

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Gabriel Toneto Druzian

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE  
INTERFERÊNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS  
TERRAS RARAS EM SANGUE POR ICP-MS**

Santa Maria, RS  
2021

**Gabriel Toneto Druzian**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE  
INTERFERÊNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS RARAS  
EM SANGUE POR ICP-MS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Druzian, Gabriel Toneto

Desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de interferências para a determinação de elementos terras raras em sangue por ICP-MS / Gabriel Toneto Druzian.- 2021.

248 p.; 30 cm

Orientador: Érico Marlon de Moraes Flores

Coorientadora: Paola de Azevedo Mello

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Sangue 2. Elementos terras raras 3. Amostragem direta 4. Preparo de amostras 5. ICP-MS I. Flores, Érico Marlon de Moraes II. Mello, Paola de Azevedo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

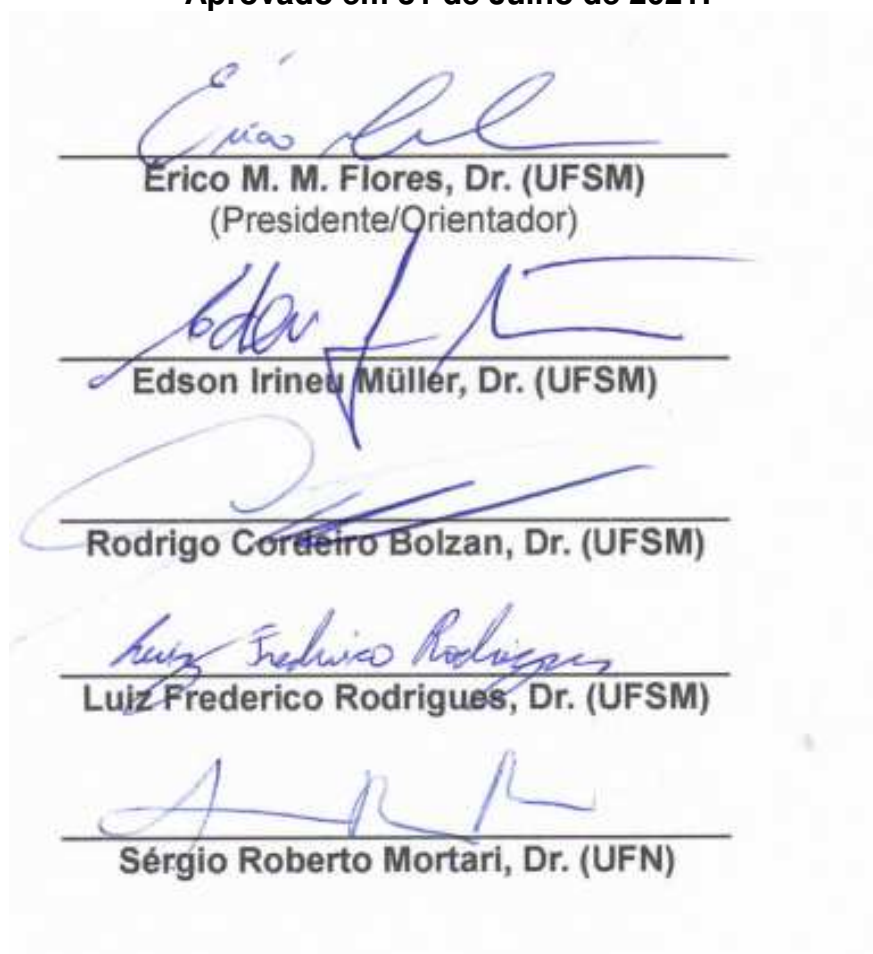
Declaro, GABRIEL TONETO DRUZIAN DRUZIAN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Gabriel Toneto Druzian**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE  
INTERFERÊNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS RARAS  
EM SANGUE POR ICP-MS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

**Aprovado em 31 de Julho de 2021:**



**Erico M. M. Flores, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

**Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)**

**Rodrigo Cordeiro Bolzan, Dr. (UFSM)**

**Luz Frederico Rodrigues, Dr. (UFSM)**

**Sérgio Roberto Mortari, Dr. (UFN)**

Santa Maria, RS  
2021

## Declaração

A pesquisa descrita nesta tese foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta tese (ou partes dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

  
Gabriel Toneto Druzian

*Dedico esse trabalho a toda a minha família,  
em especial, à minha mãe Susana, meu Pai  
Ladmir, minha irmã Leticia e à Mariele pelo  
carinho e apoio incondicional*

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação neste trabalho, pela amizade, pelas oportunidades, bem como pelo incentivo de crescimento profissional e pessoal e pelo exemplo de dedicação profissional.

Ao Dr. **Luiz Frederico Rodrigues** pela participação na banca de defesa, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Roberto Mortari** pela participação na banca de defesa, pelas valiosas sugestões e pelo acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Cordeiro Bolzan** pela participação na banca de defesa, pelas valiosas sugestões para aprimoramento do trabalho, pela amizade e convívio.

Ao Prof. Dr. **Edson Irineu Müller** pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Às Profs. Dr<sup>as</sup>. **Paola de Azevedo Mello** e Dr<sup>a</sup> **Márcia Foster Mesko** pela coorientação e por todas as contribuições, as quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. **Mariele Samuel do Nascimento** pelo convívio, pelo auxílio prestado e pela contribuição direta durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Miguel**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

A minha mãe **Susana M. Toneto Druzian**, ao meu pai **Ladmir Sérgio Druzian** e a minha irmã **Leticia Toneto Druzian**, pelo amor incondicional, pelo incentivo, e por acreditarem em mim, sempre.

***“Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons, mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.”***

**Bertold Brecht**



## RESUMO

# DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE INTERFERÊNCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS RARAS EM SANGUE POR ICP-MS

AUTOR: Gabriel Toneto Druzian

ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Neste trabalho foram investigados cinco métodos analíticos para a determinação de elementos terras raras (REE) em sangue por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS): *i*) vaporização eletrotérmica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS), *ii*) digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS), *iii*) digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado (CWD-CS), *iv*) digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC) e *v*) combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Para os métodos da CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC, os quais utilizaram a nebulização ultrassônica (USN), foi feita uma investigação sistemática de possíveis interferências para a determinação dos REE usando esse sistema de introdução de amostra. Foi investigado o efeito da concentração de Ca, Fe, K, Mg, Na, C (a partir do ácido cítrico, frutose e de digeridos de fígado bovino), bem como o efeito da concentração de HNO<sub>3</sub>, HCl e água régia. De maneira geral, efeitos de supressão de sinal para todos os REE a partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de Na e K, 75 mg L<sup>-1</sup> de Ca e 100 mg L<sup>-1</sup> de Mg e Fe foram observados nesse estudo. Na avaliação do efeito do C (proveniente do ácido cítrico e da frutose), observou-se aumento na intensidade do sinal dos REE a partir de 250 mg L<sup>-1</sup>. Para a concentração de HNO<sub>3</sub> e água régia, observou-se supressão de sinal dos REE a partir de 10 e 20%, respectivamente. Por outro lado, não foram observadas interferências na determinação dos REE na faixa de 5 a 30% de HCl. Adicionalmente, foi feito um estudo a partir de dois delineamentos fatoriais completos (2<sup>3</sup>) investigando o efeito da concentração concomitante de Fe, K e Na e de C, Na e K, respectivamente, na determinação dos REE por USN ICP-MS. Foi observado que o somatório das concentrações de Na e K (50 mg L<sup>-1</sup>) causam interferências na determinação dos REE. Ainda, estes efeitos de supressão causados pelo Na e K, competem com os efeitos de aumento da intensidade de sinal causados pela presença de C (a partir do ácido cítrico). Os resultados obtidos por digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) foram utilizados como valores de referência para os métodos analíticos desenvolvidos. Cada método analítico foi otimizado em função de parâmetros experimentais, como massa de amostra, temperatura, tempo, concentração de solução digestora, entre outros. Os métodos analíticos investigados foram aplicados para amostras de sangue humano (amostras A, B e C), sangue bovino e suíno (amostra D e E, respectivamente). Ainda, foi utilizada amostras de fígado bovino e suíno (amostra F e G, respectivamente), provenientes dos mesmos animais que forneceram as amostras D e E. Adicionalmente, uma amostra de fígado bovino (amostra H) foi utilizada para os experimentos de interferências. Com relação a ETV-ICP-MS, independente das condições experimentais utilizadas, observou-se que este método não foi adequado para a determinação de REE em sangue, possivelmente devido a dificuldade de separar os REE dos metais (Fe, Na e K) constituintes do sangue. É importante destacar que a massa de sangue utilizada nos métodos da CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC é dependente da concentração de Na e K presentes em cada amostra, visto às interferências observadas no estudo sistemático para a determinação de REE por USN-ICP-MS. O método da CWD-OS, não foi considerado adequado para a digestão de sangue, pois independente da solução de digestão utilizada, obteve-se digeridos com gordura em suspensão. Por outro lado, o método da CWD-CS foi adequado para a digestão de 0,4 g de sangue líquido usando 5 mL de HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup> + 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. No método da MAWD-SRC, foi possível a digestão de 2 g de sangue utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, a 270 °C durante 15 min. A MIC permitiu a digestão de 0,45 g de sangue utilizando 6 mL de água régia como solução absorvedora. Em vista dos métodos de preparo de amostras desenvolvidos, é importante salientar que a escolha por cada um deles depende diretamente da concentração dos interferentes presente nas amostras, a frequência analítica e a instrumentação disponível em cada laboratório.

**Palavras-chave:** Sangue, Elementos terras raras, Amostragem direta, Preparo de amostras e ICP-MS.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS AND INTERFERENCES STUDY FOR RARE EARTH ELEMENTS DETERMINATION IN BLOOD BY ICP-MS

AUTHOR: Gabriel Toneto Druzian

ADVISOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

In this work five analytical methods were investigated for rare earth elements determination (REE) in blood by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): *i*) Electrothermal vaporization and inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS), *ii*) conventional wet digestion in open system (CWD-OS), *iii*) conventional wet digestion in closed system (CWD-CS), *iv*) microwave-assisted wet digestion using a single reaction chamber (MAWD-SRC) and *v*) microwave induced combustion (MIC). For CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC and MIC, which used ultrasonic nebulization (USN), a systematic investigation of possible interferences for the determination of REE using this sample introduction system was carried out. The effect of Ca, Fe, K, Mg, Na, C (from citric acid, fructose and digested bovine liver) concentration were investigated, as well as the effect of the concentration of HNO<sub>3</sub>, HCl and aqua regia. In general, signal suppression effects for all REE from 50 mg L<sup>-1</sup> of Na and K, 75 mg L<sup>-1</sup> of Ca and 100 mg L<sup>-1</sup> Mg and Fe were observed in this study. In evaluating the C effect (from citric acid and fructose), an increase in the signal intensity of REE was observed from 250 mg L<sup>-1</sup>. For the HNO<sub>3</sub> and aqua regia concentration, signal suppression of REE was observed from 10 and 20%, respectively. On the other hand, no interferences were observed in the determination of REE in the range of 5 to 30% of HCl. Additionally, a study was carried out from two complete factorial designs (2<sup>3</sup>) investigating the effect of the concomitant concentration of Fe, K and Na and of C, Na and K, respectively, in determination of REE by USN-ICP-MS. It was observed that the sum of Na and K concentrations (50 mg L<sup>-1</sup>) interfere in the determination of the REE. Furthermore, these suppression effects caused by Na and K compete with the signal intensity increase effects caused by the presence of C (from citric acid). The obtained results by microwave-assisted wet digestion (MAWD) were used as reference values for the developed analytical methods. Each analytical method was optimized as a function of experimental parameters, such as sample mass, temperature, time, concentration of digested solution, among others. The investigated analytical methods were applied to human blood samples (samples A, B and C), bovine and pig blood (sample D and E, respectively). In addition, liver samples of bovine and pig were used (sample F and G, respectively) from the same animals that provided samples D and E. Additionally, a bovine liver sample (sample H) was used for the interference experiments. Regarding to ETV-ICP-MS, regardless of the experimental conditions used, it was observed that this method was not suitable for the determination of REE in blood, possibly due to the difficulty of separating the REE from the metals (Fe, Na and K) that are part of the blood. It is important to highlight that the blood mass used in the CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC and MIC methods is dependent on the concentration of Na and K present in each sample, based on the interferences observed on the systematic study for REE determination by USN-ICP-MS. The CWD-OS method was not considered suitable for blood digestion because regardless of the digestion solution used, it was obtained digests with fat in suspension. On the other hand, the CWD-CS method was suitable for the digestion of 0.4 g of liquid blood using 5 mL of 3 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> + 1 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the MAWD-SRC method, it was possible to digest 2 g of blood using 6 mL of 1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> at 270 °C for 15 min. The MIC allowed the digestion of 0.45 g of blood using 6 mL of aqua regia as an absorbing solution. In view of the developed sample preparation methods, it is important to emphasize that the choice for each one depends directly on the concentration of the interfering metals in each sample, the analytical frequency and the instrumentation available in each laboratory.

**Keywords:** Rare earth elements, Direct sampling, Sample preparation and ICP-MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do sistema de ETV: A) Entrada do forno, B) entrada de Ar (carreador), C) forno de grafite contendo a plataforma e amostra, D) entrada de Ar bypass, E) válvula de três vias, F) saída para a exaustão e G) tubulação de transferência para o equipamento de ICP-MS. Representação adaptada <sup>1</sup> .....	60
Figura 2 -	Plataforma e tubo de grafite utilizado no ETV-ICP-MS.....	65
Figura 3 -	A) Sistema de ETV: 1) controlador eletrônico; 2) Controlador de oxigênio; 3) forno de grafite; 4) válvula de três vias; 5) controlador do sistema de ETV, B) detalhe da válvula de três vias; C) representação do funcionamento da válvula de três vias e D) tubo de PTFE conectado à entrada do equipamento de ICP-MS.....	66
Figura 4 -	A) Forno de micro-ondas Synthos 3000 <sup>®</sup> . B) Rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizado para a digestão de sangue (MAWD e MIC) para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS.....	68
Figura 5 -	A) Forno de micro-ondas UltraWAVE <sup>®</sup> . B) Rotor equipado com cinco frascos de quartzo.....	69
Figura 6 -	A) Nebulizador USN. B) Conexão do nebulizador ultrassônico no equipamento de ICP-MS.....	70
Figura 7 -	Procedimentos executados para coleta de sangue por punção venosa. A) assepsia da região de coleta; B) coleta do sangue com agulha e seringa; C) amostras armazenadas em tubos de coleta com anticoagulante; D) tubos de coleta preenchidos.....	77
Figura 8 -	Procedimento usado no método da MAWD para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de quartzo; B) adição de 6 mL de HNO <sub>3</sub> 7 mol L <sup>-1</sup> ; C) fixação dos frascos de quartzo no rotor; D) solução final após MAWD.....	79
Figura 9 -	Sequência de etapas para análise de sangue por ETV-ICP-MS: A) sangue após coleta, B) pesagem de sangue na plataforma de grafite, C) adição de ácido cítrico, D) secagem em sistema de infravermelho e E) inserção da plataforma no forno de grafite.....	81
Figura 10 -	Procedimento usado no método da CWD-OS para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de vidro, B) frasco de vidro contendo 6 mL de solução digestora, C) etapa de digestão do sangue e D) solução final após CWD-CS.....	88
Figura 11 -	Procedimento usado no método da CWD-CS para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de PTFE, B) frasco de PTFE contendo 6 mL de solução digestora C) etapa de digestão do sangue e D) solução final após CWD-CS.....	89
Figura 12 -	Etapas envolvidas na digestão de sangue por MAWD-SRC: A) pesagem de sangue nos frascos de quartzo, B) adição da solução digestora, C) introdução da solução contendo 130 mL de água e 5 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado no copo reacional de PTFE, D) inserção do rotor com 5 frascos de quartzo automaticamente no interior da cavidade, E) fechamento manual do grampo metálico, F) pressurização com Ar <sub>(g)</sub> até 40 bar e G) solução obtida após MAWD-	

	SRC.....	90
Figura 13 -	Procedimento usado no método da MIC para adigestão de sangue: A) sangue, B) pesagem de sangue no papel de DBS, C) papel de DBS contendo o sangue seco, D) adição de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ usado como iniciador de combustão no papel filtro inserido em um suporte de quartzo, E) frasco de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora e suporte de quartzo contendo a amostra, F) frascos fixados no rotor e pressurização dos frascos de quartzo com 20 bar de $\text{O}_{2(g)}$ , G) etapa de combustão do sangue e H) solução final contendo os REE absorvidos na solução.....	92
Figura 14 -	Fluxograma dos métodos analíticos investigados e parâmetros avaliados nos estudos de interferências.....	94
Figura 15 -	Efeito da temperatura de pirólise sobre a massa residual de sangue. As barras representam o desvio padrão (n=3).....	102
Figura 16 -	Avaliação da massa de sangue no sistema ETV-ICP-MS sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ : A) 0,25 mg; B) 0,5 mg; C) 2 mg e D) 4 mg. Condições: temperatura de pirólise de 300 °C (40 s) e vaporização de 2200 °C (6 s); vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	103
Figura 17 -	Efeito da temperatura de pirólise sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ . Condições: 0,25 mg de sangue, 40 s de permanência na etapa de pirólise; vaporização a 2200 °C (6 s); vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	106
Figura 18 -	Efeito do tempo de pirólise em 700 °C sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ : A) 40 s; B) 60 s e C) 80 s. Condições: vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	107
Figura 19 -	Efeito da massa do ácido cítrico sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ : A) 6 mg; B) 8 mg e C) 10 mg. Condições: Pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	109
Figura 20 -	Efeito da vazão do $\text{O}_2$ sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ : Condições: 100 mL $\text{min}^{-1}$ de $\text{O}_2$ ; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ ....	111
Figura 21 -	Efeito do Ir sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ . Condições: 4 µg de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	112
Figura 22 -	Plataforma de grafite após avaliação do efeito do Ir sobre a intensidade do $\text{Ar}_2^+$ (após, aproximadamente 10 ciclos). Condições: 4 µg de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $\text{min}^{-1}$ e freon de 2,00 mL $\text{min}^{-1}$ .....	113
Figura 23 -	Recobrimento da plataforma de grafite: A) plataforma de grafite antes do recobrimento e B) plataforma de grafite depois do recobrimento	

	com Zr.....	113
Figura 24 -	Avaliação do recobrimento da plataforma de grafite sobre a intensidade do $Ar_2^+$ : A) 1ª leitura e B) 2ª leitura. Condições: 4 $\mu g$ de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $min^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $min^{-1}$ e freon de 2,00 mL $min^{-1}$ .....	114
Figura 25 -	Aspecto visual do plasma após recobrimento da plataforma de grafite com Zr. Condições: 4 $\mu g$ de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $min^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $min^{-1}$ e freon de 2,00 mL $min^{-1}$ .....	114
Figura 26 -	Separação entre A) soro e B) elementos figurados do sangue e monitoramento da intensidade do $Ar_2^+$ . Condições: 4 $\mu g$ de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de soro ou dos elementos figurados do sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás bypass de 0,40 L $min^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L $min^{-1}$ e freon de 2,00 mL $min^{-1}$ .....	116
Figura 27 -	Efeito da concentração de Na na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	119
Figura 28 -	Efeito do Na na mudança de coloração do plasma. A) solução sem à presença de Na, B) solução contendo 1000 mg L <sup>-1</sup> de Na e C) depósito de sais na conexão do USN com o tubo injetor do equipamento de ICP-MS.....	120
Figura 29 -	Efeito da concentração de K na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	122
Figura 30 -	Efeito da concentração de Ca na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	124
Figura 31 -	Efeito da concentração de Mg na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	126
Figura 32 -	Efeito da concentração de Fe na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	128

Figura 33 -	Depósito de Fe nos cones de amostragem e Skimmer. A) Cone de amostragem antes dos experimentos de interferências, B) cone de amostragem após os experimentos de interferências, C) cone Skimmer antes dos experimentos de interferências e D) cone Skimmer após os experimentos de interferências.....	129
Figura 34 -	Efeito da concentração de C (a partir do ácido cítrico na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	131
Figura 35 -	Efeito da concentração de C a partir da frutose na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	134
Figura 36 -	A) Depósito de C a partir do uso da frutose no tubo injetor do equipamento de ICP-MS e B) Detalhe da deposição de C no tubo injetor.....	135
Figura 37 -	A) Fígado bovino <i>in natura</i> , B) mistura contendo aproximadamente 3 g de fígado e 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> C) solução obtida após a digestão por CWD-OS.....	136
Figura 38 -	Concentração de Ca, Fe, K, Mg, Na (linhas) e C (barras), em mg L <sup>-1</sup> , nas soluções utilizadas para os experimentos de interferências a partir de digeridos de fígado bovino, obtidas por ICP-OES (n=3).....	137
Figura 39 -	Efeito da concentração de C (a partir de digeridos de fígado bovino) na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	139
Figura 40 -	Delineamento fatorial completo para avaliação do efeito da concentração de Fe, K e Na na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	142
Figura 41 -	Delineamento fatorial completo para avaliação do efeito da concentração de K, Na e C na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	145
Figura 42 -	Efeito da concentração de HNO <sub>3</sub> na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	149

Figura 43 -	Efeito da concentração de HCl na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	151
Figura 44 -	Efeito da concentração de água régia na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	153
Figura 45 -	Efeito da concentração de K na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	155
Figura 46 -	Efeito da concentração de Na na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	158
Figura 47 -	Efeito da concentração de C (a partir do ácido cítrico) na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	161
Figura 48 -	Concentração de Ca, Fe, K, Mg, Na (linhas) e C (barras), em mg L <sup>-1</sup> , nas soluções utilizadas para os experimentos de interferências a partir de digeridos de fígado bovino, obtidas por ICP-OES (n=3).....	163
Figura 49 -	Efeito da concentração de C (a partir de digeridos de fígado bovino) na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.....	164
Figura 50 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-OS usando A) 5 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, B) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> , C) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> , D) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 5 mol L <sup>-1</sup> , E) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 7 mol L <sup>-1</sup> , F) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 10 mol L <sup>-1</sup> e G) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> .....	168
Figura 51 -	Digestão de sangue na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . A) 0,4 g de sangue e B) 0,4 g de sangue e 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%.....	169
Figura 52 -	Concentração de C (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-OS. Condições: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> e 40 min a 120 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).....	170
Figura 53 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-CS usando A) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> , B) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> , C) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 5 mol L <sup>-1</sup> , D) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 7 mol L <sup>-1</sup> , E) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 10 mol L <sup>-1</sup> e F) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> .....	172

Figura 54 -	Concentração de C (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-CS. Condições: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> e 40 min a 200 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).....	173
Figura 55 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-CS usando : A) 5 mL HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, B) 5 mL HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, C) 5 mL HNO <sub>3</sub> 5 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, D) 5 mL HNO <sub>3</sub> 7 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, E) 5 mL HNO <sub>3</sub> 10 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% e F) 5 mL HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%.....	175
Figura 56 -	Concentração de C (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-CS. Condições: 0,4 g de sangue, 5 mL de HNO <sub>3</sub> 1 a 14 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 40 min a 200 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).....	176
Figura 57 -	Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) ao longo do tempo a partir de digeridos de sangue obtidos por CWD-CS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condições: 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%.....	179
Figura 58 -	Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) ao longo do tempo a partir de digeridos de sangue obtidos por CWD-CS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condições: 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%.....	181
Figura 59 -	Avaliação da exatidão do método da CWD-CS na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condições: 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> .....	183
Figura 60 -	Concentração de carbono (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando massas de sangue na faixa de 0,4 a 2,0 g. Condições: 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> , 270 °C e 20 min na temperatura máxima. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.....	188
Figura 61 -	A) Aspecto dos digeridos de sangue após MAWD-SRC usando 0,4 g de sangue e B) 2,0 g de sangue. Condição: 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> , 270 °C e 20 min em 270 °C.....	189
Figura 62 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando A) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> , B) 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> . Condição: 0,4 g de sangue, 270 °C e 20 min na temperatura máxima.....	190
Figura 63 -	Concentração de carbono (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 a 14 mol L <sup>-1</sup> . Condição: 0,4 g de sangue, 270 °C e 20 min em 270°C. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.....	191



Figura 64 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando: A) 200, B) 220, C) 250 e D) 270 °C. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 20 min em cada temperatura.....	193
Figura 65 -	Concentração de carbono (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 200, 220, 250 e 270 °C Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 20 min em cada temperatura. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.....	194
Figura 66 -	Avaliação da resposta do equipamento de USN-ICP-MS na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) ao longo do tempo a partir de digeridos de sangue (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue e 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> , temperatura de 250 °C e 20 min na temperatura máxima.....	196
Figura 67 -	Avaliação da exatidão do método da MAWD-SRC na determinação de REE (250 ng L <sup>-1</sup> ) (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue e 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 20 min em cada temperatura.....	198
Figura 68 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando A) 5, B) 10, C) 15 e D) 20 min. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 270 °C.....	200
Figura 69 -	Concentração de carbono (barras) e concentração de HNO <sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 5, 10, 15 e 20 min na temperatura máxima de digestão. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> e 270 °C. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.....	201
Figura 70 -	Absorção de sangue no papel de DBS A) após a pesagem e B) após a secagem do sangue absorvido no papel de DBS.....	204
Figura 71 -	Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MIC. Condição: 0,45 g de sangue e 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> usado como solução absorvedora.....	205
Figura 72 -	Avaliação da concentração de HNO <sub>3</sub> na determinação de REE por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo 250 ng L <sup>-1</sup> dos REE e 6 mL de HNO <sub>3</sub> .....	207
Figura 73 -	Avaliação da presença de HCl na determinação de REE por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo 250 ng L <sup>-1</sup> dos REE e 6 mL de solução absorvedora.....	210

Figura 74 - Avaliação da concentração de água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo  $250 \text{ ng L}^{-1}$  dos REE e 6 mL de solução absorvedora..... 213

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos analíticos comumente empregadas para a determinação de REE em amostras biológicas.....	50
Tabela 2 -	Condições operacionais para a determinação de REE em sangue por ETV-ICP-MS.....	66
Tabela 3 -	Condições operacionais para a determinação de REE e avaliação de possíveis interferências por USN-ICP-MS.....	70
Tabela 4 -	Condições operacionais para a determinação de metais (por ICP-OES e ICP-MS) e C por ICP-OES.....	72
Tabela 5 -	Programa de irradiação utilizado para a digestão de sangue por MAWD.....	78
Tabela 6 -	Programa de irradiação utilizado para a digestão de fígado por MAWD-SRC.....	80
Tabela 7 -	Programa de aquecimento utilizado para a otimização do sistema de ETV-ICP-MS.....	82
Tabela 8 -	Variáveis, níveis codificados e seus valores correspondentes utilizados no delineamento fatorial completo $2^3$ para Fe, Na e K.....	85
Tabela 9 -	Variáveis, níveis codificados e seus valores correspondentes utilizados no delineamento fatorial completo $2^3$ para Na, K e C.....	86
Tabela 10 -	Programa de irradiação utilizado para a digestão de sangue por MAWD-SRC.....	90
Tabela 11 -	Teor de água nas amostras de sangues e fígado após procedimento de liofilização durante 72 h.....	96
Tabela 12 -	Caracterização elementar de sangue e fígado após MAWD e MAWD-SRC, respectivamente. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), $n = 3$ . Determinações feitas por (a) ICP-MS e (b) ICP-OES.....	98
Tabela 13 -	Determinação de REE em sangue após MAWD. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ), $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS.....	100
Tabela 14 -	Massa máxima de sangue (g) que poderia ser utilizada pelos métodos de preparo de amostras para que não fossem observadas interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS.....	167
Tabela 15 -	Determinação de REE em sangue após CWD-CS. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ), $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condições: 0,4 de sangue e 5 mL de $\text{HNO}_3$ 3 mol $\text{L}^{-1}$ + 1 mL de $\text{H}_2\text{O}_2$ 30%.....	185
Tabela 16 -	Determinação de REE em sangue após MAWD-SRC. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ), $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condição: 0,4 g, 6 mL de $\text{HNO}_3$ 1 mol $\text{L}^{-1}$ , e 15 min a 270 °C.....	202
Tabela 17 -	Determinação de REE em sangue após a MIC. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ), $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condições: 0,4 g de sangue e 6 mL de água régia concentrada.....	215

Tabela 18 -	Determinação de REE em fígado bovino e suíno após MAWD-SRC. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ), $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS.....	216
Tabela 19 -	Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após CWD-CS e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).....	218
Tabela 20 -	Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após MAWD-SRC e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).....	219
Tabela 21 -	Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após MIC e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).....	220
Tabela 22 -	Comparação dos métodos de preparo de amostras investigados para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS.....	222

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRM, material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*

CWD-OS, Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto, do inglês, *conventional wet digestion in open system*

CWD-CS, Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado, do inglês, *conventional wet digestion in closed system*

d.i., diâmetro interno

ETV, vaporização eletrotérmica, do inglês, *electrothermal vaporization*

EU-OSHA, Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho, do inglês, *European Agency for Safety and Health at Work*

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

LOD, limite de detecção, do inglês, *limit of detection*

LOQ, limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*

MAWD, digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*

MAWD-SRC, digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação, do inglês, *microwave-assisted wet digestion in a single reaction chamber*

MIC, combustão iniciada por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-induced combustion*

NAA, análise por ativação neutrônica, do inglês, *neutron activation analysis*

PTFE, politetrafluoretileno

REE, elementos terras raras, do inglês, *rare earth elements*

RSD, desvio padrão relativo, do inglês, *relative standard deviation*

USN, nebulizador ultrassônico, do inglês, *ultrasonic nebulizer*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b>SANGUE: COMPOSIÇÃO E FUNCIONALIDADES.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2</b>	<b>USO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA EXAMES LABORATORIAIS</b>	<b>41</b>
<b>2.3</b>	<b>ELEMENTOS TERRAS RARAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Métodos de extração.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Digestão por via úmida.....</b>	<b>46</b>
<b>2.4.2.1</b>	<b>Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação.....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Métodos de combustão.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE.....</b>	<b>49</b>
<b>2.6</b>	<b>TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE</b>	<b>56</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Análise por ativação neutrônica.....</b>	<b>57</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....</b>	<b>57</b>
<b>2.6.2.1</b>	<b>Sistemas de nebulização.....</b>	<b>58</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Vaporização eletrotérmica e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ou espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica.....</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>INSTRUMENTAÇÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Vaporização eletrotérmica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS).....</b>	<b>64</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Métodos de preparo de amostras propostos para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAIS E REAGENTES.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3</b>	<b>AMOSTRAS.....</b>	<b>76</b>
<b>3.4</b>	<b>MÉTODOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E FÍGADO E PARA A OBTENÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS REE.....</b>	<b>78</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Determinação do teor de umidade.....</b>	<b>78</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Determinação de metais e obtenção dos valores de referência para REE em sangue após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em sistema Synthos 3000®.....</b>	<b>78</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Determinação de REE em fígado por USN-ICP-MS após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação.....</b>	<b>79</b>
<b>3.5</b>	<b>ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE</b>	

	<b>ACOPLADO COM VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA (ETV-ICP-MS)....</b>	<b>80</b>
<b>3.6</b>	<b>AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS E ICP-MS.....</b>	<b>82</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Avaliação do efeito do Ca, Fe, K, Mg e Na na determinação de REE por USN-ICP-MS e ICP-MS.....</b>	<b>83</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Avaliação do efeito do C na determinação de REE por USN-ICP-MS e ICP-MS.....</b>	<b>84</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> – Efeito da concentração de Fe, K e Na.....</b>	<b>85</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> – Efeito da concentração de Na, K e C.....</b>	<b>85</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Avaliação do efeito do HNO<sub>3</sub>, HCl e água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>86</b>
<b>3.7</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO UMA ETAPA PRÉVIA DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE.....</b>	<b>87</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS).....</b>	<b>87</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado (CWD-CS).....</b>	<b>88</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Digestão por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC).....</b>	<b>89</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Combustão iniciada por micro-ondas (MIC).....</b>	<b>91</b>
<b>3.8</b>	<b>DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO E DA ACIDEZ RESIDUAL.</b>	<b>93</b>
<b>3.9</b>	<b>RESUMO DOS PROCEDIMENTOS.....</b>	<b>93</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>AMOSTRAS.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Determinação do teor de água do sangue e fígado.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Determinação de metais em sangue e fígado após digestão por via úmida assistida por micro-ondas.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Determinação de REE em sangue após digestão por via úmida assistida por micro-ondas.....</b>	<b>99</b>
<b>4.2</b>	<b>VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA E ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ETV-ICP-MS).....</b>	<b>100</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Avaliação da temperatura de pirólise sobre a massa residual da amostra de sangue.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Avaliação da massa de sangue.....</b>	<b>102</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Avaliação da temperatura de pirólise.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Avaliação do tempo de pirólise.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Avaliação da massa de ácido cítrico.....</b>	<b>108</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Avaliação do uso de O<sub>2</sub> durante a pirólise.....</b>	<b>110</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Avaliação do uso de Ir.....</b>	<b>111</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Avaliação do recobrimento da plataforma de grafite com Zr.....</b>	<b>113</b>

4.2.9	<b>Separação dos elementos figurados do sangue e do soro.....</b>	<b>115</b>
4.3	<b>AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DURANTE A DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS.....</b>	<b>117</b>
4.3.1	<b>Avaliação do efeito do Na na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>117</b>
4.3.2	<b>Avaliação do efeito do K na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>121</b>
4.3.3	<b>Avaliação do efeito do Ca na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>123</b>
4.3.4	<b>Avaliação do efeito do Mg na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>125</b>
4.3.5	<b>Avaliação do efeito do Fe na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>127</b>
4.3.6	<b>Avaliação do efeito do C na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>130</b>
4.3.6.1	Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de ácido cítrico.....	130
4.3.6.2	Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de frutose.....	133
4.3.6.3	Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de digeridos de fígado bovino.....	135
4.3.7	<b>Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> - Efeito da concentração de Fe, K e Na.....</b>	<b>140</b>
4.3.8	<b>Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> - Efeito da concentração de Na, K e C.....</b>	<b>144</b>
4.3.9	<b>Avaliação do efeito de ácidos na determinação de REE por USN-ICP-MS.....</b>	<b>147</b>
4.3.9.1	Avaliação do efeito do HNO <sub>3</sub> na determinação de REE por USN-ICP-MS.	147
4.3.9.2	Avaliação do efeito do HCl na determinação de REE por USN-ICP-MS....	150
4.3.9.3	Avaliação do efeito de água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS.....	152
4.4	<b>AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE REE POR ICP-MS USANDO NEBULIZADOR CONCÊNTRICO.....</b>	<b>154</b>
4.4.1	<b>Avaliação do efeito do K na determinação de REE por ICP-MS.....</b>	<b>154</b>
4.4.2	<b>Avaliação do efeito do Na na determinação de REE por ICP-MS.....</b>	<b>156</b>
4.4.3	<b>Avaliação do efeito do C na determinação de REE por ICP-MS.....</b>	<b>159</b>
4.4.3.1	Avaliação do efeito de C na determinação de REE por ICP-MS a partir de soluções de ácido cítrico.....	159
4.4.3.2	Avaliação do efeito de C na determinação de REE por ICP-MS a partir de digeridos de fígado bovino.....	162
4.5	<b>MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DESENVOLVIDOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE.....</b>	<b>166</b>
4.5.1	<b>Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto.....</b>	<b>167</b>



4.5.1.1	Avaliação da concentração de HNO <sub>3</sub> para a digestão de sangue por CWD-OS.....	168
<b>4.5.2</b>	<b>Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado.....</b>	<b>171</b>
4.5.2.1	Avaliação da concentração de HNO <sub>3</sub> para a digestão de sangue por CWD-CS.....	172
4.5.2.2	Avaliação do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para a digestão de sangue por CWD-CS.....	174
4.5.2.3	Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS usando digeridos de sangue após CWD-CS ao longo do tempo.....	177
4.5.2.4	Avaliação da exatidão do método da CWD-CS.....	182
4.5.2.5	Determinação de REE em sangue após CWD-CS.....	184
<b>4.5.3</b>	<b>Digestão por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação.....</b>	<b>186</b>
4.5.3.1	Avaliação da massa de sangue.....	187
4.5.3.2	Avaliação da concentração de HNO <sub>3</sub> .....	189
4.5.3.3	Avaliação da temperatura máxima de digestão.....	192
4.5.3.4	Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS usando digeridos de sangue após MAWD-SRC.....	195
4.5.3.5	Avaliação da exatidão do método da MAWD-SRC.....	197
4.5.3.6	Avaliação do tempo.....	199
4.5.3.7	Determinação de REE em sangue após MAWD-SRC.....	202
<b>4.5.4</b>	<b>Combustão iniciada por micro-ondas.....</b>	<b>203</b>
4.5.4.1	Avaliação da massa máxima de sangue absorvida nos papéis de DBS.....	203
4.5.4.2	Avaliação da massa máxima de sangue a ser digerida no método da MIC.....	204
4.5.4.3	Avaliação da concentração de HNO <sub>3</sub> .....	205
4.5.4.4	Avaliação do uso de HCl.....	208
4.5.4.5	Avaliação da concentração de água régia.....	211
4.5.4.6	Determinação de REE em sangue após MIC.....	214
<b>4.6</b>	<b>DETERMINAÇÃO DE REE EM FÍGADOS APÓS MAWD-SRC.....</b>	<b>215</b>
<b>4.7</b>	<b>LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO.....</b>	<b>217</b>
<b>4.8</b>	<b>COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....</b>	<b>221</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>223</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>227</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido fluido formado pelo plasma e por uma fração celular. O plasma é constituído por água, nutrientes, açúcares, proteínas, gorduras, gases e outros íons (como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{CO}_3^{-2}$  por exemplo)<sup>1-3</sup>. A fração celular, por sua vez, encontra-se suspensa no plasma e é constituída basicamente por glóbulos brancos, vermelhos e as plaquetas, dentre outros componentes. Adicionalmente, dentre alguns elementos essenciais ao organismo (como Na e K, por exemplo), o sangue pode conter pequenas quantidades de elementos terras raras (REE): Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Y e Yb.

No que se refere à presença de REE no sangue, estes elementos podem causar problemas ao organismo humano, mesmo quando presentes em baixas concentrações. Dentre esses problemas, pode-se citar alterações na função hepática, inibição de algumas enzimas (como a  $\text{Ca}^{+2}$  – ATPase, por exemplo), substituição de  $\text{Ca}^{+2}$  por  $\text{La}^{+2}$  em sistemas biológicos e danos aos cromossomos dos linfócitos sanguíneos<sup>4-7</sup>. Por isso, é importante o conhecimento da concentração de REE em amostras de sangue. No entanto, embora o sangue seja constituído majoritariamente por água (mais de 70%) e essa proporção varie pouco, outras características como, por exemplo, à presença de gordura, além de altos teores de sais de Na, Fe, K e Ca, dentre outros, o torna uma amostra bastante complexa. Devido à complexidade da matriz e das, normalmente, baixas concentrações dos REE no organismo (dependendo dos hábitos de cada indivíduo, atividade profissional ou região), torna-se desafiadora a determinação de REE neste tipo de amostra<sup>4,8,9</sup>.

As técnicas analíticas de detecção usualmente utilizadas para a determinação de REE em diversas amostras são a análise por ativação neutrônica (NAA)<sup>8</sup>, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)<sup>10,11</sup>, e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)<sup>12,13</sup>.

Em relação à determinação de REE, diversas interferências podem ocorrer, no caso da técnica de ICP-OES, devido à sobreposição das linhas de emissão, fazendo com que esta técnica, embora multielementar, não seja a mais adequada para a determinação de REE. A técnica de ICP-MS, por sua vez, torna-se a melhor opção, devido a sua capacidade multielementar, baixos limites de quantificação e

elevada sensibilidade. No entanto, utilizando a técnica de ICP-MS, interferências também podem ser observadas durante a determinação dos REE utilizando o sistema nebulização convencional (nebulizador concêntrico), principalmente quanto à formação de óxidos. Neste caso, são necessários nebulizadores com sistema de dessolvatação, com o objetivo de eliminar o solvente, minimizando estes efeitos. No entanto, independentemente do nebulizador utilizado, é necessário que a amostra seja convertida em uma solução adequada para a sua introdução no equipamento<sup>13,14</sup>.

De maneira geral, os métodos de preparo de amostras têm por finalidade converter a amostra em uma solução adequada às técnicas analíticas de determinação. Durante o desenvolvimento de um método de preparo de amostra, alguns aspectos precisam ser considerados como, por exemplo, a simplicidade, o uso de volume reduzido de reagentes concentrados (ou uso de soluções diluídas), a possibilidade de utilização de métodos que proporcionem maior frequência analítica e a minimização de interferências na técnica analítica selecionada, entre outros. Além disso, os métodos de preparo de amostras tornam-se mais atrativos com o uso de elevadas massas de amostra, o que facilita a determinação dos analitos em menores concentrações<sup>15</sup>.

Dentre os métodos de preparo de amostras mais utilizados para amostras biológicas e posterior determinação de REE, podem ser destacados os métodos de extração e pré-concentração<sup>16-19</sup>, métodos de digestão<sup>20,21</sup> e a decomposição por via seca em forno tipo mufla<sup>22</sup>. Nos métodos de extração, uma atenção especial deve ser dada às resinas e colunas trocadoras, de modo que essas sejam seletivas para o maior número possível de REE. Ainda, o uso de solventes orgânicos nos métodos de extração (como Triton X-100), tornam essas metodologias desvantajosas, principalmente no que se refere às interferências durante a etapa de determinação quando as técnicas de ICP-MS e ICP-OES são utilizadas. Desta forma, muitas vezes, é necessária uma etapa de *clean up* dos extratos<sup>17,19</sup>. De modo geral, é importante ressaltar que poucos são os trabalhos que abordam a influência da presença de Fe, Na e K (principais metais presentes em matrizes biológicas) durante a etapa de preparo da amostra e na etapa de determinação dos REE<sup>16,17</sup>.

Com respeito à análise direta de amostras, o uso de métodos analíticos que utilizam sistemas de ETV (acoplado as técnicas de ICP-OES e ICP-MS), é considerado como uma opção adequada para a determinação de REE em sangue,

visto que pequenas massas de amostra podem ser utilizadas e, mesmo assim, baixos limites de quantificação (LOQs) podem ser obtidos. Além disso, nos métodos que envolvem a amostragem direta de amostras, há um mínimo manuseio da amostra e os resultados são obtidos de maneira mais rápida, visto que não é necessário o tempo destinado à etapa de preparo de amostra<sup>23-25</sup>.

Tendo em vista a complexidade do sangue e a necessidade do desenvolvimento de protocolos analíticos adequados, o objetivo do presente estudo foi a investigação de métodos analíticos para a determinação de REE (com exceção de Sc e Pm) em sangue. Dessa forma, neste trabalho, os seguintes métodos analíticos foram investigados:

- i)* Vaporização eletrotérmica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS),
- ii)* Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS) e USN-ICP-MS,
- iii)* Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado (CWD-CS) e USN-ICP-MS,
- iv)* Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC) e USN-ICP-MS, e
- v)* Combustão iniciada por radiação micro-ondas (MIC) e USN-ICP-MS.

Adicionalmente, foi feita a avaliação de possíveis interferências na determinação de REE (exceto Sc e Pm) por USN-ICP-MS:

- i)* Efeito da concentração de C a partir do ácido cítrico e da frutose (25 a 5000 mg L<sup>-1</sup>),
- ii)* Efeito da concentração de C a partir de digeridos de fígado bovino (25 a 5000 mg L<sup>-1</sup>),
- iii)* Efeito da concentração de Ca, Fe, K, Mg e Na (25 a 1000 mg L<sup>-1</sup>),
- iv)* Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> – Efeito da concentração de Fe, Na e K (em solução de HNO<sub>3</sub> 5%),
- v)* Delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup> – Efeito da concentração de Na, K e C (em solução de HNO<sub>3</sub> 5%) e,
- vi)* Efeito da concentração de HNO<sub>3</sub>, HCl e água régia.

A exatidão dos métodos analíticos investigados foi avaliada através da comparação entre os resultados obtidos empregando o método da digestão por via

úmida assistida por micro-ondas (MAWD)<sup>26</sup> e, também, por meio de experimentos de recuperação através da adição de REE na amostra.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

*Neste capítulo será feita uma breve revisão da literatura na qual serão abordados os aspectos gerais sobre a determinação de REE, bem como a importância da determinação desses elementos em sangue. Posteriormente, serão descritos os principais métodos de preparo de amostras utilizados e, ao final, serão apresentadas as principais técnicas analíticas utilizadas para a determinação de REE.*

## 2.1 SANGUE: COMPOSIÇÃO E FUNCIONALIDADES

O sangue é formado por uma fração celular (sólida), a qual circula em suspensão no plasma sanguíneo (líquido). Essa fração celular corresponde à aproximadamente 45% da massa sanguínea total e engloba os glóbulos vermelhos (eritrócitos), as plaquetas (trombócitos) e os glóbulos brancos (leucócitos). O plasma sanguíneo, por sua vez, corresponde aos 55% restantes da massa sanguínea e é constituído, basicamente, por água (aproximadamente 92%), além de proteínas, nutrientes, sais minerais, hormônios, produtos metabólicos e gases ( $O_2$  e  $CO_2$ )<sup>1,2</sup>.

Cada constituinte do sangue desempenha funções importantes no organismo. Os glóbulos brancos, por exemplo, apresentam como principal função a defesa do organismo contra o ataque de agentes estranhos, sejam eles micróbios ou toxinas. No interior dos glóbulos vermelhos encontra-se a hemoglobina, a qual responsável pelo transporte do oxigênio dos pulmões para os tecidos e pela retirada do gás carbônico para ser eliminado pelos pulmões. Já as plaquetas, estão diretamente envolvidas no processo de coagulação sanguínea<sup>1,2</sup>. Dentre as proteínas presentes no sangue, as mais importantes correspondem ao fibrinogênio (essencial na formação dos coágulos), a albumina (a qual mantém os níveis de líquido nos vasos constantes) e as globulinas (as quais dão suporte para anticorpos, ajudando, portanto, no processo de defesa do organismo)<sup>3,27</sup>.

## 2.2 USO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA EXAMES LABORATORIAIS

De maneira geral, para verificar o estado de saúde de um paciente ou o diagnóstico de possíveis doenças, os laboratórios de análises clínicas utilizam diversas amostras biológicas, como sangue, urina, fezes, esperma ou fragmentos de pele, por exemplo. Dentre estas amostras, o sangue é uma das mais utilizadas, uma vez que, visto que os vasos sanguíneos estão conectados ao longo de todo o organismo, este tecido pode sinalizar de maneira precisa eventuais alterações nos organismos vivos. Dentre os tipos de exames de sangue, o hemograma é um dos mais solicitados pelos médicos e, geralmente, utiliza-se o sangue venoso para essa finalidade<sup>28-30</sup>.

Na coleta de sangue venoso a amostragem é feita por venopunção, com o auxílio de agulhas conectadas à seringas. Utilizando esta técnica de coleta, os

acessos ao sangue do organismo correspondem, geralmente, às veias cubital mediana, cefálica e basílica, as quais se localizam nos membros superiores (braços)<sup>31</sup>. Outra técnica utilizada para a coleta de sangue é a amostragem de sangue seco em papel (do inglês, *Dried Blood Spot*, DBS). Esse procedimento é considerado mais simples e requer um volume pequeno de sangue. Nesta técnica, o sangue é coletado utilizando dispositivos chamados de lancetas, e então, inserido em um papel filtro (específico para esse procedimento) para a secagem. Neste caso, diferentemente da venopunção, a coleta é normalmente feita na extremidade do dedo, lóbulo da orelha e/ou calcanhar, em um procedimento rápido e pouco invasivo<sup>32,33</sup>.

### 2.3 ELEMENTOS TERRAS RARAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Atualmente, é bem estabelecida a importância dos REE, principalmente para as áreas tecnológicas e geológicas. Os REE são usados para a produção de *lasers*, lentes, super ímãs, sensores, chips, cerâmicas e condutores, dentre outros componentes industriais. Adicionalmente, os REE podem fornecer importantes informações nos processos geológicos e ambientais. Ainda, os REE podem ser adicionados como suplementos alimentares para animais (coelhos, porcos, galinhas e patos, por exemplo), melhorando o crescimento dos mesmos<sup>34-38</sup>.

Além das aplicações supracitadas, os REE são bastante utilizados na medicina. O La, por exemplo, pode ser usado para a produção de fármacos com ação anticoagulante e antiemética (evitar vômitos). Ainda, o  $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$  pode ser utilizado em pacientes com insuficiência renal crônica que realizam hemodiálise, enquanto que sais de La ( $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$ ) e misturas com citrato de lantânio podem ser utilizados para o tratamento da osteoporose. No caso do Gd, complexos deste elemento podem ser utilizados como agente de contraste para exames de ressonância magnética<sup>39</sup>. Entretanto, muitas vezes, esses fármacos podem conter outros REE (Eu, Ho, La, Tm, Y, por exemplo) como contaminantes<sup>20,40-43</sup>.

Com relação à exposição do organismo humano, cabe ressaltar que a atuação profissional pode ser uma possível fonte de exposição aos REE. Alguns exemplos se referem aos profissionais de áreas de mineração, agricultura, profissionais da litografia (tipo de gravura que envolve a criação de desenhos sobre uma pedra calcária com um lápis gorduroso)<sup>44</sup>, dentre outras. Somando-se a isto,



em algumas regiões (predominantemente no continente africano) existe a prática da geofagia. Nesta prática, os indivíduos possuem o hábito de comer substâncias terrestres (como terra e argila) para a reposição de nutrientes e/ou limpeza do organismo. Dessa forma, embora seja um ato cultural, esse hábito pode ser uma possível fonte de exposição dos REE aos humanos<sup>6,8,41,45</sup>.

Embora não sejam bem conhecidos os efeitos prejudiciais dos REE aos sistemas biológicos, vários estudos nessa área foram desenvolvidos e muitos outros ainda precisam ser investigados<sup>4,7,21,39,46</sup>. No entanto, alguns destes estudos apontam efeitos negativos causados pelos REE ao organismo. Dentre esses, tem sido amplamente relatada a substituição de íons  $\text{Ca}^{+2}$  pelos íons  $\text{La}^{+3}$ , devido as suas similaridades de raios iônicos, em muitas proteínas (incluindo enzimas) e em membranas celulares<sup>4,5</sup>. Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  são essenciais para o movimento dos espermatozoides e essa substituição pode alterar a mobilidade destes, afetando os processos de fertilização<sup>21</sup>. Outros estudos apontam que o Gd, quando presente no fígado, pode inibir seletivamente as células Kuffer (capazes de eliminar substâncias estranhas presentes no sangue), além de diminuir a atividade do citocromo P450 (grupo de enzimas que atua no metabolismo de medicamentos na desativação de toxinas e pela síntese de hormônios esteróides e de ácidos graxos) nos hepatócitos<sup>6</sup>. Especialmente os íons  $\text{La}^{+3}$  e  $\text{Gd}^{+3}$ , podem bloquear vários canais para o transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  no organismo e os íons  $\text{Dy}^{+3}$  e  $\text{La}^{+3}$  podem bloquear o funcionamento da  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase e da  $\text{Mg}^{+2}$ -ATPase<sup>5,6,39,47</sup>. Além disso, os REE podem causar a pneumoconiose (doença pulmonar causada pela inalação de partículas inorgânicas), bem como afetar a memória e a taxa de aprendizado devido a supressão de alguns receptores membranosos<sup>6-8,48</sup>.

Com relação aos problemas supracitados, vários estudos tem correlacionado à presença de REE a possíveis doenças ou, simplesmente, têm demonstrado a importância deste assunto na área da medicina. De acordo com um desses estudos<sup>49</sup>, pacientes que utilizaram contrastes à base de Gd, apresentaram teores desse elemento de 1000 a 1700 vezes maior do que os teores normais em ossos e tecidos corticais (localizados no cérebro), mesmo oito anos após a utilização do fármaco. Outro estudo<sup>9</sup> mostrou que há uma probabilidade de pessoas com tumor cerebral apresentarem maior concentração de La, Ce, Gd e Lu no tecido cerebral afetado do que no tecido cerebral saudável. Isto foi vinculado ao possível aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causado pela presença de

REE no organismo. Dessa forma, pode ocorrer a alteração do funcionamento de enzimas, as quais estão associadas ao estresse oxidativo e do metabolismo lipídico, aumentando a formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas e o índice mitótico (medida do crescimento de células cancerígenas), bem como a indução da proliferação celular, entre outros efeitos.<sup>9,50,51</sup>

Considerando a diversidade das fontes de REE, a possibilidade de contaminação humana, bem como os graves problemas causados pelos REE no organismo, a Agência Européia para a Segurança e Saúde no Trabalho (European Agency for Safety and Health at Work - EU-OSHA) incluiu os REE como os “Riscos Novos e Emergentes para a Segurança e Saúde Ocupacional”<sup>52,53</sup>. Por isso, torna-se necessária a determinação destes elementos em amostras biológicas. Neste contexto, são requeridas metodologias analíticas rápidas, confiáveis, de baixo custo, com baixo consumo de reagentes e, principalmente, sem interferências durante a determinação desses elementos em baixas concentrações. Assim, considerando que o sangue é um tecido que está conectado ao longo de todo o organismo, esse tipo de amostra pode sinalizar de maneira precisa à presença de REE no organismo.

#### **2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE**

Previamente à determinação dos REEs utilizando as técnicas de USN-ICP-MS e ICP-MS (no modo de nebulização convencional), é necessária uma etapa de preparo da amostra para melhorar a compatibilidade à técnica de determinação. É importante enfatizar que essa etapa é considerada a mais crítica da sequência analítica, pois é onde costumam ocorrer muitos erros sistemáticos. Para a escolha de um método de preparo de amostra adequado deve-se levar em consideração alguns fatores, principalmente os que se referem à composição da matriz e os analitos a serem determinados. Adicionalmente, métodos que forneçam resultados exatos, que sejam simples, rápidos e, preferencialmente, que utilizem volume reduzido de reagentes ou soluções diluídas são requeridos<sup>15,54,55</sup>. Além disso, a possibilidade do uso de elevada massa de amostra torna o método adequado quando se requer a determinação dos elementos em baixas concentrações (na ordem de  $\mu\text{g}$  ou  $\text{ng g}^{-1}$ ).

No caso do sangue, embora este seja constituído majoritariamente por água (mais de 70%) e essa proporção varie pouco, outras características como, por exemplo, à presença de gordura, além de altos teores de Na, Fe, K e Ca, dentre outros, o torna uma amostra bastante complexa<sup>1,2,26</sup>. Dessa forma, há o interesse no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras que possibilitem o uso de elevada massa de amostra e, por consequência, diminuindo os limites de quantificação (LOQs), o que é importante em se tratando da determinação de REE em sistemas biológicos.

Dentre os métodos de preparo de amostras mais utilizados para amostras biológicas e posterior determinação de REE estão os métodos de extração e pré-concentração<sup>16-18</sup>, métodos de digestão<sup>20,21</sup> e métodos de combustão.<sup>56-58</sup>

#### **2.4.1 Métodos de extração**

Os métodos de que envolvem a extração são bem conhecidos. Basicamente, os métodos de extração consistem em remover os analitos de uma fase sólida ou líquida de maior volume para uma fase de menor volume ou, ainda, remover os componentes majoritários dos secundários<sup>55,59,60</sup>.

Especificamente para REE, os métodos de extração que possibilitam a pré-concentração são atrativos, visto que esses elementos geralmente se encontram em baixas concentrações em amostras biológicas. Dessa forma, os LOQs obtidos podem ser melhorados, dependendo do fator de pré-concentração de cada método<sup>61,62</sup>. Dentre os métodos de extração mais utilizados para a posterior determinação de REE, pode-se citar a extração líquido-líquido (LLE)<sup>63</sup>, extração em ponto nuvem (CPE)<sup>10,64</sup>, extração em fase sólida (SPE)<sup>17,65</sup>, troca iônica<sup>61</sup>, co-precipitação<sup>66</sup>, extração líquido-líquido dispersiva (DLLME)<sup>62,67</sup> e a extração assistida por ultrassom (UAE)<sup>34,68</sup>.

No entanto, algumas vezes os métodos de extração apresentam algumas desvantagens e, dessa forma, não são considerados adequados. Uma das maiores desvantagens ocorre devido ao uso de elevadas quantidades de reagentes orgânicos, como Triton X-114<sup>10</sup>, dodecan-1-ol,<sup>69</sup> ácido di(2-etil hexil) fosfórico<sup>12</sup> e 8-hidróxiquinolina<sup>10</sup>, por exemplo. A elevada carga orgânica na solução final é uma desvantagem principalmente no que se refere às interferências oriundas do carbono durante a etapa de determinação de alguns analitos, ainda mais quando técnicas

baseadas em plasma são utilizadas<sup>55</sup>. Nestes casos, muitas vezes é necessária uma etapa de clean up, tornando o método moroso<sup>17,19</sup>. Ainda, muitas vezes, dependendo da amostra e dos analitos, a extração pode não ser quantitativa, quando comparada, por exemplo, aos métodos de digestão<sup>55</sup>.

#### 2.4.2 Digestão por via úmida

A digestão por via úmida caracteriza-se pelo aquecimento das amostras na presença de ácidos minerais concentrados ou diluídos<sup>55</sup>. A matriz é oxidada e os analitos permanecem em solução, na forma de íons inorgânicos. Este é um dos métodos de preparo de amostras mais utilizados para a posterior determinação de metais (por ICP-OES e ICP-MS), incluindo os REE, em vários tipos de amostras (tanto as orgânicas, como as inorgânicas). O HNO<sub>3</sub> é o reagente oxidante mais frequentemente utilizado para a digestão de amostras orgânicas. No entanto, o HCl, HClO<sub>4</sub> e o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ou uma combinação deles) também podem ser utilizados. Em relação ao uso do HClO<sub>4</sub>, é importante ressaltar o seu alto poder oxidante, quando utilizado de forma concentrada e aquecida. Entretanto, devido ao risco de explosões, esse ácido tem sido atualmente evitado. Para o caso de amostras inorgânicas, misturas de HNO<sub>3</sub> e HF geralmente são utilizadas<sup>70-72</sup>.

Os métodos de digestão podem ser executados em sistemas abertos ou fechados e o aquecimento pode ser aplicado de modo condutivo ou por micro-ondas<sup>15,54,73</sup>. Embora sejam relativamente mais baratos e permitam maior frequência analítica (quando comparado aos sistemas fechados), os sistemas abertos possuem inúmeras desvantagens, como a possibilidade de perdas de analitos pela formação de espécies voláteis e a susceptibilidade à contaminação cruzada durante o procedimento. Ainda, a principal desvantagem relacionada aos sistemas abertos se refere à temperatura máxima alcançada durante a digestão, a qual é limitada pela temperatura de ebulição do ácido utilizado. Quando utilizado o HNO<sub>3</sub> concentrado, por exemplo, a temperatura aplicada se limita à cerca de 120 °C. Neste caso, uma digestão incompleta da amostra pode ser obtida prejudicando a recuperação quantitativa dos analitos. Dessa forma, a utilização de um maior volume de ácido pode ser necessário, o que implicaria principalmente no aumento dos valores dos brancos, obtenção de LOQs elevados e interferências durante a etapa de determinação dos analitos<sup>15,73,74</sup>.

Alternativamente, a digestão das amostras pode ser feita em sistemas fechados que, geralmente, apresentam melhores resultados quando comparados aos sistemas abertos. Nesses sistemas, os ácidos utilizados podem alcançar temperaturas maiores, o que melhora o seu efeito oxidante, aumentando a eficiência de digestão da amostra. Consequentemente, o volume do ácido (ou da mistura de ácidos), pode ser reduzido, o que acarreta na diminuição de valores de brancos diminuindo, por consequência, os LOQs. Adicionalmente, há a possibilidade do uso de soluções ácidas diluídas e, dependendo da amostra, o mesmo desempenho de digestão é obtido quando comparado ao uso de reagentes concentrados<sup>74</sup>. Outra vantagem do uso de sistemas fechados é a redução do tempo de preparo das amostras para análises de rotina. Ainda, o uso da radiação micro-ondas pode favorecer uma transferência de calor mais eficiente, onde o aquecimento é homogêneo e mais rápido, quando comparado ao aquecimento condutivo. Cabe salientar que o uso da radiação micro-ondas pode ser utilizado tanto em sistemas abertos, como em sistemas fechados<sup>15</sup>. No entanto, devido às vantagens supracitadas, o uso da radiação micro-ondas em sistemas fechados é comumente utilizada no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para uma variedade de amostras<sup>55,70,75</sup>.

#### 2.4.2.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação

Dependendo do sistema utilizado, a digestão em sistemas fechados com aquecimento por micro-ondas pode permitir temperaturas e pressões de até 280 °C e 80 bar, respectivamente<sup>70,76,77</sup>. No entanto, nestas condições, dificilmente a temperatura máxima aplicada é atingida, devido à limitação da pressão do sistema (dependendo da massa e do tipo de amostra). Por isso, muitas vezes, mesmo empregando sistemas fechados sob pressão, são obtidos digeridos incompletos e, consequentemente, com elevado teor de carbono em solução. Ainda, nestas condições, a massa de amostra a ser digerida torna-se limitada<sup>15,78</sup>.

Alternativamente, para contornar estes problemas, nos últimos anos, foram desenvolvidos sistemas de digestão mais robustos, os quais permitem o uso de temperaturas operacionais superiores aos fornos de micro-ondas até então existentes. Os principais fornos de micro-ondas desenvolvidos foram os sistemas

UltraWave<sup>®79</sup> e o Multiwave 7000<sup>®80</sup>. Estes sistemas permitem o uso de temperaturas e pressões operacionais de, aproximadamente, 270 °C e 160 bar, respectivamente. O princípio de funcionamento de ambos os equipamentos é semelhante. Em ambos os sistemas há uma câmara de reação, onde um rotor contendo os frascos com a amostra é alocado e, então, a cavidade é pressurizada com um gás inerte (geralmente com Ar ou N<sub>2</sub>). A principal vantagem destes sistemas é a possibilidade da aplicação de maiores temperaturas e o controle da pressão, permitindo assim, a digestão eficiente de elevadas massas de amostras para a determinação elementar em concentrações mais baixas.

### 2.4.3 Métodos de combustão

As reações de combustão baseiam-se na digestão da matéria orgânica na presença de oxigênio em temperaturas elevadas (aproximadamente 1200 °C). Após a combustão, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O são obtidos como principais produtos da reação e os analitos são retidos em uma solução absorvedora adequada. Cabe salientar que durante a combustão pode ocorrer a formação de outros gases, como NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub>. No entanto, a formação destes produtos vai depender da composição da matriz<sup>15,55</sup>.

Os métodos de combustão podem ser executados em sistemas abertos (decomposição por via seca) ou em sistemas fechados (frasco de Schöniger, bomba de combustão e MIC) e, geralmente, fornecem digeridos com baixo teor de C em solução, o que os torna ideais para a determinação por diversas técnicas analíticas<sup>55,81</sup>. De maneira geral, a combustão em sistemas abertos pode ser considerada um dos métodos mais simples. Neste caso a amostra é oxidada utilizando oxigênio do ar atmosférico em fornos do tipo mufla. No entanto, o uso desse método de combustão pode ocasionar em perdas de analitos por volatilização (em alguns casos específicos), contaminação cruzada, baixa frequência analítica e projeção da amostra (como no caso de amostras que possuem altas concentrações de gorduras, por exemplo)<sup>36,82-86</sup>.

Em relação ao uso de sistemas fechados, o método da MIC é amplamente utilizado e é caracterizado pela sua versatilidade. Nos últimos anos, esse método tem sido aplicado para a digestão de uma infinidade de matrizes (tanto orgânicas, como inorgânicas) para a posterior determinação elementar (metais, halogênios, semimetais) por diferentes técnicas analíticas<sup>13,81,87</sup>. De forma geral, no

procedimento da MIC, as amostras sólidas são prensadas na forma de comprimidos e posicionadas na base de um suporte de quartzo, contendo um disco de papel filtro umedecido com uma solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  que é utilizada como iniciadora de combustão. É importante mencionar que, no caso de amostras viscosas ou líquidas, vários estudos foram desenvolvidos para o suporte da amostra (bolsas de polietileno, lã de quartzo, absorção em papel, entre outros) e foram considerados adequados para o objetivo proposto. O suporte contendo a amostra é introduzido em um frasco de quartzo, o qual contém uma solução absorvedora adequada (ácida ou básica, dependendo do analito e da técnica analítica a ser utilizada). O frasco é fechado, posicionado em um rotor e pressurizado com oxigênio. A radiação micro-ondas é aplicada e a amostra entra, rapidamente, em combustão. O sistema da MIC permite a aplicação de uma etapa de refluxo após a digestão da amostra, onde ocorre uma lavagem mais eficiente das paredes do frasco e do suporte da amostra, permitindo a absorção quantitativa dos analitos na solução para a posterior determinação.

## **2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE**

De maneira geral, é importante ressaltar que já existem metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de REE em diversas amostras biológicas. Na Tabela 1 estão descritas, de maneira resumida, as principais metodologias aplicadas para amostras biológicas e posterior determinação de REE. É importante salientar que esta tabela também aborda métodos utilizando sistemas de ETV. No entanto, esse tópico será abordado especificamente no item 2.4.3 (*Revisão Bibliográfica*).

Tabela 1 - Métodos analíticos comumente empregadas para a determinação de REE em amostras biológicas.

Método	Amostra	Procedimento	Determinação	Referência
UAE	Tecido biológico marinho	0,1 g de tecido biológico marinho foi pesado em frascos de polipropileno e, posteriormente, 5 mL de uma mistura de HNO <sub>3</sub> 3% + HCl 2% (v/v) foram adicionados à amostra. A mistura foi submetida ao ultrassom utilizando uma sonda de 20 kHz (50 W) por 3 min e com amplitude de 50%. Após a extração, as fases líquida e sólida foram separadas mediante centrifugação (10 min a 4000 rpm). O líquido foi coletado, filtrado e submetido à um processo de clean up utilizando um cartucho de C18 para posterior determinação dos analitos.	ICP-MS	19
μ-SPE	Água (CRM de Cabelo humano - usado para validação do método)	0,1 g das amostras foi pesado em frascos de PTFE e, posteriormente, foram adicionados 4 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%. A mistura permaneceu em repouso por 12 horas e, então, a digestão foi feita por MAWD (15 min a 180 °C com rampa de 10 min). Após, os frascos foram abertos e aquecidos em uma chapa de aquecimento (200 °C) até a evaporação da solução digestora. Os resíduos foram solubilizados em HNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Após, foi feita a síntese de um nano material (nanopartículas magnéticas de ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - ZFONTs) usado como adsorvente. 10 g desse adsorvente foram adicionados a um frasco contendo 30 mL das soluções previamente digeridas em pH 8. Posteriormente, a mistura foi dispersa em um banho de ultrassom por 1,5 min e deixada em repouso para a separação de fases. Após os REE foram desorvidos com 1 mL de HNO <sub>3</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> para a posterior determinação dos analitos.	ICP-MS	16
CWD-CS	Osso de costela humano (pós-morte)	0,05 a 0,1 g de osso humano foram pesados diretamente nos frascos e, posteriormente foi adicionada uma mistura contendo 1,5 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 0,3 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (PA) foi adicionada à amostra. A digestão foi feita em um sistema de autoclave (aquecimento por 3 h a 160-200 °C). Após a digestão e resfriamento dos frascos, as amostras foram transferidas para frascos volumétricos e diluídas a 20 mL com água.	ICP-MS	20
CWD	Sêmen humano	1 a 1,5 mL de sêmen foram transferidos para frascos de digestão e aquecidos em um bloco de aquecimento (105 °C por 1 h e, após, 450 °C por 14 h). Após o resfriamento, foi feita a adição de 3 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado. As amostras foram aquecidas novamente por 1 h a 100 °C e, após, 150 °C por 1 h. Foi feita a adição de 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% e, as amostras foram novamente aquecidas a 100 °C por 1 h. Após o resfriamento, foram adicionados 6 mL de água para a posterior análise.	ICP-MS	21



Continuação da tabela 1

Método	Amostra	Procedimento	Determinação	Referência
CWD e Pré-concentração	Soro de sangue humano	<p>Digestão: 8 mL de sangue foram colocados em béqueres de PTFE juntamente com 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Os frascos foram colocados em uma chapa de aquecimento e aquecidos a 110 °C até a evaporação de todo o ácido. Após, foi feita a adição de 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e a mistura resultante foi aquecida a 150 °C por 2 h. A terceira etapa da digestão foi feita com a adição de 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 1 mL de HClO<sub>4</sub> 60% e a mistura foi submetida a 150 °C por 4 h. Finalmente, 0,76 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 1 mL de água foram adicionados ao resíduo remanescente e, então, novamente aquecido a 110 °C por 1 h. Após o resfriamento, a solução resultante foi diluída a 100 mL com água.</p> <p>Pré-concentração: 100 mL da solução digerida foram diluídos a 300 mL com água. Após, o pH foi ajustado para 6 usando ácido acético e amônia (ambos concentrados). Após, 0,5 g de uma resina (Chelex 100 resin) foram adicionados na solução diluída e essa mistura foi agitada por 3 h a 80 °C. Após, a resina foi filtrada em um funil de vidro e lavada com 10 mL de uma solução de acetato de amônio 1 mol L<sup>-1</sup> e com 2 mL de água para remover Ca e Mg adsorvidos na resina. Os REE adsorvidos na resina foram eluídos com uma solução de HNO<sub>3</sub> 2 mol L<sup>-1</sup>. Então, a solução foi evaporada até a secagem e o resíduo foi dissolvido em 2 mL de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> para posterior determinação dos analitos.</p>	ICP-MS	18
MAWD	Cabelo humano	<p>0,1 g de cabelo foram pesados em frascos de PTFE e 3 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PA) foram adicionados à amostra. Após 5 min (etapa de pré-reação), os frascos foram fechados e submetidos ao aquecimento para a digestão (15 min a 180 °C, com rampa de 10 min). Após o resfriamento, a solução obtida foi transferida para um béquer de PTFE e, então, aquecida à 200 °C em uma chapa de aquecimento até a secagem. Posteriormente, o resíduo foi solubilizado com de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O pH da solução contendo os analitos foi ajustado à 8 usando HNO<sub>3</sub> diluído ou uma solução de NH<sub>4</sub>OH. Então, 10 mL da solução resultante foram transferidos para um frasco de polipropileno e foi feita a adição de 20 µL de 1-(2-pyridylazo)- 2-naphthol (PAN) em 1-dodecanol. Posteriormente, a mistura foi submetida a agitação. Após, o frasco contendo a solução foi transferida para um banho de gelo até a solidificação do solvente orgânico. O solvente orgânico foi transferido para um frasco cônico e deixado a temperatura ambiente para fusão. O extrato foi diluído para 100 µL com tetra hidrofuram (THF). Finalmente, 10 µL do extrato foram injetados em um tubo de grafite para análise. As temperaturas de pirólise e vaporização foram de 220 °C e 1300 °C, respectivamente.</p>	ETV-ICP-MS	69

Continuação da tabela 1

Método	Amostra	Procedimento	Determinação	Referência
CPE	Fígado suíno, cogumelos e folhas de chá	1 g de amostra foi dissolvida em 3 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado sob aquecimento a 100 °C. Após, foram adicionadas 10 gotas de HClO <sub>4</sub> e a mistura, foi aquecida até a secura. O resíduo remanescente foi solubilizado em HNO <sub>3</sub> 1,5 mol L <sup>-1</sup> e transferido para frascos volumétricos de 25 mL, onde o pH foi ajustado à 6 com HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> (ou pH 10 com NH <sub>4</sub> OH). Posteriormente, a solução contendo os REE foi adicionada a uma solução de Triton X-114 com 8-hidróxiquinolina 0.5 mmol L <sup>-1</sup> (utilizado como agente quelante) em um frasco de polipropileno. O pH da mistura foi ajustado à 6 com HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> ou até pH 10 com NH <sub>4</sub> OH. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (1,6 mL min <sup>-1</sup> ), a solução passou através de uma coluna preenchida com 24 mg de sílica gel. Após, a solução foi eluída para o equipamento de ICP-OES.	FIA-ICP-OES	88
MAWD	Plasma sanguíneo e CRMs de materiais biológicos	0,15 g de amostras foi pesada diretamente em frascos de quartzo e foi feita a adição de 2 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%. A mistura foi submetida a irradiação micro-ondas por 7 min (20 a 70% da potência máxima - 800 W). Após, as soluções obtidas foram evaporadas até a secura e 3 mL de HNO <sub>3</sub> 0,14 mol L <sup>-1</sup> foram adicionados. 20 µL dos digeridos foram utilizados para análise. As temperaturas de pirólise e vaporização foram de 1400 °C e 2700 °C, respectivamente.	ETV-ICP-MS	25
DA	Urina	40 µL de amostras foram colocados diretamente na plataforma de grafite. Foi usado Freon-23 (140 mL min <sup>-1</sup> ) como modificador químico. As temperaturas de pirólise e vaporização foram de 1400 °C e 2700 °C, respectivamente.	ETV-ICP-MS	89
-	Sangue	7,5 mL de sangue foram transferidos para um tubo de coleta de sangue contendo citrato de sódio (anticoagulante para separar o plasma da fração celular) e submetido à centrifugação. O plasma foi transferido para frascos de 10 mL contendo 1 mL de NDGRA 1x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (complexante sintetizado), seguido da adição de 4 mL de uma solução tampão de borato (pH 8). Após, foi adicionado 1 mL de brometo de cetilpiridínio (surfactante) e a determinação de Sm foi feita usando comprimento de onda de 475 nm.	Espectrofotometria	90
CWD e Pré-concentração	Soro de sangue humano (CRM)	0,8 g de soro de sangue foram transferidos para um béquer de PTFE e 12 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado foram adicionados à amostra. A mistura foi aquecida por 12 horas em uma chapa de aquecimento. Após, foram adicionados mais 6 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e o sistema foi aquecido por 8 h à 220 °C. Posteriormente a	ICP-MS	91

solução foi aquecida a 250 °C até a secura e o resíduo remanescente foi dissolvido com 0,76 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e depois filtrado. Finalmente, a solução foi diluída até 100 mL com água, transferida para um béquer de vidro e diluída 2 vezes com água. A etapa de pré-concentração foi feita através da adição de 0,5 g de uma resina quelante (Chelex<sup>®</sup> 100; 100-200 mesh) à solução previamente diluída. O pH da solução foi ajustado à 6 com CH<sub>3</sub>COOH ou com NH<sub>4</sub>OH. A solução foi agitada por 2 h e filtrada em um funil de vidro com 20 mL de uma solução de acetato de amônio 1 mol L<sup>-1</sup>. A etapa de dessorção dos analitos da resina foi feita com 10 mL de HNO<sub>3</sub> 2 mol L<sup>-1</sup>.

MAWD e CME	Cabelo humano	0,4 g de cabelo foi pesado e transferido para frascos de PTFE e foi feita a adição de 6 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%. A mistura foi deixada em repouso por 1 h. Após, os frascos foram fechados e digeridos por MAWD (3 atm por 1 min; 8 atm por 2 min e 10 atm por 3 min). Posteriormente, o digerido foi aquecido até a completa secura em uma chapa de aquecimento. O resíduo remanescente foi dissolvido com 5 mL de água, transferido para frascos volumétricos de 10 mL e o pH foi ajustado a 3 com auxílio de tampões comerciais. Após foi feito o procedimento da CME com 2 mL da solução em uma coluna capilar preenchida com CR-SWCNTs (nanotubos de carbono de parede única modificados com vermelho de congo). Para a eluição da solução previamente digerida, foi utilizada uma solução tampão de ácido clorídrico-glicina (pH 3) usando uma bomba peristáltica numa vazão de 0,15 mL min <sup>-1</sup> . A eluição dos analitos retidos na coluna foi feita com 40 µL de HNO <sub>3</sub> 0,8 mol L <sup>-1</sup> utilizado uma vazão de 0,10 mL min <sup>-1</sup> . Posteriormente, a solução eluída foi misturada com 5 µL de uma emulsão de PTFE 60% (m/v) e diluída até 50 µL com água. Para a etapa de determinação, 25 µL foram transferidos para a plataforma de grafite, a qual foi introduzida no forno de grafite. Após a etapa de secagem, o programa de aquecimento foi interrompido e, mais 25 µL foram adicionados e o programa de aquecimento foi iniciado novamente. As temperaturas de pirólise e vaporização foram de 1200 e 2600 °C, respectivamente.	ETV-ICP-OES	92
DA	Urina	Foram preparadas soluções padrões para a calibração do equipamento na faixa de 0,001 a 1000 µg L <sup>-1</sup> (adicionados em uma amostra de urina diluída 20 vezes em HNO <sub>3</sub> 2%).	ICP-MS	47
Via seca	Cabelo e farinha de trigo	0,5 g de amostra foram pesados em frascos de vidro e aquecidos em uma chapa de aquecimento até a formação de um sólido carbonizado. Posteriormente, o resíduo foi submetido à 500 °C por 3 h em uma mufla. As cinzas remanescentes foram umedecidas com 0,5 mL de água e, então, 1 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e		22

		0,5 mL de HClO <sub>4</sub> foram adicionados. A mistura foi aquecida até a secura (200 °C) em uma chapa de aquecimento. O resíduo remanescente foi solubilizado com 0,5 mL de HNO <sub>3</sub> e a mistura foi novamente aquecida até a solução tornar-se límpida. A solução final foi transferida para frascos volumétricos e avolumadas a 10 mL com água.		
DA	CRMs de amostras biológicas	0,2 g das amostras foi pesada diretamente no interior de tubos de quartzo, que foram posicionados diretamente em um forno com aquecimento por lâmpada infravermelho (380 nm). A amostra foi carbonizada sob atmosfera de ozônio a 250 °C (50 mL min <sup>-1</sup> durante 10 min) e oxidada à 600 °C (utilizando um fluxo de oxigênio de 600 mL min <sup>-1</sup> por 20 min. Após o resfriamento, todos os frascos foram colocados no em um banho de ultrassom (40 kHz e 180 W). Após, foram adicionados 25mL de HNO <sub>3</sub> 10% para solubilização das cinzas e posterior determinação dos analitos.	ICP-OES e ICP-MS	93
UAE	Água e urina	O pH de 10 mL de amostra foi ajustado a 5.5 com uma solução tampão de ácido acético 0,015 mol L <sup>-1</sup> e acetato de sódio trihidratado 0,085 mol L <sup>-1</sup> em um frasco com fundo cônico. Posteriormente, 180 µL de uma solução contendo 1 x 10 <sup>4</sup> mg L <sup>-1</sup> de 5,6,14,15-dibenzo-1,4-dioxa-8,12-diazaciclopentadecano (agente quelante) foi adicionado à amostra e a mistura foi agitada manualmente por 1 min. Após, 30 µL de tetraclore etileno (solução extratora)foi adicionada à mistura e agitado manualmente por mais 10 s. A mistura foi colocada em um banho de ultrassom (por 5 min) e, posteriormente, a fase aquosa foi evaporada a 80 °C. Finalmente, a fase sedimentada foi solubilizada com 1 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> para a determinação dos analitos.	ICP-OES	68
MAWD	Diversas amostras biológicas	28 a 391 mg de amostra foram digeridas usando 0,8 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado e 0,2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . A digestão foi feita por MAWD (150 W por 10 min e resfriamento por 2 min e 300 W por 10 min e resfriamento por 30 min). A solução final foi transferida para frascos de polietileno avolumada à 10 mL com água para a posterior determinação dos analitos.	ICP-MS	94
MAWD e CME	Soro de sangue humano e urina	1 mL de amostra foi digerido com 2,5 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado em frascos de PTFE para a posterior digestão por MAWD (150 °C por 5 min, 180 °C por 5 min e 200 °C por 8 min). Após o resfriamento, os frascos foram colocados em uma chapa de aquecimento à 200 °C até a secura. Após, foi adicionado 1 mL de HClO <sub>4</sub> e, novamente, a amostra foi aquecida até a secura. O resíduo remanescente foi dissolvido em água e o pH ajustado à 7 com NaOH. Posteriormente, foi feito o procedimento de micro-extração capilar utilizando um polímero sintetizado. Os	ICP-MS	95

		analitos foram eluídos com 50 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ 1 mol $\text{L}^{-1}$ para a posterior determinação dos analitos.		
MAWD	Sangue e tecido de tumor	100 mg de amostra foram pesadas diretamente em frascos de quartzo e foi feita a adição de 800 $\mu\text{L}$ de água e 200 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ concentrado para a posterior digestão por MAWD (100 $^\circ\text{C}$ por 5 min, 150 $^\circ\text{C}$ por 5 min e 200 $^\circ\text{C}$ por 15 min). Após o resfriamento, o digerido obtido foi transferido para frascos de polipropileno e diluído até 2 mL com água para a posterior determinação dos analitos.	ICP-MS	9
CWD	Leite materno e sangue	Leite: 1 mL de amostra foi adicionado em frascos de quartzo juntamente com 1 mL de $\text{HNO}_3$ concentrado. Posteriormente, os frascos foram aquecidos a 170 $^\circ\text{C}$ por 10 h e a solução resultante foi diluída com água até 10 mL. Posteriormente, foi feita adição de 20 mL de uma solução de $^{193}\text{Ir}^+$ (concentração final de 1 mg $\text{L}^{-1}$ ). Sangue: 500 $\mu\text{L}$ de sangue foram diluídos 10 vezes com água e, posteriormente, foi feita adição de 20 mL de uma solução de $^{193}\text{Ir}^+$ (concentração final de 1 mg $\text{L}^{-1}$ ).	ICP-MS	96
DA	Urina	Foi feita amostragem direta das amostras. Não há informações se foi feito ajuste de matriz.	ICP-MS	45

**UAE:** Extração assistida por ultrassom;  **$\mu$ -SPE:** Micro extração em fase sólida; **CWD-CS:** Digestão por via úmida em sistema fechado com aquecimento convencional; **MAWD:** Digestão por via úmida assistida por micro-ondas; **CPE:** Extração por ponto nuvem; **CME:** Micro extração capilar; **DA:** amostragem direta; **ICP-OES:** Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; **ICP-MS:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; **ETV-ICP-MS:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica; **NDGRA:** Reagente orgânico complexante sintetizado.

No decorrer da apresentação dos métodos analíticos desenvolvidos para a posterior determinação de REE em amostras biológicas (Tabela 1), pode ser observado que muitos deles são extremamente morosos, complexos, não são ambientalmente amigáveis (pois utilizam grandes volumes de reagentes e, muitas vezes, reagentes tóxicos), tornando-os inadequados para a análise de rotina. Ainda, com respeito ao uso de solventes orgânicos, poucos são os métodos que abordam a questão de interferências, principalmente quando técnicas baseadas em plasma são usadas para a determinação dos analitos. É importante ressaltar que alguns dos efeitos de matriz são bem conhecidos, principalmente aqueles referentes à presença de elevadas concentrações de C no plasma, por exemplo, podendo causar interferências durante a etapa de determinação<sup>97</sup>. Além disso, muitas vezes, o uso de nebulizadores com sistema de dessolvatação não são utilizados para evitar/minimizar interferências poliatômicas (formação de óxidos) durante a determinação dos REE por ICP-MS.

Outro ponto observado é que, muitas vezes, alguns dos métodos apresentados não englobam todos os REE, o que os torna bastante limitados<sup>98-100</sup>. Dessa forma, o desenvolvimento de novos protocolos analíticos, com características mais abrangentes, simples, e que levem em conta os possíveis efeitos de matriz, tornam-se importantes para a posterior determinação de REE em amostras de sangue.

## **2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE**

Como já mencionado, informações sobre a concentração dos REE no sangue são importantes devido aos efeitos que esses elementos podem causar no organismo<sup>6,45</sup>. No entanto, existe uma grande dificuldade para isso, principalmente no que se refere às baixas concentrações desses elementos nesse tipo de amostra ( $\text{ng g}^{-1}$ ) aliada à presença de interferências durante a etapa de determinação desses analitos. Dessa forma, a determinação quantitativa dos REE em sangue (e em outras amostras biológicas) pode ser considerado um desafio analítico a ser contornado<sup>5,101-103</sup>.

Assim, técnicas analíticas com elevada sensibilidade e com baixos LOQs são de extrema importância. As técnicas analíticas de detecção usualmente utilizadas para a determinação de REE são a análise por ativação neutrônica (NAA)<sup>8,50</sup>, a

espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)<sup>10,11</sup>, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)<sup>12,13</sup>, o uso de sistemas de vaporização eletrotérmica acoplado as técnicas de ICP-OES e ICP-MS (ETV-ICP-OES ou ETV-ICP-MS, respectivamente)<sup>23-25</sup> e a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC)<sup>39</sup>. A seguir, serão descritas as principais técnicas utilizadas para a determinação de REE em diversas amostras.

### **2.6.1 Análise por ativação neutrônica**

A NAA é uma técnica de determinação elementar baseada em uma reação nuclear entre nêutrons (provenientes de uma fonte emissora) e os átomos dos elementos presentes na amostra. Como resultado, é possível obter um espectro de emissão de radiação gama dos radioisótopos formados, sendo possível a identificação dos elementos presentes na amostra e a sua quantificação em função da taxa de emissão da radiação gama de cada radioisótopo. Esta técnica fornece informações quantitativas para vários elementos, incluindo REE, metais e halogênios (com exceção do F)<sup>50,104,105</sup>.

A NAA é considerada uma técnica absoluta, não destrutiva e requer o mínimo pré-tratamento da amostra, especialmente para sólidos. Entretanto, a NAA não é um técnica comum a muitos laboratórios, pois requer o uso de um reator nuclear o que exige profissionais altamente qualificados para a função<sup>104,105</sup>.

### **2.6.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**

As técnicas de ICP-MS e ICP-OES são frequentemente utilizadas para a determinação de metais (incluindo os REE) e halogênios devido a sua capacidade multielementar, ampla faixa linear e baixos LOQs, em uma infinidade de matrizes<sup>10,13,84,106</sup>.

De uma maneira geral, a etapa de determinação elementar utilizando as técnicas baseadas em plasma deve ser feita de maneira cuidadosa, principalmente, no que se refere à presença de interferências. Especificamente para os REE, estes apresentam uma séria de interferências espectrais e não espectrais. Dentre estas interferências, podem-se citar: 1) efeito da concentração de ácido utilizada na etapa de preparo, principalmente quando métodos de digestão e dissolução das amostras

são utilizados. A elevada concentração de ácido pode alterar a densidade, a viscosidade e a tensão superficial das soluções quando comparadas com as soluções de referência, as quais são utilizadas para a calibração do equipamento. Além disso, o efeito do ácido pode afetar diretamente a distribuição dos íons na região central (zona analítica) do plasma<sup>101,107-109</sup> *ii*) interferências poliatômicas devido a formação de óxidos e presença de Ba (para a técnica de ICP-MS)<sup>102,110</sup>, *iii*) sobreposição de algumas linhas de emissão (neste caso para a técnica de ICP-OES)<sup>111,112</sup> e *iv*) efeito do carbono na etapa de determinação dos REE. Geralmente o C residual é proveniente de digestão incompletada matriz, a partir da dissolução da amostra em meio ácido ou devido ao uso de solventes orgânicos (principalmente nos métodos de extração). Neste caso, elevadas concentrações de C podem resultar em supressão ou aumento da intensidade do sinal analítico dos analitos<sup>97,113</sup>.

Levando em conta os problemas citados anteriormente, é de grande importância que os métodos de preparo de amostras utilizados sejam adequados para a posterior determinação de REE por ICP-OES e ICP-MS. No caso de amostras biológicas, como o sangue, a redução da matriz orgânica, a diminuição do uso de elevadas quantidades de solventes/reagentes concentrados e a redução ou eliminação do uso de solventes orgânicos podem ser alternativas adequadas para contornar as interferências supracitadas. Adicionalmente, a possibilidade do uso de soluções ácidas diluídas (para a digestão ou extração dos analitos) também torna-se vantajosa para a etapa de determinação de REE pelas técnicas baseadas em plasma<sup>36,73,81,106</sup>. Algumas alternativas instrumentais também podem ser utilizadas para diminuir e/ou contornar algumas dessas interferências, como o uso de micronebulizadores<sup>94</sup>, nebulizadores com sistema de dessolvatação<sup>13,36</sup>, equações matemáticas<sup>114</sup> e determinação dos analitos em espectrômetros de alta resolução<sup>115</sup>, por exemplo.

#### 2.6.2.1 Sistemas de nebulização

A etapa de nebulização deve ser analisada com cautela quando se utilizam as técnicas de ICP-MS e ICP-OES. Dentre os nebulizadores pneumáticos mais utilizados, podem-se citar os nebulizadores concêntrico (ICP-MS e ICP-OES), GenCone<sup>®</sup> (ICP-OES) e *Cross flow* (ICP-OES). O principal objetivo desses sistemas é a formação de um aerossol (a partir da amostra líquida), bem como auxiliar o seu



transporte até o plasma. Os sistemas de nebulização pneumáticos convencionais possuem baixa eficiência de transporte, (aproximadamente 10%), e o restante é descartado com auxílio de câmeras de nebulização<sup>94,101,103</sup>.

O uso de nebulizadores com sistema de dessolvatação, como o APEX - Q (*Elemental Scientific Inc.*) e o nebulizador ultrassônico apresentam diversas vantagens quando comparados aos nebulizadores pneumáticos. De maneira geral, esses sistemas permitem a redução de solventes que chegam até o plasma. Dentre estes, o nebulizador ultrassônico é o mais utilizado. Quando o nebulizador ultrassônico é usado para a determinação elementar, a amostra é bombeada através de um capilar até a superfície de um cristal piezoelétrico (0,2 a 10 MHz). Dessa forma, o aerossol é gerado através da propagação da onda ultrassônica que atinge a superfície do líquido, quebrando-o em gotículas muito pequenas<sup>116</sup>. Usando esse sistema, a sensibilidade dos analitos aumenta significativamente, uma vez que a quantidade de amostra introduzida no plasma também aumenta (aproximadamente 20 vezes). Dessa forma, há uma redução significativa dos LOQs da técnica. Especificamente para REE, esses sistemas são utilizados com maior frequência, visto que eliminam o solvente e, conseqüentemente, ajudam a evitar a formação de óxidos, sendo que inúmeros estudos já foram desenvolvidos.<sup>13,94,103</sup>

### **2.6.3 Vaporização eletrotérmica e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ou espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica**

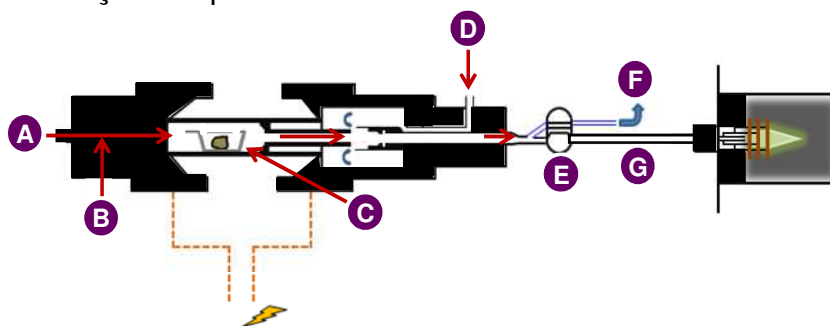
Os sistemas de ETV foram desenvolvidos a partir da fonte do atomizador utilizado na espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e ganhou interesse da comunidade de espectroscopia atômica devido às suas características satisfatórias em comparação aos sistemas convencionais de nebulização. Esses sistemas possuem como função converter os analitos para a fase vapor através da aplicação de um programa de aquecimento. Posteriormente, utiliza-se um fluxo de argônio para o transporte desses vapores para o equipamento de ICP-OES ou ICP-MS<sup>117-119</sup>.

O uso de sistemas de ETV geralmente não necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostras, evitando o uso de ácidos ou misturas de ácidos. Além disso, esses sistemas requerem mínima quantidade de amostra (fator de extrema importância para amostras biológicas, como o sangue). Na maioria das vezes, o uso

desses sistemas permite a remoção total da matriz, minimizando a formação de óxidos e hidróxidos dos elementos (especificamente para ICP-MS), o que ajuda a evitar interferências na etapa de determinação dos analitos. Dessa forma torna-se atrativo o uso dessas técnicas para análises de rotina<sup>14,101,120</sup>.

Os sistemas de ETV recentes consistem em um forno de grafite recoberto internamente com grafite pirolítico com aquecimento longitudinal, onde é inserida uma plataforma (também de grafite pirolítico) contendo a amostra. A grande vantagem do uso de grafite pirolítico é a elevada resistência térmica (2600-2700 °C) e química desses materiais. O forno é aquecido utilizando um programa de aquecimento, que geralmente consiste em uma etapa de secagem, pirólise, vaporização e limpeza. No entanto, há casos em que não são necessárias as quatro etapas ou, uma etapa é usada mais do que uma vez<sup>121-123</sup>. O controle de temperatura é feito por um pirômetro óptico, posicionado na parte interna da porta do forno de grafite. O vapor gerado dentro do forno de grafite (contendo os analitos) é direcionado para fora através de um fluxo de argônio, denominado de gás carreador e, por meio de um tubo de transferência de politetrafluoretileno (PTFE), chega até o plasma. Um gás auxiliar, denominado gás de *bypass*, também é utilizado, para evitar a possível condensação de vapores nas partes mais frias do forno<sup>14,118,124</sup>. O direcionamento dos vapores gerados no interior do forno de ETV para o plasma (etapa de vaporização) ou para a exaustão (etapa de pirólise e limpeza) é feito por meio de uma válvula de três vias que está posicionada na saída do forno<sup>23,121</sup>. Na Figura 1 está mostrada a representação de um sistema de ETV.

Figura 1 - Representação do sistema de ETV: A) Entrada do forno, B) entrada de Ar (carreador), C) forno de grafite contendo a plataforma e amostra, D) entrada de Ar *bypass*, E) válvula de três vias, F) saída para a exaustão e G) tubulação de transferência para o equipamento de ICP-MS. Representação adaptada<sup>120</sup>.



Muitas vezes, durante o desenvolvimento de métodos analíticos usando a técnica de ETV, é necessário aumentar a estabilidade térmica do analito. Com isso, a eliminação dos componentes mais voláteis da matriz é permitida, melhorando a separação do analito/matriz, bem como a redução de perdas do analito durante a etapa de pirólise, em elevadas temperaturas. Para isso, são utilizados modificadores químicos (como, Pd, Ir, Rh, ou até mesmo a combinação deles)<sup>87,125,126</sup>.

Especificamente para REE, durante o aquecimento, ocorre a formação de seus respectivos óxidos. Ainda, em temperaturas maiores do que 1600 °C, esses óxidos sofrem carbonização levando a formação de carbetos altamente estáveis e que não se decompõem durante o aquecimento. Dessa forma, do ponto de vista termodinâmico, os REE são vaporizados na forma de átomos gasosos de maneira incompleta. No entanto, na presença de modificadores químicos halogenados, a situação é contrária. Os REE são facilmente vaporizados (eficiência maior do que 98%) em temperaturas relativamente baixas (1500 - 2200 ° C)<sup>23,101,125</sup>.

Dentre os compostos halogenados mais utilizados pode-se citar o PTFE, NaCl, HCl, NH<sub>4</sub>F e os gases (CHF<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>Cl, CF<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) por exemplo<sup>25,121-123</sup>. Os modificadores gasosos são mais vantajosos quando comparados aos modificadores químicos halogenados sólidos e líquidos, pois podem ser introduzidos em tempos específicos no sistema de ETV. Adicionalmente, nestes casos, é possível controlar as espécies reativas. Ainda, reagentes sólidos podem se decompor facilmente em um curto período de tempo/aquecimento<sup>127</sup>.

Modificadores orgânicos quelantes também podem ser usados no sistema de ETV para a posterior determinação de REE. Esses modificadores orgânicos podem ser usados como reagentes de extração na etapa de pré-tratamento da amostra (extração) e, geralmente continuam no extrato, o qual é introduzido na plataforma de grafite. Dentre as principais vantagens do uso desses modificadores pode-se citar a vaporização de elementos refratários em temperaturas mais baixas e o transporte dos analitos até o equipamento de ICP-MS ou ICP-OES. O efeito de transporte causado pelo C não é bem conhecido, mas possivelmente deva-se pela liberação de partículas de C dentro do forno de ETV, as quais aumentam a eficiência de transporte. Como exemplos destacam-se o 1-fenil-3 metil-4-benzoil-5-pirazolona (PMBP), pivaloiltrifluoroacetona (PTA), 8-hidróxiquinolina, 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o dietilditiocarbamato<sup>69,101,125,128</sup>.

O uso de métodos analíticos que utilizam sistemas de ETV (acoplado às técnicas de ICP-OES e ICP-MS), tornam-se opções viáveis para a determinação de REE em sangue, visto que pequenas quantidade de amostra podem ser utilizadas, baixos limites de quantificação (LOQs) podem ser obtidos e um mínimo manuseio da amostra é requerido. No caso da técnica de ICP-OES, inúmeras interferências podem ocorrer devido à sobreposição das linhas de emissão, fazendo com que esta técnica não se torne a mais apropriada para a determinação de REE em baixas concentrações. A técnica de ICP-MS, por sua vez, torna-se a melhor opção para esta finalidade devido a sua capacidade multielementar, baixos limites de quantificação e elevada sensibilidade<sup>14,124,125</sup>. Estudos utilizando o sistema de ETV-ICP-MS já foram desenvolvidos para a determinação de REE em amostras biológicas, e alguns destes trabalhos estão descritos na Tabela 1 (*Revisão bibliográfica*).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

*Nesse capítulo são descritos os instrumentos, amostras e reagentes, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são apresentados os procedimentos, bem como os parâmetros otimizados para cada método analítico desenvolvido para a determinação de REE em sangue.*

### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

No presente trabalho foram desenvolvidas cinco métodos analíticos visando à determinação de REE (com exceção de Sc e Pm) em sangue. Foram estudados os seguintes métodos:

- i)* Vaporização eletrotérmica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS),
- ii)* Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS) e posterior determinação por USN-ICP-MS,
- iii)* Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado (CWD-CS) e posterior determinação por USN-ICP-MS,
- iv)* Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC) e posterior determinação por USN-ICP-MS,
- v)* Combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e posterior determinação por USN-ICP-MS.

Dentre esses métodos analíticos, o método de ETV-ICP-MS consistiu na amostragem direta de sangue (líquido com anticoagulante). Para os demais métodos propostos (*ii*, *iii*, *iv* e *v*) foi necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras previamente à determinação dos REE em sangue por USN-ICP-MS.

#### 3.1.1 Vaporização eletrotérmica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS)

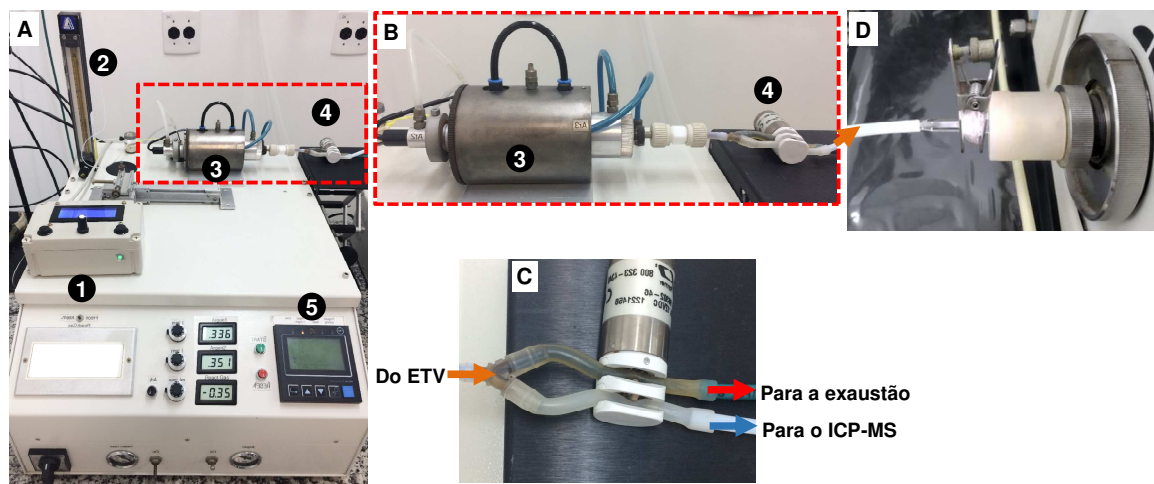
Para a determinação dos REE em sangue (líquido com anticoagulante), foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRCII, PerkinElmer-SCIEX, Canada) equipado com uma tocha contendo um tubo injetor de quartzo com 2 mm d.i e um separador de massas do tipo quadrupolo. Para o método utilizando o ETV-ICP-MS, um sistema de vaporização eletrotérmica (modelo ETV-4000c, Spectral Systems, Alemanha) com aquecimento longitudinal foi empregado para a introdução da amostra no equipamento de ICP-MS. O sistema de vaporização eletrotérmica é equipado com tubos e plataformas de grafite com recobrimento de grafite pirolítico (Spectral System). Na Figura 2 é possível observar o tubo e a plataforma de grafite utilizados no ETV-ICP-MS.

Figura 2 - Plataforma e tubo de grafite utilizado no ETV-ICP-MS.



No sistema de ETV-ICP-MS, os gases provenientes da etapa de vaporização da amostra foram carregados com Ar para o equipamento de ICP-MS por meio de um tubo de PTFE (1 m de comprimento e 6 mm de diâmetro interno) conectado à tocha. Foi utilizado um controlador eletrônico (descritos no trabalho de Mello *et al.*<sup>121</sup>) que consiste em uma válvula solenóide de três vias (Cole-Parmer, EUA) posicionada entre o saída do forno do sistema de ETV e o equipamento de ICP-MS. Essa válvula permite direcionar os gases para o resíduo durante a etapa de pirólise e para o equipamento durante a etapa de vaporização. Dessa maneira, ocorre a diminuição de possíveis depósitos de materiais oriundos da matriz (como, por exemplo, de C), na interface do equipamento. Além disso, o controlador eletrônico controla o tempo de abertura e fechamento da válvula de Freon R-12 (gás halogenado utilizado para vaporização dos REE) para evitar possíveis perdas dos analitos por volatilização. Na Figura 3 é possível observar mais detalhes do sistema de ETV-ICP-MS empregado neste trabalho.

Figura 3 - A) Sistema de ETV: 1) controlador eletrônico; 2) Controlador de oxigênio; 3) forno de grafite; 4) válvula de três vias; 5) controlador do sistema de ETV, B) detalhe da válvula de três vias; C) representação do funcionamento da válvula de três vias e D) tubo de PTFE conectado à entrada do equipamento de ICP-MS.



As condições operacionais (baseadas em um trabalho prévio<sup>120</sup>) utilizadas para a determinação de REE (com exceção de Sc e Pm) em sangue por ETV-ICP-MS estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais para a determinação de REE em sangue por ETV-ICP-MS.

Parâmetros	ETV- ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300
Vazão principal de argônio (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão auxiliar de argônio (L min <sup>-1</sup> )	1,20
Vazão de argônio do nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	-
Cones (amostragem e skimmer)	Pt
<i>Dwell time</i> (ms)	5
Varreduras ( <i>sweeps</i> )	1
Varreduras por replicatas ( <i>readings</i> )	75
Replicatas	1
Isótopos monitorados ( <i>m/z</i> )	<sup>140</sup> Ce <sup>+</sup> , <sup>163</sup> Dy <sup>+</sup> , <sup>167</sup> Er <sup>+</sup> , <sup>153</sup> Eu <sup>+</sup> , <sup>160</sup> Gd <sup>+</sup> , <sup>165</sup> Ho <sup>+</sup> , <sup>139</sup> La <sup>+</sup> , <sup>175</sup> Lu <sup>+</sup> , <sup>146</sup> Nd <sup>+</sup> , <sup>141</sup> Pr <sup>+</sup> , <sup>152</sup> Sm <sup>+</sup> , <sup>159</sup> Tb <sup>+</sup> , <sup>169</sup> Tm <sup>+</sup> , <sup>89</sup> Y <sup>+</sup> e <sup>172</sup> Yb <sup>+</sup> .

A avaliação do desempenho do espectrômetro de massas foi feita utilizando uma solução contendo 1 µg L<sup>-1</sup> de In e La e 10 µg L<sup>-1</sup> de Ba. Desta forma, as



intensidades dos sinais para  $^{111}\text{In}^+$ ,  $^{139}\text{La}^+$  e  $^{155}\text{LaO}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}$  foram monitoradas para verificação da sensibilidade do equipamento ( $^{111}\text{In}^+$ ), percentual de óxidos ( $^{139}\text{La}^+$  e  $^{155}\text{LaO}^+$ ) e íons de carga dupla ( $^{138}\text{Ba}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}$ ).

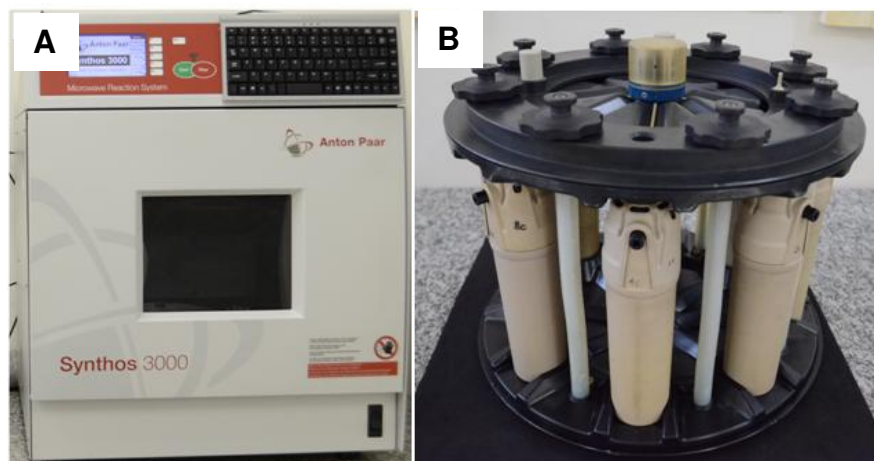
Para a secagem das amostras e das soluções de referência adicionadas à plataforma de ETV-ICP-MS, foi utilizado um sistema de aquecimento com infravermelho (modelo T/IR), Spectral Systems, Alemanha), previamente à introdução no forno de grafite. Esse aquecimento foi feito para evitar o acúmulo de água no sistema de ETV-ICP-MS. A pesagem das amostras para a análise por ETV-ICP-MS foi feita utilizando uma microbalança (modelo M2P, Sartorius, Alemanha) com resolução de 0,001 e carga máxima de 2 g.

### **3.1.2 Métodos de preparo de amostras propostos para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS**

No presente trabalho, foram avaliados quatro métodos de preparo de amostras (CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC) para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS. Cabe destacar que o método empregando MAWD<sup>26</sup> foi utilizado para obter os valores de referência aos métodos de preparo de amostras desenvolvidos.

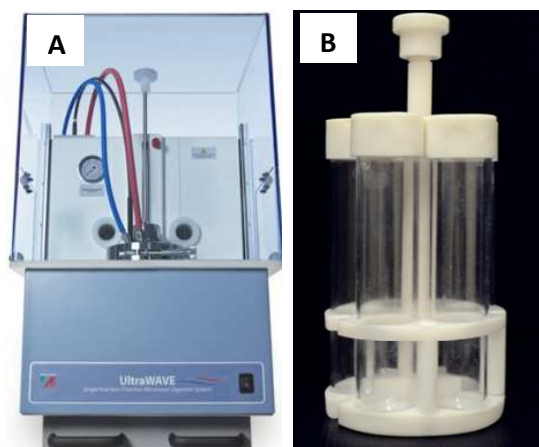
Para a digestão de sangue (*in natura* na presença de anticoagulante) por MAWD (método de referência) e por MIC, foi utilizado um forno de micro-ondas (modelo Synthos 3000<sup>®</sup>, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria) com capacidade máxima para oito frascos de quartzo com volume interno de 80 mL cada. Esse forno de micro-ondas possui condições máximas de temperatura, pressão e potência recomendadas pelo fabricante de 280 °C, 80 bar e 1400 W, respectivamente. Adicionalmente, esse forno possui sensores de temperatura e pressão, os quais permitem o controle desses parâmetros em tempo real durante a etapa de irradiação. Para o procedimento de digestão por MIC, um suporte de quartzo foi utilizado para a introdução da amostra no interior do frasco de quartzo. Esses suportes foram confeccionados no Laboratório de Hialotecnia da UFSM. O forno de micro-ondas e seu rotor equipado com os frascos de quartzo estão mostrados na Figura 4.

Figura 4 - A) Forno de micro-ondas Synthos 3000<sup>®</sup>. B) Rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizados para a digestão de sangue (MAWD e MIC) para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS.



O método de digestão por MAWD-SRC foi desenvolvido utilizando um forno de micro-ondas (modelo UltraWAVE<sup>®</sup>, Single Reaction Chamber, Milestone, Itália). O forno de micro-ondas é equipado com um rotor com capacidade máxima para 5 frascos de quartzo possuindo volume interno máximo de 40 mL. Esse forno de micro-ondas possui condições máximas de temperatura, pressão e potência de 270 °C, 160 bar e 1500 W, respectivamente. Além disso, o forno de micro-ondas possui sensores de pressão e temperatura que permitem acompanhar a potência irradiada no decorrer de cada digestão. Para o resfriamento dos frascos, após o término do programa de digestão, o forno de micro-ondas UltraWAVE<sup>®</sup> utiliza um sistema para a passagem forçada de ar. Na Figura 5 é possível observar o equipamento e o rotor utilizado no método da MAWD-SRC.

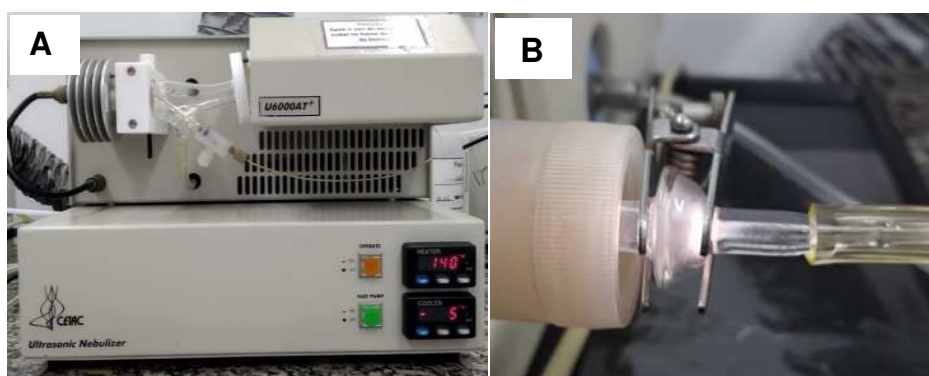
Figura 5 - A) Forno de micro-ondas UltraWAVE<sup>®</sup>. B) Rotor equipado com cinco frascos de quartzo.



O procedimento de digestão em sistema aberto (CWD-OS) foi feito usando um bloco de aquecimento (modelo DK 42, Velp Scientífica, Itália) equipado com frascos de vidro (50 mL) com 1,8 e 24,4 cm de diâmetro interno e altura, respectivamente. Esse sistema possui ajuste e programação de temperatura. O procedimento de digestão em sistema fechado (CWD-CS) foi feito usando um bloco de aquecimento equipado com frascos de PTFE de 40 mL cada (modelo TE 015, Tecnal, Brasil).

O mesmo espectrômetro de massa utilizado no método da ETV-ICP-MS foi utilizado para a determinação de REE por USN-ICP-MS nos digeridos obtidos pelos diferentes métodos de preparo de amostras avaliados (CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC). A determinação dos REE nos digeridos foi feita utilizando um nebulizador ultrassônico (modelo U600AT<sup>+</sup>, CETAC Technologies, EUA), cuja as condições operacionais foram de 140 °C (etapa de aquecimento) e -5 °C (etapa de resfriamento). A vazão da amostra foi fixada em 2,5 mL min<sup>-1</sup> e está foi bombeada através de um capilar de Tygon<sup>®</sup> (1,14 mm d.i., 95601-30, Ismatec, Cole Parmer, EUA) conectado na bomba peristáltica do espectrômetro de massas. O mesmo nebulizador ultrassônico foi usado para a avaliação do efeito de possíveis interferências durante a etapa de determinação dos REE por USN-ICP-MS. Na Figura 6, é possível observar o nebulizador USN utilizado para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 6 - A) Nebulizador USN. B) Conexão do nebulizador ultrassônico no equipamento de ICP-MS.



Foi feito, um estudo do efeito de possíveis interferências durante a determinação de REE usando a técnica de ICP-MS com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália). As condições operacionais<sup>129</sup> (baseadas em um trabalho prévio) do equipamento de ICP-MS (utilizando USN-ICP-MS e ICP-MS com nebulização concêntrica) estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições operacionais para a determinação de REE e avaliação de possíveis interferências por USN-ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS	USN-ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300	1300
Vazão principal de argônio (L min <sup>-1</sup> )	15	15
Vazão auxiliar de argônio (L min <sup>-1</sup> )	1,20	1,20
Vazão de argônio do nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	1,02	1,08
Cones (amostragem e skimmer)	Pt	Pt
<i>Dwell time</i> (ms)	50	50
Varreduras ( <i>sweeps</i> )	5	5
Varreduras por replicatas ( <i>readings</i> )	3	3
Replicatas	3	5
Isótopos monitorados	<sup>140</sup> Ce <sup>+</sup> , <sup>142</sup> Ce <sup>+</sup> , <sup>163</sup> Dy <sup>+</sup> , <sup>164</sup> Dy <sup>+</sup> , <sup>166</sup> Er <sup>+</sup> , <sup>167</sup> Er <sup>+</sup> , <sup>151</sup> Eu <sup>+</sup> , <sup>153</sup> Eu <sup>+</sup> , <sup>158</sup> Gd <sup>+</sup> , <sup>160</sup> Gd <sup>+</sup> , <sup>165</sup> Ho <sup>+</sup> , <sup>139</sup> La <sup>+</sup> , <sup>175</sup> Lu <sup>+</sup> , <sup>144</sup> Nd <sup>+</sup> , <sup>146</sup> Nd <sup>+</sup> , <sup>141</sup> Pr <sup>+</sup> , <sup>152</sup> Sm <sup>+</sup> , <sup>154</sup> Sm <sup>+</sup> , <sup>159</sup> Tb <sup>+</sup> , <sup>169</sup> Tm <sup>+</sup> , <sup>89</sup> Y <sup>+</sup> e <sup>172</sup> Yb <sup>+</sup>	

Assim como para a técnica da ETV-ICP-MS, a otimização dos parâmetros instrumentais foi feita utilizando uma solução contendo 1 µg L<sup>-1</sup> de In e La e 10 µg L<sup>-1</sup>

de Ba. Desta forma, as intensidades dos sinais para  $^{111}\text{In}^+$ ,  $^{139}\text{La}^+$  e  $^{155}\text{LaO}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}$  foram monitoradas para verificação da sensibilidade do equipamento ( $^{111}\text{In}^+$ ), percentual de óxidos ( $^{139}\text{La}^+$  e  $^{155}\text{LaO}$ ) e íons de carga dupla ( $^{138}\text{Ba}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}$ ).

A caracterização das amostras de sangue e fígado (utilizado para a avaliação do efeito de possíveis interferências oriundas da matriz por USN-ICP-MS e ICP-MS) quanto à concentração de metais, foi feita por ICP-MS (mesmo equipamento mencionado anteriormente). Adicionalmente, também foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com vista axial (modelo Ciro CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha) para a caracterização das amostras quanto à presença, principalmente, dos metais alcalinos e alcalino-terrosos. Esse espectrômetro é equipado com uma câmara de nebulização duplo passo (tipo *Scott*), um nebulizador de fluxo cruzado (*crossflow*). O espectrômetro também é equipado com um monocromador na configuração Paschen-Rouge. Além da faixa espectral da região do visível, o sistema óptico do equipamento é selado e purgado com Ar, permitindo o monitoramento de comprimentos de onda abaixo de 200 nm (até 125 nm). Esse mesmo equipamento de ICP-OES foi utilizado para a determinação do teor de carbono nas soluções obtidas pelos diferentes métodos de preparo de amostras avaliados. As condições operacionais (de acordo com um trabalho prévio<sup>77</sup>) para a determinação de metais (por ICP-OES e ICP-MS) e C por ICP-OES pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições operacionais para a determinação de metais (ICP-OES e ICP-MS) e C por ICP-OES.

Parâmetro	ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400	1300
Vazão principal de argônio (L min <sup>-1</sup> )	15,0	15,0
Vazão auxiliar de argônio (L min <sup>-1</sup> )	1,0	1,20
Vazão de argônio do nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	1,00	1,15
Replicatas	3	3
Comprimento de onda (nm)	Al (167,078), Ca (317,933), Cu (327,396), Fe (259,941), K (766,491), Mg (280,270), Na (589,592), Zn (213,856), C (193,030) e Y <sup>a</sup> (371,029).	-
Isótopos (m/z)	-	<sup>75</sup> As <sup>+</sup> , <sup>138</sup> Ba <sup>+</sup> , <sup>114</sup> Cd <sup>+</sup> , <sup>59</sup> Co <sup>+</sup> , <sup>53</sup> Cu <sup>+</sup> , <sup>55</sup> Mn <sup>+</sup> , <sup>95</sup> Mo <sup>+</sup> , <sup>60</sup> Ni <sup>+</sup> , <sup>120</sup> Sn <sup>+</sup> e <sup>88</sup> Sr <sup>+</sup> .

<sup>a</sup>Y foi utilizado como padrão interno para a determinação de C.

A determinação da concentração de HNO<sub>3</sub> nos digeridos foi feita por titulação em meio aquoso utilizando um titulador automático (modelo Titrand 836 Metrohm, Suíça), equipado com um módulo de agitação magnética (modelo 803 TI Stand, Metrohm), uma bureta de 20 mL (modelo Dosino 800, Metrohm) e um eletrodo de pH de vidro combinado para meio aquoso (modelo 6.0262.100 LL electrode Plus, Metrohm). As amostras de fígado (suíno e bovino) foram cominuídas em um moinho de facas (modelo A 11 B S 32, IKA<sup>®</sup>, China). A liofilização do sangue e fígado para a determinação do teor de água foi feita utilizando um liofilizador (modelo LH 2000/3, Terroni Fauvel, Brasil). Para a separação do plasma e dos elementos figurados do sangue para os experimentos no sistema de ETV-ICP-MS, foi utilizada uma centrífuga (modelo Q222T208, Quimis, Brasil).

Para a secagem dos reagentes sólidos utilizados no preparo das soluções foi utilizada uma estufa com circulação de ar (modelo 400-5ND, Nova Ética, Brasil). A pesagem das amostras foi feita em balança analítica digital com resolução de 0,0001 g e com capacidade de 220 g (modelo AY 220, Shimadzu, Japão).

Um banho de ultrassom (modelo P 120 H, Elmasonic, Alemanha) com potência de 300 W e frequência de 37 kHz foi utilizado para a descontaminação dos papéis filtro utilizados na MIC e os papéis de DBS (modelo M-TFN, Munktell, EUA) utilizados para a adsorção do sangue. Uma capela de fluxo laminar (CFLH12, Veco

do Brasil, Brasil) foi utilizada para secagem dos papéis da MIC e dos papéis de DBS após descontaminação.

### 3.2 MATERIAIS E REAGENTES

Os procedimentos para coleta de sangue (por punção venosa) foram adaptados de procedimentos descritos previamente na literatura<sup>28</sup>. As amostras foram coletadas com agulha de 25 x 0,8 mm (Biocon, Brasil) e seringa descartável de 5 mL (Descarpack, Brasil) e, posteriormente, transferidas para tubos de coleta a vácuo contendo anticoagulante (modelo Vacutube EDTA, Biocon Brasil). Previamente à perfuração, foi feita assepsia com álcool etanólico 70% na superfície da região de acesso. Adicionalmente, um tubo de coleta a vácuo contendo ativador de coágulo (modelo ativador com sílica, Labor import) foi usado para a separação do plasma e dos elementos figurados do sangue para os experimentos feitos no ETV-ICP-MS.

Todas as soluções de referência e demais soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água previamente destilada e deionizada em uma coluna de troca iônica e, posteriormente, purificada por um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore, EUA) com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm. O HNO<sub>3</sub> P.A (65%, Vetec, Brasil) e o HCl P.A (37%, Vetec) utilizados no método de referência (MAWD), métodos propostos (CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC) e na avaliação de interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS, foram destilados em um sistema de sub-ebulição (duoPur<sup>®</sup>2.01E, Milestone, Itália). Adicionalmente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% (v v<sup>-1</sup>) (Merck, Alemanha) foi utilizado nos métodos da CWD-OS e da CWD-CS. Para a descontaminação dos materiais utilizados em todos os procedimentos foi usado HNO<sub>3</sub> (concentrado ou uma solução 5% (v v<sup>-1</sup>)).

Para a coleta de sangue em papel para a investigação do método da MIC foi utilizado um papel específico para amostragem de fluidos biológicos (DBS, modelo M-TFN, Munktell, EUA). Previamente ao uso, os papéis passaram por três etapas de descontaminação de 60 min cada em um banho de ultrassom, sendo que as duas primeiras etapas foram feitas com HNO<sub>3</sub> 20% (v v<sup>-1</sup>) e a terceira etapa foi feita com água ultrapura. Posteriormente, a secagem dos papéis foi feita em capela de fluxo laminar. Após a secagem, os papéis foram armazenados em tubos de polipropileno.

No método da MIC, uma solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada para auxiliar na ignição da amostra e foi preparada a partir da dissolução do respectivo reagente sólido (Merck) em água. O sangue foi pesado diretamente sobre discos de papel DBS, os quais foram utilizados para o suporte da amostra. Discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (90 mm de diâmetro, nº 5891, Schleicher & Schüll, Alemanha), foram utilizados como suporte para a solução iniciadora de combustão ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ ) e também para auxiliar no processo de ignição. A pressurização dos frascos de quartzo utilizados na MIC foi feita com oxigênio de alta pureza (99,998%, White Martins). Esse mesmo oxigênio foi utilizado para os experimentos no sistema de ETV-ICP-MS.

Diclorodifluormetano ( $\text{CCl}_2\text{F}_2$ -comercialmente conhecido como Freon R-12), foi utilizado como gás de reação no sistema de ETV-ICP-MS. Uma solução de Ir ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em HCl 20%, Spectrum Chemical Mfg. Corp., EUA) foi utilizada como modificador químico e uma solução de Zr ( $\text{ZrCl}_3$ ,  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Ir em HCl 20%, Spectrum Chemical Mfg. Corp., EUA) foi utilizada para o recobrimento da plataforma de grafite no método da ETV-ICP-MS. A solução de ácido cítrico ( $400 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizada como fonte de C para auxiliar no transporte dos analitos até o plasma no método da ETV-ICP-MS, foi preparada a partir da dissolução da respectiva substância em água.

Para a avaliação de possíveis interferências oriundas da presença de metais (Ca, Fe, K, Mg e Na), durante a determinação de REE por ICP-MS e USN-ICP-MS, foram preparadas soluções estoque na concentração de  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  a partir de dos reagentes sólidos  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e NaCl (Merck), respectivamente, em água.

As soluções de calibração para a determinação de REE por USN-ICP-MS ( $0,01$  a  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), bem como as soluções usadas para os experimentos de interferências, foram preparadas a partir de uma solução estoque contendo esses elementos na concentração de  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  5% (v v<sup>-1</sup>). Para o preparo da solução estoque, foi utilizada uma solução multielementar (Inorganic Ventures, CCS - 1) contendo os REE ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  7% (v v<sup>-1</sup>)).

As soluções de calibração utilizadas para a calibração dos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS e posterior determinação de metais no sangue e no fígado foram preparadas a partir de uma solução multielementar (SCP33MS, PlasmaCAL, Canadá) contendo os analitos na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  5%. As concentrações utilizadas para a curva de calibração dos equipamentos de ICP-MS e



ICP-OES foram preparadas na faixa de 0,01 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Adicionalmente, soluções de calibração para a determinação dos metais por ICP-OES, em uma faixa mais ampla de calibração (250 a 10000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram preparadas a partir de uma solução multielementar (Merck IV, Alemanha) contendo todos os analitos na concentração de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  5%.

Para a determinação de carbono nos digeridos por ICP-OES, foi preparada uma solução estoque de carbono (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) a partir da dissolução de ácido cítrico (Dinâmica, Brasil) em água. A partir de sucessivas diluições dessa solução estoque em  $\text{HNO}_3$  5%, foi preparada uma curva de calibração para o equipamento de ICP-OES em uma faixa de concentração de 10 a 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Cabe destacar que previamente a introdução das soluções no equipamento, foi feita a adição Y (1000  $\text{mg L}^{-1}$ , Spex, EUA), utilizado como padrão interno, nas soluções de calibração, amostras e nos brancos, de modo que a concentração final foi de 1  $\text{mg L}^{-1}$ . As espécies voláteis de carbono ( $\text{CO}_2$ , por exemplo) foram previamente removidas usando um fluxo de Ar ( $0,1 \text{ L min}^{-1}$ ) por 2 minutos. Outra solução estoque de carbono (preparada a partir do ácido cítrico - 400  $\text{g L}^{-1}$ ) foi utilizada para o preparo das soluções de referência para avaliação do efeito do C durante a determinação de REE por ICP-MS e USN-ICP-MS e para os experimentos no método da ETV-ICP-MS. Adicionalmente, uma solução estoque de carbono (10  $\text{g L}^{-1}$ ) preparada a partir da dissolução de D-frutose 99% (Dinâmica) também foi utilizada para o preparo das soluções de referência para avaliação do efeito do C durante a determinação de REE por ICP-MS e USN-ICP-MS.

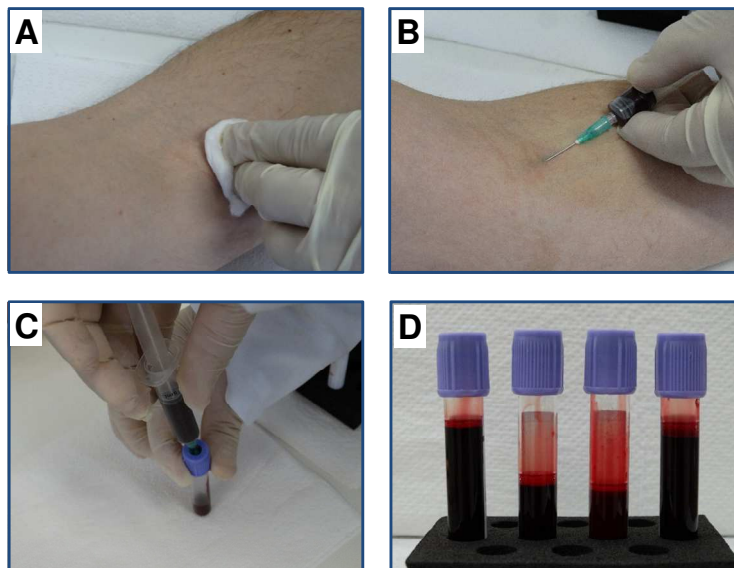
A determinação da acidez residual após os diferentes métodos de preparo de amostras avaliados foi feita por titulação em meio aquoso. Para isso, foi utilizada uma solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KOH (preparada a partir da diluição do reagente sólido em água).

O plasma dos espectrômetros de ICP-OES e ICP-MS foi gerado com argônio de alta pureza (99,998%, White Martins, Brasil) sendo também utilizado como gás de nebulização e gás auxiliar. O mesmo Ar foi utilizado no sistema de ETV como gás carreador e *bypass*.

### 3.3 AMOSTRAS

Os estudos desenvolvidos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE: 57543516.2.0000.53460). As amostras de sangue foram coletadas de voluntários com idade entre 20 a 35 anos, os quais são vinculados ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) ou com relações familiares com o autor dessa tese. Foram coletadas amostras de sangue venoso de 30 pessoas, sendo que cada um dos doadores forneceu uma alíquota com volume máximo de 4 mL. É importante mencionar que cada amostra coletada foi transferida para tubos de ensaio contendo anticoagulante específicos para a coleta de sangue. As amostras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos (cada um com amostras de 10 pessoas), onde foram obtidas três amostras (A, B e C) compostas, com aproximadamente, 40 mL cada. Essas amostras foram utilizadas nos métodos da MAWD, MAWD-SRC, CWD-CS, CWD-OS e MIC). Posteriormente à coleta e amostragem, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (aproximadamente 5 °C) com sigilo de informação. Cabe salientar que a amostra de sangue A foi escolhida para a otimização de todos os métodos desenvolvidas no presente trabalho. Na Figura 7, é possível observar o procedimento empregado para a coleta das amostras de sangue pela técnica de punção venosa.

Figura 7 - Procedimentos executados para coleta de sangue por punção venosa. A) assepsia da região de coleta; B) coleta do sangue com agulha e seringa; C) amostras armazenadas em tubos de coleta com anticoagulante; D) tubos de coleta preenchidos.



Adicionalmente, 10 mL de sangue bovino (amostra D) e 10 mL de sangue suíno (amostra E) foram fornecidas por um frigorífico do interior de Santa Maria - RS. Ainda, o mesmo frigorífico forneceu uma amostra de fígado bovino (amostra F) e uma amostra de fígado suíno (amostra G) (porção de 5 g cada - provenientes do mesmo animal ao qual o sangue das amostras D e E pertenciam). Isso foi feito para que se pudesse fazer um comparativo entre sangue e fígado quanto à concentração dos REE. É importante ressaltar que nenhum animal foi abatido para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido, mas sim as amostras foram doadas de maneira voluntária.

Para a avaliação de possíveis interferências de carbono na determinação de REE pelas técnicas de USN-ICP-MS e ICP-MS, foram preparadas soluções de referência (com concentração conhecida de carbono) a partir de digeridos de fígado bovino (simulação de matriz) obtidos por CWD-OS. Para isso, uma amostra adicional de fígado bovino (amostra H) foi adquirida em um supermercado da cidade de Santa Maria - RS. No caso do fígado, as amostras foram liofilizadas e, posteriormente, moídas utilizando um moinho de facas.

A manipulação de amostras biológicas deve ser feita de maneira cuidadosa com o objetivo de evitar possíveis contaminações para quem esta manipulando as amostras. O descarte dos frascos, das seringas e demais materiais utilizados para a

coleta de sangue foi feita em locais apropriados seguindo as recomendações protocoladas pela UFSM.

### **3.4 METODOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E FÍGADO E PARA A OBTENÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS REE**

#### **3.4.1 Determinação do teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade, 1 e 5 g de sangue e fígado, respectivamente, foram liofilizados durante 72 h. Posteriormente, o teor de umidade foi calculado com base na diferença entre a massa seca obtida após o processo de liofilização e a massa de sangue total inicial.

#### **3.4.2 Determinação de metais e obtenção dos valores de referência para REE em sangue após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em sistema Synthos 3000<sup>®</sup>**

Para a determinação de metais (incluindo REE – Valores de referência), as amostras de sangue foram digeridas por MAWD. O procedimento para a obtenção dos valores de referência foi adaptado de um trabalho prévio<sup>26</sup>. Para isso, cerca de 200 mg de sangue foram transferidos para os frascos quartzo, seguido da adição de 6 mL de HNO<sub>3</sub> 7 mol L<sup>-1</sup>. Inicialmente, um procedimento de pré-reação da amostra com o HNO<sub>3</sub> foi feito deixando os frascos abertos e em repouso por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, os frascos foram fechados, fixados no rotor, inseridos na cavidade do forno de micro-ondas e submetidos ao programa de irradiação (Tabela 5).

Tabela 5 - Programa de irradiação utilizado para a digestão de sangue por MAWD.

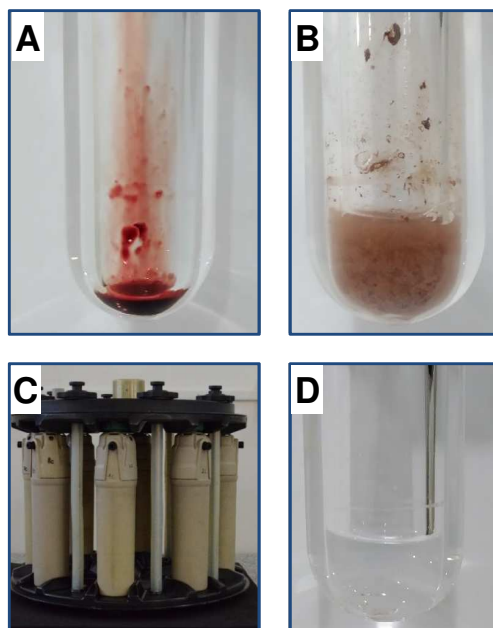
Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	900	10	5
2	1000	5	10
3 <sup>a</sup>	0	-	20

Taxa de aumento de pressão, temperatura e pressão máxima de 0,8 bar s<sup>-1</sup>, 280 °C e 80 bar, respectivamente.

<sup>a</sup>Etapa de resfriamento.

Na Figura 8 é possível observar detalhes do procedimento empregando o método da MAWD para a obtenção dos valores de referência para os REE e caracterização das amostras quanto ao teor de metais.

Figura 8 - Procedimento usado no método da MAWD para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de quartzo; B) adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $7 \text{ mol L}^{-1}$ ; C) fixação dos frascos de quartzo no rotor; D) solução final após MAWD.



Após o final do programa de irradiação, as soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com água. Posteriormente, foi feita a determinação de metais por ICP-OES e ICP-MS, bem como a determinação de REE por USN-ICP-MS.

Após cada digestão, os frascos foram descontaminados com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado usando o seguinte programa de irradiação: *i*) 1000 W por 10 min, *ii*) 0 W por 20 min (resfriamento). Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido.

### 3.4.3 Determinação de REE em fígado por USN-ICP-MS após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação

Para a determinação de metais (incluindo REE), as amostras de fígado (liofilizados após 72 h) foram digeridas por MAWD-SRC, e as condições para a digestão foram baseadas em um trabalho prévio<sup>130</sup>. Para este procedimento,

aproximadamente 500 mg de amostra foram pesados diretamente no interior dos frascos de quartzo e, posteriormente, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados sobre as mesmas. Para o preenchimento da cuba reacional do sistema UltraWave<sup>®</sup>, foi utilizado uma mistura contendo 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 130 mL de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, os frascos foram fechados e ambos (rotor contendo os frascos com o sangue e a cuba reacional contendo a solução ácida) foram inseridos na cavidade do equipamento. Em seguida, o sistema foi pressurizado até 40 bar com Ar e, então, o programa de irradiação foi iniciado. O programa de irradiação utilizado está mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Programa de irradiação utilizado para a digestão de fígado por MAWD-SRC.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	130	10	10
2	150	5	5
3	250	15	10
4 <sup>a</sup>	45	30	-

<sup>a</sup>Etapa de resfriamento.

Após o término do programa de irradiação, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e as soluções resultantes foram avolumadas com água a 25 mL. Após cada digestão, os frascos foram descontaminados com 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado usando o seguinte programa de irradiação: i) 10 min até 250 °C (15 min de permanência e, ii) 30 min até 45 °C (resfriamento). Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido. A determinação de metais foi feita por ICP-OES e ICP-MS e a determinação de REE foi feita por USN-ICP-MS.

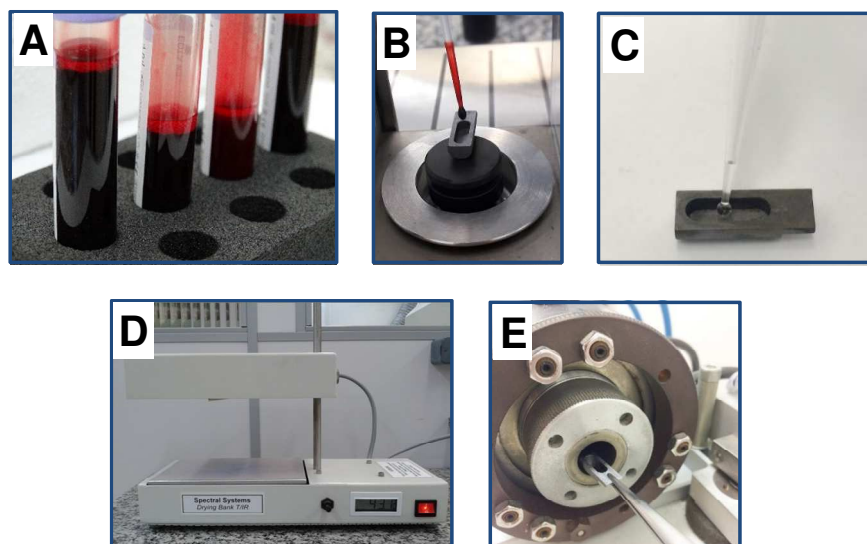
### 3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO COM VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA (ETV-ICP-MS)

Previamente ao desenvolvimento do método utilizando a técnica da ETV-ICP-MS, o tubo e a plataforma (ambos recobertos com grafite pirolítico) foram submetidos a sucessivos ciclos de aquecimento, até que os valores de contagens para os REE fossem constantes e desprezíveis.

Como condição de partida, algumas condições experimentais (como a necessidade do uso de Freon R-12 para volatilização dos REE, temperatura de vaporização, bem como a vazão dos gases carreador, *bypass* e Freon R-12) foram baseadas em um trabalho prévio<sup>120</sup>. Ainda, experimentos iniciais utilizando solução de referência contendo os REE para a avaliação desses parâmetros não foram feitos, visto que esse estudo já foi feito<sup>23</sup>.

Para a análise de sangue por ETV-ICP-MS, pesou-se a amostra de sangue diretamente na plataforma de grafite. Posteriormente, a plataforma contendo a amostra (e ácido cítrico - 6 mg) foi submetida a uma etapa de secagem durante 2 a 3 min à 75 °C em um sistema de aquecimento com lâmpada de infravermelho. A introdução da plataforma no forno foi feita manualmente, com o auxílio de uma pinça e, posteriormente, submetida ao programa de aquecimento. Na Figura 9 são mostradas ilustrações de algumas das etapas realizadas.

Figura 9 - Sequência de etapas para análise de sangue por ETV-ICP-MS: A) sangue após coleta, B) pesagem de sangue na plataforma de grafite, C) adição de ácido cítrico, D) secagem em sistema de infravermelho e E) inserção da plataforma no forno de grafite.



Para o desenvolvimento da metodologia da ETV-ICP-MS, os seguintes parâmetros experimentais foram avaliados: *i*) efeito da temperatura de pirólise sobre a massa residual das amostras (100 a 600 °C), *ii*) avaliação da massa de sangue (0,25 a 4 mg), *iii*) avaliação da temperatura de pirólise (600 e 700 °C), *iv*) tempo de pirólise (40 a 80 s), *v*) avaliação da massa de ácido cítrico (6 a 10 mg), *vi*) avaliação

do uso de O<sub>2</sub> na pirólise (100 mL min<sup>-1</sup>), *vii*) avaliação do uso de Ir como modificador químico (4 µg), *viii*) avaliação do uso de Zr para o recobrimento da plataforma de grafite<sup>131</sup> e *ix*) separação do soro e dos elementos figurados do sangue. É importante mencionar que, para todos os parâmetros avaliados, foi monitorado o sinal do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup> (*m/z* 78) para diagnosticar possíveis interferências durante a aquisição do sinal analítico. Todos os experimentos foram feitos usando o programa de aquecimento mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Programa de aquecimento utilizado para a otimização do sistema de ETV-ICP-MS.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, seg	Tempo de permanência, seg
Pirólise	700*	20	40
Resfriamento 1	100	1	40
Vaporização	2200	0	6
Limpeza	2400	0	10

\* Para otimização da massa de amostra foi usado 300 °C.

### 3.6 AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS E ICP-MS

No presente trabalho foi feito um estudo sistemático para verificar a influência de alguns elementos concomitantes na matriz sanguínea durante a determinação de REE. Todos os experimentos foram feitos utilizando nebulizador ultrassônico, visto que este é o mais indicado para a determinação de REE quando se utiliza a técnica de ICP-MS<sup>13,36</sup>. Adicionalmente, alguns experimentos foram feitos utilizando um nebulizador concêntrico e câmara ciclônica, os quais são comumente utilizados quando a técnica de ICP-MS é utilizada para a determinação elementar. As possíveis interferências investigadas foram: *i*) efeito da concentração de Ca, Fe, K, Mg e Na; *ii*) efeito da concentração de carbono a partir do ácido cítrico, frutose e de digeridos de fígado bovino (digerido por CWD-OS); *iii*) efeito da concentração de HNO<sub>3</sub>; *iv*) efeito da concentração do HCl e *v*) efeito da mistura de 1 HNO<sub>3</sub> + 3 HCl (água régia). Adicionalmente, foram feitos dois delineamentos fatoriais completos (2<sup>3</sup>) visando investigar as interferências na determinação dos REE com à presença simultânea de mais de um interferente (possíveis efeitos sinérgicos): *i*) efeito do Fe, K e Na e *ii*) efeito do C, K e Na.



Todos os experimentos referentes ao estudo de interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS e ICP-MS (com nebulização concêntrica e câmara de nebulização ciclônica) foram feitos com soluções de referência contendo todos os REE na concentração de 250 ng L<sup>-1</sup>). Foi feita a adição de soluções contendo os possíveis interferentes investigados (C, Ca, Fe, K, Mg, Na, HNO<sub>3</sub>, HCl e água régia) em concentrações crescentes (conforme descrito nos itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3, *Materiais e Métodos*).

O estudo sistemático referente à investigação de interferências na determinação de REE foi feito a partir da calibração do equipamento de ICP-MS (com nebulizador ultrassônico ou concêntrico). É importante mencionar que entre cada medida das soluções contendo os interferentes, foi feita a medida da intensidade do sinal dos REE nas soluções de referência (250 ng L<sup>-1</sup>) sem os interferentes, com o objetivo de monitorar a calibração do equipamento e verificar as variações do sistema. Esse monitoramento foi levado em consideração no cálculo de concordância na etapa de tratamento dos dados. Para todos os experimentos, os seguintes isótopos foram monitorados: <sup>140</sup>Ce<sup>+</sup>, <sup>142</sup>Ce<sup>+</sup>, <sup>163</sup>Dy<sup>+</sup>, <sup>164</sup>Dy<sup>+</sup>, <sup>167</sup>Er<sup>+</sup>, <sup>168</sup>Er<sup>+</sup>, <sup>151</sup>Eu<sup>+</sup>, <sup>153</sup>Eu<sup>+</sup>, <sup>158</sup>Gd<sup>+</sup>, <sup>160</sup>Gd<sup>+</sup>, <sup>165</sup>Ho<sup>+</sup>, <sup>139</sup>La<sup>+</sup>, <sup>175</sup>Lu<sup>+</sup>, <sup>144</sup>Nd<sup>+</sup>, <sup>146</sup>Nd<sup>+</sup>, <sup>141</sup>Pr<sup>+</sup>, <sup>152</sup>Sm<sup>+</sup>, <sup>154</sup>Sm<sup>+</sup>, <sup>159</sup>Tb<sup>+</sup>, <sup>169</sup>Tm<sup>+</sup>, <sup>89</sup>Y<sup>+</sup> e <sup>174</sup>Yb<sup>+</sup>. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

### **3.6.1 Avaliação do efeito do Ca, Fe, K, Mg e Na na determinação de REE por USN-ICP-MS e ICP-MS**

Para a avaliação de interferências oriundas da presença de Ca, Fe, K, Mg e Na na técnica de USN-ICP-MS, foram preparadas soluções estoque de cada interferente na concentração de 5000 mg L<sup>-1</sup>. Essas soluções foram preparadas a partir da dissolução dos seus respectivos sais (na forma de cloretos) em água. A concentração de Ca, Fe, K, Mg e Na foi confirmada mediante a determinação da concentração destes por ICP-OES, de modo a obter a concentração exata de cada interferente. O estudo de interferência foi feito utilizando soluções contendo 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de Ca, K, Mg ou Na e 10, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de Fe em uma solução de referência contendo 250 ng L<sup>-1</sup> de todos os REE em 15 mL de HNO<sub>3</sub> 5% (v v<sup>-1</sup>). É importante ressaltar que neste primeiro momento todos esses experimentos foram feitos com os interferentes em soluções individuais (investigação univariada).

Cabe destacar que o estudo de interferências oriundas da presença de K e Na também foi feito usando um nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica (e mesma faixa de concentração dos REE avaliada para a técnica de USN-ICP-MS, ou seja,  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esses estudos foram feitos usando as mesmas condições experimentais do equipamento de USN-ICP-MS e ICP-MS descritas no item 3.1.2 (*Materiais e Métodos*).

### **3.6.2 Avaliação do efeito do C na determinação de REE por USN-ICP-MS e ICP-MS**

Um estudo do efeito do carbono na determinação de REE por USN-ICP-MS foi feito no presente trabalho empregando a adição de carbono oriundo de três fontes distintas: ácido cítrico, frutose e carbono a partir de digeridos de fígado bovino (soluções simuladas provenientes da amostra "H").

Todos os experimentos foram feitos utilizando soluções de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 e 5000  $\text{mg L}^{-1}$  de carbono em soluções de referência contendo 250  $\text{ng L}^{-1}$  de todos os REE preparados em 15 mL de  $\text{HNO}_3$  5% ( $\text{v v}^{-1}$ ).

Para a obtenção das soluções contendo C a partir de digeridos de fígado bovino, cerca de 3 a 4 g de fígado (*in natura*) foram digeridos usando 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14  $\text{mol L}^{-1}$  por CWD-OS. O tempo de aquecimento foi de 3 h a 120 °C. Posteriormente, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com água. Posteriormente, os digeridos foram filtrados com o auxílio de um filtro com membrana de celulose com tamanho de 0,45  $\mu\text{m}$ , adaptado em uma seringa e foi feita a determinação da concentração de  $\text{HNO}_3$  e de C em cada uma das soluções.

Cabe destacar que o estudo de interferências oriundas da presença de C a partir do ácido cítrico e dos digeridos de fígado bovino, também foi feito usando um nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica (mesma faixa de concentração avaliada para a técnica de USN-ICP-MS). Esses estudos foram feitos usando as mesmas condições experimentais do equipamento de USN-ICP-MS e ICP-MS descritas no item 3.1.2 (*Materiais e Métodos*).

### 3.6.3 Delineamento fatorial completo $2^3$ – Efeito da concentração de Fe, K e Na

Para o estudo do efeito da concentração de Fe, Na e K na determinação de REE por USN-ICP-MS, foi aplicado um planejamento experimental do tipo 2 níveis e 3 variáveis ( $2^3$ ), em que a concentração de Fe, K e Na foi avaliada em conjunto. O nível inferior e superior foi estipulado em 15 e 40 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para Fe, Na e K. De maneira análoga aos estudos de interferências descritos no item 3.6 (*materiais e métodos*), o planejamento fatorial foi aplicado para a concentração dos REE de 250 ng L<sup>-1</sup>. É importante ressaltar que a concentração dos metais escolhida neste planejamento foi feita de acordo com os resultados obtidos quando os mesmos foram avaliados de maneira univariada. A Tabela 8 resume todos os experimentos desenvolvidos com as respectivas condições avaliadas.

Tabela 8 - Variáveis, níveis codificados e seus valores correspondentes utilizados no delineamento fatorial completo  $2^3$  para Fe, Na e K.

Ensaio	Planejamento	Concentração de Fe (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de K (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de Na (mg L <sup>-1</sup> )
1	$2^3$	15 (-1)	15 (-1)	15 (-1)
2		15 (+1)	15 (-1)	40 (-1)
3		15 (-1)	40 (+1)	15 (+1)
4		15 (+1)	40 (+1)	40 (-1)
5		40 (-1)	15 (-1)	15 (+1)
6		40 (+1)	15 (-1)	40 (+1)
7		40 (-1)	40 (+1)	15 (+1)
8		40 (+1)	40 (+1)	40 (+1)
9	Pontos centrais	27,5 (0)	27,5 (0)	27,5 (0)
10		27,5 (0)	27,5 (0)	27,5 (0)
11		27,5 (0)	27,5 (0)	27,5 (0)

### 3.6.4 Delineamento fatorial completo $2^3$ – Efeito da concentração de Na, K e C

Para o estudo do efeito da concentração de Na, K e C na determinação de REE por USN-ICP-MS, foi aplicado um planejamento experimental do tipo 2 níveis e

3 variáveis ( $2^3$ ), em que a concentração de Na, K e C foram avaliadas em conjunto. O nível inferior e superior foi estipulado em 15 e 40 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para Na e K e 150 e 500 mg L<sup>-1</sup> para C. De maneira análoga aos estudos de interferências descritos no item 3.6 (*materiais e métodos*), o planejamento fatorial foi aplicado para a concentração dos REE de 250 ng L<sup>-1</sup>. É importante ressaltar que a concentração dos metais escolhida neste planejamento foi feita de acordo com os resultados obtidos quando os mesmos foram avaliados de maneira univariada. A Tabela 9 resume todos os experimentos desenvolvidos com as respectivas condições avaliadas.

Tabela 9 - Variáveis, níveis codificados e seus valores correspondentes utilizados no delineamento fatorial completo  $2^3$  para Na, K e C.

Ensaio	Planejamento	Concentração de Na (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de K (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de C (mg L <sup>-1</sup> )
1	$2^3$	15 (-1)	15 (-1)	150 (-1)
2		40 (+1)	15 (-1)	150 (-1)
3		15 (-1)	40 (+1)	150 (+1)
4		40 (+1)	40 (+1)	150 (-1)
5		15 (-1)	15 (-1)	500 (+1)
6		40 (+1)	15 (-1)	500 (+1)
7		15 (-1)	40 (+1)	500 (+1)
8		40 (+1)	40 (+1)	500 (+1)
9	Pontos centrais	27,5 (0)	27,5 (0)	325 (0)
10		27,5 (0)	27,5 (0)	325 (0)
11		27,5 (0)	27,5 (0)	325 (0)

### 3.6.5 Avaliação do efeito do HNO<sub>3</sub>, HCl e água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS

O efeito da concentração de HNO<sub>3</sub>, HCl e de água régia também foi investigado na determinação de REE por USN-ICP-MS. O estudo de interferências foi feito utilizando 15 mL de soluções contendo concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (v v<sup>-1</sup>) de HNO<sub>3</sub> ou HCl (correspondente a soluções 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 e 4,2

mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e de 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 e 3,6 mol L<sup>-1</sup> de HCl) em soluções de referência contendo 250 ng L<sup>-1</sup> de todos os REE. Para o estudo do efeito da presença de água régia na determinação do REE por USN-ICP-MS, foi feito o preparo de 25 mL de uma solução estoque concentrada (6,25 mL de HNO<sub>3</sub> + 18,75 mL de HCl) e, posteriormente, foram preparadas soluções contendo 5, 10, 15, 20, 25 e 30% (v v<sup>-1</sup>) de água régia, através de sucessivas diluições da solução estoque com água.

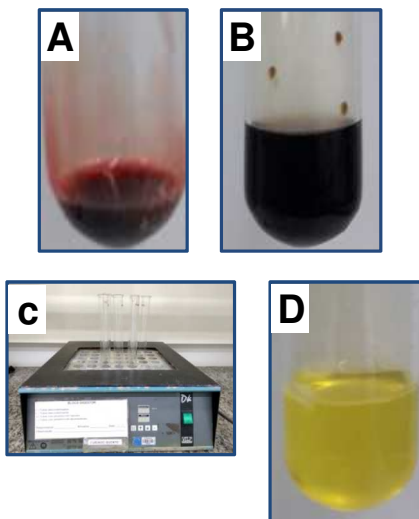
### **3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO UMA ETAPA PRÉVIA DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE**

Neste trabalho, quatro métodos de preparo de amostras foram investigados para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS. Os métodos de preparo de amostras desenvolvidos foram: *i*) CWD-OS, *ii*) CWD-CS, *iii*) MAWD-SRC e *iv*) MIC. Cabe salientar que a MAWD foi utilizada como método de referência para os demais métodos de preparo de amostras desenvolvidos. Os procedimentos utilizados para cada método serão descritos a seguir.

#### **3.7.1 Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS)**

Aproximadamente, 0,4 g de sangue (*in natura* com anticoagulante) foram pesados diretamente no interior dos frascos de vidro com o auxílio de uma seringa e, posteriormente, foi feita a adição de 6 mL de HNO<sub>3</sub>. Os frascos foram fechados e a digestão foi feita em bloco de aquecimento. O programa de aquecimento foi de 60 min a 120 °C. Neste método de preparo de amostra, foi feita a avaliação da concentração de HNO<sub>3</sub> (1, 3, 5, 7, 10 e 14 mol L<sup>-1</sup>). Na Figura 10 são mostradas algumas ilustrações referentes às etapas envolvidas para o procedimento da CWD-OS.

Figura 10 - Procedimento usado no método da CWD-OS para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de vidro, B) frasco de vidro contendo 6 mL de solução digestora, C) etapa de digestão do sangue e D) solução final após CWD-CS.

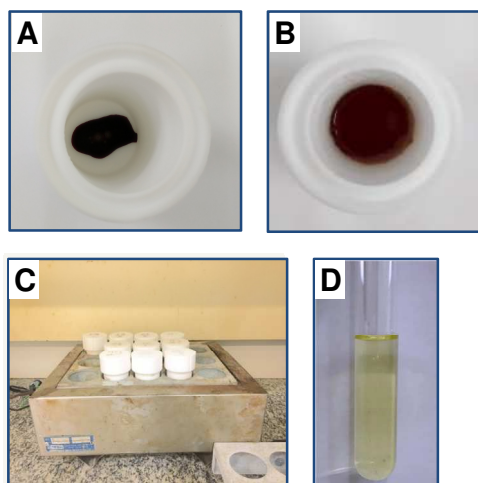


Após o término do programa de aquecimento e o resfriamento dos frascos, as soluções resultantes foram recolhidas em frascos de polipropileno e aferidas a 25 mL com água. Após o procedimento de digestão, os frascos de vidro utilizados foram descontaminados através da adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e aquecimento no bloco de aquecimento por 2 h a 120 °C. Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos em temperatura ambiente.

### 3.7.2 Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado (CWD-CS)

Neste método, cerca de 0,4 g de sangue foram pesados diretamente no interior dos frascos de PTFE com o auxílio de uma seringa e, posteriormente, foi feita a adição da solução de digestão sobre a amostra. Após, os frascos foram fechados e a digestão foi feita em um bloco de aquecimento. O programa de aquecimento foi de 60 min a 200 °C. Na Figura 11 são mostradas fotos de algumas das etapas envolvidas para o procedimento da CWD-CS.

Figura 11 - Procedimento usado no método da CWD-CS para a digestão de sangue: A) sangue pesado no frasco de PTFE, B) frasco de PTFE contendo 6 mL de solução digestora C) etapa de digestão do sangue e D) solução final após CWD-CS.



Após o término do programa de aquecimento e o resfriamento dos frascos, as soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos e aferidas a 25 mL com água. Os frascos de PTFE utilizados na digestão por CWD-CS foram descontaminados através da adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e aquecimento no bloco de aquecimento por 2 h a 120 °C. Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos em temperatura ambiente.

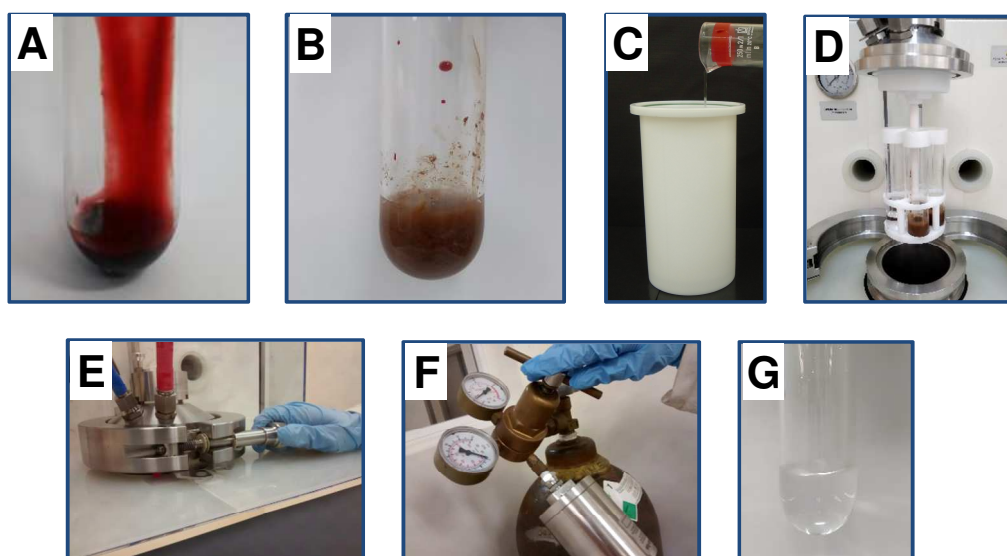
No método da CWD-CS foram avaliados as seguintes condições experimentais: *i*) concentração de  $\text{HNO}_3$  (1, 3, 5, 7, 10 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$ ), *ii*) uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (1 mL) + 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1, 3, 5, 7, 10 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$  (totalizando 6 condições experimentais). A exatidão do método proposto foi avaliada mediante experimentos de recuperação de REE (250 ng  $\text{L}^{-1}$ ).

### 3.7.3 Digestão por via úmida assistida micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC)

No procedimento da MAWD-SRC, aproximadamente 0,4 g de sangue foram pesados diretamente no interior dos frascos de quartzo com o auxílio de uma seringa e, posteriormente, foi feita a adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$  (1, 3, 5, 7, 10 ou 14 mol  $\text{L}^{-1}$ ). Os frascos foram fechados, alocados no rotor, e o mesmo foi inserido em uma cavidade do equipamento a qual continha um copo reacional de PTFE preenchido com uma mistura de 130 mL de água e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Em seguida, fechou-se o grampo da cavidade do forno de micro-ondas e o sistema foi pressurizado com  $\text{Ar}_{(g)}$

até 40 bar. Na Figura 12 são mostradas ilustrações de algumas das etapas referentes ao procedimento da MAWD-SRC.

Figura 12 - Etapas envolvidas na digestão de sangue por MAWD-SRC: A) pesagem de sangue nos frascos de quartzo, B) adição da solução digestora, C) introdução da solução contendo 130 mL de água e 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado no copo reacional de PTFE, D) inserção do rotor com 5 frascos de quartzo automaticamente no interior da cavidade, E) fechamento manual do grampo metálico, F) pressurização com Ar<sub>(g)</sub> até 40 bar e G) solução obtida após MAWD-SRC.



Na Tabela 10 é possível observar o programa de irradiação utilizado para a digestão de sangue por MAWD-SRC.

Tabela 10 - Programa de irradiação utilizado para a digestão de sangue por MAWD-SRC.

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	130	10	10
2	150	5	5
3	T	15	15
4 <sup>a</sup>	45	30	-

T= 200, 220, 250 ou 270 °C; <sup>a</sup>Etapa de resfriamento.

A pressão e a potência máximas aplicadas durante a digestão do sangue foram fixadas em 160 bar e 1500 W, respectivamente, e estes parâmetros foram



mantidos durante todo o desenvolvimento do presente trabalho. A temperatura mínima para início da despressurização do sistema, bem como a taxa de despressurização foram de 80 °C e 10 bar min<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a etapa de resfriamento, o grampo metálico foi aberto e o rotor retirado do equipamento de micro-ondas. Os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e o volume de 25 mL foi completado com água.

A otimização do método da MAWD-SRC foi feita usando os frascos de quartzo com volume interno de 80 mL. Após cada digestão, os frascos foram descontaminados com 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup> usando o seguinte programa de irradiação: *i*) 15 min a 250 °C (rampa de 10 min) e *ii*) 30 min até 45 °C (etapa de resfriamento). Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido.

Além da condição experimental supracitada, foram otimizados outros parâmetros experimentais para avaliar a eficiência do método da MAWD-SRC: *i*) massa de sangue (0,4 a 2 g), *ii*) concentração de HNO<sub>3</sub> (1 a 14 mol L<sup>-1</sup>), *iii*) temperatura de aquecimento (200 a 270 °C) e *iv*) tempo de irradiação micro-ondas (5 a 20 min) na temperatura otimizada. Adicionalmente, foi feito um experimento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (1 mL) juntamente com 5 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. A exatidão do método proposto foi avaliada mediante experimentos de recuperação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>).

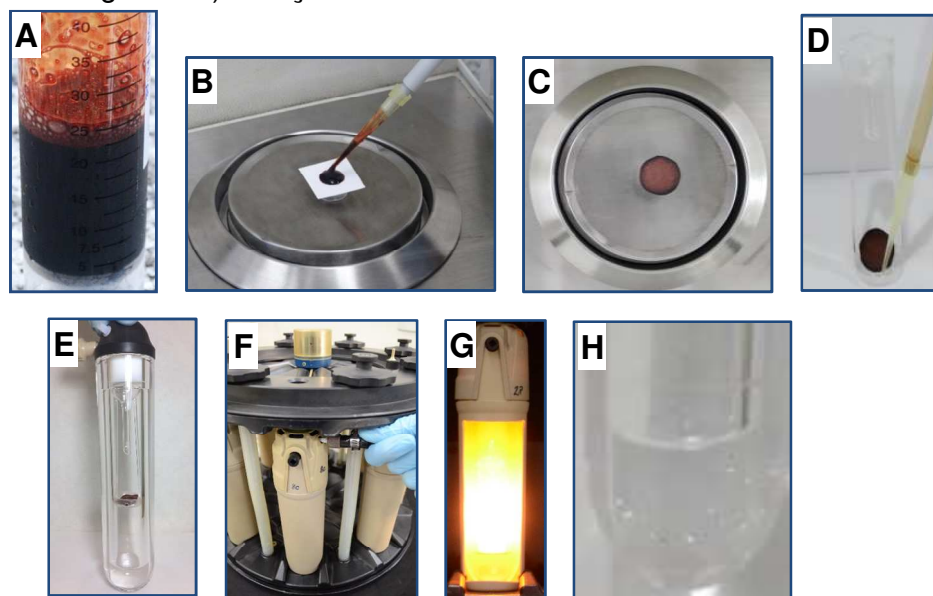
#### **3.7.4 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)**

A digestão de sangue por MIC foi feita com base em um trabalho prévio (Waechter, 2017)<sup>26</sup>. Nesse procedimento, aproximadamente 170 mg de amostra foram pesados, com o auxílio de uma seringa, diretamente em discos de papel de DBS (utilizado para amostragem de sangue capilar). No entanto, no presente trabalho, para a otimização do método da MIC, foram utilizados 3 papéis de DBS, totalizando uma massa de 400 mg. Após a pesagem do sangue, os papéis foram colocados em uma capela de fluxo laminar para a secagem.

Posteriormente, os papéis de DBS contendo o sangue absorvido foram posicionados sobre o suporte de quartzo, contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 µL de uma solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6 mol L<sup>-1</sup> (utilizado como iniciador de combustão). Para a otimização do método da MIC, foi feita a adição dos analitos na amostra A, de modo que a concentração final foi de 250 ng L<sup>-1</sup> em 25 mL. Após

esta etapa, os suportes de quartzo contendo a amostra foram inseridos nos frascos de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora. Em seguida, os frascos foram fechados, fixados no rotor e pressurizados com 20 bar de  $O_2$ . O programa de irradiação foi *i*) 900 W por 5 min (combustão e refluxo) e *ii*) 0 W por 20 min (resfriamento). Na Figura 13 estão mostradas as fotos referentes as etapas envolvidas na digestão do sangue por MIC.

Figura 13 - Procedimento usado no método da MIC para adigestão de sangue: A) sangue, B) pesagem de sangue no papel de DBS, C) papel de DBS contendo o sangue seco, D) adição de  $NH_4NO_3$  usado como iniciador de combustão no papel filtro inserido em um suporte de quartzo, E) frasco de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora e suporte de quartzo contendo a amostra, F) frascos fixados no rotor e pressurização dos frascos de quartzo com 20 bar de  $O_{2(g)}$ , G) etapa de combustão do sangue e H) solução final contendo os REE absorvidos na solução.



Após o término do programa de irradiação e resfriamento dos frascos, o conjunto foi retirado do forno micro-ondas e a válvula de alívio dos gases, posicionada na tampa, foi aberta. Após, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e o volume de 25 mL foi completado com água. Os frascos e os suportes de quartzo utilizados na digestão por MIC foram descontaminados usando 6 mL de  $HNO_3$  concentrado sob irradiação micro-ondas por 10 min a 1400 W. Posteriormente, os frascos e os suportes foram lavados com água e secos com ar comprimido.

No método da MIC foram avaliados os seguintes parâmetros experimentais: *i*) massa de sangue possível de ser absorvida em cada papel de DBS (0,15 a 0,2 g), *ii*) massa de amostra a ser digerida (0,15 a 0,45 g), *iii*) concentração de HNO<sub>3</sub> (1 a 14 mol L<sup>-1</sup>), *iv*) avaliação do uso de HNO<sub>3</sub>+HCl (1+3, 1+2 e 3+1) e *v*) concentração de água régia (25, 50 e 100%).

### 3.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO E DA ACIDEZ RESIDUAL

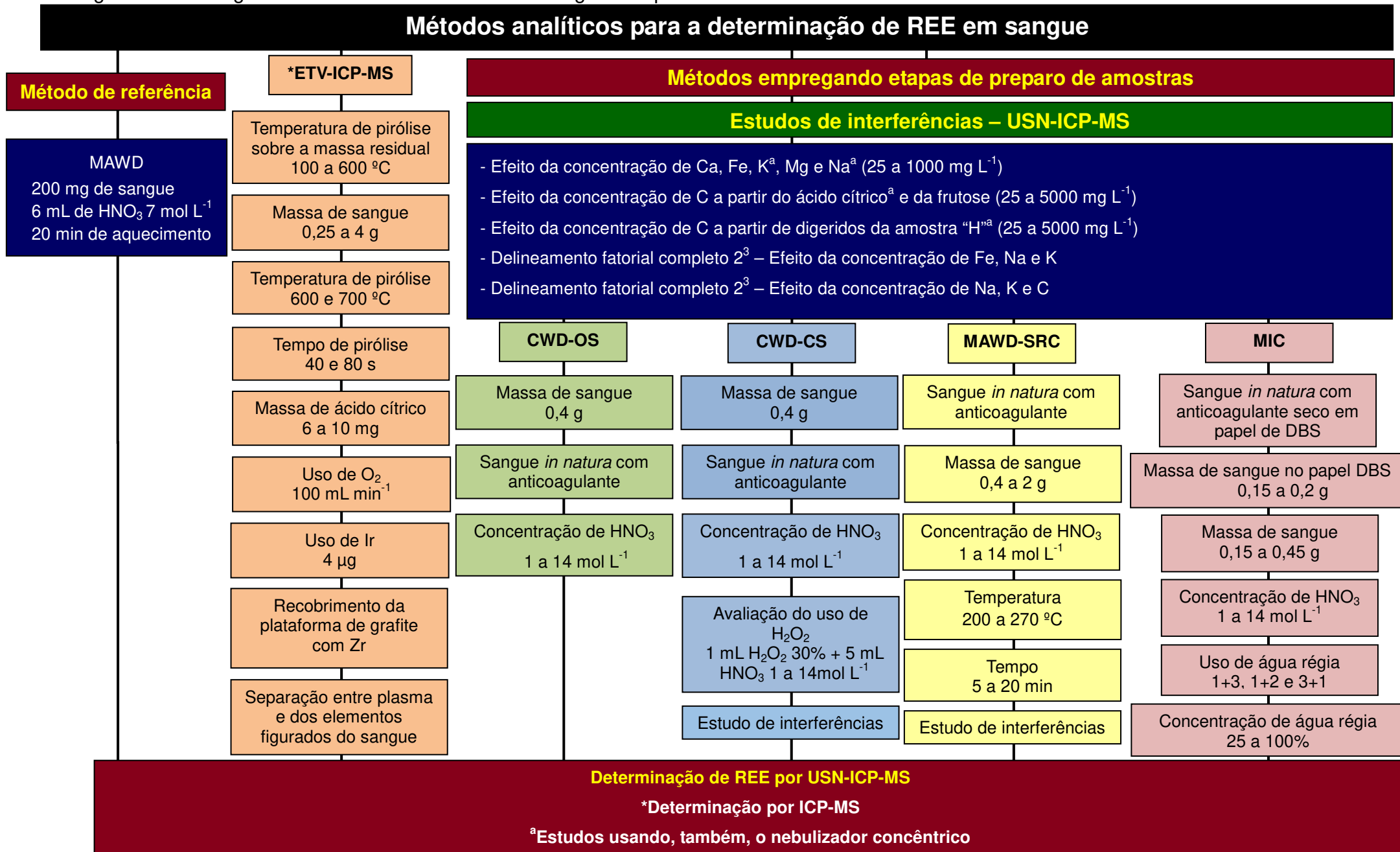
A concentração de carbono presente nas soluções obtidas após CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC foi determinada por ICP-OES. As amostras foram diluídas em HNO<sub>3</sub> 5% e Y foi utilizado como padrão interno (adicionado nos padrões e nas amostras em uma concentração final de 1 mg L<sup>-1</sup>). Previamente à etapa de determinação, as soluções foram purgadas com argônio por 2 min para eliminação dos gases dissolvidos<sup>74</sup>.

A concentração de HNO<sub>3</sub> nos digeridos após CWD-OS, CWD-CS e MAWD-SRC foi feita por titulação potenciométrica em meio aquoso. Para isso, aproximadamente, 150 mg das soluções resultantes das digestões pelos métodos de preparo de amostras desenvolvidos foram diluídas com 20 mL de água, em frascos de vidro, e tituladas com uma solução de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, previamente padronizada com biftalato de potássio.

### 3.9 RESUMOS DOS PROCEDIMENTOS

No presente trabalho, cinco métodos foram investigados visando à obtenção de protocolos analíticos adequados para determinação de REE em sangue. Além disso, foi feito um estudo de possíveis interferências durante a determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS e ICP-MS. Na Figura 14 é apresentado um fluxograma com um resumo dos parâmetros experimentais avaliados e descritos nessa seção.

Figura 14 - Fluxograma dos métodos analíticos investigados e parâmetros avaliados nos estudos de interferências.



#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dos métodos analíticos para a determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS. Além disso, serão apresentados os resultados referentes ao estudo de possíveis interferências oriundas da matriz. Posteriormente, será feita uma discussão quanto às principais características dos métodos analíticos investigados.*

## 4.1 AMOSTRAS

Na primeira etapa deste trabalho foi feita a coleta de sangue venoso de 30 pessoas. A partir das amostras coletadas, foram preparadas três amostras compostas (A, B e C) com aproximadamente 40 mL cada. Adicionalmente, amostras de sangue bovino e suíno (amostras D e E, respectivamente) e amostras de fígado bovino e suíno (amostras F e G, respectivamente) foram adquiridas de um frigorífico de Santa Maria - RS. Cabe destacar que para as amostras de origem bovina e suína, a amostra de sangue e fígado corresponderam ao mesmo animal. Ainda, uma amostra adicional de fígado bovino (amostra H) também foi adquirida em um supermercado da mesma cidade. Após, as amostras foram caracterizadas quanto ao teor de água e de metais.

### 4.1.1 Determinação do teor de água do sangue e fígado

Para a determinação do teor de água, 1 e 5 g de sangue e fígado, respectivamente, foram liofilizados durante 72 h. O teor de umidade foi calculado com base na diferença entre a massa seca obtida após o processo de liofilização e a massa de sangue total inicial. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor de água nas amostras de sangues e fígado após procedimento de liofilização durante 72 h.

Amostra	Tipo de amostra	Teor de água, %
A	Sangue humano	70,8 ± 0,3
B	Sangue humano	73,0 ± 0,4
C	Sangue humano	75,6 ± 0,5
D	Sangue bovino	78,8 ± 0,2
E	Sangue suíno	81,5 ± 0,3
F	Fígado bovino	68,4 ± 0,4
G	Fígado suíno	66,9 ± 0,4
H	Fígado bovino	70,5 ± 0,3

Verificou-se que, de maneira geral, as amostras de sangue possuem teor de água maior do que as amostras de fígado (independente da origem). Ainda, foi observado que o teor de água entre os sangues (humanos, bovinos e suínos) variaram de  $70,8 \pm 0,3$  (amostra A) a  $81,5 \pm 0,3\%$  (amostra E), enquanto que para o fígado (suíno e bovino) variaram de  $66,9 \pm 0,4$  (amostra G) a  $70,5 \pm 0,3$  (amostra H).

#### **4.1.2 Determinação de metais em sangue e fígado após digestão por via úmida assistida por micro-ondas**

Atualmente são bem conhecidos os efeitos adversos que à presença de certos metais pode causar nos sistemas biológicos<sup>132,133</sup>. Dessa maneira, torna-se importante, também, a determinação desses elementos em amostras biológicas.

As condições experimentais do método da MAWD para a posterior determinação de metais em sangue foram adaptadas de um trabalho prévio<sup>26</sup>. Para a etapa de digestão, aproximadamente 200 mg de sangue foram pesados diretamente nos frascos de quartzo com o auxílio de uma seringa e, em seguida, 6 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados sobre a amostra.

Inicialmente, os frascos contendo o sangue e o  $\text{HNO}_3$  foram deixados abertos e em repouso durante 30 min (em temperatura ambiente) para uma etapa de pré-reação evitando, assim, um brusco aumento de pressão durante a digestão. O procedimento utilizado e o programa de irradiação estão descritos no item 3.4.2 (*Materiais e Métodos*).

A digestão de fígado foi feita por MAWD-SRC, também com base em um trabalho prévio<sup>130</sup>. Para este procedimento, aproximadamente 500 mg de fígado (liofilizado) foram pesados diretamente no interior dos frascos de quartzo e 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados sobre a amostra. O procedimento utilizado e o programa de irradiação estão descritos no item 3.4.3 (*Materiais e Métodos*).

Em ambos os métodos de digestão, os digeridos apresentaram aspecto límpido, sem à presença de resíduos sólidos. Após a coleta das soluções, a determinação de metais foi feita por ICP-MS e ICP-OES. Os resultados podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização elementar de sangue e fígado após MAWD e MAWD-SRC, respetivamente. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  $n = 3$ . Determinações feitas por (a) ICP-MS e (b) ICP-OES.

Elemento	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Al <sup>b</sup>	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	2,27 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,101	3,36 $\pm$ 0,305	2,42 $\pm$ 0,112
As <sup>a</sup>	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,034 $\pm$ 0,001	0,014 $\pm$ 0,001	0,012 $\pm$ 0,001
Ba <sup>a</sup>	< 0,03	0,073 $\pm$ 0,002	< 0,03	0,082 $\pm$ 0,004	0,059 $\pm$ 0,002	0,068 $\pm$ 0,004	0,088 $\pm$ 0,005	0,122 $\pm$ 0,007
Ca <sup>b</sup>	59,2 $\pm$ 1,5	55,9 $\pm$ 1,8	70,4 $\pm$ 2,6	63,6 $\pm$ 3,7	65,2 $\pm$ 1,5	128 $\pm$ 6	140 $\pm$ 8	148 $\pm$ 6
Cd <sup>a</sup>	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,088 $\pm$ 0,001	0,041 $\pm$ 0,002	0,152 $\pm$ 0,006
Co <sup>a</sup>	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,158 $\pm$ 0,013	0,123 $\pm$ 0,014	0,142 $\pm$ 0,012
Cr <sup>a</sup>	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	0,516 $\pm$ 0,006	0,165 $\pm$ 0,012	0,604 $\pm$ 0,035
Cu <sup>b</sup>	0,881 $\pm$ 0,015	1,03 $\pm$ 0,05	0,668 $\pm$ 0,017	0,411 $\pm$ 0,018	0,668 $\pm$ 0,017	199 $\pm$ 10	14,6 $\pm$ 0,8	188 $\pm$ 11
Fe <sup>b</sup>	440 $\pm$ 22	496 $\pm$ 10	451 $\pm$ 38	418 $\pm$ 35	405 $\pm$ 12	160 $\pm$ 13	810 $\pm$ 25	240 $\pm$ 16
K <sup>b</sup>	1575 $\pm$ 144	2332 $\pm$ 119	1770 $\pm$ 124	860 $\pm$ 42	1050 $\pm$ 88	8951 $\pm$ 430	9524 $\pm$ 716	9186 $\pm$ 459
Mg <sup>b</sup>	30,9 $\pm$ 1,6	37,3 $\pm$ 1,4	32,0 $\pm$ 2,5	29,6 $\pm$ 2,3	26,5 $\pm$ 0,7	569 $\pm$ 37	729 $\pm$ 52	573 $\pm$ 19
Mn <sup>a</sup>	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,311 $\pm$ 0,013	8,01 $\pm$ 0,09	7,75 $\pm$ 0,48	9,68 $\pm$ 0,91
Mo <sup>a</sup>	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,012 $\pm$ 0,001	3,90 $\pm$ 0,44	4,11 $\pm$ 0,14	2,80 $\pm$ 0,82
Na <sup>b</sup>	1450 $\pm$ 110	1865 $\pm$ 150	1329 $\pm$ 108	1876 $\pm$ 62	1977 $\pm$ 95	1911 $\pm$ 101	2552 $\pm$ 43	2236 $\pm$ 143
Ni <sup>a</sup>	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	0,409 $\pm$ 0,062	0,181 $\pm$ 0,008	0,322 $\pm$ 0,003
Pb <sup>a</sup>	< 0,01	0,018 $\pm$ 0,002	< 0,01	< 0,01	0,021 $\pm$ 0,002	< 0,005	0,076 $\pm$ 0,008	< 0,005
Sn <sup>a</sup>	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,07	< 0,07	< 0,07
Sr <sup>a</sup>	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	0,104 $\pm$ 0,005	0,158 $\pm$ 0,006	0,091 $\pm$ 0,004
V <sup>a</sup>	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	< 0,12	0,008 $\pm$ 0,001	0,046 $\pm$ 0,002	0,007 $\pm$ 0,001
Zn <sup>b</sup>	< 3,00	< 3,00	< 3,00	3,27 $\pm$ 0,09	< 3,00	99,5 $\pm$ 6,9	154 $\pm$ 8	91,9 $\pm$ 4,5

Digestão de sangue: 250 mg (MAWD)

Digestão de fígado: 500 mg - liofilizado (MAWD-SRC)



De maneira geral, as amostras de fígado (F, G e H) apresentaram as maiores concentrações de metais (especialmente metais alcalinos e alcalino-terrosos), quando comparadas às amostras de sangue (Tabela 12). Cabe salientar que o fígado é responsável pelo desempenho de diversas funções no organismo humano, como o metabolismo de macronutrientes, regulação do volume sanguíneo e a quebra de compostos xenobióticos, incluindo alguns medicamentos<sup>134,135</sup>. Desta forma, o fígado pode acumular elementos (incluindo os tóxicos) que, por sua vez, não são facilmente eliminados<sup>134</sup>.

Ainda, conforme mostrado na Tabela 12, foi observado que, tanto o sangue quanto o fígado, apresentaram concentrações muito baixas de As, Cd, Cr e Pb, elementos sem ainda função biológica essencial conhecida (Cd e Pb).

Por outro lado, Ca, Fe, K, Mg e Na por exemplo, presentes em altas concentrações, tanto no sangue, como no fígado, desempenham importantes funções no organismo. Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , ajudam no regulamento da distribuição de água ao longo do organismo, atuando no controle da pressão osmótica<sup>136</sup>. Ainda, o Mg é um co-fator metabólico em várias funções metabólicas, como por exemplo, na bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e pode auxiliar no metabolismo do  $\text{Ca}^{+2}$ , que, por sua vez auxilia na formação dos ossos e pode ajudar na diminuição da pressão arterial<sup>137</sup>. O Fe, assim como os demais elementos, é essencial para o organismo, visto que ele está presente na hemoglobina, sendo a responsável pelo transporte de oxigênio ao longo do organismo<sup>138</sup>.

É importante mencionar que tanto a concentração de metais, presentes no sangue quanto no fígado estão concordantes com a concentração obtida para esses elementos e para essas amostras em trabalhos dispostos na literatura<sup>26,74</sup>.

#### **4.1.3 Determinação de REE em sangue após digestão por via úmida assistida por micro-ondas**

Inicialmente, foi feita a digestão das amostras de sangue por MAWD baseadas em um trabalho prévio para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS<sup>26</sup>. A descrição do procedimento está descrita no item 3.4.2 (Materiais e Métodos). Esses experimentos foram feitos com o objetivo de obter os valores de referência para os REE nas amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Determinação de REE em sangue após MAWD. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ),  $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS.

Elemento	Concentração, $\text{ng g}^{-1}$				
	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
Dy	< 7,5	< 7,5	< 7,5	< 7,5	< 7,5
Er	< 6,3	< 6,3	< 6,3	< 6,3	< 6,3
Eu	< 6,9	< 6,9	< 6,9	< 6,9	< 6,9
Gd	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
Ho	< 3,3	< 3,3	< 3,3	< 3,3	< 3,3
La	< 25,2	< 25,2	< 25,2	< 25,2	< 25,2
Lu	< 6,5	< 6,5	< 6,5	< 6,5	< 6,5
Nd	< 18,8	< 18,8	< 18,8	< 18,8	< 18,8
Pr	< 16,3	< 16,3	< 16,3	< 16,3	< 16,3
Sm	< 17,4	< 17,4	< 17,4	< 17,4	< 17,4
Tb	< 6,3	< 6,3	< 6,3	< 6,3	< 6,3
Tm	< 7,0	< 7,0	< 7,0	< 7,0	< 7,0
Y	< 25	< 25	< 25	< 25	< 25
Yb	< 7,5	< 7,5	< 7,5	< 7,5	< 7,5

Como pode ser observado na Tabela 13, todos os REE ficaram abaixo dos LOQs em todas as amostras após a digestão por MAWD e determinação por USN-ICP-MS. Dessa forma, considerando as baixas concentrações desses elementos nesse tipo de amostra, o desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitem a obtenção de baixos LOQs são fundamentais.

#### 4.2 VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA E ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ETV-ICP-MS)

A determinação de REE em plasma sanguíneo por ETV-ICP-MS foi feita por Wibetoe e colaboradores<sup>25</sup>. No entanto, há muitas dúvidas quanto ao desenvolvimento deste estudo. Dentre os problemas observados, os autores não descrevem o desvio padrão da concentração dos REE presentes nas amostras. Ainda, os autores mencionam que não foi possível a determinação de Ce devido à

uma fonte desconhecida de contaminação. É importante mencionar que nesse trabalho, não foi feito o monitoramento do sinal do  $\text{Ar}_2^+$  ( $m/z$  78) para verificar possíveis mudanças na estabilidade do plasma. Dessa maneira, surge a necessidade do desenvolvimento de um método adequado que possibilite avaliar as possíveis interferências para a determinação de REE em sangue por ETV-ICP-MS.

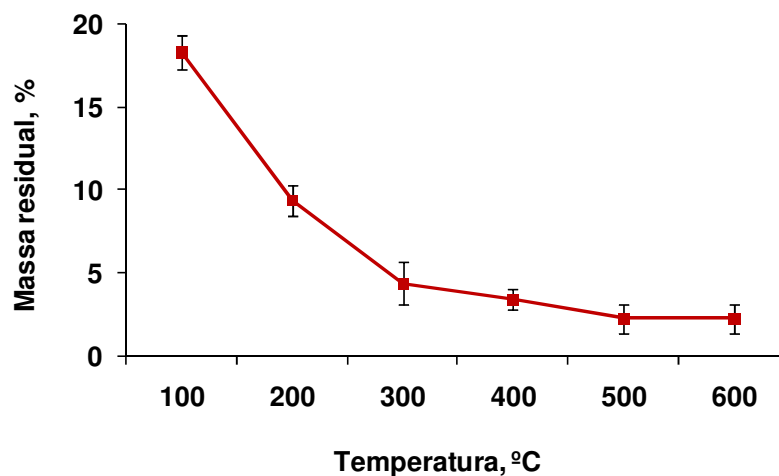
No presente estudo, como condição inicial, e conforme demonstrado por Silva e colaboradores<sup>23</sup>, todos os experimentos foram feitos utilizando Freon R-12 (gás halogenado) para favorecer a volatilização dos REE na etapa de vaporização.

#### **4.2.1 Avaliação da temperatura de pirólise sobre a massa residual da amostra de sangue**

Com a finalidade de verificar o comportamento térmico do sangue em função da temperatura aplicada no sistema de ETV, bem como auxiliar na escolha da temperatura de pirólise, foram feitos alguns experimentos de perda de massa de sangue. A etapa de pirólise foi avaliada com base em trabalhos prévios, usando 4 mg de sangue e etapas de 40 s (rampa) e 40 s de permanência em cada temperatura avaliada (100 a 600 °C)<sup>120,139</sup>. A vazão do gás carreador e do gás *bypass* foi de 0,40 L min<sup>-1</sup>.

A perda de massa foi calculada com base na diferença de massa da plataforma antes e depois da simulação da etapa de pirólise. O resultado foi representado considerando a massa inicial como sendo 100%. Na Figura 15 é possível observar o perfil de perda de massa em função da temperatura.

Figura 15 - Efeito da temperatura de pirólise sobre a massa residual de sangue. As barras representam o desvio padrão (n=3).

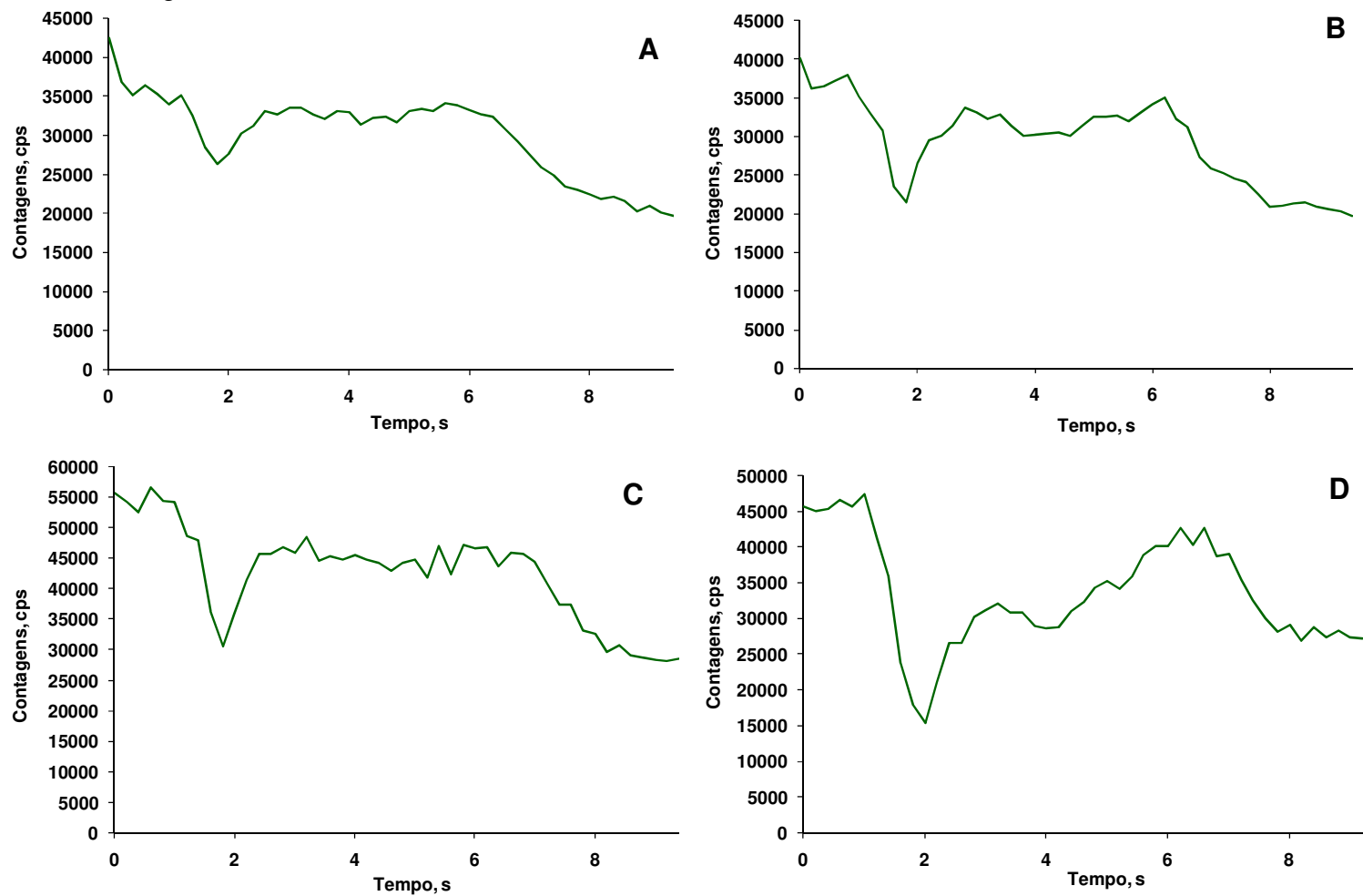


De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, é possível observar que quando a temperatura de 100 °C foi aplicada, obteve-se uma massa residual de amostra de aproximadamente 18%. Esse resultado já era esperado, visto que o sangue é composto majoritariamente por água (70 a 80%). Para temperaturas superiores a 300 °C, a massa residual foi menor do que 5%, o que indica a eliminação da maior parte da matriz original. No entanto, nessa temperatura há a possibilidade da presença de alguns concomitantes remanescentes na plataforma (como sais de Na, K e Fe, por exemplo). Esses elementos não são eliminados quando essa temperatura é aplicada, podendo, então, causar interferências na etapa da medida dos REE<sup>140</sup>.

#### 4.2.2 Avaliação da massa de sangue

A massa de sangue é um parâmetro importante que deve ser avaliado com cautela em estudos por ETV-ICP-MS. No presente trabalho, foram avaliadas massas de sangue de 0,25 a 4 mg. O programa de aquecimento utilizado para estas avaliações está descrito na Tabela 7 (Item 3.5, *Materiais e Métodos*). Cabe salientar que, em todas as avaliações da ETV-ICP-MS, foi feito o monitoramento do sinal do  $Ar_2^+$  ( $m/z$  78) para verificar possíveis oscilações na medida. Na Figura 16 é possível observar o sinal do  $Ar_2^+$  obtido para todas as massas de sangue avaliadas.

Figura 16 - Avaliação da massa de sangue no sistema ETV-ICP-MS sobre a intensidade do  $Ar_2^+$ : A) 0,25 mg; B) 0,5 mg; C) 2 mg e D) 4 mg. Condições: temperatura de pirólise de 300 °C (40 s) e vaporização de 2200 °C (6 s); vazão do gás *bypass* de 0,40 L min<sup>-1</sup>; gás carreador de 0,40 L min<sup>-1</sup> e freon de 2,00 mL min<sup>-1</sup>.



Como pode ser observado na Figura 16, independentemente da massa de sangue utilizada (na faixa de 0,25 a 4 mg), foi observada a supressão da intensidade do sinal do  $\text{Ar}_2^+$ . Ainda, é possível observar que à medida que a massa de sangue aumenta, o efeito de supressão é cada vez mais pronunciado. De acordo com os resultados, a diminuição da intensidade do sinal do  $\text{Ar}_2^+$  foi na ordem de 40 a 70% quando foram utilizadas massas de sangue de 0,25 e 4 mg, respectivamente.

Os resultados observados na Figura 16 podem ser explicados por duas hipóteses. A primeira delas refere-se ao pequeno tempo de abertura da válvula do gás Freon R-12 antes da vaporização (visto que é necessário um tempo de estabilização do plasma quando o Freon R-12 chega até o mesmo). Neste caso, a abertura da válvula do gás Freon R-12 foi feita 20 s antes do início da vaporização. Cabe destacar, que alguns trabalhos relatam que esse tempo seria suficiente para a estabilização do plasma antes da volatilização dos REE<sup>23,120</sup>. Por outro lado, a segunda hipótese sugere que possíveis constituintes da matriz (como o Fe, K e Na) são volatilizados juntamente com os REE na etapa de vaporização causando a supressão do sinal quando estes chegam ao plasma. Cabe destacar que os experimentos foram feitos utilizando 0,25 mg de sangue.

Com o objetivo de avaliar se os problemas de supressão sinal do  $\text{Ar}_2^+$  observados era influenciado pelo tempo de abertura da válvula do gás Freon R-12, foram feitos dois experimentos adicionais. Dessa forma, foi aumentado o tempo de estabilização do plasma para 30 e 40 s após a introdução do gás Freon R-12 no sistema de ETV para que a etapa de vaporização fosse feita. Em ambas as situações, independente da massa de amostra utilizada, observou-se efeitos de supressão de sinal do  $\text{Ar}_2^+$ .

De acordo com os resultados observados (Figura 15), embora 95% da massa total de sangue seja eliminada usando 300 °C, os constituintes inorgânicos majoritários presentes no sangue (Fe, Na e K) permanecem na plataforma. Estes constituintes podem ser volatilizados no decorrer do programa de aquecimento e, com isso, chegar até o plasma e causar interferências na determinação dos REE. Alguns trabalhos mencionam alterações no plasma devido à presença de elementos facilmente ionizáveis, como Na e K. Dentre esses efeitos, destacam-se mudanças nos equilíbrios de ionização, efeito espaço carga e, até mesmo, mudanças de energia do plasma<sup>103,141</sup>. Dessa maneira, considerando todos os concomitantes presentes no sangue (principalmente os sais dos metais alcalinos e alcalino-

terrosos), subsequentes experimentos foram feitos de modo a solucionar os efeitos de supressão de sinal de  $\text{Ar}_2^+$  para a posterior determinação dos REE por ETV-ICP-MS.

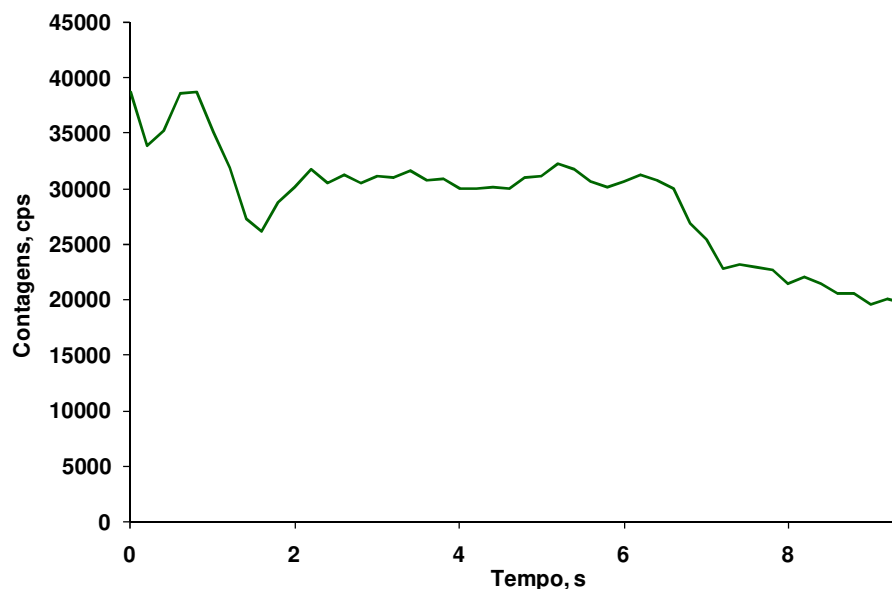
#### 4.2.3 Avaliação da temperatura pirólise

De maneira geral, a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite do sistema de ETV é feito através da avaliação das curvas de pirólise e atomização. Conforme mencionado no *item 4.3 (Resultados)*, foram observadas interferências, possivelmente oriundas da presença de Fe, K e Na, que são constituintes majoritários do sangue. Conforme é sabido, esses elementos não são facilmente volatilizados e, por isso, a otimização da temperatura de pirólise torna-se importante com o objetivo de tentar eliminar esses elementos antes da vaporização dos REE. No entanto, a otimização da temperatura de pirólise não é uma tarefa simples e, no caso dos REE, uma atenção ainda maior deve ser dada visto que as temperaturas de volatilizações destes elementos são superiores a 1600 °C (na forma de cloretos)<sup>140</sup>.

De acordo com Silva<sup>120</sup>, foram observadas perdas dos REE quando temperaturas de pirólise superiores a 700 °C foram avaliadas usando soluções de referência. Essa é uma conclusão importante, tendo em vista que, usualmente, a calibração do sistema de ETV-ICP-MS é feita usando soluções de referência. Por este motivo, visando à determinação de REE por ETV-ICP-MS, a temperatura de pirólise fica limitada a 700 °C, se a calibração do sistema for feita com solução de referência. Cabe mencionar que não há disponibilidade de CRMs com concentração conhecida dos REE para sangue, o que dificulta a possibilidade de calibrar o equipamento de ETV-ICP-MS com este tipo de material.

Considerando os aspectos mencionados anteriormente, foi feito o monitoramento do sinal analítico do  $\text{Ar}_2^+$  na máxima temperatura de pirólise que poderia ser utilizada (700°C) sem que houvesse perdas significativas dos analitos em solução. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 17.

Figura 17 - Efeito da temperatura de pirólise sobre a intensidade do  $\text{Ar}_2^+$ . Condições: 0,25 mg de sangue, 40 s de permanência na etapa de pirólise; vaporização a 2200 °C (6 s); vazão do gás *bypass* de 0,40 L  $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L  $\text{min}^{-1}$  e freon de 2,00 mL  $\text{min}^{-1}$ .



Como pode ser observado na Figura 17, ocorreu a supressão de intensidade do sinal do  $\text{Ar}_2^+$  (aproximadamente 36%), mesmo usando temperatura de pirólise de 700 °C por 40 s. Dessa maneira não é possível eliminar a interferência de Fe, K e Na usando temperaturas de pirólise de até 700 °C. Esse resultado era esperado, uma vez que Fe, Na e K possuem temperatura de volatilização superior a 650 °C mesmo associado a cloretos<sup>140</sup>.

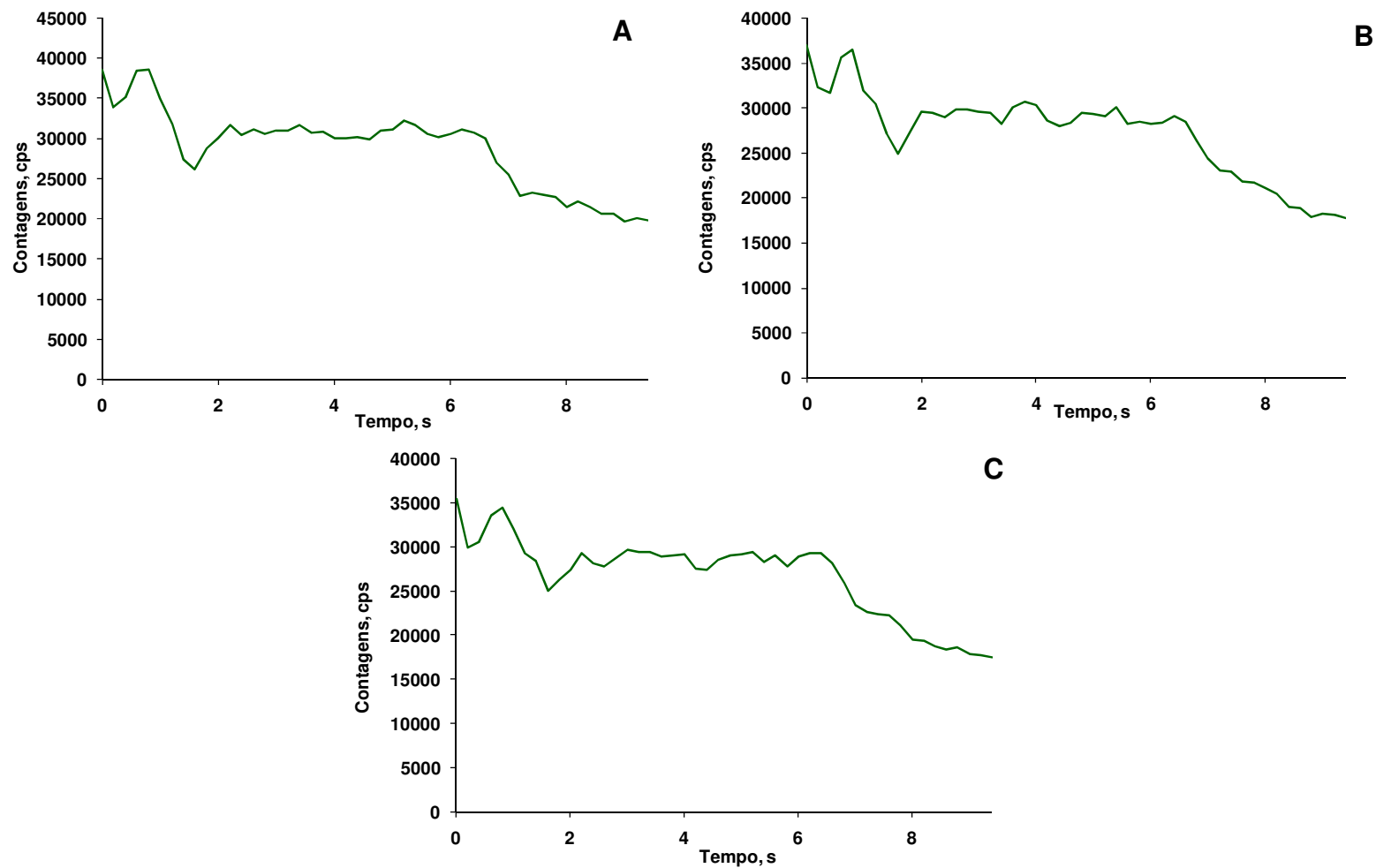
Cabe resaltar que os resultados obtidos são discordantes com o estudo proposto por Wibetoe e colaboradores<sup>25</sup>. Nesse estudo, os autores utilizaram temperatura de pirólise de 1400 °C mesmo usando calibração com soluções de referência. Os autores não comentaram sobre eventuais perdas dos REE durante o aquecimento na etapa de calibração do equipamento

#### 4.2.4 Avaliação do tempo de pirólise

O tempo de pirólise foi avaliado para verificar se poderia ocorrer a volatilização de Fe, K e Na em tempos de 40, 60 e de 80 s a 700 °C. Os resultados obtidos para o sinal analítico do  $\text{Ar}_2^+$  podem ser observados na Figura 18.



Figura 18 - Efeito do tempo de pirólise em 700 °C sobre a intensidade do  $Ar_2^+$ : A) 40 s; B) 60 s e C) 80 s. Condições: vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; vazão do gás *bypass* de 0,40 L min<sup>-1</sup>; gás carreador de 0,40 L min<sup>-1</sup> e freon de 2,00 mL min<sup>-1</sup>.



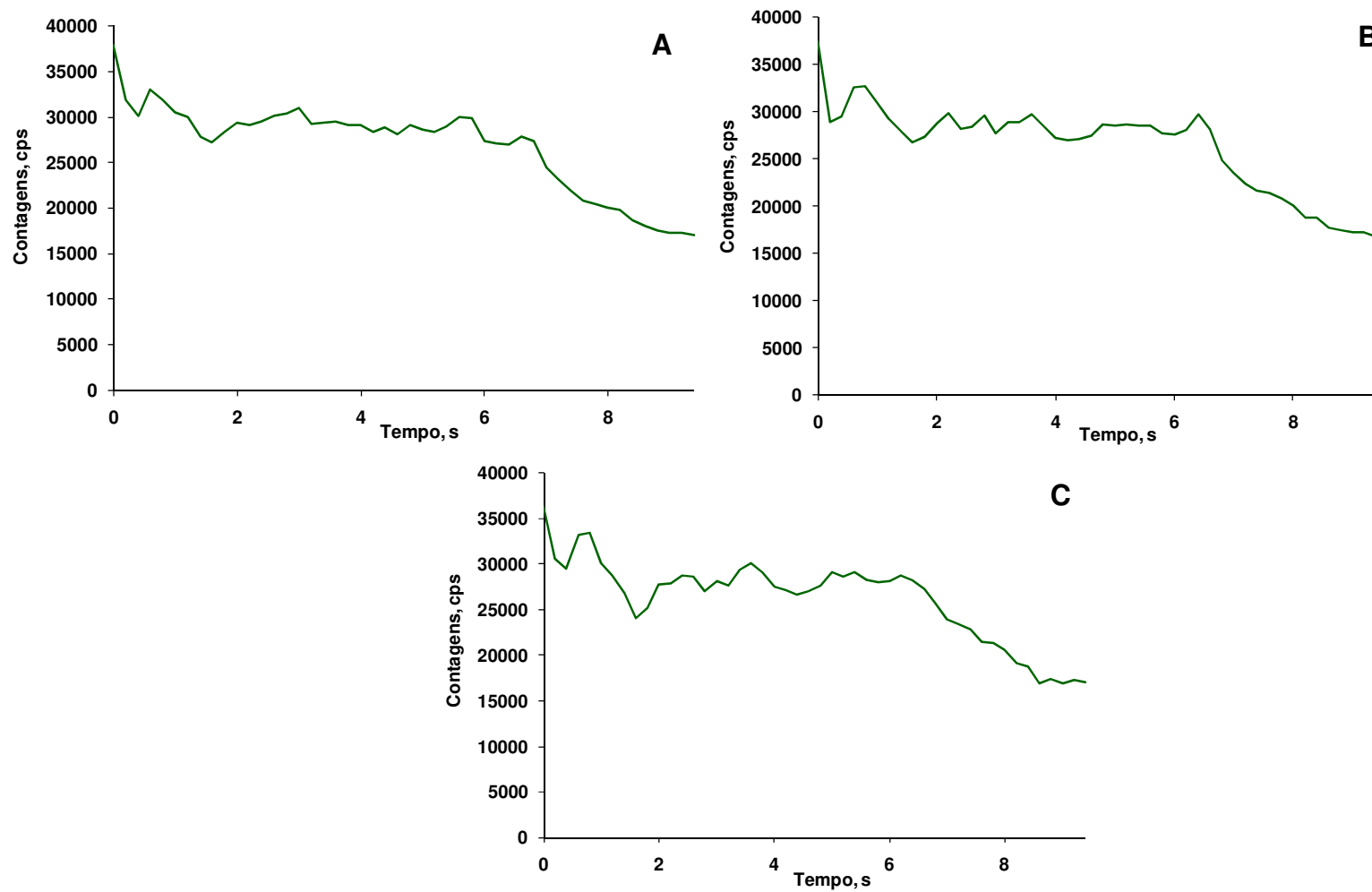
Como pode ser observado (Figura 18), ocorreu a supressão do sinal do  $\text{Ar}_2^+$  para todos os REE em todos os tempos de permanência avaliados (40 a 80 s) em 700 °C (temperatura de pirólise). Dessa maneira, optou-se por manter o tempo de 40 s na etapa de pirólise. Esses resultados evidenciam que os elementos que possivelmente estão causando a supressão do sinal (Fe, K e Na) não são removidos de maneira fácil da plataforma de grafite (nessa temperatura). É importante mencionar que não é possível usar modificadores halogenados na etapa de pirólise, pois os REE podem ser facilmente perdidos por volatilização na forma de cloretos.

#### 4.2.5 Avaliação da massa de ácido cítrico

De acordo com Silva et. al.<sup>23</sup> observou-se que a intensidade do sinal para os REE aumentou, ao passo que os RSDs diminuiram com o uso de ácido cítrico como modificador orgânico. O mecanismo de ação dos modificadores orgânicos no processo de atomização ainda não é bem conhecido, mas a formação de gases com propriedades redutoras ( $\text{H}_2$  e  $\text{CO}$ ) gerados pela decomposição térmica do ácido cítrico na etapa de pirólise, pode favorecer a redução dos óxidos REE. Ainda, a formação de C amorfo (em aproximadamente 900 °C), bem como sua liberação por meio da decomposição e formação de espécies ativas de C (em temperaturas superiores a 900 °C) podem ser possíveis justificativas para o aumento da intensidade dos REE<sup>125,126,139</sup>. Adicionalmente, o uso do ácido cítrico pode aumentar a eficiência de transporte dos REE até o plasma, pois as espécies ativas de C podem formar um aerossol estável devido a formação de *clusters*<sup>14,125,126,142</sup>.

Dessa forma, considerando-se os aspectos mencionados, foi feita a avaliação do uso do ácido cítrico para verificar se a sua decomposição térmica poderia acelerar a volatilização dos interferentes e, conseqüentemente, a eliminação destes. Ainda, essa avaliação foi feita para verificar se o uso do ácido cítrico poderia favorecer a formação de carbetos dos elementos interferentes, fixando-os à plataforma de grafite durante a vaporização. Para isso, foram avaliadas massas de ácido cítrico de 6, 8 e 10 mg (a partir de uma solução de 400 g  $\text{L}^{-1}$ ) e foi feito o monitoramento do sinal do  $\text{Ar}_2^+$ . Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 - Efeito da massa do ácido cítrico sobre a intensidade do  $Ar_2^+$ : A) 6 mg; B) 8 mg e C) 10 mg. Condições: Pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; vazão do gás *bypass* de 0,40 L min<sup>-1</sup>; gás carreador de 0,40 L min<sup>-1</sup> e freon de 2,00 mL min<sup>-1</sup>.



De acordo com os resultados obtidos na Figura 19, observou-se que o uso do ácido cítrico não evitou a supressão de sinal do  $Ar_2^+$ , independentemente da massa de ácido cítrico avaliada (6 a 10 mg). Embora o mecanismo de ação dos modificadores orgânicos não esteja bem elucidado, a maioria dos modificadores químicos orgânicos atuam por meio de um mecanismo bastante complexo que é controlado por reações na solução da amostra, na fase sólida (durante a pirólise) e na fase gasosa do atomizador<sup>14</sup>. Dessa maneira, foi evidenciado que essas reações e a possível decomposição térmica do ácido cítrico não aceleraram a volatilização do Fe, Na e K. Adicionalmente, também observou-se que o uso do ácido cítrico não foi capaz de reter os elementos interferentes na plataforma de grafite retardando suas volatilizações.

No entanto, considerando que o ácido cítrico pode ajudar no transporte dos REE até o plasma e, conseqüentemente, aumentar a intensidade do sinal, bem como a diminuição dos RSDs, optou-se por manter o uso do ácido cítrico. A massa de ácido cítrico escolhida foi de 6 mg otimizada por Silva et al<sup>23</sup>.

#### **4.2.6 Avaliação do uso de O<sub>2</sub> durante a pirólise**

O O<sub>2</sub> pode ser utilizado em conjunto com o gás carreador para aumentar a volatilidade da matéria orgânica, conforme demonstrado em um trabalho prévio<sup>87</sup>. Ainda, o O<sub>2</sub> pode aumentar a eficiência de transporte do analito, pois aumenta a quantidade de partículas de C dentro do compartimento do forno de grafite. Conseqüentemente, essas partículas podem atuar como carreadores físicos, visto que os elementos podem condensar-se na sua superfície e serem transportados de maneira mais eficiente<sup>87</sup>.

No presente trabalho, foi feita a avaliação do uso de O<sub>2</sub> na etapa de pirólise para verificar se Fe, Na e K poderiam formar óxidos (compostos de difícil volatilização) e, então, ficarem adsorvidos na plataforma de grafite. A vazão de O<sub>2</sub> foi fixada em 100 mL min<sup>-1</sup> e foi adicionado em conjunto com o gás carreador. Na Figura 20 podem ser observado os resultados obtidos.

Figura 20 - Efeito da vazão do O<sub>2</sub> sobre a intensidade do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup>: Condições: 100 mL min<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40 L min<sup>-1</sup>; gás carreador de 0,40 L min<sup>-1</sup> e freon de 2,00 mL min<sup>-1</sup>.



De acordo com os resultados (Figura 20), com uso do O<sub>2</sub> ocorreu supressão do sinal do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup> (aproximadamente 38%) na determinação de REE. Neste caso, é possível que o O<sub>2</sub> tenha convertido os elementos interferentes nos seus respectivos óxidos durante a etapa de pirólise. No entanto, quando a temperatura do forno é aumentada para fazer a etapa de vaporização dos REE (2200 °C) e, com a presença dos Freon R-12, os elementos são facilmente convertidos a cloretos e volatilizados.

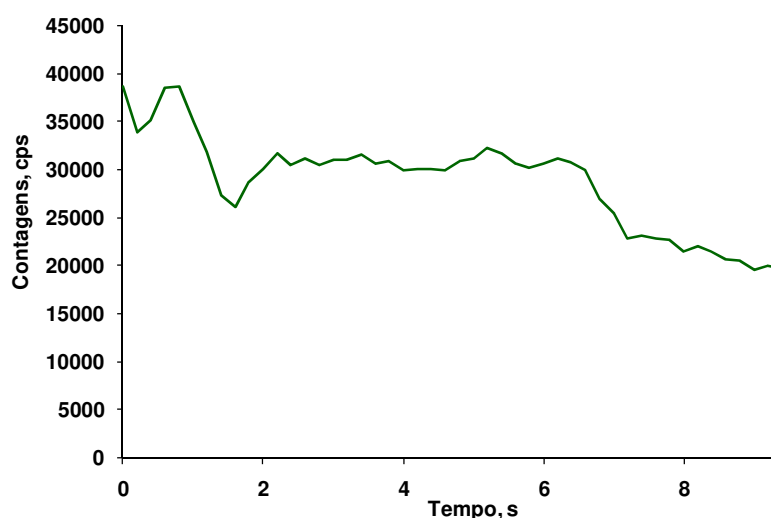
É importante mencionar que foi feito um experimento adicional utilizando 200 mL min<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>, mas não houve melhora na intensidade do sinal do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup>. Dessa maneira, optou-se por não utilizar o O<sub>2</sub> na etapa da pirólise.

#### 4.2.7 Avaliação do uso de Ir

Os elementos do grupo da platina possuem a capacidade de atuar como modificadores químicos e, portanto, podem ser utilizados para aumentar a estabilidade térmica dos analitos. Dessa forma, o Ir foi utilizado no presente trabalho para verificar a possibilidade de melhora da separação analitos/matriz através de sua possível interação química com os interferentes (Fe, Na e K). Assim, a volatilização dos interferentes poderia ser dificultada<sup>14</sup>.

Inicialmente, os experimentos foram feitos utilizando 4  $\mu\text{g}$  de Ir, tendo como base os resultados obtidos por Henn et al<sup>87</sup>. Assim, após adição de 6 mg do ácido cítrico (massa previamente otimizada), 4  $\mu\text{g}$  de Ir (a partir de uma solução contendo 1000 mg L<sup>-1</sup>), foram adicionados na plataforma de grafite. Os resultados obtidos para a intensidade do sinal do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup> podem ser observados na Figura 21.

Figura 21 - Efeito do Ir sobre a intensidade do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup>. Condições: 4  $\mu\text{g}$  de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40 L min<sup>-1</sup>; gás carreador de 0,40 L min<sup>-1</sup> e freon de 2,00 mL min<sup>-1</sup>.



De acordo com a Figura 21, foi possível observar que a utilização do Ir como modificador não evitou a supressão do sinal para o Ar<sub>2</sub><sup>+</sup>. Dessa forma, pode-se concluir que a retenção de Fe, K e Na na plataforma de grafite não ocorre facilmente (mesmo usando modificadores que possuem essa capacidade, como é o caso do Ir). Provavelmente, isso esteja relacionado com a reatividade do gás Freon R-12 na vaporização. É importante mencionar que foi feito um experimento utilizando massa maior de Ir (6  $\mu\text{g}$ ), mas não houve melhora na estabilização da intensidade do sinal do Ar<sub>2</sub><sup>+</sup>.

Adicionalmente, após o programa de aquecimento foi observado que, após aproximadamente 10 ciclos de pesagem de amostra e subsequente aquecimento no forno de ETV, a plataforma ficou escura (Figura 22). Essa característica pode indicar possíveis reações químicas entre o Ir e o Freon R-12, levando à remoção do grafite pirolítico que recobre a plataforma de grafite.

Figura 22 - Plataforma de grafite após avaliação do efeito do Ir sobre a intensidade do  $\text{Ar}_2^+$  (após, aproximadamente 10 ciclos). Condições: 4  $\mu\text{g}$  de Ir; pirólise a 700  $^\circ\text{C}$  (40 s); vaporização a 2200  $^\circ\text{C}$  (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40  $\text{L min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40  $\text{L min}^{-1}$  e freon de 2,00  $\text{mL min}^{-1}$ .

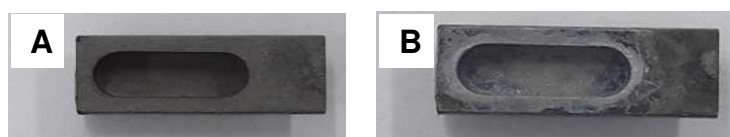


#### 4.2.8 Avaliação do recobrimento da plataforma de grafite com Zr

Após os experimentos feitos com Ir, verificou-se que a superfície da plataforma de grafite foi danificada, como apresentado na Figura 22. Para tentar evitar esses danos na plataforma de grafite, optou-se por fazer o recobrimento desta com Zr e continuar usando Ir para verificar a possibilidade de retenção dos interferentes Fe, K e Na. Assim, os REE seriam direcionados para o plasma, livre dessas interferências.

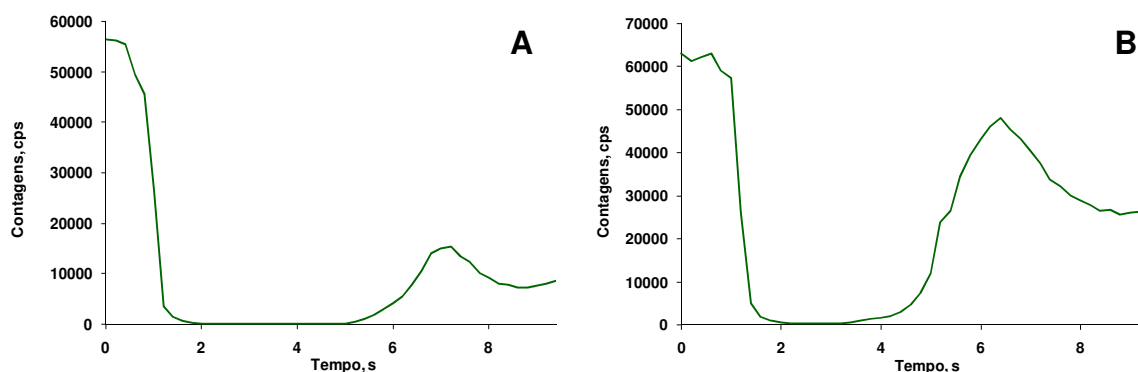
O recobrimento da plataforma foi feito com base em Picoloto<sup>131</sup>. Assim, foi feita a adição de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  de Zr (aquecimento a 1000  $^\circ\text{C}$  por 10 s). Esse procedimento foi repetido por 10 vezes. Na Figura 23 pode ser observado o aspecto da plataforma antes e depois do recobrimento com Zr.

Figura 23 - Recobrimento da plataforma de grafite: A) plataforma de grafite antes do recobrimento e B) plataforma de grafite depois do recobrimento com Zr.



Após o recobrimento da plataforma de grafite com Zr, conforme observado na figura 23 B, foi feita a adição do ácido cítrico (6 mg) e do Ir (4  $\mu\text{g}$ ), além de 0,25 mg de sangue. Após, a plataforma foi submetida ao programa de aquecimento (Tabela 7) por duas vezes de maneira sucessivas. Os resultados obtidos para o sinal do  $\text{Ar}_2^+$  podem ser observados na Figura 24.

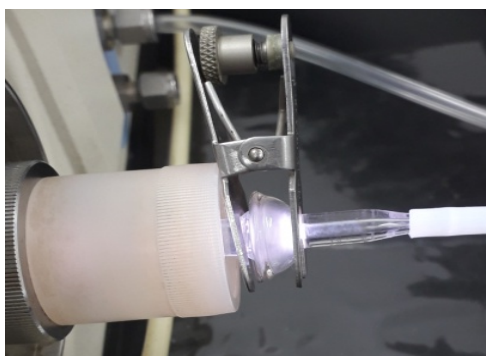
Figura 24 - Avaliação do recobrimento da plataforma de grafite sobre a intensidade do  $Ar_2^+$ : A) 1ª leitura e B) 2ª leitura. Condições: 4  $\mu g$  de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40 L  $min^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L  $min^{-1}$  e freon de 2,00 mL  $min^{-1}$ .



Como observado na Figura 24, o recobrimento da plataforma de grafite com Zr diminuiu ainda mais a intensidade do  $Ar_2^+$ . Dessa maneira, foi observado que grande parte do Zr, previamente adicionado na plataforma de grafite, foi volatilizado durante a vaporização. Isso provavelmente ocorreu devido à presença do Freon R-12 nesta etapa. É importante salientar que, mesmo fazendo duas leituras da plataforma de grafite após o recobrimento com Zr, ainda ocorreu a volatilização do Zr devido à intensa supressão do sinal do  $Ar_2^+$ .

Na Figura 25 é possível observar o aspecto visual do plasma devido à presença de Zr, o qual que foi volatilizado da plataforma de grafite durante o programa de aquecimento aplicado.

Figura 25 - Aspecto visual do plasma após recobrimento da plataforma de grafite com Zr. Condições: 4  $\mu g$  de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40 L  $min^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L  $min^{-1}$  e freon de 2,00 mL  $min^{-1}$ .





A volatilização do Zr da plataforma de grafite (Figura 25) causou alterações na cor do plasma, deixando-o azulado. Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos após os experimentos feitos com o uso de modificadores químicos (Ir e Zr), não se conseguiu reter (nesta etapa) os elementos interferentes na plataforma de grafite durante a etapa de volatilização dos REE.

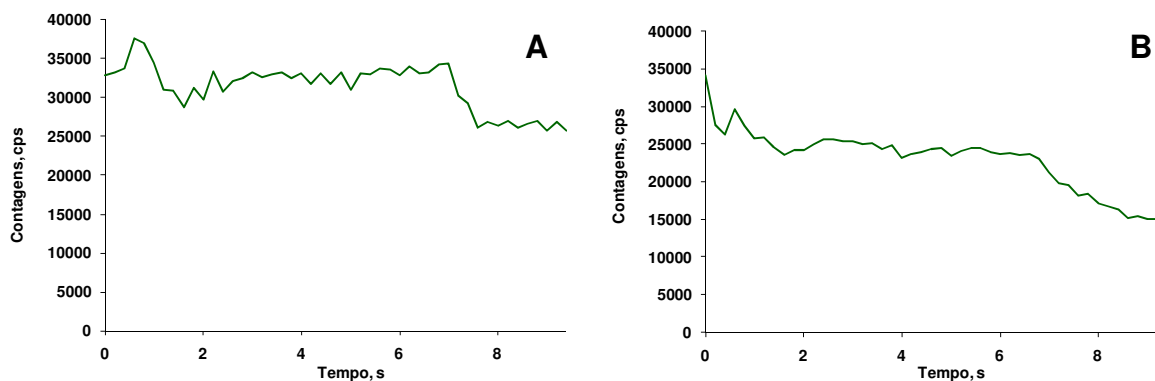
#### **4.2.9 Separação dos elementos figurados do sangue e do soro**

A determinação de REE em sangue por ETV-ICP-MS não é uma tarefa analítica fácil. À presença de Fe, K e Na, constituintes presentes no sangue em elevadas concentrações, tornam essa tarefa ainda mais difícil. Possivelmente, o K e o Na estejam presentes no soro sanguíneo na forma de cloretos, enquanto que o Fe está presente nas hemácias, visto que é o elemento central que forma a hemoglobina. Dentre todas as tentativas visando acelerar ou retardar a volatilidade desses elementos interferentes, nenhuma delas apresentou resultados satisfatórios.

Dessa maneira, considerando os aspectos mencionados anteriormente, optou-se por fazer a separação entre o soro e dos elementos figurados do sangue, visando reduzir a concentração dos interferentes da amostra a ser analisada. Para isso, 4 mL de sangue foram transferidos para um tubo de coleta de sangue (específico para esse fim). Posteriormente, o frasco foi submetido a centrifugação durante 10 min a 3450 rpm para a separação dos soro e da fração celular.

Após a centrifugação (3450 rpm por 10 min), a fração sobrenadante (soro) foi separada dos elementos figurados do sangue (fração decantada) com o auxílio de uma seringa. Ambas as frações foram transferidas para outros tubos de coleta. Posteriormente, 0,25 mg de soro ou da fração celular (em experimentos distintos) foram pesados diretamente na plataforma de grafite e submetidas ao programa de aquecimento aplicado na ETV-ICP-MS. Os resultados obtidos para o sinal do  $Ar_2^+$  em ambas as frações (soro e dos elementos figurados do sangue) podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 - Separação entre A) soro e B) elementos figurados do sangue e monitoramento da intensidade do  $\text{Ar}_2^+$ . Condições: 4  $\mu\text{g}$  de Ir; pirólise a 700 °C (40 s); vaporização a 2200 °C (6 s); 0,25 mg de soro ou dos elementos figurados do sangue; 6 mg de ácido cítrico; vazão do gás *bypass* de 0,40 L  $\text{min}^{-1}$ ; gás carreador de 0,40 L  $\text{min}^{-1}$  e freon de 2,00 mL  $\text{min}^{-1}$ .



Como pode ser observado na Figura 26, foi observada a supressão de sinal do  $\text{Ar}_2^+$  de, aproximadamente, 26% e 30%, respectivamente, para as amostras de soro e dos elementos figurados do sangue. Assim, a separação do soro e dos elementos figurados do sangue não foi suficiente para contornar as possíveis interferências na determinação de REE por ETV-ICP-MS. No plasma, as interferências são possivelmente associadas à presença de sais solúveis de Na e K, enquanto que para os elementos figurados do sangue, a alta concentração de Fe pode ter causado a interferência. Dessa forma, assim como todas as outras condições experimentais avaliadas, não foi possível contornar as interferências causadas por Fe, Na e K durante a determinação de REE em sangue por ETV-ICP-MS.

A ETV-ICP-MS é uma das técnicas mais indicadas para a determinação elementar em baixa concentração quando não há grande disponibilidade de amostra (como é o caso do sangue). No entanto, mostrou-se susceptível a interferências provenientes de matriz. É importante enfatizar que a remoção dos interferentes poderia ser feita com o uso de temperaturas de pirólise mais elevada (acima de 700 °C). No entanto, como ocorre a perda dos REE (em solução), essa possibilidade não é a mais viável, visto que a calibração do equipamento de ETV-ICP-MS, geralmente, é feita com soluções de referência.

Outra possibilidade para contornar possíveis interferências da matriz seria a calibração do sistema de ETV-ICP-MS com o uso de CRMs. No entanto, não há disponibilidade de CRM de sangue com concentração conhecida dos REE. Ainda, no

caso da disponibilidade de CRMs com matriz similar ao sangue (ou outra amostra biológica, por exemplo), estes teriam concentrações de Fe, Na e K elevadas e o mesmo problema de interferência poderia ser observado.

Considerando todos os resultados obtidos, a ETV-ICP-MS não foi apropriada para a determinação de REE em sangue. Com base nisto, optou-se por utilizar a técnica de ICP-MS utilizando o USN para a determinação destes elementos. No entanto, uma vez que a amostra sólida precisa ser convertida em uma solução compatível a esta técnica, o uso de métodos de preparo de amostras passam a ser necessários. No entanto, previamente a isso, um estudo detalhado de interferências na determinação dos REE por USN-ICP-MS foi feito, de modo a evitar possíveis interferências.

#### **4.3 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DURANTE A DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS**

Considerando a necessidade de aplicação de métodos de preparo de amostra adequados para a subsequente determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS, é essencial um estudo sistemático de possíveis interferências oriundas da matriz. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12 (*Resultados*), os elementos presentes em maiores concentrações nas amostras de sangue são Ca, Mg, Fe, Na e K. Então, inicialmente, o estudo sistemático foi feito para estes elementos.

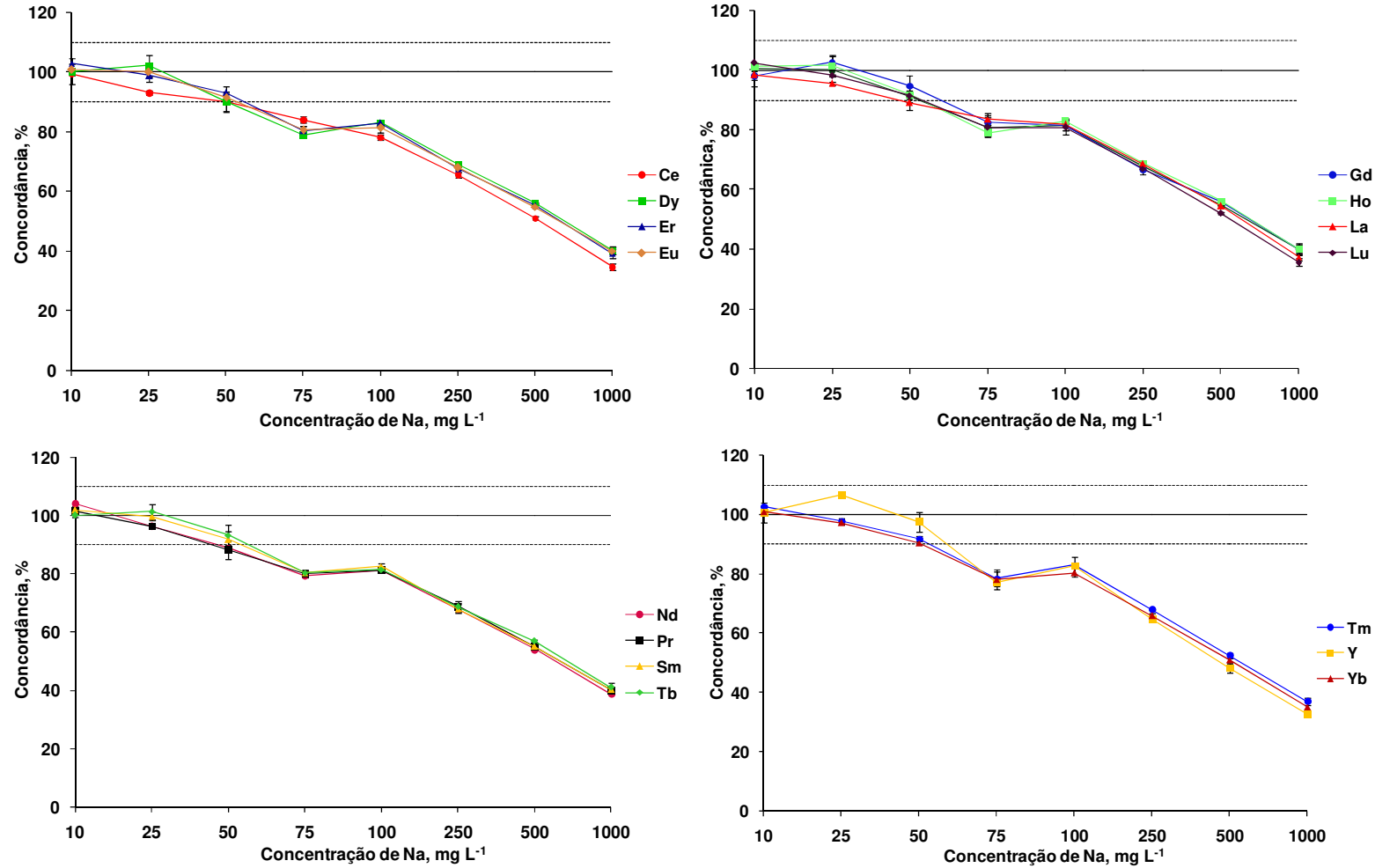
O estudo sistemático foi feito conforme descrição na sessão 3.6 (*Materiais e Métodos*). A avaliação de possíveis interferências causadas pelos metais foram feitas para a concentração dos REE de  $250 \text{ ng L}^{-1}$ ). Uma faixa de tolerância de 10%, para mais ou para menos, foi aceita como oscilações normais de medida no equipamento de ICP-MS. Assim, somente foram consideradas como interferências os resultados de intensidade de sinal inferiores a 90% ou superiores a 110%.

##### **4.3.1 Avaliação do efeito do Na na determinação de REE por USN-ICP-MS**

Segundo alguns estudos<sup>129,141</sup>, à presença de elementos facilmente ionizáveis, como é o caso dos metais alcalinos, pode levar a erros durante a determinação de outros elementos (como Al, Cr e Cu, por exemplo). Quando esses elementos facilmente ionizáveis estão presentes em altas concentrações, as

características do plasma podem ser alteradas e causam, na maioria das vezes, supressão na intensidade de sinal dos analitos, comprometendo a exatidão dos resultados. Por possuir funções específicas no organismo, o Na é um dos metais alcalinos presente no sangue em altas concentrações. Por isso, há a necessidade de investigação dos seus efeitos na determinação de REE por USN-ICP-MS neste tipo de amostra. Na Figura 27 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do Na na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 27 - Efeito da concentração de Na na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.

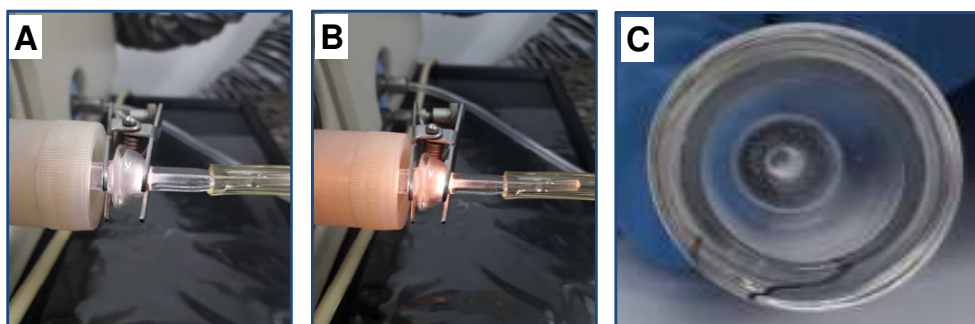


De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que as concordâncias obtidas entre as soluções contendo os REE com a presença de Na até  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e a solução de referência foi na faixa de 90 a 110% para todos os REE. Por outro lado, para as soluções contendo concentrações de Na igual ou superiores a  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , foi observado um efeito de supressão de intensidade de sinal para todos os REE (de 20 a 60% para 100 e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Na, respectivamente). É importante salientar que o comportamento de supressão de intensidade de sinal causado pela presença de Na foi similar para todos os analitos.

O efeito de supressão de intensidade de sinal causado pelo Na, também foi observado em estudos prévios, na determinação de metais<sup>141</sup> e REE<sup>129</sup>. Em ambos os trabalhos reportados, os autores não observaram correlação entre o efeito de supressão de sinal causado por um elemento com fácil ionização (como o Na e o K), e o potencial de ionização dos analitos. Dessa forma, é importante mencionar que as mesmas conclusões foram observadas no presente trabalho.

Ainda, quando os REE são determinados em amostras com alto teor salino, o sal pode depositar-se nos capilares e conexões levando à obstrução destes. Adicionalmente, o sal pode se depositar nos cones de amostragem e *Skimmer*, levando a perda de sensibilidade do equipamento de ICP-MS e, conseqüentemente, à obtenção de resultados errôneos. Na Figura 28 é possível observar a mudança de coloração do plasma quando uma solução contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Na chega até ele, bem como o depósito de sais na conexão do USN com o tubo injetor do equipamento de ICP-MS após o estudo de interferências feito com sal deste elemento (na forma de NaCl).

Figura 28- Efeito do Na na mudança de coloração do plasma. A) solução sem a presença de Na, B) solução contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Na e C) depósito de sais na conexão do USN com o tubo injetor do equipamento de ICP-MS.

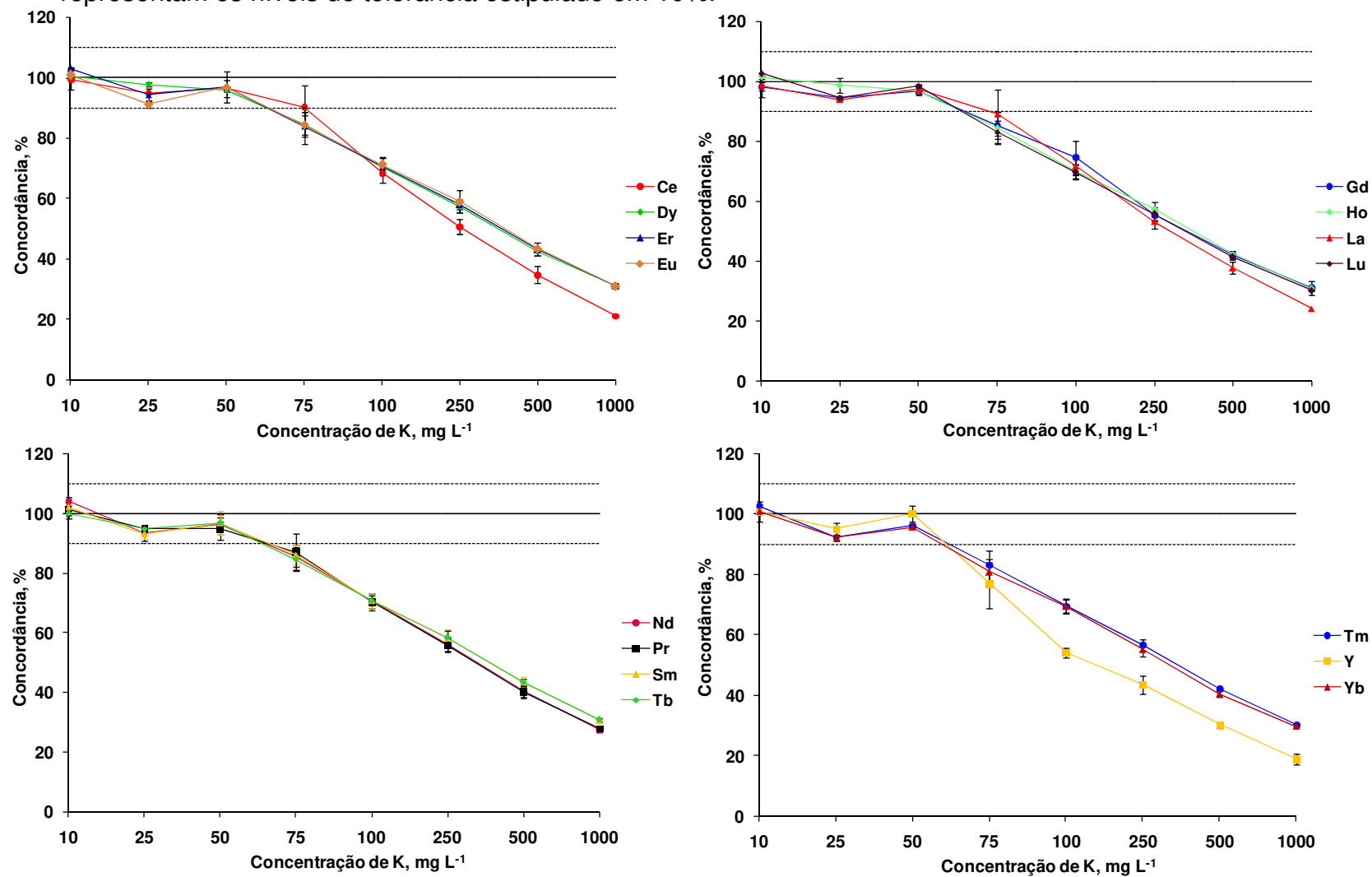


Os resultados obtidos, até então, evidenciaram a importância do conhecimento da matriz, bem como da concentração de Na nas amostras, previamente à determinação dos REE por USN-ICP-MS. Considerando a presença de Na em altas concentrações em amostras de sangue, pode ser necessária uma etapa de diluição das amostras para contornar possíveis interferências causadas pela presença deste concomitante para a obtenção de resultados analíticos mais exatos.

#### **4.3.2 Avaliação do efeito do K na determinação de REE por USN-ICP-MS**

Como descrito no estudo referente à presença de elevadas concentrações de Na no plasma (item 4.3.1 - *Resultados*), é bem conhecido que a elevada concentração de metais alcalinos nas amostras pode ocasionar muitos erros de medida na determinação de alguns elementos utilizando a técnica de ICP-MS<sup>143</sup>. Embora esse fenômeno seja comumente relatado para Na, no presente trabalho, o efeito do K também foi avaliado devido a concentração relativamente alta deste elemento no sangue. Na Figura 29 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do K na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 29 - Efeito da concentração de K na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.





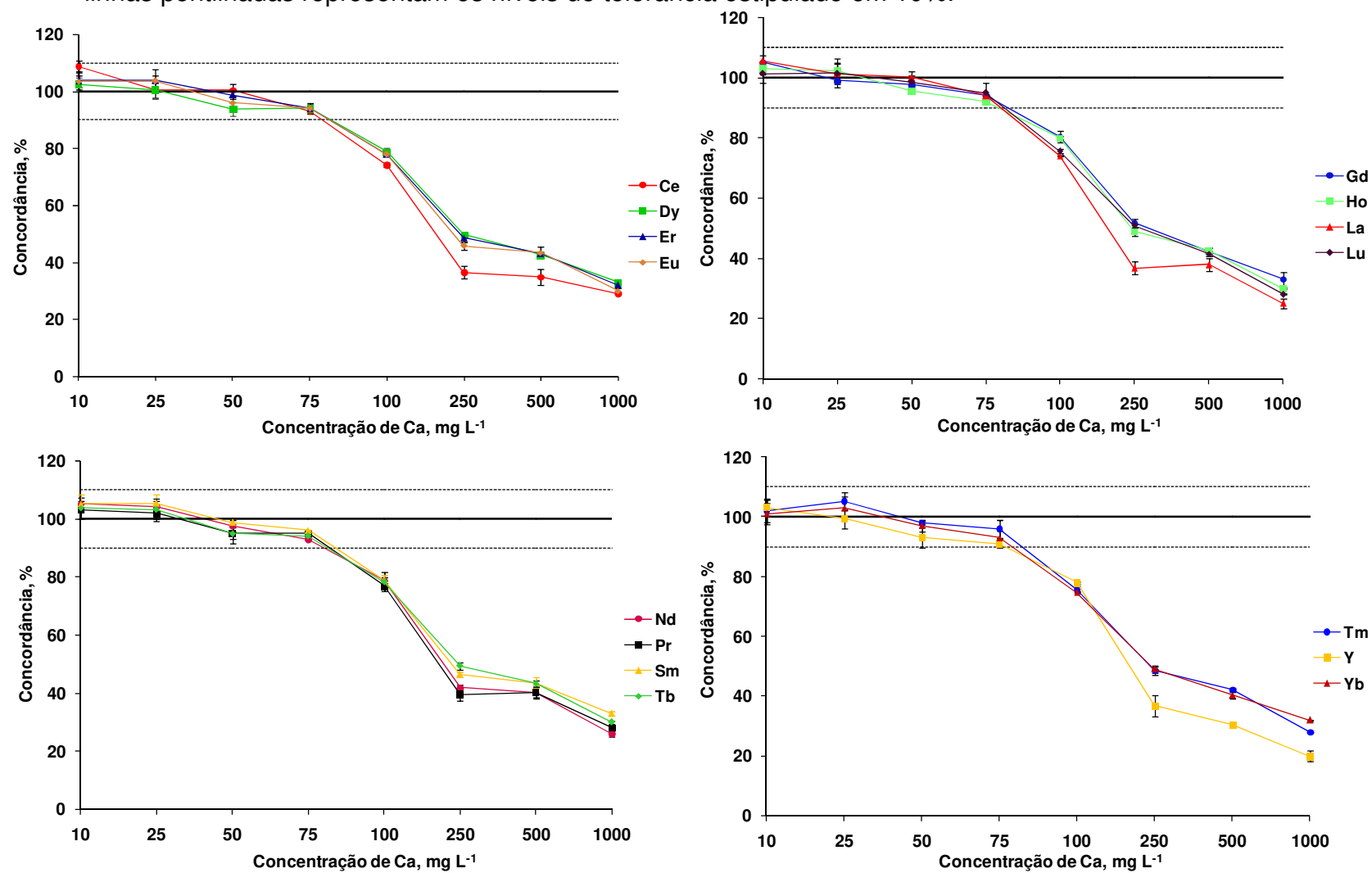
De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que as concordâncias obtidas para os REE entre as soluções contendo os REE com à presença de K até  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e a solução de referência foram na faixa de 90 a 110%. Entretanto, quando foi avaliada à presença de K na concentração de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , observou-se que apenas La e Ce apresentaram concordâncias na faixa de 90%. Por outro lado, para as soluções contendo K em concentrações iguais ou superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foi observado o efeito de supressão do sinal para todos os REE (supressão superior a 20%).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com outros estudos<sup>141,143</sup>, onde foram observadas supressões do sinal frente à presença de K para As, Cd e Pb. Com relação ao estudo do Na na determinação de REE, pode-se observar que o efeito ocasionado pelo K é similar aos efeitos de supressão de sinal e ocorrem na mesma faixa de concentração (a partir de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  - exceto Ce e La que apresentam 90% de concordância para esta concentração de K avaliada). Assim como para o Na, o conhecimento do efeito do K na determinação de REE por USN-ICP-MS é extremamente importante.

#### **4.3.3 Avaliação do efeito do Ca na determinação de REE por USN-ICP-MS**

Embora o Ca esteja presente no sangue em concentrações mais baixas quando comparado a Na e K, por exemplo, este é um elemento químico considerado majoritário em muitas amostras<sup>55,143</sup>. Além disso, o Ca também é um elemento de fácil ionização, podendo causar interferências nas medidas por USN-ICP-MS. É importante mencionar que não foram encontrados trabalhos que mencionem os efeitos da presença de Ca durante a determinação de REE por USN-ICP-MS. Na Figura 30 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do Ca na a determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 30 - Efeito da concentração de Ca na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.

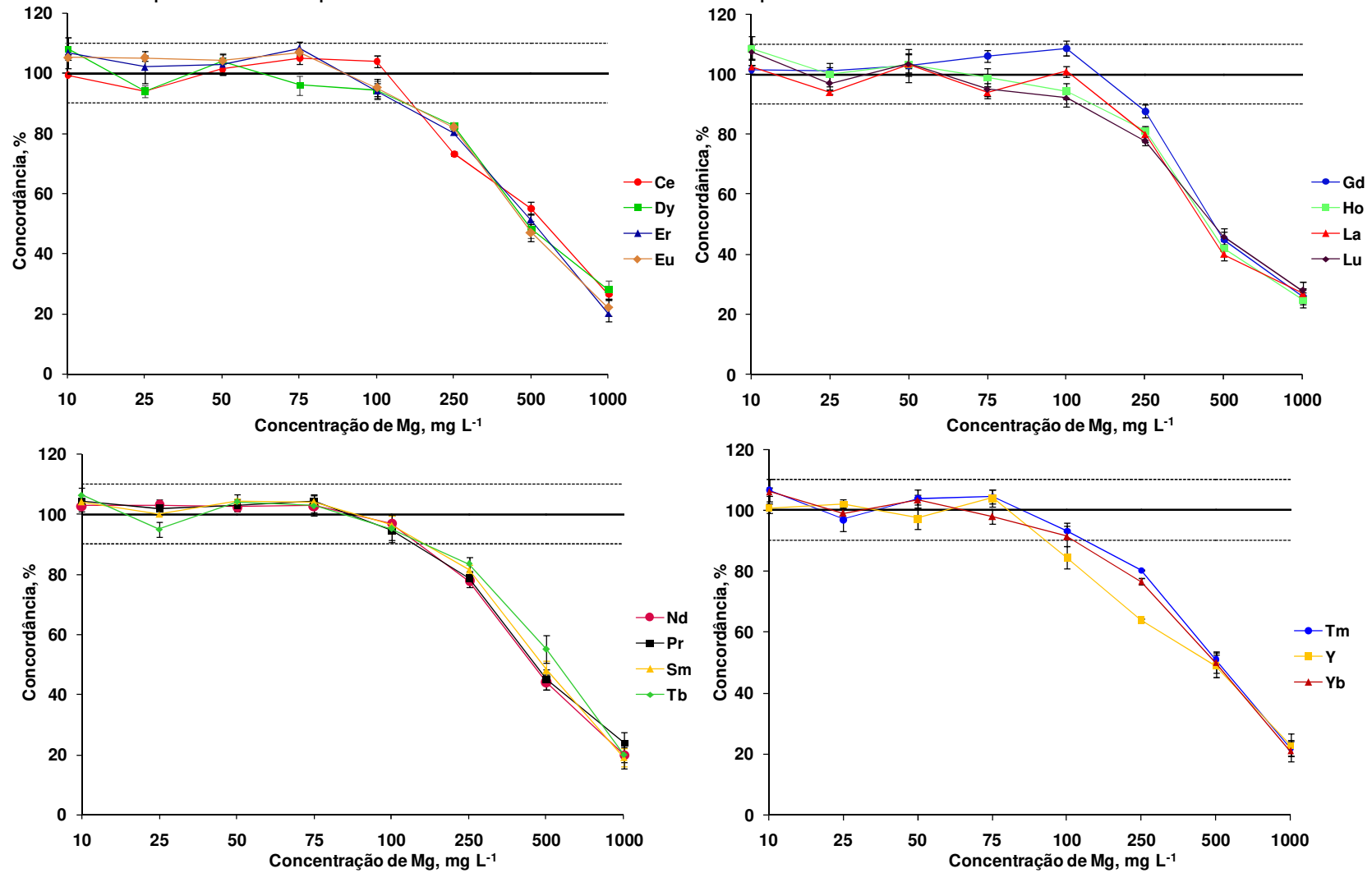


De acordo com os resultados apresentados na Figura 30, foi possível observar que não ocorreu a supressão de sinal dos analitos para as soluções contendo concentrações de Ca de 10 até 75 mg L<sup>-1</sup>. De maneira geral, esse comportamento foi observado para todos os REE. No entanto, quando foi avaliada a concentração de Ca de 100 mg L<sup>-1</sup> foi observado que a intensidade do sinal dos REE diminuíram. As concordâncias entre a solução contendo todos os REE na presença de Ca (100 mg L<sup>-1</sup>) e a solução de referência foram na faixa de 74% a 80% (para Ce e Gd, respectivamente). No caso do uso de soluções contendo concentrações de Ca superiores a 250 mg L<sup>-1</sup>, concordâncias inferiores a 70% foram obtidas para todos os REE.

#### **4.3.4 Avaliação do efeito do Mg na determinação de REE por USN-ICP-MS**

Assim como o Ca, o Mg está presente no sangue em concentrações mais baixas quando comparado com Fe, K e Na. No entanto, da mesma forma que os demais, o Mg é também é um elemento que se ioniza facilmente. Por isso, foram necessários estudos de interferências desse elemento na determinação de REE. Ainda, é importante mencionar que não foram encontrados trabalhos que mencionem os efeitos que o Mg pode causar durante a determinação de REE por USN-ICP-MS. Na Figura 31 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do Mg durante a determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 31 - Efeito da concentração de Mg na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.

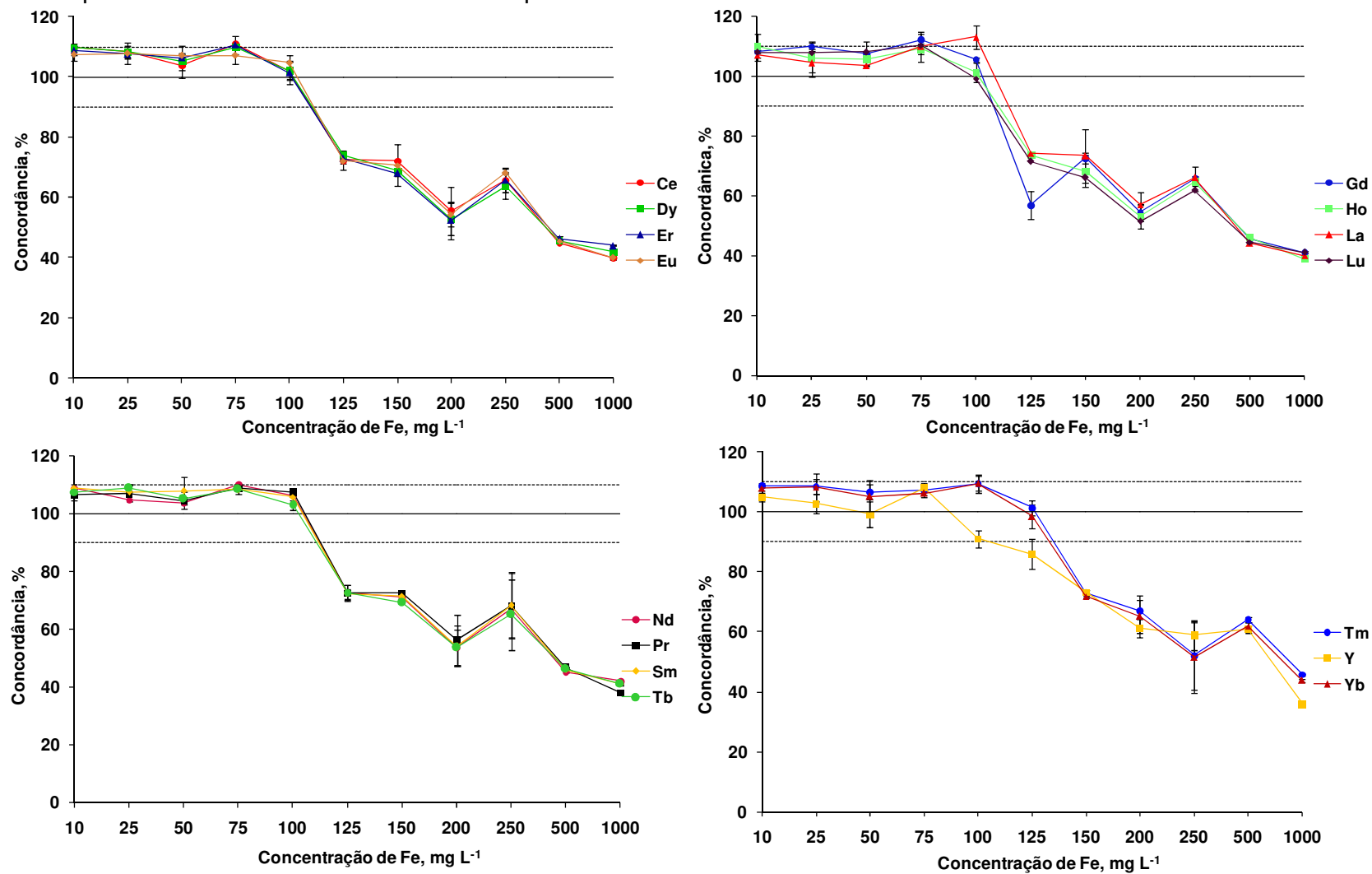


De acordo com os resultados (Figura 31), foi observado que, em geral, as concordâncias para os REE entre as soluções contendo os REE com até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Mg e as soluções de referência foram na faixa de 90 a 110% (exceto para Y que obteve uma concordância de aproximadamente 85%). Por outro lado, a partir do uso de soluções contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Mg observou-se a supressão da intensidade do sinal para todos os analitos (maior do que 20%), evidenciando possíveis interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS na presença de Mg. Com base nestes resultados, embora o Mg esteja presente no sangue em menores concentrações quando comparado com K e Na, torna-se importante o conhecimento da concentração deste elemento nas amostras antes da determinação dos REE por USN-ICP-MS.

#### **4.3.5 Avaliação do efeito do Fe na determinação de REE por USN-ICP-MS**

O Fe é um elemento essencial para quase todos os organismos vivos, pois participa de uma variedade de processos metabólicos, incluindo o transporte de oxigênio, síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e transporte de elétrons<sup>144</sup>. Por compor a hemoglobina, há concentrações relativamente elevadas de Fe no sangue. Assim, a avaliação do efeito deste elemento na determinação de REE por USN-ICP-MS é necessário para verificar possíveis interferências durante as determinações. Na Figura 32 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do Fe na determinação de REE por USN-ICP-MS.

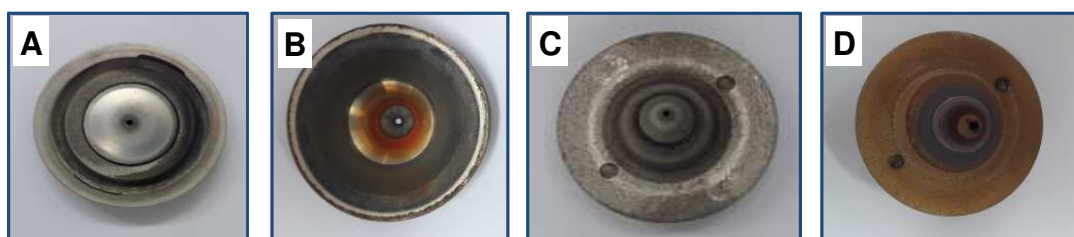
Figura 32 - Efeito da concentração de Fe na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De maneira geral, os resultados apresentados indicam que a intensidade do sinal para os REE manteve-se praticamente constante quando soluções contendo até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe foram avaliadas. Concordâncias na faixa de 90 a 110% para todos os analitos foram obtidas entre a solução multielementar contendo todos os REE sem à presença de Fe e as soluções contendo os REE na presença de até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe. No entanto, efeitos de supressão de sinal para os REE foram observados na presença de Fe a partir de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  (concordâncias menores do que 80%, exceto para Tm e Yb).

Os resultados obtidos mostram que o Fe pode ser um interferente relevante na determinação de REE por USN-ICP-MS. Ainda, é preciso enfatizar que, dependendo da concentração de Fe nas amostras, pode ocorrer a deposição deste elemento nas partes do equipamento de ICP-MS, bem como nos capilares e sistemas de conexão. Na Figura 33 é possível observar o depósito de Fe nos cones de amostragem e *Skimmer* após o estudo de interferências do Fe na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 33 - Depósito de Fe nos cones de amostragem e *Skimmer*. A) Cone de amostragem antes dos experimentos de interferências, B) cone de amostragem após os experimentos de interferências, C) cone *Skimmer* antes dos experimentos de interferências e D) cone *Skimmer* após os experimentos de interferências.



Conforme demonstrado na Figura 33, além dos efeitos que o Fe pode causar diretamente no plasma, o depósito de Fe nos cones pode acarretar na diminuição de sensibilidade do equipamento de ICP-MS, aumentando os problemas durante a determinação dos REE. Adicionalmente, a montagem e a desmontagem destas peças seguidamente para procedimentos de limpeza pode desgastá-las. Ainda, manutenções em menor prazo de tempo, bem como perigo de quebra ao manuseá-las exigem maior habilidade e atenção do analista. Assim, fica evidenciado a importância do conhecimento da concentração de Fe previamente a determinação

dos REE por USN-ICP-MS nas mais diversas amostras para a determinação de REE.

#### 4.3.6 Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS

Dentre os problemas causados pela presença de C nas soluções que serão analisadas por ICP-MS, destacam-se as interferências não espectrais. Essas interferências se referem às diferenças de densidade, viscosidade e tensão superficial das amostras em relação às soluções que serão usadas para a calibração do equipamento. Além disso, a presença de carbono pode afetar os processos de atomização e ionização dos analitos no plasma.<sup>77,81,97</sup> Alguns autores reportam o aumento de sinal para alguns elementos devido a reações de transferência de carga com espécies de C ( $C^+$ ,  $C^{2+}$ ,  $CO^+$  ou  $CO_2^+$ ) e a formação de espécies poliatômicas<sup>113,145</sup>. Adicionalmente, à presença de elevadas concentrações de carbono nas soluções pode ocasionar depósitos em capilares e na interface do equipamento de ICP-MS<sup>97</sup>.

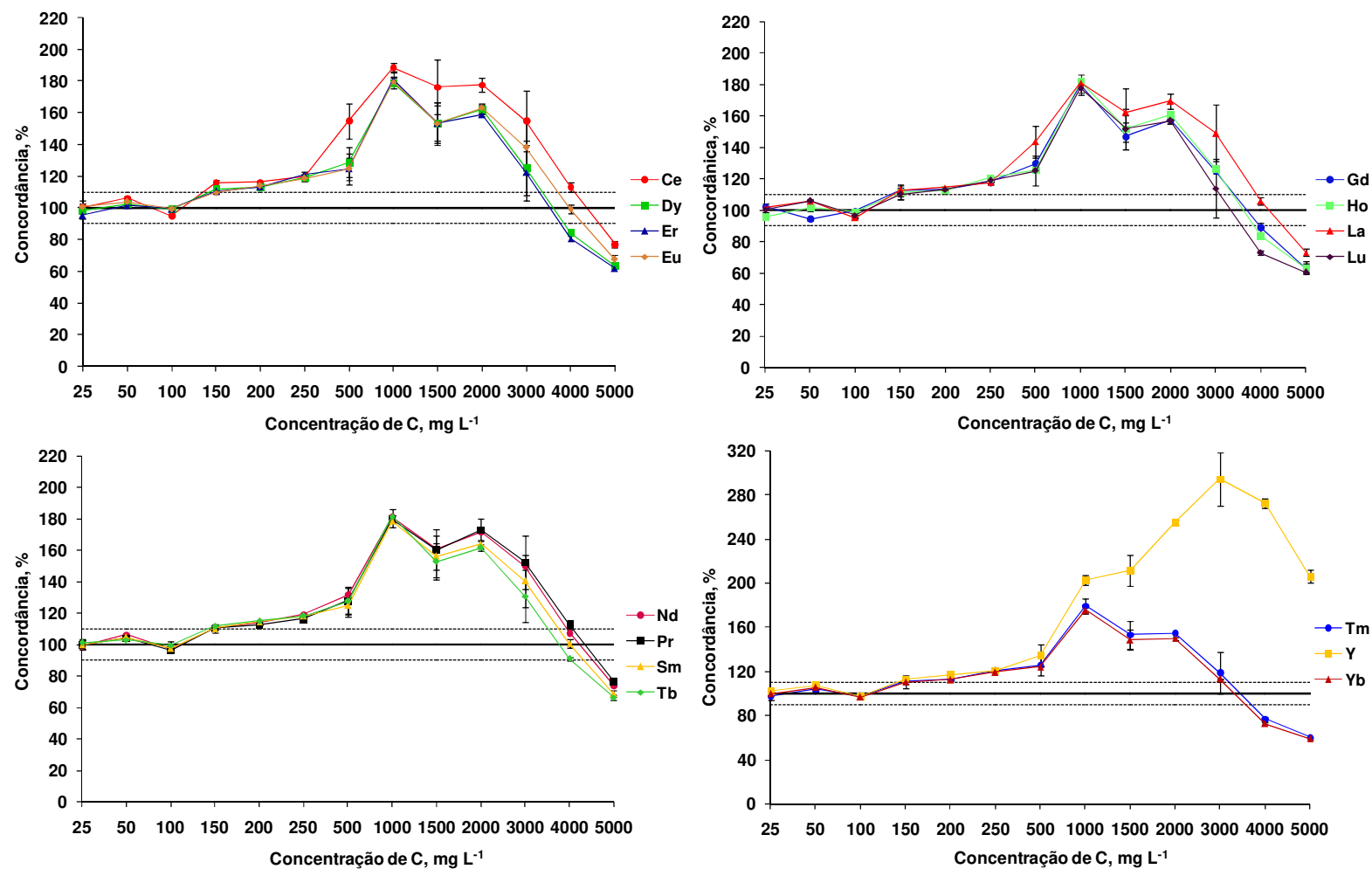
Considerando todos os aspectos mencionados, no presente trabalho foi feito um estudo sistemático referente ao efeito do C na determinação de REE por USN-ICP-MS. Todos os experimentos foram feitos conforme descritos no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). É importante mencionar que foram utilizadas três fontes de C para este estudo: *i*) C a partir do ácido cítrico, *ii*) C a partir da frutose e *iii*) C a partir de digeridos de fígado bovino. Essas fontes de C foram selecionadas para avaliar se o C oriundo de fontes distintas interfere ou não na determinação dos analitos. Este estudo sistemático foi feito utilizando soluções simuladas contendo C.

##### 4.3.6.1 Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de ácido cítrico

Para a avaliação do efeito do C a partir do ácido cítrico, as soluções contendo C (na faixa de 25 a 5000 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas conforme descrição apresentada no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). Na Figura 34 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do C a partir do ácido cítrico na determinação de REE por USN-ICP-MS.



Figura 34 - Efeito da concentração de C (a partir do ácido cítrico na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas interferências para as soluções contendo concentrações de C de até  $150 \text{ mg L}^{-1}$ . Entretanto, usando  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de C, foi observado um aumento na intensidade do sinal para todos os REE, sendo obtidas concordâncias de 112% a 117% (para Er e Y, respectivamente). Ainda, a partir do uso de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de C, a intensidade do sinal dos REE aumentou de maneira significativa, chegando a um aumento de até 280% (para Y) quando  $3000 \text{ mg L}^{-1}$  de C foi avaliado.

Diferentemente do que ocorreu para o estudo do efeito dos metais na determinação dos REE por USN-ICP-MS (supressão de sinal), no caso do C (a partir do ácido cítrico), foi observado um comportamento contrário (aumento de intensidade de sinal). Teoricamente, é difícil afirmar o motivo do aumento da intensidade do sinal dos analitos nesta investigação e não há trabalhos na literatura que ajudem a compreender esse comportamento. No entanto, o uso do USN pode ajudar a entender as possíveis causas através dos mecanismos envolvidos nos processos de dessolvatação e transporte dos analitos até o plasma.

O uso de nebulizadores com sistema de dessolvatação (como o USN), são vantajosos para a determinação de REE, visto que eliminam os solventes e, conseqüentemente, ajudam a evitar a formação de óxidos (que é crucial quando o objetivo é a determinação de REE por ICP-MS). Com isso, após a geração do aerossol o solvente é evaporado e, posteriormente, condensado sendo levado com o auxílio de uma bomba peristáltica até o resíduo. No entanto, após a evaporação do solvente, os analitos se aglomeram formando *clusters* que então, são direcionados ao plasma para a posterior detecção. Assim, é importante mencionar que o uso do USN proporciona a chegada de um aerossol seco até o plasma<sup>13,15,36</sup>.

Com respeito ao aerossol seco e na presença de C, é possível lembrar dos efeitos causados pelo C no sistema de ETV-ICP-MS. Conforme já mencionado neste trabalho, o C pode auxiliar no transporte dos analitos até o plasma aumentando a intensidade destes<sup>125,126,139</sup>. Dessa maneira, esses efeitos, também, podem estar envolvidos quando o processo de nebulização é feito com o USN. Outra possível explicação para o aumento da intensidade do sinal, poderia ser devido às reações de transferência de carga entre as espécies de C ( $\text{C}^+$ ,  $\text{C}^{2+}$ ,  $\text{CO}^+$  ou  $\text{CO}_2^+$ ) e os REE.

Ainda, conforme observado na Figura 34, Y foi o elemento que teve maior aumento de sinal, o que corrobora com a ideia do efeito de transporte causado pelo C visto que o Y é um REE menor e mais leve. No entanto, levando em consideração

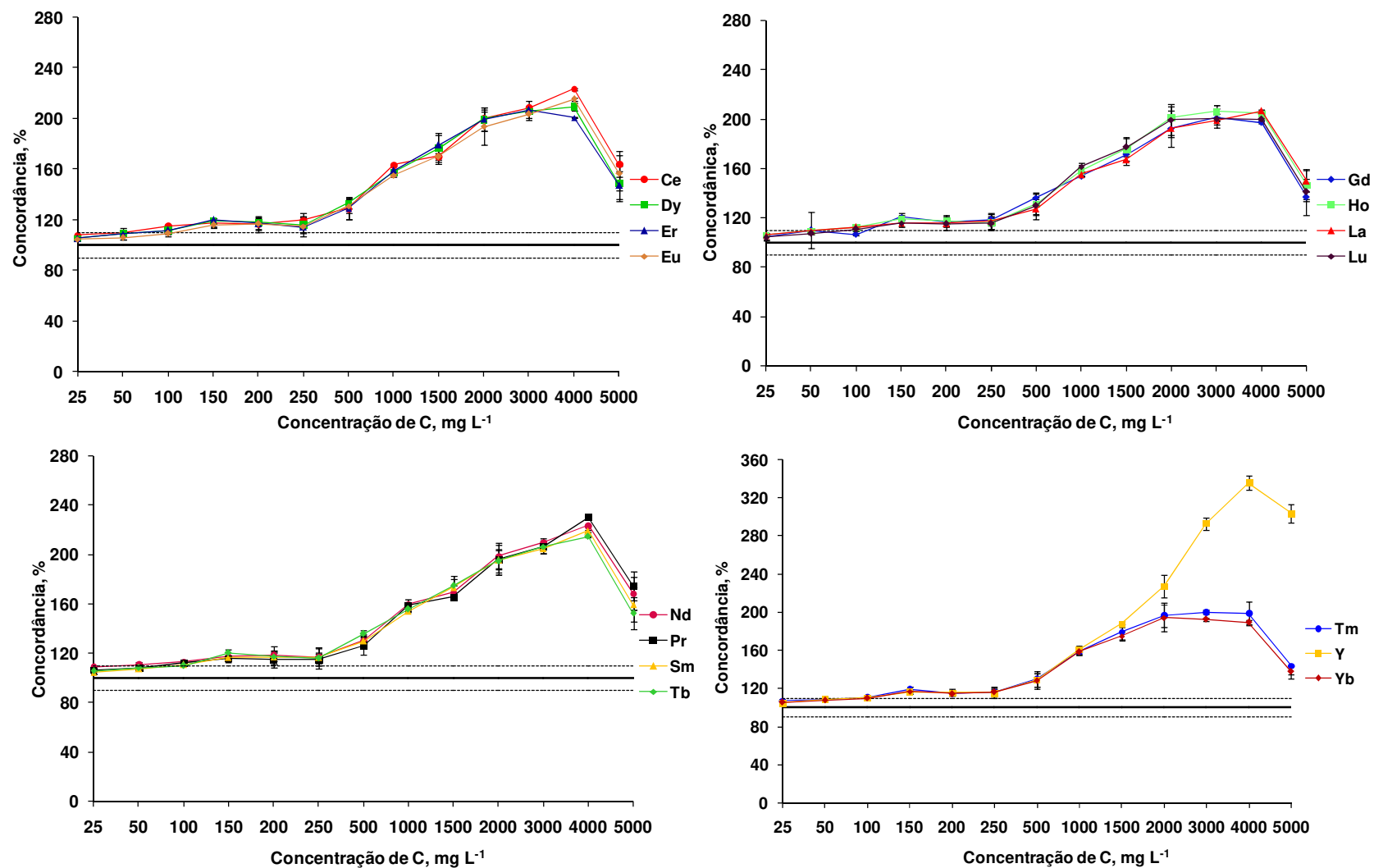
a hipótese formada, não é possível afirmar com certeza o que realmente está acontecendo no plasma à temperatura de 10000 K (temperatura aproximada do plasma de Ar).

Outro ponto a ser destacado de acordo com a Figura 34, foi que a partir de 3000 mg L<sup>-1</sup> de C ( exceto para Y que foi a partir de 4000 mg L<sup>-1</sup> de C) as concordâncias foram reduzindo de maneira significativa. Isso provavelmente ocorreu devido ao depósito de C na interface do equipamento e no tubo injetor, levando a redução de sensibilidade do equipamento de ICP-MS.

#### 4.3.6.2 Avaliação do efeito de C na determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de frutose

Conforme mencionado anteriormente (Item 4.3.6.1), foi observado um aumento da intensidade do sinal para todos os REE a partir do C proveniente do ácido cítrico. Teoricamente, uma das possíveis hipóteses, como mencionado, seja o efeito de transporte ocasionado pelo C presente nas soluções. Dessa forma, para verificar se esse efeito era observado exclusivamente a partir do C oriundo do ácido cítrico, ou se outras fontes de C poderiam causar os mesmos efeitos, o mesmo estudo foi feito com soluções contendo C a partir da frutose. Na Figura 35 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do C a partir da frutose na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 35 - Efeito da concentração de C a partir da frutose na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.

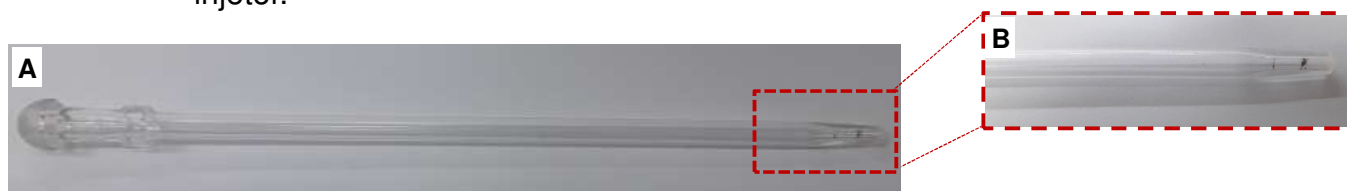


Conforme observado na Figura 35, o perfil dos resultados obtidos através da avaliação do efeito do C a partir da frutose foram semelhantes aos obtidos a partir da investigação com o ácido cítrico. Nesse sentido, para concentrações de C de até 100 mg L<sup>-1</sup> não foram observadas interferências para nenhum analito. Entretanto, para 150 mg L<sup>-1</sup> de C, foi observado um aumento na intensidade do sinal para todos os REE, e concordâncias de 116% a 120% (para Eu e Gd, respectivamente) foram obtidas em comparação com soluções de referência. Ainda, a partir de 150 mg L<sup>-1</sup> de C, a intensidade do sinal dos REE aumentou de maneira significativa chegando a concordâncias de até 340% (para Y) quando 3000 mg L<sup>-1</sup> de C foi avaliado.

Ainda, de acordo com os resultados obtidos, o Y, novamente, foi o analito que apresentou o maior aumento na intensidade do sinal na presença de C (a partir do ácido cítrico e da frutose). Possivelmente, o efeito do C proveniente do ácido cítrico e da frutose sejam muito semelhantes no transporte dos analitos até o plasma (Figuras 34 e 35).

Além disso, a partir de 4000 mg L<sup>-1</sup> houve uma diminuição nas concordâncias obtidas para todos os analitos. Possivelmente, isso também ocorreu, pela diminuição da sensibilidade do equipamento causada pelo depósito de C na interface e no tubo injetor do equipamento de ICP-MS. Na Figura 36 é possível observar o aspecto do tubo injetor após os experimentos referentes ao estudo do efeito do C a partir da frutose na determinação dos REE por USN-ICP-MS.

Figura 36 - A) Depósito de C a partir do uso da frutose no tubo injetor do equipamento de ICP-MS e B). Detalhe da deposição de C no tubo injetor.



#### 4.3.6.3 Avaliação do efeito de C durante a determinação de REE por USN-ICP-MS a partir de soluções simuladas de digeridos de fígado bovino

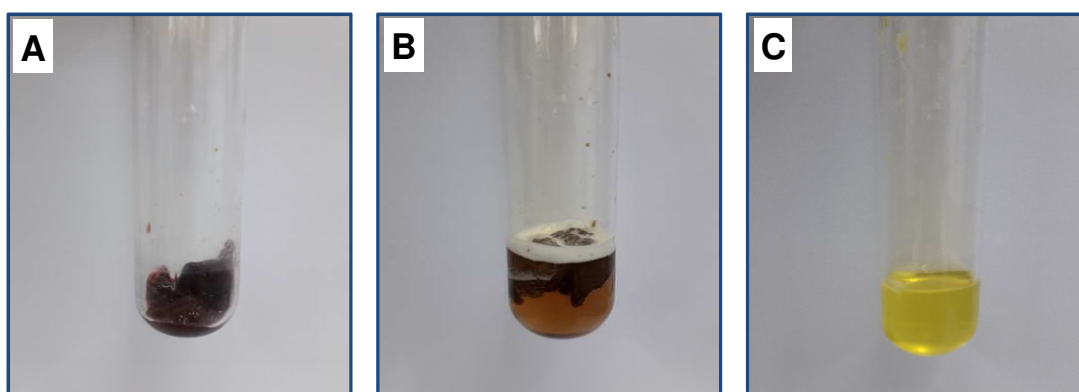
Conforme os resultados obtidos, para o efeito do C a partir do ácido cítrico e da frutose, de maneira geral, foi possível verificar que o C causou um aumento na

intensidade do sinal para todos os REE. Além disso, para ambas as soluções simuladas ocorreu o depósito de C nas partes do equipamento de ICP-MS, levando possivelmente à redução da sensibilidade do equipamento.

É importante salientar que, em ambos os casos, a fonte de C avaliada foi a partir de soluções simuladas, levando aos efeitos de aumento de intensidade de sinal dos analitos. No entanto, a forma química em que o C está presente nas soluções simuladas de ácido cítrico e de frutose é diferente da forma química que o C está presente em digeridos da amostra, por exemplo. Provavelmente, nesses digeridos, o C esteja associado às gorduras e outros compostos orgânicos oxidados de maneira incompleta. Dessa maneira, o C não estaria tão disponível nos digeridos como nas soluções simuladas. Assim, para investigar se à presença de uma fonte de C diferente daquelas usadas nas soluções simuladas causariam os mesmos efeitos, experimentos adicionais com digeridos de fígado foram feitos.

Conforme descrito no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*), para a obtenção das soluções contendo C a partir de digeridos de fígado bovino, cerca de 3 a 4 g de fígado (*in natura*) foram digeridos usando 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  por CWD-OS. Posteriormente, foram preparadas as soluções usadas nos experimentos de interferências contendo C nas concentrações de 50 a 5000 mg  $\text{L}^{-1}$  a partir de sucessivas diluições dos digeridos. Na Figura 37 é possível observar o aspecto dos digeridos de fígado bovino após o método da CWD-OS.

Figura 37- A) Fígado bovino *in natura*, B) mistura contendo aproximadamente 3 g de fígado e 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  C) solução obtida após a digestão por CWD-OS.



Após a digestão, foi feita a determinação da concentração de  $\text{HNO}_3$  em todos os digeridos obtidos após CWD-OS, visto que era necessário o preparo de soluções

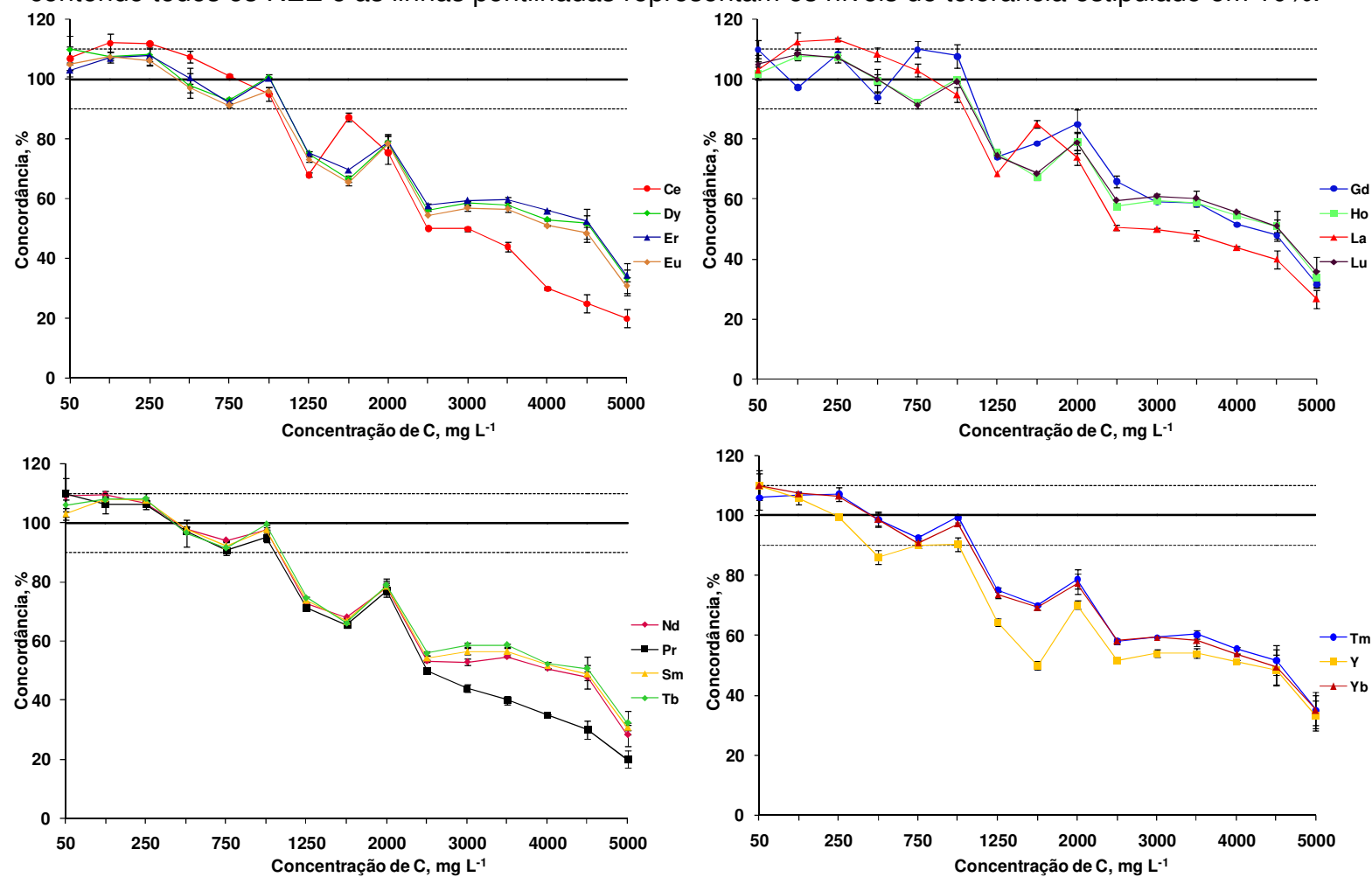


Como demonstrado na Figura 38, todas as soluções contendo C a partir dos digeridos de fígado bovino tiveram concentrações diferentes (principalmente de Na, e de K). Esse resultado era esperado visto que a amostra de fígado *in natura* não é homogênea e foram utilizados diferentes digeridos de fígado bovino para preparar as soluções para os experimentos de interferências. Ainda, foi feito um somatório da concentração dos metais (linha azul clara) para se ter certeza quais as soluções poderiam, ou não, causar interferências devido à presença de metais na determinação dos REE por USN-ICP-MS.

É importante salientar os resultados obtidos para as soluções 6 e 7, correspondentes a concentração de C de 1000 e 1250 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Neste contexto, foram obtidas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> de K e 8 mg L<sup>-1</sup> de Na (na solução contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de C) e de 49 mg L<sup>-1</sup> de K e 13 mg L<sup>-1</sup> de Na (na solução contendo 1250 mg L<sup>-1</sup> de C). Esses resultados evidenciam que, de acordo com os experimentos de interferências causados por K e Na, a solução 7 causaria supressão de sinal para os REE. Na Figura 39 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do C na determinação dos REE por USN-ICP-MS a partir de digeridos de fígado bovino.



Figura 39 - Efeito da concentração de C (a partir de digeridos de fígado bovino) na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 39, foi possível observar que para as concentrações de C de até  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  as concordâncias para todos os analitos variaram de 90 a 110% em comparação com as soluções de referência. Uma das causas que poderia justificar esse resultado é que o C proveniente de digeridos não favorece o transporte dos analitos até o plasma, visto que ele não está quimicamente tão disponível quanto aquele presente nas soluções simuladas.

Resumidamente, o C presente nos digeridos não consegue, de maneira eficiente, transportar os clusters dos REE (formados após o processo de desolvatação pelo USN) para o plasma. Outra possível explicação para esse comportamento, é que o C presente nos digeridos não favorece reações de transferência de carga entre o C e os REE (ionizados) no plasma, causadas pelas espécies de C ( $\text{C}^+$ ,  $\text{C}^{2+}$ ,  $\text{CO}^+$  ou  $\text{CO}_2^+$ ).

Por outro lado, para concentrações de C acima de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  a partir de soluções simuladas do digerido de fígado, todos os analitos apresentaram supressão de sinal, chegando a concordâncias não mais do que 40% para a maioria dos analitos quando  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  de C foi avaliado. No que se refere a diminuição das concordâncias dos REE a partir de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (correspondente a solução 7), é possível concluir que esses resultados estão concordantes com os experimentos de interferências causados por K e Na, visto que essa solução possui concentração de  $49 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $13 \text{ mg L}^{-1}$  de Na. Ainda, é importante destacar que para as soluções 8 a 15, todas possuem concentração de K superior a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Possivelmente, por isso, para estas soluções, também foi observada uma diminuição da intensidade dos REE e, conseqüentemente, nas concordâncias obtidas. Por outro lado para as soluções 1 a 5, o somatório da concentração de K e Na foi inferior a  $40 \text{ mg L}^{-1}$  para ambos os elementos e, com isso, interferências não foram observadas.

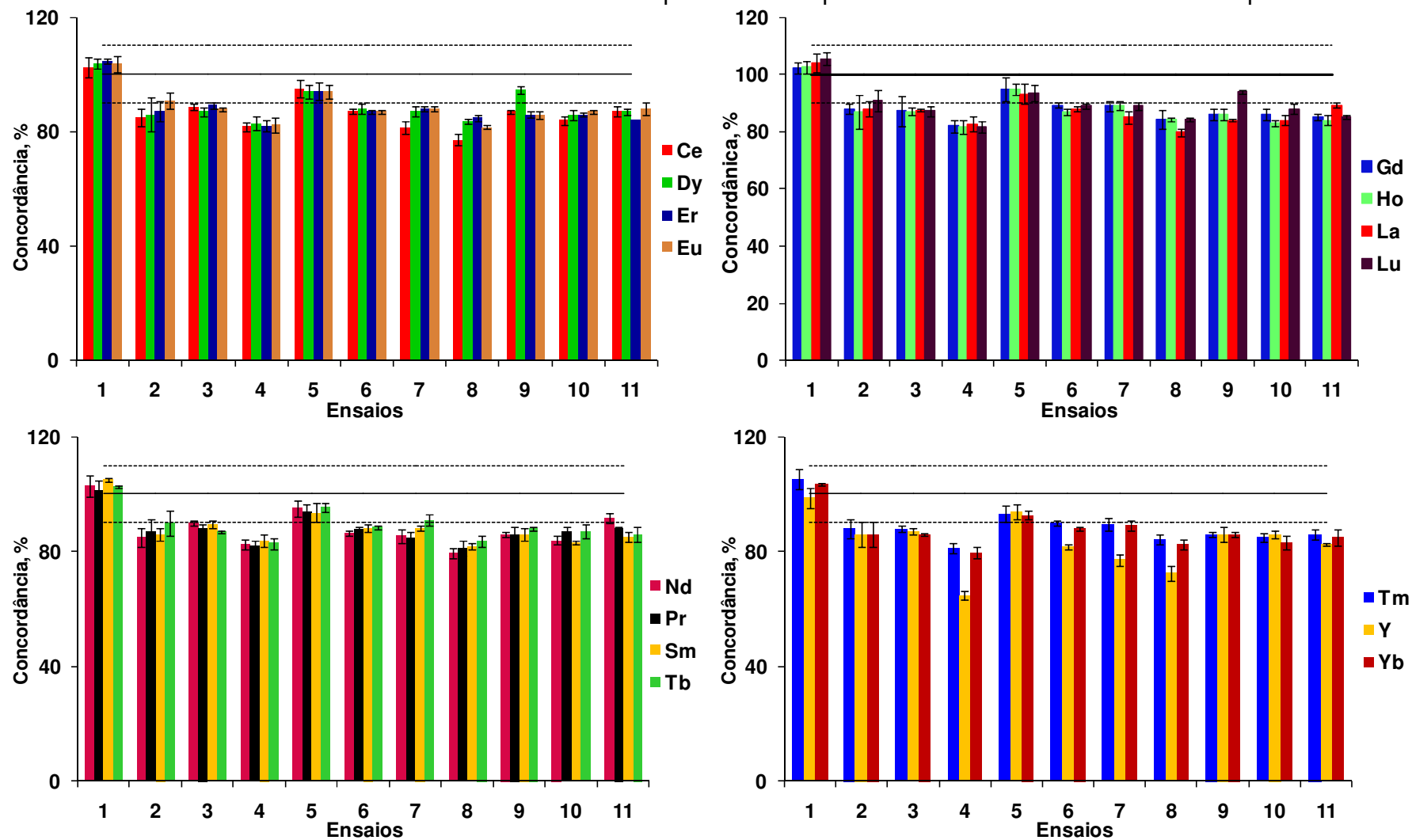
#### **4.3.7 Delineamento fatorial completo $2^3$ – Efeito da concentração de Fe, K e Na**

Até o momento, no presente trabalho, os estudos que avaliaram a presença de interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS na presença de Fe, K e Na, foram feitos de forma univariada. De maneira resumida, a partir da presença de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para Na e K e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  para Fe, foram observadas interferências na determinação de todos os REE por USN-ICP-MS. No entanto, após o estudo

univariado para Fe, K e Na, não foi possível concluir se o somatório da concentração desses elementos também causaria esse tipo de interferência na determinação de REE por USN-ICP-MS. Dessa forma, foi feito um estudo sistemático usando um delineamento fatorial completo ( $2^3$ ) envolvendo Fe, Na e K. Os experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles em que os níveis de 2 ou mais fatores são combinados. Fatores são as variáveis independentes, as quais tiveram seus níveis fixados de acordo com o interesse de quem aplica o planejamento. Esse tipo de planejamento é dito completo, uma vez que todas as combinações possíveis, de cada fator estão presentes.

Para os ensaios do delineamento fatorial completo, as variáveis envolvidas foi a concentração de Fe, K e Na, que foi selecionada com base nos resultados obtidos nos estudos univariados destes interferentes. A concentração de Fe, K e Na em cada ensaio pode ser observada na Tabela 8 (*Materiais e Métodos*). As concentrações foram avaliadas em 8 ensaios com 3 repetições no ponto central. Os procedimentos para esta avaliação estão descritos no item 3.6.3 (*Materiais e Métodos*). Na Figura 40 podem ser observados os resultados obtidos para o planejamento experimental.

Figura 40 - Delineamento fatorial completo para avaliação do efeito da concentração de Fe, K e Na na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



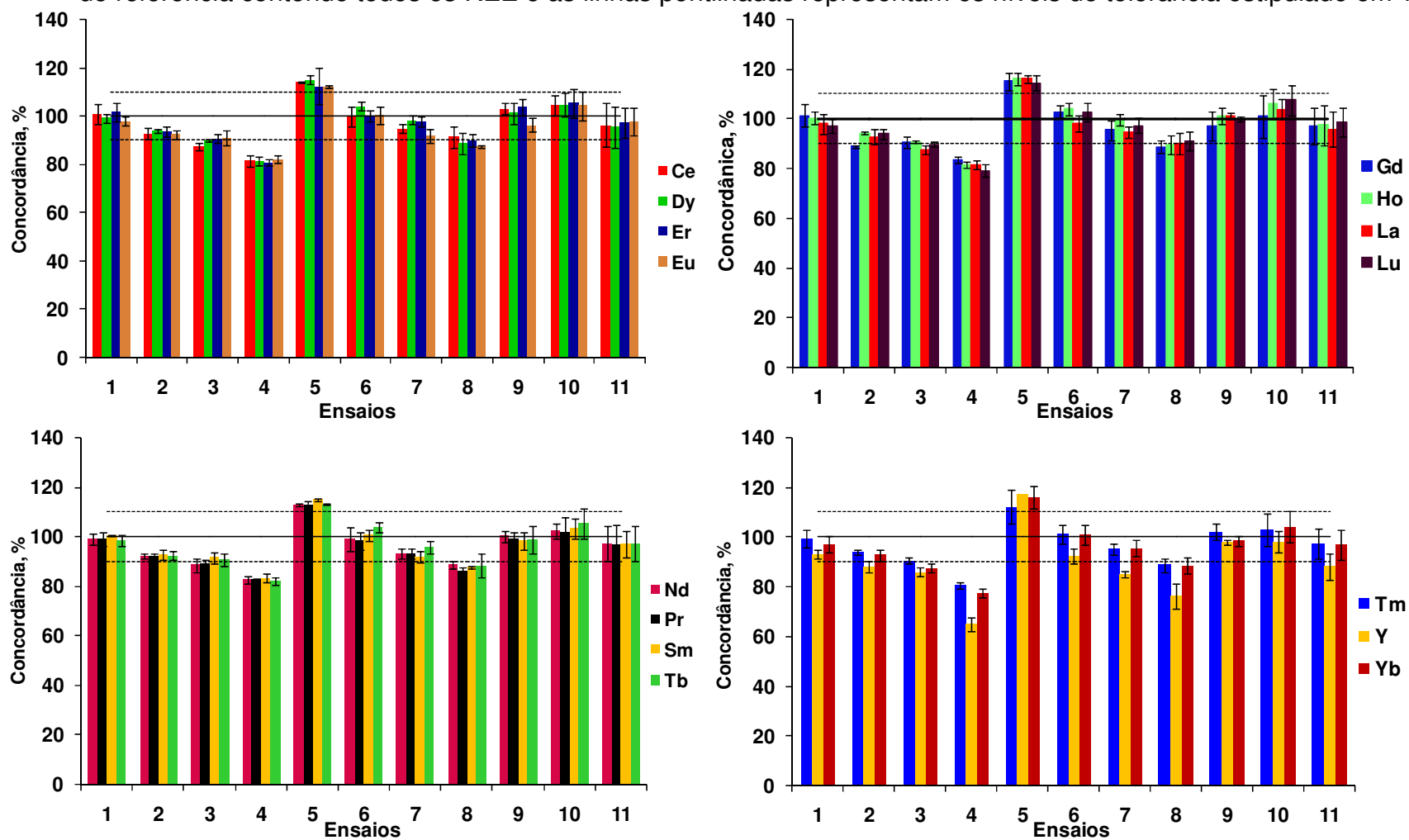
Como pode ser observado na Figura 40, conforme esperado, os resultados foram bem distintos para cada condição avaliada. No ensaio 1 não foram observadas interferências na determinação dos REE e as concordâncias entre as soluções contendo  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Na (totalizando  $45 \text{ mg L}^{-1}$ ) variaram de 98,7% para Y a 105% para Tm em comparação com os valores de referência (sem à presença dos interferentes). Por outro lado, para as condições 2 e 3 ( $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de Na e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Na, respectivamente, totalizando  $70 \text{ mg L}^{-1}$ ), os resultados foram similares entre si. No entanto, em ambas as condições, as concordâncias em relação a condição 1 diminuíram para todos os analitos. Nestes casos, concordâncias de 85% para Nd e 90% para Eu e Lu, respectivamente (condição 2) e de 86 e 88% para Yb e Nd, respectivamente (condição 3) foram obtidas. Ainda nestas condições, embora as concordâncias estejam na faixa de 90% para alguns elementos (como Eu e Lu, por exemplo), é possível verificar a tendência de diminuição de intensidade do sinal para estes analitos. É importante mencionar que, de acordo com os experimentos univariados, nenhum desses elementos causariam interferências nessas concentrações. Dessa forma, esses resultados mostram que o somatório da concentração de K e Na pode influenciar no surgimento de interferências (supressão de sinal) na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Quando a condição 4 ( $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de Na, totalizando  $95 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi avaliada, todos os elementos apresentaram supressão de sinal. Neste caso, as concordâncias variaram de 64% para Y a 84% para Eu, evidenciando que o somatório das concentrações dos metais influencia no surgimento das interferências. Por outro lado, para a condição 5 ( $40 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de K e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Na, totalizando  $70 \text{ mg L}^{-1}$ ), não foi observado supressão de sinal e as concordâncias para todos os REE variaram de 91% (Ce) a 95% (Tm). Observando os resultados obtidos para a condição 5 e para os resultados obtidos para as demais condições (6 a 11), observa-se que somando-se a concentração de Fe às concentrações de Na e K, não foi observada nenhuma interferência. De uma maneira geral, foi possível concluir que as somas de concentrações de K e Na possuem maior tendência de causar supressão de sinal dos REE na determinação por USN-ICP-MS. Dessa forma, o conhecimento de concomitantes nas matrizes para determinação REE é muito importante.

#### 4.3.8 Delineamento fatorial completo $2^3$ – Efeito da concentração de Na, K e C

Conforme observado nos estudos de interferências de Na e K na determinação de REE por USN-ICP-MS (itens 4.3.1 e 4.3.2, *Resultados e Discussões*), observou-se que, de maneira geral, a supressão de sinal dos REE depende da concentração dos interferentes (concentrações superiores a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). No entanto, avaliando os efeitos do C (a partir do ácido cítrico) na determinação dos REE pela mesma técnica, o comportamento foi contrário, ou seja, com o aumento da concentração de C foi observado o aumento de sinal para todos os REE. Dessa forma, um estudo sistemático usando um delineamento fatorial completo ( $2^3$ ) envolvendo K, Na e C foi feito para verificar qual dos efeitos seria predominante durante a determinação de REE por USN-ICP-MS. As concentrações foram avaliadas em 8 ensaios com 3 repetições no ponto central. A concentração de K, Na e C em cada ensaio pode ser observada na Tabela 9 (*Materiais e Métodos*). Os procedimentos para este estudo estão descritos no item 3.6.4 (*Materiais e Métodos*). É importante enfatizar que as concentrações selecionadas para os ensaios foram baseadas nos resultados obtidos nos estudos univariados para cada interferente. Na Figura 41 podem ser observados os resultados obtidos para todos os ensaios feitos.

Figura 41 - Delineamento fatorial completo para avaliação do efeito da concentração de K, Na e C na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



Como pode ser observado na Figura 41, no ensaio 1 (15 mg L<sup>-1</sup> de K, 15 mg L<sup>-1</sup> de Na e 150 mg L<sup>-1</sup> de C), as concordâncias variaram de 92% para Y a 102% para Er em comparação com os valores de referência. Por outro lado, para as condições 2 (15 mg L<sup>-1</sup> de K, 40 mg L<sup>-1</sup> de Na e 150 mg L<sup>-1</sup> de C) e 3 (40 mg L<sup>-1</sup> de K, 15 mg L<sup>-1</sup> de Na e 150 mg L<sup>-1</sup> de C), as concordâncias em relação a condição 1 diminuiriam. Nestes casos, as concordâncias variam de 86% para Y (condição 3) a 94% para Ho, Lu e Tm (condição 2). Em ambas as condições (2 e 3), foi possível observar comportamento similar para todos os REE. Possivelmente, esse comportamento similar seja pelo fato de Na e K possuírem efeitos semelhantes no plasma.

Ainda, conforme descrito no item 4.3.7 (*Resultados e Discussões*) nas condições 2 e 3, o somatório da concentração de Na e K (55 mg L<sup>-1</sup>) provocaria a diminuição da intensidade de sinal dos REE, resultando em concordâncias na faixa de 85 a 90% para a maioria dos analitos (exceto Eu e Lu). Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos na avaliação do efeito do C (a partir do ácido cítrico descrito no item 4.3.6.1, *Resultados e Discussões*), foi possível verificar que a partir de 150 mg L<sup>-1</sup> de C, as concordâncias para os REE tendem a aumentar.

Dessa forma, os resultados obtidos nos ensaios 2 e 3 do presente planejamento, mostram que os efeitos de Na/K e C na determinação de alguns REE por USN-ICP-MS estão concordantes com os resultados univariados. Adicionalmente, quando a condição 4 (40 mg L<sup>-1</sup> de K, 40 mg L<sup>-1</sup> de Na e 150 mg L<sup>-1</sup> de C) foi avaliada as concordâncias foram menores do que 84% (Gd) e todos os REE apresentaram supressão de sinal. Por outro lado, para a condição 5 (15 mg L<sup>-1</sup> de K, 15 mg L<sup>-1</sup> de Na e 500 mg L<sup>-1</sup> de C) foi observado que houve um aumento de sinal para todos os REE, possivelmente devido a alta concentração de C. Nesta condição as concordâncias para os REE variaram de 114% (Ce) a 116% (Y). Por outro lado, para as condições 6 (15 mg L<sup>-1</sup> de K, 40 mg L<sup>-1</sup> de Na e 500 mg L<sup>-1</sup> de C) e 7 (40 mg L<sup>-1</sup> de K, 15 mg L<sup>-1</sup> de Na e 500 mg L<sup>-1</sup> de C), observou-se que todos os REE apresentaram concordâncias na faixa de 90 a 110%. Esses resultados, evidenciam que, os efeitos de interferências (supressão e aumento de sinal) podem ser compensados quando presentes na mesma solução.



Com isso, observando os resultados obtidos para a condição 6 e 7 e para as demais condições (8 a 11), observa-se que as concentrações de K/Na e C podem competir entre si para influenciar no surgimento de interferências durante a determinação de REE por USN-ICP-MS. No entanto, na condição 8 (40 mg L<sup>-1</sup> de K, 40 mg L<sup>-1</sup> de Na e 500 mg L<sup>-1</sup> de C, observou-se uma tendência na prevalência do efeito de supressão de sinal (causados pelo Na e K) do que o efeito de aumento de sinal dos REE causados pelo C (ácido cítrico). Neste caso, o somatório das concentrações de Na e K foi de 80 mg L<sup>-1</sup>. É importante mencionar que um ou outro efeito irá prevalecer dependendo da concentração de cada elemento presente nas amostras.

#### 4.3.9 Avaliação do efeito de ácidos na determinação de REE por USN-ICP-MS

À presença de elevadas concentrações de ácido pode causar interferências na determinação elementar, dependendo da técnica utilizada. As técnicas de ICP-MS e ICP-OES são mais susceptíveis à essas interferências, cujos efeitos são bastante mencionados na literatura<sup>101,107-109</sup>. Dependendo da concentração dos ácidos em solução, pode ocorrer alteração nos processos de nebulização das soluções, modificação da estabilidade do plasma e efeitos de supressão de intensidade de sinal de alguns elementos<sup>107,109,146</sup>. Dessa forma, o efeito do ácido na determinação de REE por USN-ICP-MS deve ser mensurado.

O estudo sistemático de avaliação do efeito de ácidos na determinação de REE por USN-ICP-MS foi feito conforme descrito no item 3.6.5 (*Materiais e Métodos*). É importante mencionar que foram avaliados os efeitos de três soluções ácidas na determinação de REE por USN-ICP-MS: *i*) efeito da concentração de HNO<sub>3</sub>, *ii*) efeito da concentração de HCl e o *iii*) efeito da concentração de água régia.

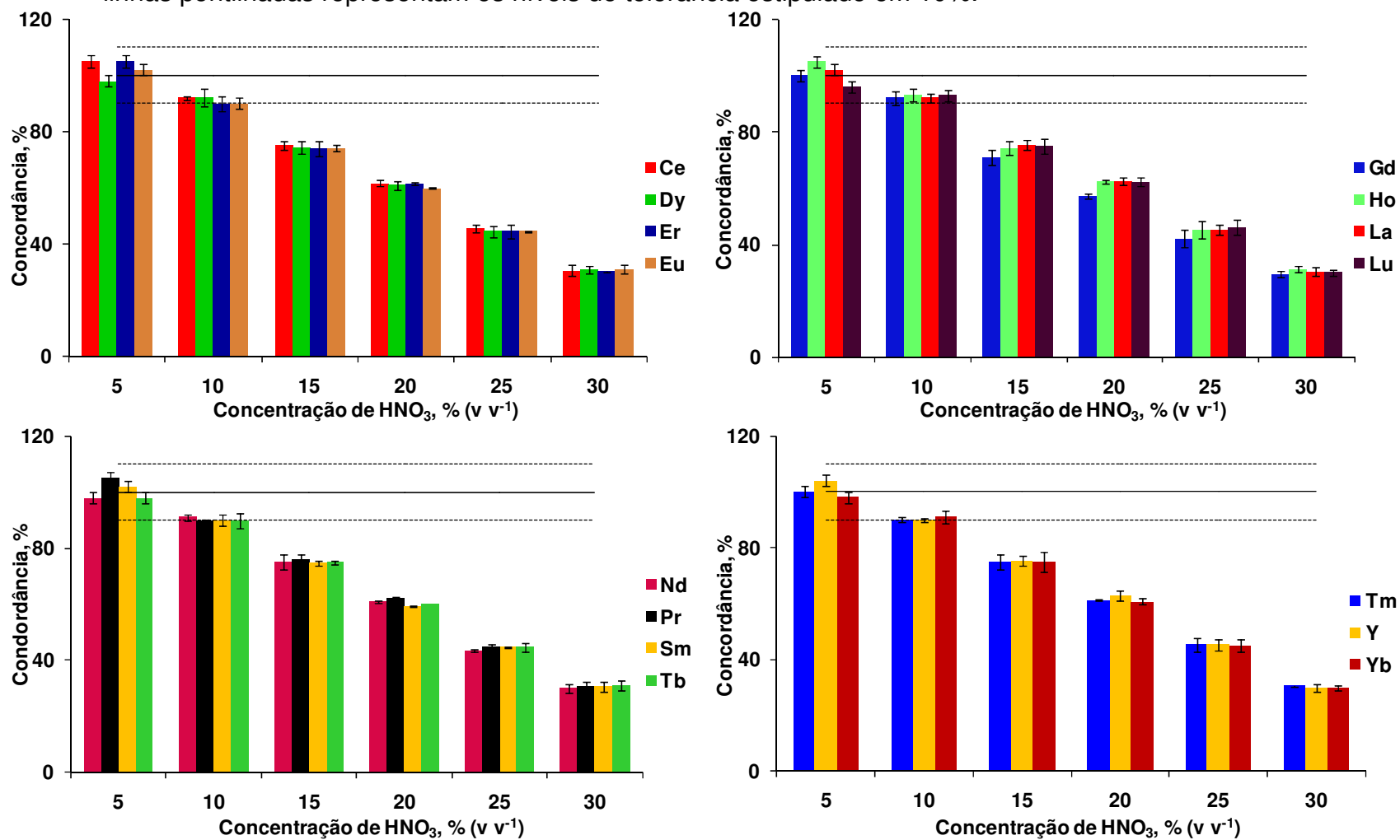
##### 4.3.9.1 Avaliação do efeito do HNO<sub>3</sub> na determinação de REE por USN-ICP-MS

Dentre os ácidos inorgânicos para a oxidação de matrizes orgânicas, o HNO<sub>3</sub>, é o mais utilizado. No entanto, após a etapa de digestão das amostras, o ácido residual pode causar interferências na determinação dos REE se presente em

elevada concentração. Nesse caso, geralmente são observados efeitos de supressão de sinal<sup>13,107,109</sup>.

É importante considerar que o efeito do HNO<sub>3</sub> na determinação de REE por USN-ICP-MS já foram abordados em trabalhos prévios<sup>13,129</sup>. No entanto, esses estudos foram feitos para soluções de referência contendo 1 µg L<sup>-1</sup> dos REE. Portanto, no presente trabalho, experimentos adicionais contendo 250 ng L<sup>-1</sup> dos REE foram feitos, com o principal objetivo de verificar se os efeitos observados ocorrem na mesma proporção. Na Figura 42 é possível observar os resultados obtidos para a avaliação do efeito HNO<sub>3</sub> na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 42 - Efeito da concentração de HNO<sub>3</sub> na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



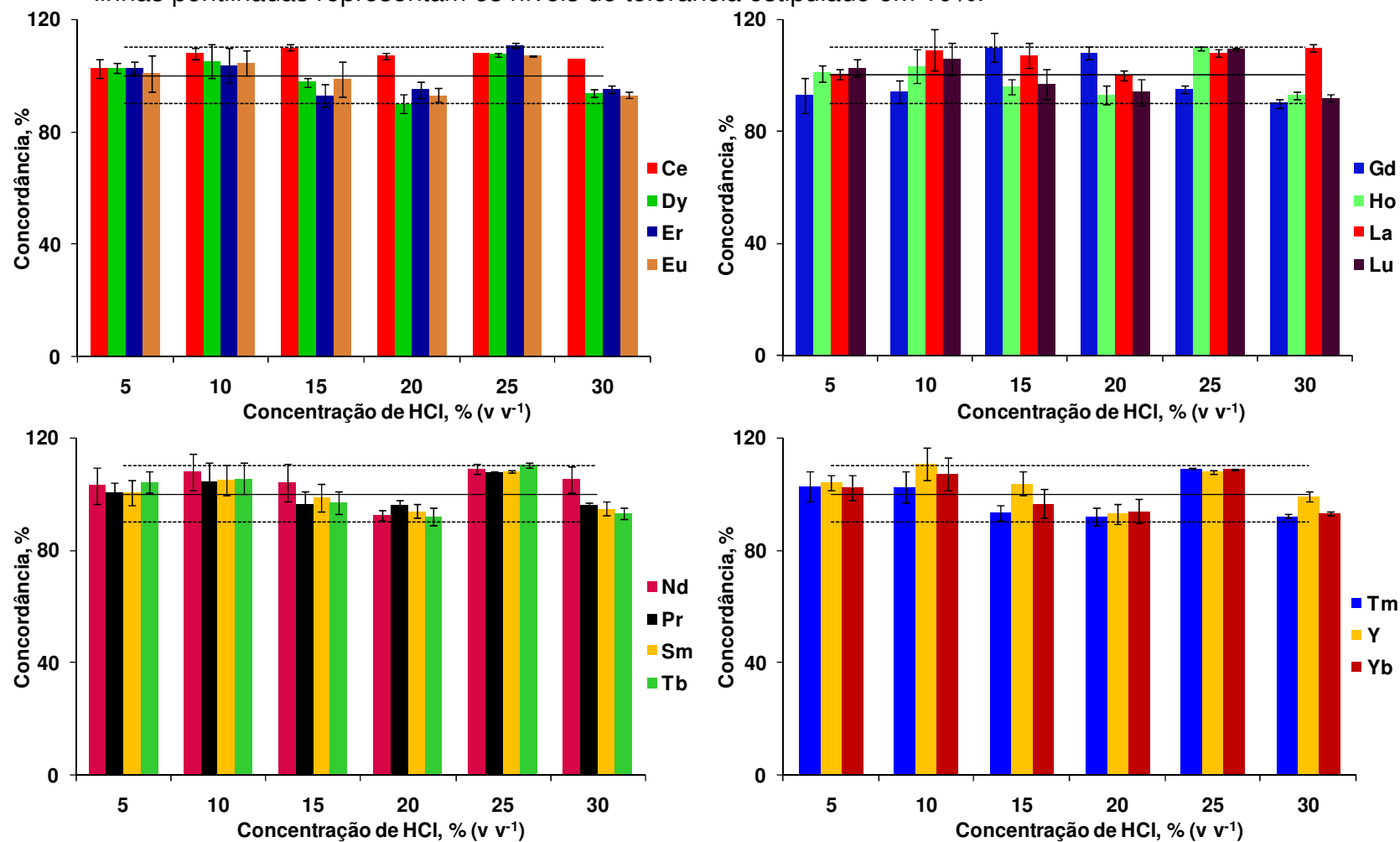
De acordo com os resultados obtidos (Figura 42), para concentrações de  $\text{HNO}_3$  de até 10% ( $\text{v v}^{-1}$ ) não foram observadas interferências em comparação com os valores de referência (soluções contendo todos os REE em  $\text{HNO}_3$  5%). Para concentrações superiores à 10% de  $\text{HNO}_3$ , todos analitos apresentaram supressão de sinal, acarretando em concordâncias inferiores a 40% quando a concentração de  $\text{HNO}_3$  30% foi avaliada. Ainda, é possível observar que todos os REE apresentaram efeitos de supressão de sinal similares.

No presente estudo foi observado que o efeito de supressão de sinal ocorre independentemente da concentração dos REE (250 ou 1000  $\text{ng L}^{-1}$ ). De uma forma geral, possivelmente, o aumento da concentração de  $\text{HNO}_3$  acarreta na diminuição da eficiência de formação do aerossol pelo USN, visto que as propriedades físico-químicas das soluções (densidade, viscosidade e tensão superficial) são alteradas de maneira significativa. Visualmente, é possível verificar que a formação da névoa durante o processo de nebulização pelo USN diminui de maneira significativa para soluções com concentração de  $\text{HNO}_3$  superiores a 20%. Esse é um dos principais problemas na determinação de REE por USN-ICP-MS em soluções que possuem elevada concentração de  $\text{HNO}_3$ . É importante salientar que comportamentos similares foram observados por Pereira<sup>129</sup> e Druzian<sup>13</sup> pela presença de elevadas concentrações  $\text{HNO}_3$  em solução na determinação de REE por USN-ICP-MS.

#### 4.3.9.2 Avaliação do efeito do HCl na determinação de REE por USN-ICP-MS

Embora o HCl não seja um ácido comumente utilizado para a oxidação da matéria orgânica, muitos métodos de preparo de amostras utilizam o HCl ou até mesmo a mistura de HCl com  $\text{HNO}_3$  para aumentar a volatilidade e ajudar a reter alguns analitos em solução para a posterior determinação<sup>15,70,85</sup>. Considerando estes aspectos, o efeito do HCl também foi avaliado na determinação de REE por USN-ICP-MS. Os resultados estão mostrados na Figura 43.

Figura 43 - Efeito da concentração de HCl na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



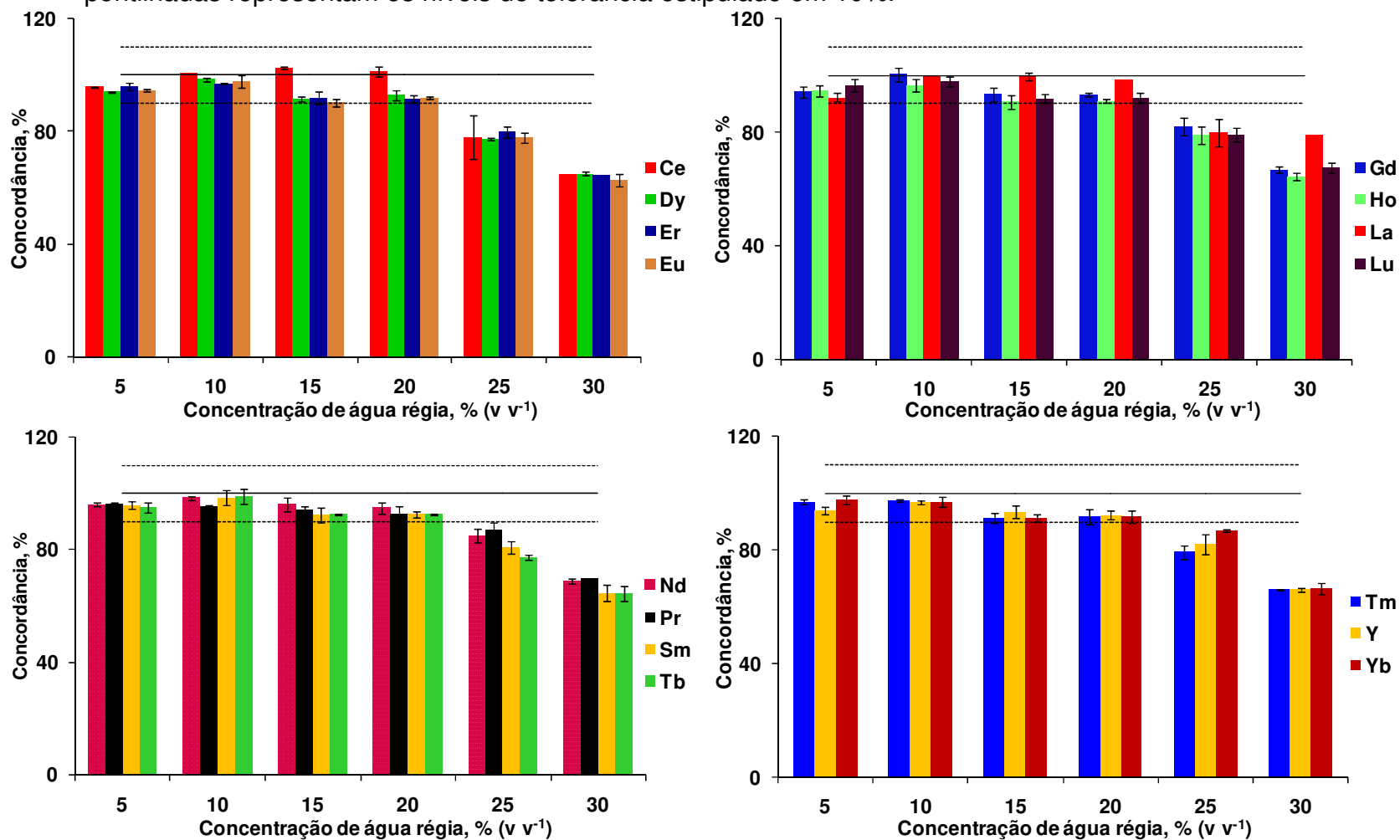
Após a avaliação da concentração de HCl na determinação de REE por USN-ICP-MS, não foram observadas interferências para nenhum dos analitos, independentemente da concentração de HCl avaliada (5 a 30%). Além disso, os RSDs foram relativamente baixos (menores do que 6%) para todas as condições. Possivelmente, a mudança de densidade, viscosidade e tensão superficial devido à presença do HCl não seja suficiente para modificar a formação do aerossol pelo USN. Também, de acordo com os resultados obtidos, a presença do HCl não modificou a estabilidade do plasma, bem como o transporte dos analitos até o mesmo. De acordo com Brenner et al<sup>108</sup>, o uso de diferentes tipos de ácidos (HNO<sub>3</sub>, HCl ou HClO<sub>4</sub>) não causam, necessariamente, efeitos de interferências de mesma magnitude na determinação de REE por técnicas espectrométricas. Ainda, segundo os mesmos autores, a intensidade das interferências depende do tipo de nebulizador e da câmara de nebulização, bem como das condições do equipamento utilizado.

#### 4.3.9.3 Avaliação do efeito de água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS

A água régia é uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HCl em uma proporção 1+3, respectivamente. A água régia possui alto poder oxidante, sendo capaz de dissolver Au e Pt, por exemplo. Essa mistura é muito utilizada em métodos de preparo de amostras, justamente devido às suas propriedades oxidantes proveniente da combinação desses dois ácidos fortes.

Conforme demonstrado nas Figuras 42 e 43, foi possível observar que o principal problema, no que se refere a concentração de ácido na determinação de REE por USN-ICP-MS, é à presença de HNO<sub>3</sub>, visto que não foram observados efeitos quando o HCl foi avaliado. No entanto, torna-se necessário estudar o efeito da combinação de ambos os ácidos (HNO<sub>3</sub> e HCl), visto que ambos podem ser utilizados simultaneamente para a digestão de uma infinidade de matrizes<sup>55</sup>. Na Figura 44 é possível observar os resultados obtidos para o efeito da água régia durante a determinação de REE por USN-ICP-MS.

Figura 44 - Efeito da concentração de água régia na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De maneira geral, após a avaliação do efeito da água régia na determinação dos REE por USN-ICP-MS, não foram observadas interferências para concentrações de água régia de até 20% (v v<sup>-1</sup>). Ainda, RSDs relativamente baixos foram obtidos (menores do que 5%). Por outro lado, para concentrações de água régia superiores a 20%, foram observados efeitos de supressão de sinal, acarretando em concordâncias inferiores a 85% para todos os analitos em comparação com os valores de referência. Ainda, quando a condição de água régia 30% foi avaliada, foi verificado que as concordâncias para todos os analitos foram inferiores a 75%.

Conforme observado durante a avaliação do efeito do HNO<sub>3</sub> e do HCl (itens 4.3.9.1 e 4.3.9.2, respectivamente), os REE foram mais susceptíveis às interferências causadas pelo HNO<sub>3</sub> do que pelo HCl. Com isso, e conforme o esperado, efeitos de supressão de sinal para os REE utilizando a água régia foram menos pronunciados do que para o HNO<sub>3</sub>, visto que o HCl diluiu o HNO<sub>3</sub> presente na solução. O conhecimento desses resultados é o importante, visto que em muitos casos é necessário o uso de ácidos ou misturas de ácidos para digestão de amostras visando a posterior determinação de REE.

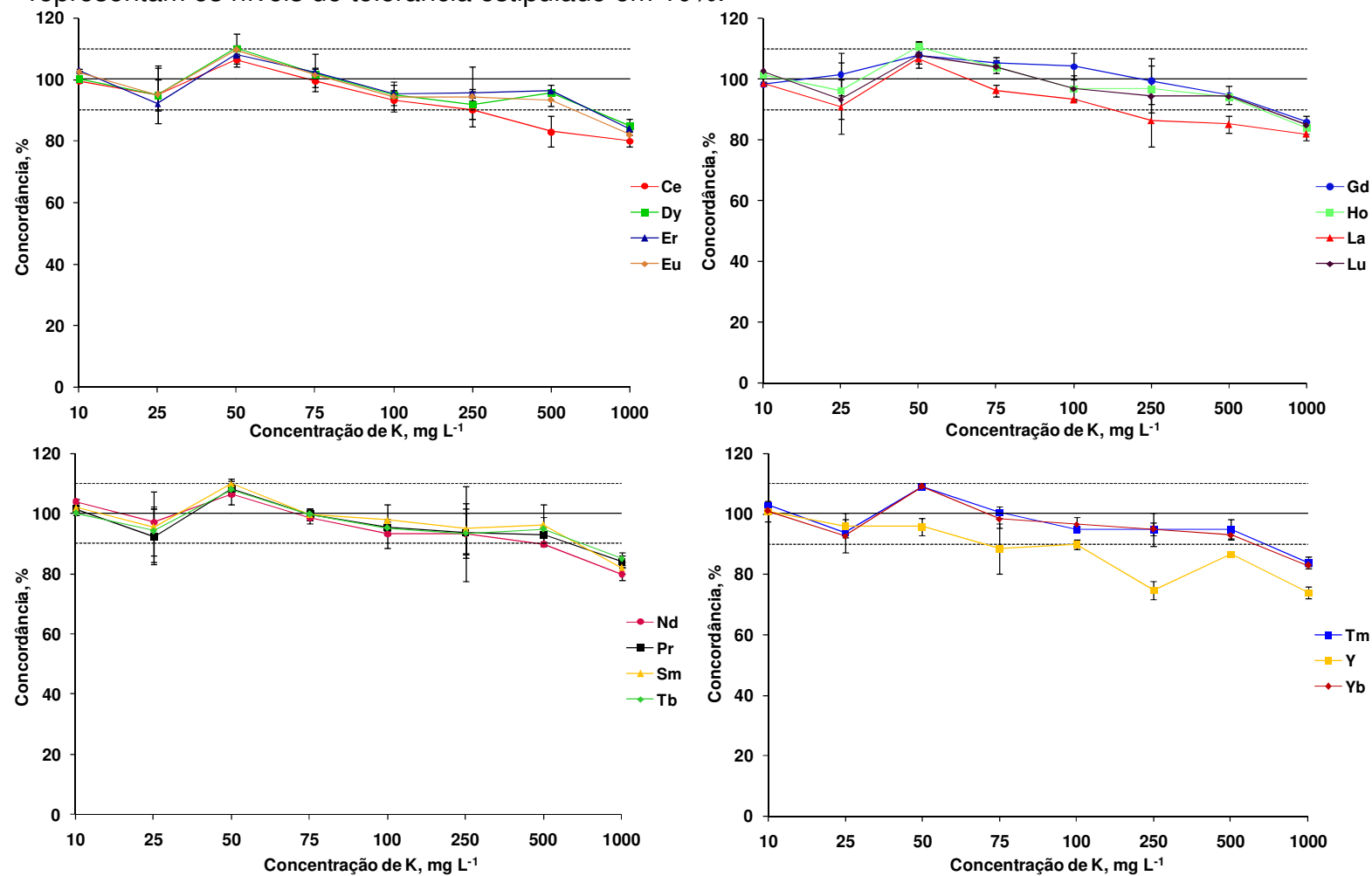
#### **4.4 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DE REE POR ICP-MS USANDO NEBULIZADOR CONCÊNTRICO**

##### **4.4.1 Avaliação do efeito do K na determinação de REE por ICP-MS**

Após os estudos de interferências na determinação dos REE por USN-ICP-MS causados por Ca, Fe, K, Mg, Na e C, alguns experimentos foram feitos usando o sistema de nebulização concêntrico e câmara de nebulização ciclônica, o qual é comumente utilizado para a determinação elementar por ICP-MS. Esses experimentos foram feitos para verificar se as interferências observadas por USN-ICP-MS seriam devido aos efeitos que ocorrem no plasma independente do tipo de nebulizador, ou se, o USN favorecia/dificultava o surgimento delas. Dessa forma, K, Na e C (a partir do ácido cítrico e digerido de fígado bovino) foram avaliados no presente estudo. A primeira investigação foi referente à concentração de K e a descrição do procedimento está descrita no item 3.6.1 (*Materiais e Métodos*). Na Figura 45 é possível observar os resultados obtidos para o estudo do efeito da concentração de K na determinação de REE por ICP-MS.



Figura 45 - Efeito da concentração de K na determinação de REE ( $250 \text{ ng L}^{-1}$ ) por ICP-MS ( $n=5$ ). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 45, foi possível observar que as concordâncias na presença de até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de K foram superiores à 90% para todos os analitos em comparação com os valores de referência (sem a presença de K). Quando a concentração de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de K foi avaliada, apenas La e Y apresentaram supressão de sinal (concordância de 86 e 74%, respectivamente). Ainda, para a concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de K, além da supressão de sinal observada para La e Y, foi observada, também, a supressão de sinal para Ce (de 83%). Com a excessão de Ce, La e Y, não foram observadas interferências para os demais REE usando até  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de K. No entanto, quando foi avaliada a solução contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de K, todos os analitos apresentaram efeito de supressão de sinal, sendo que as concordâncias variaram de 73% (Y) a 85% (Lu).

De acordo com os resultados supracitados foi possível observar que o uso do nebulizador ultrassônico favoreceu o surgimento de interferências (em aproximadamente 10 vezes) quando comparado com o uso do nebulizador concêntrico. Esses resultados estão concordantes entre si, visto que o uso do nebulizador ultrassônico aumenta a sensibilidade da técnica, ou seja, a quantidade dos analitos que chega até o plasma é maior quando comparada ao sistema convencional de nebulização. Desta forma, o USN não aumentou a sensibilidade apenas para os analitos (neste caso os REE), mas também para os elementos concomitantes presentes na solução, aumentando o efeito interferente destes.

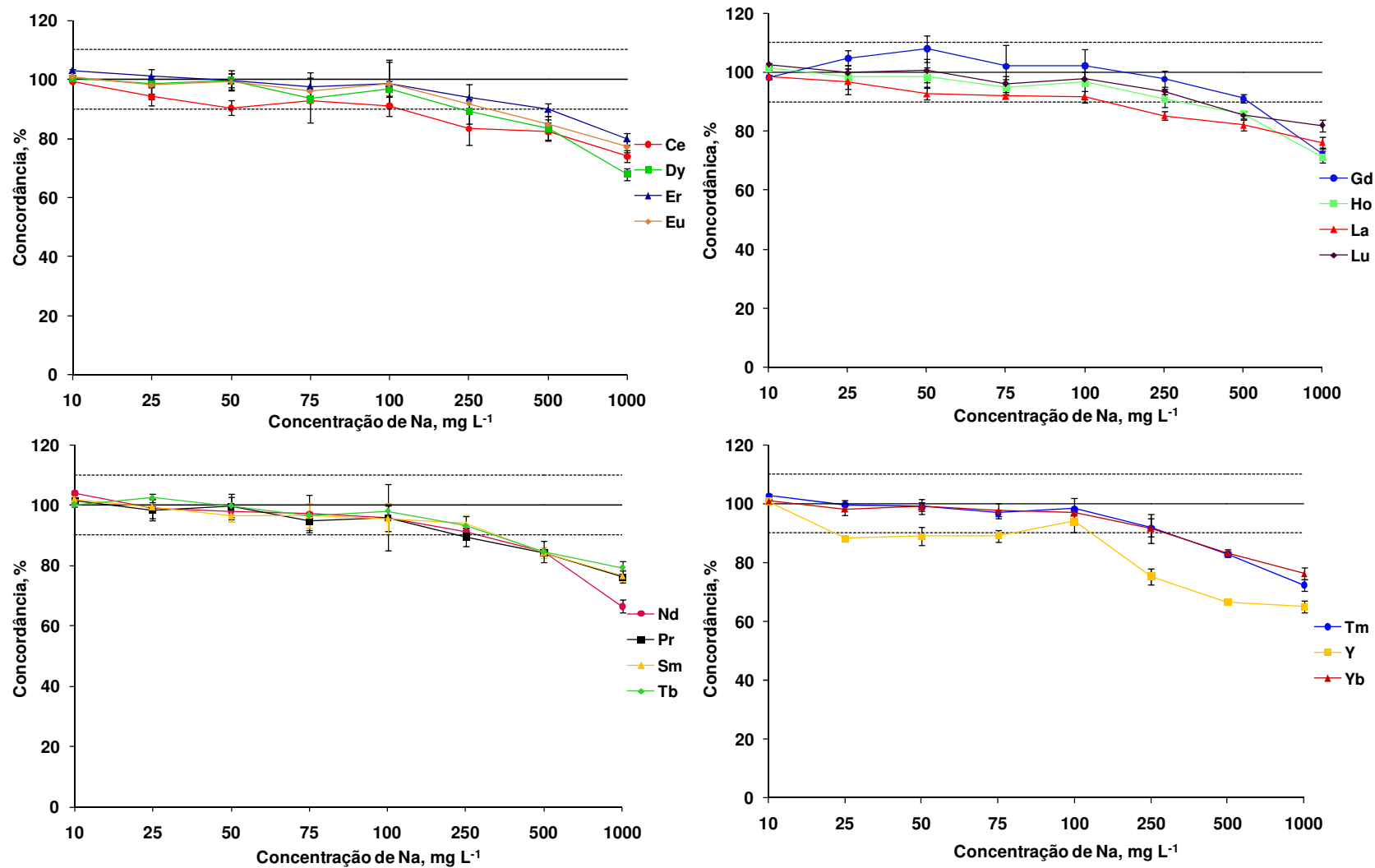
Os resultados obtidos estão concordantes com um estudo prévio feito por Flores et al<sup>143</sup>, onde foi feita a avaliação do efeito do K durante a determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Neste estudo, foi observado que todos os analitos apresentaram supressão de sinal de 15% quando  $530 \text{ mg L}^{-1}$  de K foi avaliado como interferente. No entanto, embora o USN aumente a suscetibilidade às interferências, o uso desse nebulizador é essencial durante a determinação dos REE, visto que as taxas de formação de óxidos diminuem e a sensibilidade da técnica de ICP-MS aumenta de maneira significativa<sup>13,36</sup>.

#### **4.4.2 Avaliação do efeito do Na na determinação de REE por ICP-MS**

Assim como para K, o efeito da concentração de Na foi investigado utilizando a técnica de ICP-MS com sistema de nebulização concêntrico e câmara

de nebulização ciclônica. A descrição do procedimento está descrita no item 3.6.1 (*Materiais e Métodos*). Na Figura 46 é possível observar os resultados obtidos para o efeito da concentração de Na na determinação de REE por ICP-MS.

Figura 46 - Efeito da concentração de Na na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



Após os estudos referentes às possíveis interferências causadas pela presença de Na na determinação de REE por ICP-MS, foi possível observar que concordâncias superiores a 90% utilizando soluções contendo até 100 mg L<sup>-1</sup> de Na em comparação com os valores de referência. Ainda, quando a concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> de Na foi avaliada, apenas La e Y apresentaram supressão de sinal (concordância de 85 e 75%, respectivamente). Por outro lado, para a concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> de Na, exceto para Gd e Er, que apresentaram concordâncias na faixa de 90%, foi observado supressão de sinal para os demais REE (de 76% para Y a 86% para Ho). Ainda, quando a concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Na foi avaliada, todos os analitos apresentaram efeito de supressão de sinal, sendo que as concordâncias variaram de 65% (Dy e Y) a 82% (Lu).

De acordo com os resultados observados para Na na determinação de REE, o uso do nebulizador ultrassônico favoreceu o surgimento de interferências na determinação de REE (em aproximadamente 10 vezes) quando comparado com o uso do nebulizador concêntrico. É importante salientar que esse comportamento foi muito similar ao efeito do K (descrito no item 4.4.1 - *Resultados e discussões*).

#### **4.4.3 Avaliação do efeito do C na determinação de REE por ICP-MS**

O efeito do C durante a determinação de REE por ICP-MS utilizando o nebulizador concêntrico também foi investigado. Para isso, foram avaliadas duas fontes de C: *i*) carbono a partir do ácido cítrico e, *ii*) carbono a partir de digeridos de fígado bovino.

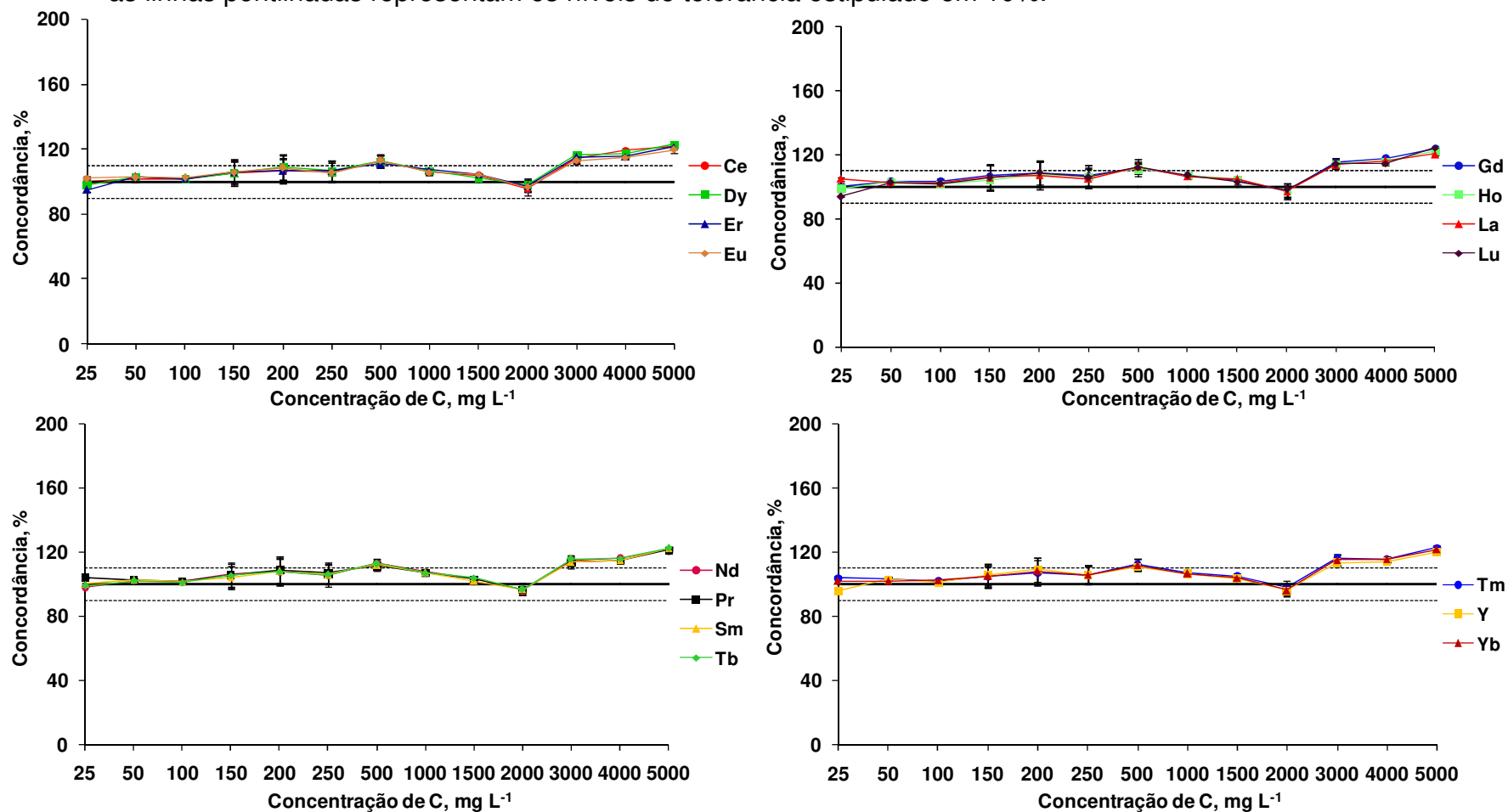
##### **4.4.3.1 Avaliação do efeito de C na determinação de REE por ICP-MS a partir de soluções de ácido cítrico**

Conforme mencionado no item 4.3.6.1 (*Resultados e discussões*), na determinação de REE por USN-ICP-MS observou-se um aumento na intensidade do sinal para todos os REE à medida que a concentração de C em solução (proveniente do ácido cítrico) foi aumentada. Conforme mencionado, possivelmente isso aconteceu devido ao aumento da eficiência de transporte ocasionada pela presença

de C após o processo de dessolvatação ou por possíveis efeitos de transferência de carga entre as espécies contendo C e os REE no plasma.

Para comparação dos resultados obtidos, um estudo referente ao efeito de C proveniente do ácido cítrico na determinação dos REE utilizando o nebulizador concêntrico e a câmara de nebulização ciclônica foi feito no presente estudo. A descrição do procedimento está descrita no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). Na Figura 47 é possível observar os resultados obtidos na determinação de REE por ICP-MS.

Figura 47 - Efeito da concentração de C (a partir do ácido cítrico) na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



Conforme demonstrado na Figura 47, não foram observadas interferências para nenhum analito para concentrações de C de até 2000 mg L<sup>-1</sup> e as concordâncias variaram de 90 a 110% para todos os analitos em comparação com as soluções de referência (sem C). Por outro lado, quando a concentração de 3000 mg L<sup>-1</sup> de C foi avaliada foi observado um aumento de intensidade de sinal para todos REE, resultando em concordâncias de 113% (Ce) a 116% (Tm).

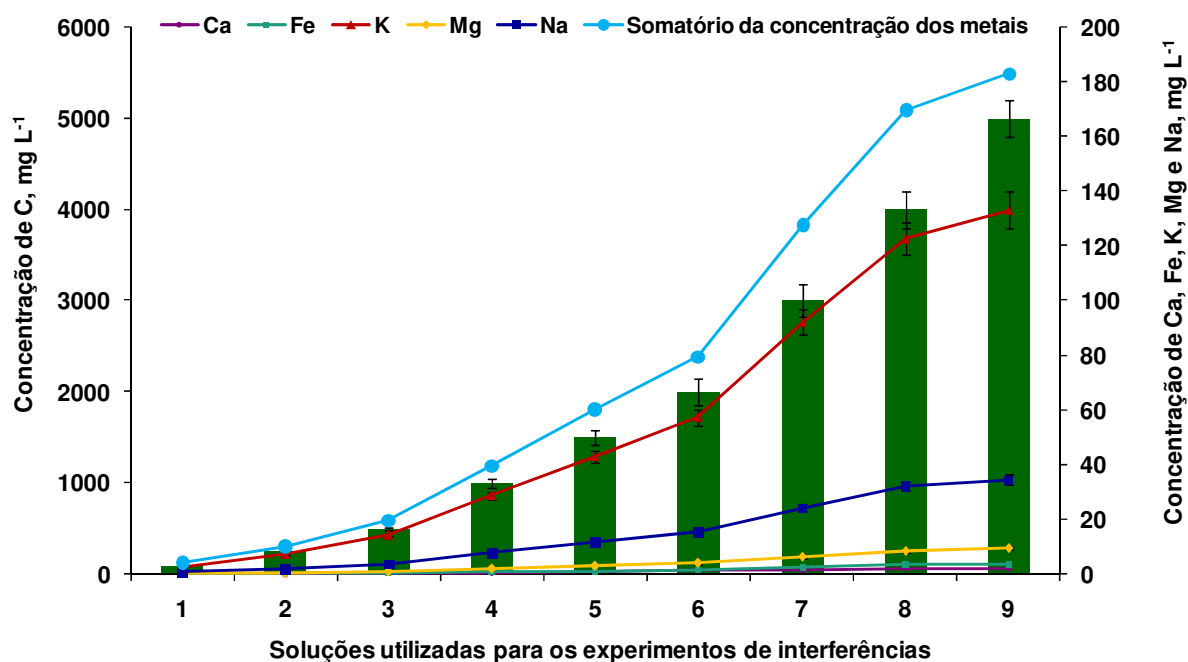
Os resultados obtidos até então, mostram que o uso do USN causou interferências na determinação de REE quando concentrações mais baixas de C (a partir de 150 mg L<sup>-1</sup> de C a partir do ácido cítrico) foram usadas. Dessa forma, possivelmente, o aumento na intensidade do sinal para os REE é causado pelo aumento da eficiência de transporte desses elementos na presença de C (causada pelo USN). O uso do nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica permitem concluir que as reações de transferência de carga entre o C e os REE não é o fator que provoca o aumento da intensidade do sinal dos REE, visto que, não foi observado o aumento na intensidade do sinal para nenhum dos REE utilizando esse sistema de nebulização.

#### 4.4.3.2 Avaliação do efeito de C na determinação de REE por -ICP-MS a partir de digeridos de fígado bovino

A avaliação do efeito do C a partir de digeridos de fígado bovino também foi avaliado utilizando a técnica de ICP-MS utilizando o nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. Para isso, foram preparadas 9 soluções contendo concentrações crescentes de C, conforme descrito no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). Para este estudo, assim como nos estudos por USN-ICP-MS, previamente aos experimentos de interferências, foi feita a determinação de Ca, Fe, K, Mg e Na em cada uma das soluções utilizadas para a avaliação do efeito de C a partir dos digeridos de fígado bovino. Na Figura 48 estão mostrados os resultados obtidos referentes a concentração de Ca, Fe, K, Mg, Na e C, obtidas por ICP-OES, nas 9 soluções utilizadas para a avaliação do efeito da presença de C a partir de digeridos de fígado bovino durante a determinação dos REE por ICP-MS.

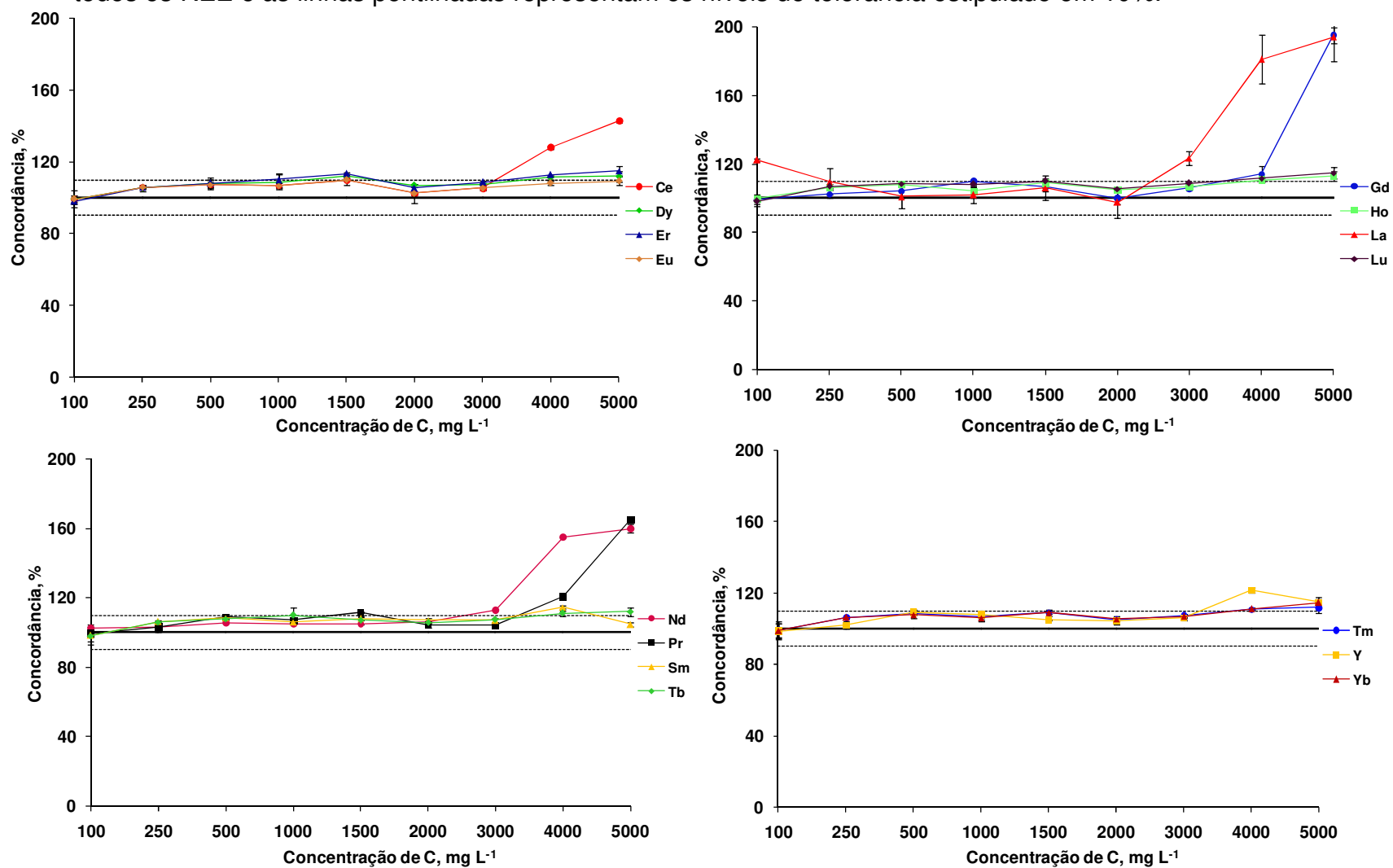


Figura 48 - Concentração de Ca, Fe, K, Mg, Na (linhas) e C (barras), em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas soluções utilizadas para os experimentos de interferências a partir de digeridos de fígado bovino, obtidas por ICP-OES ( $n=3$ ).



Conforme mostrado na Figura 48, é possível verificar que todas as soluções utilizadas nos estudos de interferências, a partir de digeridos de fígado tiveram concentrações relativamente elevadas de K e Na. É importante enfatizar que, considerando as concentrações somadas de K e Na (elementos que estão presentes em maiores concentrações), estas não foram superiores a  $180 \text{ mg L}^{-1}$ . Assim, de acordo com os resultados obtidos nos itens 4.4.1 e 4.4.2 (*Resultados*), nenhuma dessas concentrações causaria efeito de supressão de sinal durante a determinação dos REE por ICP-MS. Na Figura 49 é possível observar os resultados obtidos para o efeito do C a partir de digeridos de fígado bovino durante a determinação de REE por ICP-MS.

Figura 49 - Efeito da concentração de C (a partir de digeridos de fígado bovino) na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) por ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%.



De acordo com os resultados obtidos (Figura 49), foi possível observar que, exceto para Y, utilizando soluções de C com concentração de até 3000 mg L<sup>-1</sup> foram obtidas concordâncias de 90 a 110% em comparação com os valores de referência. Por outro lado, quando as soluções contendo 4000 e 5000 mg L<sup>-1</sup> de C foram avaliadas, concordâncias de 108% para Eu (solução contendo 4000 mg L<sup>-1</sup>) a 195% para Gd (solução contendo 5000 mg L<sup>-1</sup>) foram obtidas.

Adicionalmente, também foi observado que não houve efeito de supressão de sinal para os REE devido à presença de K e Na pela técnica de ICP-MS (Figura 49). Estes resultados foram esperados, visto que efeitos de supressão de sinal dos REE (exceto La e Y) ocorrem, a partir de 250 mg L<sup>-1</sup> de K ou Na. Dessa forma, como nenhuma solução utilizada no estudo do efeito do C a partir de digeridos de fígado continha concentrações total de Na e K superior a 180 mg L<sup>-1</sup>, o efeito de supressão não foi observado.

De maneira geral, pode-se observar ao decorrer dos estudos de interferências que os REE são susceptíveis a interferências devido à presença de metais e, dependendo da fonte, de C. No entanto, é importante destacar que a faixa de concentração dos interferentes na determinação dos REE (por USN-ICP-MS ou ICP-MS) e a magnitude destas, irá depender do equipamento utilizado e das suas respectivas condições instrumentais (tipo de nebulizador e câmara de nebulização, design do injetor e ajuste, potência do plasma e vazões dos gases principal e de nebulização)<sup>108</sup>. Além disso, o nebulizador ultrassônico mostrou-se ser mais susceptível a interferências quanto comparado ao nebulizador concêntrico, provavelmente, devido ao aumento de sensibilidade que esse confere a técnica de ICP-MS. Entretanto, é bem conhecido as interferências poliatômicas (devido a formação de óxidos) durante a determinação dos REE utilizando o sistema de nebulização concêntrico. Por esse motivo, o uso de nebulizadores com sistemas de dessolvatação (como o nebulizador ultrassônico) é indispensável para a determinação desses elementos.

#### **4.5 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DESENVOLVIDOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM SANGUE**

Para o desenvolvimento dos métodos de preparo de amostras propostos no presente trabalho (MAWD-SRC, CWD-OS, CWD-CS e MIC), a amostra "A" foi arbitrariamente selecionada.

Durante o desenvolvimento dos métodos de preparo de amostras propostos, buscou-se condições que apresentassem baixa concentração de ácido residual e menores concentrações de C. Ainda, quando possível buscou-se utilizar soluções diluídas e menores tempos de execução dos procedimentos, bem como métodos que apresentassem menor possibilidade de interferências na determinação dos REE por USN-ICP-MS.

Uma das informações mais relevantes, previamente ao desenvolvimento dos métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS, são as informações das concentrações de K e Na nas amostras. Geralmente esses dois elementos de fácil ionização estão presentes em elevadas concentrações em amostras biológicas. De acordo com os estudos de interferências investigados no presente trabalho, K e Na podem causar interferências durante a etapa de medida dos REE pela técnica de USN-ICP-MS.

Além disso, de acordo com os estudos de interferências desenvolvidos no presente trabalho, convencionou-se que o somatório máximo permitido das concentrações de K e Na em solução, previamente a determinação dos REE por USN-ICP-MS, não poderia ultrapassar  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (sem a etapa de diluição). Dessa forma, na Tabela 14 estão mostradas as massas máxima de sangue a serem digeridas para cada amostra utilizada no presente trabalho para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS.

Tabela 14 - Massa máxima de sangue (g) que poderia ser utilizada pelos métodos de preparo de amostras para que não fossem observadas interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS.

Sangue	Concentração de K ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentração de Na ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Somatório da concentração de K e Na ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Massa máxima a ser digerida (g)*
A	1575	1450	3025	0,40
B	2330	1870	4200	0,29
C	1770	1330	3100	0,40
D	860	1880	2740	0,45
E	1050	1980	3030	0,40

\* Baseada no somatório das concentrações de K e Na de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (em 25 mL).

É importante mencionar que a massa de sangue máxima a ser utilizada pelos métodos de preparo de amostras pode variar de acordo com a concentração de K e Na. Assim, torna-se necessária e importante a determinação destes elementos concomitantes previamente a determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS. Para o desenvolvimento dos métodos de preparo de amostra desenvolvidos no presente estudo, a eficiência de digestão foi avaliada através da determinação do teor de carbono em solução e da concentração de  $\text{HNO}_3$  nos digeridos.

#### 4.5.1 Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto

Dentre as características desejáveis de um método de preparo de amostra, podem-se destacar a simplicidade, rapidez e custos relativamente baixos. Considerando esses aspectos, o método da CWD-OS atende a estes requisitos e pode ser aplicado pela maioria dos laboratórios analíticos. Por outro lado, embora simples e de baixo custo, a CWD-OS possui algumas limitações e, dentre elas, pode-se mencionar a baixa massa de amostra possível de ser digerida e a máxima temperatura alcançada durante a digestão, geralmente limitada pela temperatura de ebulição do ácido utilizado.

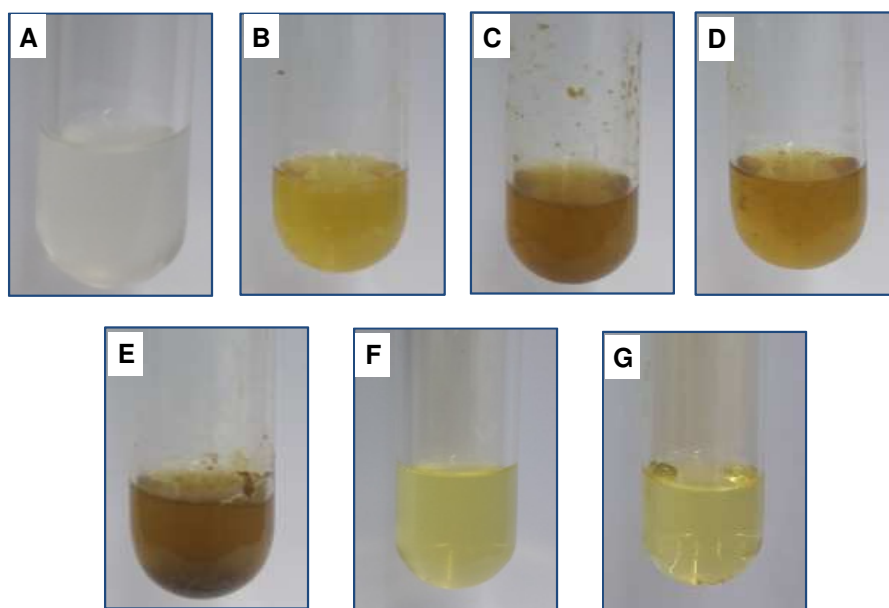
Dessa forma, considerando todos os aspectos mencionados anteriormente, o método da CWD-OS foi avaliado. Neste método, devido as suas limitações, foi feita

apenas a avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$  e a avaliação do uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em conjunto com  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . É importante enfatizar que a massa de amostra (A) foi fixada em 0,4 g devido a concentração máxima de K e Na que poderiam estar presentes nas soluções finais com o objetivo foi evitar/minimizar possíveis interferências (baseada nos estudos de interferências) na determinação dos REE por USN-ICP-MS. O procedimento do método da CWD-OS está descrito no item 3.7.1 (*Materiais e Métodos*).

#### 4.5.1.1 Avaliação da concentração de $\text{HNO}_3$ para a digestão de sangue por CWD-OS

No método da CWD-OS foi feita a avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$  (e a avaliação do uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% em conjunto com  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) para a digestão de 0,4 g de sangue. Na Figura 50 é possível observar o aspecto dos digeridos após a CWD-OS.

Figura 50 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-OS usando A) 5 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, B) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , C) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$ , D) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $5 \text{ mol L}^{-1}$ , E) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $7 \text{ mol L}^{-1}$ , F) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $10 \text{ mol L}^{-1}$  e G) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $14 \text{ mol L}^{-1}$ .

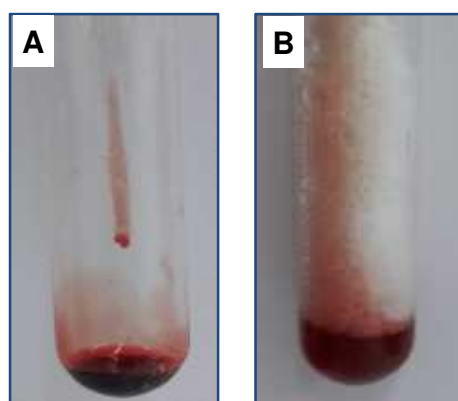


De acordo com a Figura 50, é possível observar que os digeridos de sangue utilizando  $\text{HNO}_3$  10 e  $14 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 50 F e G) apresentaram aspecto amarelado

e com uma camada de gordura sobrenadante, indicando que uma parte da matriz não foi eficientemente digerida. Quando foi utilizado  $\text{HNO}_3$  nas concentrações de 1 a  $7 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 50 B, C, D e E) os digeridos apresentaram aspecto escuro com resíduos sólidos provenientes da matriz não digerida. Ainda, foi observado que quando foi feita a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  juntamente com  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi obtido um digerido esbranquiçado com gordura não digerida em suspensão (Figura 50 A).

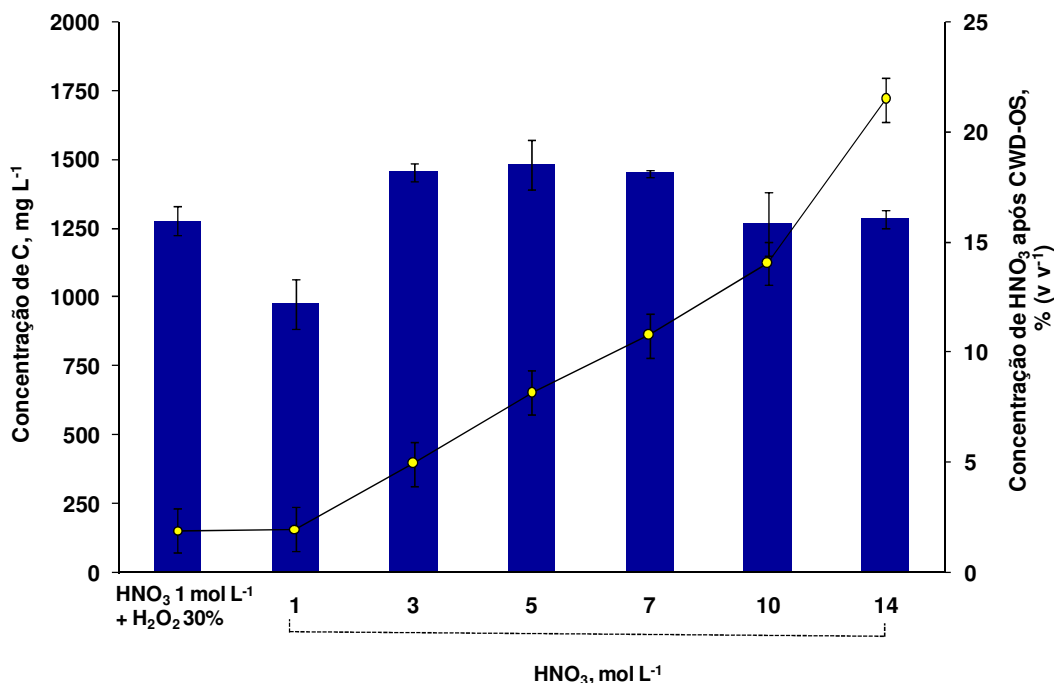
É importante enfatizar os cuidados que devem ser tomados ao digerir sangue com o auxílio do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A presença de catalase no sangue pode acelerar a deteriorização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  levando a projeção da amostra<sup>147</sup>. Na Figura 51 é possível observar a reação do sangue na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Figura 51 - Digestão de sangue na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A) 0,4 g de sangue e B) 0,4 g de sangue e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.



Como mostrado na Figura 51 B, a digestão de sangue na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultou na formação de espuma (proveniente da liberação de  $\text{CO}_2$  misturado à amostra ainda não digerida) levando à projeção da amostra. Essa reação ocorreu de maneira rápida nos instantes iniciais do programa de aquecimento. Dessa maneira, cuidados devem ser tomados quando se utiliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a digestão de sangue utilizando sistemas abertos. Na Figura 52 é possível observar os resultados para o teor de C e acidez residual nos digeridos.

Figura 52 - Concentração de C (barras) e concentração de HNO<sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-OS. Condições: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO<sub>3</sub> e 40 min a 120 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).



De acordo com os resultados mostrados na Figura 52, pode ser observado que utilizando HNO<sub>3</sub> 10 e 14 mol L<sup>-1</sup> as concentrações de C foram similares (aproximadamente 1250 mg L<sup>-1</sup>). No entanto, foi observado que utilizando HNO<sub>3</sub> 10 mol L<sup>-1</sup> foi obtido um RSD de aproximadamente 10%, enquanto que utilizando HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>, o RSD foi de, aproximadamente 3%. Ainda, quando concentrações de HNO<sub>3</sub> de 3 a 7 mol L<sup>-1</sup> foram utilizadas para a digestão de 0,4 g de sangue, foi observado que, conforme o esperado, houve um aumento na concentração de C. No entanto, quando foi avaliada a concentração de HNO<sub>3</sub> de 1 mol L<sup>-1</sup> houve uma diminuição da concentração de C (aproximadamente 1000 mg L<sup>-1</sup>). Isso, provavelmente ocorreu, devido a digestão incompleta do sangue (Figura 50 B), visto que há material particulado em suspensão.

A concentração de HNO<sub>3</sub> também foi avaliada, e de acordo com os resultados (Figura 52), usando HNO<sub>3</sub> 10 e 14 mol L<sup>-1</sup>, as soluções resultantes apresentaram concentração de HNO<sub>3</sub> de 15 e 20%, respectivamente. Adicionalmente, conforme o esperado, a concentração de HNO<sub>3</sub> residual foi diminuindo, chegando a concentração de 2% (v v<sup>-1</sup>) quando a digestão foi feita com HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. Estes resultados foram semelhantes àqueles obtidos utilizando 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e 5 mL



de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em ambos os casos observou-se que a amostra não foi completamente digerida, visto que foram observados resíduos sólidos na solução final e gordura como sobrenadante. Embora o sangue contenha uma elevada quantidade de água, a sua digestão não é uma tarefa fácil devido à presença de gordura.

Considerando todos aspectos mencionados, pode-se perceber que, apesar de simples, barato e disponível na maioria dos laboratórios, o método da CWD-OS não é o mais adequado para a digestão de sangue. É importante enfatizar que o método poderia ser otimizado utilizando menor massa de amostra, no entanto, considerando que os REE estão em concentrações extremamente baixas nesse tipo de amostra (na faixa de  $\text{ng g}^{-1}$ ), esta possibilidade não é a mais adequada.

#### **4.5.2 Digestão por via úmida com aquecimento convencional em sistema fechado**

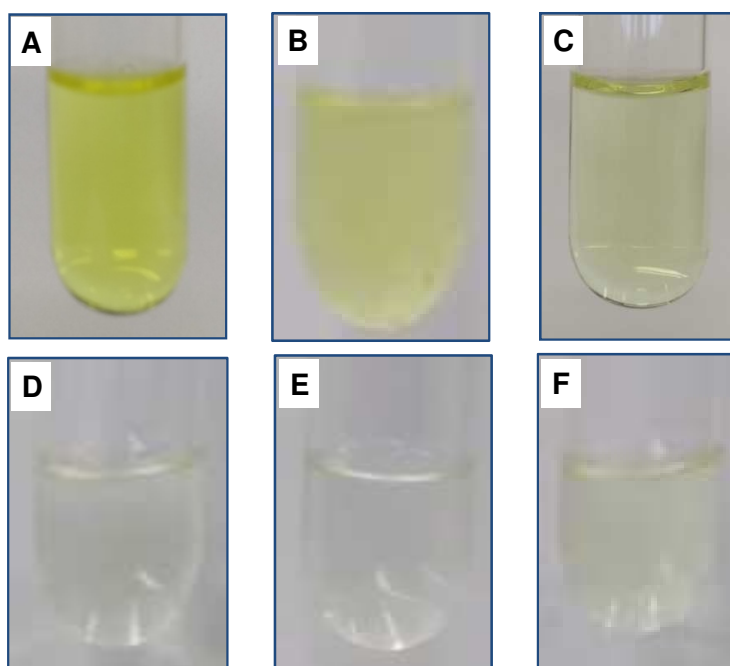
Assim como o método da CWD-OS, o método da CWD-CS é simples, barato, e pode ser feito pela maioria dos laboratórios. Ainda, o método da CWD-CS permite o uso de temperaturas de até  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , a qual é muito superior às temperaturas comumente usadas nos sistemas abertos (a qual é limitada pela temperatura de ebulição do ácido utilizado). No entanto, o método da CWD-CS apresenta algumas limitações, principalmente, no que se refere ao aquecimento de modo convencional (por condução). Este tipo de aquecimento pode ser desvantajoso, visto que não é feito de maneira uniforme para todos os frascos. Além disso, não há um controle da pressão durante a etapa de aquecimento, aumentando o cuidado referente a máxima massa de amostra possível de ser digerida<sup>15,55,70</sup>.

Dessa forma, considerando os aspectos mencionados, o método da CWD-CS foi avaliado no presente estudo. É importante enfatizar que a massa de amostra na CWD-CS também foi fixada em  $0,4 \text{ g}$ , devido a concentração máxima de K e Na permitida nas soluções finais para a determinação de REE por USN-ICP-MS (de acordo com os resultados obtidos nos estudos de interferências). O procedimento feito no método da CWD-CS está descrito no item 3.7.2 (Materiais e Métodos). No método da CWD-OS foi feita a avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$  e a avaliação do uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% nas diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3$ .

#### 4.5.2.1 Avaliação da concentração de $\text{HNO}_3$ para a digestão de sangue por CWD-CS

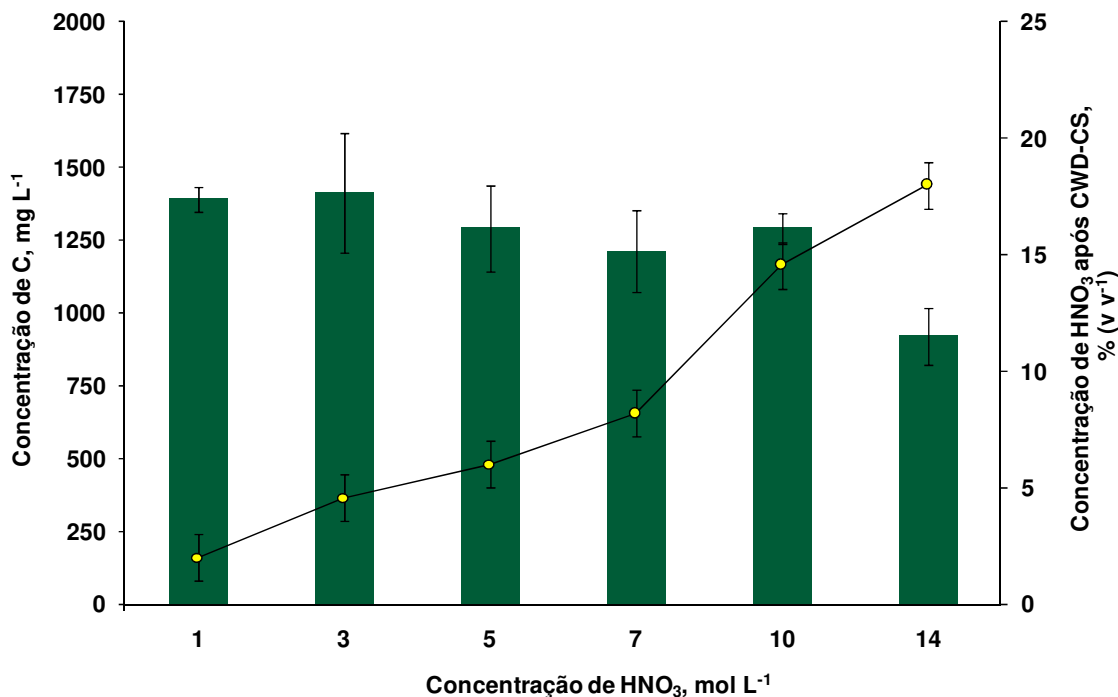
A concentração de  $\text{HNO}_3$  é um parâmetro importante que deve ser avaliado nos métodos de digestão, principalmente no que se refere as interferências causadas na determinação de REE por USN-ICP-MS. Por isso, a concentração de  $\text{HNO}_3$  foi avaliada no método da CWD-CS. Na Figura 53 é possível observar o aspecto dos digeridos obtidos por CWD-CS após a avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$ .

Figura 53 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-CS usando A) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , B) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$ , C) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  5 mol  $\text{L}^{-1}$ , D) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ , E) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  10 mol  $\text{L}^{-1}$  e F) 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$ .



Como pode ser observado, embora não se tenha à presença de material particulado, os digeridos apresentaram coloração bastante amarelada quando a digestão do sangue foi feita com  $\text{HNO}_3$  nas concentrações de 1 a 5 mol  $\text{L}^{-1}$  (Figura 53 A, B e C). Por outro lado, quando o sangue foi digerido com  $\text{HNO}_3$  7 a 14 mol  $\text{L}^{-1}$  (Figura 53 D, E e F), os digeridos apresentaram aspecto límpido. Na Figura 54 é possível observar os resultados para o teor de C e acidez residual nos digeridos.

Figura 54 - Concentração de C (barras) e concentração de HNO<sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-CS. Condições: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO<sub>3</sub> e 40 min a 200 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).



De acordo com os resultados observados na Figura 54, observa-se que, de maneira geral, os RSDs para C, em todas as condições, variaram na faixa de 5 a 14%. Possivelmente, o aquecimento não ocorreu de maneira homogênea em todos os frascos. Conforme o esperado, o teor de C foi diminuindo com o aumento da concentração de HNO<sub>3</sub>. Quando foi utilizado HNO<sub>3</sub> 1 e 3 mol L<sup>-1</sup>, foram obtidos digeridos com concentrações de C de 1391 e 1414 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, a concentração de C de, aproximadamente, 920 mg L<sup>-1</sup> foi obtida usando HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>. Isso representa uma diminuição de 30% em relação aos valores de C obtidos quando a digestão foi feita com HNO<sub>3</sub> 10 mol L<sup>-1</sup>.

Em relação a concentração de HNO<sub>3</sub>, conforme o esperado, a concentração de HNO<sub>3</sub> remanescente nos digeridos após o método da CWD-CS diminuiu com a diminuição da concentração de HNO<sub>3</sub>. Dessa forma, quando 0,4 g de sangue foram digeridos com 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 a 5 mol L<sup>-1</sup> foram obtidas soluções com concentração de HNO<sub>3</sub> residual inferiores a 5% (v v<sup>-1</sup>). No entanto, à medida que foram utilizadas soluções de HNO<sub>3</sub> mais concentradas para a digestão das amostras, a concentração de HNO<sub>3</sub> remanescente nas soluções digeridas também aumentou. Dessa forma,

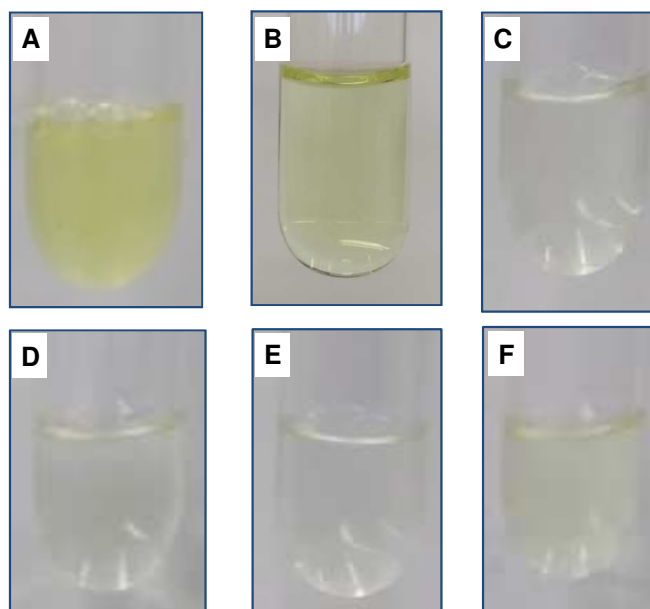
quando 0,4 g de sangue foram digeridos com  $\text{HNO}_3$  10 e 14 mol  $\text{L}^{-1}$ , foram obtidas soluções com concentração de  $\text{HNO}_3$  residual de, aproximadamente, 15 e 18% ( $\text{v v}^{-1}$ ), respectivamente.

Conforme mencionado, o uso de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  para a digestão das amostras, acarretou na obtenção de digeridos com elevada concentração residual de  $\text{HNO}_3$  (aproximadamente 18%). Particularmente, para a determinação de REE por USN-ICP-MS, esta concentração de  $\text{HNO}_3$  nos digeridos, faria com que uma etapa de diluição (de pelo menos 2 vezes), previamente a determinação, fosse necessária. Consequentemente, os LOQs seriam afetados, o que não é vantajoso quando o objetivo é a determinação de REE em sangue. Assim, soluções digeridas com menores concentrações de  $\text{HNO}_3$  residual e com concentrações de C relativamente baixas (como as obtidas com  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ ) seria a melhor escolha, até o momento.

#### 4.5.2.2 Avaliação do $\text{H}_2\text{O}_2$ para a digestão de sangue por CWD-CS

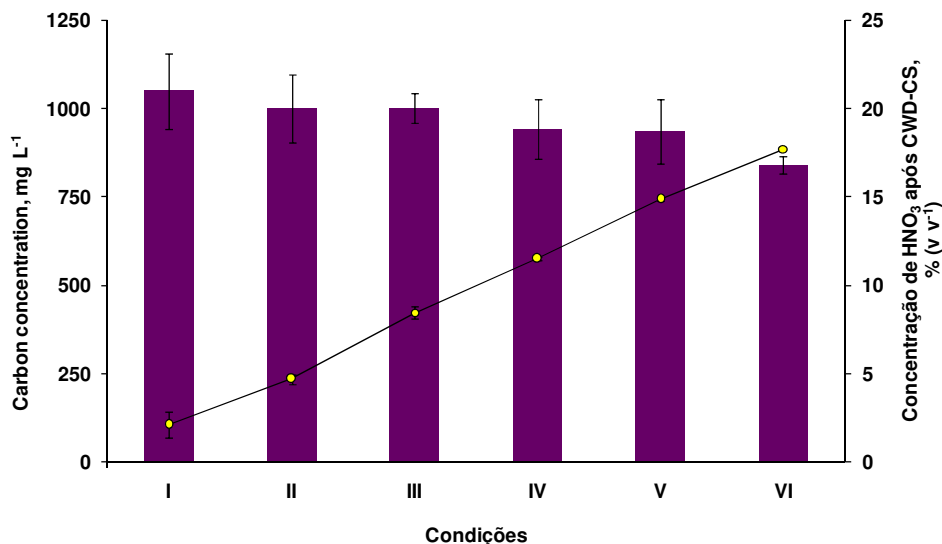
Conforme discutido anteriormente, foi possível digerir 0,4 de sangue com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ . No entanto, considerando as potencialidades do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como um reagente auxiliar na oxidação da matriz orgânica, bem como no potencial para a regeneração do  $\text{HNO}_3$  durante o processo de digestão<sup>70,74</sup>, foi feita uma avaliação do uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o objetivo de reduzir a concentração de  $\text{HNO}_3$  para a digestão de sangue. Para isso, foram avaliadas 6 condições experimentais: *i*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, *ii*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, *iii*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  5 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, *iv*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, *v*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  10 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e *vi*) 5 mL  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Na Figura 55 é possível observar o aspecto dos digeridos obtidos após a avaliação da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no método da CWD CS.

Figura 55 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após CWD-CS usando: A) 5 mL  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, B) 5 mL  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, C) 5 mL  $\text{HNO}_3$  5 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, D) 5 mL  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, E) 5 mL  $\text{HNO}_3$  10 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e F) 5 mL  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.



É possível observar que utilizando 5 mL  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  Figura 55 A) foram obtidos digeridos com aspecto amarelado e com gordura em suspensão, assim como aqueles obtidos sem o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 53 A). Esse resultado é um indicativo que o uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  não auxiliou de maneira efetiva a digestão de sangue usando  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Por outro lado, usando 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em conjunto com  $\text{HNO}_3$  3 a 14 mol  $\text{L}^{-1}$ , foram obtidas soluções límpidas sem à presença de gordura ou outro material particulado em suspensão. Na Figura 56 é possível observar os resultados para o teor de C e acidez residual nos digeridos.

Figura 56 - Concentração de C (barras) e concentração de  $\text{HNO}_3$  (linha) presente nos digeridos obtidos após CWD-CS. Condições: 0,4 g de sangue, 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 a 14 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 40 min a 200 °C. As barras representam o desvio padrão (n=3).



De acordo com os resultados obtidos, os RSDs para C para todas as condições investigadas foram na faixa de 4 a 10%. Conforme o esperado, o teor de C nos digeridos foi diminuindo com o aumento da concentração de  $\text{HNO}_3$ . Usando, por exemplo, 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  as concentrações de C variaram de 1050 a 840 mg  $\text{L}^{-1}$ .

De maneira geral, o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  proporcionou a obtenção de digeridos com menores teores de C quando comparado àqueles em que não foi feito o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 54). Possivelmente, esses resultados podem ser explicados pelo efeito de regeneração do  $\text{HNO}_3$ , uma vez que este efeito com o auxílio de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é amplamente discutido em na literatura<sup>15,74</sup>.

Por outro lado, a concentração de  $\text{HNO}_3$  remanescente nos digeridos, assim como esperado, diminuiu utilizando menores concentrações de  $\text{HNO}_3$  para a digestão de sangue (aproximadamente 5% utilizando 5 mL  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e 5 mL  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%). Dessa forma, essa condição mostrou-se adequada para a digestão de sangue por CWD-CS, visto que não foi necessário efetuar etapas de diluições antes da terminação dos REE por USN-ICP-MS. Adicionalmente, os digeridos apresentaram aspecto límpido sem à presença de material particulado em suspensão.

De maneira geral, foi possível verificar que o método da CWD-CS apresentou digeridos com menor teor de C quando comparado ao método da CWD-OS. Esses resultados são concordantes entre si, visto que o uso de sistema fechado possibilita utilizar temperaturas superiores ao ponto de ebulição do  $\text{HNO}_3$ , o que acarreta no aumento da eficiência de digestão da amostra<sup>55</sup>.

#### 4.5.2.3 Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS usando digeridos de sangue após CWD-CS ao longo do tempo

Conforme sabido, um método de preparo de amostra ideal é aquele que fornece digeridos compatíveis à técnica de determinação a ser utilizada. Ainda, o ideal é que esses digeridos possam ser introduzidos nos equipamentos sem etapas de diluições, as quais algumas vezes são necessárias para evitar interferências.

No entanto, muitas vezes, nenhum estudo é feito acerca da adequabilidade dos digeridos frente às técnicas analíticas. Em análises de rotina, essas informações são importantes, visto que, resultados incorretos podem ser obtidos. Adicionalmente, é importante mencionar que, durante a análise de rotina, se o digerido não for adequado às técnicas analíticas, a longo prazo, pode ocorrer a diminuição da sensibilidade do equipamento, bem como depósitos de material particulado e obstrução de capilares, por exemplo. O tempo dispendioso para a manutenção e/ou a limpeza dos equipamentos gera custos e atrasos na entrega de resultados para as indústrias ou laboratórios.

Considerando todos os aspectos mencionados, experimentos adicionais utilizando os digeridos de sangue obtidos na CWD-CS foram feitos de modo a verificar se eles causariam mudanças na sensibilidade da técnica de USN-ICP-MS quando injetados de maneira contínua no equipamento. É importante mencionar que os experimentos foram feitos utilizando os digeridos obtidos por duas condições (5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e por 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%). Os experimentos em cada condição foram feitos de maneira independente.

Dessa forma, primeiramente, foram obtidos digeridos (quintuplicata) de sangue pelo método da CWD-CS, conforme o procedimento descrito no item 3.7.2 (*Materiais e Métodos*). Cabe salientar que, a amostra A foi escolhida, visto que todos

os analitos estavam abaixo do LOQ. Após a obtenção dos digeridos, estes foram misturados de modo a obter uma solução única (de todos os digeridos) com volume total de, aproximadamente, 125 mL. Posteriormente, foi feita a adição de todos os REE de modo que, no volume final (125 mL), a concentração dos analitos fosse de  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A solução foi introduzida no equipamento de USN-ICP-MS de maneira contínua por 45 min e a determinação da concentração dos REE foi feita de 5 em 5 min. Todas as concentrações obtidas em cada tempo foram comparadas (percentualmente) com aquelas obtidas na medida 1 (correspondente a determinação dos REE no tempo de 1 min). Os resultados obtidos para a condição utilizando 5 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% podem ser observados na Figura 57.

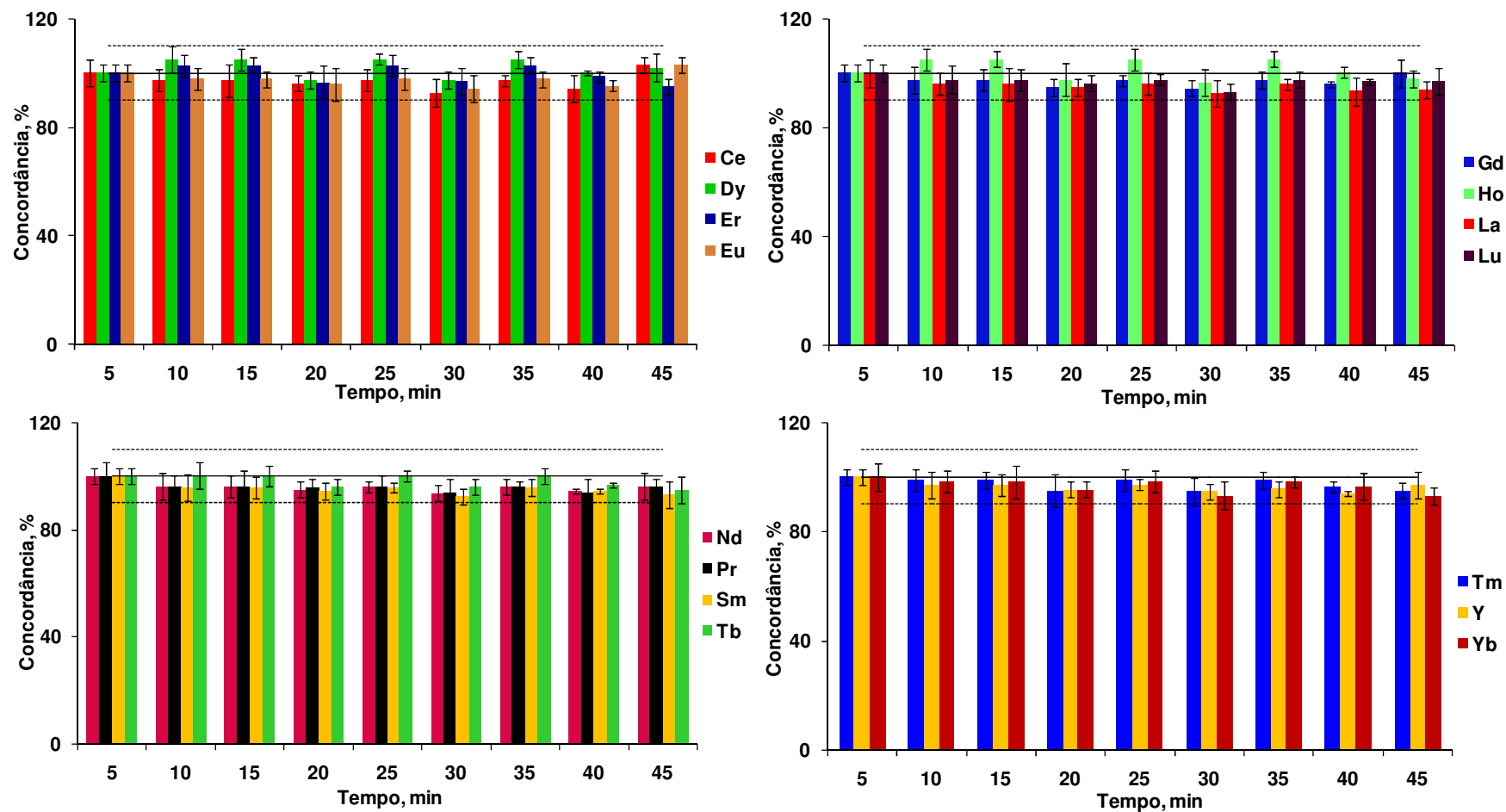




Como pode ser observado na Figura 57, apesar dos digeridos apresentarem aspecto amarelado (Figura 55 A), na prática, a sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS não foi alterada de maneira significativa para tempos de até 40 min (tempo correspondente a introdução dos digeridos de maneira contínua). De maneira geral, todos os analitos apresentaram concordâncias na faixa de 90 a 100% para os tempos de 5 a 40 min. No entanto, após 45 min de introdução dos digeridos de maneira contínua no equipamento de USN-ICP-MS, pode-se perceber uma diminuição nas concordâncias para todos os REE de aproximadamente 85 (Er) a 89% (Y), em comparação com os resultados obtidos na medida 1 (tempo de 1 min). Adicionalmente, nesta mesma condição, RSDs de, aproximadamente, 7% foram obtidos para todos os REE.

De forma geral e de acordo com os resultados obtidos até então, os digeridos obtidos pelo método da CWD-CS usando 0,4 g de sangue e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% poderiam ser soluções compatíveis à técnica de USN-ICP-MS. O mesmo experimento descrito acima foi feito para os digeridos de sangue obtidos por CWD-CS usando 0,4 g de sangue e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 58.

Figura 58 - Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS na determinação de REE ( $250 \text{ ng L}^{-1}$ ) ao longo do tempo a partir de digeridos de sangue obtidos por CWD-CS ( $n=5$ ). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condições: 0,4 g de sangue e 5 mL de  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.

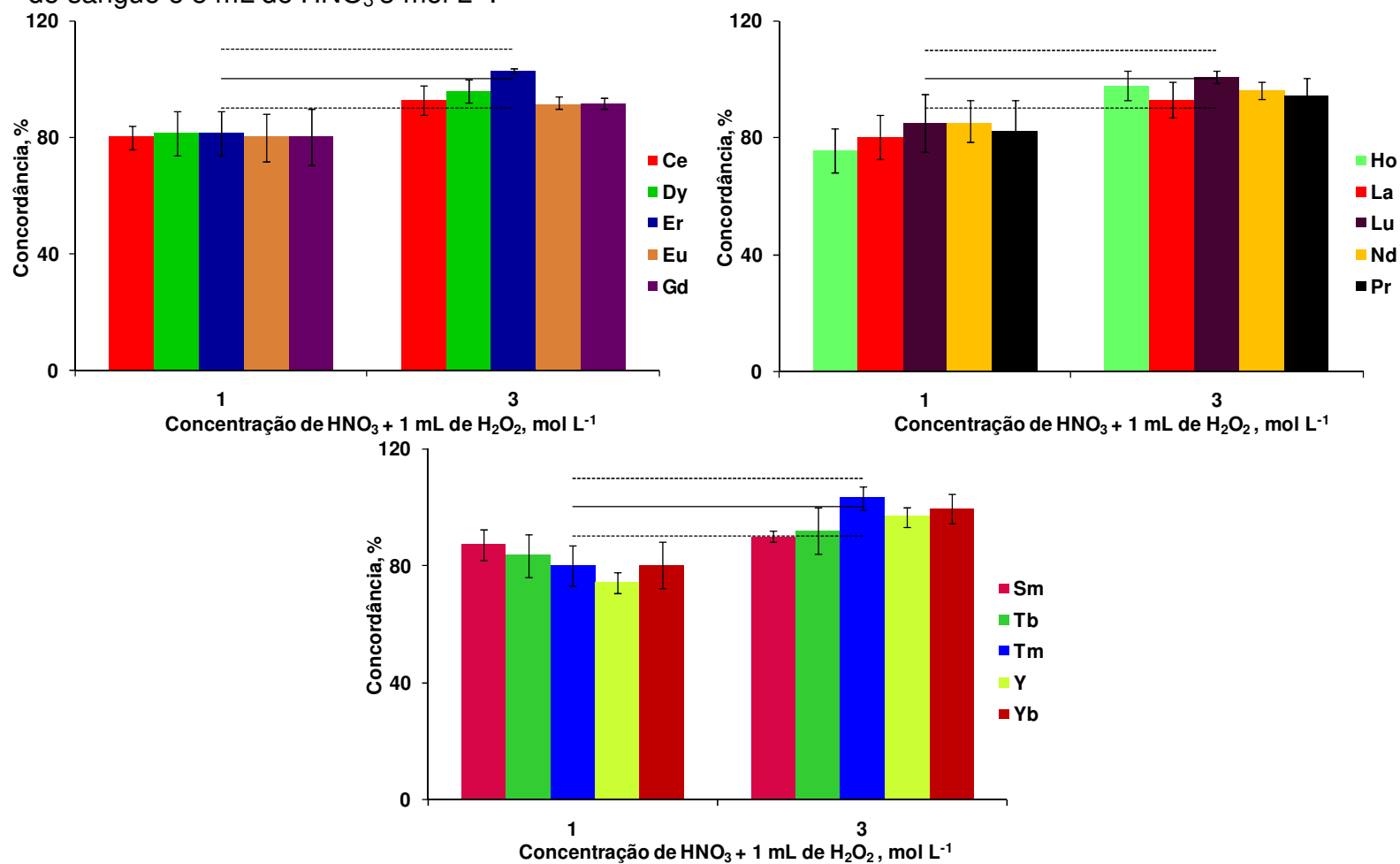


Após a avaliação da sensibilidade da técnica de USN-ICP-MS frente aos digeridos de sangue obtidos pelo método da CWD-CS usando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, pode-se observar que não foram observadas mudanças nas concordâncias para os REE nos tempos avaliados (5 a 45 min). Nesse sentido, os resultados mostraram que, os digeridos de sangue obtidos por CWD-CS (usando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%) apresentaram soluções compatíveis à técnica de USN-ICP-MS, visto que não foram observadas mudanças na sensibilidade desta técnica ao longo do tempo. Ainda, é importante mencionar que não foram observados depósitos de C nos cones de amostragem e *Skimmer* após estes experimentos.

#### 4.5.2.4 Avaliação da exatidão do método da CWD-CS

Para a avaliação da exatidão do método da CWD-CS foram feitos experimentos de recuperação dos analitos. Os experimentos foram feitos usando 0,4 g da amostra A em duas condições distintas (as quais apresentaram digeridos compatíveis à técnica de USN-ICP-MS): 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Previamente a digestão da amostra, foi feita a adição de todos os REE de modo que a concentração final foi de 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Posteriormente, foi feita a determinação dos REE por USN-ICP-MS e os resultados podem ser observados na Figura 59.

Figura 59 - Avaliação da exatidão do método da CWD-CS na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condições: 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e 0,4 g de sangue e 5 mL de HNO<sub>3</sub> 3 mol L<sup>-1</sup>.



De acordo com os resultados obtidos na Figura 59, foi possível verificar que, embora os digeridos obtidos usando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não causou mudança na sensibilidade da técnica de USN-ICP-MS (introdução do digerido de maneira contínua durante 40 min - Figura 58), os resultados obtidos na presente avaliação não apresentaram exatidão adequada. Neste caso, as concordâncias entre as recuperações dos analitos em comparação com a solução de referência variaram de 74% (Y) a 87% (Sm).

Cabe salientar que nesta condição, o digerido obtido apresentou resíduo de matriz. Dessa forma, possivelmente, as propriedades físico-químicas dos digeridos (viscosidade, densidade e tensão superficial) foram diferentes das soluções de referência utilizadas para a calibração do equipamento de ICP-MS. Durante esta avaliação, foi observado que durante a nebulização destes digeridos pelo USN a formação da névoa diminuiu de maneira significativa. Com isso, menor quantidade de amostra chegou até o plasma, alterando a exatidão dos resultados.

Por outro lado, quando a exatidão foi avaliada usando os digeridos de sangue obtidos com 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, concordâncias de 91% (Eu e Tb) a 103% (Tm) foram obtidas. Nesse sentido, esta condição foi escolhida para a digestão de sangue e posterior determinação dos REE.

#### 4.5.2.5 Determinação de REE em sangue após CWD-CS

Após a otimização dos parâmetros experimentais do método da CWD-CS, foi feita a determinação dos REE no sangue. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 - Determinação de REE em sangue após CWD-CS. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ),  $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condições: 0,4 de sangue e 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3  $\text{mol L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%.

Elemento	Concentração, $\text{ng g}^{-1}$					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	< 12,5	< 9,0	< 10,3	< 9,0	< 6,3	< 9,0
Dy	< 7,5	< 5,0	< 6,4	< 5,0	< 3,7	< 5,0
Er	< 6,3	< 4,2	< 5,2	< 4,2	< 3,2	< 4,2
Eu	< 6,9	< 4,5	< 5,5	< 4,5	< 3,4	< 4,5
Gd	< 12,5	< 8,3	< 10,1	< 8,3	< 6,3	< 8,3
Ho	< 3,3	< 2,1	< 2,8	< 2,1	< 1,6	< 2,1
La	< 25,2	< 16,6	< 10,4	< 16,6	< 6,3	< 16,6
Lu	< 6,5	< 4,3	< 5,2	< 4,3	< 3,3	< 4,3
Nd	< 18,8	< 12,5	< 8,6	< 12,5	< 5,0	< 12,5
Pr	< 16,3	< 10,8	< 7,6	< 10,8	< 4,8	< 10,8
Sm	< 17,4	< 12,5	< 8,3	< 12,5	< 5,2	< 12,5
Tb	< 6,3	< 4,3	< 5,0	< 4,3	< 3,2	< 4,3
Tm	< 7,0	< 2,0	< 2,4	< 2,0	< 1,6	< 2,0
Y	< 25	< 16,6	< 10,3	< 16,6	< 6,3	< 16,6
Yb	< 7,5	< 5,0	< 6,8	< 5,0	< 3,8	< 5,0

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que todos os REE em todas as amostras ficaram abaixo dos LOQs. Assim, como o esperado, a concentração de REE no sangue é baixa. É importante mencionar que as digestões foram feitas usando 0,4 g das amostras A, C e E, 0,29 g da amostra B e 0,45 g da amostra E. Não foi avaliado o uso de massas mais elevadas, uma vez que a concentração de Na, K e Fe nos digeridos também aumentaria, causando interferências na determinação dos REE por USN-ICP-MS.

#### 4.5.3 Digestão por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação

Como sabido, o uso de sistemas fechados e com aquecimento por micro-ondas favorecem a digestão de amostras com elevado teor de gordura (como o sangue), proporcionando o uso de temperaturas mais elevadas e controle de pressão do sistema<sup>15,55</sup>. No que se refere a sistemas fechados para a digestão de amostras, o UltraWave<sup>®</sup> pode ser considerado como uma das melhores alternativas para essa finalidade, visto que permite o uso de temperatura e pressão operacionais de 270 °C e 160 bar, respectivamente. Consequentemente, o uso dessas condições experimentais, permite a digestão de elevadas massas de amostra usando, muitas vezes, soluções diluídas<sup>13,71,130</sup>.

No presente trabalho, o método da MAWD-SRC foi investigado para a digestão de sangue e posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um método de digestão de sangue que fornecesse digeridos com mínimos teores de carbono e de HNO<sub>3</sub>. Ainda, esses digeridos deveriam ser compatíveis com a técnica de USN-ICP-MS, de modo que possíveis interferências pudessem ser minimizadas e/ou evitadas durante a etapa de determinação dos REE. Além disso, objetivou-se também o uso de soluções diluídas para a digestão e, consequentemente a redução de resíduos no laboratório. É importante mencionar que, até então, não foram encontrados trabalhos na literatura usando o método da MAWD-SRC para a digestão de sangue.

Inicialmente, foi escolhido um programa de radiação relativamente longo<sup>148</sup>, com o objetivo de propiciar um maior tempo para a digestão das amostras quando soluções diluídas fossem avaliadas e evitar possíveis projeções da amostra. O programa de radiação utilizado foi descrito na Tabela 10 (*Materiais e Métodos*).

No método da MAWD-SRC, os seguintes parâmetros experimentais foram avaliados: *i*) massa de sangue (0,4 a 2 g), *ii*) concentração de HNO<sub>3</sub> (1 a 14 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>), *iii*) temperatura máxima (200 a 270 °C) e *iv*) tempo de irradiação micro-ondas (5 a 20 min) na temperatura otimizada. O procedimento experimental utilizado no método da MAWD-SRC está descrito no item 3.7.3 (*Materiais e Métodos*).



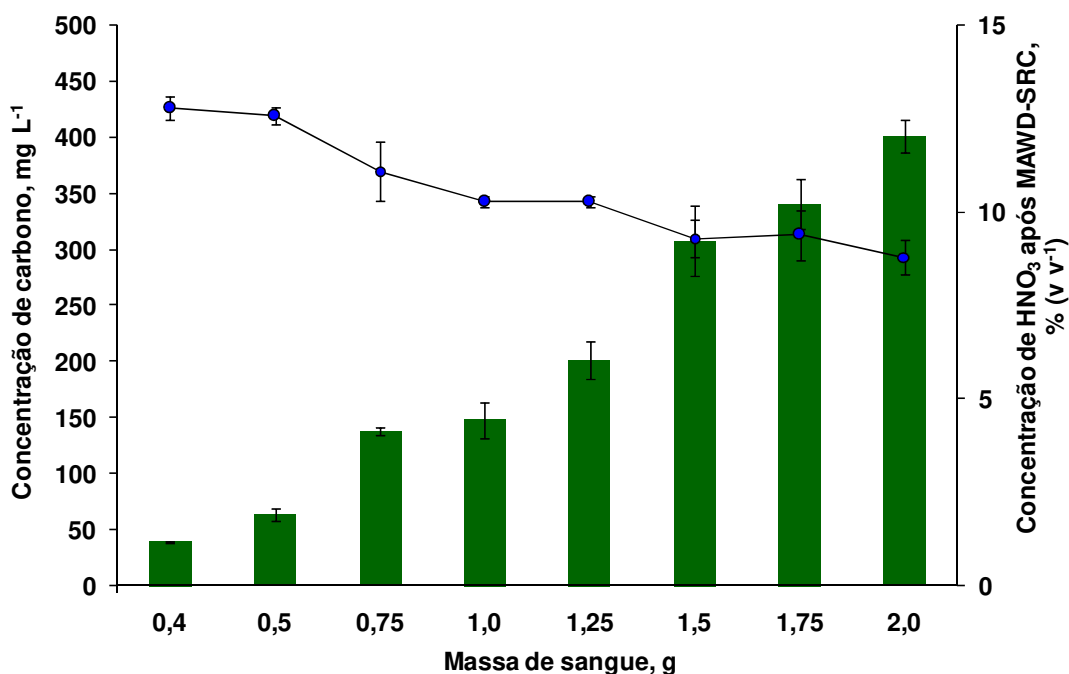
#### 4.5.3.1 Avaliação da massa de sangue

Conforme mencionado no decorrer do presente trabalho, a massa de sangue a ser digerida nos métodos de preparo de amostras é um importante parâmetro que deve ser avaliado, visto a necessidade da obtenção de LOQs mais baixos possíveis. No caso da determinação de REE em sangue, esse parâmetro é de fundamental importância considerando que esses elementos, geralmente, estão presentes em baixas concentrações<sup>11,18,46,70</sup>.

Embora demonstrado nos estudos de interferências, a massa máxima de sangue possível de ser digerida nos métodos de preparo de amostras está diretamente relacionada às elevadas concentrações de K e Na presentes em cada amostra. Conforme já descrito, a massa de sangue deveria ser limitada à, aproximadamente 0,4 g, a fim de evitar interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS. Entretanto, considerando as potencialidades do método da MAWD-SRC para a digestão de uma variedade de amostras, buscou-se avaliar a massa máxima de sangue a ser digerida por este método, para explorar a capacidade do sistema.

Neste contexto, foi avaliado o uso de massas de sangue de 0,4 a 2,0 g usando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>. Para a avaliação da massa de sangue, bem como para os demais parâmetros, foi utilizado o programa de irradiação mencionado na Tabela 10. A eficiência de digestão do sangue foi avaliada com base nos teores de carbono em solução e da concentração de HNO<sub>3</sub>. Os resultados obtidos para cada massa de sangue estão mostrados na Figura 60.

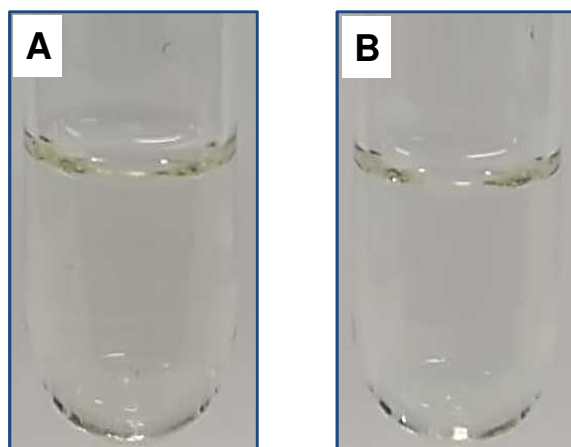
Figura 60 - Concentração de carbono (barras) e concentração de  $\text{HNO}_3$  (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando massas de sangue na faixa de 0,4 a 2,0 g. Condições: 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $14 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $270 \text{ }^\circ\text{C}$  e 20 min na temperatura máxima. As barras de erros representam o desvio padrão,  $n=3$ .



De acordo com os resultados mostrados na Figura 60, é possível observar que, conforme o esperado, o teor de carbono em solução aumentou com o aumento da massa de sangue utilizada ( $40 \pm 0,2$  a  $401 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$  usando 0,4 a 2,0 g de sangue, respectivamente). Pode-se observar que, mesmo usando massa de sangue de 2 g os teores de C obtidos são, relativamente, baixos.

Por outro lado, a concentração de  $\text{HNO}_3$  diminuiu com o aumento da massa de sangue (de 12,7 a 8,8%, usando de 0,4 a 2,0 g, respectivamente). Os resultados obtidos estão concordantes com o esperado, visto que, ao aumentar a massa de sangue a ser digerida, mais ácido será necessário para sua oxidação o que, conseqüentemente, acarreta no maior consumo deste. Na figura 61 é possível observar os aspectos dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC.

Figura 61 - A) Aspecto dos digeridos de sangue após MAWD-SRC usando 0,4 g de sangue e B) 2,0 g de sangue. Condição: 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$ , 270 °C e 20 min em 270 °C.



Conforme pode ser observado na Figura 61, independentemente da massa de sangue digerida por MAWD-SRC (0,4 a 2,0 g), os digeridos apresentaram aspecto límpido, sem à presença de material particulado em suspensão. Conforme demonstrado na Figura 60, os teores de C obtidos nos digeridos foram baixos, o que indica que as amostras foram eficientemente digeridas em todas as massas de sangue avaliadas.

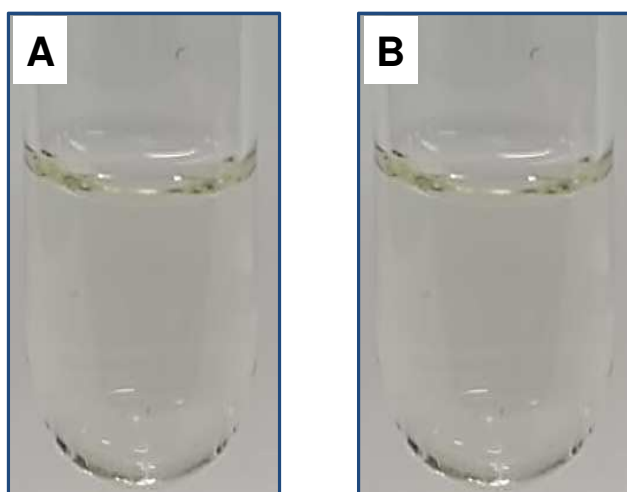
É importante mencionar que massas de sangue superiores a 0,4 g foram avaliadas no método da MAWD-SRC. No entanto, no presente trabalho, a massa de amostra selecionada para as demais otimizações do método proposto foi de 0,4 g, de acordo com os experimentos de interferências feitos na determinação de REE por USN-ICP-MS.

#### 4.5.3.2 Avaliação da concentração de $\text{HNO}_3$

Levando em conta as concentrações de C relativamente baixas obtidas quando as mostras de sangue foram digeridos (até 2,0 g) com  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$ , a concentração de  $\text{HNO}_3$  é um parâmetro importante a ser investigado. Adicionalmente, considerando todos os aspectos ambientais, no que se refere ao desenvolvimento de métodos analíticos com reagentes diluídos, menor geração de resíduos, bem como redução de custos, a avaliação deste parâmetro torna-se ainda mais importante. Além disso, conforme demonstrado neste trabalho, o uso de

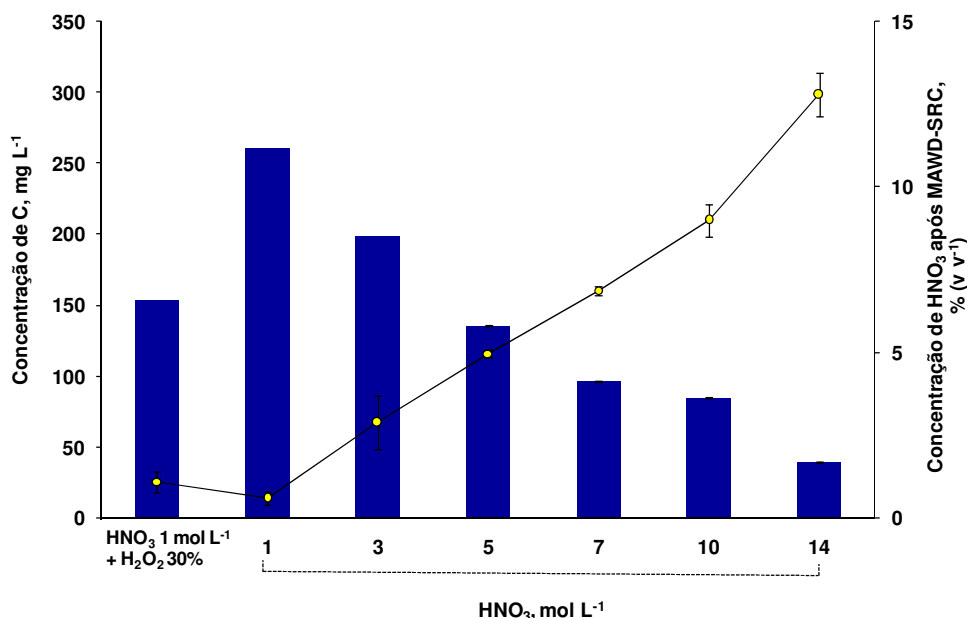
métodos analíticos que possibilitam a obtenção de digeridos com menores concentrações de ácidos, principalmente o  $\text{HNO}_3$  (oxidante comumente utilizado), ajudam a reduzir possíveis interferências na etapa de determinação dos REE por USN-ICP-MS. Na Figura 62 está mostrado o aspecto dos digeridos usando  $\text{HNO}_3$  1 e  $14 \text{ mol L}^{-1}$  após a digestão de 0,4 g de sangue por MAWD-SRC.

Figura 62 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando A) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , B) 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $14 \text{ mol L}^{-1}$ . Condição: 0,4 g de sangue,  $270 \text{ }^\circ\text{C}$  e 20 min na temperatura máxima.



É importante salientar que, usando 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 a  $14 \text{ mol L}^{-1}$ , os aspectos dos digeridos foram límpidos e sem à presença de material particulado e gordura em suspensão. Posteriormente, foi feita a determinação da concentração de C e de  $\text{HNO}_3$  nos digeridos obtidos por MAWD-SRC, onde que os resultados obtidos estão mostrados na Figura 63.

Figura 63 - Concentração de carbono (barras) e concentração de HNO<sub>3</sub> (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 a 14 mol L<sup>-1</sup>. Condição: 0,4 g de sangue, 270 °C e 20 min em 270°C. As barras de erros representam o desvio padrão, n=3.



De acordo com os resultados mostrados na Figura 63, é possível observar que, com adiminuição da concentração de HNO<sub>3</sub> o teor de C aumentou após a digestão de 0,4 g de sangue ( $40 \pm 0,2$  a  $260 \pm 19$  mg L<sup>-1</sup> usando HNO<sub>3</sub> 14 e 1 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). O aumento da concentração de C usando HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, representa um aumento de aproximadamente 6,5 vezes em relação ao uso de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>. No entanto, conforme demonstrado no item 4.3.6.3 (*Resultados*), esse teor de C não seria o suficiente para causar interferências na etapa de determinação do REE por USN-ICP-MS.

Por outro lado, a concentração de HNO<sub>3</sub> presente nos digeridos, assim como o esperado, diminuiu com o uso de soluções mais diluídas de HNO<sub>3</sub>. Foi possível observar que, usando concentrações de HNO<sub>3</sub> de até 5 mol L<sup>-1</sup>, a concentração de HNO<sub>3</sub> não foi superior a 5% (v v<sup>-1</sup>).

Adicionalmente, foi feito um experimento avaliando o uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% na digestão de sangue utilizando o método da MAWD-SRC em conjunto com HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. É importante mencionar que, para evitar projeções (Figura 51) devido a reação da catalase, o sangue contendo o HNO<sub>3</sub> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aquecido em uma chapa de aquecimento (150 °C) por, aproximadamente 40 min, antes da digestão por MAWD-SRC. Por tratar-se de um método que consiste na pressurização da SRC,

esse cuidado torna-se ainda mais relevante. Nesta avaliação verificou-se que os teores de C diminuíram (aproximadamente 42%), enquanto que, a concentração de  $\text{HNO}_3$  teve um pequeno aumento (3%) em comparação com a condição utilizando somente o  $\text{HNO}_3$  na mesma concentração ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Entretanto, considerando que o uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no método da MAWD-SRC acarreta no aumento do tempo total do procedimento, optou-se por não usar este reagente para a subseqüentes experimentos. Além disso, embora a condição utilizando apenas  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , apresentou teores de C maiores ( $260 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando comparado a condição contendo o  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  em conjunto com  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $152 \text{ mg L}^{-1}$ ), os valores de C são relativamente baixos e não causariam interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS.

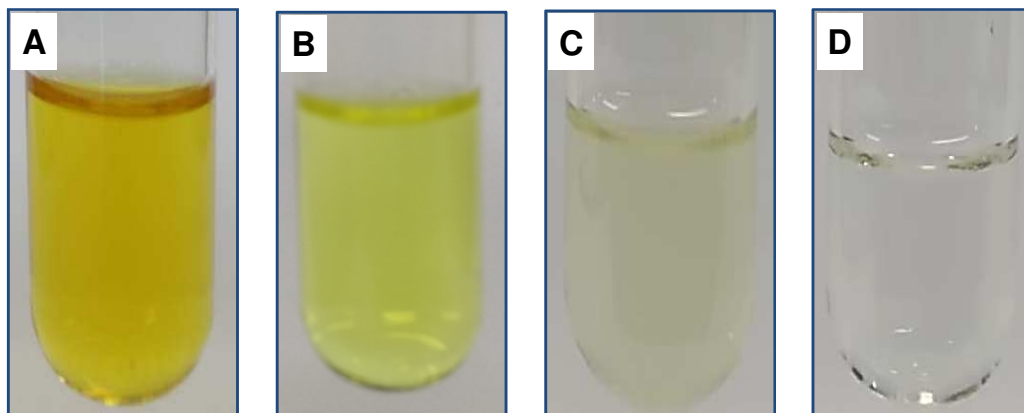
Nesse sentido, considerando os aspectos mencionados, a concentração de  $\text{HNO}_3$  de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi escolhida para a digestão de sangue e para a otimização dos demais parâmetros do método da MAWD-SRC. É importante enfatizar que o uso de soluções diluídas é muito importante nos métodos de preparo de amostras, principalmente, durante as análises de rotina.

#### 4.5.3.3 Avaliação da temperatura máxima de digestão

A avaliação da temperatura é outro parâmetro importante para o desenvolvimento do método da MAWD-SRC. Conforme é sabido, o aumento da temperatura, de maneira geral, proporciona o aumento da eficiência de digestão das amostras, visto que o poder oxidante do ácido utilizado para a digestão das amostras é potencializado<sup>15,70</sup>.

Dessa forma, o uso de temperaturas mais elevadas no método da MAWD-SRC, quando comparada aos métodos da CWD-OS e CWD-CS, pode justificar o fato desse método proporcionar a digestão de 0,4 g de sangue com o uso de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Neste caso, digeridos com baixo teor de C (aproximadamente  $260 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram obtidos. Assim, optou-se por verificar se, seria possível utilizar a mesma concentração de ácido para a digestão do sangue em temperaturas menores. Na Figura 64 é possível observar o aspecto dos digeridos após avaliação da temperatura no método da MAWD-SRC.

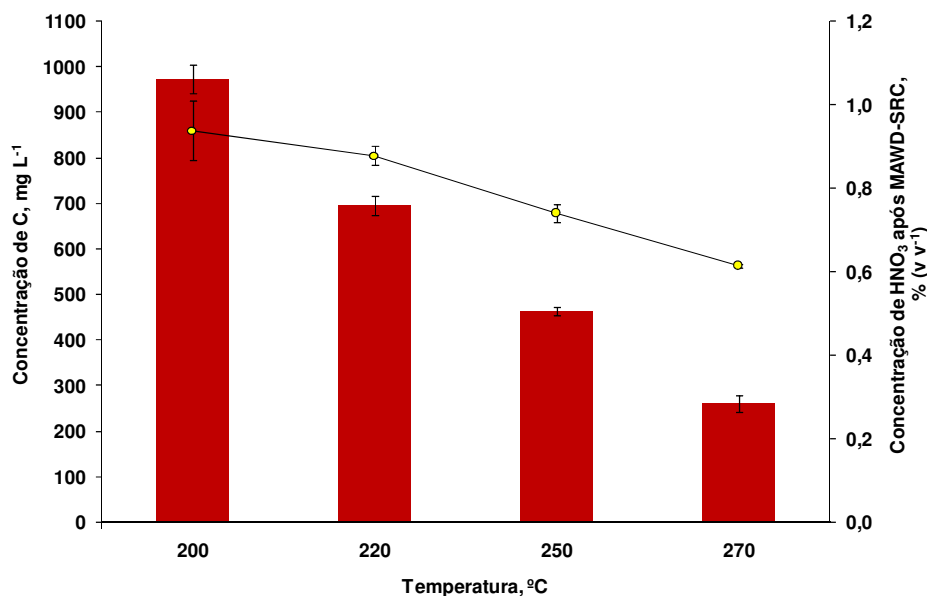
Figura 64 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando: A) 200, B) 220, C) 250 e D) 270 °C. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e 20 min em cada temperatura.



De acordo com a Figura 64, pode-se verificar que para o uso de temperaturas de 200 e 220 °C foram obtidos digeridos com aspecto amarelado, viscosos e com gordura em suspensão proveniente de amostra não digerida. Possivelmente, com o uso dessas temperaturas, somando-se ao uso de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, ocorreu a redução do poder oxidante do ácido. Por outro lado, com o uso de temperaturas de 250 e 270 °C foi observado a obtenção de digeridos mais límpidos. No entanto, foi observada um pouco de gordura em suspensão quando a temperatura de 250 °C foi avaliada.

Posteriormente, foi feita a determinação da concentração de C e de HNO<sub>3</sub> nos digeridos obtidos. Na Figura 65 é possível observar o teor de carbono em solução e a concentração de HNO<sub>3</sub> nos digeridos após a avaliação da temperatura para a digestão de sangue por MAWD-SRC.

Figura 65 - Concentração de carbono (barras) e concentração de  $\text{HNO}_3$  (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 200, 220, 250 e 270 °C. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  e 20 min em cada temperatura. As barras de erros representam o desvio padrão,  $n=3$ .



Como pode ser observado na Figura 65, usando temperaturas máximas de 200 a 270 °C durante a digestão de sangue, o teor de carbono em solução variou de cerca de 974 a 260 mg  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados indicam que, o aumento da temperatura ocasionou uma diminuição significativa da concentração de C. Utilizando a temperatura de 270 °C observou-se uma redução da concentração de C de, aproximadamente, 73% em comparação com o digerido obtido na temperatura de 200 °C. Por outro lado, a concentração de  $\text{HNO}_3$  remanescente manteve-se, praticamente constante, visto que foi utilizado  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ .

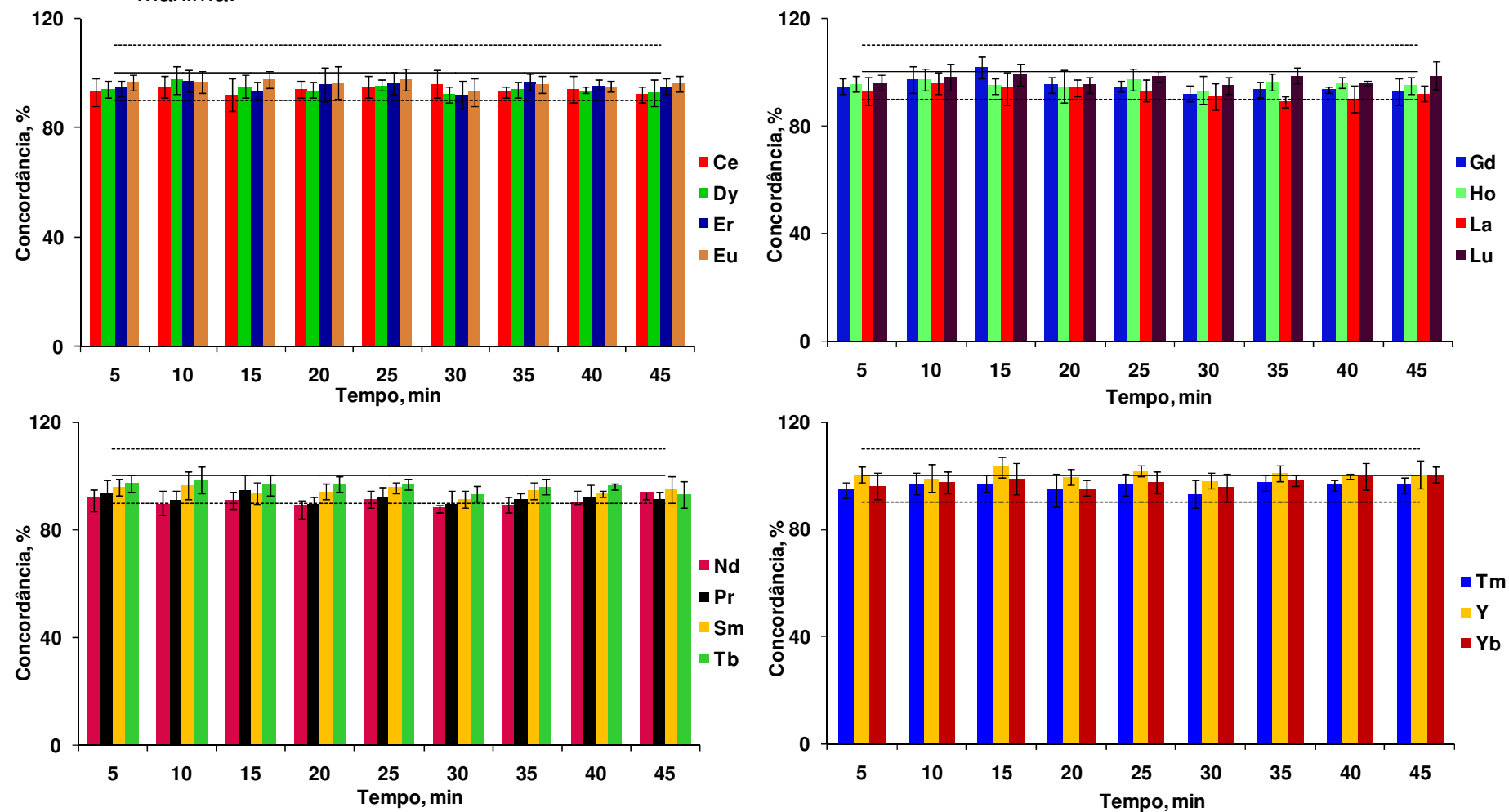
Subsequentemente, foi feita a avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS usando os digeridos obtidos após a avaliação da temperatura máxima de digestão de 250 e 270 °C. Este estudo foi feito com o objetivo de otimizar a melhor temperatura para a digestão de sangue por MAWD-SRC. Nesse sentido, a temperatura máxima de digestão foi fixada em 250 e 270 °C.



#### 4.5.3.4 Avaliação da sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS usando digeridos de sangue após MAWD-SRC

Um estudo usando digeridos obtidos após a avaliação da temperatura máxima de digestão no método da MAWD-SRC foi feito para verificar uma possível mudança de sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS ao longo do tempo. Os experimentos foram feitos de maneira análoga, seguindo os mesmos procedimentos mencionados no método da CWD-CS (item 4.5.2.3, *Resultados*). É importante mencionar que esses experimentos foram feitos utilizando os digeridos obtidos após a digestão de 0,4 g de sangue (amostra A) em 250 e 270 °C conforme o procedimento descrito no item 3.7.3 (*Materiais e Métodos*). Após a obtenção dos digeridos, estes foram misturados de modo a obter uma solução única com volume total de 125 mL. Posteriormente, foi feita adição dos REE na solução resultante de modo que no volume final a concentração dos REE foi de 250  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A solução foi introduzida no equipamento de USN-ICP-MS de maneira contínua por 45 min e, a leitura dos REE foi feita de 5 em 5 min. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos logo que a solução foi introduzida no equipamento de USN-ICP-MS (medida 1 - Tempo de 1 min). Os resultados obtidos (na condição usando 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  e 250 °C) podem ser observados na Figura 66.

Figura 66 - Avaliação da resposta do equipamento de USN-ICP-MS na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) ao longo do tempo a partir de digeridos de sangue (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue e 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, temperatura de 250 °C e 20 min na temperatura máxima.

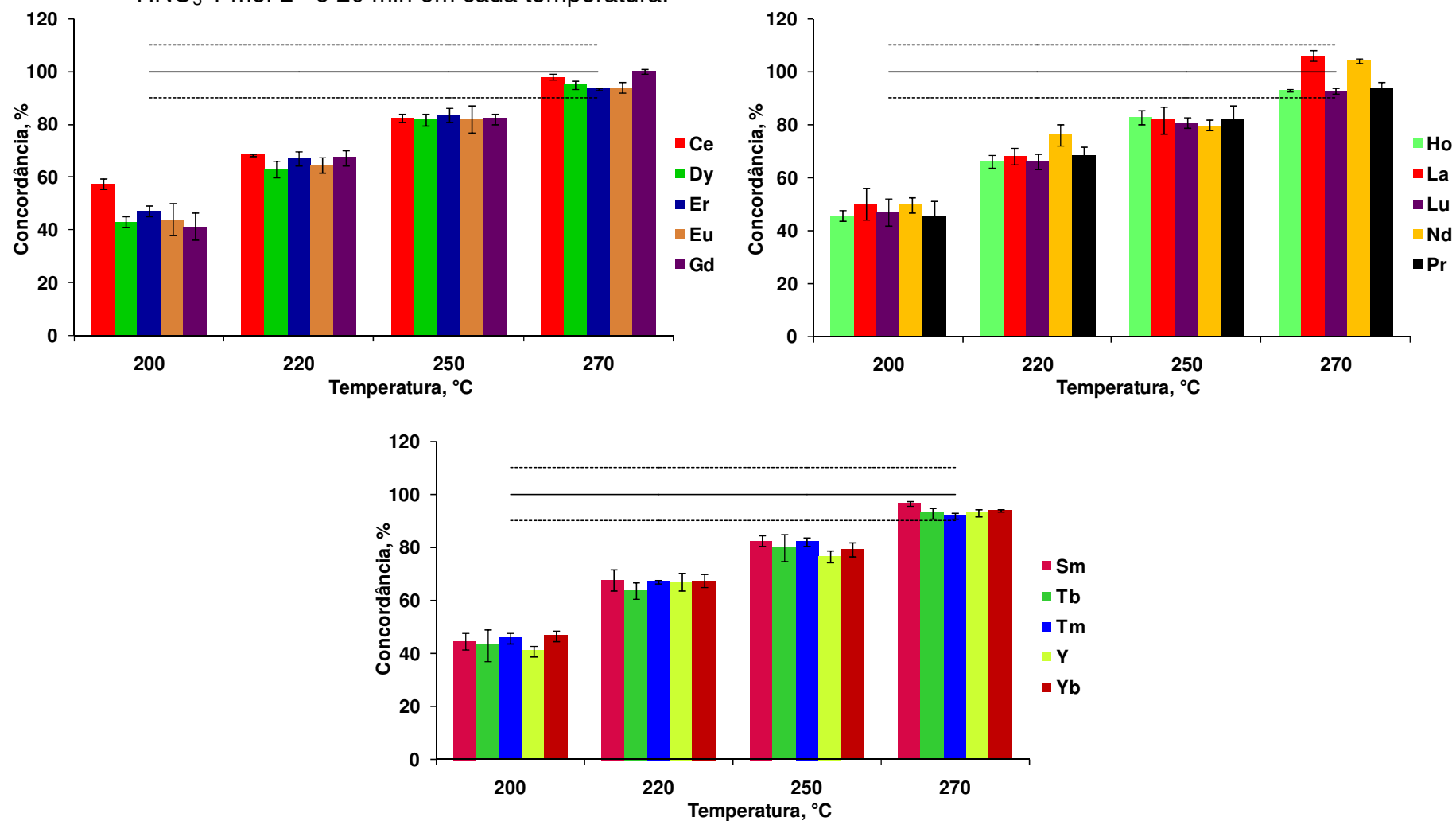


De acordo com os resultados obtidos (Figura 66), não foram observadas alterações significativas na sensibilidade independente do tempo de introdução do digerido no equipamento de USN-ICP-MS (5 a 45 min). Nesta condição, todos os REE apresentaram concordâncias na faixa de 90 a 110%. Com isso, pode-se concluir que os digeridos obtidos após a MAWD-SRC não alteram de maneira significativa a sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS ao longo de 45 min. É importante mencionar que os mesmos experimentos foram feitos utilizando a temperatura de 270 °C e, conforme o esperado, também não houve mudanças na sensibilidade do equipamento de USN-ICP-MS ao longo do tempo.

#### 4.5.3.5 Avaliação da exatidão do método da MAWD-SRC

A exatidão método da MAWD-SRC foi avaliada mediante experimentos de recuperação dos analitos e determinação por USN-ICP-MS. Para isso, foi feita a adição dos REE em 0,4 g de sangue previamente a digestão usando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> nas diferentes temperaturas avaliadas por MAWD-SRC. Posteriormente, foi feita a determinação dos REE por USN-ICP-MS. Estes experimentos foram feitos nas temperaturas de 200 a 270 °C de modo a verificar a exatidão do método em cada temperatura avaliada. Os resultados podem ser observados na Figura 67.

Figura 67 - Avaliação da exatidão do método da MAWD-SRC na determinação de REE (250 ng L<sup>-1</sup>) (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue e 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e 20 min em cada temperatura.



De acordo com os resultados, as concordâncias foram inferiores a 50 e 70% para os digeridos obtidos em temperaturas de 200 e 220 °C, respectivamente, para todos os elementos em comparação com os valores de referência. Para a temperatura de 250 °C, as concordâncias variaram de 76% (Y) a 82% (Sm), indicando que, mesmo possuindo um aspecto límpido, a solução não é adequada para introdução de forma direta no equipamento de USN-ICP-MS. Esse resultado provavelmente ocorra devido as mudanças na formação do aerossol quando esses digeridos são introduzidos no nebulizador ultrassônico. Essa mudança na geração do aerossol, possivelmente, seja devido a uma pequena quantidade de gordura dissolvida nos digeridos. Por outro lado, concordâncias superiores a 92%, foram obtidas para todos os REE em comparação com os valores de referência utilizando os digeridos provenientes da digestão de sangue a 270 °C.

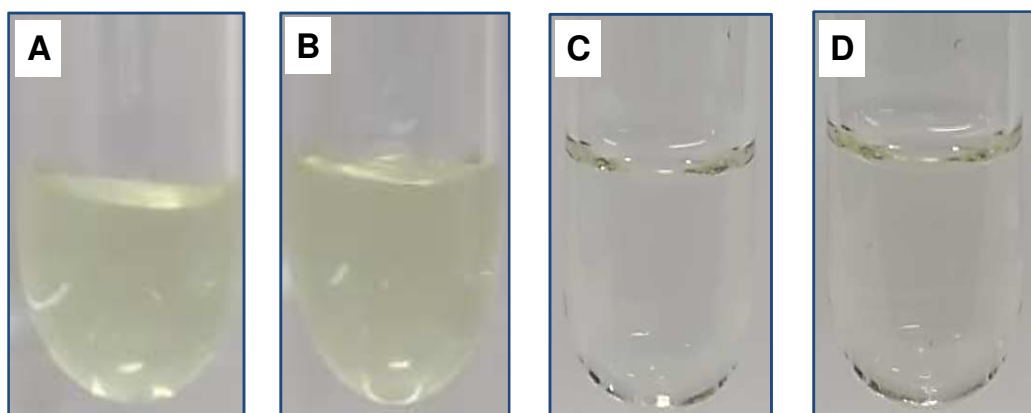
Considerando esses aspectos, dentre as temperaturas avaliadas, a temperatura de 270 °C foi a única que forneceu digeridos compatíveis ao equipamento de USN-ICP-MS, sem a necessidade de diluições para corrigir possíveis interferências. Assim, esta temperatura foi escolhida para a digestão de sangue visando a posterior determinação dos REE por USN-ICP-MS.

#### 4.5.3.6 Avaliação do tempo

A avaliação do tempo é um importante parâmetro experimental a ser investigado no desenvolvimento de método de preparo analítico, visto que esta etapa pode ser considerada a mais morosa da sequencia analítica<sup>15</sup>. Esta avaliação torna-se ainda mais importante para os métodos que serão aplicados em análise de rotina<sup>55</sup>.

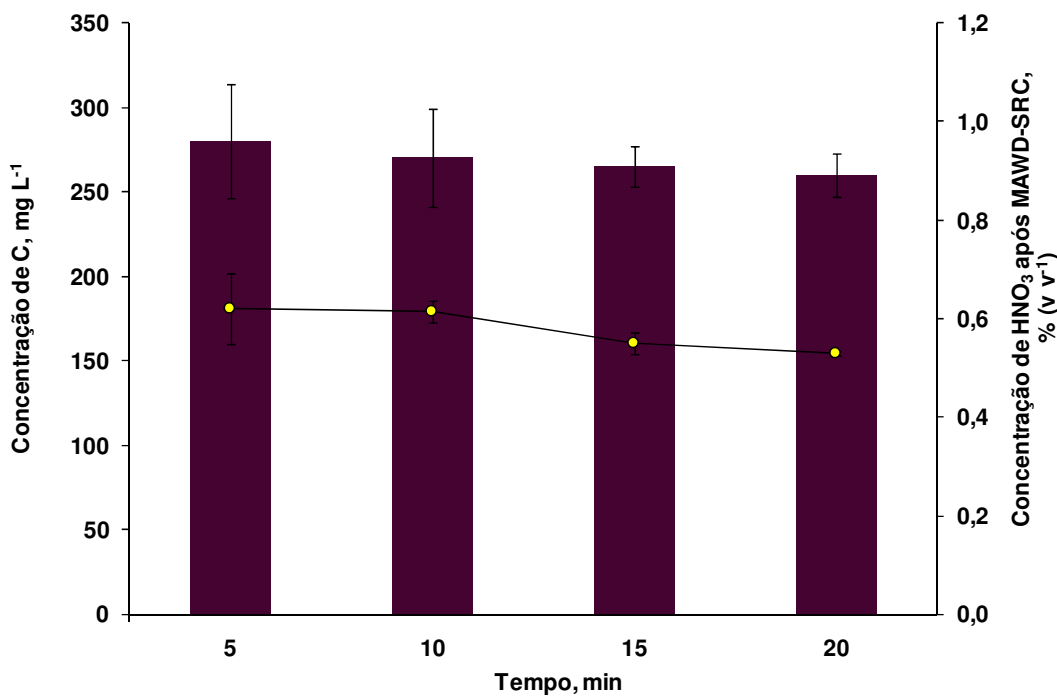
Neste estudo, o tempo de 5, 10, 15 e 20 min foram avaliados para a digestão de sangue pela mudança de tempo de permanência na quarta etapa de programa de irradiação (270 °C). Para verificar este parâmetro, os experimentos foram feitos usando as condições previamente otimizadas: 0,4 g de sangue, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e 270 °C. Na figura 68 está mostrado o aspecto dos digeridos usando 5, 10, 15 e 20 min para a digestão de 0,4 g de sangue por MAWD-SRC.

Figura 68 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MAWD-SRC usando A) 5, B) 10, C) 15 e D) 20 min. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $270 \text{ }^\circ\text{C}$ .



De acordo com a Figura 68, pode-se observar que os digeridos obtidos após 5 e 10 min em  $270 \text{ }^\circ\text{C}$ , apresentaram aspecto amarelado e com gordura em suspensão. Por outro lado, digeridos límpidos, sem gordura e material sólido em suspensão foram obtidos nos tempos de 15 e 20 min. Na Figura 69 é possível observar o teor de carbono em solução e a concentração de  $\text{HNO}_3$  obtida após a variação do tempo de permanência na temperatura máxima para a digestão de sangue.

Figura 69 - Concentração de carbono (barras) e concentração de  $\text{HNO}_3$  (linha) presente nos digeridos obtidos após a MAWD-SRC usando 5, 10, 15 e 20 min na temperatura máxima de digestão. Condição: 0,4 g de sangue, 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $270 \text{ }^\circ\text{C}$ . As barras de erros representam o desvio padrão,  $n=3$ .



De acordo com os resultados obtidos (Figura 69), foi possível observar que, de maneira geral, o teor de C nos digeridos foram semelhantes usando 5 e 20 min ( $265$  a  $248 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente). No entanto, quando foram utilizados tempos de 5 e 10 min, valores de RSDs mais elevados foram obtidos (aproximadamente 30% enquanto que para as condições utilizando 15 e 20 min os RSDs foram de, aproximadamente 4%). Isto, possivelmente ocorreu, devido a quantidade de gordura remanescente no digerido final. Por outro lado, a concentração de  $\text{HNO}_3$  manteve-se praticamente constante para todas as condições (aproximadamente 0,5 a 0,6%). Nesse sentido, considerando todos esses aspectos, foi selecionado o tempo de 15 min a  $270 \text{ }^\circ\text{C}$  para a digestão de sangue por MAWD-SRC.

## 4.5.3.7 Determinação de REE em sangue após MAWD-SRC

Após definir as melhores condições no método da MAWD-SRC (0,4 g, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, e 15 min a 270 °C) para a digestão de sangue, foi feita a determinação dos REE nas amostras utilizadas no presente estudo. Os resultados podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Determinação de REE em sangue após MAWD-SRC. Os valores representam a média ± desvio padrão (ng g<sup>-1</sup>), n = 5. Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condição: 0,4 g, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, e 15 min a 270 °C.

Elemento	Concentração, ng g <sup>-1</sup>					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	< 12,5	< 6,3	< 8,6	7,43 ± 0,72	< 5,6	8,66 ± 0,85
Dy	< 7,5	< 3,7	< 5,1	< 3,7	< 3,3	< 3,7
Er	< 6,3	< 3,1	< 4,3	< 3,1	< 2,8	< 3,1
Eu	< 6,9	< 3,4	< 4,8	< 3,4	< 3,0	< 3,4
Gd	< 12,5	< 6,3	< 8,6	< 6,3	< 5,5	< 6,3
Ho	< 3,3	< 1,6	< 2,5	< 1,6	< 1,4	< 1,6
La	< 25,2	< 6,3	< 8,6	6,83 ± 0,50	< 5,6	7,03 ± 0,44
Lu	< 6,5	< 3,3	< 4,5	< 3,3	< 2,9	< 3,3
Nd	< 18,8	< 5,0	< 6,8	5,93 ± 0,38	< 4,4	< 5,0
Pr	< 16,3	< 4,8	< 6,5	< 4,8	< 4,2	< 4,8
Sm	< 17,4	< 5,0	< 6,9	< 5,0	< 4,3	< 5,0
Tb	< 6,3	< 3,2	< 4,3	< 3,2	< 2,8	< 3,2
Tm	< 7,0	< 1,6	< 2,2	< 1,6	< 1,5	< 1,6
Y	< 25	< 6,3	< 8,6	< 6,3	< 5,6	< 6,3
Yb	< 7,5	< 3,8	< 5,1	< 3,8	< 3,3	< 3,8

Após a determinação dos REE por USN-ICP-MS após MAWD-SRC, pode-se verificar que todos os elementos estão em concentrações menores que os LOQs nas amostras A, B e D. Por outro lado, nas amostras C e E foi observado que, Ce, La e Nd estão presentes em concentrações acima dos seus respectivos LOQs na amostra C, enquanto que na amostra E foi encontrada apenas à presença de Ce e



La acima do LOQ. É importante mencionar que os LOQs variaram um pouco de amostra para amostra em função da massa digerida por MAWD-SRC.

#### 4.5.4 Combustão iniciada por micro-ondas

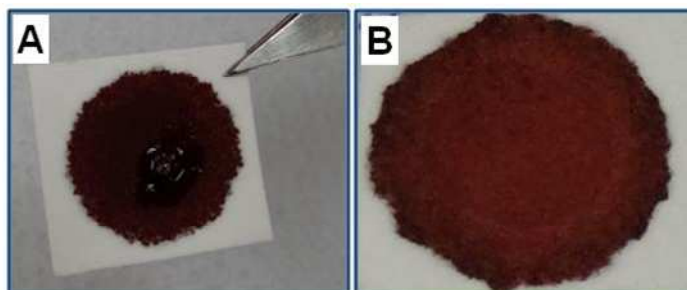
O método da MIC é bem estabelecido na literatura e tem sido aplicado para uma infinidade de amostras e para diferentes analitos<sup>10,81-84,106,149</sup>. Em relação à amostras biológicas, recentemente, a MIC foi aplicada para a digestão de cabelo e saliva para posterior determinação de Br e I<sup>150</sup>. No entanto, o método da MIC ainda não foi aplicado para a digestão de sangue para a posterior determinação dos REE.

O método da MIC fornece diversas vantagens, principalmente no que se refere à obtenção de digeridos com baixo teor de carbono em solução (inferior a 1%), tornando-os compatíveis às técnicas analíticas comumente utilizada para a determinação elementar. Além da adequabilidade dos digeridos quanto ao baixo teor de carbono em solução, no método da MIC há a possibilidade do uso de soluções ácidas ou alcalinas diluídas para a retenção dos analitos, o que acarreta na diminuição de valores de brancos, menor geração de resíduos e reduz possíveis interferências durante a etapa de medida<sup>10,84,106</sup>. Considerando esses aspectos, no presente trabalho o método da MIC foi investigado para a digestão de sangue para a posterior determinação dos REE por USN-ICP-MS. O procedimento experimental da MIC está descrito no item 3.7.4 (Materiais e Métodos).

##### 4.5.4.1 Avaliação da massa máxima de sangue adsorvida nos papéis de DBS

Para o desenvolvimento do método da MIC foi utilizado papéis de DBS como suporte da amostra. Dessa forma, previamente ao desenvolvimento do método propriamente dito, foi feita uma avaliação da massa máxima de sangue que poderia ser absorvida em cada disco de papel. Foi feita a adição de massas de sangue de 0,15 a 0,2 g em cada papel e então, os mesmos foram deixados em uma capela de fluxo laminar para secagem (aproximadamente 72 h). Na Figura 70 é possível observar o sangue absorvido no papel antes de após a secagem.

Figura 70 - Absorção de sangue no papel de DBS A) após a pesagem e B) após a secagem do sangue absorvido no papel de DBS.



É importante salientar que, nesta etapa convencionou-se que a massa máxima de sangue possível de ser absorvida no papel de DBS seria aquela em que não fosse observado sinais de amostra no frasco de polietileno, o qual foi utilizado para suportar o papel de DBS na balança durante a pesagem. Assim, observou-se que cada papel de DBS absorveu cerca de 170 mg de sangue. Com isso, 170 mg de sangue em cada papel de DBS foi utilizado para subseqüentes avaliações do método da MIC.

#### 4.5.4.2 Avaliação da massa máxima de sangue a ser digerida no método da MIC

Para avaliação do método da MIC, inicialmente, foi feita a avaliação da massa máxima de amostra possível de ser digerida. As massas de sangue avaliadas foram de 0,17, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 e 0,45 g. Nesta avaliação,  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  foi utilizado como solução absorvedora. Conforme mencionado anteriormente, cada papel de DBS é capaz de absorver cerca de 170 mg de sangue. Assim, quando massas acima de 0,35 g de sangue foram digeridas, foram utilizados três papéis de DBS.

Para todas as massas de sangue digeridas no método da MIC (0,17 a 0,45 g), a pressão máxima durante a etapa de combustão não ultrapassou 35 bar. Isso representa um valor de pressão inferior a 50% do valor de pressão máxima permitida pelo fabricante do forno de micro-ondas. Nessas condições, a pressão gerada no interior dos frascos de quartzo está dentro do limite suportado pelos frascos de quartzo<sup>78</sup>. Na Figura 71 é possível observar o aspecto da solução obtida após a queima de 0,45 g de sangue.

Figura 71 - Aspecto dos digeridos de sangue obtidos após MIC. Condição: 0,45 g de sangue e 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14 mol  $\text{L}^{-1}$  usado como solução absorvedora.



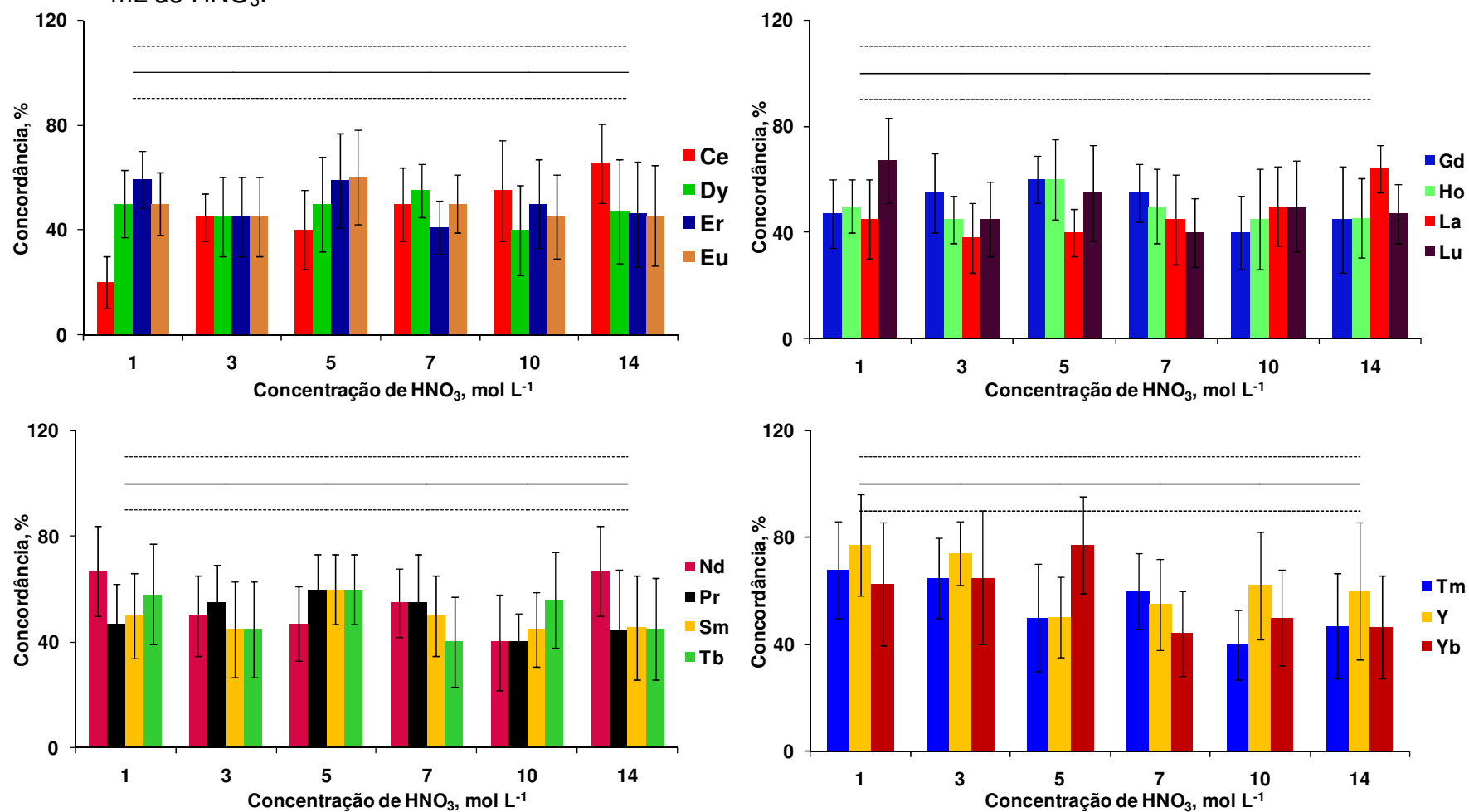
Após a digestão de massas de sangue de até 0,45 g, pode-se perceber que o método da MIC forneceu digeridos límpidos e sem a presença de material sólido em suspensão. Além disso, é importante mencionar que o teor de C nos digeridos sempre foi inferior a 25 mg  $\text{L}^{-1}$ , indicando que a matriz foi eficientemente digerida. No entanto, considerando que o sangue possui concentrações relativamente elevadas de Na, K e Fe e, de acordo com os estudos de interferências feitos no presente trabalho para a determinação de REE por USN-ICP-MS, optou-se por utilizar 0,4 g de sangue (3 papéis de DBS contendo aproximadamente 133 mg de sangue cada) para as subseqüentes otimizações do método da MIC.

#### 4.5.4.3 Avaliação da concentração de $\text{HNO}_3$

No método da MIC, a solução absorvedora desempenha um papel fundamental, visto que é a responsável pela absorção dos analitos após a etapa de combustão da amostra<sup>15,84</sup>. O método da MIC permite o uso de soluções ácidas (para a absorção de metais, que é o caso dos REE) e também soluções alcalinas ou até mesmo água (geralmente utilizada para a retenção de halogênios). Uma das principais vantagens da MIC é a possibilidade do uso de soluções absorvedoras diluídas, tanto para os metais, como para os halogênios<sup>36,82,83,85</sup>. Considerando os aspectos mencionados, no presente trabalho, foi feita a avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$  para a absorção dos REE após a combustão de sangue. É importante mencionar que para a otimização dos parâmetros operacionais no método da MIC, a amostra A foi selecionada e, a cada experimento, foi feita a adição de uma solução contendo todos os REE (sobre o papel filtro), de modo que no volume final (25 mL) a

concentração dos analitos foi de 250 ng L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 72.

Figura 72 - Avaliação da concentração de  $\text{HNO}_3$  na determinação de REE por USN-ICP-MS ( $n=5$ ). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo  $250 \text{ ng L}^{-1}$  dos REE e 6 mL de  $\text{HNO}_3$ .



De acordo com os resultados (Figura 72), foram obtidos RSDs muito altos (na faixa de 20 a 50%) para todos os REE, independentemente das concentrações de  $\text{HNO}_3$  avaliadas. Além disso, as concordâncias variaram de 20% a 67% para Ce e Lu, respectivamente, utilizando  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Provavelmente, esses resultados podem ser explicados pelo fato dos REE estarem formando óxidos ternários e complexos na base do suporte após a etapa de combustão. É sabido que os REE formam cátions, geralmente trivalentes, que são volumosos e estáveis. Dessa forma, esses elementos nas formas ionizadas podem ocupar uma ou mais posições dos cátions nos óxidos ternários ( $\text{ABO}_3$ , onde A=REE e B=metal). As perovskitas (grupo de cristais que apresenta a fórmula química ( $\text{ABO}_3$ ), como o  $\text{GdFeO}_3$ , por exemplo) podem ser altamente estáveis pelo fato dos octaedros de  $\text{FeO}_3$  estarem ligados pelos vértices em torno do íon  $\text{Gd}^{+3}$  <sup>151</sup>.

Dessa forma, não foram obtidas concordâncias adequadas para os REE no método da MIC nestas condições, possivelmente pelos REE estarem formando espécies estáveis, como as perovskitas. Cabe salientar que o sangue contém elevada concentração de Fe, podendo facilitar a formação desses compostos. A formação de complexos é menos provável, pois foi utilizado apenas  $\text{HNO}_3$  para a retenção dos analitos (compostos solúveis), sem à presença de qualquer ligante orgânico.

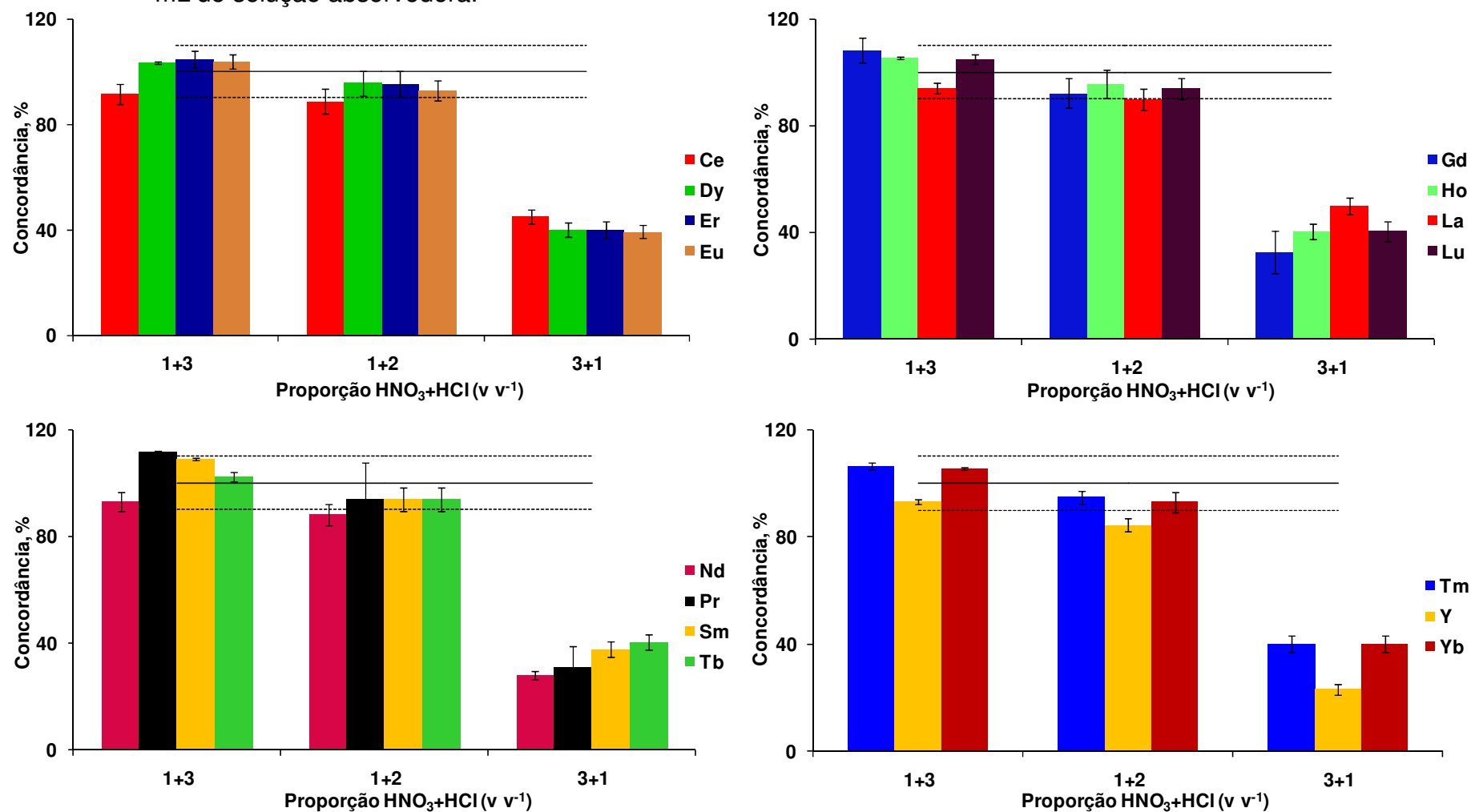
#### 4.5.4.4 Avaliação do uso de HCl

Dentre os oxidantes comumente utilizados para o preparo de amostras orgânicas, o  $\text{HNO}_3$  é um dos mais utilizados. No entanto, alguns analitos formam compostos refratários após a combustão e podem ficar adsorvidos na base do suporte ou nas paredes dos frascos de quartzo (como o Cr e Sn, por exemplo). Dessa forma, esses analitos podem não ser absorvidos de maneira quantitativa utilizando apenas  $\text{HNO}_3$  como solução absorvedora<sup>83,85</sup>. Assim, o HCl pode ser uma alternativa para ajudar na retenção destes elementos em solução após a combustão. Um dos principais mecanismos de ação do HCl é a formação de compostos voláteis na forma de cloretos após o processo de combustão e durante a etapa de refluxo, evitando assim a formação dos compostos refratários<sup>15</sup>.

Como as recuperações obtidas para os REE usando apenas  $\text{HNO}_3$  não foram concordantes com os valores de referência, optou-se por avaliar o uso do HCl para a

retenção dos REE após a digestão do sangue. Para isso, foram usadas soluções absorvedoras contendo  $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$  nas proporções de 1+3, 1+2 e 3+1 (num volume total de 6 mL). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 73.

Figura 73 - Avaliação da presença de HCl na determinação de REE por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo 250 ng L<sup>-1</sup> dos REE e 6 mL de solução absorvedora.





Conforme pode ser observado na Figura 73, com a presença de HCl, independentemente da proporção de HNO<sub>3</sub> utilizada, os RSDs das medidas melhoraram significativamente (inferiores a 8%, exceto para Pr que foi de 14% na proporção de HNO<sub>3</sub> + HCl na proporção de 1+2, respectivamente). Por outro lado, pode-se observar que a condição utilizando HNO<sub>3</sub> + HCl na proporção de 3+1, respectivamente, continuou não favorecendo a completa absorção dos REE na solução. Usando esta proporção, as concordâncias foram inferiores a 40% para todos os analitos. Contrariamente, com o aumento da proporção de HCl em relação ao HNO<sub>3</sub> (condição HNO<sub>3</sub> + HCl na proporção de 1+2, respectivamente), percebe-se que as concordâncias aumentaram de maneira significativa. Nesta condição, as concordâncias variaram de 84,5% (Y) a 95% (Er e Dy). No entanto, quando a proporção de HNO<sub>3</sub> + HCl de 1+3 (água régia) foi usada, as concordâncias variaram de 91,5% (Ce) a 106% (Yb).

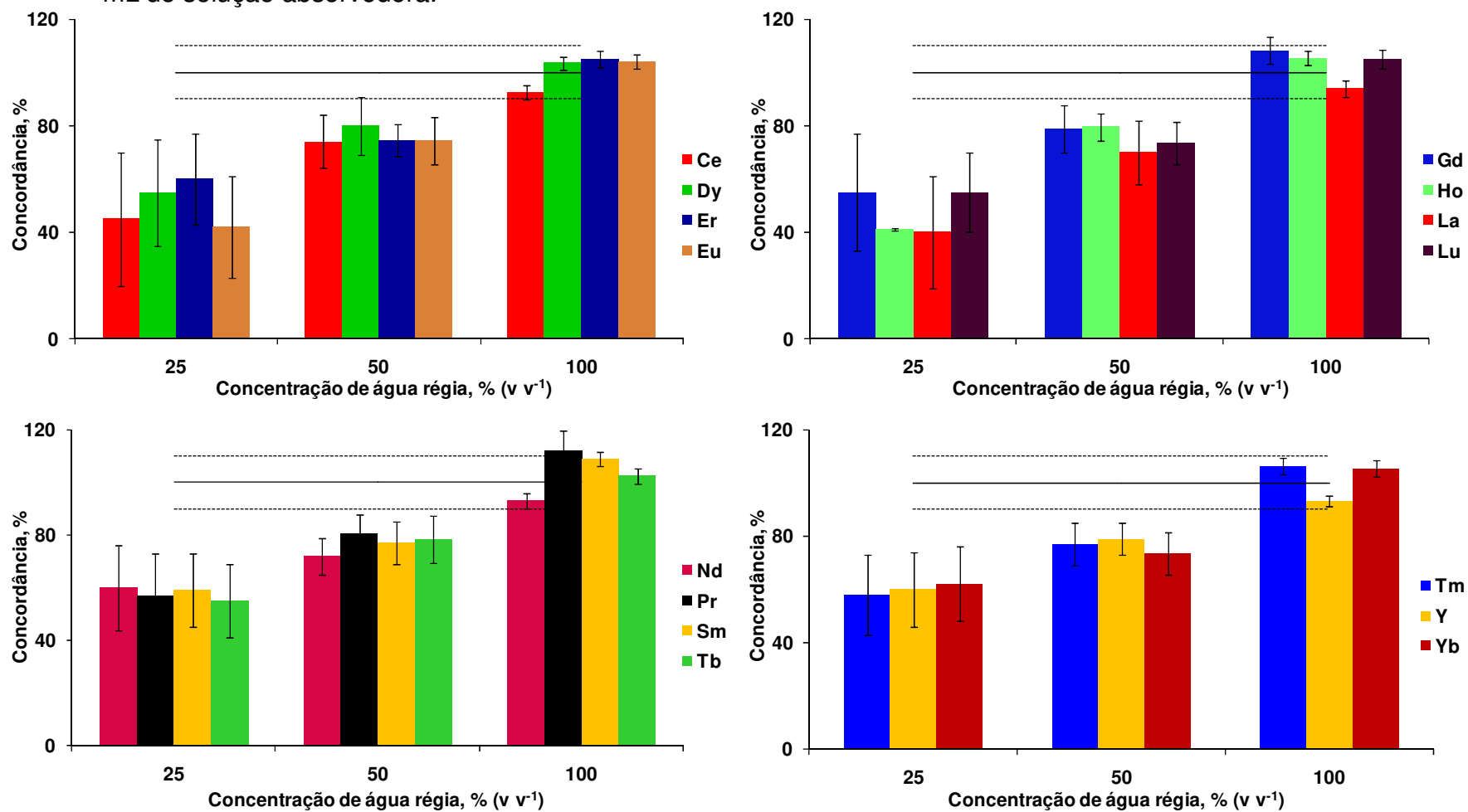
Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que a presença de HCl na solução absorvedora para absorção dos REE tem papel importante, visto a melhora dos resultados obtidos quando comparados com aqueles em que foi utilizado apenas HNO<sub>3</sub>. Possivelmente, esses resultados sejam explicados pela capacidade dos REE formarem compostos voláteis (cloretos) na presença de HCl, evitando a formação das perovskitas. Assim, os REE são removidos da base do suporte ou das paredes dos frascos e retidos de forma quantitativa na solução absorvedora. Dessa forma a proporção de HNO<sub>3</sub> + HCl de 1+3 foi a escolhida para a absorção quantitativa dos REE após a digestão de sangue pelo método da MIC.

#### 4.5.4.5 Avaliação da concentração de água régia

Foi demonstrado que é necessário o uso de HCl para absorção quantitativa dos REE após a digestão de sangue utilizando o método da MIC. Dentre as condições avaliadas, a proporção de HNO<sub>3</sub> + HCl de 1+3 (água régia) foi a mais adequada para a retenção dos REE. No entanto, todas as avaliações das proporções foram feitas utilizando HCl e HNO<sub>3</sub> na forma concentrada (12 e 14 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Com isso, experimentos adicionais foram feitos para verificar se poderia ser utilizada água régia diluída para a absorção quantitativa dos

REE. Assim, foram avaliadas concentrações de água régia de 25 e 50%. Os resultados obtidos para esta avaliação podem ser visualizados na Figura 74.

Figura 74 - Avaliação da concentração de água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS (n=5). A linha contínua representa a concordância em 100% com a concentração da solução de referência contendo todos os REE e as linhas pontilhadas representam os níveis de tolerância estipulado em 10%. Condição: 0,4 g de sangue contendo 250 ng L<sup>-1</sup> dos REE e 6 mL de solução absorvedora.



De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que, com a diminuição da concentração de água régia (25 e 50%) houve uma diminuição nas concordâncias para os REE. Nesse sentido, concordâncias inferiores a 80% foram obtidas em comparação com os valores de referência para todos os analitos. Desta forma, optou-se por manter a concentração de água régia em 100% de modo a garantir a completa absorção dos REE em solução.

#### 4.5.4.6 Determinação de REE em sangue após MIC

Após definir as melhores condições no método da MIC (0,4 g de sangue e 6 mL de água régia concentrada) para a digestão de sangue e recuperação quantitativa, foi feita a determinação dos REE nas amostras de sangue avaliadas no presente trabalho. Os resultados podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 - Determinação de REE em sangue após a MIC. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ),  $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS. Condições: 0,4 g de sangue e 6 mL de água régia concentrada.

Elemento	Concentração, $\text{ng g}^{-1}$					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	< 12,5	< 9,3	< 12,9	< 9,3	< 8,3	< 9,3
Dy	< 7,5	< 4,0	< 5,6	< 4,0	< 3,6	< 4,0
Er	< 6,3	< 3,3	< 4,7	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Eu	< 6,9	< 3,1	< 4,3	< 3,1	< 2,7	< 3,1
Gd	< 12,5	< 7,0	< 9,7	< 7,0	< 6,2	< 7,0
Ho	< 3,3	< 2,1	< 2,8	< 2,1	< 1,8	< 2,1
La	< 25,2	< 10,5	< 14,5	< 10,5	< 9,3	< 10,5
Lu	< 6,5	< 2,8	< 3,8	< 2,8	< 2,4	< 2,8
Nd	< 18,8	< 5,6	< 7,8	< 5,6	< 5,0	< 5,6
Pr	< 16,3	< 5,2	< 7,2	< 5,2	< 4,6	< 5,2
Sm	< 17,4	< 5,5	< 7,6	< 5,5	< 4,8	< 5,5
Tb	< 6,3	< 3,6	< 5,0	< 3,6	< 3,2	< 3,6
Tm	< 7,0	< 2,2	< 3,1	< 2,2	< 2,0	< 2,2
Y	< 25	< 9,1	< 12,6	< 9,1	< 8,1	< 9,1
Yb	< 7,5	< 4,1	< 5,7	< 4,1	< 3,6	< 4,1

Embora Ce, La e Nd na amostra C e Ce e La na amostra E estivessem acima do LOQ pelo método da MAWD-SRC, todos elementos ficaram abaixo do LOQ em todas as amostras após a aplicação do método da MIC (Tabela 17). Cabe destacar que os LOQs obtidos pelo método da MIC foram superiores aos obtidos pela CWD-CS e pela MAWD-SRC. Esse resultado foi vinculado ao uso do suporte de quartzo e pelo uso de reagentes concentrados.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE REE EM FÍGADOS APÓS MAWD-SRC

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de sangue humano, bovino e suíno. Essa amostras foram adquiridas dos mesmos animais que forneceram as amostras de sangue (amostras F e G). Ainda, foi adquirida uma amostra de fígado bovino (amostra H) para os estudos de interferências oriundos da matriz mostrados no presente trabalho (itens 4.3.6.3 e 4.4.3.2, *Resultados e Discussões*). Dessa forma,

foi feita a determinação dos REE nestas amostras após a MAWD-SRC. O procedimento de digestão está descrito no item 3.4.3 (*Materiais e Métodos*). Na tabela 18 esta mostrado os resultados obtidos após a digestão das amostras e a posterior determinação dos REE por USN-ICP-MS.

Tabela 18 - Determinação de REE em fígado bovino e suíno após MAWD-SRC. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $\text{ng g}^{-1}$ ),  $n = 5$ . Determinações feitas por USN-ICP-MS.

Elemento	Concentração, $\text{ng g}^{-1}$		
	Fígado F	Fígado G	Fígado H
Ce	$26,0 \pm 0,6$	$27,1 \pm 1,6$	$49,6 \pm 2,8$
Dy	< 15	< 15	< 15
Er	< 13	< 13	< 13
Eu	< 14	< 14	< 14
Gd	< 25	< 25	< 25
Ho	< 6,3	< 6,3	< 6,3
La	< 25	$25,6 \pm 0,5$	$32,8 \pm 1,3$
Lu	< 13	< 13	< 13
Nd	< 12	$14,7 \pm 0,9$	$15,1 \pm 0,4$
Pr	< 19	< 19	< 19
Sm	< 20	< 20	< 20
Tb	< 12	< 12	< 12
Tm	< 1,3	< 1,3	< 1,3
Y	< 10,0	< 10,0	< 10,0
Yb	< 3,0	< 3,0	< 3,0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, pode-se observar que Ce, La e Nd foram únicos elementos presentes nas amostras com concentrações superiores ao LOQ do método. De maneira geral, a concentração variou de  $14,7 \pm 0,9 \text{ ng g}^{-1}$  para Nd (amostra G) a  $49,6 \pm 2,8 \text{ ng g}^{-1}$  para Ce (amostra H). Além disso, pode-se observar que as concentrações de Ce foram superiores às concentrações de La que, por sua vez, foram superiores as de Nd para todas as amostras. É importante enfatizar que os LOQs para o fígado foram superiores aos LOQs obtidos para sangue utilizando o método da MAWD-SRC, visto que a

concentração de Na e K nas amostras de fígado são superiores, acarretando na necessidade de diluição das amostras previamente a determinação dos analitos.

Curiosamente, observou-se que para as amostras F e G (fígados bovino e suíno, respectivamente), apresentaram concentrações de Ce, La e Nd superiores ao LOQ do método quando comparadas as amostras de sangue D e E (sangue bovino e suíno, respectivamente). É importante mencionar que o sangue D e o fígado F são provenientes do mesmo animal (bovino), enquanto que, o sangue E e o fígado G, também, são provenientes do mesmo animal (suíno). Esses resultados podem indicar que, ao longo do tempo, os REE podem se depositar no fígado desses animais levando ao aumento de suas concentrações. É importante destacar que esses resultados apenas levam a um indicativo e estudos específicos são necessários para comprovar essa hipótese. No entanto, é sabido que o fígado é responsável por inúmeras funções no organismo, dentre elas, o metabolismo de macronutrientes, regulação do volume sanguíneo, controle endócrino das vias de sinalização de crescimento, homeostase e oxidação de lipídeos e colesterol<sup>134,135</sup>. Com isso, considerando essa variedade de funções, o fígado pode acumular os elementos que, por sua vez, não são facilmente eliminados<sup>134</sup>. Assim, possivelmente, além de outros metais o fígado possa, também acumular os REE.

#### **4.7 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO**

Com a utilização da técnica de USN-ICP-MS para a determinação dos REE, foram obtidos LOQs relativamente baixos ( $\text{ng g}^{-1}$ ) para os métodos de preparo de amostras avaliados. Os LOQs obtidos, expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ , foram calculados a partir do desvio padrão de 10 leituras do branco, levando em consideração a máxima massa de amostra utilizada e o volume final de aferição para cada método proposto.

É importante mencionar que, devido ao fato das amostras apresentarem concentrações de K e Na diferentes entre si, foram utilizadas massas de amostra distintas em cada método de preparo de amostra avaliado. Assim, os LOQs obtidos são diferentes para cada amostra, visto que a massa da amostra foi levada em consideração no cálculo. Os LOQs para cada amostra e em cada método de preparo proposto no presente estudo estão apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19 - Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após CWD-CS e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).

Elemento	Limites de quantificação, ng g <sup>-1</sup>					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	12,5	9,0	10,3	9,0	6,3	9,0
Dy	7,5	5,0	6,4	5,0	3,7	5,0
Er	6,3	4,2	5,2	4,2	3,2	4,2
Eu	6,9	4,5	5,5	4,5	3,4	4,5
Gd	12,5	8,3	10,1	8,3	6,3	8,3
Ho	3,3	2,1	2,8	2,1	1,6	2,1
La	25,2	16,6	10,4	16,6	6,3	16,6
Lu	6,5	4,3	5,2	4,3	3,3	4,3
Nd	18,8	12,5	8,6	12,5	5,0	12,5
Pr	16,3	10,8	7,6	10,8	4,8	10,8
Sm	17,4	12,5	8,3	12,5	5,2	12,5
Tb	6,3	4,3	5,0	4,3	3,2	4,3
Tm	7,0	2,0	2,4	2,0	1,6	2,0
Y	25	16,6	10,3	16,6	6,3	16,6
Yb	7,5	5,0	6,8	5,0	3,8	5,0



Tabela 20 - Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após MAWD-SRC e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).

Elemento	Limites de quantificação, ng g <sup>-1</sup>					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	12,5	6,3	8,6	6,3	5,6	6,3
Dy	7,5	3,7	5,1	3,7	3,3	3,7
Er	6,3	3,1	4,3	3,1	2,8	3,1
Eu	6,9	3,4	4,8	3,4	3,0	3,4
Gd	12,5	6,3	8,6	6,3	5,5	6,3
Ho	3,3	1,6	2,5	1,6	1,4	1,6
La	25,2	6,3	8,6	6,3	5,6	6,3
Lu	6,5	3,3	4,5	3,3	2,9	3,3
Nd	18,8	5,0	6,8	5,0	4,4	5,0
Pr	16,3	4,8	6,5	4,8	4,2	4,8
Sm	17,4	5,0	6,9	5,0	4,3	5,0
Tb	6,3	3,2	4,3	3,2	2,8	3,2
Tm	7,0	1,6	2,2	1,6	1,5	1,6
Y	25	6,3	8,6	6,3	5,6	6,3
Yb	7,5	3,8	5,1	3,8	3,3	3,8

Tabela 21 - Limites de quantificação obtidos por USN-ICP-MS após MIC e comparação com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD).

Elemento	Limites de quantificação, ng g <sup>-1</sup>					
	Método de referência*	Sangue A	Sangue B	Sangue C	Sangue D	Sangue E
Ce	12,5	< 9,3	< 12,9	< 9,3	< 8,3	< 9,3
Dy	7,5	< 4,0	< 5,6	< 4,0	< 3,6	< 4,0
Er	6,3	< 3,3	< 4,7	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Eu	6,9	< 3,1	< 4,3	< 3,1	< 2,7	< 3,1
Gd	12,5	< 7,0	< 9,7	< 7,0	< 6,2	< 7,0
Ho	3,3	< 2,1	< 2,8	< 2,1	< 1,8	< 2,1
La	25,2	< 10,5	< 14,5	< 10,5	< 9,3	< 10,5
Lu	6,5	< 2,8	< 3,8	< 2,8	< 2,4	< 2,8
Nd	18,8	< 5,6	< 7,8	< 5,6	< 5,0	< 5,6
Pr	16,3	< 5,2	< 7,2	< 5,2	< 4,6	< 5,2
Sm	17,4	< 5,5	< 7,6	< 5,5	< 4,8	< 5,5
Tb	6,3	< 3,6	< 5,0	< 3,6	< 3,2	< 3,6
Tm	7,0	< 2,2	< 3,1	< 2,2	< 2,0	< 2,2
Y	25	< 9,1	< 12,6	< 9,1	< 8,1	< 9,1
Yb	7,5	< 4,1	< 5,7	< 4,1	< 3,6	< 4,1

De uma forma geral, os LOQs obtidos pelos métodos de preparo de amostras foram inferiores aos obtidos pelo método de referência. Isso pode ser explicado, pela diferença entre as massas de amostra utilizadas em cada método de preparo de amostra. Cabe destacar que a MIC apresentou LOQs maiores dentre os demais métodos avaliados, seguida pela CWD-CS e pela MAWD-SRC. O método da MAWD-SRC foi o que apresentou os menores LOQs devido ao uso, principalmente de soluções diluídas ( $\text{HNO}_3$  1 mol L<sup>-1</sup>). Em relação às amostras B e D, estas apresentaram valores de LOQ para cada analito diferentes das amostras A, C e E, visto que foram utilizadas massas de sangue menores, em todos os métodos de preparo de amostras investigados (0,4 g para as amostras A, C e E, 0,29 g para a amostra B e 0,45 g para amostra D).

De maneira geral, é importante salientar que o objetivo do presente estudo não foi a avaliação da máxima massa de amostra a ser digerida e obtenção de menores LOQs possíveis, como ocorre para a maioria dos métodos de preparo de

amostras desenvolvidos. Neste caso, o principal objetivo foi o contorno de interferências intrínsecas da matriz para a determinação exata dos REE pela técnica em questão.

#### **4.8 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS**

Neste trabalho, foram avaliados quatro métodos de preparo de amostras para a digestão de sangue objetivando a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Durante o decorrer da avaliação, foi observado que o método da CWD-OS não foi considerado adequado, visto que não foi possível obter uma digestão eficiente do sangue. Na Tabela 22 pode ser observada uma comparação geral de alguns parâmetros operacionais obtidos após a otimização dos métodos de preparo de amostras investigados.

Tabela 22 – Comparação dos métodos de preparo de amostras investigados para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS.

Parâmetro	Métodos de preparo de amostras investigados		
	CWD-CS	MAWD-SRC	MIC
Massa de amostra digerida, g	0,4	0,4	0,4
Solução utilizada	5 mL de HNO <sub>3</sub> 3 mol L <sup>-1</sup> + 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	6 mL HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup>	6 mL de água régia concentrada
Teor de carbono em solução, mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>	250	< 25
Tempo de digestão, min	4 h e 20 min	2 h e 20 min	40
Frequência analítica, 6 h*	14 amostras	5 amostras	8 amostras

\*Considerando o tempo total de preparo e a etapa de descontaminação.

De acordo com os estudos desenvolvidos no presente estudo, é importante ressaltar que as condições otimizadas em cada método de preparo de amostra investigado são dependentes da massa máxima de sangue que foi possível digerir (0,4 g para as amostras A, C e E, 0,29 g para a amostra B e 0,45 g para amostra D) para minimizar interferências de K e Na durante a determinação dos REE por USN-ICP-MS. Após a otimização das condições experimentais, o método da CWD-CS mostrou-se ser o mais simples, embora seja o mais moroso, devido ao fato do resfriamento ser feito de maneira lenta. No método da CWD-CS foi feita a digestão de 0,4 g de sangue usando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Os teores de C nos digeridos foram de aproximadamente 1000 mg  $\text{L}^{-1}$  e não causaram interferências durante a determinação dos REE por USN-ICP-MS. Adicionalmente, foram obtidas recuperações maiores do que 90% para todos os analitos após a digestão por CWD-CS.

No método da MAWD-SRC foram digeridos 0,4 g de sangue com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , 270 °C e 15 min. A concentração de carbono em solução nos digeridos obtidos pela MAWD-SRC foi de, aproximadamente 250 mg  $\text{L}^{-1}$ . Cabe destacar a possibilidade do uso de soluções diluídas no método da MAWD-SRC, o que minimiza possíveis interferências durante a determinação dos REE por USN-ICP-MS. Adicionalmente, menores LOQs podem ser obtidos com o uso de soluções diluídas. No entanto, dentre os métodos avaliados, este é o que possui a menor frequência analítica.

A MIC, por sua vez, permite a obtenção de digeridos com baixo teor de C (< 25 mg  $\text{L}^{-1}$ ). Ainda, dentre as principais vantagens da MIC, destaca-se o menor tempo de preparo quando comparada aos demais métodos (aproximadamente 40 min). No entanto, foi necessário o uso de água régia para a absorção quantitativa dos analitos, o que por sua vez, pode acarretar no aumento dos LOQs. Ainda, o método da MIC pode ser considerado o mais custoso dentre os métodos avaliados, o que dificulta seu uso em grande parte dos laboratórios.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram investigados cinco métodos analíticos para a determinação de REE em sangue. Destes, um foi baseado na amostragem direta de amostras (ETV-ICP-MS), enquanto que os demais foram feitos usando a técnica de

USN-ICP-MS, com uma etapa prévia de preparo de amostra (CWD-OS, CWD-CS, MAWD-SRC e MIC). Durante o desenvolvimento destes métodos, buscou-se simplicidade, rapidez, uso reduzido de reagentes e, quando possível, optou-se pelo uso de soluções diluídas. Ainda, nestas avaliações buscou-se, principalmente, a obtenção de soluções compatíveis com a técnica analítica utilizada para a determinação dos REE em amostras de sangue.

O método empregando ETV-ICP-MS não foi considerado adequado para a determinação de REE em sangue, visto que foram observadas interferências durante a determinação dos analitos. Essas interferências foram associadas à instabilidade do plasma, possivelmente devido à presença de elementos concomitantes presentes na matriz (Fe, K e Na).

Devido aos problemas na amostragem direta de amostras, optou-se pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de REE em sangue por USN-ICP-MS. No entanto, previamente à etapa de medida, foram feitos estudos de interferências devidos aos elementos majoritários presentes em altas concentrações na matriz, como o caso de Fe, K e Na, além de C. Os experimentos foram feitos com solução de referência contendo os REE em concentrações de  $250 \text{ ng L}^{-1}$ . A partir dos resultados obtidos, foi observado que K e Na são elementos que causaram supressão de sinal dos REE quando presentes em concentrações relativamente baixas (a partir de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ).

No estudo do efeito do C na determinação dos REE por USN-ICP-MS, foi possível observar aumento da intensidade de sinal para todos os REE utilizando C oriundo do ácido cítrico e frutose (a partir de  $150$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente). Possivelmente, estes resultados possam ser explicados devido ao efeito de transporte causado pelo C (vapor seco após dessolvatação pelo USN). Por outro lado, não foi observado aumento da intensidade de sinal para os REE nas soluções contendo até  $3000 \text{ mg L}^{-1}$  de C oriundo dos digeridos de fígado bovino.

O efeito da concentração de  $\text{HNO}_3$ , HCl e água régia na determinação de REE por USN-ICP-MS também foi avaliado. Foi observado que o  $\text{HNO}_3$  é o principal ácido causador de interferências durante a determinação de REE por USN-ICP-MS. Neste caso, supressões de sinais para concentrações de  $\text{HNO}_3$  a partir de 15% (v/v) foram observadas. Por outro lado, efeitos de supressão causadas pela água régia em concentrações superiores a 25%, foram observados enquanto que, não foi

observado efeito de interferências usando o HCl, independente da concentração investigada (5 a 30%).

Adicionalmente, foi feito um planejamento fatorial variando as concentrações de Fe, K e Na para verificar se, o somatório das concentrações desses elementos causaria efeito de supressão de sinal durante a determinação dos REE por USN-ICP-MS. Assim, foi observado que  $50 \text{ mg L}^{-1}$  é o limite máximo da concentração de K e Na para não causar os efeitos de supressão dos REE. Ainda, outro planejamento fatorial foi feito com K, Na e C (a partir do ácido cítrico) para verificar qual efeito era predominante, visto que K e Na causaram efeitos de supressão e C efeito de aumento de sinal para os analitos. Para alguns analitos, como Ce, Gd e Pr, os resultados indicam que, o efeito da concentração dos de K e Na acaba prevalecendo sobre o efeito da concentração de C. No entanto, está é uma conclusão geral, e indica que cada amostra deve ser analisada com cautela, visto que estes elementos podem estar presentes em diversos níveis de concentrações.

Estudos adicionais de interferências, também, foram feitos usando a nebulização concêntrica e câmara de nebulização ciclônica. Observou-se que a técnica de ICP-MS com nebulização concêntrica é menos susceptível às interferências, sendo que os efeitos de supressão dos REE na presença de K e Na foram observados apenas a partir de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Por outro lado, não foi observado aumento na intensidade de sinal dos analitos para concentrações de C (a partir do ácido cítrico e digeridos de fígado bovino) de até  $3000 \text{ g L}^{-1}$ . No entanto, embora o USN aumente a possibilidade de interferências, é importante mencionar que a determinação de REE usando USN é importante, pois este minimiza a formação de óxidos.

De acordo com os estudos de interferência na determinação dos REE por USN-ICP-MS, estipulou-se que a massa máxima de amostra a ser utilizada nos métodos de preparo de amostras investigados seria de 0,4 g para as amostras A, C e E, 0,29 g para a amostra B e 0,45 g para a amostra D. Esse critério foi adotado para evitar interferências na determinação dos analitos pela técnica de USN-ICP-MS devido à presença de elevadas concentrações de Na e K nas amostras.

Em relação aos métodos de preparo de amostras, na CWD-OS foi observado que este método não foi adequado para a digestão de sangue, visto que não foi obtida uma digestão completa da matriz (presença de gordura sobrenadante e com

elevado teor de C ( $> 1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) mesmo usando  $\text{HNO}_3$   $14 \text{ mol L}^{-1}$ . O método da CWD-CS apresentou bom desempenho para a digestão de sangue usando 0,4 g de amostra, 5 mL de  $\text{HNO}_3$   $3 \text{ mol L}^{-1}$  + 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e 60 min a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Além disso, os digeridos foram compatíveis à técnica de USN-ICP-MS. Ainda, foram obtidas concordâncias superiores a 90% para os REE nos experimentos avaliação da exatidão do método.

O método da MAWD-SRC apresentou bom desempenho para a digestão de sangue usando 0,4 g de amostra, 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  e 15 min a  $270 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os digeridos foram compatíveis à técnica de USN-ICP-MS. Ainda, foram obtidas concordâncias superiores a 90% para os REE nos experimentos de avaliação da exatidão do método. O método da MIC, por sua vez, também foi considerado adequado para a digestão de sangue fornecendo digeridos com baixo teor de carbono em solução. Verificou-se que cada papel de DBS absorveu 0,17 g de sangue e 6 mL de água régia concentrada foi utilizada para absorção quantitativa dos analitos.

Por fim, levando em consideração todos os estudos feitos, pode-se verificar que para a determinação de REE em sangue, a melhor alternativa é o uso de um método de preparo de amostra adequado previamente à determinação dos REE por USN-ICP-MS. No entanto, é preciso ter cautela quanto a massa máxima de sangue a ser digerida devido as interferências causadas pelo K, Na e C em solução. Ainda, a escolha de um ou outro método de preparo de amostras irá depender da instrumentação disponível em cada laboratório, custos, frequência analítica e tempo total do procedimento.



## 6 REFERÊNCIAS

1. Spence, A. P. Anatomia humana básica, 2 ed., Manole, São Paulo, 1991, 713 p.
2. Rogers, K. Blood: physiology and circulation, Britannica Educational Publisher, New York, 2010, 239 p.
3. Lorenzi, T. F. Manual de hematologia: propedêutica e clínica, 4<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, 710 p.
4. Panichev, A. M. Rare Earth Elements: Review of Medical and Biological Properties and Their Abundance in the Rock Materials and Mineralized Spring Waters in the Context of Animal and Human Geophagia Reasons Evaluation, *Achievements in the Life Sciences* 9 (2015) 95-103.
5. d'Aquino, L., Morgana, M., Carboni, M. A., Staiano, M., Antisari, M. V., Re, M., Lorito, M., Vinale, F., Abadi, K. M., Woo, S. L. Effect of some rare earth elements on the growth and lanthanide accumulation in different Trichoderma strains, *Soil Biology and Biochemistry* 41 (2009) 2406-2413.
6. Rim, K. T., Koo, K. H., Park, J. S. Toxicological Evaluations of Rare Earths and Their Health Impacts to Workers: A Literature Review, *Safety and Health at Work* 4 (2013) 12-26.
7. Feng, L., Xiao, H., He, X., Li, Z., Li, F., Liu, N., Zhao, Y., Huang, Y., Zhang, Z., Chai, Z. Neurotoxicological consequence of long-term exposure to lanthanum, *Toxicology letters* 165 (2006) 112-120.
8. Sabbioni, E., Pietra, R., Gaglione, P., Vocaturo, G., Colombo, F., Zanoni, M., Rodi, F. Long-term occupational risk of rare-earth pneumoconiosis. A case report as investigated by neutron activation analysis, *The Science of the total environment* 26 (1982) 19-32.

9. Gaman, L., Radoi, M. P., Delia, C. E., Luzardo, O. P., Zumbado, M., Rodríguez-Hernández, Á., Stoian, I., Gilca, M., Boada, L. D., Henríquez-Hernández, L. A. Concentration of heavy metals and rare earth elements in patients with brain tumours: Analysis in tumour tissue, non-tumour tissue, and blood, *International Journal of Environmental Health Research* (2019) 1-14.
10. Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Antes, F. G., Diehl, L. O., Santos, M. F. P., Guimarães, R. C. L., Fonseca, T. C. O., Dressler, V. L., Flores, E. M. M. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.
11. Zhang, N., Huang, C., Hu, B. ICP-AES determination of trace rare earth elements in environmental and food samples by on-line separation and preconcentration with acetylacetone-modified silica gel using microcolumn, *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 23 (2007) 997-1002.
12. Yan, P., He, M., Chen, B., Hu, B. Fast preconcentration of trace rare earth elements from environmental samples by di(2-ethylhexyl)phosphoric acid grafted magnetic nanoparticles followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 136 (2017).
13. Druzian, G. T., Pereira, L. S. F., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. Rare earth element determination in heavy crude oil by USN-ICP-MS after digestion using a microwave-assisted single reaction chamber, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31 (2016) 1185-1191.

14. Aramendía, M., Resano, M., Vanhaecke, F. Electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A versatile tool for tackling challenging samples A critical review, *Analytica chimica acta* 648 (2009) 23-44.
15. Flores, E. M. M. Microwave-assisted sample preparation for trace element determination, Elsevier, 1<sup>a</sup> ed., Amsterdam, 2014, p.
16. Chen, S., Yan, J., Li, J., Lu, D. Magnetic ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanotubes for dispersive micro solid-phase extraction of trace rare earth elements prior to their determination by ICP-MS, *Microchimica Acta* 186 (2019).
17. Chen, S., Zhu, S., Lu, D. Titanium dioxide nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for on-line preconcentration and determination of trace rare earth elements by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchemical Journal* 110 (2013) 89-93.
18. Inagaki, K., Haraguchi, H. Determination of rare earth elements in human blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry after chelating resin preconcentration, *Analyst* 125 (2000) 191-196.
19. Costas, M., Lavilla, I., Gil, S., Pena, F., de la Calle, I., Cabaleiro, N., Bendicho, C. Evaluation of ultrasound-assisted extraction as sample pre-treatment for quantitative determination of rare earth elements in marine biological tissues by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analytica chimica acta* 679 (2010) 49-55.
20. Zaichick, S., Zaichick, V., Karandashev, V., Nosenko, S. Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan, *Metallomics* 3 (2011) 186-194.

21. Marzec-Wróblewska, U., Kamiński, P., Łakota, P., Ludwikowski, G., Szymański, M., Wasilow, K., Stuczyński, T., Buciński, A., Jerzak, L. Determination of Rare Earth Elements in Human Sperm and Association with Semen Quality, *Archives of environmental contamination and toxicology* 69 (2015) 191-201.
22. Ming, Y., Bing, L. Determination of rare earth elements in human hair and wheat flour reference materials by inductively coupled plasma mass spectrometry with dry ashing and microwave digestion<sup>1</sup>This paper was published in the Special Issue from the BCEIA Conference in Shanghai, China, in October 1997.<sup>1</sup>, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1447-1454.
23. Silva, J. S., Schneider Henn, A., Dressler, V. L., Mello, P. A., Flores, E. M. M. Feasibility of Rare Earth Element Determination in Low Concentration in Crude Oil: Direct Sampling Electrothermal Vaporization-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 7064-7071.
24. Fan, Z., Hu, B., Jiang, Z., Li, S. Low-temperature electrothermal vaporization of thenoyltrifluoroacetone complex of Sc(III) and Y(III) for sample introduction in an inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, and their determination in biological samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 456-459.
25. Buseth, E., Wibetoe, G., Martinsen, I. Determination of endogenous concentrations of the lanthanides in body fluids and tissues using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1039-1049.

26. Waechter, S. R. Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de sangue empregando sistemas de combustão e via úmida para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2017.
27. McKenzie, S. B. Clinical laboratory hematology, 2<sup>nd</sup> ed., Pearson, 2010 1080 p.
28. Silva, P. H. A., H. B. Comar, S. R., Henneberg, R. Merlin, J. C. Stinghen, S. T. Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos, Artmed, Porto Alegre,, 2016, 448 p.
29. Marty, E. M., R. M. Hematologia laboratorial, Erica, Brasil, 2015, 120 p.
30. Bates, I., Bain, B. J. Approach to the diagnosis and classification of blood diseases, *Dacie and Lewis Practical Haematology* (2006) 609-624.
31. Santos, P. C. J. L. Hematologia: métodos e interpretação, Roca, Brasil, 2013, 480 p.
32. Li, W. L., M.S. Dried blood spots: applications and techniques, Wiley, USA, 2014, 363 p.
33. Guthrie, R., Susi, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, *Pediatrics* 32 (1963) 338-343.
34. Diehl, L. O., Gatiboni, T. L., Mello, P. A., Muller, E. I., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. Ultrasound-assisted extraction of rare-earth elements from carbonatite rocks, *Ultrasonics Sonochemistry* 40 (2018) 24-29.
35. Costa, T. B. d., Silva, M. G. C. d., Vieira, M. G. A. Recovery of rare-earth metals from aqueous solutions by bio/adsorption using non-conventional

- materials: a review with recent studies and promising approaches in column applications, *Journal of Rare Earths* 38 (2020) 339-355.
36. Pereira, J. S. F., Pereira, L. S. F., Mello, P. A., Guimarães, R. C. L., Guarnieri, R. A., Fonseca, T. C. O., Flores, E. M. M. Microwave-induced combustion of crude oil for further rare earth elements determination by USN–ICP-MS, *Analytica chimica acta* 844 (2014).
37. Bayon, G., Barrat, J. A., Etoubleau, J., Benoit, M., Bollinger, C., Révillon, S. Determination of Rare Earth Elements, Sc, Y, Zr, Ba, Hf and Th in Geological Samples by ICP-MS after Tm Addition and Alkaline Fusion, *Geostandards and Geoanalytical Research* 33 (2009) 51-62.
38. Reka, D. T., V. Selvaraj P. Arivuchelvan, A. Effect of dietary REE supplementation on blood biochemical parameters in layer chicken, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (2018) 181-185.
39. Telgmann, L., Sperling, M., Karst, U. Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: a review, *Analytica chimica acta* 764 (2013) 1-16.
40. Lindner, U., Lingott, J., Richter, S., Jiang, W., Jakubowski, N., Panne, U. Analysis of gadolinium-based contrast agents in tap water with a new hydrophilic interaction chromatography (ZIC-chILIC) hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 407 (2015) 2415-2422.
41. Li, X., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, Y. A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China, *Chemosphere* 93 (2013) 1240-1246.

42. Ramos, S. J., Dinali, G. S., Oliveira, C., Martins, G. C., Moreira, C. G., Siqueira, J. O., Guilherme, L. R. G. Rare Earth Elements in the Soil Environment, *Current Pollution Reports* 2 (2016) 28-50.
43. Veiga, M., Mattiazzi, P., de Gois, J. S., Nascimento, P. C., Borges, D. L. G., Bohrer, D. Presence of other rare earth metals in gadolinium-based contrast agents, *Talanta* 216 (2020) 120940.
44. Nayfeh, M. H. Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerines: Current and Future Trends, Elsevier, Netherlands, 2018, p.
45. Hao, Z., Li, Y., Li, H., Wei, B., Liao, X., Liang, T., Yu, J. Levels of rare earth elements, heavy metals and uranium in a population living in Baiyun Obo, Inner Mongolia, China: A pilot study, *Chemosphere* 128 (2015) 161-170.
46. Zhang, H., Feng, J., Zhu, W., Liu, C., Xu, S., Shao, P., Wu, D., Yang, W., Gu, J. Chronic toxicity of rare-earth elements on human beings, *Biological Trace Element Research* 73 (2000) 1-17.
47. Li, Y., Yu, H., Zheng, S., Miao, Y., Yin, S., Li, P., Bian, Y. Direct Quantification of Rare Earth Elements Concentrations in Urine of Workers Manufacturing Cerium, Lanthanum Oxide Ultrafine and Nanoparticles by a Developed and Validated ICP-MS, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (2016) 350.
48. Rim, K. A book review; "Rare earth elements in human and environmental health; at the crossroads between toxicity and safety", *Journal of Applied Biological Chemistry* 60 (2017) 207-211.
49. Darrah, T. H., Prutsman-Pfeiffer, J. J., Poreda, R. J., Ellen Campbell, M., Hauschka, P. V., Hannigan, R. E. Incorporation of excess gadolinium into human bone from medical contrast agents, *Metallomics* 1 (2009) 479-488.

50. Zhuang, G., Zhou, Y., Lu, H., Lu, W., Zhou, M., Wang, Y., Tan, M. Concentration of rare earth elements, As, and Th in human brain and brain tumors, determined by neutron activation analysis, *Biological Trace Element Research* 53 (1996) 45-49.
51. Pagano, G., Guida, M., Tommasi, F., Oral, R. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements—Knowledge gaps and research prospects, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115 (2015) 40-48.
52. Pagano, G., Aliberti, F., Guida, M., Oral, R., Siciliano, A., Trifuoggi, M., Tommasi, F. Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities, *Environmental research* 142 (2015) 215-220.
53. Work, E. A. f. S. a. H. a. Priorities for occupational safety and health research in Europe: 2013-2020, 2013, p.
54. Druzian, G. T., Nascimento, M. S., Santos, R. F., Pedrotti, M. F., Bolzan, R. C., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. New possibilities for pharmaceutical excipients analysis: Combustion combined with pyrohydrolysis system for further total chlorine determination by ICP-OES, *Talanta* 199 (2019) 124-130.
55. Krug, F. J., Rocha, F. R. P. Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elementar, 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, 2016, p.
56. Mesko, M. F., Toralles, I. G., Coelho Junior, G. S., Rondan, F. S., Costa, V. C., Hartwig, C. A., Scaglioni, P. T. Ion chromatography coupled to mass spectrometry as a powerful technique for halogens and sulfur determination in egg powder and its fractions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 34 (2020) e8775.
57. Novo, D. L. R., Henn, A. S., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. Feasibility of microwave-induced combustion combined with inductively coupled plasma



- mass spectrometry for bromine and iodine determination in human nail, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 34 (2020) e8675.
58. Mesko, M. F., Toralles, I. G., Hartwig, C. A., Coelho, G. S., Muller, A. L. H., Bizzi, C. A., Mello, P. A. Bromine and Iodine Contents in Raw and Cooked Shrimp and Its Parts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (2016) 1817-1822.
59. Mello, P. A., Pereira, J. S. F., Mesko, M. F., Barin, J. S., Flores, E. M. M. Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil—A review, *Analytica chimica acta* 746 (2012) 15-36.
60. Nóbrega, J. A., Santos, M. C., de Sousa, R. A., Cadore, S., Barnes, R. M., Tatro, M. Sample preparation in alkaline media, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61 (2006) 465-495.
61. Prasada Rao, T., Kala, R. On-line and off-line preconcentration of trace and ultratrace amounts of lanthanides, *Talanta* 63 (2004) 949-959.
62. Lum, T.-S., Tsoi, Y.-K., Leung, K. S.-Y. Current developments in clinical sample preconcentration prior to elemental analysis by atomic spectrometry: a comprehensive literature review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 234-241.
63. Shabani, M. B., Akagi, T., Shimizu, H., Masuda, A. Determination of trace lanthanides and yttrium in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after preconcentration with solvent extraction and back-extraction, *Analytical Chemistry* 62 (1990) 2709-2714.
64. Depoi, F. d. S., Bentlin, F. R. S., Ferrão, M. F., Pozebon, D. Multivariate optimization for cloud point extraction and determination of lanthanides, *Analytical Methods* 4 (2012) 2809-2814.

65. Giakissikli, G., Zachariadis, P., Kila, I., Teshima, N., Anthemidis, A. Flow Injection Solid Phase Extraction for Trace Metal Determination Using a Chelating Resin and Flame Atomic Absorption Spectrometry Detection, *Analytical Letters* 49 (2016) 929-942.
66. Fujimori, E., Hayashi, T., Inagaki, K., Haraguchi, H. Determination of lanthanum and rare earth elements in bovine whole blood reference material by ICP-MS after coprecipitation preconcentration with heme-iron as coprecipitant, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363 (1999) 277-282.
67. Leme, F. O., Lima, L. C., Papai, R., Akiba, N., Batista, B. L., Gaubeur, I. A novel vortex-assisted dispersive liquid-phase microextraction procedure for preconcentration of europium, gadolinium, lanthanum, neodymium, and ytterbium from water combined with ICP techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33 (2018) 2000-2007.
68. Sereshti, H., Entezari Heravi, Y., Samadi, S. Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES, *Talanta* 97 (2012) 235-241.
69. Chen, S., Cheng, X., He, Y., Zhu, S., Lu, D. Determination of the rare earth elements La, Eu, and Yb using solidified floating organic drop microextraction and electrothermal vaporization ICP-MS, *Microchimica Acta* 180 (2013) 1479-1486.
70. Arruda, M. A. Z. Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, New York, 2006, 8 p.
71. Pinheiro, F. C., Barros, A. I., Nóbrega, J. A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in

compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be?, *Analytica chimica acta* 1065 (2019) 1-11.

72. Cerveira, C., Hermann, P. R. S., Pereira, J. S. F., Pozebon, D., Mesko, M. F., Moraes, D. P. Evaluation of microwave-assisted ultraviolet digestion method for rice and wheat for subsequent spectrometric determination of As, Cd, Hg and Pb, *Journal of Food Composition and Analysis* 92 (2020) 103585.
73. Krzyzaniak, S. R., Iop, G. D., Holkem, A. P., Flores, E. M. M., Mello, P. A. Determination of inorganic contaminants in carbon nanotubes by plasma-based techniques: Overcoming the limitations of sample preparation, *Talanta* 192 (2019) 255-262.
74. Bizzi, C. A., Flores, E. L. M., Nobrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mortari, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 332-338.
75. Knapp, G. Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration, *Microchimica Acta* 104 (1991) 445-455.
76. Barclay, D. Microwave digestion. Moves to 21<sup>st</sup> century, Today's chemist at work, American Chemical Society, USA, 2004, p.
77. Nascimento, M. S. Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de metais alcalinos, alcalino-terrosos e halogênios em petróleo, Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2020, p.
78. Anton Paar, Áustria, Multiwave 3000<sup>®</sup>, Microwave Sample Preparation. Disponível em: <http://www.anton-paar.com/br-pt/>. disponível em: acessado em

79. Srl., M. UltraWAVE, operator manual, 2013, p.
80. Anton Paar, Áustria, Multiwave 7000<sup>®</sup>, Microwave Sample Preparation. Disponível em: <http://www.anton-paar.com/br-pt/>. p.
81. Mendes, A. L. G., Nascimento, M. S., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., Mello, P. A. A sample preparation method for fluoride detection by potentiometry with ion-selective electrode in medicinal plants, *Journal of Fluorine Chemistry* 231 (2020) 109459.
82. Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Barin, J. S., Knapp, G. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.
83. Krzyzaniak, S. R., Santos, R. F., Dalla Nora, F. M., Cruz, S. M., Flores, E. M. M., Mello, P. A. Determination of halogens and sulfur in high-purity polyimide by IC after digestion by MIC, *Talanta* 158 (2016) 193-197.
84. Nascimento, M. S., Mendes, A. G., Henn, A. S., Picoloto, R. S., Mello, P. A., Flores, E. M. M. Accurate determination of bromine and iodine in medicinal plants by inductively coupled plasma-mass spectrometry after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 138 (2017).
85. Rondan, F. S., Henn, A. S., Mello, P. A., Perez, M., Bullock, L. A., Parnell, J., Feldmann, J., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. Determination of Se and Te in coal at ultra-trace levels by ICP-MS after microwave-induced combustion, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34 (2019) 998-1004.
86. Dalla Nora, F. M., Cruz, S. M., Giesbrecht, C. K., Knapp, G., Wiltsche, H., Bizzi, C. A., Barin, J. S., Flores, E. M. M. A new approach for the digestion of

- diesel oil by microwave-induced combustion and determination of inorganic impurities by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 408-414.
87. Henn, A. S., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Mesko, M. F., Feldmann, J., Mello, P. A. Feasibility of As, Sb, Se and Te determination in coal by solid sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33 (2018) 1384-1393.
88. Li, Y., Hu, B. Cloud point extraction with/without chelating agent on-line coupled with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of trace rare earth elements in biological samples, *Journal of Hazardous Materials* 174 (2010) 534-540.
89. Bettinelli, M., Spezia, S., Terni, C., Ronchi, A., Balducci, C., Minoia, C. Determination of rare earth elements in urine by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (2002) 579-584.
90. Tariq, M. Synthesis and Characterization of Some New Azo Dyes Derivatives Via Chalcone and Study Some of Their Biological Activity, *Baghdad Science Journal* 13 (2018) 122-132.
91. Fujimori, E., Tomosue, Y., Haraguchi, H. Determination of rare earth elements in blood serum reference sample by chelating resin preconcentration and inductively coupled plasma mass spectrometry, *The Tohoku journal of experimental medicine* 178 (1996) 63-74.
92. Wu, S., Hu, C., He, M., Chen, B., Hu, B. Capillary microextraction combined with fluorinating assisted electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of trace

- lanthanum, europium, dysprosium and yttrium in human hair, *Talanta* 115 (2013) 342-348.
93. Zhang, N., Zheng, J. Fully automated focused infrared microashing combined with use of ICP-based instruments for rapid analysis of multiple elements in biological samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 1489-1499.
94. Dressler, V. L., Pozebon, D., Matusch, A., Becker, J. S. Micronebulization for trace analysis of lanthanides in small biological specimens by ICP-MS, *International Journal of Mass Spectrometry* 266 (2007) 25-33.
95. Zhang, L., Chen, B., He, M., Hu, B. Polymer monolithic capillary microextraction combined on-line with inductively coupled plasma MS for the determination of trace rare earth elements in biological samples, *Journal of separation science* 36 (2013) 2158-2167.
96. Höllriegl, V., González-Estecha, M., Trasobares, E. M., Giussani, A., Oeh, U., Herraiz, M. A., Michalke, B. Measurement of cerium in human breast milk and blood samples, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 24 (2010) 193-199.
97. Leclercq, A., Nonell, A., Todolí, J. L. T., Bresson, C., Vio, L., Vercouter, T., Chartier, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations, *Analytica chimica acta* 885 (2015) 57-91.
98. Li, Z., Yang, Y., Liu, J., Pan, J., Tang, J. Novel sensitive and selective method for spectrophotometric determination of cerium (III) in biological samples using

2,6-dibromo-4-chlorocarboxyarsenazo, *Analytical Letters* 35 (2002) 1959-1975.

99. Elgendy, K., El-didamony, A., Abd El-wahaab, B. Analytical applications using spectrophotometric technique for the determination of uranium (VI), samarium (III) and cerium (III) by new organic reagent, *Journal of the Iranian Chemical Society* 17 (2020) 1317-1327.
100. Ganjali, M. R., Norouzi, P., Faridbod, F., Hajiabdollah, N., Larijani, B., Hanifehpour, Y. Procaine as a Sensing Material for Determination of Dysprosium(III) Ions in Presence of Other Rare-earth Elements in Biological and Environmental Samples, *Analytical Letters* 40 (2007) 2544-2561.
101. He, M., Hu, B., Chen, B., Jiang, Z. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for rare earth elements analysis, 2017, pp. 145-196.
102. May, T. W., Wiedmeyer, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 150-155.
103. Becker, J. S. Inorganic mass spectrometry, principles and applications, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, p.
104. Adeyemo, D. J., Umar, I. M., Funtua, I. I., Thomas, S. A., Agbaji, E. B. Trace Multielement Content of Some Crude Oils by Instrumental Neutron Activation Analysis Techniques, *Instrumentation Science & Technology* 32 (2004) 681-687.
105. Orvini, E., Speziali, M. Applicability and limits of instrumental neutron activation analysis: state of the art in the year 2000, *Microchemical Journal* 59 (1998) 160-172.
106. Mello, P. A., Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Knapp, G. Nickel, vanadium and sulfur determination by inductively coupled

- plasma optical emission spectrometry in crude oil distillation residues after microwave-induced combustion, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009).
107. Grotti, M., Todolí, J.-L. Nitric acid effect in inductively coupled plasma mass spectrometry: new insights on possible causes and correction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 35 (2020) 1959-1968.
  108. Brenner, I. B., Segal, I., Mermet, M., Mermet, J. M. Study of the depressive effects of nitric acid on the line intensities of rare earth elements in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50 (1995) 333-340.
  109. Todolí, J.-L., Mermet, J.-M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta* 54 (1999) 895.
  110. Dulski, P. Interferences of oxide, hydroxide and chloride analyte species in the determination of rare earth elements in geological samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 350 (1994) 194-203.
  111. Ardini, F., Soggia, F., Rugi, F., Udisti, R., Grotti, M. Comparison of inductively coupled plasma spectrometry techniques for the direct determination of rare earth elements in digests from geological samples, *Analytica chimica acta* 678 (2010) 18-25.
  112. Bentlin, F. R. S., Pozebon, D. Direct determination of lanthanides in environmental samples using ultrasonic nebulization and ICP OES, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21 (2010) 627-634.
  113. Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in



inductively coupled plasma–mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

114. Cao, X., Yin, M., Wang, X. Elimination of the spectral interference from polyatomic ions with rare earth elements in inductively coupled plasma mass spectrometry by combining algebraic correction with chromatographic separation, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 431-441.
115. Prohaska, T., Hann, S., Latkoczy, C., Stingeder, G. Determination of rare earth elements U and Th in environmental samples by inductively coupled plasma double focusing sectorfield mass spectrometry (ICP-SMS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 1-8.
116. Montaser, A., Minnich, M. G., McLean, J. A., Liu, H.,. Inductively coupled plasma mass spectrometry, Wiley-VCH, Washington, 1998, p.
117. Belarra, M. A., Resano, M., Vanhaecke, F., Moens, L. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 828-839.
118. Vanhaecke, F., Resano, M., Moens, L. Electrothermal Vaporisation ICP-mass Spectrometry (ETV-ICP-MS) for the Determination and Speciation of Trace Elements in Solid Samples - A Review of Real-life Applications from the Author's Lab, *Analytical and bioanalytical chemistry* 374 (2002) 188-195.
119. Resano, M., Vanhaecke, F., de Loos-Vollebregt, M. T. C. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23 (2008) 1450-1475.

120. Silva, J. S. Determinação de elementos terras raras em petróleo e resíduos de destilação por amostragem direta de sólidos e ICP-MS com vaporização eletrotérmica, Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria-RS, 2017, p.
121. Mello, P. A., Pedrotti, M. F., Cruz, S. M., Muller, E. I., Dressler, V. L., Flores, E. M. M. Determination of rare earth elements in graphite by solid sampling electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 2048-2055.
122. Pinto, F. G., Lepri, F. G., Saint'Pierre, T. D., da Silva, J. B. B., Costa, L. M., Curtius, A. J. Direct Determination of Dy, Sm, Eu, Tm, and Yb in Geological Samples by Slurry Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Letters* 43 (2010) 949-959.
123. Xiang, G., Jiang, Z., He, M., Hu, B. Direct determination of trace rare earth elements in ancient porcelain samples with slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 60 (2005) 1342-1348.
124. Hu, B., Li, S., Xiang, G., He, M., Jiang, Z. Recent Progress in Electrothermal Vaporization–Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Applied Spectroscopy Reviews* 42 (2007) 203-234.
125. Machado, R. C., Andrade, D. F., Babos, D. V., Castro, J. P., Costa, V. C., Sperança, M. A., Garcia, J. A., Gamela, R. R., Pereira-Filho, E. R. Solid sampling: advantages and challenges for chemical element determination—a critical review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 35 (2020) 54-77.

126. Mattos, J. C. P., Nunes, A. M., Martins, A. F., Dressler, V. L., Flores, E. M. M. Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 60 (2005) 687-692.
127. Kántor, T. Sample introduction with graphite furnace electrothermal vaporization into an inductively coupled plasma: effects of streaming conditions and gaseous phase additives, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 431-448.
128. Yin, J., Hu, B., He, M., Jiang, Z. Determination of trace rare earth elements in environmental samples by low temperature electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry after synergistic extraction with dimethylheptyl methyl phosphate and 1-phenyl-3-methyl-4-benzoyl-pyrazalone-5, *Analytica chimica acta* 594 (2007) 61-68.
129. Pereira, J. S. F. Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de petróleo e posterior determinação de elementos terras raras por ICP-MS, Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria-RS, 2011, p.
130. Nóbrega, J. A., Pirola, C., Fialho, L. L., Rota, G., de Campos Jordão, C. E. K. M. A., Pollo, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become?, *Talanta* 98 (2012) 272-276.
131. Picoloto, R. S. Determinação de halogênios em amostras biológicas por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2014, p.

132. Schmidt, L., Landero, J. A., Novo, D. L. R., Duarte, F. A., Mesko, M. F., Caruso, J. A., Flores, E. M. M. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS, *Food Chemistry* 255 (2018) 340-347.
133. Hajeb, P., Sloth, J. J., Shakibazadeh, S., Mahyudin, N. A., Afsah-Hejri, L. Toxic Elements in Food: Occurrence, Binding, and Reduction Approaches, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13 (2014) 457-472.
134. Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D. H. The liver, *Curr Biol* 27 (2017) R1147-R1151.
135. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R. Heavy metals and living systems: An overview, *Indian J Pharmacol* 43 (2011) 246-253.
136. Haddy, F. J., Vanhoutte, P. M., Feletou, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290 (2006) R546-552.
137. Cormick, G., Belizán, J. M. Calcium Intake and Health, *Nutrients* 11 (2019) 1606.
138. Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., Tissot, J. D. Physiology of Iron Metabolism, *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 41 (2014) 213-221.
139. Enders, M. S. P., Gomes, A. O., Oliveira, R. F., Guimarães, R. C. L., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., Muller, E. I. Determination of Chlorine in Crude Oil by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry Using AlCl, InCl, and SrCl Molecules, *Energy & Fuels* 30 (2016) 3637-3643.

140. Dean, J. A. L., N. A. Lange's Handbook of Chemistry, 16 ed., McGrawHill, New York, 2005, 1608 p.
141. Fraser, M. M., Beauchemin, D. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.
142. Venable, J., Holcombe, J. Signal enhancements produced from externally generated 'carrier' particles in electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 753-766.
143. Pardino, R. B., Dalla Vecchia, P., Mendes, A. L. G., Bizzi, C. A., Mello, P. A., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O<sub>2</sub> pressure, *Food Chem* 263 (2018) 37-41.
144. Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health, *J Res Med Sci* 19 (2014) 164-174.
145. Novo, D., La Rosa, Pereira, R. M., Henn, A. S., Costa, V. C., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques?, *Analytica chimica acta* 1060 (2019) 45-52.
146. Stewart, I., W. Olesik, J. Transient acid effects in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 843-854.

147. Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K.-i., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K., Mizunoe, Y. A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach, *Scientific Reports* 3 (2013) 3081.
148. Enders, M. S. P., Anschau, K. F., Doneda, M., Druzian, G. T., Gomes, A. O., Guimaraes, R. C. L., Flores, E. M. M., Muller, E. I. Characterization of inorganic solids present in brazilian crude oil emulsions using Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy-Dispersive X-ray Spectrometry (EDS): Evaluation of the effect of solvents, *Energy & Fuels* (2020).
149. Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Moraes, D. P., Duarte, F. A., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 554-558.
150. Novo, D. L. R., Mello, J. E., Rondan, F. S., Henn, A. S., Mello, P. A., Mesko, M. F. Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method, *Talanta* 191 (2019) 415-421.
151. Atkins, P., Duward F. S. Química inorgânica, 4<sup>a</sup> ed., Bookman, Porto Alegre, 2008, p.