* **345** (1993) 121-123

CURRICULUN VITAE

1. Dados Pessoais

Nome: Cassiana Seimi Nomura

Filiação: Ademar Naotake Nomura e Cecília Shizuko Nomura

Data de Nascimento: 07/02/1979

Nacionalidade: Brasileira/São Paulo, SP

2. Formação acadêmica

Fundamental: Escola Adventista do Campo Limpo, São Paulo, SP, 1993

Médio: Colégio Bandeirantes, São Paulo, SP, 1996

Superior: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, 2001

. Licenciatura em Química, 2005

Doutorado: Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Área de concentração: Química Analítica

3. Ocupação

Bolsista FAPESP desde 2002 (02/00666-4)

4. Publicações

1. Correia, P. R. M.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Espectrometria de absorção atômica multielementar: Desafios e Perspectivas, *Revista Analytica* **5** (2003) 52-59.

2. Correia, P. R. M.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Multielement determination of cadmium and lead in urine by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry with end – capped graphite tube, *Analytical Sciences* **19** (2003) 1519-1523.

3. Nomura, C. S.; Correia, P. R. M.; Oliveira, P. V.; Oliveira, E.; W+Rh as permanent chemical modifier in simultaneous atomic absorption spectrometry: Interference studies on As, Cd, Pb and Se determination, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **15/1** (2004) 75-82

4. Nomura, C. S.; Silva, C. S.; Nogueira, A. R. A.; Oliveira, P. V.; Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* **60** (2005) 673-680
5. Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólidos *Química Nova* **29/2** (2006) 234-239
6. Documento oficial: Zeisler, R; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Acceptance of SRM 1648a Urban Particulate Matter for Certification Analysis, *Report of Analysis*, National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, MD, USA, 2005
7. Capítulo de Livro: Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Micro sampling for solid and slurries analytical methods

5. Artigos submetidos ou em fase de redação

1. Nomura, C. S.; Silva, C. S.; Oliveira, P. V.; Análise direta de sólido por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite: uma revisão, *Química Nova*
 2. Nomura, C. S.; Naozuka, J.; Correia, P. R. M.; Oliveira, P. V.; Gas-phase and platform surface temperature evaluation for the graphite furnace used in solid sampling atomic absorption spectrometry, *Journal of the Brazilian Chemical Society*
 3. Silva, C. S.; Nomura, C. S.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, P. V.; Direct analysis of iron in sand by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytical Sciences*
 4. Nomura, C. S.; Oliveira, P.V.; Cadmium and lead screening in hair by solid sampling atomic absorption spectrometry, *Environmental Forensics*
 5. Scatamachia, D. S.; Nomura, C. S.; Oliveira, P. V.; Use of Ar/H₂ mixture as purge gas and Ir as permanent chemical modifier for barium determination in waters by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta*
-