



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS  
INORGÂNICAS EM SUPLEMENTOS  
DE FERRO POR DSS-GF AAS**

---

**Daniela Dal Molin**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS  
INORGÂNICAS EM SUPLEMENTOS  
DE FERRO POR DSS-GF AAS**

---

**por**

**Daniela Dal Molin**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Química da Universidade  
Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial  
para a obtenção do grau de **Mestre em**  
**Química Analítica**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**18 de janeiro de 2010**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS INORGÂNICAS EM  
SUPLEMENTOS DE FERRO POR DSS-GF AAS**

elaborada por

**Daniela Dal Molin**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM - RS)**

---

**Valderi Luiz Dressler – (UFSM - RS)**

---

**Edson Irineu Müller – (UFSM - RS)**

**Santa Maria, 18 de janeiro de 2010**

## AGRADECIMENTOS

---

---

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Érico, pela orientação, pelos ensinamentos e fundamental ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Valderi, pela disponibilidade de esclarecer as dúvidas e aos ensinamentos transmitidos durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Drs. Edson e Juliano pela ajuda e pelas valiosas sugestões para a concretização deste trabalho.

Ao Luiz Frederico, por todos os ensinamentos, ajuda, paciência e amizade demonstrada durante este trabalho.

Ao Júlio, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Fábio, Marcelo e a Paola, pela grande ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos integrantes do Setor de Química Industrial e Ambiental, pelas contribuições para este trabalho.

A Professora Dr. Sibeles da Universidade Regional Integrada (URI), pelas análises realizadas no Laboratório da UFRGS e contribuições para este trabalho.

Aos funcionários Ademir e Valéria, pela atenção apresentada.

Aos meus queridos amigos, Fabiane, Lucélia, Fernando, Jocelene, Camila, Aline e Clarissa pela amizade, incentivo e carinho demonstrado.

Ao Cristian, pelo apoio incondicional, carinho, paciência, incentivo e companheirismo.

Aos meus queridos pais, pelo carinho, amor, incentivo e apoio durante esta fase importantíssima da minha vida.

## SUMÁRIO

---

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xx</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Impurezas em produtos farmacêuticos.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Toxicidade de metais pesados.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Metais pesados em produtos farmacêuticos.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Métodos oficiais para controle de metais pesados em produtos farmacêuticos.....</b>	<b>9</b>
2.4.1. Teste limite para metais pesados nas farmacopéias.....	10
<b>2.5. Ferro tris-glicina quelato.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Controle de metais pesados por espectrometria de absorção atômica.....</b>	<b>16</b>
2.6.1. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).....	18
2.6.1.1. Amostragem direta de sólidos empregando a GF AAS.....	19
2.6.1.2 Sistemas de introdução de amostras sólidas em GF AAS.....	20

2.6.1.3 Calibração.....	21
2.6.1.4 Precisão nas determinações por DSS-GF AAS.....	24
2.6.1.4.1. Homogeneidade das amostras.....	24
2.6.1.4.2 Tamanho de partícula e Influência na localização do analito.....	27
2.6.1.4.3 Massa de amostra.....	27
2.6.1.5. Extensão da faixa de trabalho em DSS-GF AAS.....	28
2.6.1.6. Principais técnicas de correção de interferências empregadas na GF AAS.....	29
2.6.1.7.1 Correção do sinal de fundo por efeito Zeeman.....	30
2.6.1.8. Modificadores químicos.....	39
2.6.1.8.1. Mecanismo de ação dos modificadores químicos HNO <sub>3</sub> e ácido oxálico.....	41
2.6.1.8.2. Modificadores químicos orgânicos.....	42
2.6.1.8.3. Modificadores químicos baseados no grupo da platina.....	45
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Instrumentação.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Reagentes.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Materiais diversos.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Amostras.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5. Procedimento de decomposição.....</b>	<b>54</b>
3.5.1. Decomposição assistida por microondas em sistema fechado.....	54
<b>3.6. Procedimentos para determinação dos elementos.....</b>	<b>55</b>

3.6.1. Determinação de metais por DSS-GF AAS.....	55
3.6.1.1 Curvas de pirólise e atomização .....	55
3.6.2. Determinação de metais por ICP OES e ICP-MS.....	58
3.6.3. Comparação estatística dos resultados obtidos por DSS-GF AAS e pelas diferentes técnicas comparativas.....	60
3.7. Análise das plataformas de grafite por espectrometria de fluorescência de raios-X (EDX).....	60
<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Estudo das interferências da amostra de ferro aminoácido quelato na GF AAS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Comportamento térmico da amostra de ferro aminoácido quelato.....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Otimização da temperatura de pirólise e atomização.....	66
4.2.1.1. Otimização do programa de aquecimento para níquel.....	67
4.2.1.2 Otimização do programa de aquecimento para cromo.....	70
4.2.1.3. Otimização do programa aquecimento para manganês.....	72
4.2.1.4 Otimização do programa de aquecimento para antimônio.....	74
4.2.1.5. Otimização do programa de aquecimento para arsênio.....	75
4.2.1.6. Otimização do programa de aquecimento para chumbo.....	77
4.2.1.7 Otimização do programa de aquecimento para prata.....	82
<b>4.3. Sinais analíticos.....</b>	<b>86</b>
<b>4.4. Efeito da massa de amostra e linearidade.....</b>	<b>89</b>

<b>4.5. Análise das amostras.....</b>	<b>102</b>
<b>4.6. Resultados e parâmetros de mérito.....</b>	<b>105</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>110</b>
<b>6.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

---



---

<b>Figura 1.</b> Estrutura do ferro tris-glicina quelato.....	15
<b>Figura 2.</b> Acessórios para a DSS-GF AAS: (a) Sistema manual SSA 5, introdução da plataforma de grafite com amostra para o interior do atomizador com uma pinça metálica; (b) Amostrador automático (SSA 62) para transferência automática da plataforma contendo a amostra para o atomizador. (Cortesia Analytik Jena AG, Jena, Alemanha).....	21
<b>Figura 3.</b> Ilustração da influência da homogeneidade na determinação de um analito (•): (a) amostragem com grande massa e (b) amostragem com pequena massa. (Figura adaptada de Nomura <i>et.al.</i> <sup>59</sup> ) .....	25
<b>Figura 4.</b> Efeito Zeeman normal. A: desdobramento em níveis de energia; B: desdobramento nas linhas espectrais. (Figura adaptada de Welz <sup>75</sup> ).....	31
<b>Figura 5.</b> Efeito Zeeman transversal (campo magnético perpendicular ao feixe de radiação) e efeito Zeeman longitudinal (campo magnético paralelo à fonte de radiação), (figura adaptada de Welz <sup>75</sup> ).....	33
<b>Figura 6.</b> (A) representação da ligação química formada entre o Pd e a grafite, (B) ativação do Pd pela sua interação na grafite, que desta maneira atua como doador de elétrons para outros metais (Adaptado de Ortner <i>et. al.</i> <sup>93</sup> ).....	47
<b>Figura 7.</b> Fluxograma com os procedimentos empregados para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato.....	61
<b>Figura 8.</b> Registro microfotográfico da plataforma de grafite com as partículas depositadas; (A) plataforma com várias partículas formadas após o ciclo de aquecimento desta com a amostra; (B) detalhe da superfície de partícula removida da plataforma.....	62

- Figura 9.** Espectro obtido pela análise de espectrometria de fluorescência de raios-X das partículas removidas da plataforma após ciclos de aquecimento (secagem 120 °C, pirólise 800 °C e atomização 2400 °C)..... 63
- Figura 10.** Sinal obtido após o aquecimento da plataforma vazia contendo as partículas depositadas..... 63
- Figura 11.** Plataforma de grafite com amostra de ferro aminoácido quelato (5 mg de amostra): (A) plataforma com amostra antes do aquecimento; (B) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento (secagem 120 °C por 30 s, pirólise 800 °C por 30 s e atomização 2400 °C por 8 s); (C) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de água; (D) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de ácido oxálico 5% m/v; (E) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de ácido nítrico 10% v/v..... 64
- Figura 12.** Perda de massa do ferro aminoácido quelato a partir da plataforma com o aumento de temperatura de pirólise..... 66
- Figura 13.** Curvas de pirólise e atomização para níquel: ■ amostra sólida; ◆ solução aquosa (10 ng de níquel). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n =3)..... 69
- Figura 14.** Variação do sinal de fundo para Ni em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,5 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 69
- Figura 15.** Curvas de pirólise e atomização para cromo: ■ amostra; ◆ solução aquosa (30 ng de cromo). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 71
- Figura 16.** Variação do sinal de fundo para Cr em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,4 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 72

- Figura 17.** Curvas de pirólise e atomização para manganês: ■ amostra; ◆ solução aquosa (40 ng de manganês). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 73
- Figura 18.** Variação do sinal de fundo para Mn em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,5 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 74
- Figura 19.** Curvas de pirólise e atomização para antimônio: ■ amostra; ◆ solução aquosa (1 ng de antimônio). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3) 75
- Figura 20.** Curvas de pirólise e atomização para arsênio: ■ amostra; ◆ solução aquosa (1 ng de arsênio). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 76
- Figura 21.** Variação do sinal de fundo para As em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,3 a 0,5 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 77
- Figura 22.** Curvas de pirólise e atomização para chumbo: ■ amostra; ◆ solução aquosa (0,4 ng de chumbo). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 78
- Figura 23.** Variação do sinal de fundo para Pb em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,8 a 1,1 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3). ..... 79
- Figura 24.** Curvas de pirólise e atomização para chumbo: ◆ solução aquosa (0,4 ng de chumbo); ▲ - solução aquosa (0,4 ng de chumbo e 4 µg de Pd); ■ amostra sólida; ▲ - amostra sólida (contendo 4 µg Pd). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 81

- Figura 25.** Variação do sinal de fundo para Pb em altura: ◆ solução aquosa (0,4 ng de chumbo); ▲ solução aquosa (0,4 ng de chumbo e 4 µg de Pd); ■ amostra sólida, utilizando massas de amostra entre 0,8 a 1,1 mg; ▲ amostra sólida (contendo 4 µg Pd), utilizando massas de amostra entre 0,5 a 1,0 mg. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 81
- Figura 26.** Curvas de pirólise e atomização para prata: ■ amostra; ◆ solução aquosa (0,025 ng de prata). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n= 3)..... 83
- Figura 27.** Variação do sinal de fundo para Ag em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,5 a 0,7 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 83
- Figura 28.** Curvas de pirólise e atomização para prata: ◆ solução aquosa (0,025 ng de prata); ▲ solução aquosa (0,025 ng de prata e 4 µg de Pd); ■ amostra sólida; ▲ amostra sólida (contendo 4 µg Pd). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 85
- Figura 29.** Variação do sinal de fundo para Ag em altura: ◆ solução aquosa (0,025 ng de prata); ▲ solução aquosa (0,025 ng de prata e 4 µg de Pd); ■ amostra sólida, utilizando massas de amostra entre 0,5 a 0,7 mg; ▲ amostra sólida (contendo 4 µg Pd), utilizando massas de amostra entre 0,4 a 0,8 mg. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3)..... 85
- Figura 30.** Perfil dos sinais analíticos na amostra sólida (-), perfil dos sinais analíticos na solução de referência aquosa (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-) e perfil do sinal de fundo na solução de referência aquosa (-)..... 88
- Figura 31.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Cr. ◆ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 90

- Figura 32.** Faixa linear para Cr em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de cromo; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear..... 91
- Figura 33.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Ni. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 92
- Figura 34.** Faixa linear para Ni em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de níquel; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear..... 92
- Figura 35.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Mn. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 93
- Figura 36.** Faixa linear para Mn em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de manganês; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear..... 94
- Figura 37.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Sb. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 95

- Figura 38.** Perfil do sinal do antimônio na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 0,9 mg..... 95
- Figura 39.** Faixa linear para Sb em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de antimônio; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (----) limite da faixa linear..... 96
- Figura 40.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de As. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 97
- Figura 41.** Faixa linear para As em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de arsênio; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (----) limite da faixa linear..... 98
- Figura 42.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Pb. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 99
- Figura 43.** Perfil do sinal do chumbo na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 2,7 mg..... 99

- Figura 44.** Faixa linear para Pb em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de chumbo; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear..... 100
- Figura 45.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Ag. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas..... 101
- Figura 46.** Perfil do sinal da prata na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 1,9 mg..... 101
- Figura 47.** Faixa linear para Ag em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de prata; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear..... 102

## LISTA DE TABELAS

---

---

<b>Tabela 1.</b> Configurações de aplicação do efeito Zeeman na correção de fundo por AAS.....	35
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros operacionais para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb em amostras de ferro aminoácido quelato.....	51
<b>Tabela 3.</b> Programa de irradiação de microondas empregado para decomposição da amostras.....	54
<b>Tabela 4.</b> Programa de aquecimento empregado para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn em ferro aminoácido quelato.....	57
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros operacionais utilizados na quantificação dos elementos por ICP OES e ICP-MS.....	59
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros da curva de calibração obtidos com solução de referência aquosa para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Sb e Pb.....	104
<b>Tabela 7.</b> Concentração de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato por DSS-GF AAS.....	105
<b>Tabela 8.</b> Limites de metais em suplementos alimentares.....	106
<b>Tabela 9.</b> Constante de homogeneidade obtida para os analitos por DSS-GF AAS nas amostras de ferro aminoácido quelato.....	107
<b>Tabela 10.</b> Resultados da determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb na amostra de ferro aminoácido quelato (FAQ2).....	108
<b>Tabela 11.</b> Comparação dos limites de detecção obtidos por diferentes técnicas para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato.....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

---

1. AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*
2. AdSV, voltametria adsortiva de redissolução, do inglês *Adsorbitive Stripping Voltammetry*
3. ANOVA, análise de variância entre grupos, do inglês *Analysis of Variance*
4. ASV, voltametria de redissolução anódica, do inglês *Anodic Stripping Voltammetry*
5. BP, farmacopéia britânica, do inglês *British Pharmacopoeia*
6. CRMs, materiais de referência certificados, do inglês *Certified Reference Materials*
7. CV AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês *Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*
8. DCP-OES, espectrometria de emissão ótica com plasma de corrente direta, do inglês *Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry*
9. DSS-GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com amostragem direta de sólidos, do inglês *Direct Solid Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
10. EP, farmacopéia europeia, do inglês *European Pharmacopoeia*
11. F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*
12. FB, farmacopéia brasileira
13.  $H_e$ , constante de homogeneidade
14. GFAAS, espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite, do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
15. HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*
16. HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*
17. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*

18. ICP OES, espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
19. IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
20. JP, farmacopéia Japonesa, do inglês *Japanese Pharmacopoeia*
21. LCO, lâmpada de cátodo oco
22. LD, limite de detecção
23. NAA, análise de ativação neutrônica, do inglês *Neutron Activation Analysis*
24. OMS, organização mundial da saúde, do inglês *World Health Organization*
25. PGM, modificadores do grupo da platina, do inglês *Platinum Group Modifiers*
26.  $R^2$ , coeficiente de correlação de determinação
27. RSD, desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
28. STPF, temperatura estável na plataforma do forno, do inglês *Stabilized Temperature Platform Furnace*
29. USP 30, farmacopéia americana 30ª edição, 2007, do inglês *The United States Pharmacopoeia 30<sup>th</sup> Edition*
30. UV, espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Molecular Absorption Spectrometry*
31. VIS, espectrometria de absorção molecular na região do visível, do inglês *Visible Molecular Absorption Spectrometry*
32. WDXRF, espectrometria de fluorescência de raios-X com dispersão em comprimento de onda, do inglês *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry*

**RESUMO**

---

---

Neste trabalho foi otimizada uma metodologia para a determinação de impurezas inorgânicas (Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb) por espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos (DSS-GF AAS) em amostras de ferro aminoácido quelato. Foi realizado um estudo do comportamento térmico dos analitos na amostra sólida e na solução de referência aquosa a partir de curvas de pirólise e atomização. Para a determinação de As, Cr, Mn, Ni e Sb foi adicionado 20 µL de água sobre a amostra na plataforma e para a determinação de Ag e Pb foi utilizado 20 µL de uma solução contendo 4 µg de paládio como modificador químico. A massa empregada na determinação de Cr variou de 0,1 a 0,7 mg, para Ni foram utilizadas massas entre 0,1 e 0,9 mg, para As e Sb esta foi de 0,2 a 0,9 mg, para Ag foram empregadas massas entre 0,1 e 1,9 mg, para Mn esta foi de 0,1 a 0,4 mg e para a quantificação de Pb a massa utilizada variou entre 0,1 e 2,5 mg. Os analitos investigados neste trabalho, com exceção da Ag nas amostras FAQ1 e FAQ 2 apresentaram uma boa homogeneidade. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e análise por ativação neutrônica (NAA). O teste estatístico ANOVA, considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), não demonstrou diferença significativa entre os valores das concentrações de As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb obtidos pelas diferentes técnicas. Para Ag, as técnicas comparativas apresentaram limite de detecção (LD) maior que a concentração de Ag obtida na amostra por DSS-GF AAS. Devido a isto, foi feita a adição de analito por meio de soluções de referência nas amostras antes destas serem introduzidas no atomizador. A recuperação para a Ag empregando solução de referência foi maior que 97%. Os valores dos limites de detecção (LDs) dos elementos Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb obtidos por DSS-GF AAS foram 0,002; 0,07; 0,03; 0,01; 0,002; 0,008 e 0,08 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo que, com exceção de As e Sb, os demais elementos apresentaram LDs menores que os obtidos pelas técnicas ICP-MS, ICP OES e NAA.

**ABSTRACT**

---

---

In this work a methodology for determination of inorganic impurities (Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb) by direct solid sampling with graphite furnace atomic absorption spectrometry (DSS-GF AAS) in iron glycinate chelate samples was developed. The thermal behavior of the analytes in solid samples and reference aqueous solutions was studied using pyrolysis and atomization curves. For Cr, Mn, Ni and Sb determination, 20  $\mu\text{L}$  of water were added over the sample in the platform, and for Ag and Pb determination, 20  $\mu\text{L}$  of a solution containing 4  $\mu\text{g}$  of Pd as chemical modifier was used. The mass used in the Cr determination varied from 0,1 to 0,7 mg, for Ni masses among 0,1 and 0,9 mg were used, for As and Sb from 0,2 to 0,9 mg, for Ag masses among 0,1 and 1,9 mg were used, for Mn from 0,1 to 0,4 mg and for the quantification of Pb the used mass varied among 0,1 and 2,5 mg. The analytes characteristic mass average value in the solid sample was consistent with the value obtained in the aqueous reference solutions. Thus, aqueous reference solutions calibration was possible. The analytes investigated in this work, except for silver in samples FAQ1 and FAQ2, showed good homogeneity in the samples. The results obtained by the proposed method were compared with inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and neutron activation analysis (NAA). No statistical difference was observed in As, Cr, Mn, Ni, Pb and Sb concentrations determined by different techniques. For Ag, the comparative techniques showed a higher detection limit (LD) than the Ag concentration found in the sample by DSS-GF AAS. To address this, analyte addition through reference solutions in the samples before introduction in the atomizer was used. The recovery for silver using standard solutions was greater than 97%. The Ag, Cr, Mn, Ni, Pb and Sb LDs obtained by DSS-GF AAS were 0,002; 0,07; 0,03; 0,01; 0,002; 0,008 and 0,08  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. With exception of As and Sb, the other elements presented lower LDs than those obtained by ICP-MS, ICP OES and NAA techniques.

A determinação de impurezas em diferentes etapas do processo de obtenção de produtos farmacêuticos é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final, bem como para prevenir riscos à saúde humana. Entre as impurezas que podem estar presentes nos fármacos estão os metais pesados, que podem ser introduzidos por diversas fontes durante o processo de fabricação dos medicamentos.<sup>1</sup> O limite para metais pesados presentes em medicamentos e em matérias-primas é, normalmente, definido por agências reguladoras, as quais empregam ensaios semiquantitativos e não seletivos de precipitação de sulfetos metálicos.<sup>2,3</sup>

O ensaio limite para metais pesados, descrito na maioria das farmacopéias emprega soluções de sulfeto de hidrogênio ou tioacetamida, que produzem precipitados coloridos cuja intensidade da cor é comparada visualmente com uma solução de referência de chumbo a qual apresenta concentração conhecida. Os elementos que normalmente respondem ao ensaio limite de metais pesados são As, Ag, Bi, Cu, Cd, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn.<sup>2,3</sup>

Entretanto, esse teste apresenta a limitação de trazer apenas uma informação semiquantitativa, pois o desenvolvimento de cor será proporcional aos precipitados de todos os elementos que podem ocorrer nas condições citadas. Deste modo, esses testes apresentam baixa sensibilidade e não são específicos, em função de não informarem qual elemento está contribuindo com o desenvolvimento da cor nem a concentração individual destes interferentes.<sup>1</sup> Além do mais, existe uma dependência da acuidade visual do operador, pois a detecção é feita por comparação direta com uma solução de referência de chumbo, uma vez que, a comparação visual pode ser influenciada por erros do operador ou mesmo pela luminosidade do ambiente. Este ensaio descrito nas farmacopéias é específico somente para o grupo de elementos citados anteriormente. Outros elementos importantes sob o aspecto toxicológico, como é o caso do cromo, não respondem a este teste. Além do mais, os reagentes tioacetamina e sulfeto de hidrogênio são tóxicos e instáveis, devendo ser preparados no dia em que será feita a análise.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> NAGESWARA RAO, R.; KUMAR TALLURI, M. V. N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1-13.

<sup>2</sup> EUROPEAN PHARMACOPEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, França, 2004.

<sup>3</sup> UNITED STATES PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007.

<sup>4</sup> BOLZAN *et.al.*; *Talanta* 74 (2007) 119-124.

Em virtude da baixa seletividade e sensibilidade dos métodos oficiais, de impurezas inorgânicas em medicamentos, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de metais, em baixa concentração, para garantir a segurança dos medicamentos para o consumo humano. Muitos artigos relatam a utilização de técnicas instrumentais para o controle de qualidade de medicamentos.<sup>1,4-6</sup> Entre as técnicas utilizadas no controle de impurezas em medicamentos está a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), a qual apresenta elevada sensibilidade. A aplicação convencional desta técnica, geralmente, requer o preparo da amostra, o qual pode envolver o processo de decomposição ou diluição da amostra em um solvente.<sup>7</sup> A amostragem direta de sólidos empregando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (DSS-GF AAS) é uma boa alternativa na determinação de metais, principalmente quando estes encontram-se em baixa concentração, ou quando a amostra for de difícil decomposição.<sup>8</sup> Além do baixo limite de detecção, esta técnica apresenta vantagens como menor risco de perda de analito e de contaminação da amostra, e baixo consumo de reagentes tóxicos.<sup>9</sup>

Segundo a UNICEF<sup>10</sup> a deficiência de micronutrientes é o maior problema de saúde pública do mundo, afetando mais de dois bilhões de pessoas. Este fato está relacionado principalmente à deficiência de vitaminas e minerais, especialmente vitamina A, iodo, ferro e zinco.<sup>10</sup> Este problema justifica o grande desenvolvimento de compostos para suprir os diferentes tipos de carência e o grande consumo de suplementos alimentares por pessoas em todo o mundo. Um estudo realizado na Coreia demonstrou que o consumo de suplementos alimentares está aumentando. Neste estudo foram investigados 972 adolescentes, destes, 31% consumiam algum tipo de suplemento.<sup>11</sup>

O ferro aminoácido quelato é um composto que apresenta um aminoácido quelado, formado pela ligação de três moléculas de glicina a um íon ferro (III),

<sup>1</sup> NAGESWARA RAO, R.; KUMAR TALLURI, M. V. N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1-13.

<sup>5</sup> MARGUÍ *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1253-1257.

<sup>6</sup> KELKÓ-LÉVAI, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYI, K.; LÁSZTITY, A.; *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.

<sup>7</sup> CHUANG *et al.*; *Biol. Trace Elem. Res.* 76 (2000) 235-244.

<sup>8</sup> DONG, H.M.; KRIVAN, V.; WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1747.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>10</sup> UNICEF/WHO/WFP; (2007) 1-2.

<sup>11</sup> KIM, S. H.; HAN, J. H.; KEEN, C. L.; *Nutrition* 17 (2001) 373-380.

---

utilizado para a prevenção e tratamento da anemia ferropriva. Este composto apresenta em torno de 19% de ferro em sua constituição e é utilizado em preparações infantis, xaropes e suspensões, ou ainda pode ser adicionado a alimentos como fortificante de ferro.<sup>12</sup> Tendo em vista a importância, a aplicabilidade e, conseqüentemente, a ampla utilização deste produto farmacêutico, torna-se relevante a determinação de impurezas que possam estar presentes no medicamento.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um procedimento por DSS-GF AAS para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb em ferro aminoácido quelatos. Os resultados da concentração dos analitos obtidos pelo procedimento proposto foram comparados com os obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e por análise de ativação neutrônica (NAA).

---

<sup>12</sup> <http://www.albitech.com.br/farmacias.php>

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

---

### 2.1 Impurezas em produtos farmacêuticos

A qualidade dos produtos farmacêuticos é muito importante para garantir a sua eficácia. As exigências de qualidade em relação ao princípio ativo e ao conteúdo das matérias-primas utilizadas na obtenção dos medicamentos estão descritas na maioria das farmacopéias.<sup>2,3,13</sup> Estas descrevem testes para a identificação, o doseamento e a pureza para cada produto farmacêutico que, normalmente, utilizam métodos seletivos (por exemplo, cromatografia a líquido de alta eficiência - HPLC) e métodos não seletivos como titrimetria ou espectrometria molecular (região visível - VIS e ultravioleta - UV). No entanto, nas últimas décadas, está diminuindo a utilização de métodos não seletivos na caracterização dos produtos farmacêuticos, pois novos métodos cromatográficos e espectroscópicos estão sendo desenvolvidos, os quais permitem a identificação e quantificação do princípio ativo, como também das impurezas individuais que possam estar presentes no medicamento.<sup>14</sup> A determinação de impurezas em produtos farmacêuticos é um importante ensaio para garantir a qualidade e a segurança dos mesmos. Essa importância pode ser evidenciada pela publicação, em um período de tempo relativamente curto, de diversos livros e diversos artigos sobre este assunto.<sup>14-19</sup> A autorização de um fármaco para consumo humano é feita após o estabelecimento do perfil farmacológico, toxicológico e clínico do medicamento. Através destes, as autoridades regulatórias avaliam efeitos benéficos e adversos para o organismo e, com base no risco/benefício, tomam a decisão de liberá-lo ou não. Os efeitos adversos de um medicamento normalmente ocorrem devido a propriedades toxicológicas inerente dos medicamentos e as impurezas que possam estar presentes no mesmo.<sup>14</sup>

---

<sup>2</sup> EUROPEAN PHARMAOPEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, França, 2004.

<sup>3</sup> UNITED STATES PHARMAOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007

<sup>13</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988.

<sup>14</sup> GÖRÖG, S.; *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 755-757.

<sup>15</sup> GÖRÖG, S.; *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

<sup>16</sup> AHUJA, S.; *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York, USA, 1998.

<sup>17</sup> AHUJA, S.; ALSANTE, K.; M.; *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*, Academic Press-Elsevier, New York, USA, 2003.

<sup>18</sup> SZÁNTAY, Jr. C.; BÉNI, Z.; BALOGH, G.; GÁTI, T.; *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 806-820.

<sup>19</sup> GÖRÖG, S.; *et. al.*; *Talanta* 44 (1997) 1517-1526.

Deste modo, impureza farmacêutica pode ser definida como qualquer componente que esteja presente na formulação do fármaco, além da substância ativa e dos excipientes.<sup>20</sup> Como essas impurezas dependem de muitos fatores como a rota sintética, condições reacionais, armazenamento, qualidade da matéria-prima, solventes utilizados durante a síntese, etapa de purificação e condições de cristalização, o efeito colateral do medicamento pode ser irreprodutível, influenciando a qualidade e a eficácia do fármaco. Assim, a estimativa de impurezas presentes em produtos farmacêuticos e limites rígidos de impurezas fixados por agências reguladoras podem minimizar esse risco,<sup>14</sup> além de fornecerem meios para as autoridades reguladoras de medicamentos e para as indústrias farmacêuticas sobre a qualidade da matéria-prima e sobre o processo de obtenção do fármaco, que podem indicar a fonte de contaminação e deste modo, minimizar ou evitar estas.<sup>14,21</sup>

Além disso, como existem várias possibilidades de sintetizar um fármaco, o mesmo produto proveniente de fornecedores diferentes, obtido por maneiras diferentes, pode conter distintas impurezas.<sup>22</sup> Nos trabalhos descritos por Lehr *et. al.*<sup>23</sup> e Wirth *et. al.*<sup>24</sup> foram verificadas diversas impurezas no mesmo medicamento proveniente de distintos fornecedores e obtidos por processos diferentes.

As impurezas presentes em medicamentos, normalmente, são de origem orgânica, inorgânica e de resíduo de solvente.<sup>14</sup> As impurezas inorgânicas normalmente são provenientes do processo de obtenção do fármaco. Entre as principais fontes destas impurezas estão os reagentes, catalisadores, recipientes, exposição a partículas da atmosfera e equipamentos em geral, utilizados durante a síntese dos produtos farmacêuticos. A qualidade das matérias-primas e a estocagem dos produtos farmacêuticos também podem ser fontes de contaminação de metais pesados.<sup>19</sup> Estas impurezas são identificadas e quantificadas por ensaios não seletivos, como o teste limite para metais pesados, descrito na maioria das farmacopéias, que é baseado na precipitação do sulfeto

---

<sup>14</sup> GÖRÖG, S.; *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 755-757.

<sup>20</sup> Pharmaceutical impurities: Analytical, toxicological and regulatory perspectives, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2007) 1–2.

<sup>21</sup> GÖRÖG, S.; *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 407-415.

<sup>22</sup> NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 335-377.

<sup>23</sup> LEHR *et. al.*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 373-389.

<sup>24</sup> WIRTH *et. al.*; *Chromatographia* 46 (1997) 511-523.

<sup>19</sup> GÖRÖG, S.; *et. al.*; *Talanta* 44 (1997) 1517-1526.

metálico que fornece informação sobre um grupo de metais, denominado metais pesados.<sup>2</sup>

## 2.2 Toxicidade de metais pesados

Entre os elementos considerados metais pesados, alguns possuem atividades biológicas essenciais para o funcionamento do corpo humano. Entre estes elementos estão o cobre, zinco, ferro, manganês, cromo, selênio, vanádio, cobalto entre outros.<sup>25,26</sup> No entanto, se estes elementos ultrapassarem a faixa ótima de concentração, tornam-se tóxicos para o organismo. O intervalo entre carência e toxicidade dos elementos considerados essenciais, varia de elemento para elemento, dependendo da sua natureza e da função fisiológica que possuem no organismo. Para determinados elementos, esta faixa pode ser relativamente ampla, onde variações significativas não provocam problemas aparentes (como é o caso do ferro). Entretanto para outros elementos, como o cromo, esta faixa é reduzida, onde um pequeno acréscimo na sua concentração no organismo pode provocar um quadro de sintomas tóxicos.<sup>27</sup>

Muitos metais pesados não possuem atividade biológica conhecida, como antimônio, arsênio, níquel, estanho e tungstênio. Outros elementos, como chumbo, cádmio, mercúrio apresentam toxicidade mesmo quando presentes em baixas concentrações. Estudos epidemiológicos indicam uma relação entre câncer de pele e a exposição severa a compostos inorgânicos de arsênio através de medicação prolongada, água contaminada ou exposição ocupacional. O chumbo também está relacionado ao surgimento de câncer, principalmente nos pulmões. Além do mais, a presença deste elemento pode provocar diversas alterações bioquímicas deletérias no organismo humano.<sup>28</sup>

---

<sup>2</sup> EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, França, 2004.

<sup>25</sup> SEILER, H. G.; SINGEL, A.; SINGEL, H.; *Handbook on Metals in Clinical and analytical Chemistry* Marcel Dekker INC., New York, NY, 1994.

<sup>26</sup> NEVE, J.; CHAPPUIS, P.; LAMAND, M.; *Therapeutic Uses of Trace Element*, Plenum Press Inc., New York, NY, 1996.

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>28</sup> LARINI, L.; *Toxicologia*, Editora Manole Ltda, São Paulo, SP, 1997.

### 2.3 Metais pesados em produtos farmacêuticos

Entre as definições encontradas na literatura para metais pesados, a descrita por Hawkes<sup>29</sup> contempla muitos elementos desconsiderados em outras classificações. Segundo esta definição, metais pesados são os elementos contidos nos grupos de 2 a 16 no período 4 e sucessivos. Esta definição apesar de muito abrangente, exclui o alumínio, elemento que apresenta grande toxicidade, considera metais pesados alguns semimetais como germânio, arsênio, antimônio e telúrio e inclui selênio que é um não metal.

O monitoramento de metais pesados nas diferentes etapas de produção do medicamento, bem como no produto final é uma importante atividade nas indústrias farmacêuticas para garantir a qualidade do medicamento e a segurança do consumidor, pois alguns elementos metálicos apresentam alta toxicidade, mesmo presentes em baixas concentrações e podem também, influenciar na estabilidade do medicamento,<sup>6</sup> além de interagir com determinadas substâncias, podendo assim, alterar aspectos farmacocinéticos, principalmente de medicamentos administrados por via oral, tais como tetraciclina<sup>30</sup>, levodopa<sup>31</sup>, penicilinas<sup>32</sup> e norfloxacina<sup>32</sup>, medicamentos que apresentam diminuição na absorção do princípio ativo quando consumidos juntamente com produtos contendo íons metálicos divalentes e trivalentes.<sup>27</sup>

A importância do desenvolvimento de metodologias para a quantificação de metais presentes como impureza em produtos farmacêuticos pode ser demonstrada pelos diversos trabalhos sobre este assunto publicados nos últimos anos. Bolzan *et. al.*<sup>4</sup> desenvolveram um procedimento utilizando a amostragem direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (DSS-AAS GF) para a determinação de Cr em amostras de sulfato de bário, composto utilizado como contrastante radiológico de difícil decomposição. A concentração de cromo encontrada variou de 0,45 a 1,06  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Marguí *et. al.*<sup>5</sup> propuseram um procedimento para determinação de Cr, Fe, Ni e Zn em princípios

<sup>29</sup> HAWKES, S. J.; *J. Chem.* 74 (1997) 1374.

<sup>6</sup> KELKÓ-LÉVAI, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYI, K.; LÁSZTITY, A.; *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.

<sup>30</sup> NEURONEN, P. J.; *J. Drugs* 11 (1976) 45-54.

<sup>31</sup> CAMPBELL, N. R. C.; HASINOFF, B.; *Clin. Pharmacol. Ther.* 45 (1989) 220-225.

<sup>32</sup> OSMAN *et. al.*; *Clin. Pharmacol. Ther.* 45 (1983) 465-470.

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>4</sup> BOLZAN *et. al.*; *Talanta* 74 (2007) 119-124.

<sup>5</sup> MARGUÍ *et. al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1253-1257.

ativos *farmacêuticos* através da espectrometria de fluorescência de raios-X com dispersão em comprimento de onda (WDXRF). No trabalho proposto por Kelkó-lévai<sup>6</sup> foram determinados Cd, Co, Ni e Pb em amostras de açúcares, sorbitol, manitol, paracetamol, amidopirina, hidrato de cloral. Chuan *et. al.*<sup>7</sup> desenvolveram uma metodologia para a determinação de Pb, Cd, As, Hg, Cu, Co e Mn em diversas plantas medicinais chinesas utilizando diferentes técnicas espectrométricas (espectrometria de absorção atômica com chama - F AAS; espectrometria de absorção atômica com forno de grafite - GF AAS; espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos - HG AAS; espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio - CV AAS). A concentração de Pb nas diferentes plantas medicinais variou de 0,2 a 32,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ , de Cd de 0,01 a 0,31  $\mu\text{g g}^{-1}$ , de Hg entre 0,01 a 0,27  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a concentração de Mn encontrada foi entre 24,8 a 665,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Vários metais foram determinados em diferentes tipos de antibióticos por amostragem direta de suspensões, utilizando um sistema de nebulização de um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).<sup>33</sup> Stoica *et. al.*<sup>34</sup> determinaram a concentração de cobalto em complexos vitamínicos por diferentes técnicas (F AAS, GF AAS, ICP OES e voltametria adsorptiva de redissolução - AdSV). As amostras foram digeridas com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  em sistema fechado assistida por radiação microondas. A validação do método foi feita adicionando-se alíquotas com concentração conhecida do analito por meio de soluções de referência. Os elementos Pd e Fe foram determinados em amostras de methotrexate no trabalho proposto por Nielelä *et. al.*<sup>35</sup> O método foi baseado na decomposição das amostras em sistema fechado com aquecimento por microondas e posterior determinação por GF AAS e por espectrometria de emissão óptica com plasma de corrente direta (DCP-OES), os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Lásztitya *et. al.*<sup>36</sup> determinaram platina, ródio e paládio em diferentes produtos farmacêuticos por

<sup>6</sup> KELKÓ-LÉVAI, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYI, K.; LÁSZTITYA, A.; *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.

<sup>7</sup> CHUANG *et. al.*; *Biol. Trace Elem. Res.* 76 (2000) 235-244.

<sup>33</sup> ZACHARIADIS, G. A.; MICHOS, C. E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 951-958.

<sup>34</sup> STOICA, A.-I.; PELTEA, M.; BAIULESCUA, G.-E.; IONICAB M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 653-656.

<sup>35</sup> NIEMELÄ, M.; KOLA, H.; EILOLA, K.; PERÄMÄKI, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 433-439.

<sup>36</sup> LASZTITYA *et. al.*; *Microchem. J.* 73 (2002) 59-63.

ICP-MS. A concentração de Pd nas amostras de maleato de enalapril foi  $77 \text{ ng g}^{-1}$ , de platina em folinato de cálcio foi  $2360 \text{ ng g}^{-1}$  e de ródio nas amostras de levodopa foi  $27 \text{ ng g}^{-1}$ . O limite de detecção obtido foi 15; 2,8 e  $2,5 \text{ ng g}^{-1}$  para Pd em maleato de enalapril, Pt em folinato de cálcio e Rh em levodopa, respectivamente. No trabalho proposto por Bourgoïn *et. al.*<sup>37</sup> foram determinados Cd e Pb em suplementos de cálcio usando ICP-MS, F AAS, GF AAS e voltametria de redissolução anódica (ASV). Os valores de concentração obtidos pelas diferentes técnicas não apresentaram diferenças significativas. O LD para Cd foi 0,010, 0,024, 0,006 e  $0,035 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  para ICP-MS, ASV, GF AAS e F AAS, respectivamente. Para chumbo o LD foi 0,010; 0,120; 0,120 e  $0,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  para ICP-MS, ASV, GF AAS e F AAS, respectivamente. Scelo e Flegal<sup>38</sup> determinaram Cd em amostras de antiácidos e suplementos de cálcio empregando ICP-MS. O limite de quantificação obtido foi de  $0,06 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ .

Os elementos As, Cd, Hg e Pd foram determinados em suplementos dietéticos empregando ICP-MS. A concentração de arsênio encontrada nas amostras de suplemento variou de 5 a  $3770 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ; cádmio de 10 a  $368 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ; mercúrio de 80 a  $16800 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  e chumbo de 20 a  $48000 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ .<sup>39</sup> Os autores Wu *et. al.*<sup>40</sup> desenvolveram uma metodologia para a quantificação de As e Hg em produtos da medicina chinesa por ICP-MS. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos.

#### 2.4. Métodos oficiais para controle de metais pesados em produtos farmacêuticos

As farmacopéias americana (United States Pharmacopeia, USP) e européia (European Pharmacopeia, EP), mencionam a exigência de testes limites para metais pesados para diversas matérias-primas e produtos farmacêuticos acabados. Alguns testes são exclusivos para determinados produtos farmacêuticos e para determinados elementos, como chumbo, mercúrio, níquel e

<sup>37</sup> BOURGOIN *et. al.*; *Analyst* 117 (1992) 19–22.

<sup>38</sup> SCELFO, M.; FLEGAL, A. R.; *Environ. Health. Persp.* 108 (2000) 309–313.

<sup>39</sup> DOLAN, S. P.; NORTRUP, D. A.; BOLGER, P. M.; CAPAR, S. G.; *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1307–1312.

<sup>40</sup> WU *et. al.*; *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 311–323.

---

arsênio. No entanto, a grande maioria das farmacopéias recomenda um teste para um grupo de metais pesados, ao invés de testes específicos para cada elemento. Estes testes empregam soluções de sulfeto de hidrogênio, as quais produzem precipitados coloridos com os metais que podem estar presentes nos produtos farmacêuticos. A detecção é feita por comparação visual com uma solução de referência de chumbo.<sup>2,3</sup>

#### **2.4.1. Teste limite para metais pesados nas farmacopéias**

Historicamente, os ensaios de caracterização e especificação dos ingredientes ativos dos produtos farmacêuticos são acompanhados de testes para metais pesados, baseados em compêndios oficiais. Estes testes foram incluídos para assegurar que impurezas inorgânicas não relacionadas ao processo fossem incorporadas ao fármaco em alguma etapa do processo de produção do produto. Os testes oficiais para a determinação de metais pesados descritos na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP), Farmacopéia Britânica (BP), Farmacopéia Japonesa (JP) e Farmacopéia Européia (EP) são baseados na reação de determinados metais com o íon sulfeto, proveniente da tioacetamida ou sulfeto de hidrogênio. A reação produz precipitados coloridos cuja intensidade é avaliada, normalmente, por comparação visual com uma solução de referência de chumbo de concentração conhecida. O teste é recomendado para a determinação conjunta de As, Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn.<sup>41</sup>

Estes testes gerais foram recomendados há mais de 70 anos, possivelmente visando uma rápida identificação da qualidade do produto, possibilitando aos laboratórios de pequeno porte o controle da matéria-prima ou de produtos acabados. Na época, as técnicas instrumentais hoje empregadas de forma rotineira, encontravam-se em desenvolvimento. Os equipamentos possuíam elevado custo, não estavam facilmente disponíveis para laboratórios fora de países industrializados e necessitavam de analistas treinados para a operação, o que também não se dispunha na época. Além do mais, os níveis máximos de concentração de metais tolerados na época e a escassez de conhecimentos

---

<sup>2</sup> EUROPEAN PHARMACOPEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, França, 2004.

<sup>3</sup> UNITED STATES PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007.

<sup>41</sup> LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739–752.

acerca da influência de metais pesados, serviram como o subsídio para a proposição dos testes baseados na formação de sulfetos metálicos.<sup>27</sup>

Esses testes normalmente exigem uma quantidade relativamente grande de amostra (em torno de 1g) para o analito poder ser detectado na concentração  $\mu\text{g g}^{-1}$ , o que poderia limitar a aplicação destes testes nas fases iniciais do desenvolvimento dos medicamentos. Muitas vezes, estes testes requerem uma etapa de aquecimento ou decomposição por via seca da amostra, nas quais, pode ocorrer a perda de elementos voláteis.<sup>41</sup>

Um comitê sobre a “Harmonização dos procedimentos dos ensaios para metais pesados” da USP, EP e JP, reconheceu algumas falhas nos testes oficiais, e declarou que cerca de 50% dos metais podem ser perdidos durante o processo de decomposição por via seca. A perda dos metais é provavelmente dependente da matriz e em função da grande manipulação da amostra, onde as recuperações podem variar significativamente entre analistas diferentes.<sup>41</sup> Desde modo, a perda de metais durante o processo de decomposição por via seca torna a veracidade dos resultados obtidos com os testes baseados nas USP, JP e EP questionáveis.<sup>42</sup>

As dificuldades de obter um resultado seguro e reprodutível utilizando esses testes, não estão limitadas somente à etapa de aquecimento e formação do sulfeto metálico. O teste depende da acuidade visual do operador, que é sujeita a variações devido ao grau de luminosidade do ambiente, pois a detecção é feita por comparação visual entre a amostra e a solução de referência de chumbo.<sup>41,27</sup>

O teste fornece apenas uma informação qualitativa da concentração de alguns elementos, pois o desenvolvimento da cor será proporcional à soma dos precipitados metálicos que podem estar presentes no produto farmacêutico, sem a informação de qual elemento específico pode estar contribuindo com o desenvolvimento da cor. Esta informação é limitada, pois se apenas cobre ou chumbo estiverem presentes como contaminantes em níveis que atinjam o limite, o teste apenas apontará um resultado, apesar da toxicidade dos elementos

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>41</sup> LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739-752.

<sup>42</sup> BLAKE, K.; *Pharm. Forum* 21 (1995) 1632-1637.

<sup>41</sup> LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739-752.

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

---

citados como exemplo ser muito diferente. Além disso, o conhecimento da concentração individual dos elementos suspeitos de estarem presentes como contaminantes fornece aspectos importantes, como procedência da matéria-prima, possibilidade de contaminação em outras partes da síntese, como maquinário, entre outros.<sup>27</sup>

Outra desvantagem deste método está relacionada ao precipitado de chumbo, utilizado como solução de referência para comparação, que possui coloração preta, enquanto que o sulfeto de bismuto é marrom e os sulfetos de As, Cd e Sb são amarelos ou alaranjados. A detecção destes elementos, se estes estiverem presentes na amostra, pode ser prejudicada durante a comparação entre a amostra e a solução de referência de chumbo, onde concentrações relativamente elevadas destes elementos poderiam não ser detectadas.<sup>27</sup>

A detecção de metais pelo teste farmacopéico é restrita aos elementos que formam precipitados com as soluções de tioacetamida ou sulfeto de hidrogênio. Alguns elementos importantes do ponto de vista toxicológico ou nutricional, como Cr, W, Se, V, Pd e Ti não formam precipitados com essas soluções, sendo que outros elementos como Tl e Mn não formam precipitados com essas soluções com grande facilidade. O teste apresenta resultados ideais para a detecção de elementos em determinados estados de oxidação e solvatados. No entanto, elementos como mercúrio, estanho, arsênio e selênio podem ser encontrados como espécies alquiladas, dificultando assim sua detecção. Além disso, os testes estão sujeitos a interferências e os reagentes (tioacetamida e sulfeto de hidrogênio) apresentam grande toxicidade e instabilidade, devendo ser preparados no dia da determinação.<sup>27</sup> Adicionalmente, não são descritos procedimentos importantes para a limpeza e descontaminação do material utilizado.<sup>27</sup>

Trabalhos publicados recentemente demonstram pequena recuperação de metais pesados empregando o teste limite para metais pesados descrito na maioria das farmacopéias. Lewen *et. al.*<sup>41</sup> avaliaram a recuperação dos metais

---

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>41</sup> LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739-752.

pesados em 9 substâncias farmacêuticas empregando o teste limite de metais pesados descrito na USP. Para isto, foram adicionados 14 elementos (As, Se, Mo, Ru, Pd, Pb, Cd, In, Sn, Sb, Pt, Hg, Bi e Ag) nas substâncias, cuja concentração para cada elemento foi de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ , totalizando  $140 \mu\text{g g}^{-1}$  de metais pesados. Os resultados obtidos para a concentração de metais pesados nas amostras empregando o teste baseado na formação de precipitação de sulfetos metálicos foi inferior a  $80 \mu\text{g g}^{-1}$ , onde uma amostra apresentou uma recuperação de metais pesados entre  $60$  e  $80 \mu\text{g g}^{-1}$ , e as demais amostras apresentaram uma recuperação entre  $40$  e  $60 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para verificar a perda de elementos voláteis durante a etapa de decomposição em forno tipo mufla, os autores determinaram a concentração dos analitos nessas amostras decompostas, por ICP-MS. Os resultados indicaram que as recuperações para Se, Sn, Sb, Ru e Hg foram inferiores a 10%. Entretanto, para Pb, As, Cd, Mo, Pd, Pt e In as recuperações ficaram entre 30 e 50%. Contudo, a prata foi o único elemento em que a recuperação foi próxima de 100%. Os autores acreditam que as perdas dos elementos voláteis ocorreram devido às temperaturas altas empregadas na mufla (500 a 600 °C).

Barin<sup>43</sup> avaliou o desempenho dos métodos farmacopéicos de preparo de amostras e de determinação de metais pesados utilizando fármacos tricíclicos (carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina). Segundo o autor, os métodos farmacopéicos mostraram-se inadequados tanto para o preparo quanto para a determinação de metais pesados. Na decomposição em forno tipo mufla vários elementos foram perdidos por volatilização, enquanto que na decomposição por via úmida esta foi incompleta. Já nos ensaios de determinação de metais pesados por precipitação com íon sulfeto, resultados satisfatórios para soluções analíticas de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn foram encontrados apenas para Ag e Pb. A determinação de metais pesados foi avaliada e novos métodos de preparo de amostras em sistema fechado e determinação de metais pesados por espectrometria atômica foram propostos como alternativa.

Cabe ressaltar que as técnicas e os limites para controle de metais pesados em produtos farmacêuticos não foram aperfeiçoados todos da mesma

<sup>43</sup> BARIN, J. S., Dissertação de mestrado, PPGCTF, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2003.

---

forma, mesmo que algumas monografias publicadas nas últimas edições das farmacopéias recomendem a utilização da técnica de espectrometria atômica. Outro fator extremamente importante é que mesmo com os testes limites apresentando uma série de inconvenientes, alguns produtos muito utilizados, como vitaminas, anfetaminas, fortificantes, hormônios diversos e alguns antidepressivos e antibióticos não possuem nenhum controle de metais pesados.<sup>27</sup>

Tendo em vista a baixa seletividade e sensibilidade, em muitos casos, estes testes limites não são considerados adequados para a determinação de impurezas inorgânicas presentes em baixas concentrações, onde técnicas instrumentais podem ser mais eficientes no controle de qualidade dos produtos farmacêuticos.

## 2.5. Ferro tris-glicina quelato

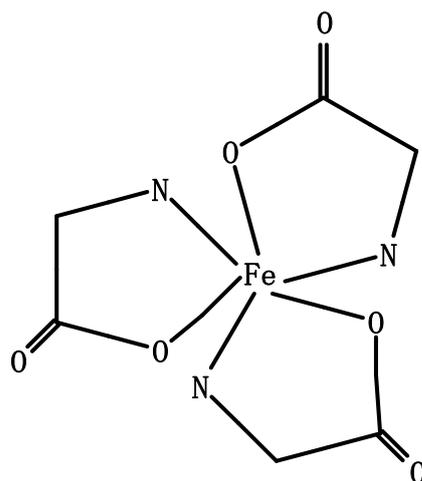
O ferro tris-glicina quelato é um composto de coloração vermelha, formado por um íon de Fe (III) ligado covalentemente a três moléculas de glicina (Figura 1). Este composto apresenta em torno de 19% de ferro em sua constituição e é utilizado em preparações infantis, xaropes e suspensões, ou ainda pode ser adicionado à alimentos no tratamento da anemia ferropriva.<sup>12</sup> Este composto apresenta baixa solubilidade em água.

Não há descrição de métodos analíticos em compêndios oficiais para o controle de qualidade do ferro tris-glicina quelato em formas farmacêuticas.

---

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>12</sup> <http://www.albitech.com.br/farmacias.php>



**Figura 1.** Estrutura do ferro tris-glicina quelato.

A anemia ferropriva é uma doença provocada pelo desequilíbrio no balanço entre a quantidade de ferro biodisponível absorvida pela dieta e a necessidade do organismo por este elemento, ou seja, quando o suprimento de ferro é insuficiente para a síntese de componentes que dependem deste mineral.<sup>44</sup> A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,62 bilhões de pessoas, 24,8% da população mundial possuem anemia e, aproximadamente, 50% do total é atribuída à deficiência de ferro. Esta proporção pode variar entre grupos de população e em diferentes áreas, de acordo com as condições locais.<sup>45</sup>

A suplementação medicamentosa com sais de ferro tem sido amplamente utilizada, tanto na forma curativa (grupos com deficiência de ferro) como profilática (direcionada a grupos de risco).<sup>46</sup> Muitos produtos farmacêuticos que contêm compostos de ferro podem ser utilizados no tratamento da anemia. No entanto, muitos destes produtos, como o sulfato ferroso, possuem efeitos colaterais como dores intestinais, náuseas, vômito, diarreia e presença de gosto metálico. Muitos destes efeitos diminuem a absorção e a aceitação destes medicamentos, principalmente, por crianças.<sup>47</sup> Os quelatos de ferro estão sendo muito utilizados, principalmente por apresentarem menos efeitos colaterais e maiores biodisponibilidade do ferro. Entre esses quelatos, está o ferro tris-glicina

<sup>44</sup> COOK, J. D.; *Food Technology*, 198 (1983) 124-126.

<sup>45</sup> Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia/Edited by Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswel.

<sup>46</sup> DEMAAYER, E. M.; *Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care*, World Health Organization, Geneva, 1989.

<sup>47</sup> MOYA, A.; ARDÓN, S. J. S.; *Revista Médica de los Post Grados de medicina* 11 (2008) 42-48.

quelato. O grande diferencial deste quelato em relação aos demais é a ausência do sabor metálico, que segundo a Albion,<sup>48</sup> está relacionado com o estado de oxidação do metal empregado no composto, uma vez que o suplemento contendo  $\text{Fe}^{3+}$  não apresenta gosto metálico, diferentemente do composto com  $\text{Fe}^{2+}$ .

## 2.6. Controle de metais pesados por espectrometria de absorção atômica

As técnicas de espectrometria de absorção atômica, com suas respectivas variantes (F AAS, GF AAS, HG AAS, CV AAS) são atraentes para o controle de qualidade rotineiro de metais pesados em matéria-prima e produtos farmacêuticos em geral, pois apresentam vantagens como facilidade de processamento de elevado número de amostras, sensibilidade, possibilidade de determinação de vários elementos, reprodutibilidade e repetibilidade superiores a 95%, rapidez, custo moderado e treinamento técnico relativamente rápido. Além disso, as principais interferências em relação a esta técnica já estão bem estabelecidas.<sup>27</sup>

A escolha da técnica ideal para a determinação de metais vai depender do tipo de amostra, do elemento de interesse e da concentração do(s) analito(s) presente(s) na amostra. A técnica F AAS é empregada quando se deseja quantificar elementos que estejam presentes em concentrações mais elevadas, na ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ . Esta técnica permite determinar cerca de 70 elementos. A HG AAS é uma técnica que apresenta elevada sensibilidade, no entanto, sua aplicação é restrita aos elementos que formam hidretos voláteis, como As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn e Te. A técnica CV AAS é empregada na determinação de mercúrio. A GF AAS possui grandes aplicações na determinação de impurezas inorgânicas em níveis de ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), pois possui elevada sensibilidade e possibilita a introdução direta de amostras no interior do atomizador. Essa vantagem é muito importante na determinação de analitos em amostras de difícil decomposição ou na determinação de elementos presentes em baixas concentrações.<sup>49</sup>

Atualmente, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos utilizando a técnica de espectrometria atômica com o objetivo de produzir métodos mais adequados para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Jia *et. al.*<sup>50</sup>

<sup>48</sup> A Compilation of Vital Research Updates on Human Nutrition, Research Notes, *Albion Human Nutrition* 14 (2005) 1-4.

<sup>27</sup> FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.

<sup>49</sup> VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W. N. L.; *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(2006) 377-400.

<sup>50</sup> JIA *et. al.*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2005) 43 – 47.

desenvolveram uma metodologia para a determinação de rutênio em sais de diisopropanolamina ou trimetilglicina e em soluções destes sais, sendo a determinação de rutênio feita por um equipamento de GF AAS. Chumbo foi determinado em 100 diferentes tipos de ervas medicinais, disponíveis em variadas formas (pílulas, cápsulas e sachê) de grande consumo na Malásia utilizando um equipamento de F AAS. Neste estudo foi verificado que 8% das ervas medicinais analisadas apresentaram concentrações entre 10,64 e 20,72  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>51</sup> Mattos *et. al.*<sup>52</sup> propuseram uma metodologia para a determinação de chumbo por GF AAS em suplementos de cálcio (carbonato de cálcio, dolomita e concha de ostra). A técnica GF AAS também foi utilizada por Jia *et. al.*<sup>53</sup> para a determinação de paládio em produtos farmacêuticos. Os autores verificaram a possibilidade da determinação de Pd em diferentes solventes, como acetonitrila, acetonitrila e água, dimetil sulfoxido, dimetil sulfoxido e água. Gomes *et. al.*<sup>54</sup> determinaram diversos metais em folhas, flores, chás e cápsulas provenientes da *Hypericum perforatum*, planta fitoterápica muito utilizada no tratamento de depressão. A determinação da concentração de Al, Cr, Fe e V foi feita por ICP OES utilizando nebulizador ultrasônico. Os limites de detecção obtidos foram 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Al, Cr, Fe e V, respectivamente. Os elementos Cd, Co e Pb foram determinados por GF AAS e os respectivos LDs obtidos foram 0,008  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Alexui *et. al.*<sup>55</sup> otimizaram um procedimento para a determinação de Hg em amostras de timerosal, agente antibacteriano, empregando GF AAS.

Um procedimento para a determinação de arsênio em antimoniato de meglumina, medicamento utilizado na forma injetável por pacientes que possuem leishmaniose, empregando a HG AAS foi desenvolvida por Flores *et. al.*<sup>56</sup> A determinação de As neste medicamento por HG AAS é fortemente influenciada pela grande concentração de Sb (V), pois pode ocorrer supressão do sinal analítico do arsênio.<sup>56</sup> Resano *et. al.*<sup>57</sup> desenvolveram um procedimento para a

<sup>51</sup> ANG, H. H.; LEE, E.; MATSUMOTO, K.; *Hum. Exp. Toxicol.* 22 (2003) 445–451.

<sup>52</sup> MATTOS *et. al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 687–692.

<sup>53</sup> JIA, X.; WANG, T.; WU, J.; *Talanta* 54 (2001) 741–751.

<sup>54</sup> GOMEZ *et. al.*; *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 1060–1064.

<sup>55</sup> ALEXIU, V.; CHIRTOP, E.; VLADESCU, L.; SIMION, M.; *Acta Chim. Slov.* (2004) 51 361-372.

<sup>56</sup> FLORES *et. al.*; *Acta Part B* 57 (2002) 2095–2102.

<sup>57</sup> RESANO *et. al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1477–1484.

determinação de Pd em amostras de maleato de enalapril, medicamento utilizado por pacientes hipertensivos, empregando DSS-GF AAS.

A grande preocupação em determinar impurezas inorgânicas em baixas concentrações em produtos farmacêuticos justifica o desenvolvimento de metodologias analíticas que utilizam técnicas instrumentais de determinação com elevada sensibilidade, especificidade, robustez e baixos limites de detecção como a GF AAS e de outras técnicas com princípios físicos diferentes, como ICP OES e ICP-MS.

### 2.6.1 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)

A GF AAS é uma técnica que apresenta grande seletividade e sensibilidade, permitindo a determinação de elementos em concentrações em nível ppb ou mesmo ppt em certos casos. Esta técnica possui propriedades que a torna adequada para a determinação de metais em diversos tipos de amostras, como materiais de difícil decomposição, amostras ambientais, biológicas, medicamentos entre outras.<sup>58,49</sup> Entre as características desta técnica estão:

- I. Programa de aquecimento, que possibilita o pré-tratamento térmico da amostra, principalmente na etapa de pirólise, o que facilita a remoção de parte dos concomitantes que podem provocar interferências durante a atomização
- II. Permite a análise de pequenas quantidades de amostras
- III. Com uma otimização adequada do programa de aquecimento, aliada ao uso de modificadores químicos, possibilita, na maioria das vezes, a calibração do equipamento utilizando soluções aquosas

Além disso, esta técnica apresenta grande versatilidade, pois permite a análise de amostras líquidas, sólidas após digestão e também amostras sólidas na forma de suspensões ou de forma direta, através da introdução da amostra diretamente no tubo de grafite, com auxílio de uma plataforma amostradora.<sup>58, 59,49</sup>

<sup>58</sup> STURGEON, R. E.; *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1451-1457.

<sup>49</sup> VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W. N. L.; *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(2006) 377-400.

<sup>58</sup> STURGEON, R. E.; *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1451-1457.

<sup>59</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.; *Quim. Nova* 31(2008) 104 -113.

<sup>49</sup> VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W. N. L.; *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(2006) 377-400.

O conjunto de características instrumentais desejáveis para GF AAS é descrito no conceito STPF (do inglês, *stabilized temperature platform furnace*), conceito introduzido por Walter Slavin e colaboradores em 1981.<sup>60</sup> Entre os parâmetros importantes do conceito STPF está a utilização de equipamentos com eletrônica digital de alta velocidade, obtenção do sinal de absorvância de forma integrada, interrupção da vazão de argônio durante a etapa de atomização, rápida rampa de aquecimento durante a etapa de atomização, utilização de plataforma de L'vov recoberta com grafite pirolítico, utilização de modificadores químicos e corretores de sinal de fundo eficientes.<sup>61</sup> O uso de modificadores químicos e os principais sistemas de correção do sinal de fundo serão relatados de forma mais detalhada em uma seção específica deste trabalho.

### 2.6.1.1 Amostragem direta de sólidos empregando a GF AAS

A análise direta de amostras sólidas tem sido apontada como uma boa alternativa aos métodos convencionais de análise, principalmente quando são necessários baixos limites de detecção (LDs), ou na análise de amostras de difícil decomposição.<sup>49</sup> Nesta técnica, o sinal analítico é obtido a partir da amostra sólida, sem a etapa de decomposição da amostra, a qual constitui a etapa mais onerosa e demorada da análise. Desta maneira, a eliminação desta etapa confere vantagens como:<sup>9</sup>

- Menor risco de contaminação e/ou perda de analito
- Menores limites de detecção, pois a amostra não é diluída
- Maior rapidez na obtenção dos resultados
- Normalmente é requerida pequena quantidade de amostra
- Dispensa a utilização de reagentes corrosivos e perigosos, resultando em benefícios ambientais e econômicos

Na química analítica, contínuos esforços estão sendo feitos para obtenção de melhores LDs. No entanto, a decomposição da amostra é geralmente acompanhada de subsequente diluição. Assim, é necessário melhorar de uma a

<sup>60</sup> SLAVIN, W.; MANNING, D. C.; CARNRICK, G. R.; *At. Spectrosc.* 2 (1981) 137-145.

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry* Third, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.

<sup>49</sup> VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W. N. L.; *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(2006) 377-400.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

---

duas ordens de grandeza o LD para compensar a redução da concentração do analito em um determinado volume de amostra diluída. Na técnica de amostragem direta de sólidos não há diluição, este fato favorece a obtenção de melhores LDs.<sup>62</sup>

A validação de métodos de amostragem direta de sólidos utilizando materiais de referência certificado (CRM) é vantajosa, uma vez que a quantidade de massa utilizada é reduzida. A utilização de CRMs, neste caso, é limitada apenas pela validade do produto.<sup>62</sup>

Apesar das muitas vantagens apresentadas pela DSS-GF AAS, esta técnica possui algumas limitações. Segundo Belarra *et. al.*<sup>9</sup> a análise de amostras heterogêneas pode resultar em uma baixa precisão dos resultados. A calibração nem sempre pode ser feita com soluções de referência aquosas, pois o processo de vaporização e atomização do analito depende da forma na qual o analito está presente na amostra, e este também pode ser influenciado pela matriz da amostra sólida. Devido a sua elevada sensibilidade, as análises são limitadas para amostras que apresentam uma baixa concentração de analito. A DSS-GF AAS é uma técnica mono elementar, que possui uma baixa frequência de determinações.<sup>9</sup> Alguns destes inconvenientes serão abordados neste trabalho, bem como as principais formas de contorná-los.

#### **2.6.1.2 Sistemas de introdução de amostras sólidas em GF AAS**

A introdução de amostras sólidas no atomizador, geralmente, envolve quatro etapas básicas: separação de uma alíquota de amostra, pesagem desta em uma microbalança, transporte da amostra até o forno e posterior introdução no interior do atomizador.<sup>62</sup>

Com o desenvolvimento da DSS-GF AAS vários sistemas de introdução de amostras sólidas foram desenvolvidos, alguns deles como protótipos, e outros desenvolvidos por fabricantes de instrumentos de AAS específicos. A corporação Analytik jena desenvolveu um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite com um acessório baseado no modelo proposto por Kurfürst *et. al.*<sup>63</sup> para a

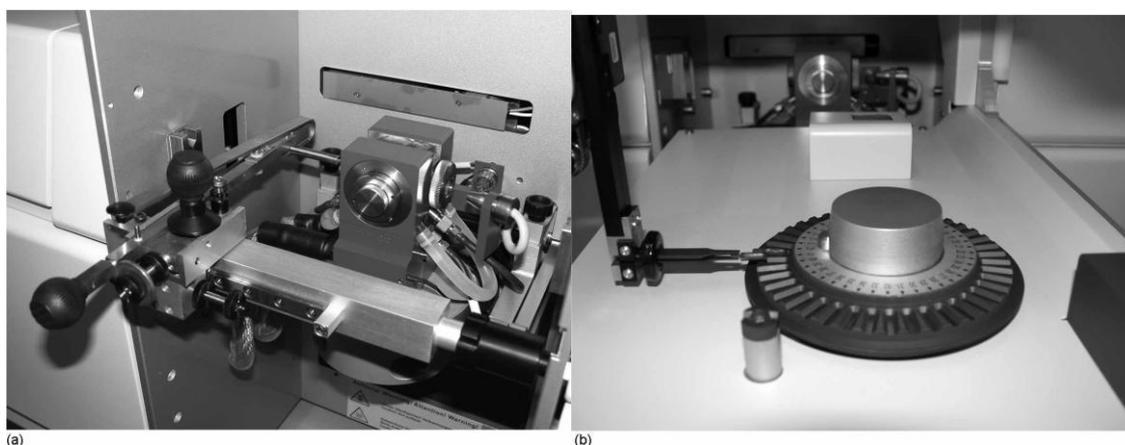
---

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>62</sup> KURFÜRST, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany (1998).

<sup>63</sup> KURFÜRST, U.; KEMPENEER, M.; STOEPLER, M.; SCHUIERER, O.; *Fresenius J. Anal. Chem.* 337 (1990) 248-252.

introdução direta de amostras sólidas. Os instrumentos atuais para DSS-GF AAS permitem a introdução da amostra através de um acessório manual ou de uma maneira completamente automatizada, incluindo a etapa de pesagem, através de uma balança integrada. O carregador de amostra é uma plataforma de grafite que é introduzida e retirada do interior do atomizador com a utilização de uma pinça metálica, através de um guia mecânico para o modo manual, ou utilizando um braço robótico no caso do sistema automatizado. A microbalança utilizada é muito estável e possui resolução 1  $\mu\text{g}$ .<sup>62</sup> A Figura 2 apresenta os dois sistemas de introdução de amostra utilizados por DSS-GF AAS, juntamente com os seus acessórios.



**Figura 2.** Acessórios para a DSS-GF AAS: (a) Sistema manual SSA 5, introdução da plataforma de grafite com amostra para o interior do atomizador com uma pinça metálica; (b) Amostrador automático (SSA 62) para transferência automática da plataforma contendo a amostra para o atomizador. (Cortesia Analytik Jena AG, Jena, Alemanha).

### 2.6.1.3 Calibração

A calibração é uma das etapas mais importantes para garantir a confiabilidade da análise quando técnicas analíticas de comparação são empregadas. Na DSS-GF AAS a calibração requer um cuidado especial, pois o analito pode sofrer influência da matriz da amostra.<sup>62</sup> A calibração pode ser feita

<sup>62</sup> KURFÜRST, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany (1998).

utilizando CRM, padrões sólidos sintéticos, soluções de referência aquosas, ou ainda, utilizando o método de adição de padrão.<sup>62</sup>

Idealmente, o material de calibração deverá ter uma composição idêntica ou muito semelhante ao material que está sendo analisado e, preferencialmente, ambos deverão apresentar uma concentração semelhante do analito.<sup>62</sup>

Em geral, a utilização de CRMs para a calibração permite compensar os efeitos provocados pela matriz da amostra, pois o CRM apresenta composição idêntica ou semelhante ao material que está sendo analisado. Desta maneira, o analito contido no material de calibração e na amostra sólida será influenciado de maneira semelhante.<sup>62</sup> A calibração com a utilização dos CRMs pode ser feita através da pesagem de massas crescentes de um CRM ou massas iguais de um tipo de CRM com diferentes concentrações do analito.<sup>59</sup> No entanto, a calibração utilizando estes materiais apresenta algumas restrições que dificultam a sua utilização: os CRMs apresentam elevado custo, pode haver dificuldade em encontrar CRM comercialmente disponíveis com composição idêntica à amostra que está sendo analisada; muitos materiais não são certificados para alguns elementos de interesse; a utilização de pequenas massas empregada na DSS-GF AAS pode aumentar a imprecisão devido à heterogeneidade na distribuição do analito;<sup>62</sup> a maioria dos CRMs disponíveis comercialmente apresentam homogeneidade garantida para massas maiores que 100 mg, quantidade superiores às massas, normalmente, empregadas na análise direta de sólidos.<sup>64</sup>

Outro problema relacionado aos materiais de referência é a concentração certificada destes materiais, que geralmente, apresenta uma incerteza associada, a qual pode ser considerada muito grande quando comparada com as incertezas das medidas da técnica. Conseqüentemente, a calibração com CRMs poderá introduzir uma grande incerteza no valor final do resultado. Em alguns casos, em que os CRMs não estão disponíveis comercialmente, uma amostra sólida sintética, com composição semelhante à amostra original, pode ser utilizada.<sup>65</sup>

O método de adição de padrão tem sido utilizado para suprimir as interferências produzidas pela composição da matriz sólida. Um pré-requisito

<sup>59</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.; *Quim. Nova* 31(2008) 104-113.

<sup>62</sup> KURFÜRST, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany (1998).

<sup>64</sup> ZEISLER, R.; *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 376-379.

<sup>65</sup> BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

---

básico para a aplicação deste método é que o analito contido na amostra sólida e o analito adicionado sejam igualmente afetados pela matriz da amostra. A calibração com adição de padrão pode ser feita de três diferentes maneiras:<sup>65</sup>

- I. Quantidades crescentes de analito são adicionadas em uma quantidade de massa constante da amostra sólida. Esse procedimento é bastante problemático, pois requer a utilização de massas idênticas da amostra para as concentrações individuais do analito na curva de calibração.<sup>65</sup>
- II. Utilização de quantidades crescentes de massa de amostra sólida com adição de quantidades constantes do analito, proveniente de uma solução de referência.<sup>65</sup>
- III. O terceiro modo de fazer calibração com adição de padrão envolve o uso de quantidades variáveis de massas de amostra e de padrão. O sinal de absorção do analito será em função das duas variáveis independentes, e pode ser interpretado através da regressão linear multielementar.<sup>65</sup>

Devidos a erros associados aos procedimentos I e II, o método III é o mais apropriado. O sinal de absorbância, neste último caso, é função de duas variáveis independentes (quantidade de massa de amostra e analito adicionado), e o sinal pode ser normalizado para uma unidade de massa.<sup>66</sup>

A calibração com soluções de referência aquosas é a forma mais comum, simples e de menor custo para obter uma curva analítica de calibração. Além disso, as soluções não apresentam problemas de heterogeneidade. No entanto, o perfil do sinal analítico para as soluções de referência e para a amostra sólida, normalmente, não é igual, pois a matriz pode influenciar no processo de vaporização e atomização do analito. Entretanto, a obtenção das medidas em absorbância integrada, eletrônica rápida, corretor eficiente e modificadores químicos (condições STPF) podem ajudar a minimizar a interferência provocada

---

<sup>65</sup> BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

<sup>66</sup> BERGLUND, M.; BAXTER, D. C., *Spectrochim. Acta B* 47 (1992) 1567-1586.

pela matriz nos materiais sólidos, permitindo em muitos casos, a calibração com soluções de referência aquosa.<sup>62</sup>

#### 2.6.1.4 Precisão nas determinações por DSS-GF AAS

Os valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 10 e 20% podem ser considerados normais quando esta técnica é empregada.<sup>9</sup> Entre os fatores que podem afetar a precisão dos resultados estão: problemas de pesagem, transporte da amostra para o atomizador, utilização de gás de argônio durante a etapa de atomização, variação do posicionamento da amostra no interior do sistema de atomização, tamanho das partículas das amostras, homogeneidade e massa de amostra introduzida no atomizador.<sup>65,9</sup>

##### 2.6.1.4.1 Homogeneidade das amostras

A DSS-GF AAS utiliza massas diminutas de amostra para fazer a análise, tipicamente entre 0,1 e 10 mg, para a análise. No entanto, o emprego de massas pequenas pode influenciar a homogeneidade da amostra e, por conseqüência, a exatidão e precisão dos resultados.<sup>65</sup> Estudos recentes indicam que a imprecisão da técnica está relacionada com a baixa homogeneidade em pequenas massas de amostra introduzidas para o interior do atomizador (normalmente 0,5 a 2 mg).<sup>9</sup>

De modo geral, a utilização de massas inferiores a 100 mg pode comprometer a homogeneidade e, por conseqüência, a representatividade da amostra, já que os elementos traço podem não estar distribuídos de maneira homogênea na amostra.<sup>67</sup> Entretanto, é verificado em alguns trabalhos que a utilização de massas de amostra inferiores a 2 mg, apresenta boa homogeneidade.<sup>68,4</sup> Toda vez que a amostra é dividida em porções menores, ela tende a se tornar cada vez menos homogênea, pois a probabilidade estatística de

<sup>62</sup> KURFÜRST, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany (1998).

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>65</sup> BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

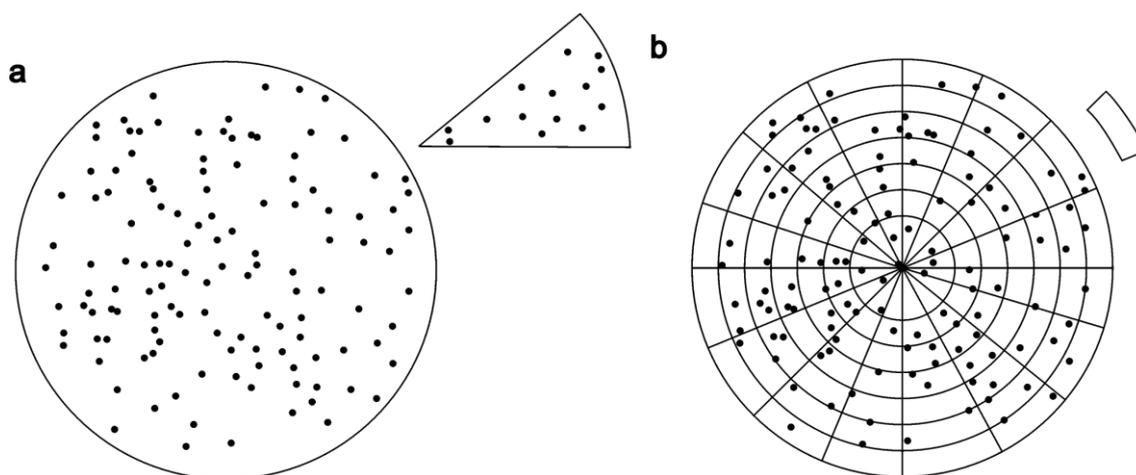
<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>67</sup> ROSSBACH, M.; OSTAPCZUK, P.; EMONS, H.; *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 380-383.

<sup>68</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; OLIVEIRA, P. V.; *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 673-680.

<sup>4</sup> BOLZAN *et.al.*; *Talanta* 74 (2007) 119-124.

encontrar a mesma concentração média do analito na porção utilizada para realizar a análise é cada vez menor, como pode ser visualizado na Figura 3.<sup>59</sup>



**Figura 3.** Ilustração da influência da homogeneidade na determinação de um analito (•): (a) amostragem com grande massa e (b) amostragem com pequena massa. (Figura adaptada de Nomura *et. al.*<sup>59</sup>).

As massas de amostra normalmente empregadas para digestão ou solubilização variam entre 100 a 500 mg. Essas quantidades, geralmente, não são influenciadas pela micro homogeneidade da amostra e deste modo, não devem gerar erros associados à falta de homogeneidade da amostra (Figura 3a). No entanto, quando são utilizadas massas diminutas para a análise (0,01 a 1 mg), a micro homogeneidade torna-se um parâmetro crítico, pois pequenas porções de amostra podem conter quantidades diferentes do elemento de interesse (Figura 3b), podendo desta maneira, comprometer os resultados analíticos.<sup>59</sup> À medida que um material homogêneo se torna heterogêneo para massas menores, existe uma massa mínima que deve ser considerada e estabelecida para garantir a representatividade da amostra e desta maneira, a exatidão dos resultados analíticos.<sup>69</sup>

A homogeneidade é um parâmetro que depende de fatores como a natureza da amostra, densidade, massa de amostra utilizada na análise e

<sup>59</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.; *Quim. Nova* 31(2008) 104-113.

<sup>69</sup> PAUWELS, J.; HOFMANN, C.; VANDECASTEELE, C.; *Fresenius. J. Anal. Chem.* 348 (1994) 418-421.

concentração do analito de interesse.<sup>59</sup> Alguns estudos também demonstram que a heterogeneidade para pequenas massas de amostra pode ser devido à presença de aglomerados de partículas de tamanho grandes, sendo que essas podem apresentar concentração de elementos em nível de traço maiores que as concentrações encontradas na amostra como um todo.<sup>70</sup> Entre as medidas que podem ser utilizadas para contornar esse problema é a redução do tamanho das partículas das amostras através de moagens.<sup>59</sup>

Atualmente, a homogeneidade para pequenas quantidades de amostra pode ser calculada através do conceito de constante relativa de homogeneidade ( $H_e$ ) introduzida por Kurfurst,<sup>71</sup> conforme Equação 1:

$$H_e = \text{RSD} * m^{1/2} \quad \text{Equação 1.}$$

Onde, RSD = desvio padrão relativo de todas as medidas e m = massa média (mg).

Quando o fator de homogeneidade ( $H_e$ ) for menor que 10, a amostra pode ser considerada suficientemente homogênea.

A precisão pode ser melhorada com a moagem da amostra, com a introdução de maior quantidade de massa de amostra no atomizador. O aumento do número de medições, segundo Belarra *et. al.*,<sup>9</sup> também pode melhorar a precisão dos resultados, principalmente nos casos em que a utilização de massas maiores é limitada pela faixa linear utilizada para calibração, a qual é dependente do analito, ou pela capacidade física da plataforma ou ainda, pelo aumento dos efeitos negativos causados pela co-vaporização de componentes da matriz residual, durante a etapa de atomização.<sup>9</sup>

<sup>70</sup> KURFÜRST, U.; *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1205-1211.

<sup>59</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.; *Quim. Nova* 31(2008) 104 -113.

<sup>71</sup> KURFÜRST *et. al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 112-120.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

#### 2.6.1.4.2 Tamanho de partícula e influência na localização do analito

Com o intuito de aumentar a homogeneidade das amostras, muitas passam pelo processo de cominuição antes de serem submetidas à análise por DSS-GF AAS. Entre as técnicas utilizadas para tal, estão os moinhos mecânicos convencionais, os moinhos criogênicos e os moinhos a jato de ar. Na maioria das vezes, esse processo é acompanhado por uma etapa de classificação dos tamanhos das partículas por exclusão. O processo de cominuição proporciona uma diminuição do tamanho das partículas, o que geralmente, aumenta a homogeneidade e melhora a distribuição dos elementos na amostra. A homogeneidade de uma pequena massa de amostra, geralmente, é assegurada por uma estreita distribuição do tamanho da partícula, preferencialmente por partículas inferiores a 10  $\mu\text{m}$ .<sup>64</sup>

A localização do analito na partícula sólida (elemento presente na superfície ou incluso na partícula sólida), assim como os diferentes tipos de ligações entre o analito e a matriz sólida, podem influenciar na medida de absorvância do analito, pois essas diferenças podem provocar variações na cinética de vaporização do elemento.<sup>65</sup> Um exemplo desta interferência foi observado no trabalho realizado por Takada.<sup>72</sup> Os autores determinaram diversos metais em amostras de aço. Os sinais analíticos obtidos apresentaram um pico duplo, como consequência da ocorrência de duas localizações diferentes do analito na estrutura do aço. Nestes casos, a utilização de modificadores químicos pode ajudar a contornar estas dificuldades.<sup>65</sup>

#### 2.6.1.4.3 Massa de amostra

A representatividade, a precisão e a exatidão dos resultados estão diretamente relacionadas à homogeneidade da amostra. Entretanto a homogeneidade pode ser afetada pela utilização de massas pequenas de amostra. Belarra *et. al.*<sup>73</sup> avaliaram a influência da massa de amostra na

<sup>64</sup> ZEISLER, R.; *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 376–379.

<sup>65</sup> BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

<sup>72</sup> TAKADA, K.; HIROKAWA, K.; *Talanta* 29 (1982) 849-855.

<sup>65</sup> BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

<sup>73</sup> BELARRA, M. A.; CRESPO, C.; MARTÍNEZ-GARBAYO, M. P.; CASTILLO, J. R.; *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1855-1860.

determinação de Cu em um complexo vitamínico por DSS-GF AAS. Para isso, foram realizadas 293 medidas cujas massas variaram de 0,1 a 1,3 mg. Segundo os autores, o emprego de massas pequenas, entre 0,1 a 0,3 mg apresentaram valores superestimados. Em contrapartida, massas superiores, entre 1,1 e 1,3 mg de amostra, geraram valores subestimados. Os valores subestimados podem ser explicados pelo aumento da influência do resíduo da matriz presente no atomizador, que pode ter alterado a cinética de vaporização do analito. No entanto, para os valores superestimados, os autores não encontraram nenhuma explicação plausível. Foi também verificado que o RSD diminuiu com o aumento da massa de amostra.

Nomura *et. al.*<sup>68</sup> avaliaram a influência do tamanho da partícula e da quantidade de massa de amostra introduzida no atomizador sobre a homogeneidade e conseqüentemente, sobre a precisão e exatidão dos resultados através da determinação de Cu e Zn em amostra de fígado bovino por DSS-GF AAS. O estudo foi realizado com 10 amostras utilizando massas entre 9 e 150 µg. Segundo os autores, o emprego de massas superiores a 50 µg apresentou uma boa homogeneidade (constante de homogeneidade,  $H_e < 10$ ) com baixos desvios-padrões.

#### 2.6.1.5. Extensão da faixa de trabalho em DSS-GF AAS

A alta sensibilidade da DSS-GF AAS pode ser um problema na determinação de analitos presentes em concentrações mais elevadas, pois a técnica apresenta uma estreita faixa linear de calibração e grandes dificuldades de diluição da amostra. Esta limitação pode ser solucionada através da seleção de linhas espectrais menos sensíveis do analito, ou ainda, mantendo o fluxo de argônio durante a etapa de atomização. Esses procedimentos diminuem a sensibilidade da determinação dos analitos, e permitem também introduzir uma quantidade maior de amostra para o interior do atomizador. O fluxo de argônio durante a etapa de atomização também pode ser utilizado para minimizar as interferências na fase gasosa quando a matriz é vaporizada juntamente com o analito.<sup>9</sup>

<sup>68</sup> NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; OLIVEIRA, P. V.; *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 673 – 680.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

Instrumentos de absorção atômica equipados com corretores de fundo baseado no efeito Zeeman também permitem a redução da sensibilidade com a aplicação de um campo magnético (modo *3-field*).<sup>74</sup> Alguns autores, porém, afirmam que a utilização de linhas espectrais menos sensíveis e/ou fluxo de argônio durante a etapa de atomização pode diminuir a precisão. No entanto, essa desvantagem é desprezível quando comparada com a diminuição na exatidão causada pela heterogeneidade da amostra.<sup>9</sup>

#### **2.6.1.6. Principais técnicas de correção de interferências empregadas na GF AAS**

As técnicas de AAS não permitem medir a absorção atômica exclusivamente devido ao vapor atômico do analito presente no atomizador, sendo necessário medir a absorção total (específica do analito e não específica), e então subtrair o valor da absorção não específica. Entre as técnicas utilizadas para a correção do sinal de fundo estão: o corretor com fonte contínua (lâmpada de deutério), corretor Smith-Hieftje e corretor baseado no efeito Zeeman.<sup>61</sup>

Entre os requisitos para um sistema ideal de correção do sinal de fundo estão:<sup>61</sup>

- I. A atenuação do sinal de fundo deve ser medida exatamente no comprimento de onda do analito
- II. A atenuação do sinal de fundo deve ser medida no atomizador exatamente na mesma posição em que é feita a medida da absorção total
- III. Se a absorção muda com o tempo, a absorção total e a atenuação de fundo devem ser medidas ao mesmo tempo, ou numa seqüência muito rápida, de modo que as mudanças na absorção de uma medida em relação à seguinte sejam pequenas

<sup>74</sup> RESANO *et. al.*; *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 142–149.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Third, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.

- 
- IV. A absorção total e a atenuação do sinal de fundo devem ser medidas com um feixe com a mesma intensidade e geometria
  - V. A técnica empregada para medir e corrigir a atenuação do sinal de fundo deve ser aplicável para todos os elementos

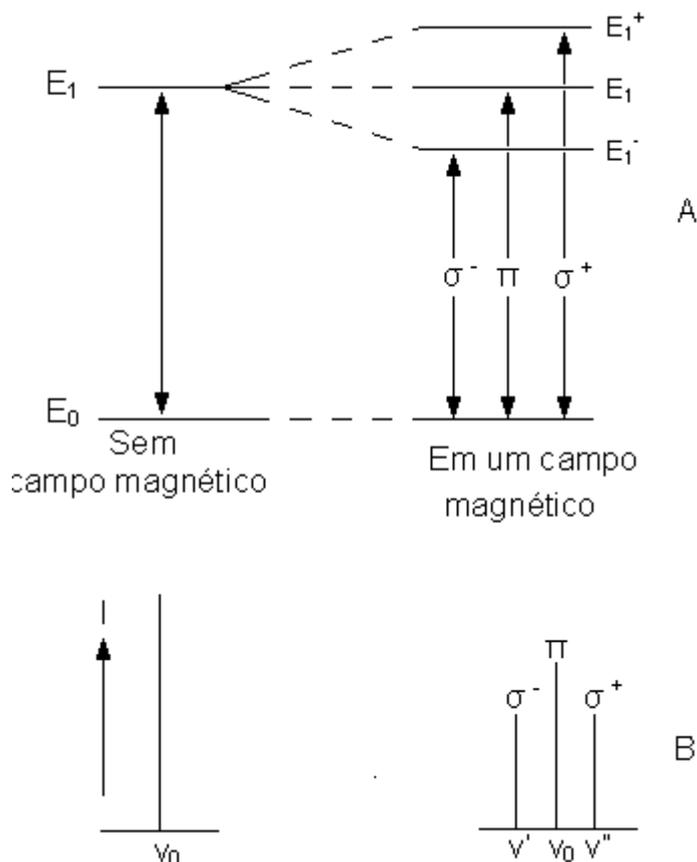
Entretanto, nenhuma das técnicas disponíveis para a medição e correção da atenuação do sinal de fundo apresenta todos os requisitos citados acima.<sup>61</sup>

#### **2.6.1.7.1. Correção do sinal de fundo por efeito Zeeman**

O efeito Zeeman consiste no desdobramento dos níveis de energia nos átomos, sob um campo magnético, o que resulta na separação das linhas espectrais. Esse efeito foi descoberto pelo físico holandês Pieter Zeeman no ano de 1897.<sup>61</sup> A Figura 4 demonstra através de um esquema o desdobramento das linhas espectrais.

---

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Third, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.



**Figura 4.** Efeito Zeeman normal. A: desdobramento em níveis de energia; B: desdobramento nas linhas espectrais. (Figura adaptada de Welz<sup>75</sup>).

Nos casos mais simples, a linha espectral sob um campo magnético é desdobrada em três componentes: uma componente central, denominada  $\pi$  cuja energia e frequência não são mudadas em relação ao comprimento de onda original, e duas componentes com energia levemente superior e inferior em relação à energia atômica original, denominadas  $\sigma^+$  e  $\sigma^-$ , respectivamente. Estas últimas componentes são deslocadas para a direita e para a esquerda da linha espectral original. A extensão do desdobramento das linhas depende da força do campo magnético aplicado. A distribuição da energia ou intensidade entre as três

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1985.

componentes é:  $\sigma^+ : \pi : \sigma^- = 25 : 50 : 25$ . A soma das componentes individuais é igual a 100, o que corresponde à intensidade da linha original.<sup>75</sup>

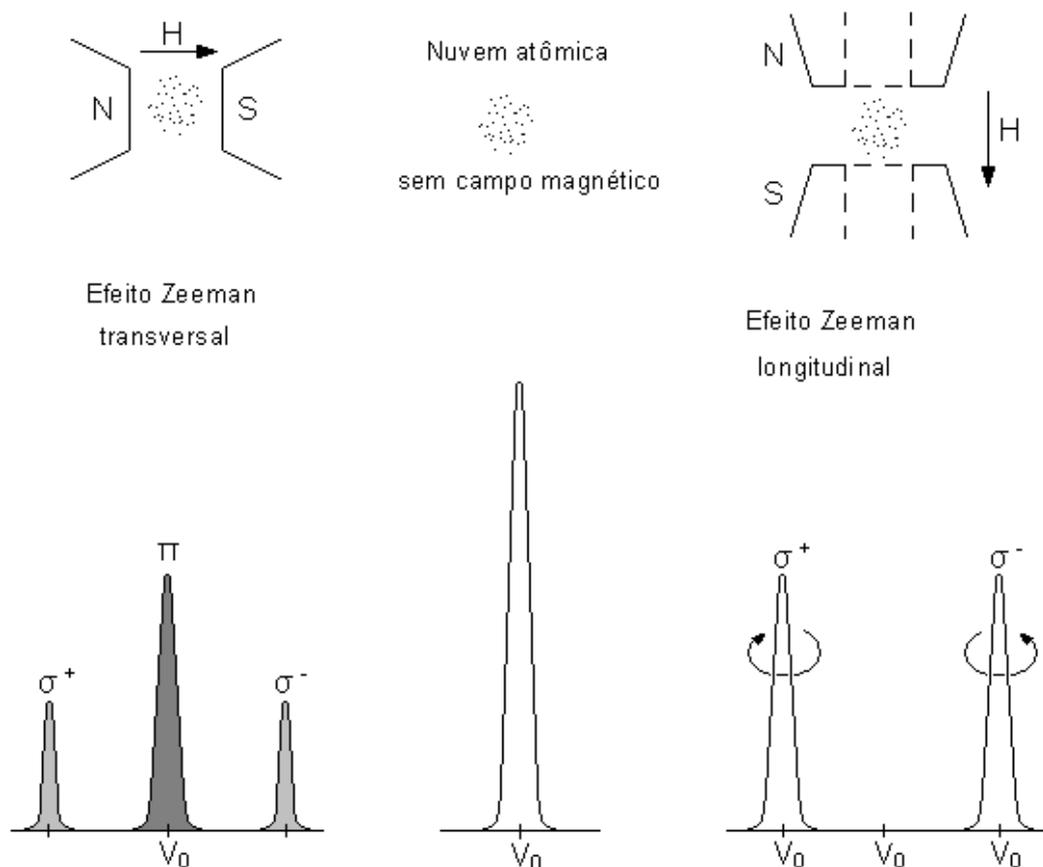
O desdobramento da linha espectral em três componentes ocorre somente para as linhas singleto ( $S=0$ ) e é designado efeito Zeeman normal. As linhas denominadas singleto são as linhas ressonantes principais dos Grupos II A e II B da tabela periódica dos elementos químicos (Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Zn, Cd e Hg). Todas as demais linhas exibem um efeito Zeeman anômalo, onde a linha espectral se desdobra em mais do que três componentes. No efeito Zeeman anômalo, a componente  $\pi$  também é dividida em várias linhas.<sup>75</sup>

Simultaneamente, com o desdobramento das linhas espectrais, a radiação também é polarizada. O plano de polarização varia de acordo com a direção do campo magnético e também de acordo com a direção de observação (na mesma direção do campo ou perpendicular ao campo). A componente  $\pi$  é polarizada linearmente numa direção paralela ao campo magnético, enquanto as componentes  $\sigma$  são polarizadas circularmente numa direção perpendicular ao campo magnético. Se o campo magnético é aplicado perpendicularmente (ângulo reto) a fonte de radiação, a componente  $\pi$  é polarizada paralelamente ao campo magnético, enquanto as componentes  $\sigma$  são polarizadas perpendicularmente ao campo magnético. Esta configuração é denominada efeito Zeeman transversal. Quando o campo magnético está montado paralelamente à fonte de radiação, a configuração é denominada efeito Zeeman longitudinal. Neste caso, a componente  $\pi$  desaparece do espectro e somente as componentes  $\sigma^+$  e  $\sigma^-$  polarizadas circularmente podem ser observadas.<sup>75</sup>

A Figura 5 apresenta um esquema demonstrando estas duas configurações, longitudinal e transversal.

---

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag Gmbh, Alemanha, 1985.



**Figura 5.** Efeito Zeeman transversal (campo magnético perpendicular ao feixe de radiação) e efeito Zeeman longitudinal (campo magnético paralelo à fonte de radiação), (figura adaptada de Welz<sup>75</sup>)

Como mencionado anteriormente, o campo magnético provoca um desdobramento nos níveis de energia nos átomos. Isso significa que o campo magnético não pode ser posicionado de maneira arbitrária no feixe de radiação, este deve ser aplicado na nuvem atômica. Por esta razão, o campo magnético deverá ser aplicado na nuvem atômica na fonte de radiação primária ou no atomizador.<sup>75</sup>

Quando o campo magnético é aplicado na fonte de radiação, é chamado de efeito Zeeman direto. Nesse caso, os níveis de energia dos átomos emissores são desdobrados e, deste modo, o desdobramento das linhas espectrais podem ser observadas, além da polarização variada dos componentes. Se o campo magnético é aplicado no atomizador, o efeito Zeeman é denominado inverso,

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag Gmbh, Alemanha, 1985.

---

neste caso a fonte de radiação emite linhas espectrais não desdobradas, como usualmente observado em AAS. No efeito Zeeman inverso, os níveis de energia dos átomos absorvedores são desdobrados, e assim, suas características de absorção são totalmente mudadas. Deste modo, a linha ressonante principal emitida pela fonte de radiação será absorvida somente pela componente  $\pi$  do analito, pois possui comprimento de onda igual ao original, e as componentes  $\sigma$  não irão absorver essa radiação, pois possuem comprimentos de onda ligeiramente diferentes. Para o efeito Zeeman direto, a absorção pode ser medida nos comprimentos de onda das componentes  $\sigma$ , pois ambas componentes,  $\sigma$  e  $\pi$ , são emitidas pela fonte de radiação.<sup>75</sup>

Características como orientação do campo magnético em relação à fonte de radiação (efeito Zeeman longitudinal ou transversal), aplicação do campo magnético de forma constante ou alternado e disposição do campo magnético (montado na fonte de radiação – direto; ou no atomizador – inverso) permitem oito diferentes configurações que constam na Tabela 1.<sup>61</sup>

---

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag Gmbh, Alemanha, 1985.

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Third, Wiley-VCH Verlag Gmbh, Alemanha, 1999.

**Tabela 1.** Configurações de aplicação do efeito Zeeman na correção de fundo por AAS.

Localização do campo magnético	Orientação do campo relação feixe de radiação	Tipo de campo magnético	Componentes adicionais requeridos	Particularidades
Fonte (direto)	Paralelo (longitudinal)	Constante	Polarizador rotatório	Aplicado em casos excepcionais
		Alternado	Nenhum	
	Perpendicular (transversal)	Constante	Polarizador rotatório	
		Alternado	Polarizador fixo	
Atomizador (inverso)	Paralelo (longitudinal)	Constante	-	Não aplicado em AAS
		Alternado	Nenhum	
	Perpendicular (transversal)	Constante	Polarizador rotatório	
		Alternado	Polarizador fixo	

As configurações, em que o campo magnético é longitudinal e constante, tanto na fonte como no atomizador, não pode ser aplicado em AAS, pois a componente  $\pi$  desaparece completamente do espectro. Assim, na configuração inversa (magneto no atomizador) os átomos do analito não podem absorver radiação da linha analítica, enquanto na configuração direta (magneto na fonte) nenhuma radiação é emitida na linha analítica. Para comparação das seis configurações restantes, aspectos como características instrumentais e

espectroscópicas, sensibilidade, limite de detecção e linearidade da curva de calibração devem ser levados em consideração.<sup>61</sup>

Na configuração com efeito Zeeman inverso, campo alternado e transversal a medida da absorção total (absorção atômica e sinal de fundo) é feita na fase em que o campo magnético está desligado. Quando o campo magnético está ligado, é medido somente o sinal de fundo, pois há um polarizador fixo orientado num plano perpendicular ao campo magnético, fazendo com que somente as componentes  $\sigma$  absorvem a radiação, excluindo a componente  $\pi$ .<sup>75</sup>

Na configuração com efeito Zeeman inverso, campo alternado e longitudinal, a absorção total é medida durante a fase em que o campo magnético está desligado. Na fase em que o campo magnético está ligado, a componente  $\pi$  desaparece do espectro pelo efeito Zeeman, e então o sinal de fundo é medido, pois somente as componentes  $\sigma$  absorvem radiação. Nessa configuração, a componente  $\pi$  desaparece do espectro devido ao fato que uma onda eletromagnética não pode se propagar na direção de um vetor elétrico. Essa configuração apresenta a vantagem de dispensar a utilização de componentes ópticos adicionais e, conseqüentemente, não há perdas de intensidade luminosa.<sup>61</sup>

Em relação aos aspectos instrumentais, o corretor Zeeman inverso é preferido, pois quando se utiliza corretor Zeeman direto há necessidade da utilização de fontes de emissão especiais. Entretanto quando o magneto é colocado no atomizador, podem-se utilizar lâmpadas de cátodo oco convencionais.<sup>61</sup> Um campo magnético homogêneo deve possuir um fluxo de densidade na ordem de 1 Tesla (10 kGauss) para uma satisfatório desdobramento e separação das componentes  $\sigma^-$ ,  $\sigma^+$  e  $\pi$ .<sup>75</sup>

O desenvolvimento dos espectrômetros de absorção atômica com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman pode ser dividido, historicamente, em três gerações. Os equipamentos da terceira geração utilizam uma frequência do campo magnético de pelo menos 200 Hz, o que permite um aumento do número de medidas por unidade de tempo, e também uma melhor homogeneidade do

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Third, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1985.

campo através do atomizador. Estes equipamentos podem operar no modo *2-field* (2F) e no modo *3-field* (3F), que possibilita um aumento de, pelo menos 5 vezes a faixa de trabalho da curva analítica.<sup>76</sup>

No modo 2F, a medida é feita na fase do campo magnético  $H=H_{\text{zero}}$  (desligado) que corresponde à absorbância total e na fase do campo magnético  $H=H_{\text{max}}$  (ligado) que corresponde ao sinal de fundo. A intensidade é avaliada conforme Equação 2.<sup>76</sup>

$$2F\text{-modo: } AA = A_{H=\text{zero}} - A_{H=\text{Max}} \quad \text{Equação 2.}$$

Onde

$$A_{H = \text{zero}} = \log \frac{\bar{I}_0(AZ^*)}{I_{\text{zero}(x=1,3,5\dots)}} \quad e$$

$$A_{H = \text{max}} = \log \frac{\bar{I}_0(AZ^*)}{(I_{\text{max}(x=2,4\dots)} + I_{\text{max}(x=4,6\dots)})/2}$$

O termo  $\bar{I}_0(AZ^*)$  significa a intensidade média da linha sem absorção;  $I_{\text{zero}(x=1,3,5\dots)}$  corresponde aos valores da intensidade da linha adjacente com campo magnético desligado ( $H=\text{zero}$ ), a partir do qual os valores de absorbância total ( $A_{H=\text{zero}}$ ) são gerados;  $(I_{\text{max}(x=2,4\dots)})$  e  $(I_{\text{max}(x=4,6\dots)})$  são os valores da intensidade da linha adjacente com campo magnético ligado ( $H=\text{máximo}$ ), a partir do qual os valores médios do sinal de fundo ( $A_{H=\text{Max}}$ ) são gerados;  $x=1, 2, 3, \dots$  é o número de um único ciclo “x” de medida usada para o cálculo da absorção atômica (AA).<sup>76</sup>

O termo 3F significa uma mudança de ciclo que consiste em uma seqüência com de três fases do campo magnético:  $H=H_{\text{zero}}$  (desligado),  $H=H_{\text{med}}$  (ligado) e  $H=H_{\text{max}}$  (ligado). Na fase  $H=H_{\text{med}}$ , trabalha-se com campo magnético intermediário. Medidas obtidas a partir das fases  $H=H_{\text{med}}$  e  $H=H_{\text{max}}$  fornecem uma

<sup>76</sup> GLEISNER, H.; EICHARDT, K.; WELZ, B.; *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 1663–1678.

curva analítica com sensibilidade reduzida. Esta redução depende da força intermediária aplicada. A redução da sensibilidade resulta do fato que o perfil de absorção das duas componentes  $\sigma$ , estão mais ou menos separadas em relação à posição do perfil da lâmpada de cátodo oco. A atenuação de fundo sempre é medido com a força no campo magnético máximo ( $H=H_{\max}$ ). No modo 3F a medida é feita com o sinal obtido com aplicação de um campo magnético máximo e médio de acordo com a Equação 3.<sup>76</sup>

$$3F\text{-modo: } AA = A_{H=\text{med}} - A_{H=\text{Max}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde

$$A_H = \text{med} = \log \frac{\bar{I}_0(AZ^*)}{I_{\text{med}(x=1,3,5\dots)}} \quad e$$

$$A_H = \text{max} = \log \frac{\bar{I}_0(AZ^*)}{(I_{\text{max}(x=2,4\dots)} + I_{\text{max}(x=4,6\dots)}) / 2}$$

Onde  $I_{\text{med}(x=1,3,5\dots)}$  são os valores da intensidade da linha ajcente com campo magnético ligado ( $H=\text{médio}$ ).

Se não houver prejuízo da sensibilidade provocado pelo espelhamento Zeeman anômalo, na maioria das vezes, os limites de detecção obtidos em espectrômetros equipados com corretor por efeito Zeeman são melhores que aqueles obtidos com corretor com fonte contínua, pois nestes há uma lâmpada de deutério como fonte adicional de ruído.<sup>61</sup> Além disso, com o uso de corretores baseados no efeito Zeeman não é necessário equalizar as intensidades das fontes de radiação (lâmpada de cátodo oco e de deutério), evitando deste modo problemas de alinhamento das lâmpadas.<sup>75</sup>

<sup>76</sup> GLEISNER, H.; EICHARDT, K.; WELZ, B.; *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 1663–1678.

<sup>61</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Third, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.

<sup>75</sup> WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, Second, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1985.

### 2.6.1.8. Modificadores químicos

A técnica de GF AAS requer, idealmente, uma vaporização seletiva do analito a fim de obter uma boa sensibilidade, o que, na maioria das vezes, é obtido através de uma otimização do programa de temperatura. Entretanto, algumas vezes é necessária a utilização de modificadores químicos para ajudar corrigir os efeitos adversos causados por algumas matrizes.

O conceito de modificador químico foi formulado por Ediger em 1973.<sup>77</sup> Segundo o autor, modificadores químicos podem ser definidos como compostos que são adicionados no forno de grafite (atomizador) simultaneamente com a amostra e diminuem drasticamente os efeitos de matriz.

O mecanismo de ação da maioria dos modificadores químicos consiste na remoção da matriz da amostra durante a etapa de pirólise, onde compostos do analito permanecem no atomizador. Isto é obtido principalmente, através de duas maneiras: pela conversão de compostos da matriz em compostos mais voláteis ou diminuindo drasticamente a volatilidade do analito, permitindo desta maneira, a utilização de temperaturas maiores na etapa de pirólise.<sup>78</sup> De maneira geral, na prática, o analito pode encontrar-se em três situações genéricas em relação à matriz onde este se encontra:<sup>9</sup>

- I. Analito mais volátil que a matriz
- II. Volatilidades semelhantes entre a matriz e o analito
- III. Analito menos volátil que a matriz

No primeiro caso, quando a analito é mais volátil que a matriz, a etapa de pirólise é menos importante. No entanto, a etapa de vaporização/atomização é essencial, pois a temperatura de atomização tem que ser a melhor possível para promover uma eficiente vaporização do analito, com a mínima vaporização da matriz. Esta é uma situação que pode ser observada na análise de certas amostras inorgânicas, quando se desejam determinar analitos voláteis como cádmio e mercúrio.<sup>9</sup> Normalmente, esta situação não requer a utilização de

<sup>77</sup> EDIGER, R.; D.; *At. Absorpt. Newsletter* 14 (1975) 127-130.

<sup>78</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905-921.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

modificadores químicos para estabilizar termicamente os analitos durante a etapa de pirólise, mas para melhorar a vaporização do analito das matrizes das amostras devido ao efeito de estabilização da própria matriz.<sup>9</sup>

Se a matriz é mais volátil que o analito, a etapa de pirólise é extremamente importante, pois uma otimização da temperatura de pirólise permite a vaporização/atomização do analito de maneira seletiva, prevenindo interferências espectrais, pois a matriz é eliminada antes da etapa de atomização.<sup>9</sup> Entretanto, alguns modificadores químicos podem ser utilizados de modo a facilitar a modificação/eliminação da matriz sem perda de analito.<sup>9</sup>

A situação é mais complicada quando o analito e a matriz da amostra possuem temperaturas de volatilização semelhantes, como ocorre na determinação de analitos voláteis em matrizes orgânicas. Para essa situação, a escolha de um modificador químico adequado é de fundamental importância.<sup>9</sup> Neste caso, podem-se utilizar modificadores químicos que alteram as propriedades físico-químicas do analito e permitem a estabilização/eliminação da matriz ou o aumento da volatilidade do analito de modo a atingir a vaporização seletiva.

O modificador químico poderá ser adicionado na forma de solução, gás ou na forma sólida, sendo necessário o desenvolvimento de um programa de temperatura adequado para assegurar uma eficiente interação entre o modificador e o analito que se deseja determinar.<sup>9</sup> O conhecimento sobre o mecanismo de ação dos modificadores químicos pode ajudar na seleção do melhor modificador a ser utilizado na determinação de um dado analito por GF AAS, uma vez que, o entendimento destes mecanismos evita a execução de testes desnecessários utilizando um grande número de modificadores inadequados.<sup>78</sup> Uma vez que os processos químicos e físicos que ocorrem no sistema amostra-modificador estão presentes em grande número, não há consenso na literatura sobre o mecanismo de ação de grande parte dos modificadores. Outro problema encontrado durante o estudo dos mecanismos são as baixas concentrações do analito em relação à matriz, sendo que em certos casos essa proporção pode ser maior que  $10^7$  vezes.

---

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

<sup>78</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905-921.

Estes fatores levam a contradições substanciais em relação à descrição dos mecanismos de ação dos modificadores por diferentes autores.<sup>78</sup>

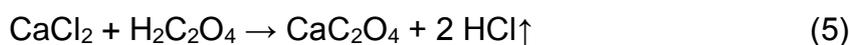
Um grande número de compostos são utilizados como modificadores químicos, entretanto, os mais efetivos e versáteis modificadores estão divididos nos seguintes grupos:<sup>78</sup>

- I. Ácido nítrico, ácido oxálico e os correspondentes sais de amônio
- II. Nitratos metálicos (exceto metais do grupo da platina)
- III. Fosfato de amônio
- IV. Carbetos
- V. Compostos orgânicos
- VI. Íons de metais de transição com alto potencial de oxidação (sais de W(VI), Mo(VI), Zr(IV), etc.)
- VII. Compostos do grupo da platina (exceto ósmio)

#### **2.6.1.8.1. Mecanismo de ação dos modificadores químicos HNO<sub>3</sub> e ácido oxálico**

Esses modificadores são empregados principalmente na análise de amostras cujas matrizes apresentam alta concentração de cloretos. A presença de grandes quantidades de cloreto pode trazer muitos problemas na determinação de elementos por GF AAS, pois muitos cloretos metálicos são voláteis nas baixas temperaturas utilizadas na etapa de pirólise, sendo que a evaporação de grande quantidade de matriz contendo cloreto pode aumentar o sinal de fundo. Além disso, a presença de cloro na fase gasosa no atomizador durante a etapa de atomização pode favorecer a dissociação incompleta ou recombinação de cloretos metálicos.<sup>78</sup>

O mecanismo de ação destes modificadores foi estudado por muitos autores e é baseado nas seguintes reações:



<sup>78</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905–921.

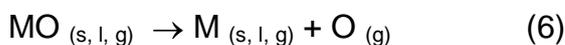
Nestes casos, o cloreto é eliminado do atomizador durante a etapa de pirólise na forma de espécies voláteis de HCl.<sup>78</sup>

### 2.6.1.8.2. Modificadores químicos orgânicos

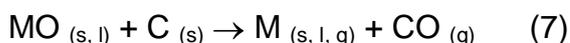
Embora a versatilidade dos modificadores químicos orgânicos seja menor que os modificadores baseados nos compostos metálicos do grupo da platina, os compostos orgânicos são bastante utilizados nos procedimentos analíticos, pois estes são efetivos para resolver algumas dificuldades analíticas específicas.<sup>78</sup> Os processos que levam à supressão dos efeitos negativos da matriz, quando utilizados modificadores orgânicos são relativamente bem estudados. A maioria das hipóteses para explicar o mecanismo de ação destes modificadores é baseada nas características redutoras dos modificadores orgânicos, equação 7, e dos produtos de sua decomposição térmica em atmosfera inerte.<sup>78</sup>

A hipótese de Regan e Warren<sup>79</sup> é baseada na existência de dois mecanismos principais de atomização para óxidos, em GF AAS, Equação 6 e 7:

#### Dissociação térmica:



Redução carbotérmica (atmosfera com argônio e carbono residual no atomizador):



Em relação a essa hipótese, uma mistura molecular de carbono ativo e compostos formados durante a decomposição térmica do composto orgânico com os componentes da amostra faz com que o mecanismo de atomização predominante seja um processo de redução relativamente rápido.<sup>78</sup> O processo de redução carbotérmica é responsável pelo aparecimento de um “pico de baixa temperatura”, enquanto que processos de dissociação térmica de óxidos levam à

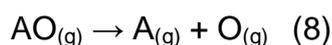
<sup>78</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905–921.

<sup>79</sup> REGAN, J. G. T.; WARREN, J.; *Analyst* 101 (1976) 220-221.

atomização em temperaturas relativamente maiores.<sup>80</sup> A mudança do sinal analítico para uma temperatura menor na presença de modificadores orgânicos torna possível a detecção do analito antes do surgimento de uma significativa absorção de fundo causada pela evaporação da matriz da amostra, diminuindo drasticamente os efeitos de matriz.<sup>78</sup>

A presença de oxigênio livre no interior do forno de grafite pode causar problemas na determinação de elementos que formam óxidos estáveis na etapa de atomização.<sup>78</sup> Contudo, a utilização de modificadores orgânicos diminui a concentração de oxigênio livre durante a etapa de atomização.<sup>78</sup> A reatividade, em relação à diminuição da quantidade de oxigênio na unidade de atomização, aumenta na seguinte ordem: grafite pirolítico < grafite policristalino < carbono ativo. Este último é formado a partir da decomposição dos modificadores orgânicos. Esta ordem crescente é decorrente do aumento da reatividade devido à diferença na superfície de contato do carbono com o oxigênio, pois parte da estrutura cristalina do grafite pirolítico (fechada), para uma estrutura relativamente mais porosa (como a do grafite policristalino) até uma estrutura amorfa, como a do carbono amorfo ativo residual.<sup>78</sup>

A diminuição da concentração de oxigênio livre na fase gasosa na presença de modificadores orgânicos foi demonstrada por Gilchrist *et. al.*<sup>81</sup> que utilizou cromatografia gasosa para a análise direta da fase gás do forno de grafite e cálculos termodinâmicos. De acordo com o autor, a diminuição na concentração de oxigênio livre, é principalmente, devido à interação do oxigênio livre com os produtos gasosos (CO, H<sub>2</sub>) da decomposição térmica dos ácidos orgânicos. Como a concentração de oxigênio é reduzida, o equilíbrio da reação de dissociação dos óxidos gasosos dos analitos é deslocado para a direita (Equação 8), resultando em átomos de analito em menores temperaturas.<sup>78</sup>



<sup>80</sup> VOLYNSKII, A. B.; *Zh. Anal. Khim.* 50 (1995) 4.

<sup>78</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905-921.

<sup>81</sup> GILCHRIST, G. F. R.; CHAKRABARTI, C. L.; BYRNE, J. P.; *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 533-538.

Algumas hipóteses relacionam a mudança do aparecimento do sinal analítico, de elementos como o chumbo, na presença de modificadores orgânicos, como o ácido ascórbico, à formação de grafite pirolítico na superfície interna do tubo.<sup>82</sup> Entretanto, nem todos os compostos que geram carbono residual após a decomposição térmica são capazes de formar grafite nas temperaturas entre 2800 e 3000 °C.<sup>83</sup> A baixa estabilidade térmica do ácido ascórbico é uma característica dos compostos que formam carbono não grafitizável durante a decomposição térmica.<sup>83</sup> Além do mais, a formação de grafite é possível somente na presença de alguns metais que catalisam o processo de grafitização, entretanto, o chumbo não apresenta essas características.<sup>84</sup> O grau de grafitização é inversamente proporcional à proporção atômica O : H na maioria dos compostos orgânico.<sup>85</sup>

A mudança da temperatura do aparecimento do sinal analítico do chumbo na presença de modificadores orgânicos foi avaliado por Byrne.<sup>86</sup> O objetivo deste estudo foi avaliar o principal mecanismo de ação dos modificadores orgânicos. Para isso, os autores investigaram o efeito no sinal do chumbo na presença de ácido ascórbico e ácido oxálico. Este último composto não produz carbono residual na sua decomposição térmica. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a mudança da temperatura do aparecimento do sinal de chumbo não é somente pela mudança da superfície de contato da plataforma, camada de carbono amorfo, gerado pela decomposição do ácido ascórbico durante a etapa de pirólise, pois o tempo de aparecimento do sinal atômico do chumbo na presença de ácido oxálico, que não apresenta a formação de carbono residual, também mudou. Segundo os autores, o efeito dos ácidos ascórbico e oxálico na mudança de temperatura do aparecimento do sinal atômico do chumbo pode ser explicado, principalmente, pelas reações que ocorrem na fase gasosa entre moléculas contendo chumbo (como PbO) e gases redutores (H<sub>2</sub> e CO) formados pela decomposição destes ácidos na etapa de pirólise.

<sup>82</sup> IMAI, S.; HAYASHI, Y.; *Chem.* 63 (1991) 772-775.

<sup>83</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 50 (1995) 2-29.

<sup>84</sup> OYA, A.; OTANI, S.; *Carbon* 17 (1979) 131-137.

<sup>85</sup> OBERLIN, A.; VILLEY, M.; COMBAZ, A.; *Carbon.* 18 (1980) 347-353.

<sup>86</sup> BYRNE *et. al.*; *Anal. Chem.* 65 (1993) 1207-1272.

### 2.6.1.8.3. Modificadores químicos baseados no grupo da platina

A utilização de cloreto de paládio e platina como modificadores químicos na GF AAS foi proposto por Shan<sup>87</sup> em 1979. Atualmente, os metais do grupo da platina (PGMs) e também dos elementos do grupo 4 a 6 da tabela periódica são considerados os mais eficientes e versáteis modificadores químicos. Sua combinação com outros modificadores, como  $Mg(NO_3)_2$ ,<sup>88</sup> compostos orgânicos,<sup>89</sup> compostos formadores de carbetos<sup>90</sup> é freqüentemente utilizada na determinação de elementos por GF AAS. No entanto, em algumas situações, os modificadores do grupo da platina não suprimem os efeitos da matriz. Para prevenir estes efeitos e utilizar os modificadores com máxima eficiência é necessário conhecer o mecanismo de ação do modificador com o analito.<sup>91</sup> Entretanto, diferentes e contraditórios mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito destes modificadores.<sup>92</sup>

Uma das hipóteses da ação dos modificadores no grupo da platina é baseada na formação e da subsequente ativação dos metais em compostos intercalados na grafite. Estes metais ativados formam ligações covalentes muito fortes com elementos relativamente voláteis, levando à sua estabilização a altas temperaturas.<sup>93</sup>

O mecanismo proposto por Ortner<sup>92</sup> é baseado na ligação do analito nos átomos de paládio, os quais foram ativados pela intercalação nas camadas da grafite. Existem ligações químicas entre o sistema de elétrons  $\pi$  do retículo da grafite e átomos de paládio na superfície externa do *cluster* Pd-grafite. Os elétrons que faltam para atingir a configuração dos gases nobres para os átomos de paládio são, portanto, retirados do sistema  $\pi$  da grafite. Este fato causa uma elevação na densidade eletrônica nos átomos de paládio, que são ativados para uma interação, por exemplo, com  $As(OH)_3$ , funcionando como doadores de

<sup>87</sup> SHAN, X. Q.; NI, Z. M.; *Acta Chim. Sci.* 37 (1979) 261-266.

<sup>88</sup> WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R.; *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1257-1271.

<sup>89</sup> VOTH-BEACH, L. M.; SHRADER, D. E.; *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 45-50.

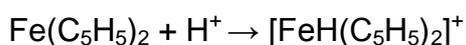
<sup>90</sup> TSALEV *et. al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 1003-1009.

<sup>91</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 59 (2004) 502-520.

<sup>93</sup> ORTNER *et. al.*; *Modifiers in ETAAS-How do they work? 2nd European Furnace Symposium, Book of Abstracts, O IV/2, St. Petersburg, 1996.*

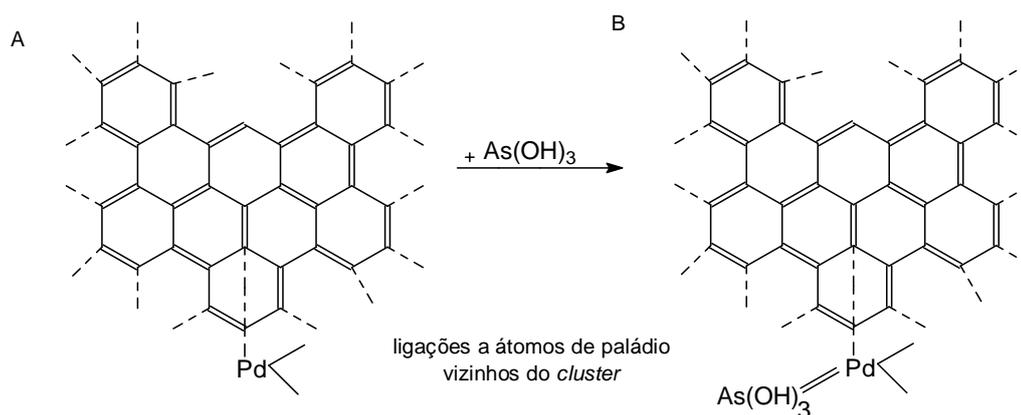
<sup>92</sup> ORTNER *et. al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1835-1853.

elétrons. Este processo é análogo os compostos ferrocenos onde os átomos de ferro também exibem propriedade de doadores de elétrons:



No entanto, se o Pd atuasse como receptor de elétrons, então analitos com alto estado de oxidação (por exemplo, As(V) ou cátions metálicos como  $\text{Cd}^{+2}$  ou  $\text{Pb}^{+2}$ ) não poderiam formar ligações com o Pd. A ligação entre o sistema elétrons  $\pi$  do retículo da grafite e os átomos de Pd na periferia do *cluster* estão simbolizadas por uma linha perpendicular na Figura 6 A. Deste modo, os átomos de paládio ativados reagem, por exemplo, com ácido arsênico da mesma maneira indicada na Figura 6 B. Cabe enfatizar, que somente os átomos de Pd ligados ao *clustes* serão ativados. Isto está de acordo com a observação que o analito já estaria ligando durante a etapa de secagem. Esta ligação não é destruída pelo aumento da temperatura, mesmo que a redução do paládio ocorra na etapa de pirólise. Também deve ser enfatizado que o domínio do Pd como modificador é em uma região abaixo da superfície da grafite, em uma profundidade em torno de 10  $\mu\text{m}$ , ou seja, o equivalente ao volume da porosidade aberta e domínios adjacentes entre as camadas de grafite e a estrutura policristalina. Cabe ressaltar também, que a forte ligação do analito ao Pd, praticamente suprime a sua mobilidade na etapa de pirólise. Assim, átomos de analito não podem difundir para o interior da superfície de grafite. Desta maneira, é minimizada a perda de analito durante a etapa de pirólise.<sup>92</sup>

<sup>92</sup> ORTNER *et. al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1835–1853.



**Figura 6.** (A) representação da ligação química formada entre o Pd e a grafite, (B) ativação do Pd pela sua interação na grafite, que desta maneira atua como doador de elétrons para outros metais (Adaptado de Ortner *et. al.*<sup>92</sup>).

O estudo realizado por Yan e Ni,<sup>94</sup> Yan-Zhong e Zhe-Ming<sup>95</sup> sugere que o mecanismo de ação dos modificadores do grupo da platina é baseado na formação de compostos de baixa volatilidade entre os elementos do grupo da platina e os analitos. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não apresentam uma informação sobre a composição dos compostos formados.<sup>91</sup>

O mecanismo proposto por Volynskii<sup>96</sup> também, sugere que a ação dos modificadores do grupo da platina é baseada na formação de compostos com baixa volatilidade entre o analito e os elementos do grupo da platina. O autor sugere que a primeira etapa na formação destes compostos é a redução dos óxidos do analito no atomizador catalisado pelos modificadores do grupo da platina. O Estudo feito por Volynskii<sup>91</sup> demonstrou que a adição de cloreto de paládio diminui, significativamente, a temperatura de redução do óxido do analito no interior do atomizador, confirmando os estudos realizados anteriormente pelo mesmo autor<sup>96</sup>, o qual sugere que os elementos do grupo da platina possuem propriedades catalíticas.

<sup>92</sup> ORTNER *et. al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1835–1853.

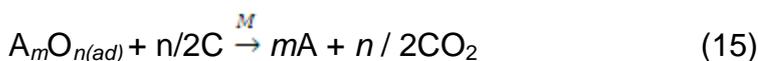
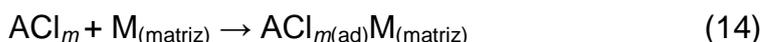
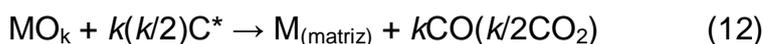
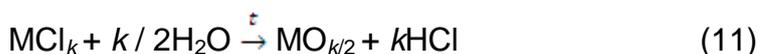
<sup>94</sup> YAN, X. P.; NI, Z. M.; *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1315-1323.

<sup>95</sup> YAN-ZHONG, L.; ZHE-MING, N.; *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 229-241.

<sup>91</sup> VOLYNSKII, A. B.; *J. Anal. Chem.* 59 (2004) 502–520.

<sup>96</sup> VOLYNSKII, A. B.; Available from VINITI, Moscow 89 n. 4977 (1989)

De acordo com Volynsky,<sup>97</sup> os dados da literatura indicam que o principal mecanismo de ação dos modificadores do grupo da platina pode ser descrito conforme esquema abaixo:



Onde: M = modificador; A = analito; C\* = sítios ativos na superfície da grafite;

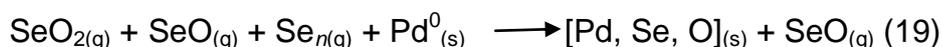
Os modificadores PMG no esquema é representado como cloreto, pois nesta situação ele é o mais empregado. Os processos (10) - (14) ocorrem durante a etapa de secagem e início da etapa de pirólise. Os processos (15) – (18) ocorrem em temperaturas mais altas durante a etapa de pirólise.<sup>97</sup> Embora, o esquema apresenta a adsorção dos compostos do analito somente nos PGMs elementares, estes também podem estar adsorvidos nos óxidos PGMs. Como este é um esquema geral, algumas etapas podem não contribuir para a estabilização de analitos em particular.<sup>97</sup> Por exemplo, a taxa do processo (18) pode ser crítica somente para elementos com relativo baixo ponto de ebulição, como selênio, cujo ponto de ebulição é 685°C.<sup>98</sup>

Após a etapa de secagem, supõe-se que todos analitos estão em contato direto com o modificador PGM usado.<sup>97</sup> No entanto, esta suposição pode não ser de fato verdadeira, particularmente na análise de amostras na forma de suspensões, e quando forem considerados os processos de redeposição do

<sup>97</sup> VOLYNSKY, A. B.; *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 103–150.

<sup>98</sup> VOLYNSKY, A. B.; KRIVAN, V.; TIKHOMIROV, S. V.; *Spectrochim. Acta Part B* 51(1996) 1253-1261.

analito dentro do atomizador.<sup>99,100</sup> De acordo com Fischer,<sup>101</sup> a equação corresponde neste caso pode ser descrita como:



Pode-se admitir que com a utilização dos fornos de grafite atuais os produtos de interação entre analitos e modificadores do PGM decompõem-se completamente durante a etapa de atomização. A efetividade dos compostos PGM como modificador é então determinada pelo processo (10) a (19).<sup>97</sup> Certamente, o mecanismo de ação dos modificadores PGM difere entre os analitos. Os processos (10) a (18) estão apresentadas como reações entre analitos e modificadores PGM, eles têm muito em comum com a interação entre modificadores PGM e componentes da matriz.<sup>97</sup> Por exemplo, de acordo com<sup>102</sup> sulfatos são reduzidos pela grafite na presença de paládio como modificador. A subsequente formação de PdS<sub>(s)</sub> pode ser responsável pela estabilização do enxofre no atomizador de grafite.

Diversos artigos disponíveis na literatura relatam a redução do sinal de fundo na presença de modificadores PGM.<sup>103-106</sup> Isto pode ser causado pelos efeitos dos ácidos usados para a estabilização das soluções dos modificadores. Sabe-se que altas concentrações de ácido nítrico eliminam o cloreto na forma de HCl durante a etapa de secagem e pirólise. No entanto, ácido nítrico diluído utilizado para estabilizar a solução modificadora faz com que este efeito não pode seja tão pronunciado.<sup>97</sup>

Uma razão mais provável para a diminuição do sinal de fundo é a baixa temperatura da transformação dos cloretos, sulfatos e óxidos, etc. presentes nas matrizes, nos correspondentes elementos livres, liberando-os em sua forma elementar. Esta transformação é catalisada pelos modificadores PGMs. De acordo com a reação (17), qualquer cloro elementar assim formado será removido

<sup>99</sup> STYRIS, D. L.; PRELL, L. J.; REDFIELD, D. A.; *Anal. Chem.* 63 (1991) 503-507.

<sup>100</sup> STYRIS *et. al.*; *Anal. Chem.* 63 (1991) 508-517.

<sup>101</sup> FISCHER, J. L.; RADEMEYER, C. J.; *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 975-983.

<sup>102</sup> MROCZEK, A.; WERNER, G.; WENNRICH, R.; SCHROEN, W.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* 361 (1998) 34-42.

<sup>103</sup> TITTARELLI, P.; BIFFI, C.; *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 409-415.

<sup>104</sup> RADEMEYER *et. al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 81-84.

<sup>105</sup> SAEED, K.; THOMASSEN, Y.; *Anal. Chim. Acta* 130 (1981) 281-287.

<sup>106</sup> SHIUE, M. Y.; CHAN, Y. C.; MIERZWA, J.; YANG, M. H.; *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 69-74.

<sup>97</sup> VOLYNSKY, A. B.; *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 103-150.

---

do atomizador durante a etapa de pirólise. Outros componentes da matriz como metais, enxofre e fósforo, no estado elementar podem interagir com paládio, formando soluções contendo sólidos estáveis ou compostos estequiométricos.<sup>107,108</sup> Estes compostos, juntamente com os compostos análogos contendo o analito, permanecem até a etapa de atomização. No entanto, sua dissociação a altas temperaturas não resulta no aparecimento de um sinal de fundo significativo.<sup>9</sup>

---

<sup>107</sup> RADZIUK, B.; THOMASSEN, Y.; *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 397–403.

<sup>108</sup> LI, M.; NI, Z.-M.; RAO, Z.; *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1381-1389.

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

---

#### 3.1. Instrumentação

As determinações por DSS-GF AAS nas amostras de ferro aminoácido quelato foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytik Jena (modelo AAS ZEE nit 60) com aquecimento transversal e sistema de correção de fundo baseado no efeito Zeeman transversal (inverso). Esse sistema de correção permite variar a intensidade do campo magnético de 0,05 a 0,8 T. Foi utilizado um sistema manual para a introdução da amostra sólida (modelo SSA 6E, Analytik Jena), tubos de grafite revestidos piroliticamente e plataformas de grafites especiais para amostras sólidas. As amostras foram pesadas em uma balança eletro-mecânica Sartorius (modelo M500P, Göttingen, Alemanha) com resolução de 0,001 mg e tara máxima de 2 g. Os principais parâmetros instrumentais utilizados na quantificação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb estão apresentados no Tabela 2. Cabe ressaltar, que a determinação de Mn foi realizada utilizando uma linha secundária, enquanto os demais analitos foram determinados utilizando a linha principal.

**Tabela 2.** Parâmetros operacionais para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb em amostras de ferro aminoácido quelato.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Fenda espectral (nm)	Corrente da LCO (mA)	Campo magnético (T)
Ag	328,1	0,8	4,0	0,8
As	193,7	0,8	7,0	0,8
Cr	357,9	0,8	4,0	0,6-0,8
Mn	403,1	0,2	7,0	0,6-0,8
Ni	232,0	0,2	5,5	0,6-0,8
Pb	283,3	0,8	4,0	0,8
Sb	217,6	0,2	7,0	0,8

Antes da quantificação dos analitos foi feita a otimização do programa de tempo e temperatura para cada elemento nas amostras sólidas e nas soluções de referência aquosa. Após, foi feita a curva de calibração do instrumento utilizando soluções de referência aquosa. Foi avaliada também, a necessidade da utilização de modificadores químicos, como paládio, ácido oxálico e água.

Para a comparação dos resultados, as amostras foram previamente decompostas em um forno de microondas Anton Paar (modelo Multiwave 3000 Graz, Áustria) equipado com frascos de quartzo com capacidade para 80 mL. Esse sistema possui sensores que permitem medir a temperatura e a pressão em tempo real em todos os frascos, com temperatura e pressão máximas de trabalho de 280 °C e 80 bar, respectivamente. Para este procedimento, as amostras foram pesadas em uma balança eletro-mecânica (Mettler Toledo modelo AG245, Alemanha) com resolução de 0,01 mg e transferidas para os frascos de quartzo.

As determinações de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas soluções obtidas por decomposição da amostra em sistema de alta pressão, foram feitas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV, Shelton, USA) na vista axial, equipado com nebulizador pneumático concêntrico (Meinhard modelo TR-50-C1, [www.meinhard.com](http://www.meinhard.com), Colorado, USA) acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, <http://www.geicp.com>, Austrália). Os dados foram obtidos através da integração dos sinais usando três pontos por pico e dois pontos para a correção de fundo.

Os elementos também foram determinados por ICP-MS (PerkinElmer, modelo ELAN DRCII, <http://www.perkinelmer.com>, USA), equipado com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., <http://www.geicp.com>, Austrália) e nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA).

### 3.2. Reagentes

A água utilizada neste trabalho foi destilada, desionizada em coluna de troca iônica e, desionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA), apresentando resistividade final de 18,2 MΩ cm. O ácido nítrico concentrado P.A. (Art. nº 100452.1000, 65%, 1,4 kg L<sup>-1</sup>, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi destilado

abaixo de seu ponto de ebulição em sistema de quartzo (Milestone, modelo duoPur 2.01E, Bergamo, Itália).

As soluções de calibração empregadas nas determinações dos elementos por DSS-GF AAS, ICP OES e por ICP-MS foram preparadas a partir da diluição de uma solução de referência comercial multielementar SCP33MS (SCP Science PlasmaCAL 140-130-325 Quebec, Canadá) de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em de  $\text{HNO}_3$  5% (v/v).

A solução de paládio foi preparada a partir de solução estoque de  $10 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$  de Pd, na forma de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  em  $\text{HNO}_3$  15% v/v (Merck Art. n° 107289, <http://www.merck.com>, Alemanha). Esta solução foi, posteriormente, diluída 50 vezes em  $\text{HNO}_3$  0,2% v/v. A solução de ácido oxálico ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_2$ , Merck, <http://www.merck.com>, Alemanha) 5% (m/v) foi preparada a partir da dissolução do ácido em água e a solução de ácido nítrico foi preparada a partir da diluição do ácido a 10% v/v em água.

O gás utilizado na determinação dos analitos por ICP OES, ICP-MS e GF AAS foi argônio de 99,999% de pureza proveniente da empresa White Martins (São Paulo, Brasil).

### 3.3. Materiais diversos

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados e descontaminados por imersão em  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) por, pelo menos, 24 h e, posteriormente, enxaguados com água ultra pura.

As amostras foram diluídas e armazenadas em frascos de polipropileno (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha) com capacidade máxima de 50 mL.

### 3.4. Amostras

As amostras de ferro aminoácido quelato são compostas por cerca de 19% de ferro e apresentam coloração marrom avermelhado e granulometria de 80 mesh, segundo informações do fabricante. Estas foram adquiridas diretamente de fornecedores de matéria-prima para a indústria farmacêutica. As amostras foram secas em estufa (Nova Ética, modelo 400/2ND 300) a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas.

### 3.5. Procedimento de decomposição

#### 3.5.1. Decomposição assistida por microondas em sistema fechado

Para o processo de decomposição da amostra de ferro aminoácido quelato foram transferidos cerca de 150 mg de amostra para frascos de quartzo e adicionado 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado.

Em seguida, os frascos foram fechados e colocados no interior do forno de microondas onde foram submetidos a um programa de aquecimento, conforme Tabela 3. Após o resfriamento, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno e aferidas a 30 mL com água purificada. Essas soluções foram, posteriormente, diluídas 4, 10 ou 100 vezes, conforme a técnica usada e o elemento determinado. As amostras em branco foram preparadas com os mesmos reagentes e submetidas ao mesmo tratamento descrito anteriormente.

**Tabela 3.** Programa de irradiação de microondas empregado para decomposição da amostras.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de irradiação (min)	Exaustão
1	1000	20	20	Fan1
2	1000	0	20	Fan 1
3	0	0	0	Fan 2

No programa de aquecimento do forno de microondas, a taxa de aumento de pressão máxima foi 0,8 bar s<sup>-1</sup>, a temperatura máxima 280 °C e a pressão máxima 80 bar.

---

### **3.6. Procedimentos para determinação dos elementos**

#### **3.6.1. Determinação de metais por DSS-GF AAS**

##### **3.6.1.1 Curvas de pirólise e atomização**

Inicialmente o forno e as plataformas de grafite foram descontaminadas através da aplicação de ciclos de aquecimento consecutivos até que os valores de branco fossem considerados desprezíveis (absorbância integrada inferior a 0,002 s).

Posteriormente, foram estabelecidas curvas de pirólise e atomização para cada elemento tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa. Isto possibilitou uma melhor avaliação do comportamento térmico de cada elemento na solução de referência aquosa e na amostra sólida. Os resultados obtidos para a amostra em absorbância integrada foram normalizados para 1 mg de amostra ( $s\ mg^{-1}$ ). Através da observação das curvas de pirólise e atomização para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa foi avaliada a utilização de diferentes modificadores químicos. Na avaliação do comportamento térmico e na determinação dos analitos foi utilizado modificador químico. Para As, Cr, Mn, Ni e Sb foi adicionada 20  $\mu$ L de água sobre a amostra. Entretanto para Ag e Pb foi adicionado 20  $\mu$ L de uma solução contendo 4  $\mu$ g de paládio. O programa de tempo e temperatura para quantificação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb, que foi otimizado com a construção das curvas de pirólise e atomização, está demonstrado na Tabela 4.

##### **3.6.1.2 Estudo do comportamento térmico da amostra**

Após o estudo do comportamento térmico dos analito tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa, foi estabelecida uma curva de perda de massa de amostra de ferro aminoácido quelato da plataforma de grafite durante o aumento da temperatura de pirólise. Para isto, pesou-se cerca de 5 mg de amostra na plataforma de grafite e, em seguida, foi aplicado um programa de aquecimento. Este programa foi constituído de uma etapa de secagem (120 °C, 10 °C s<sup>-1</sup>, 30 s), seguido de uma etapa de pirólise (100 a 1100 °C, 10 °C s<sup>-1</sup>, 60

---

s). Após o resfriamento, a plataforma foi retirada do forno de grafite e realizou-se a pesagem desta sem a remoção do material residual e, novamente, a plataforma foi introduzida no tubo de grafite para a aplicação de um novo ciclo de aquecimento com aumento crescente da temperatura da etapa de pirólise.

Os dados foram representados graficamente, com as temperaturas no eixo das abscissas ( $x$ ) e os valores de massa relativa, determinados considerando a massa inicial como 100%, no eixo das ordenadas ( $y$ ).

**Tabela 4.** Programa de aquecimento empregado para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb e Sb em ferro aminoácido quelato.

Etapa	Elemento						
	Ag	As	Cr	Mn	Ni	Pb	Sb
<b>Secagem</b>							
Temperatura, °C	120	120	120	120	120	120	120
Rampa, °C s <sup>-1</sup>	10	10	10	10	10	10	10
Tempo, s	40	40	40	40	40	40	40
Temperatura, °C	140	140	140	140	140	140	140
Rampa, °C s <sup>-1</sup>	10	10	10	10	10	10	10
Tempo, s	20	20	20	20	20	20	20
Vazão de Ar, L min <sup>-1</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Pirólise</b>							
Temperatura, °C	800	1000	1400	1200	1400	800	1200
Rampa, °C s <sup>-1</sup>	100	100	100	100	100	100	100
Tempo, s	30	30	30	30	30	30	30
Vazão de Ar, L min <sup>-1</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Atomização</b>							
Temperatura, °C	1800	2400	2600	2200	2600	2200	2200
Rampa, °C s <sup>-1</sup>	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Tempo, s	10	15	12	10	12	10	8
Vazão de Ar, L min <sup>-1</sup>	0,0	0,0	0-0,5	0-0,5	0-0,5	0,0	0,0

Etapa de limpeza\*: temperatura 2600 °C, rampa 3000 °C s<sup>-1</sup>, tempo 5 s.

\*Etapa de limpeza: aplicada após a etapa de atomização.

As curvas de calibração para todos os analitos investigados neste trabalho foram construídas pipetando quantidades crescentes de solução de referência aquosa diretamente na plataforma cujo volume foi variado de 1 a 20  $\mu\text{L}$ . As curvas de calibração foram estabelecidas a partir dos sinais em absorbância integrada. A amostra foi pesada diretamente na plataforma e introduzida no interior do forno de grafite onde foi submetida a repetidos ciclos de aquecimento, de acordo com os respectivos programas de aquecimento que estão apresentados na Tabela 3. A massa empregada na determinação de Cr variou de 0,1 a 0,7 mg, para Ni foram utilizadas massas entre 0,1 a 0,9, para As e Sb esta foi de 0,2 a 0,9 mg, para Ag foram empregadas massas entre 0,1 a 1,9 mg, para Mn esta foi de 0,1 a 0,4 mg e para a quantificação de Pb a massa utilizada variou entre 0,1 a 2,5 mg.

A eficácia dos modificadores químicos (solução contendo 4  $\mu\text{g}$  de paládio, ácido oxálico 5%, ácido nítrico 10% e água) foi avaliada adicionando-se 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo os modificadores sobre a amostra na plataforma antes desta ser introduzida no atomizador.

Os limites de detecção e quantificação para cada elemento foram calculados considerando a máxima quantidade de amostra que poderia ser introduzida no forno de grafite assegurando porém, que o sinal de absorbância integrada esteja situado dentro da faixa linear usada para cada elemento, levando em consideração o branco analítico, seguindo a recomendação da IUPAC (branco +  $3\sigma$  e branco +  $10\sigma$ ,  $n = 10$ ).

### **3.6.2. Determinação de metais por ICP OES e ICP-MS**

Para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato por ICP OES e por ICP-MS, as amostras previamente decompostas em sistema fechado, foram diluídas 4, 10 e 100 vezes, conforme a concentração e a técnica empregada para a determinação dos analitos. As condições operacionais do instrumento estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros operacionais utilizados na quantificação dos elementos por ICP OES e ICP-MS.

Parâmetros	ICP OES	ICP-MS
Potência do gerador de rádio frequência (W)	1400	1350
Vazão de argônio principal (L min <sup>-1</sup> )	15	15
Vazão de argônio auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,2	1,2
Vazão de argônio do nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	0,6	1,03
Elemento	Comprimento de onda $\lambda$ (nm)	Razão massa/carga (m/z)
Ag	338,289	107
As	193,696	75
Cr	357,869; 267,716	52
Mn	259,372; 257,61	55
Ni	231,604	60
Pb	220,353	206
Sb	206,836	121

As curvas de calibração para a determinação dos analitos por ICP-OES e ICP-MS, foram preparadas a partir da solução multielementar (SCP 33 MS). Para a determinação dos analitos por ICP OES a faixa de concentração da curva foi de 5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Entretanto para a determinação dos analitos por ICP-MS a faixa de concentração da curva de calibração foi entre 0,025 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foram realizados ensaios de recuperação dos analitos adicionando-se concentrações conhecidas dos elementos de interesse nas soluções, após decomposição da amostra.

---

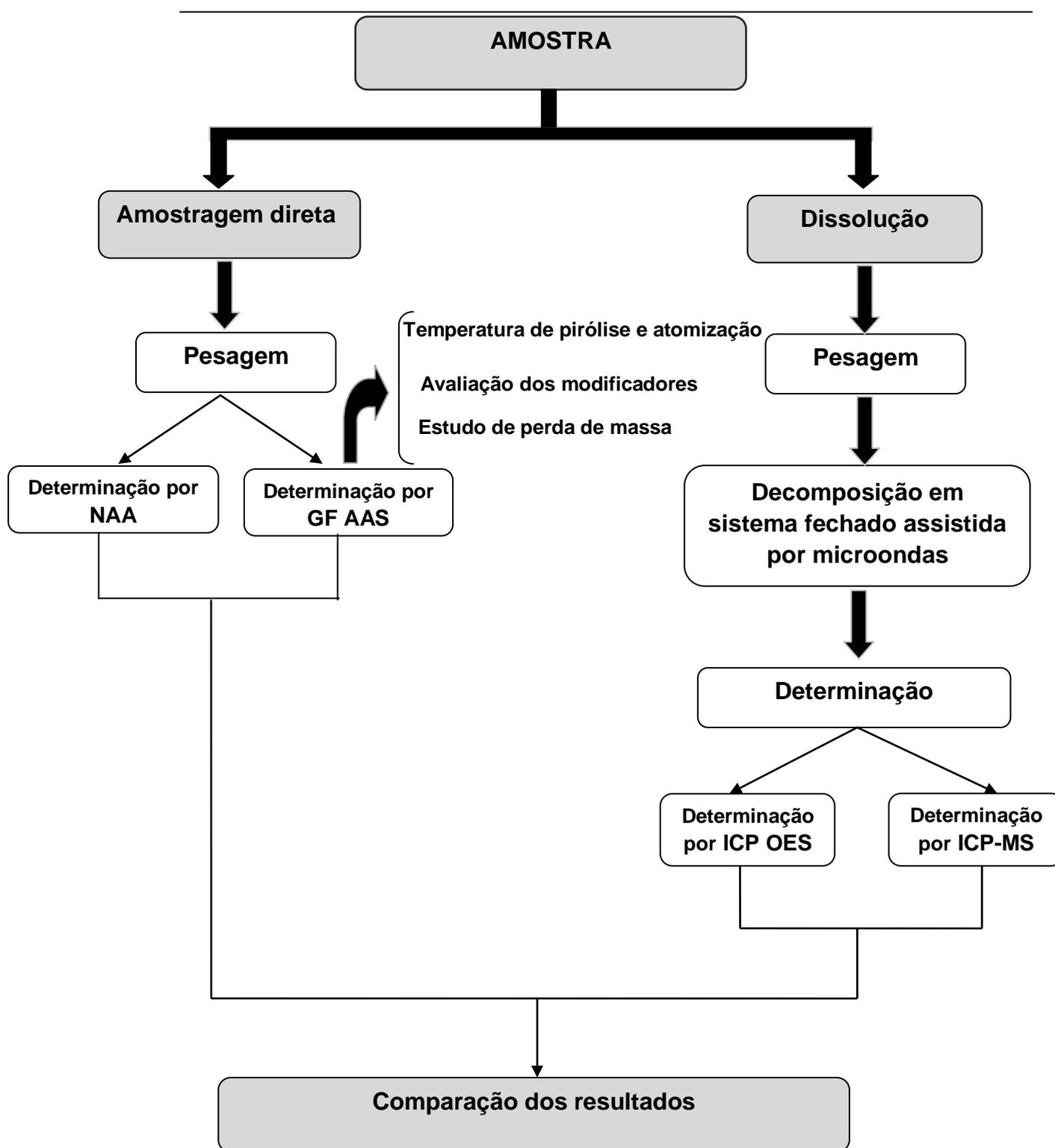
### **3.6.3. Comparação estatística dos resultados obtidos por DSS-GF AAS e pelas diferentes técnicas comparativas**

Para a comparação dos resultados obtidos por DSS-GF AAS, ICP OES, ICP-MS e NAA foi utilizado o programa estatístico Insttat 3.0 (Graph Pad Software). Quando a comparação envolveu duas médias utilizou-se o teste *t-student*. Entretanto, para a comparação de um número de valores superiores utilizou-se a análise de variância (ANOVA), optando-se pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. O nível de confiança para a investigação dos resultados foi 95%.

A Figura 7 apresenta um fluxograma com todas as etapas dos procedimentos empregados na quantificação dos elementos nas amostras de ferro aminoácido quelato.

### **3.7. Análise das plataformas de grafite por espectrometria de fluorescência de raios-X (EDX)**

As plataformas de grafite contendo partículas depositadas pelos sucessivos aquecimentos da mesma contendo amostra foram encaminhadas para um Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, para serem analisadas por espectrometria de fluorescência de raios-X (EDX).



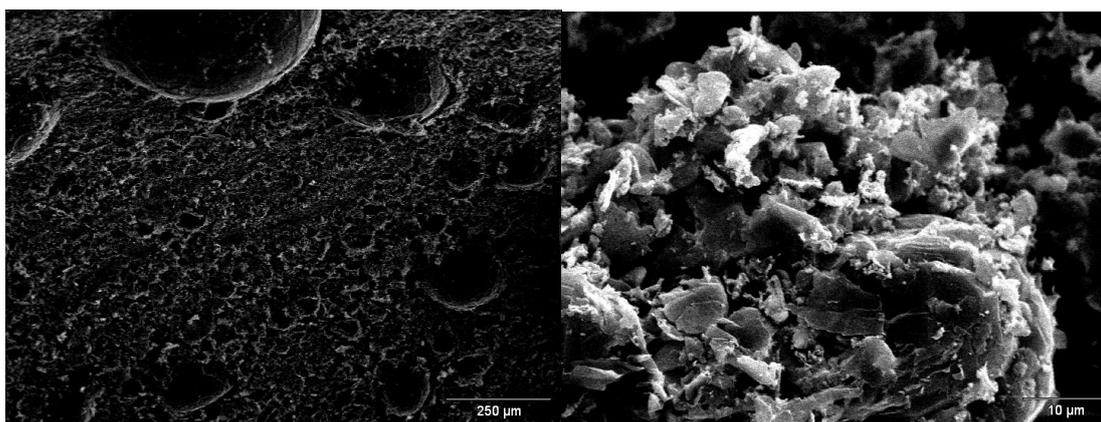
**Figura 7.** Fluxograma com os procedimentos empregados para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato.

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

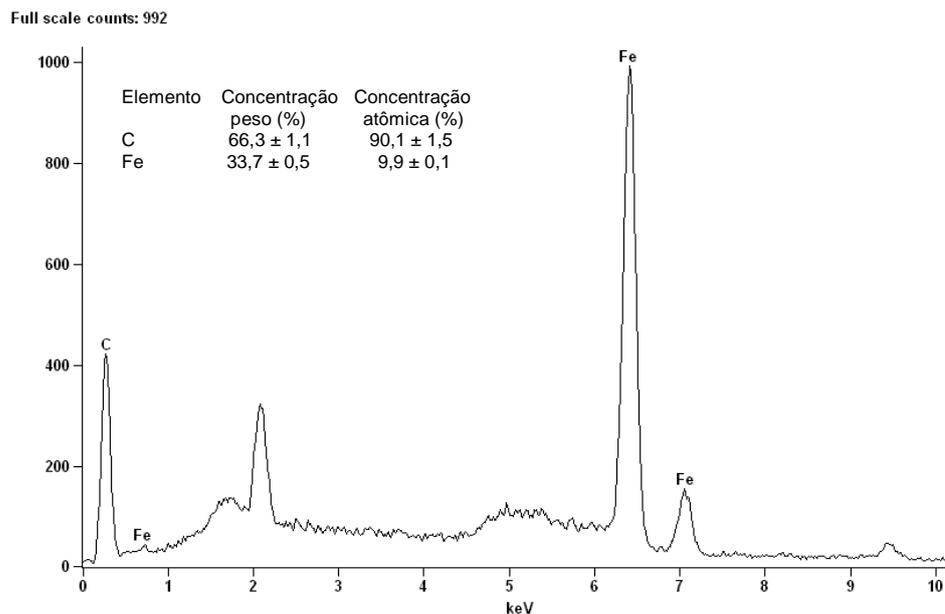
---

### 4.1. Estudo das interferências da amostra de ferro aminoácido quelato na GF AAS

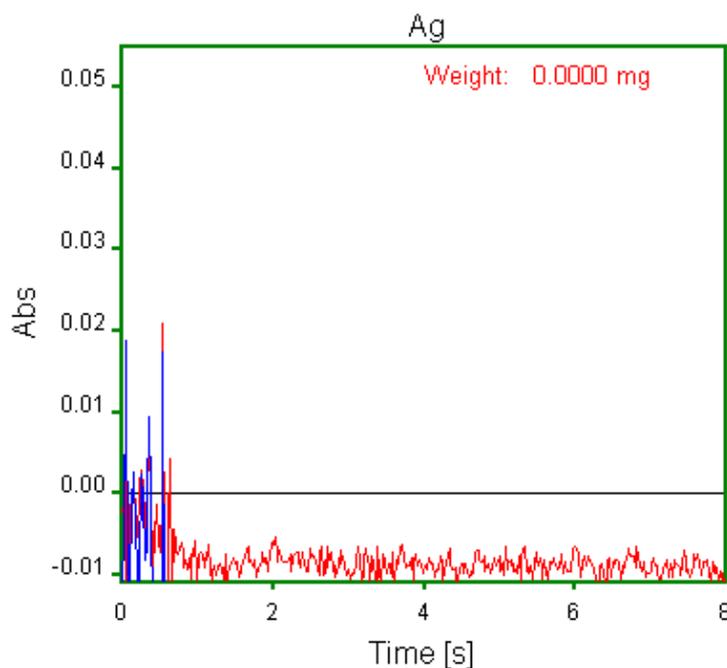
Durante os estudos preliminares do comportamento térmico da amostra de ferro aminoácido quelato por GF AAS foi verificado o surgimento de partículas na plataforma de grafite após o término do programa de aquecimento. Segundo a análise da plataforma contendo essas partículas e das partículas removidas da plataforma, por espectrometria de fluorescência de raios-X, estas são compostas majoritariamente por ferro e carbono (Figuras 8 e 9). O aumento do número de partículas na plataforma de grafite foi proporcional ao aumento de massa de amostra na plataforma e ao uso contínuo desta plataforma com as amostras. Foi verificado que a plataforma de grafite não pode ser mais utilizada para a determinação de elementos em temperaturas entre 400 e 800 °C, quando esta apresenta certa quantidade de partículas depositadas, pois o corretor baseado no efeito Zeeman não consegue corrigir o sinal de fundo. Provavelmente, o aquecimento da plataforma contendo essas partículas, vaporiza compostos que interferem na correção do sinal de fundo. O sinal obtido com a plataforma vazia contendo partículas depositadas pode ser visualizado na Figura 10.



**Figura 8.** Registro microfotográfico da plataforma de grafite com as partículas depositadas; (A) plataforma com várias partículas formadas após o ciclo de aquecimento desta com a amostra; (B) detalhe da superfície de partícula removida da plataforma.



**Figura 9.** Espectro obtido pela análise de espectrometria de fluorescência de raios-X (EDX) das partículas removidas da plataforma após ciclos de aquecimento (secagem 120 °C, pirólise 800 °C e atomização 2400 °C).



**Figura 10.** Sinal obtido após o aquecimento da plataforma vazia contendo as partículas depositadas

Outro problema verificado na amostra de ferro aminoácido quelato está relacionado ao comportamento térmico. Durante a etapa de pirólise, a amostra sofre um aumento no volume. Esse aumento, com a utilização de massas

maiores, interrompeu o caminho óptico no interior do forno de grafite, impedindo a passagem da radiação da lâmpada de cátodo oco pelo atomizador. Como consequência, nesta condição, não foi possível fazer a determinação dos analitos na amostra sólida. A Figura 11 (A-E) apresenta cinco plataformas contendo amostra sem ser aquecida e após ser aquecida. A transformação da amostra com aquecimento pode ser verificado na Figura 11(B).

Com a intenção de solucionar estes problemas, foram testados alguns modificadores químicos. Como pode ser observado na Figura 11 (C-E), a adição de ácido nítrico 10% v/v, ácido oxálico 5% m/v e água sobre a amostra antes desta ser introduzida no interior do atomizador minimizou o efeito do aumento de volume. A remoção de grande parte da matriz da amostra durante a etapa de pirólise, com a utilização destes modificadores, retardou o surgimento das partículas sobre a plataforma de grafite.



**Figura 11.** Plataforma de grafite com amostra de ferro aminoácido quelato (5 mg de amostra): (A) plataforma com amostra antes do aquecimento; (B) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento (secagem 120 °C por 30 s, pirólise 800 °C por 30 s e atomização 2400 °C por 8 s); (C) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de água; (D) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de ácido oxálico 5% m/v; (E) plataforma com amostra após o ciclo de aquecimento com 20 µL de ácido nítrico 10% v/v.

Desta maneira, com o intuito de aumentar a vida útil da plataforma de grafite foram adicionados 20 µL de água sobre a amostra durante as otimizações

---

e na determinação de As, Cr, Mn, Pb e Sb ou 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 4  $\mu\text{g}$  de Pd sobre a amostra para o estudo de Ag e Pb. Com a utilização de ambos os modificadores foi possível aumentar a quantidade de massa de amostra introduzida no interior do atomizador. Esse é um aspecto positivo, pois segundo Belarra *et. al.*<sup>9</sup> o aumento da massa introduzida no atomizador pode ajudar a diminuir o RSD das medidas nas técnicas de amostragem direta.

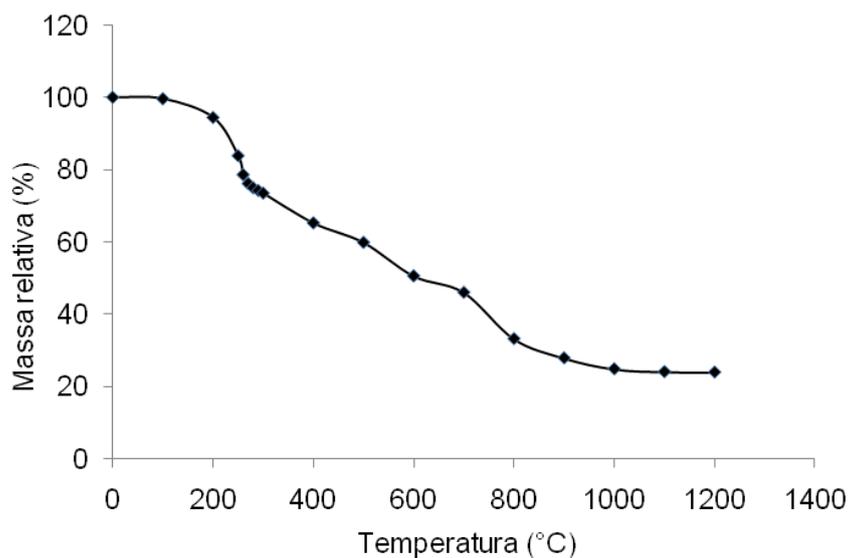
#### **4.2. Comportamento térmico da amostra de ferro aminoácido quelato**

Inicialmente, foi feito um estudo avaliando-se a perda relativa de massa da amostra em função da temperatura. Para isso pesou-se em torno de 5 mg de amostra sobre a plataforma de grafite e foram feitos sucessivos ciclos de aquecimentos da plataforma contendo a amostra, aumentando-se progressivamente a temperatura de pirólise. A plataforma foi pesada a cada ciclo de aquecimento, de modo a avaliar variações na massa da amostra.

De acordo com a Figura 12, a vaporização do ferro aminoácido quelato começa em torno de 200 °C e nas temperaturas a partir de 1000 °C não é mais observada perda de massa de amostra.

---

<sup>9</sup> BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.



**Figura 12.** Perda de massa do ferro aminoácido quelato a partir da plataforma com o aumento de temperatura de pirólise.

Durante este estudo foi verificado que o aspecto da amostra apresentou mudanças na temperatura em torno de 250 °C. Nesta temperatura, a amostra aumentou seu volume e sua coloração mudou de vermelho para marrom escuro. Sob temperatura em torno de 400 °C, a amostra apresentou uma coloração preta. A diminuição do volume da amostra foi observada com uma temperatura em torno de 700 °C. No entanto, apesar de uma significativa redução na quantidade de massa nesta temperatura, a plataforma ainda continha grande quantidade de resíduo de carbono amorfo e ferro.

#### 4.2.1 Otimização da temperatura de pirólise e atomização

A otimização do tempo e temperatura de pirólise e atomização para a determinação dos analitos por DSS-GF AAS foi feita por meio da avaliação das curvas de pirólise e atomização construída para cada analito. Desta forma, é possível selecionar a máxima temperatura de pirólise onde não é observada perda de analito e a melhor temperatura de atomização para o analito em estudo. O sinal de fundo produzido pela amostra também é avaliado com a construção destas curvas. Com este estudo é possível selecionar a melhor temperatura de pirólise e atomização onde é observada a máxima sensibilidade com o mínimo sinal de fundo.

Deste modo, com o intuito de avaliar o comportamento do analito na amostra de ferro aminoácido quelato e na solução de referência aquosa foram estabelecidas curvas de pirólise e atomização para a solução de referência aquosa e para a amostra sólida com adição de 20 µL de água para o estudo do As, Cr, Mn, Ni, Sb e também com 20 µL de uma solução contendo 4 µg de Pd, para Ag e Pb. Devido à dificuldade em se pesar massas iguais para a amostra sólida e facilitar a comparação do comportamento térmico dos analitos (amostra sólida e solução de referência aquosa), os sinais de absorvância integrada das amostras sólidas foram normalizados para 1 mg de amostra.

Conforme a concentração dos analitos observada nos testes preliminares na amostra de ferro aminoácido quelato, as curvas de pirólise e atomização para os analitos estudados neste trabalho foram construídas na máxima sensibilidade (uso da linha espectral principal do analito, vazão de argônio interrompida durante a etapa de atomização e campo magnético modo *2-field*, 0,8 T) ou com sensibilidade reduzida (utilização de linha espectral secundária e/ou vazão de argônio durante a etapa de atomização e/ou campo magnético variável – modo *3-field*, 0,6-0,8 T). Os analitos Ag, As, Pb e Sb foram determinados na máxima sensibilidade. Enquanto Cr e Ni foram determinados utilizando vazão de argônio durante a etapa de atomização e campo magnético variável – modo *3-field*, 0,6-0,8 T. Para manganês foram utilizados todos os recursos para reduzir a sensibilidade (vazão de argônio durante a etapa de atomização, campo magnético variável – modo *3-field*, 0,6-0,8 T e linha analítica secundária).

A amostra FAQ1 e soluções aquosas contendo 10; 30; 40; 1; 1; 0,4 e 0,025 ng para Ni, Cr, Mn, Sb, As, Pb e Ag, em HNO<sub>3</sub> 5% v/v, respectivamente, foram empregadas para a otimização do programa de aquecimento.

#### **4.2.1.1. Otimização do programa de aquecimento para níquel**

Em função da grande quantidade de níquel presente nas amostras utilizou-se campo magnético variável (modo *3-field*, 0,6-0,8 T) e vazão de argônio durante a etapa de atomização. A curva de pirólise para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa foi obtida fixando-se a temperatura de atomização em 2600 °C por 12 s e variando-se a temperatura de pirólise de 400 a 2200 °C por 30 s,

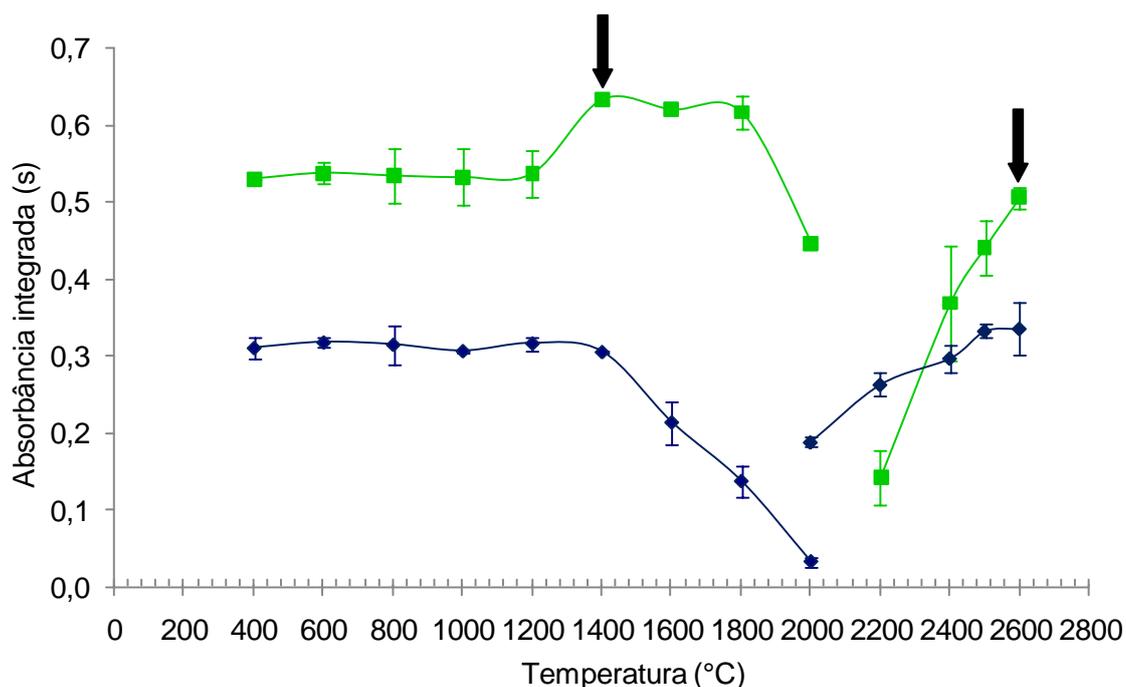
---

tempo escolhido arbitrariamente. O sinal para Ni na amostra sólida apresentou melhor sensibilidade nas temperaturas de pirólise entre 1400 a 1800 °C (Figura 13). Os sinais de fundo para a amostra sólida, durante a etapa de pirólise apresentaram baixos valores de absorvância (Figura 14).

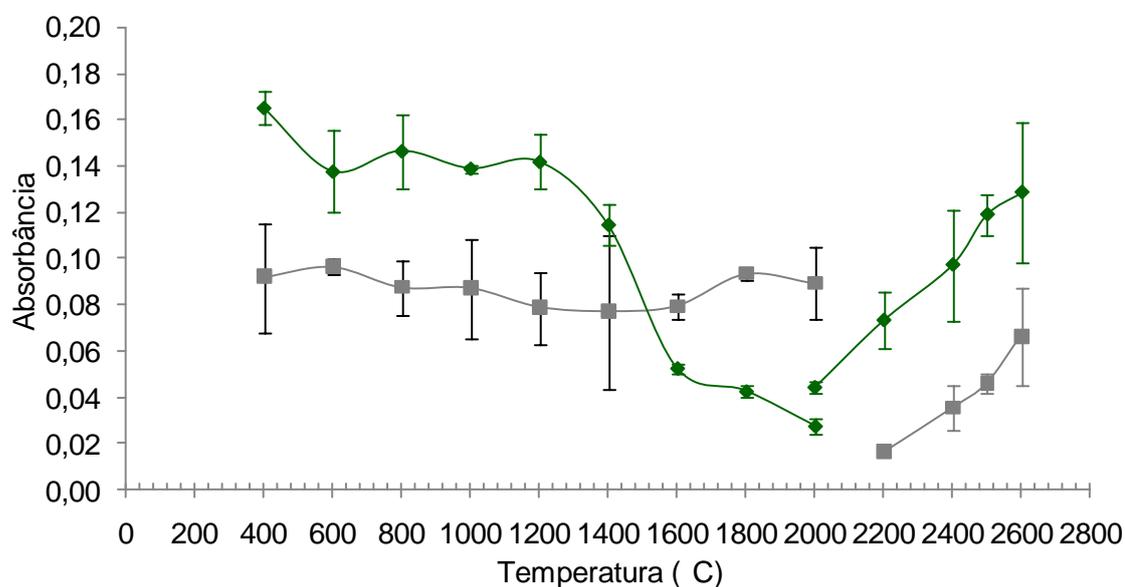
Na solução aquosa, o sinal do Ni se manteve estável entre as temperaturas de 400 a 1400 °C (Figura 13). A temperatura máxima para a etapa de pirólise sem perdas de analito foi mais elevada para a amostra sólida (1800 °C) do que para a solução de referência aquosa (1400 °C), neste caso, a matriz parece dificultar a vaporização do analito.

Para a otimização da temperatura de atomização para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa, a temperatura de pirólise foi fixada em 1400 °C por 30 s. O intervalo de temperatura de atomização investigado foi de 2000 a 2600 °C, com um tempo de integração de 12 s. Em temperaturas inferiores a 2400 °C ocorreu uma integração incompleta do sinal do Ni na amostra sólida e na solução aquosa, pois o sinal analítico não retornou completamente à linha base. O sinal de fundo na amostra sólida aumentou com o aumento da temperatura de atomização (Figura 14).

Portanto, para a determinação de níquel nas amostras de ferro aminoácido quelato, as temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 1400 °C por 30 s e 2600 °C por 12 s, respectivamente.



**Figura 13.** Curvas de pirólise e atomização para níquel: ■ amostra sólida; ◆ solução aquosa (10 ng de níquel). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n=3$ ).



**Figura 14.** Variação do sinal de fundo para Ni em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,5 mg). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n=3$ ).

#### 4.2.1.2 Otimização do programa de aquecimento para cromo

Em vista da elevada concentração de Cr nas amostras de ferro aminoácido quelato, assim como para níquel, as curvas de pirólise e atomização foram obtidas utilizando vazão de argônio durante a etapa de atomização além da aplicação de campo magnético variável (modo *3-field*, 0,6-0,8 T).

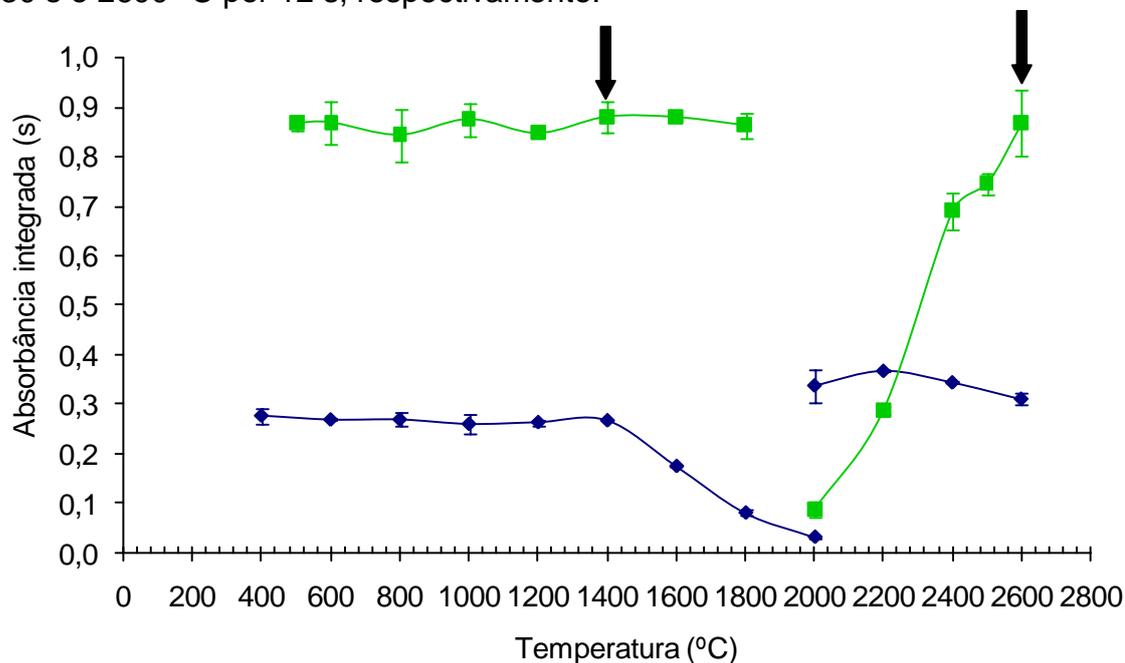
A curva de pirólise para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa foi obtida fixando-se a temperatura de atomização em 2600 °C por 12 s e variando-se as temperaturas de pirólise de 400 a 2200 °C por 30 s (tempo escolhido arbitrariamente). O sinal analítico do cromo na amostra sólida e na solução aquosa permaneceu praticamente constante durante as temperaturas entre 400 a 1400 °C (Figura 15). Como observado na curva de pirólise para níquel, a temperatura máxima sem perdas de analito na solução de referência aquosa (1400 °C) foi menor que a observada na amostra sólida (1800 °C). O sinal de fundo para a amostra sólida apresentou valores de absorbância relativamente elevados, mas foi aparentemente corrigido pelo corretor do equipamento que corrige até 1,5 unidades de absorbância em altura (Figura 16).

Para a otimização da temperatura de atomização na amostra sólida e na solução de referência aquosa a temperatura de pirólise foi fixada em 1400 °C por 30 s e a temperatura de atomização variada de 2000 a 2600 °C por 12 s. Foi verificada uma diminuição na sensibilidade na solução aquosa de cromo na temperatura de 2600 °C, provavelmente em virtude do processo de difusão do analito. Entretanto, em temperaturas inferiores a 2600 °C, não ocorreu à integração completa do sinal analítico na amostra sólida (não houve retorno completo à linha de base). Assim, a temperatura de atomização selecionada foi de 2600 °C. Cabe ressaltar que esta condição foi similar àquela usada em outros trabalhos referentes à determinação de cromo.<sup>109,110</sup> O sinal de fundo, assim como observado para níquel, aumentou com o aumento da temperatura de atomização (Figura 16).

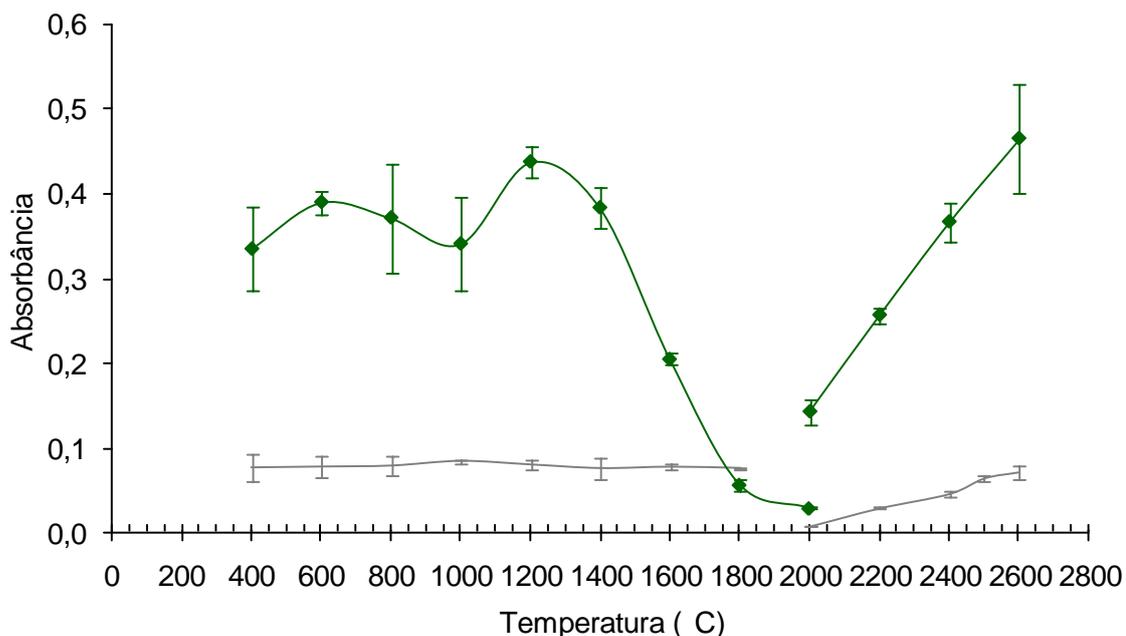
<sup>109</sup> MARQUES, M. J.; SALVADOR, A.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA, M.; *Microchem. J.* 62 (1999) 363–370.

<sup>110</sup> MIERZWA, J.; SUN, Y.-C.; YANG, M.-H.; *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 63-69.

Desta maneira, a temperatura de pirólise e atomização, selecionadas para a quantificação de cromo nas amostras de ferro aminoácido quelato foi 1400 °C por 30 s e 2600 °C por 12 s, respectivamente.



**Figura 15.** Curvas de pirólise e atomização para cromo: ■ amostra; ◆ solução aquosa (30 ng de cromo). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).



**Figura 16.** Variação do sinal de fundo para Cr em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa;  $\blacksquare$  amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,4 mg). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

#### 4.2.1.3. Otimização do programa de aquecimento para manganês

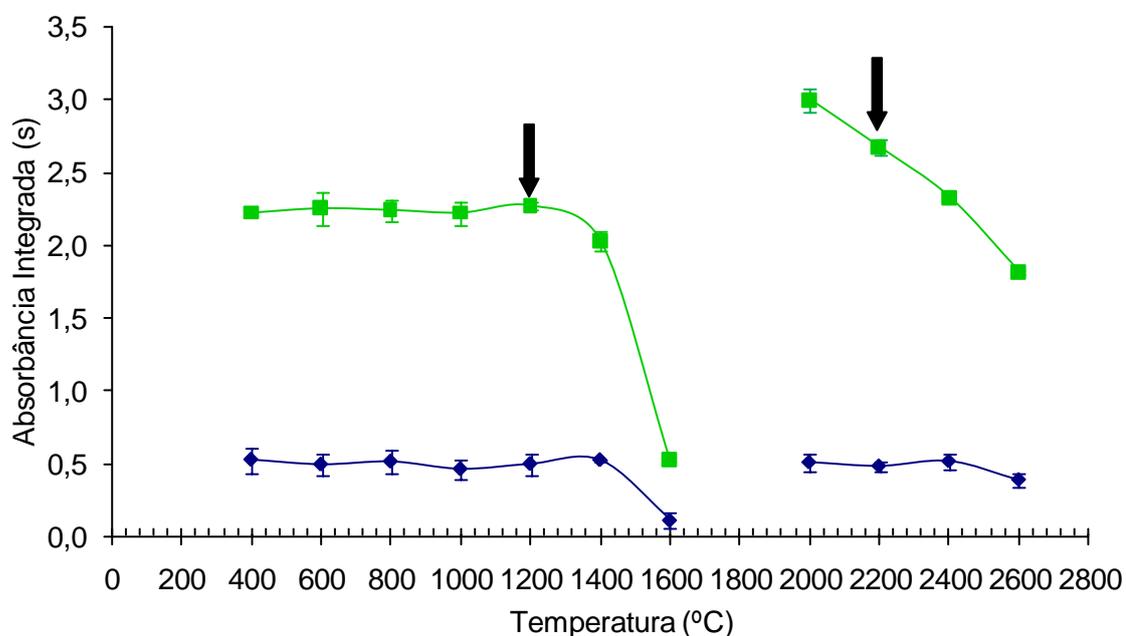
Já que as amostras continham alta concentração de manganês, as curvas de pirólise e atomização foram construídas utilizando vazão de argônio durante a etapa de atomização, linha analítica secundária (403,1 nm, cerca de 10 vezes menos sensível que o comprimento de onda principal, 279,5 nm) e campo magnético variável (modo *3-field*, 0,6-0,8 T).

Para a otimização da temperatura de pirólise para manganês na amostra sólida e na solução de referência aquosa, a temperatura de atomização foi fixada em 2400 °C por 10 s e a temperatura de pirólise variada de 400 a 1600 °C por 30 s (tempo escolhido arbitrariamente). A temperatura máxima de pirólise observada foi 1200 °C, nesta temperatura não há perdas do analito, tanto na amostra sólida quanto na solução aquosa (Figura 17). O sinal de fundo na amostra sólida e na solução de referência aquosa apresentou valores relativamente elevados, mas provavelmente, corrigido pelo corretor utilizado no equipamento (Figura 18).

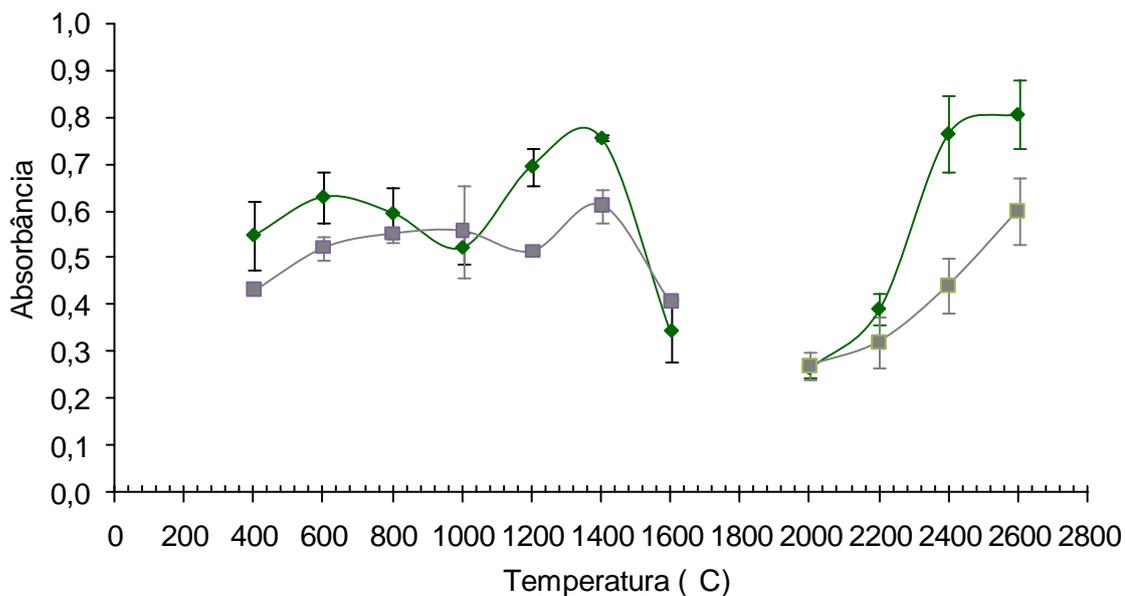
Para a otimização da temperatura de atomização para Mn na amostra sólida e na solução de referência aquosa, a temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C por 30 s e a temperatura de atomização variada de 2000 a 2600 °C por

10 s. Na temperatura de 2000 °C, tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa, os sinais analíticos não foram completamente integrados. Na solução de referência aquosa foi observada perda de sensibilidade somente na temperatura de 2600 °C enquanto na amostra sólida foi observado perda na sensibilidade nas temperaturas a partir de 2400 °C. (Figura 17). O sinal de fundo para a amostra sólida aumentou com o aumento da temperatura de atomização (Figura 18).

Assim, a temperatura de pirólise e atomização selecionada para a determinação de manganês nas amostras de ferro aminoácido quelato foi 1200 °C por 30 s e de 2200 °C por 10 s, respectivamente.



**Figura 17.** Curvas de pirólise e atomização para manganês: ■ amostra; ◆ solução aquosa (40 ng de manganês). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3).



**Figura 18.** Variação do sinal de fundo para Mn em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa;  $\blacksquare$  amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,2 a 0,5 mg). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

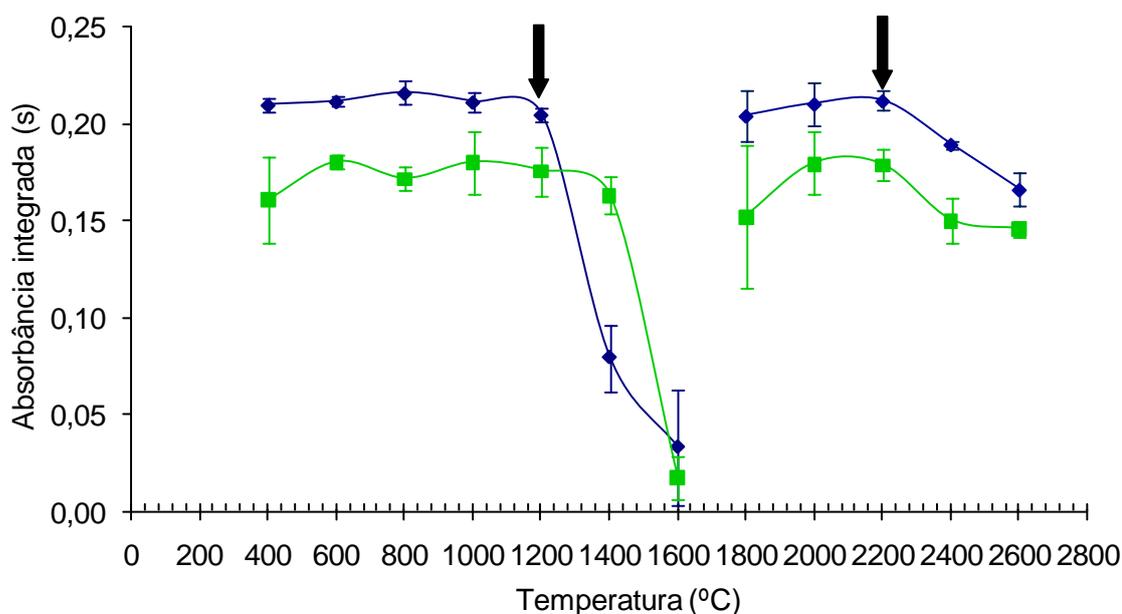
#### 4.2.1.4 Otimização do programa de aquecimento para antimônio

As curvas de pirólise e atomização foram construídas na máxima sensibilidade.

As curvas de pirólise para Sb na amostra sólida e na solução de referência aquosa foram obtidas fixando-se a temperatura de atomização em 2200 °C por 8 s e variando-se a temperatura de pirólise de 400 a 1600 °C. O sinal analítico manteve-se constante até a temperatura de 1200 °C, tanto para a amostra quanto para a solução de referência aquosa (Figura 19).

Posteriormente, fixou-se a temperatura de pirólise em 1200 °C por 30 s para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa e variou-se a temperatura de atomização entre 1800 a 2600 °C por 8 s. Em temperaturas de atomização superiores a 2200 °C foi observada perda de sensibilidade tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa (Figura 19). Assim, a temperatura de compromisso de atomização foi fixada em 2200 °C, pois nesta temperatura foram observados os melhores valores de absorbância tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa.

As curvas de temperatura de pirólise e atomização do antimônio na solução de referência aquosa e na amostra sólida apresentaram um comportamento similar (Figura 19). Sendo assim, a temperatura de pirólise e atomização selecionada para a quantificação de Sb foi de 1200 °C por 30 s e 2200 °C por 8 s, respectivamente.



**Figura 19.** Curvas de pirólise e atomização para antimônio: ■ amostra; ◆ solução aquosa (1 ng de antimônio). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

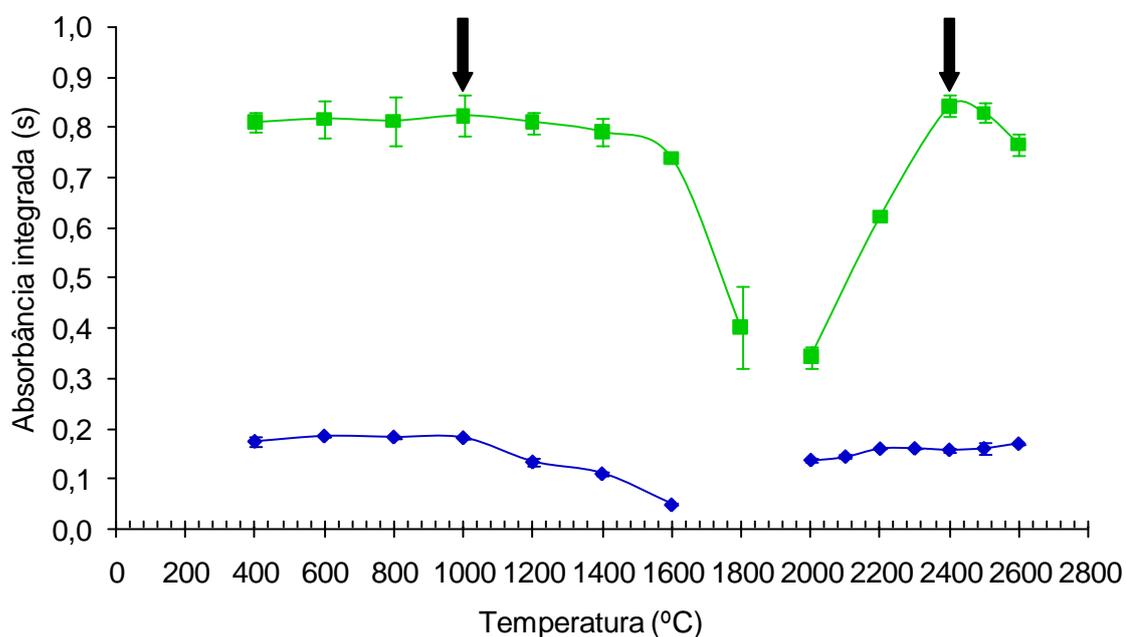
#### 4.2.1.5. Otimização do programa de aquecimento para arsênio

Conforme verificado nos testes preliminares nas amostras de ferro aminoácido quelato, foi possível obter as curvas de pirólise e atomização para arsênio na amostra sólida e na solução referência aquosa utilizando as condições de máxima sensibilidade.

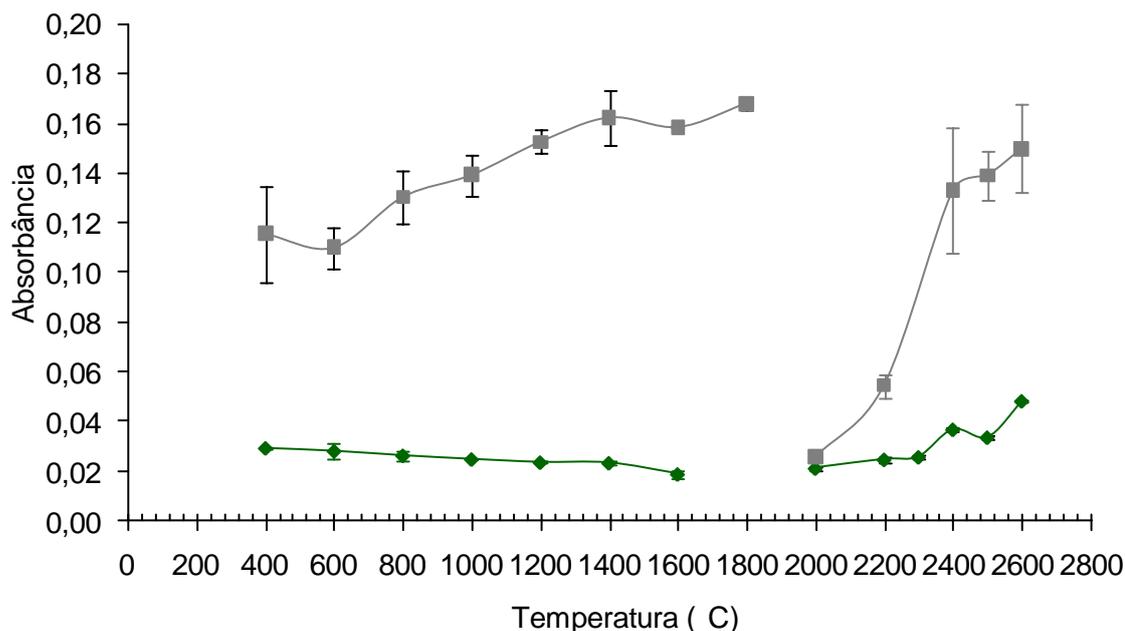
Com as temperaturas de atomização fixadas em 2200 e 2400 °C por 12 s na solução de referência e na amostra sólida, respectivamente, variou-se a temperatura de pirólise de 400 a 1600 °C por 30 s. O sinal analítico permaneceu praticamente constante no intervalo de temperatura entre 400 a 1000 °C tanto para o arsênio na solução de referência aquosa quanto na amostra sólida (Figura

20). O sinal de fundo apresentou baixos valores, possivelmente corrigido pelo corretor do equipamento (Figura 21).

Para a otimização da temperatura de atomização, a temperatura de pirólise foi fixada em 1000 °C por 30 s. O intervalo de temperatura de atomização investigado foi de 2000 a 2600 °C, com um tempo de integração de 12 s. Na temperatura de 2000 °C os sinais analíticos apresentaram sinal não gaussiano com demora para o retorno à linha base após o máximo de absorvância, tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa. Na temperatura de 2200 °C na amostra sólida o sinal analítico também não integrou completamente. A temperatura ótima de atomização para o arsênio tanto na amostra quanto na solução de referência aquosa foi de 2400 °C (Figura 21). O sinal de fundo apresentou dependência com o aumento da temperatura de atomização (Figura 21). Deste modo, a temperatura de pirólise e atomização selecionada para a determinação de arsênio foi 1000 e 2400 °C, respectivamente.



**Figura 20.** Curvas de pirólise e atomização para arsênio: ■ amostra; ◆ solução aquosa (1 ng de arsênio). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3).



**Figura 21.** Variação do sinal de fundo para As em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa;  $\blacksquare$  amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,1 a 0,8 mg). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

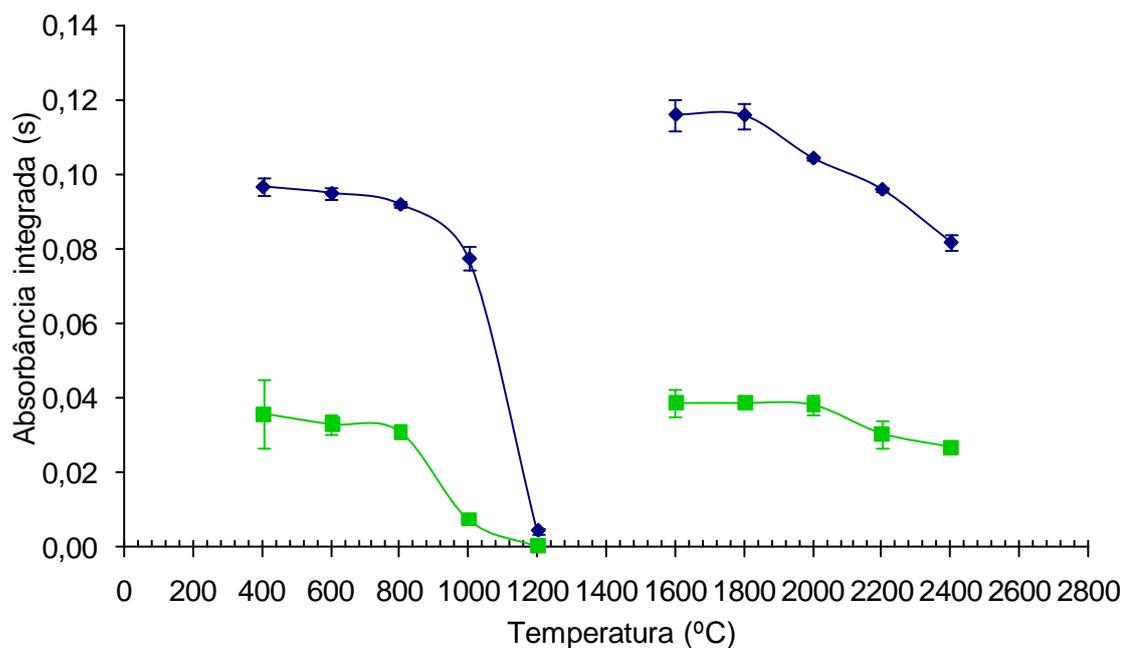
#### 4.2.1.6. Otimização do programa de aquecimento para chumbo

Para Pb, as curvas de pirólise e atomização foram obtidas utilizando o comprimento de onda principal do analito, vazão interrompida de argônio durante a etapa de atomização e campo magnético no modo *2-field*.

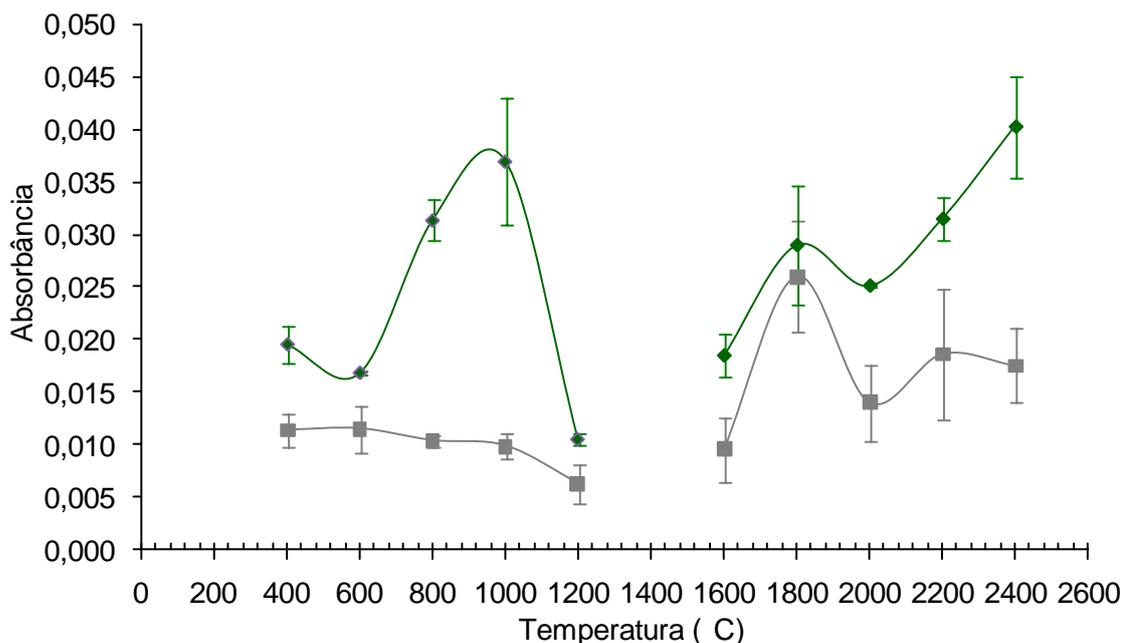
Para o estudo do comportamento térmico do Pb durante a etapa de pirólise na amostra sólida e na solução aquosa, a temperatura de atomização foi fixada em 1800 °C por 10 s e a temperatura de pirólise variada de 400 a 1200 °C por 30 s (tempo escolhido arbitrariamente) como mostra a Figura 22. Foi observado que o comportamento do Pb na etapa de pirólise foi semelhante em ambas as situações, amostra e solução aquosa (Figura 22). O chumbo apresentou comportamento estável em temperaturas até 600 °C na solução de referência aquosa e na amostra sólida. O sinal de fundo na amostra sólida apresentou pouca variação e foi praticamente desprezível durante o intervalo de temperatura estudado (Figura 23).

Em relação à temperatura de atomização, para a solução de referência aquosa e para a amostra, a temperatura de pirólise foi fixada em 600 °C por 30 s e a temperatura de atomização variada de 1600 a 2400 °C por 10 s. Conforme

verificado na Figura 22, o sinal analítico do chumbo na solução de referência aquosa foi muito similar ao sinal deste na amostra sólida. Para a amostra sólida, ocorreu a integração completa do sinal analítico em 1600 e em 1800 °C. Foi observado que o sinal de fundo para a amostra sólida é desprezível no intervalo de temperatura estudado na etapa de atomização (Figura 23). A temperatura de atomização escolhida foi 1800 °C.



**Figura 22.** Curvas de pirólise e atomização para chumbo: ■ amostra; ◆ solução aquosa (0,4 ng de chumbo). Os valores de absorbância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).



**Figura 23.** Variação do sinal de fundo para Pb em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa;  $\blacksquare$  amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,8 a 1,1 mg). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

Conforme verificado nas curvas de pirólise e atomização para a amostra sólida e para a solução de referência aquosa, as melhores temperaturas de pirólise e atomização para chumbo correspondem a 600 °C e 1800 °C, respectivamente. A temperatura de 600 °C é muito baixa para remoção da matriz durante a etapa de pirólise. Desta maneira, foi realizado um estudo para verificar a máxima quantidade de amostra que pode ser introduzida no interior do atomizador nestas condições. De acordo com os resultados obtidos, a máxima quantidade de amostra introduzida foi em torno de 1 mg. Sendo assim, foi realizado um estudo com utilização de modificador químico tanto para a amostra sólida quanto para a solução de referência aquosa, com o intuito de introduzir uma quantidade maior de massa no atomizador.

A influência de paládio sobre a temperatura de pirólise e atomização do chumbo na amostra sólida foi verificada fixando-se as temperaturas de pirólise e atomização em 800 °C e 2200 °C, respectivamente. Foram pesados entre 0,3 a 0,7 mg de amostra sólida e adicionado, antes de cada medida, 20  $\mu$ L de uma solução contendo 4  $\mu$ g de Pd sobre a superfície da amostra. Para a solução de

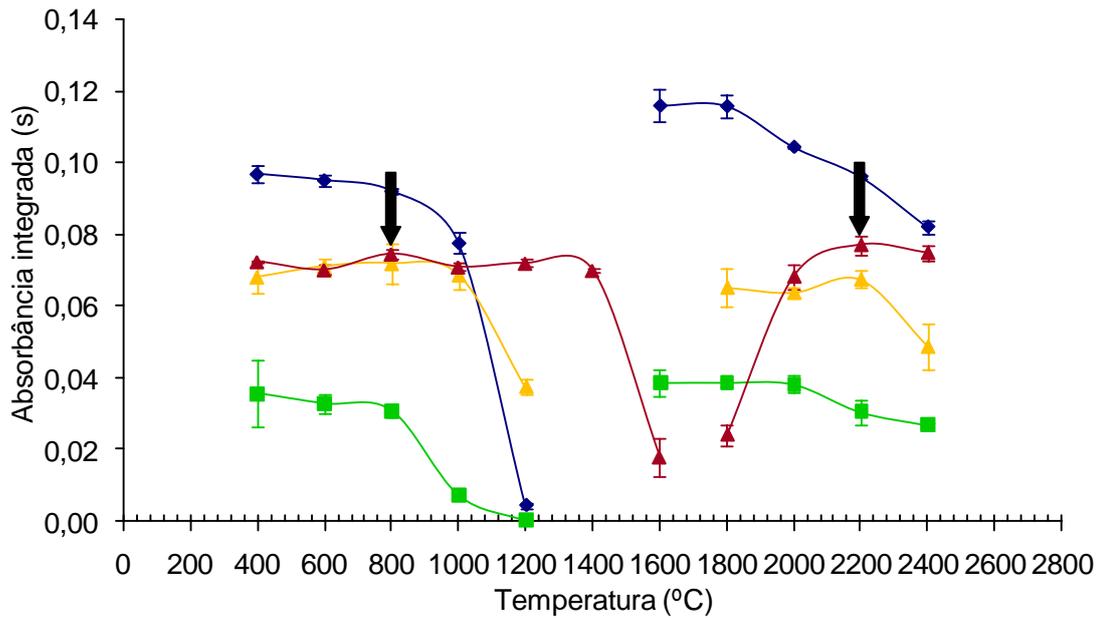
referência aquosa foi transferida uma alíquota de 0,4 ng desse elemento para a atomizador juntamente com 4  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 4  $\mu\text{g}$  de Pd. As temperaturas de pirólise e atomização foram fixadas em 800 °C e 2200 °C, respectivamente. Durante a etapa de pirólise, o sinal analítico permaneceu, praticamente, constante até a temperatura de 1200 °C na solução aquosa, enquanto que na amostra sólida, este permaneceu constante até a temperatura de 800 °C (Figura 24). Com a adição de Pd tanto na amostra sólida quanto na solução de referência aquosa, o sinal de fundo foi praticamente desprezível na faixa de temperatura de pirólise e atomização estudada, este apresentou uma variação maior na temperatura de atomização de 2400 °C para a amostra sólida (Figura 25).

Desta maneira, as temperaturas de pirólise e atomização selecionadas para a determinação de chumbo nas amostras de ferro aminoácido quelato, com adição de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 4  $\mu\text{g}$  de Pd foram 800 °C por 30 s e 2200 °C por 10 s, respectivamente. Foi verificado que utilizando essas condições foi possível introduzir cerca de 2,5 mg de amostra para o interior do atomizador. Desde modo, pode-se concluir que o aumento da temperatura de pirólise apresentou maior eficiência na remoção da matriz da amostra. Este modificador também foi utilizado em outros trabalhos que determinaram a concentração de chumbo em diversos tipos de matriz, com o intuito de aumentar a temperatura de pirólise para obter uma maior eficiência da remoção da matriz da amostra durante a etapa de pirólise.<sup>111-113</sup>

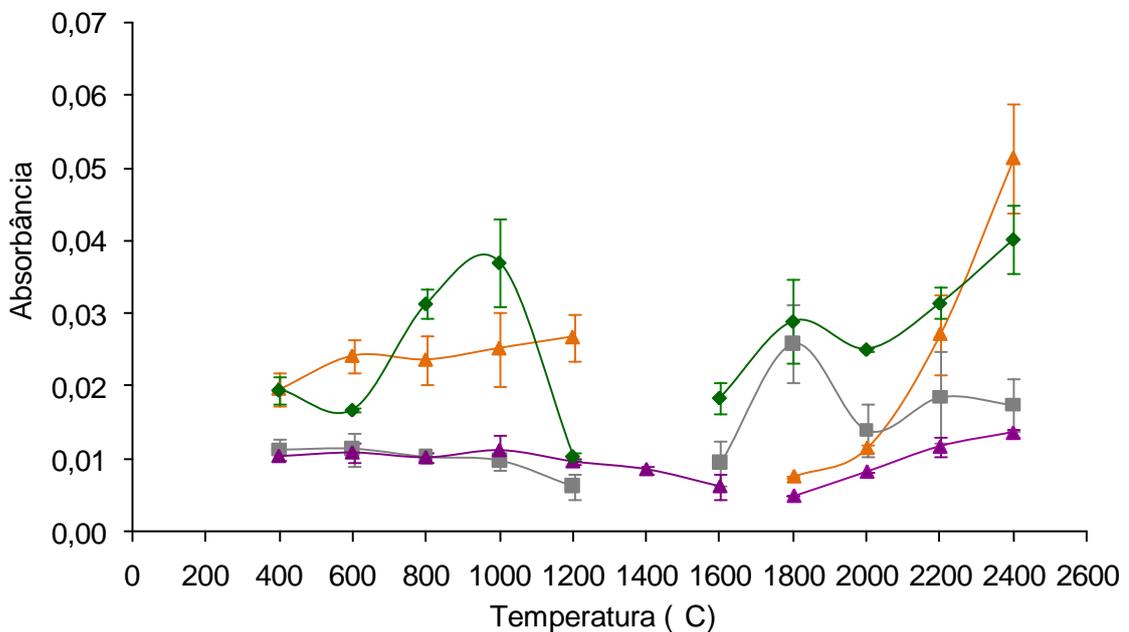
<sup>111</sup> LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z.; *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 601-611.

<sup>112</sup> BOBROWSKA-GRZESIK, E.; JAKOBIK-KOLON, A.; *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 326-331.

<sup>113</sup> ACAR, O.; KILIC, Z.; TÜRKER, A. R.; *Food Chem.* 71 (2000) 117-122.



**Figura 24.** Curvas de pirólise e atomização para chumbo:  $\blacklozenge$  solução aquosa (0,4 ng de chumbo);  $\blacktriangle$  - solução aquosa (0,4 ng de chumbo e 4  $\mu\text{g}$  de Pd);  $\blacksquare$  amostra sólida;  $\blacktriangle$  - amostra sólida (contendo 4  $\mu\text{g}$  Pd). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).



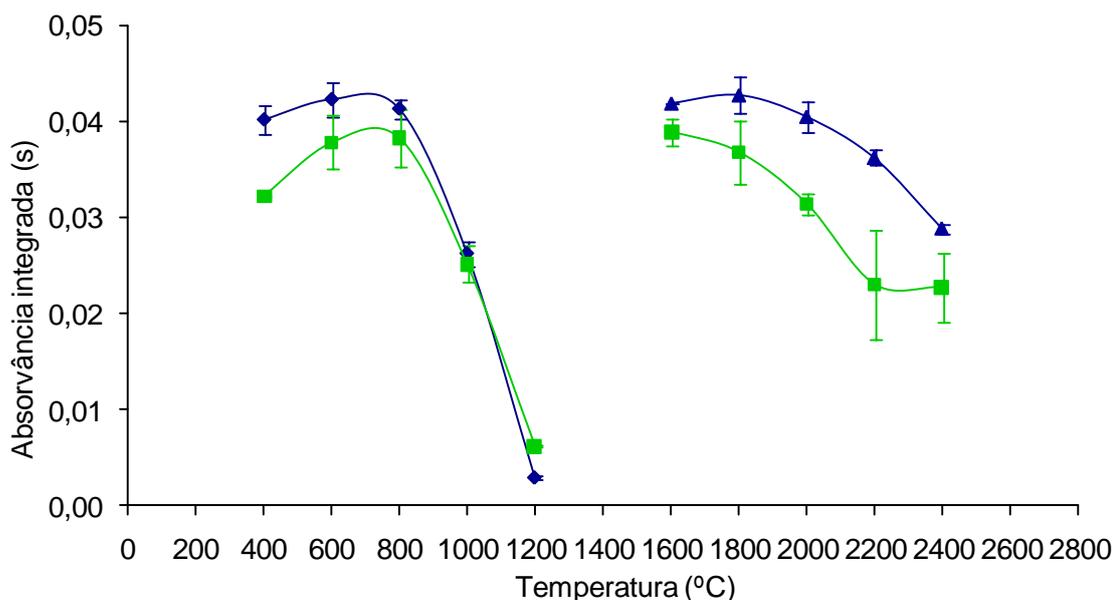
**Figura 25.** Variação do sinal de fundo para Pb em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa (0,4 ng de chumbo);  $\blacktriangle$  solução aquosa (0,4 ng de chumbo e 4  $\mu\text{g}$  de Pd);  $\blacksquare$  amostra sólida, utilizando massas de amostra entre 0,8 a 1,1 mg;  $\blacktriangle$  amostra sólida (contendo 4  $\mu\text{g}$  Pd), utilizando massas de amostra entre 0,5 a 1,0 mg. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

#### 4.2.1.7 Otimização do programa de aquecimento para prata

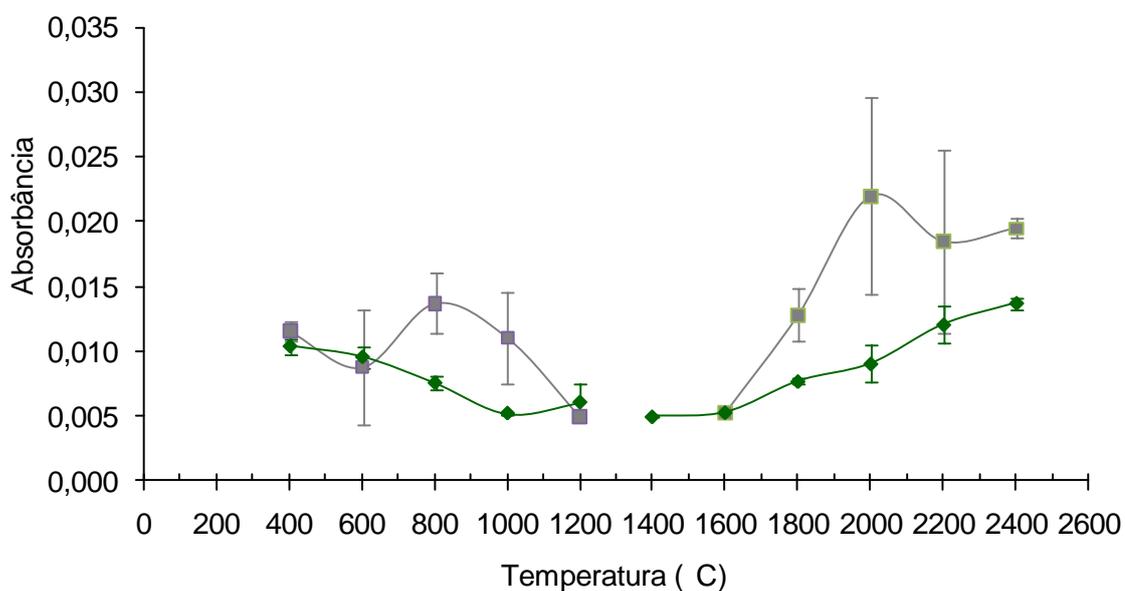
As curvas de pirólise e atomização para a prata foram obtidas na máxima sensibilidade, pois nos testes preliminares, foi verificado que as amostras de ferro aminoácido quelato continham baixas concentrações de prata.

Para a otimização da temperatura de pirólise na amostra sólida e na solução de referência aquosa, a temperatura de atomização foi fixada em 1800 °C durante 10 s e a temperatura de pirólise foi variada de 400 a 1200 °C por 30 s, tempo escolhido arbitrariamente (Figura 26). Foi observado que a prata é estável em temperaturas até 800 °C para a amostra sólida. Entretanto, para a solução de referência aquosa foi observada uma pequena diminuição na sensibilidade nesta temperatura (Figura 26). O sinal de fundo na amostra sólida foi, praticamente, desprezível (Figura 27).

Para selecionar a temperatura ótima de atomização a temperatura de pirólise foi fixada em 600 °C na solução de referência e em 800 °C na amostra sólida por 30 s e a temperatura de atomização variada de 1600 a 2200 °C por 10 s (Figura 26). Na temperatura de 1600 °C o sinal analítico não foi completamente integrado para a amostra sólida. A Figura 27 demonstra que o sinal de fundo na amostra sólida foi desprezível no intervalo de temperatura estudado.



**Figura 26.** Curvas de pirólise e atomização para prata: ■ amostra; ◆ solução aquosa (0,025 ng de prata). Os valores de absorvância integrada para a amostra sólida foram normalizados para 1 mg de amostra. Barras verticais representam o desvio padrão (n= 3).



**Figura 27.** Variação do sinal de fundo para Ag em altura: ◆ solução aquosa; ■ amostra sólida (utilizando massas de amostra entre 0,5 a 0,7 mg). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 3).

Considerando a volatilidade da prata decidiu-se verificar a influência do paládio sobre o sinal analítico tanto na amostra sólida quanto na solução de

referência aquosa. Muitos autores, com intuito de aumentar a temperatura de pirólise para, desta maneira, favorecer a remoção da matriz da amostra, também utilizaram Pd como modificador químico na determinação de prata em diversos tipos de amostras.<sup>74,114-116</sup> Para este estudo, foi feita a curva de pirólise fixando a temperatura de atomização em 1800 °C por 10 s e curva de atomização fixando-se a temperatura de pirólise em 800 °C por 30 s, tanto para a amostra sólida quanto para a solução de referência aquosa. Conforme observado na Figura 28, o sinal da prata na solução de referência aquosa permaneceu estável até a temperatura de 1000 °C. Na amostra sólida, a adição de paládio não alterou a temperatura ótima de pirólise (800 °C). O sinal de fundo na amostra sólida aumentou com o aumento da temperatura de atomização. No entanto, este foi desprezível na faixa de temperatura estudada (Figura 29).

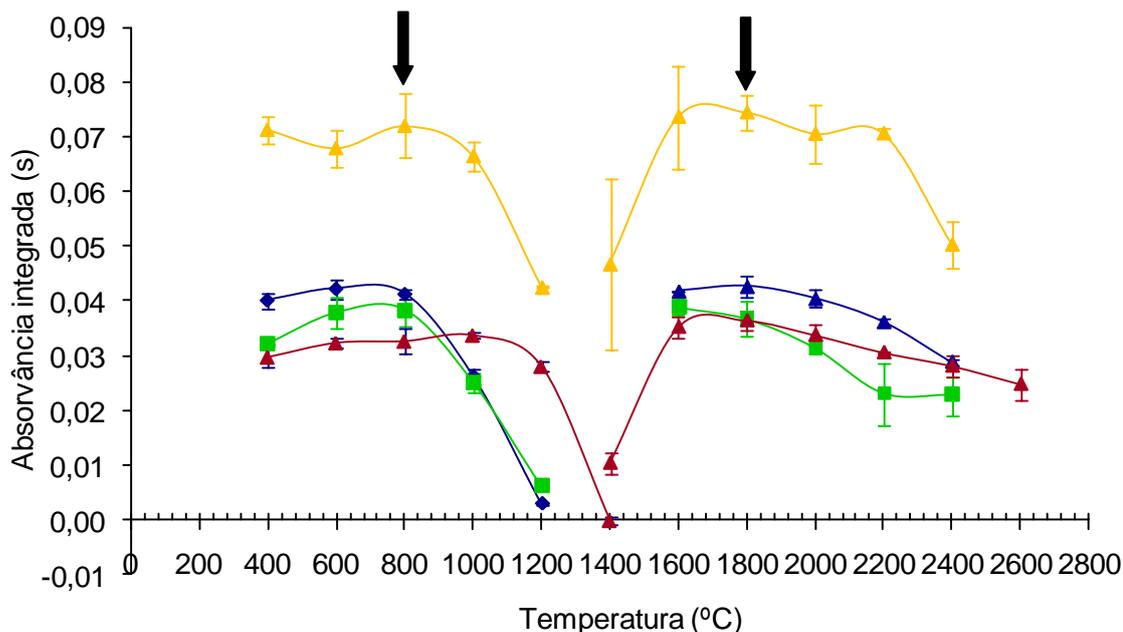
Deste modo, para a determinação de Ag nas amostras de ferro aminoácido quelato optou-se em utilizar o paládio, pois a utilização deste modificador permitiu a utilização de temperaturas mais elevadas na etapa de pirólise na solução de referência aquosa, sem a perda de analito, o que poderá favorecer em uma remoção mais eficiente da matriz da amostra. Assim, as temperaturas de pirólise e atomização selecionadas para a determinação de prata nas amostras de ferro aminoácido quelato, foram 800 °C por 30 s e 1800 °C por 10 s, respectivamente, com a utilização de 20 µL de uma solução contendo 4 µg de paládio.

<sup>74</sup> RESANO *et. al.*; *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 142–149.

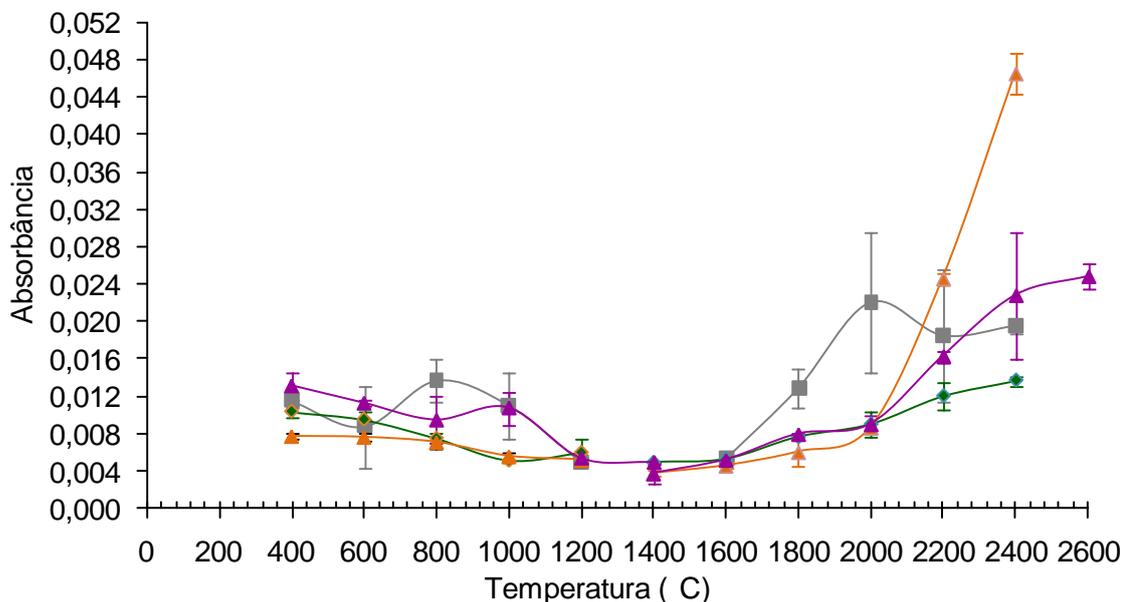
<sup>114</sup> BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A.; *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 777–786.

<sup>115</sup> XIAO-QUAN, S.; BEI, W.; *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 791–798.

<sup>116</sup> BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; BERMEJO-BARRERA, A.; *Talanta* 43 (1996) 1783 – 1792



**Figura 28.** Curvas de pirólise e atomização para prata:  $\blacklozenge$  solução aquosa (0,025 ng de prata);  $\blacktriangle$  solução aquosa (0,025 ng de prata e 4  $\mu\text{g}$  de Pd);  $\blacksquare$  amostra sólida;  $\blacktriangle$  amostra sólida (contendo 4  $\mu\text{g}$  Pd). Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).



**Figura 29.** Variação do sinal de fundo para Ag em altura:  $\blacklozenge$  solução aquosa (0,025 ng de prata);  $\blacktriangle$  solução aquosa (0,025 ng de prata e 4  $\mu\text{g}$  de Pd);  $\blacksquare$  amostra sólida, utilizando massas de amostra entre 0,5 a 0,7 mg;  $\blacktriangle$  amostra sólida (contendo 4  $\mu\text{g}$  Pd), utilizando massas de amostra entre 0,4 a 0,8 mg. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

Cabe ressaltar, que a adição de água sobre a superfície da amostra diminui a formação de resíduo após o programa de aquecimento da amostra. No entanto, com a utilização de massas maiores foi observada a formação de uma pequena quantidade de resíduo de carbono amorfo e ferro sobre a plataforma, que foi facilmente removido com a utilização de uma espátula. A remoção dos resíduos da plataforma é importante para evitar a aglomeração de partículas, como já citado anteriormente, no item 4.1.

### 4.3. Sinais analíticos

Os sinais analíticos e os sinais de fundo nas amostras sólidas de ferro aminoácido quelato e nas soluções de referência aquosa foram avaliados nas melhores condições de temperaturas de pirólise e atomização.

O perfil dos sinais de Cr e de Ni nas amostras de ferro aminoácido quelato e nas soluções de referência aquosa, obtidos com sensibilidade reduzida, foram similares (Figura 30 A e B). Os sinais analíticos nas amostras sólidas foram completamente integrados em 12 s, enquanto que na solução de referência aquosa, a integração completa ocorreu em torno de 7 s. Conforme a Figura 30 A e B, a vaporização de ambos os analitos aconteceu, praticamente, no mesmo instante que a matriz da amostra. Os sinais de fundo na amostra sólida apresentaram altura de pico menor que 0,25 de absorvância (em altura) para Ni e menor que 0,20 de absorvância (em altura) para Cr e foram, aparentemente, corrigidos pelo efeito Zeeman.

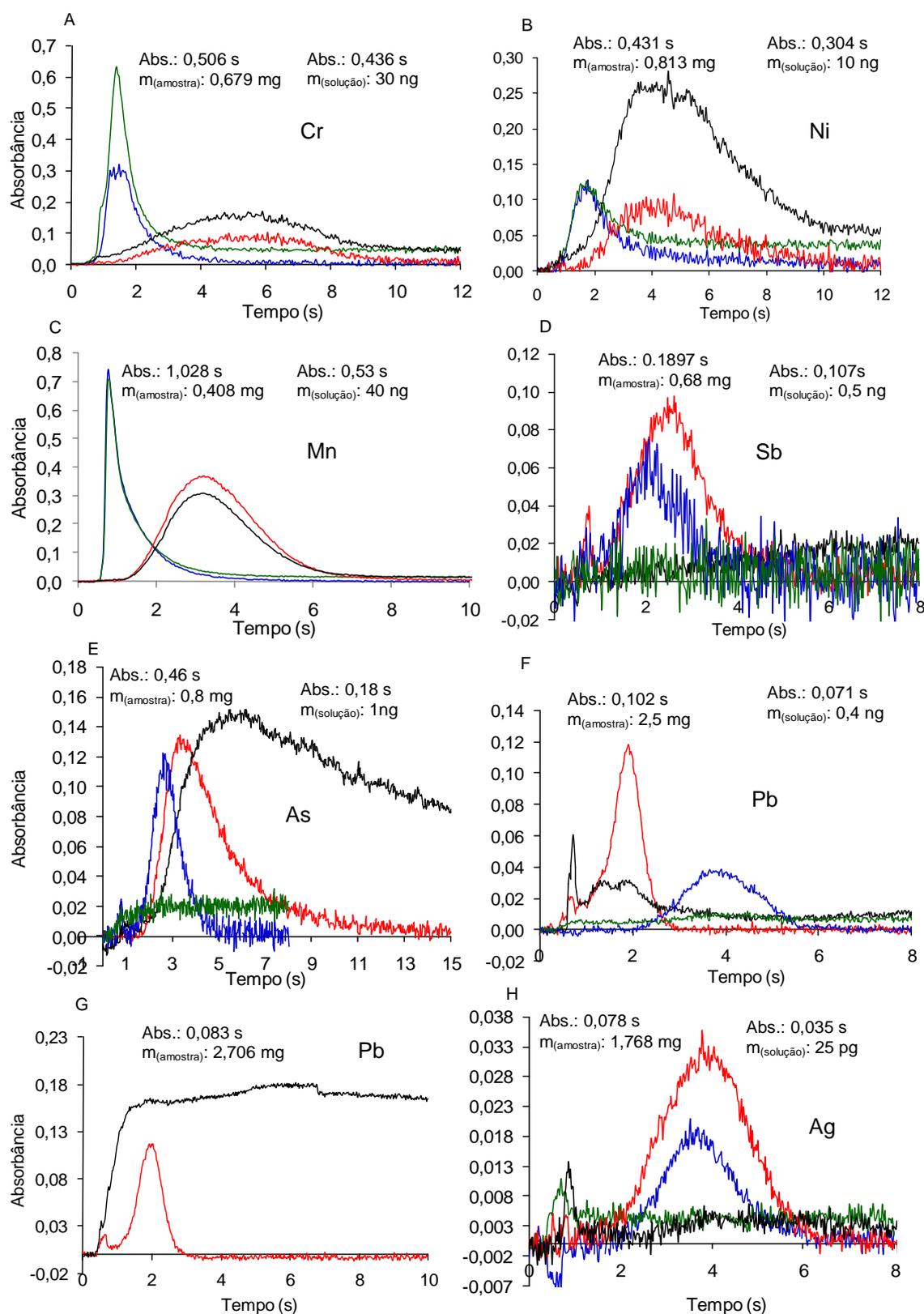
Como comentado anteriormente, os testes preliminares indicaram que as amostras de ferro aminoácido quelato continham altas concentrações de Mn. Desta maneira, os sinais analíticos do Mn foram obtidos com sensibilidade reduzida. Conforme verificado na Figura 30 C, a integração completa do sinal de Mn ocorreu em 8 s, enquanto que na solução de referência aquosa, a integração completa foi em torno de 5 s. Assim como observado para Cr e Ni, a vaporização do Mn aconteceu, praticamente, no mesmo instante que a matriz da amostra. O sinal de fundo na amostra sólida apresentou 0,4 de absorvância (em altura) e, aparentemente, foi corrigido pelo efeito Zeeman.

---

Na Figura 30 E, estão apresentados os sinais obtidos para a amostra sólida e para a solução aquosa contendo arsênio. Os sinais analíticos, obtidos na sensibilidade máxima foram completamente integrados em 6 s na solução de referência aquosa, enquanto na amostra sólida este foi integrado em 15 s. A matriz da amostra vaporizou, praticamente, no mesmo instante que o sinal analítico. O sinal de fundo na amostra sólida foi menor que 0,15 em absorbância (altura de pico).

Os sinais obtidos para Pb na amostra sólida e na solução de referência estão apresentados na Figura 30 F - G. O sinal analítico na amostra sólida foi totalmente integrado em 4 s, enquanto na solução de referência aquosa este foi completamente integrado em 6 s. O sinal de fundo na amostra apresentou valores de absorbância insignificantes, completamente corrigidos pelo efeito Zeeman. No entanto, o sinal de fundo na amostra sólida aumentou com a utilização de massas superiores a 2,7 mg, como observado na Figura 30 G.

Os perfis do Sb e da Ag na amostra sólida e na solução de referência aquosa foram similares, conforme exibido na Figura 30 D e H, respectivamente. Os sinais analíticos de ambos os elementos foram completamente integrados em 6 s. Os sinais de fundo observados na amostra sólida foram insignificantes.



**Figura 30.** Perfil dos sinais analíticos na amostra sólida (---), perfil dos sinais analíticos na solução de referência aquosa (—), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (---) e perfil do sinal de fundo na solução de referência aquosa (---).

#### 4.4. Efeito da massa de amostra e linearidade

A avaliação do efeito da massa de amostra sobre a concentração dos analitos em estudo neste trabalho foi feita plotando-se a concentração do analito versus a quantidade de massa introduzida no atomizador, considerando-se a faixa de resposta linear do elemento. Os resultados foram avaliados através da ANOVA (teste de comparação múltipla Tukey-Kramer) considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Insttat 3.0 (Graph Pad Software). As massas de amostras empregadas para a quantificação dos analitos nas amostras de ferro aminoácido quelato variaram entre 0,1 a 2,5 mg, dependendo do analito determinado.

A faixa linear foi avaliada através do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. Este estudo foi feito segundo recomendações do Guia de Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.<sup>117</sup> Para isso, calculou-se o valor de  $t$  através da Equação 20:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|X_{\text{medido}} - X_{\text{calculado}}|}{S_r / \sqrt{n}} \quad \text{Equação 20}$$

Onde:

$S_r$  = desvio padrão dos resíduos

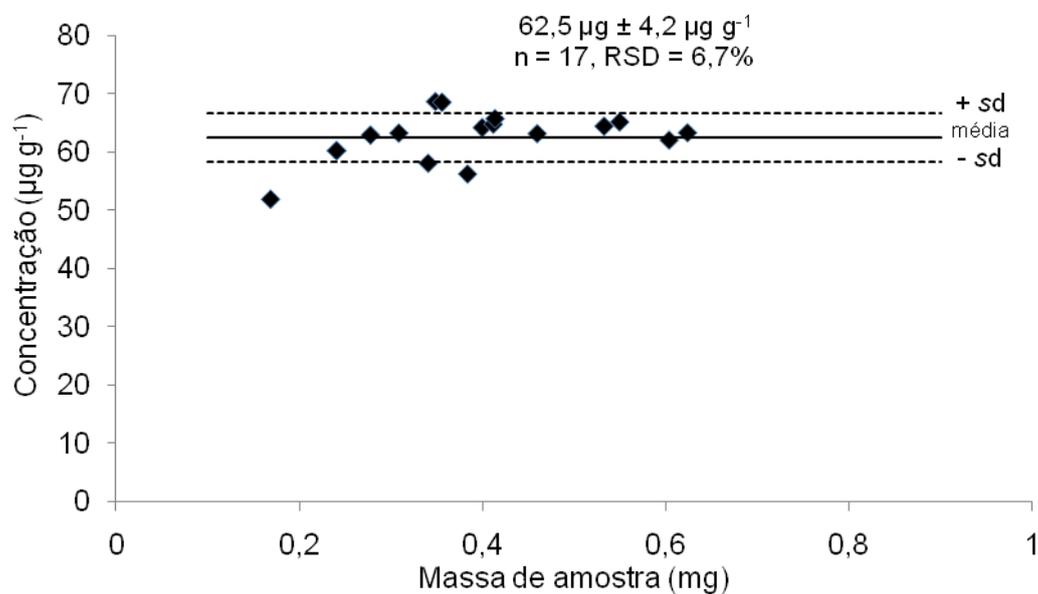
$n$  = número de pontos

Se o valor de  $t_{\text{calculado}}$  para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor  $t$  unilateral, para a confiança desejada e  $(n - 1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até este ponto, é linear. Para todos os analitos, foi empregada a amostra FAQ1.

O estudo da influência da massa de amostra para cromo foi realizado através de 17 medidas e não foi observada diferença significativa entre os valores de massas entre 0,1 a 0,7 mg de amostra (Figura 31). Desta maneira, esta faixa de massa foi empregada para a quantificação de Cr nas amostras de ferro

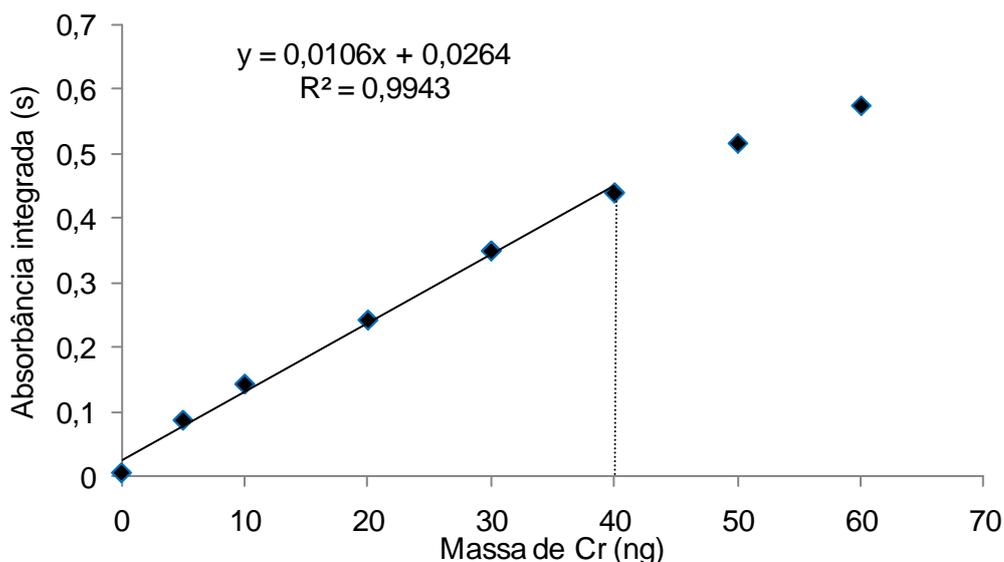
<sup>117</sup> INMETRO, DOQ-CGCRE-008 (2007).

aminoácido quelato. A grande concentração de Cr nas amostras impediu a introdução de uma massa maior de amostra no atomizador, mesmo utilizando recursos para diminuir a sensibilidade, como vazão de argônio durante a etapa de atomização e campo magnético variável (modo 3 *field*, 0,6-0,8 T).



**Figura 31.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Cr. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.

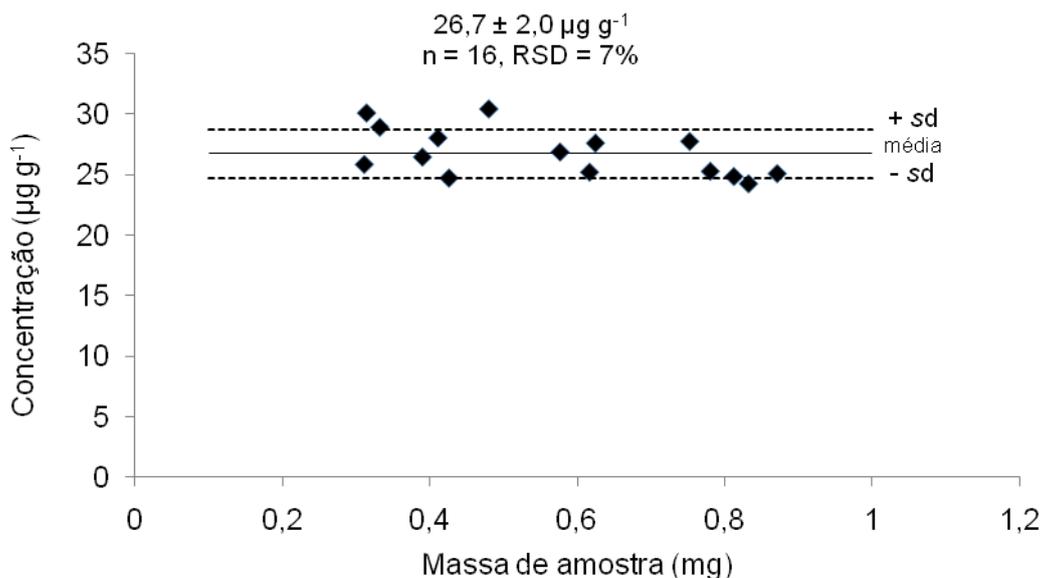
O estudo da linearidade para Cr foi feito com emprego de soluções de referência aquosas. Este indicou que a faixa linear para cromo pode ser estendida até 40 ng (Figura 32).



**Figura 32.** Faixa linear para Cr em solução de referência aquosa;  $\blacklozenge$  medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de cromo; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

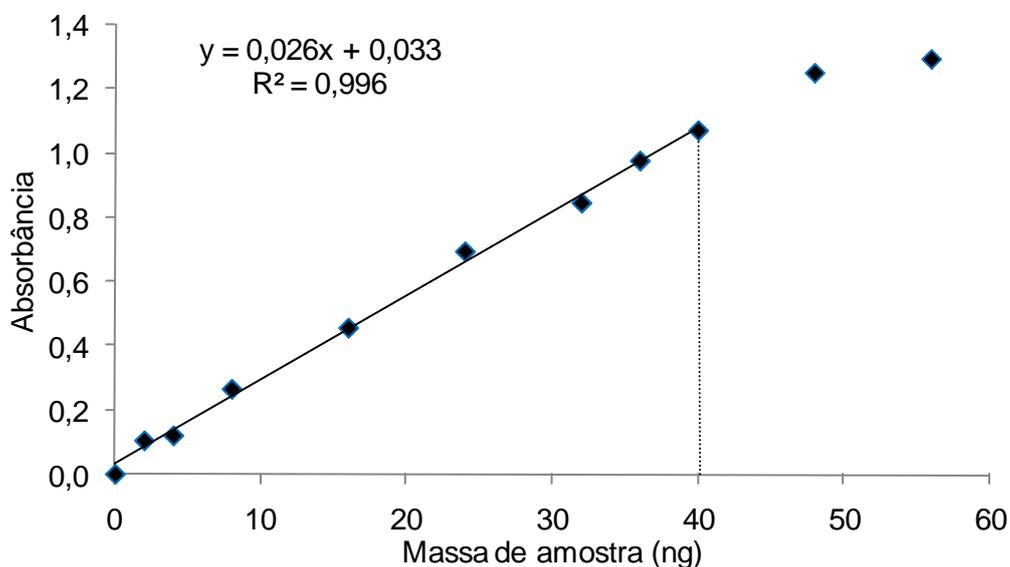
O cálculo da massa característica foi obtido utilizando recursos para diminuir a sensibilidade, os quais foram citados anteriormente. Para a amostra sólida foi esta feita através da média de 15 medidas de cromo utilizando massas distribuídas na faixa linear, entre 0,1 a 0,7 mg. O valor médio da massa característica para Cr na amostra sólida foi de  $354 \pm 10$  pg, enquanto na solução de referência aquosa o valor encontrado foi de  $355 \pm 11$  pg ( $n = 5$ ).

Para o estudo da influência da quantidade de massa introduzida no atomizador para níquel foram feitas 16 medidas na amostra sólida de ferro aminoácido quelato. Os resultados do teste estatístico ANOVA demonstraram que os valores de concentração obtidos utilizando massas entre 0,1 a 0,9 mg não diferem significativamente, conforme Figura 33. Assim como para cromo, o fator limitante para o aumento de massa introduzida no atomizador foi à alta concentração de níquel encontrada nas amostras de ferro aminoácido quelato.



**Figura 33.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Ni. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.

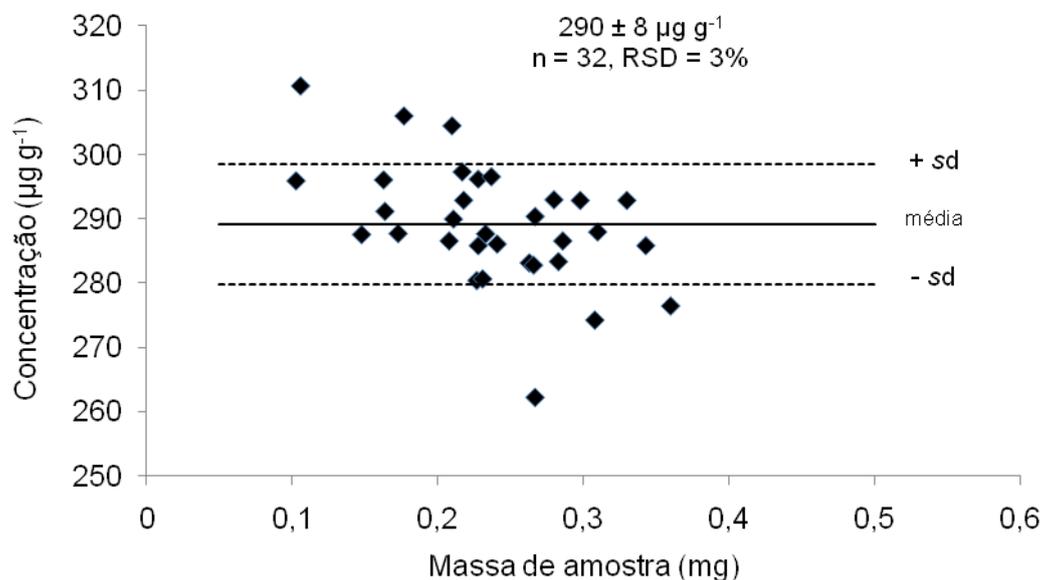
A faixa linear do níquel na solução de referência aquosa foi estendida até 40 ng, conforme Figura 34.



**Figura 34.** Faixa linear para Ni em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de níquel; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

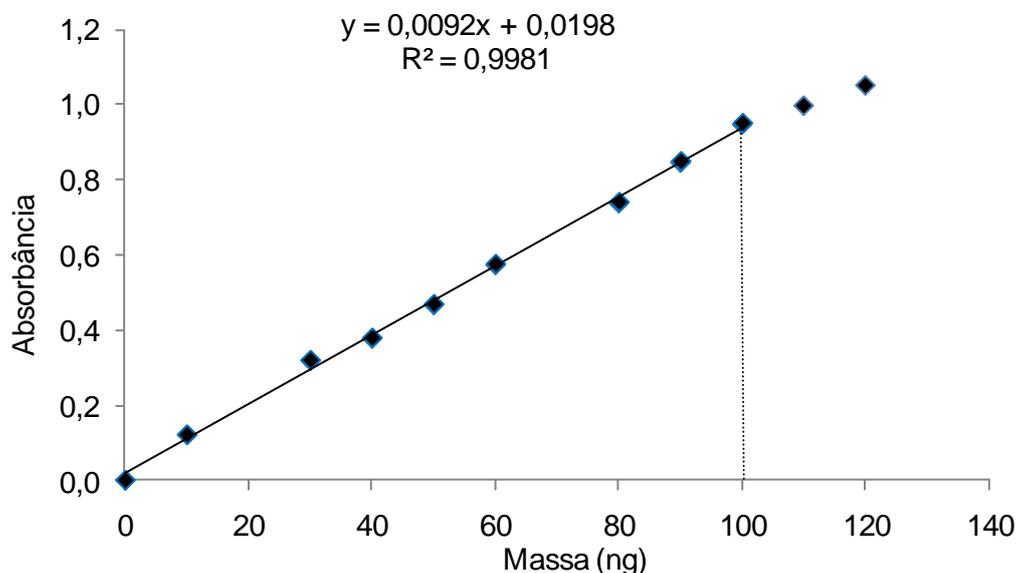
O valor da massa característica para Ni foi calculado em uma condição de baixa sensibilidade. O valor médio da massa característica de níquel para a amostra sólida foi obtido a partir da média de 14 medidas, utilizando-se até 0,9 mg de massa de amostra. Para a amostra sólida, o valor da massa característica do Ni foi de  $197 \pm 12$  pg, enquanto que para a solução de referência aquosa, este valor foi de  $198 \pm 10$  pg ( $n = 5$ ). Os valores da massa característica de Ni obtidos na solução de referência aquosa e na amostra sólida demonstram concordância.

No estudo da influência da massa de amostra sobre a concentração de manganês, 32 medidas foram realizadas na amostra sólida. Com o intervalo de 95% ( $p < 0,05$ ), os resultados do teste ANOVA demonstraram que não existe diferença significativa entre as concentrações obtidas com a introdução no atomizador de massas entre 0,1 a 0,4 mg de amostra (Figura 35). Assim como observado para cromo e níquel, o fator que limitou o aumento da quantidade de amostra introduzida no atomizador foi à concentração de Mn encontrada nas amostras de ferro aminoácido quelato, mesmo determinando o analito com sensibilidade reduzida (linha secundária, vazão de argônio durante a etapa de atomização e campo magnético variável – modo *3-field*, 0,6-0,8 T).



**Figura 35.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Mn. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.

Segundo o teste estatístico aplicado nas medidas de alíquotas da solução de referência aquosa, a faixa linear para manganês foi até 100 ng (Figura 36).

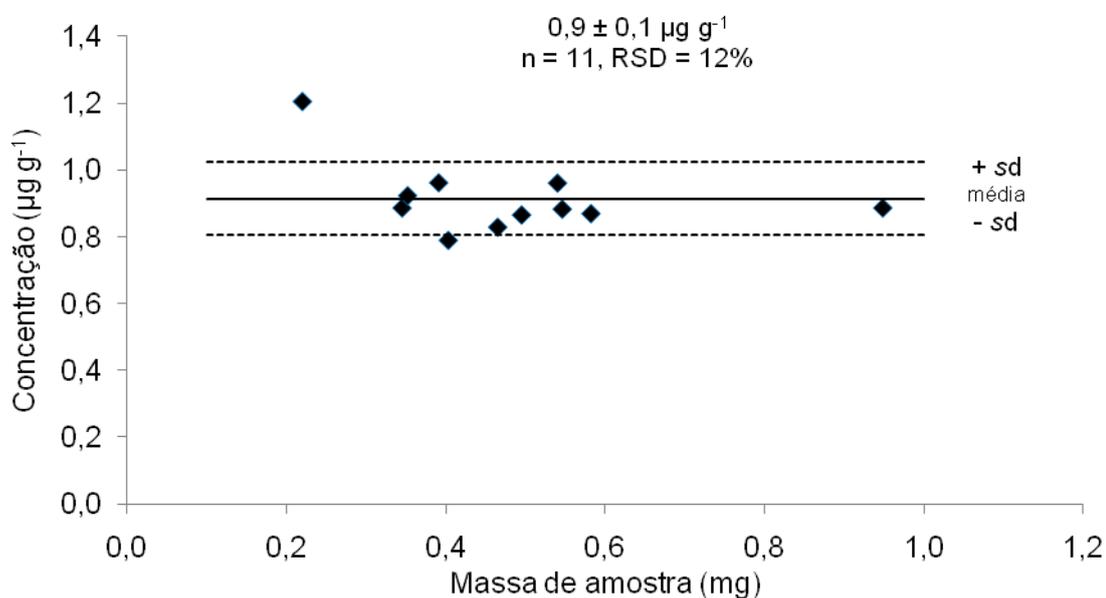


**Figura 36.** Faixa linear para Mn em solução de referência aquosa; ♦ medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de manganês; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

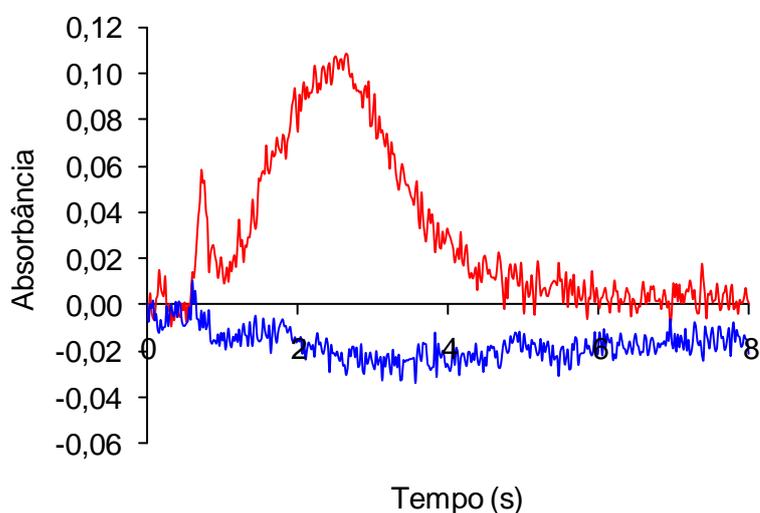
Assim como para Cr e Ni, o valor da massa característica para Mn foi calculado em uma condição de baixa sensibilidade. O valor da massa característica na amostra sólida foi obtido a partir de 17 medidas de manganês na amostra sólida, utilizando massas entre 0,1 a 0,4 mg, distribuídas na faixa linear. Para a amostra sólida o valor médio da massa característica foi de  $465 \pm 3$  pg, enquanto para a solução de referência aquosa, o valor médio da massa característica foi de  $466 \pm 5$  pg ( $n = 6$ ), sendo os valores considerados concordantes.

O estudo da influência da massa de amostra introduzida no atomizador sobre a concentração de antimônio nas amostras de ferro aminoácido quelato foi feita através de 11 medidas e os resultados obtidos com o teste estatístico ANOVA, considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), demonstraram que os valores de concentração não diferem estatisticamente, utilizando massas de amostra entre 0,1 a 0,9 mg de amostra (Figura 37). Massas

de amostras superiores a 0,9 mg causam alguma interferência, provavelmente física, que torna o sinal de fundo negativo, conforme verificado na Figura 38.

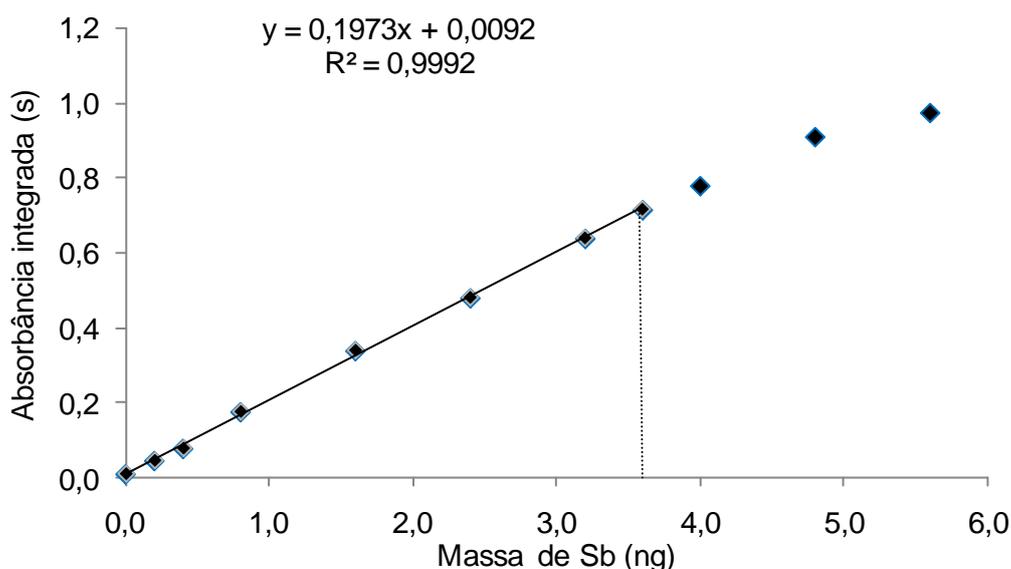


**Figura 37.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Sb. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.



**Figura 38.** Perfil do sinal do antimônio na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 0,9 mg.

O estudo da linearidade de antimônio na solução de referência aquosa indicou que a faixa linear deste elemento foi até 3,6 ng (Figura 39).

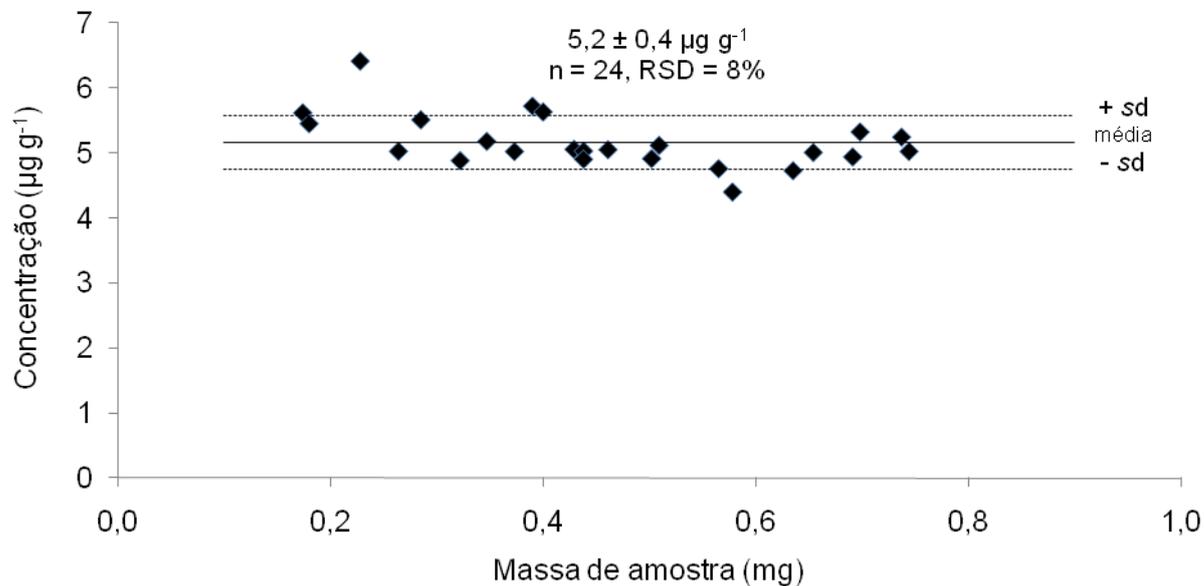


**Figura 39.** Faixa linear para Sb em solução de referência aquosa;  $\blacklozenge$  medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de antimônio; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

A massa característica de antimônio na amostra sólida foi calculada através da média de 11 medidas empregando massas distribuídas entre 0,1 a 0,9 mg de amostra. A massa característica na amostra sólida foi de  $20,6 \pm 0,2$  pg, enquanto que o valor médio da massa característica do antimônio na solução de referência aquosa foi de  $20,5 \pm 1,0$  pg ( $n = 5$ ). Estes valores foram estatisticamente concordantes.

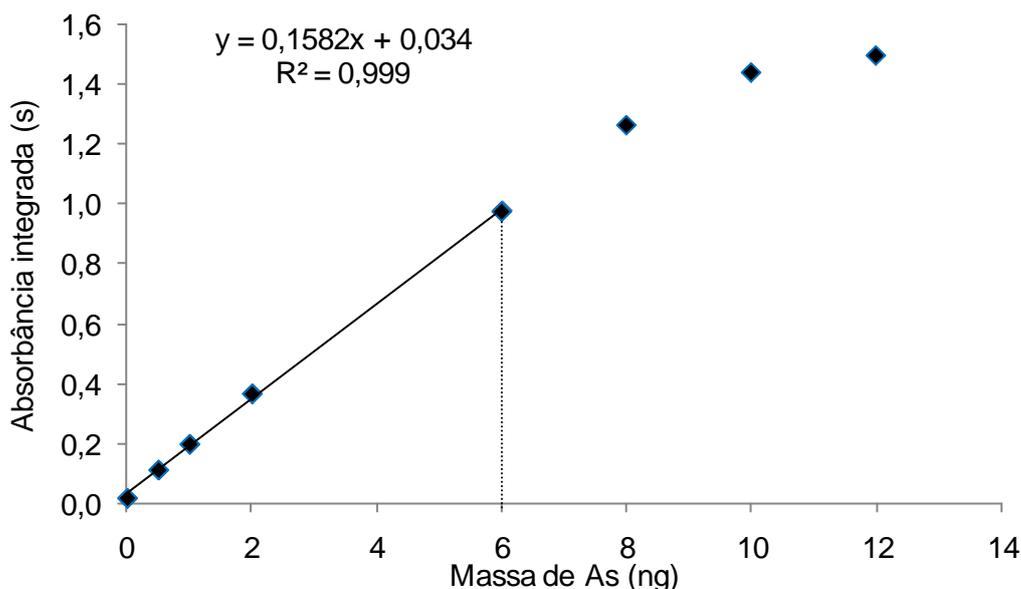
O estudo da influência da massa de amostra introduzida no atomizador sobre a concentração de arsênio na amostra de ferro aminoácido quelato foi feito através de 24 medidas da amostra sólida. Com um intervalo de 95% de confiança, o teste estatístico ANOVA, indicou que massas de amostra entre 0,1 a 0,8 mg podem ser utilizadas para a determinação de arsênio nas amostras de ferro aminoácido quelato, pois a concentração obtida com essas massas de amostra não apresentou diferença estatística significativa. A Figura 40 apresenta o intervalo de massa de amostra utilizada para fazer a quantificação deste elemento nas amostras de ferro aminoácido quelato. Cabe ressaltar, que não foi possível aumentar a quantidade de massa de amostra introduzida no atomizador, pois

massas maiores que 0,8 mg, interferiram na integração do sinal de arsênio, onde o sinal analítico não voltou completamente à linha base.



**Figura 40.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de As. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.

No estudo da linearidade, com arsênio em solução de referência aquosa, foi verificado que o limite superior da faixa linear foi de 6 ng de arsênio (Figura 41).

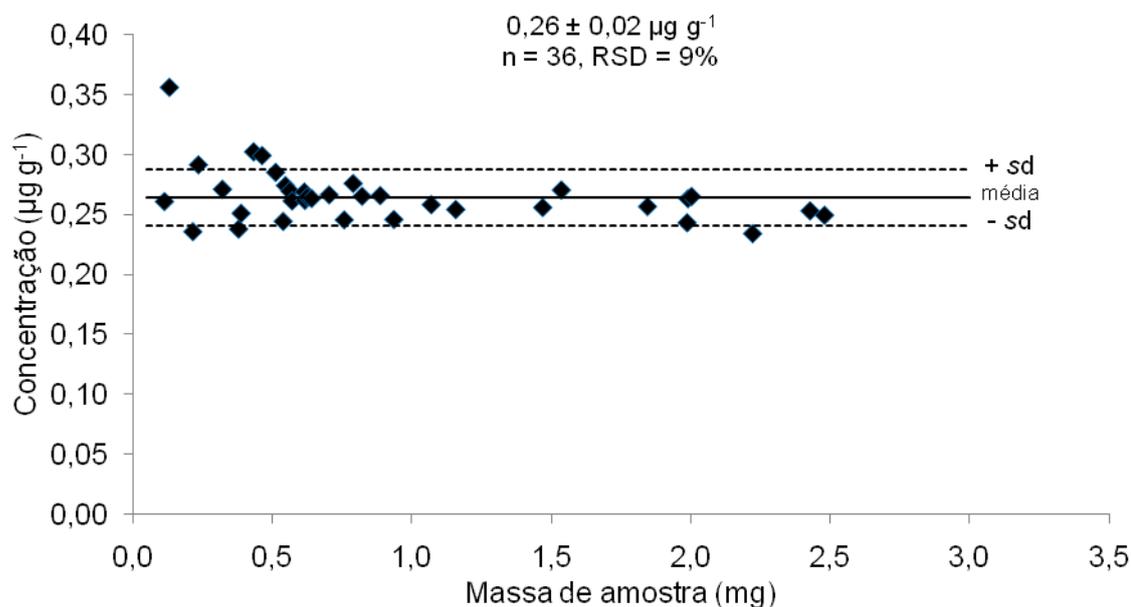


**Figura 41.** Faixa linear para As em solução de referência aquosa;  $\blacklozenge$  medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de arsênio; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

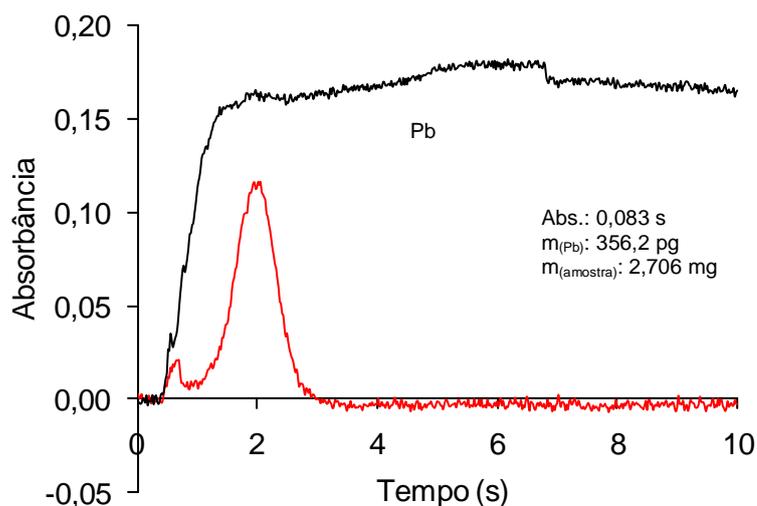
Para calcular a média do valor da massa característica, foram consideradas 7 medidas de arsênio para a amostra sólida. Utilizando-se massas de amostra entre 0,1 e 0,8 mg, o valor médio da massa característica de arsênio na amostra sólida foi  $24,7 \pm 0,4$  pg. A massa característica média para arsênio na solução de referência aquosa foi  $24,0 \pm 2,1$  pg ( $n = 6$ ). Os valores da massa característica na amostra sólida e na solução de referência aquosa encontrados foram concordantes.

O estudo da influência da quantidade de massa de amostra introduzida no atomizador sobre a concentração de chumbo foi realizado através de 36 medidas (intervalo de confiança de 95%,  $p < 0,05$ ). Os resultados do teste estatístico ANOVA demonstraram que massas de amostra entre 0,1 a 2,5 mg apresentam a mesma influência sobre a concentração de Pb nas amostras de ferro aminoácido quelato, pois não apresentaram diferenças estatísticas significativas. A Figura 42 demonstra o intervalo de massa de amostra que pode ser utilizado para a determinação de chumbo em amostras de ferro aminoácido quelato. Com a utilização de massas superiores a 2,5 mg foi observado um pequeno efeito de

supercorreção do sinal de fundo (Figura 43). Além do mais, o sinal de fundo com essa quantidade de amostra sólida apresentou absorbâncias negativas, provavelmente, devido a uma interferência física provocada com a utilização de uma quantidade maior de massa de amostra.

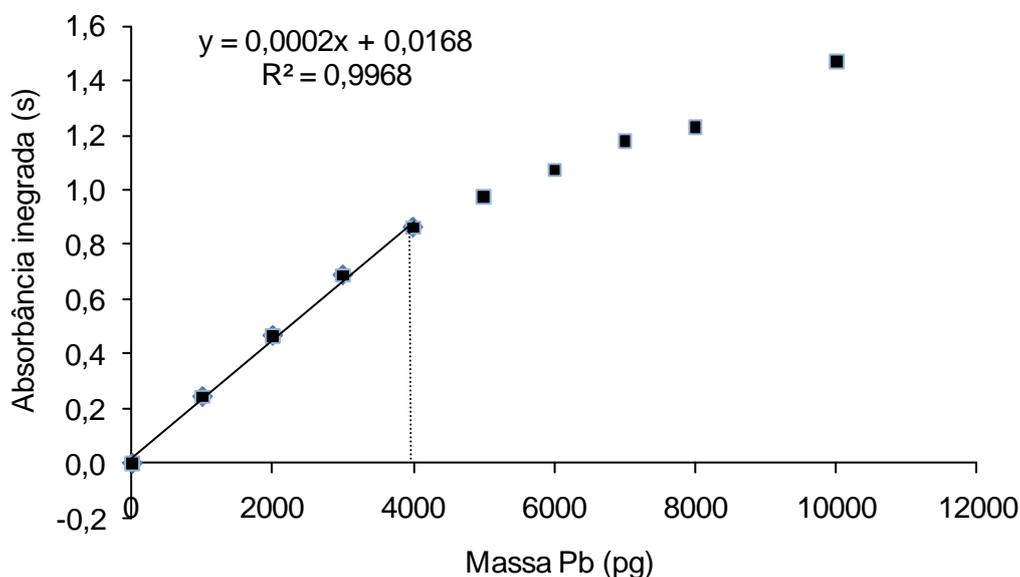


**Figura 42.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Pb. ♦ representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.



**Figura 43.** Perfil do sinal do chumbo na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 2,7 mg.

O estudo da linearidade do chumbo em solução de referência aquosa demonstrou que o limite superior da faixa linear é 4000 pg de chumbo (Figura 44).

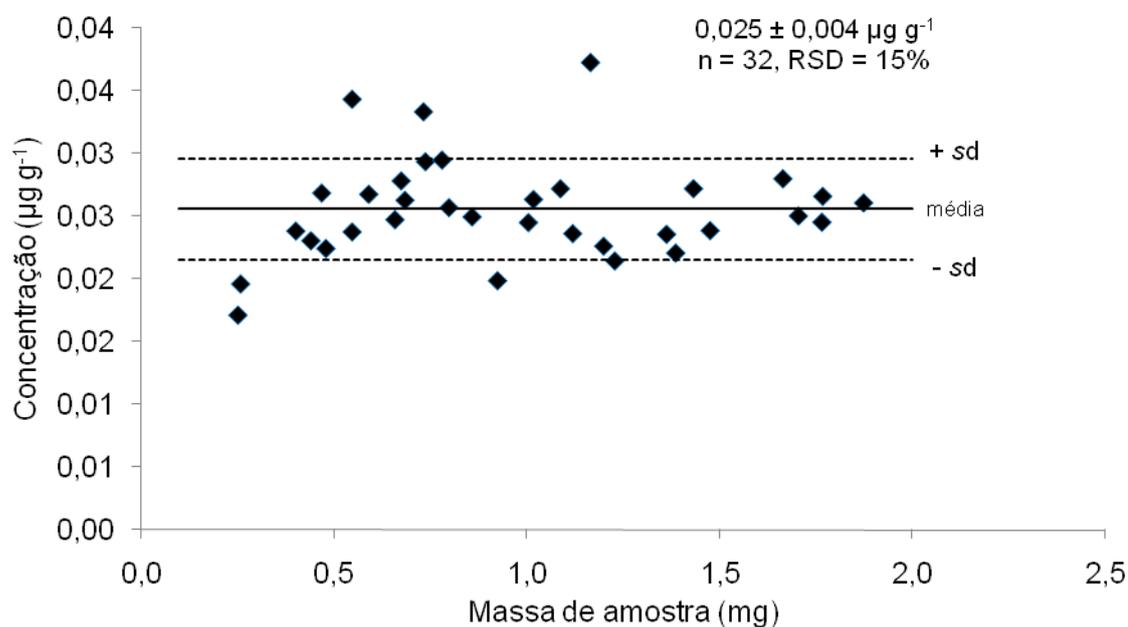


**Figura 44.** Faixa linear para Pb em solução de referência aquosa;  $\blacklozenge$  medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de chumbo; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

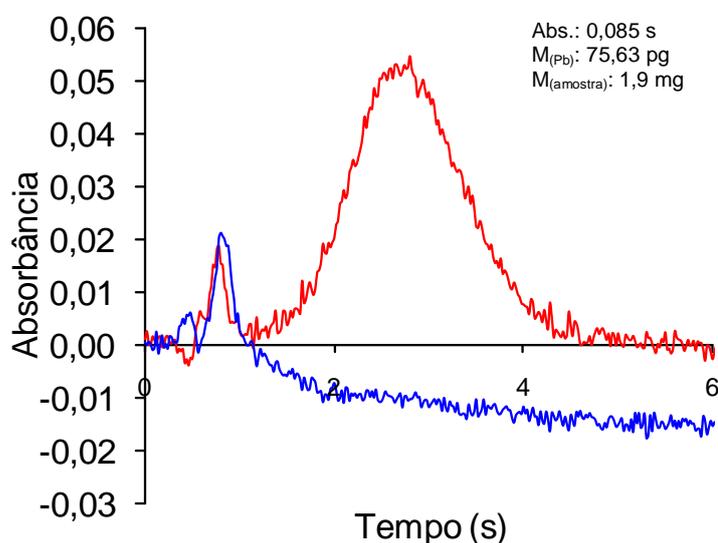
Para calcular o valor médio da massa característica de chumbo na amostra sólida foram consideradas 11 medidas de chumbo utilizando massas de amostra entre 0,1 a 2,5 mg. O valor médio da massa característica na amostra sólida foi  $19 \pm 1$  pg, enquanto na solução de referência foi  $19 \pm 1$  pg ( $n = 8$ ). Os valores das massas características foram concordantes.

O estudo da influência da massa de amostra sobre a concentração de prata na amostra de ferro aminoácido quelato foi realizado através de 32 medidas e os resultados do teste estatístico ANOVA, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), demonstraram que os valores de concentração não diferem significativamente, utilizando massas de amostra entre 0,1 a 1,9 mg. A Figura 45 apresenta a faixa de massa de amostra que pode ser utilizada para a determinação de prata em amostras de ferro aminoácido quelato. Assim como observado para chumbo e para antimônio o aumento de massa de amostra introduzida no atomizador causou uma interferência, provavelmente física, que fez

com que o sinal de fundo, apresentasse absorbâncias negativas com a utilização de massas superiores a 1,9 mg (Figura 46).

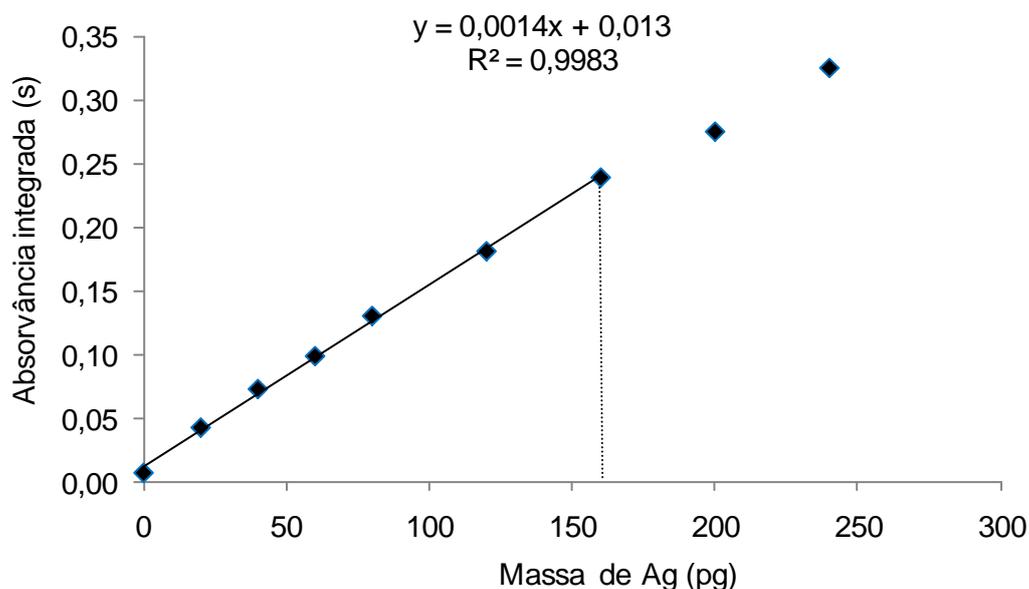


**Figura 45.** Influência da massa de amostra sobre a concentração de Ag.  $\blacklozenge$  representa uma medida da amostra sólida. A linha preta é a média da concentração da amostra e as linhas pontilhadas representam o desvio padrão das medidas.



**Figura 46.** Perfil do sinal da prata na amostra sólida (-), perfil do sinal de fundo na amostra sólida (-), utilizando massa de amostra em torno de 1,9 mg.

O estudo da linearidade da prata na solução de referência aquosa demonstrou que a faixa linear vai até 160 pg, conforme observado na Figura 47.



**Figura 47.** Faixa linear para Ag em solução de referência aquosa;  $\blacklozenge$  medidas dos valores da solução de referência aquosa utilizando alíquotas com massas crescentes de prata; (-) reta obtida através das medidas da solução de referência aquosa utilizando o método dos mínimos quadrados; (-----) limite da faixa linear.

O valor da massa característica da prata na amostra sólida foi obtido a partir do valor médio de 11 medidas de prata utilizando-se massas de amostra entre 0,1 a 1,9 mg. O valor da massa característica obtido para prata na amostra sólida foi  $2,4 \pm 0,2$  pg, enquanto que valor da massa característica na solução de referência de prata foi  $2,4 \pm 0,4$  pg ( $n = 6$ ). Os valores médios da massa característica para prata foram concordantes.

#### 4.5. Análise das amostras

A etapa de calibração é extremamente importante para garantir a qualidade dos resultados analíticos. Esta etapa pode ser crítica para as técnicas que permitem a análise direta da amostra sólida, como a DSS-GF AAS, pois o processo de vaporização e atomização do analito pode depender na forma o qual está presente na amostra sólida e este poderá, também, ser afetado pela matriz

da amostra.<sup>8</sup> A calibração para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato foi feita utilizando soluções de referência aquosa. Segundo Krivan e Dong,<sup>118</sup> o principal requisito para a utilização de soluções de referência para construir a curva de calibração é a garantia que o efeito da matriz seja negligenciável. Normalmente, isto pode ser verificado através da comparação do valor da massa característica obtido na amostra sólida e na solução de referência aquosa (uma curva de adição de analito também poderia evidenciar este efeito).

Os valores da massa característica dos analitos na amostra sólida e nas soluções de referência aquosa foram apresentados no item anterior (4.4. Efeito da massa de amostra e linearidade). Segundo os resultados obtidos, o valor da massa característica na amostra sólida foi concordante com o valor da massa característica nas soluções de referência dos analitos estudados. Desta maneira, foi possível a utilização de soluções de referência aquosa para a construção da curva de calibração do instrumento.

A curva analítica de calibração para cromo, manganês e níquel foi construída utilizando recursos para diminuir a sensibilidade da determinação. A curva para cromo e níquel foi construída a partir de soluções de referência aquosa contendo Cr na faixa de 5 a 40 ng e Ni na faixa de 2 a 20 ng, com campo magnético variável (modo *3-field*, 0,6-0,8 T) e vazão de argônio durante a etapa de atomização. A curva de calibração para manganês foi construída com soluções de referência aquosa na faixa de 10 a 100 ng, utilizando campo magnético variável (modo *3-field*, 0,6-0,8 T), vazão de argônio durante a etapa de atomização e linha secundária (403,1 nm).

As curvas analíticas de calibração para antimônio, arsênio, prata e chumbo foram construídas na máxima sensibilidade, utilizando comprimento de onda principal, vazão de argônio interrompida durante a atomização e com campo magnético de alta sensibilidade (modo *2-field*, 0,8 T). A curva analítica para antimônio foi obtida a partir de uma solução de referência contendo 0,1 a 1 ng de antimônio. Para arsênio, a curva analítica de calibração foi entre 0,5 a 4 ng. Para

---

<sup>8</sup> DONG, H.M.; KRIVAN, V.; WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1747-1762.

<sup>118</sup> KRIVAN, V.; DONG, H. M.; *Anal. Chem.* 70 (1998) 5312-5321.

chumbo a curva foi construída a partir de uma solução de referência aquosa contendo Pb na faixa entre 50 a 800 pg, adicionando 20 µL de uma solução contendo 4 µg de paládio, como modificador químico. Para prata a faixa da curva de calibração foi entre 10 a 60 pg de Ag, utilizando 20 µL de uma solução contendo 4 µg paládio, como modificador químico.

A Tabela 6 apresenta as equações da regressão linear das curvas de calibração e os respectivos coeficientes de determinação.

**Tabela 6.** Parâmetros da curva de calibração obtidos com solução de referência aquosa para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Sb e Pb.

Elemento	Equação de regressão linear	Coeficiente de correlação de determinação ( $R^2$ )
Ag	Abs.int. = 0,001 m** + 0,011	0,999
As	Abs.int. = 0,165 m* + 0,028	0,999
Cr	Abs.int. = 0,010 m* + 0,026	0,994
Mn	Abs.int. = 0,009 m* + 0,019	0,998
Ni	Abs.int. = 0,020 m* + 0,021	0,998
Sb	Abs.int. = 0,207 m* + 0,003	0,997
Pb	Abs.int. = 0,0002 m** + 0,002	0,999

m = massa do analito em ng\* e em pg\*\*.

Os perfis da Ag, As, Cr, Mn, Ni, Sb e Pb na solução de referência aquosa e na amostra sólida de ferro aminoácido quelato estão apresentados na Figura 30. Na análise por amostragem direta de sólidos, a completa liberação do analito da amostra sólida em um tempo de atomização razoável representa um pré-requisito fundamental.<sup>118</sup> Na análise da amostra de ferro aminoácido quelato, foram observadas diferenças no comportamento de liberação dos analitos na solução de referência aquosa e na amostra sólida. A liberação dos elementos As, Cr, Mn e Ni da matriz da amostra sólida foi mais lenta, o perfil do sinal analítico foi mais

alargado e o aparecimento do sinal analítico necessitou de um tempo maior, quando comparado com a solução de referência aquosa. Mesmo assim, a liberação quantitativa pôde ser obtida com o uso de tempo de atomização de até 15 s (Figura 30). Entretanto, a liberação da prata e do antimônio da amostra sólida foi praticamente no mesmo tempo que da solução de referência aquosa (Figura 30) e para chumbo, a liberação do analito da amostra sólida foi em um tempo menor que a liberação do chumbo da solução de referência aquosa (Figura 30). Segundo Krivan<sup>118</sup> e Hornung<sup>119</sup>, a diferença no comportamento de liberação do analito entre amostras sólidas e soluções de referência aquosa não causa erros sistemáticos significativos, caso seja utilizado um atomizador com aquecimento transversal e uma taxa rápida de aquecimento.

#### 4.6. Resultados e parâmetros de mérito

Após estabelecer as temperaturas de pirólise e atomização e os melhores intervalos de massas de amostra introduzida no atomizador, foi feita a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato por DSS-GF AAS. Os resultados obtidos estão na Tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato por DSS-GF AAS.

Elemento	FAQ1		FAQ2		FAQ3	
	$\mu\text{g g}^{-1}$	RSD (%)	$\mu\text{g g}^{-1}$	RSD (%)	$\mu\text{g g}^{-1}$	RSD (%)
Ag	0,025 ± 0,004	15,0	0,026 ± 0,003	15,0	0,029 ± 0,003	9,0
As	5,2 ± 0,4	8,0	5,1 ± 0,5	10,2	3,4 ± 0,3	9,5
Cr	62,5 ± 4,2	6,7	65,2 ± 2,1	3,1	70,8 ± 4,1	5,7
Mn	290 ± 8	3,0	289, ± 12	4,0	285 ± 6	1,9
Ni	26,7 ± 2,0	7,4	26,3 ± 2,1	7,9	29,1 ± 0,8	2,6
Pb	0,26 ± 0,02	8,9	0,25 ± 0,02	6,4	0,13 ± 0,01	9,9
Sb	0,9 ± 0,1	11,9	0,9 ± 0,1	7,6	1,4 ± 0,1	8,9

<sup>118</sup> KRIVAN, V.; DONG, H. M.; *Anal. Chem.* 70 (1998) 5312-5321.

<sup>119</sup> HORNUNG, M.; KRIVAN, V.; *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 1177 – 1191.

O editorial do Pharmacopeial Forum<sup>120</sup> divulgou recentemente valores limites de metais considerados altamente tóxicos (As, Cd, Hg e Pb) em suplementos alimentares. Estes valores, provavelmente, serão incluídos na próxima edição da farmacopéia americana (USP). Segundo esse editorial, os limites máximos de arsênio e chumbo em produtos farmacêuticos é 1,5 e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 8).<sup>120</sup> Esses valores foram baseados em informações obtidas na literatura e em discussões envolvendo especialistas em toxicologia dos metais.<sup>120</sup> Os valores da concentração de arsênio encontrados nas amostras de ferro aminoácido quelato chegam a apresentar uma concentração 3,5 vezes maiores que o limite máximo estipulado por agências reguladoras. Entretanto, a concentração de chumbo encontrada nas amostras está abaixo do limite máximo exigido por órgãos reguladores.

**Tabela 8.** Limites de metais em suplementos alimentares.

Elemento	Limite ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Arsênio	1,5
Cádmio	0,5
Chumbo	1,0
Mercúrio	1,5

A homogeneidade das amostras de ferro aminoácido quelato foi avaliada conforme Kurfurst *et. al.*<sup>71</sup> calculando o valor da constante de homogeneidade ( $H_e$ ), discutida na seção 2.6.1.4.1. Como pode ser visualizado na Tabela 9, com exceção da prata nas amostras FAQ1 e FAQ2, os demais analitos apresentaram boa homogeneidade ( $H_e < 10$ ) considerando as massas médias de amostras utilizadas.

<sup>120</sup> PHARMACOPEIAL FORUM, 36 (2010) 1-9.

<sup>71</sup> KURFURST *et. al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 112-120.

**Tabela 9.** Constante de homogeneidade obtida para os analitos por DSS-GF AAS nas amostras de ferro aminoácido quelato.

Elemento	Constante de homogeneidade ( $H_e$ )		
	FAQ1	FAQ2	FAQ3
Ag	13	14	9
As	5	5	6
Cr	4	2	4
Mn	2	2	1
Ni	5	6	3
Pb	9	5	9
Sb	8	5	7

Os resultados obtidos por DSS-GF AAS foram comparados com os obtidos por ICP OES, ICP-MS (após digestão das amostras) e NAA. Os resultados foram avaliados através do teste estatístico ANOVA considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Na Tabela 10 são mostradas as concentrações médias obtidas na determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb na amostra FAQ2. O teste estatístico, ANOVA, não demonstrou diferença significativa entre os valores das concentrações de As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb obtidos pelas diferentes técnicas. Desta forma, pode-se verificar que os valores obtidos pelo método proposto, DSS-GF AAS, demonstram concordância com os obtidos com as técnicas ICP OES, ICP-MS e NAA. Como os resultados obtidos para a prata nas amostras de ferro aminoácido quelato por DSS-GF AAS estão abaixo do LD das técnicas comparativas (ICP OES, ICP-MS e NAA), foi feita adição de analito por meio de soluções de referência nas amostras antes destas serem introduzidas no atomizador. A recuperação para a prata empregando solução de referência foi maior que 97%.

**Tabela 10.** Resultados da determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb na amostra de ferro aminoácido quelato (FAQ2).

Elem.	DSS-GF AAS		ICP OES		ICP-MS		NAA	
	$\mu\text{g g}^{-1}$	RSD (%)						
Ag	$0,025 \pm 0,004$	15,0	< LD	-	< LD	-	-	-
As	$5,1 \pm 0,5$	10,2	< LD	-	$5,3 \pm 0,3$	5,6	$5,9 \pm 1,4$	-
Cr	$65,2 \pm 2,1$	3,1	$67,7 \pm 0,9$	1,3	$65,8 \pm 5,1$	7,7	$66,3 \pm 0,6$	-
Mn	$289 \pm 12$	4,0	$301 \pm 16$	1,2	$290 \pm 18$	3,8	$295 \pm 1$	-
Ni	$26,3 \pm 2,1$	7,9	$27,5 \pm 1,8$	6,2	$27,1 \pm 0,2$	8,1	-	-
Pb	$0,25 \pm 0,02$	6,4	< LD	-	$0,23 \pm 0,2$	8,6	-	-
Sb	$0,9 \pm 0,1$	7,6	< LD	-	$0,9 \pm 0,1$	9,3	$0,9 \pm 0,1$	-

Os limites de detecção para os elementos Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb determinados por DSS-GF AAS foram obtidos a partir do cálculo de três vezes o desvio padrão de dez medidas do branco (utilizando a plataforma de grafite vazia ou a plataforma com paládio quando este foi empregado na quantificação dos analitos), considerando a máxima massa de amostra introduzida no atomizador para cada analito estudado neste trabalho. A Tabela 11 apresenta os limites de detecção obtidos por DSS-GF AAS, ICP OES, ICP-MS e NAA.

**Tabela 11.** Comparação dos limites de detecção obtidos por diferentes técnicas para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb nas amostras de ferro aminoácido quelato.

Elemento	Limite de detecção, $\mu\text{g g}^{-1}$			
	DSS-GF AAS	ICP OES	ICP-MS	NAA
Ag	0,002	0,2	0,03	n.d.
As	0,07	12,5	0,05	0,04
Cr	0,03	0,5	0,24	0,13
Mn	0,01	0,05	0,07	0,3
Ni	0,002	0,9	0,03	n.d.
Pb	0,008	2,2	0,05	n.d.
Sb	0,08	6,5	0,01	0,04

n.d. = não determinado

---

Conforme a Tabela 11, com exceção do antimônio e do arsênio, todos os demais elementos determinados neste trabalho por DSS-GF AAS apresentaram valores de LDs menores que os obtidos pelas técnicas ICP-MS, ICP OES e NAA. Os métodos de análise que possibilitam a amostragem direta, como a DSS-GF AAS, não requerem etapas de decomposição e diluição das amostras, o que diminui o risco de contaminação dos brancos analíticos. A ausência destas etapas de preparo da amostra pode justificar os valores inferiores de LDs obtidos por DSS-GF AAS.

A técnica DSS-GF AAS mostrou-se adequada para a determinação de Ag, As, Cr, Mn, Ni, Pb e Sb em amostras de ferro aminoácido quelato. A adição de água (ou solução aquosa de Pd) sobre a amostra, antes de sua introdução no atomizador, reduziu os efeitos provocados pela matriz da amostra (formação de partículas sobre a plataforma) e possibilitou um aumento na quantidade de amostra introduzida no atomizador.

Conforme o estudo da massa de amostra introduzida no atomizador, foi verificado semelhança no valor médio da massa característica na solução aquosa e na amostra sólida, o que demonstrou a possibilidade da utilização de soluções de referência aquosa para a calibração. Entretanto, para a determinação dos elementos mais voláteis (Ag e Pb) foi necessária a utilização de paládio como modificador químico.

A determinação de analitos presentes em altas concentrações na amostra de ferro aminoácido quelato foi executada através da utilização de recursos para diminuir a sensibilidade do equipamento (utilização de vazão de argônio durante a etapa de atomização, linha espectral secundária e campo magnético no modo *3-field*).

Os analitos investigados no trabalho, com exceção da prata nas amostras FAQ1 e FAQ2, apresentaram uma boa homogeneidade nas amostras.

Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores da concentração dos analitos obtidos por DSS-GF AAS, ICP OES, ICP-MS e NAA.

A concentração de As obtida nas amostras de ferro aminoácido foi superior ao limite máximo divulgado no editorial do Pharmacopeial Forum.<sup>120</sup>

Os valores dos LDs dos elementos obtidos pela técnica DSS-GF AAS, com exceção de As e de Sb, foram menores que os LDs obtidos pelas técnicas comparativas.

Assim, a técnica DSS-GF AAS apresentou características que possibilitam seu emprego no controle de qualidade de impurezas inorgânicas em amostras de ferro aminoácido quelato.

---

<sup>120</sup> PHARMACOPEIAL FORUM, 36 (2010) 1-9.

## 6. REFERÊNCIAS

---

---

1. NAGESWARA RAO, R.; KUMAR TALLURI, M. V. N.; An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1-13.
2. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, França, 2004.
3. UNITED STATES PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007.
4. BOLZAN, R. C.; RODRIGUES, L. F.; MATTOS, J. C. P.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction, *Talanta* 74 (2007) 119–124.
5. MARGUÍ, E.; FONTÀS, C.; BUENDÍA, A.; HIDALGOB, M.; QUERALTA, I.; Determination of metal residues in active pharmaceutical ingredients according to European current legislation by using X-ray fluorescence spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1253–1257.
6. KELKÓ-LÉVAI, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYI, K.; LÁSZTITY, A.; Determination of trace elements in pharmaceutical substances by graphite furnace atomic absorption spectrometry and total reflection X-ray fluorescence after flow injection ion-exchange preconcentration, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.
7. CHUANG, I.-C.; CHEN, K.-S.; HUANG, Y.-L.; LEE, P.-N.; LIN T.-H.; Determination of Trace Elements in Some Natural Drugs by Atomic Absorption Spectrometry, *Biol. Trace Elem. Res.* 76 (2000) 235-244.

- 
8. DONG, H.M.; KRIVAN, V.; WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; Determination of trace impurities in titanium dioxide by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1747.
  9. BELARRA, M. A.; RESANO, M.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 828-839.
  10. UNICEF/WHO/ WFP; Deficiencies in populations affected by an emergency World Health Organization, (2007) 1-2.
  11. KIM, S. H.; HAN, J. H.; KEEN, C. L.; Vitamin and Mineral Supplement Use by Healthy Teenagers in Korea: Motivating Factors and Dietary Consequences, *Nutrition* 17 (2001) 373–380.
  12. <http://www.albitech.com.br/farmacias.php>, acessado em 19 de novembro de 2009.
  13. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988.
  14. GÖRÖG, S.; The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 755-757.
  15. GÖRÖG, S.; Identification and Determination of Impurities in Drugs, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2000.
  16. AHUJA, S.; Impurities Evaluation of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, USA, 1998.
  17. AHUJA, S.; ALSANTE, K.; M.; Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Academic Press-Elsevier, New York, USA, 2003.

- 
18. SZÁNTAY, Jr. C.; BÉNI, Z.; BALOGH, G.; GÁTI, T.; The changing role of NMR spectroscopy in off-line impurity identification: A conceptual view, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 806–820.
19. GÖRÖG, S.; BABJGK, M.; BALOGH, G.; BRLIK, J.; CSEHI, A.; DRAVECZ, F.; GAZDAG, M.; HORVÁTH, P.; LAUKÓ, A.; VARGA, K.; Drug impurity profiling strategies, *Talanta* 44 (1997) 1517-1526.
20. Pharmaceutical impurities: Analytical, toxicological and regulatory perspectives, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2007) 1–2.
21. GÖRÖG, S.; New safe medicines faster: the role of analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 407-415.
22. NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V.; An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 335-377.
23. LEHR, G. J.; BARRY, T. L.; PETZINGER, G.; HANNA, G. M.; ZITO, S. W.; Isolation and identification of process impurities in trimethoprim drug substance by high-performance liquid chromatography, atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 373-389.
24. WIRTH, D. D.; OLSEN, B. A.; HALLENBECK, D. K.; LAKE, M. E.; GREGG, S. M.; PERRY, F. M.; Screening methods for impurities in multi-sourced fluoxetine hydrochloride drug substances and formulations, *Chromatographia* 46 (1997) 511-523.
25. SEILER, H. G.; SINGEL, A.; SINGEL, H.; Handbook on Metals in Clinical and analytical Chemistry, Marcel Dekker INC., New York, NY, 1994.

- 
26. NEVE, J.; CHAPPUIS, P.; LAMAND, M.; Therapeutic Uses of Trace Elements, Plenum Press Inc., New York, NY, 1996.
27. FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; LAPORTA, L. V.; BARIN, J. S.; Controle de metais pesados em produtos farmacêuticos: aspectos analíticos relevantes, *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.
28. LARINI, L.; Toxicologia 3ª edição Editora Manole Ltda, São Paulo, SP, 1997.
29. HAWKES, S. J.; What Is a "Heavy Metal"?, *J. Chem.* 74 (1997) 1374.
30. NEURONEN, P. J.; Interactions with the absorption of tetracyclines, *J. Drugs* 11 (1976) 45-54.
31. CAMPBELL, N. R. C.; HASINOFF, B.; Ferrous sulfate reduces levodopa bioavailability, *Clin. Pharmacolo. Ther.* 45 (1989) 220-225.
32. OSMAN, M. A.; PATEL, R. B.; SCHUNA, A.; SUNDSTROM, W.R.; WELLING, P.G; Reduction in oral penicillamine absorption by food, antacid, and ferrous sulfate, *Clin. Pharmacolo. Ther.* 45 (1983) 465-470.
33. ZACHARIADIS, G. A.; MICHOS, C. E.; Development of a slurry introduction method for multi-element analysis of antibiotics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using various types of spray chamber and nebulizer configurations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 951–958.
34. STOICA, A.-I.; PELTEA, M.; BAIULESCUA, G.-E.; IONICAB M.; Determination of cobalt in pharmaceutical products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 653–656.

- 
35. NIEMELÄ, M.; KOLA, H.; EILOLA, K.; PERÄMÄKI, P.; Development of analytical methods for the determination of sub-ppm concentrations of palladium and iron in methotrexate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 433–439.
36. LÁSZTITYA, A.; KELKÓ-LÉVAIA, Á.; VARGA, I.; ZIH-PERÉNYIA, K.; BERTALAN, É.; Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals, *Microchem. J.* 73 (2002) 59–63.
37. BOURGOIN, B. P.; BOOMER, D.; POWELL, M. J.; WILLIE, S.; EDGAR, D.; EVANS, D.; Instrumental Comparison for the Determination of Cadmium and Lead in Calcium Supplements and Other Calcium-rich Matrices, *Analyst* 117 (1992) 19–22.
38. SCELFO, M.; FLEGAL, A. R.; Lead in calcium supplements, *Environ. Health. Persp.* 108 (2000) 309–313.
39. DOLAN, S. P.; NORTRUP, D. A.; BOLGER, P. M.; CAPAR, S. G.; Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1307–1312.
40. WU, X. H.; SUN, D. H.; ZHUANG, Z. X.; WANG, X. R.; GONG, H. F.; HONG, J. X.; LEE, F. S. C.; Analysis and Leaching Characteristics of Mercury and Arsenic in Chinese Medicinal Material, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 311–323.
41. LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T.; A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739–752.
42. BLAKE, K.; Harmonization of the USP, EP, and JP heavy metals testing procedures, *Pharm. Forum* 21 (1995) 1632-1637.

- 
43. BARIN J., S.; Desenvolvimento de procedimentos alternativos para a determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos; Tese de doutorado; Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2007.
44. COOK, J. D.; Determinants of non-heme iron absorption in man, *Food Technology* 198 (1983) 124-126.
45. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia/Edited by Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswel.
46. DEMAAYER, E. M.; Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care. World Health Organization, Geneva, 1989.
47. MOYA, A.; ARDÓN, S. J. S.; Estudio comparativo de hierro aminoquelato vs sulfato ferroso más ácido fólico en el tratamiento de anemia ferropénica en el embarazo, *Revista Médica de los Post Grados de medicina* 11 (2008) 42-48.
48. A Compilation of Vital Research Updates on Human Nutrition, Research Notes, *Albion Human Nutrition* 14 (2005) 1-4.
49. VALE, M. G. R.; OLESZCZUK, N.; SANTOS, W. N. L.; Current Status of Direct Solid Sampling for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry - A Critical Review of the Development between 1995 and 2005, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(2006) 377–400.
50. JIA, X.; WANG, T.; BU, X.; TU, Q.; SPENCER, S.; Determination of ruthenium in pharmaceutical compounds by graphite furnace atomic absorption spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2005) 43–47.

- 
51. ANG, H. H.; LEE, E.; MATSUMOTO, K.; Analysis of lead content in herbal preparations in Malaysia, *Hum. Exp. Toxicol.* 22 (2003) 445–451.
52. 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, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 687–692.
53. JIA, X.; WANG, T.; WU, J.; Determination of palladium by graphite furnace atomic absorption spectroscopy without matrix matching, *Talanta* 54 (2001) 741–751.
54. GOMEZ, M. R.; CERUTTI, S.; SOMBRA, L. L.; SILVA, M. F.; MARTÍNEZ, L. D.; Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 1060–1064.
55. ALEXIU, V.; CHIRTOP, E.; VLADESCU, L.; SIMION, M.; Determination of mercury in pharmaceuticals by graphite furnace atomic absorption spectrometry with chemical modifier, *Acta Chim. Slov.* (2004) 51 361-372.
56. FLORES, E. M. M.; SILVA, F. E. B.; SANTOS, E. P.; PAULA, F. R.; BARIN, J. S.; ZANELLA, R.; DRESSLER, V. L.; BITTENCOURT, C., F., Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb(V) as *N*-methylglucamine antimonate, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2095–2102.

- 
57. RESANO, M.; GARCIA-RUIZ, E.; CRESPO, C.; VANHAECKE, F.; BELARRA, M. A.; Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for palladium determination at trace and ultratrace levels, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1477–1484.
58. STURGEON, R. E.; Graphite furnace atomic absorption spectrometry and environmental challenges at the ultratrace level - a review, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1451-1457.
59. NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.; Análise Direta de Sólidos por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite: Uma Revisão, *Quim. Nova* 31(2008) 104 -113.
60. SLAVIN, W.; MANNING, D. C.; CARNRICK, G. R.; The stabilized temperature platform furnace, *At. Spectrosc.* 2 (1981) 137-145.
61. WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry – Third, Completely revised edition*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1999.
62. KURFÜRST, U.; *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1998.
63. KURFÜRST, U.; KEMPENEER, M.; STOEPLER, M.; SCHUIERER, O.; Theory and instrumentation – an *automated solid sample analysis system*, *Fresenius J. Anal. Chem.* 337 (1990) 248-252.
64. ZEISLER, R.; Reference materials for small-sample analysis, *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 376–379.
65. BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C.; Solid Sampling in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Commercial Atomizers - A Review, *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.

- 
66. BERGLUND, M.; BAXTER, D. C.; Methods of calibration in the direct analysis of solid samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 47 (1992) 1567-1586.
67. ROSSBACH, M.; OSTAPCZUK, P.; EMONS, H.; Microhomogeneity of candidate reference materials: Comparison of solid sampling Zeeman-AAS with INAA, *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 380–383.
68. NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; OLIVEIRA, P. V.; Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 673–680.
69. PAUWELS, J.; HOFMANN, C.; VANDECASTEELE, C.; On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 348 (1994) 418-421.
70. KURFÜRST, U.; Statistical treatment of ETA-AAS (electrothermal atomisation - atomic absorption spectrometry) solid sampling data of heterogeneous samples, *Pure & Appl. Chem.* 63 (1991) 1205-1211.
71. KURFURST, U.; PAWELS, J.; GROBECKER, K. H.; STOEPLER, M.; MUNTAU, H.; Microhomogeneity study of BCR candidate reference material CRM 422 – Cod muscle, *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 112-120.
72. TAKADA, K.; HIROKAWA, K.; Origin of double-peak signals for trace lead, bismuth, silver and zinc in a microamount of steel in atomic-absorption spectrometry with direct electrothermal atomization of a solid sample in a graphite-cup cuvette, *Talanta* 29 (1982) 849-855.

- 
73. BELARRA, M. A.; CRESPO, C.; MARTÍNEZ-GARBAYO, M. P.; CASTILLO, J. R.; Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results? *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1855-1860.
74. RESANO, M.; ARAMENDÍA, M.; GARCÍA-RUIZ, E.; CRESPO, C.; BELARRA, M., A.; Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels, *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 142–149.
75. WELZ, B.; SPERLING, M.; *Atomic Absorption Spectrometry – Second, Completely revised edition*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Alemanha, 1985.
76. GLEISNER, H.; EICHARDT, K.; WELZ, B.; Optimization of analytical performance of a graphite furnace atomic absorption spectrometer with Zeeman-effect background correction using variable magnetic field strength, *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 1663–1678.
77. EDIGER, R.; D.; Atomic absorption analysis with the graphite furnace using matrix modification, *At. Absorpt. Newsletter* 14 (1975) 127-130.
78. VOLYNSKII, A. B.; Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 905–921.
79. REGAN, J. G. T.; WARREN, J.; A Novel Approach to the Elimination of Matrix Interferences in Flameless Atomic-absorption Spectroscopy Using a Graphite Furnace, *Analyst* 101 (1976) 220-221.
80. VOLYNSKII, A. B.; *Zh. Anal. Khim.* 50 (1995) 4.

- 
81. GILCHRIST, G. F. R.; CHAKRABARTI, C. L.; BYRNE, J. P.; Effect of ascorbic acid on the appearance temperature of lead in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 533-538.
82. IMAI, S.; HAYASHI, Y.; Effect of ascorbic acid on graphite furnace atomic absorption signals for lead, *Anal. Chem.* 63 (1991) 772-775.
83. VOLYNSKII, A. B.; Use of Organic Matrix Modifiers in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 50 (1995) 2 - 29.
84. OYA, A.; OTANI, S.; Catalytic graphitization of carbons by various metals, *Carbon* 17 (1979) 131-137.
85. OBERLIN, A.; VILLEY, M.; COMBAZ, A.; Influence of elemental composition on carbonization: Pyrolysis of kerosene shale and kuckersite, *Carbon.* 18 (1980) 347-353.
86. BYRNE, J. P.; CHAKRABARTI, C. L.; GILCHRIST, G. F. R.; LAMOUREUX, M. M.; BERTELS, P.; Chemical Modification by Ascorbic Acid and Oxalic Acid in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1207-1272.
87. SHAN, X. Q.; NI, Z. M.; Matrix modification for the determination of mercury using an electrothermal graphite atomizer in atomic absorption spectrometry in Chinese, *Acta Chim. Sci.* 37 (1979) 261-266.
88. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R.; Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1257-1271.

- 
89. VOTH-BEACH, L. M.; SHRADER, D. E.; Investigations of a reduced palladium chemical modifier for graphite furnace atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 45-50.
90. TSALEV, D. L.; D'ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; DI MARKO, M.; ZAMBONI, R.; Thermal stabilized iridium on an integrated, carbide-coated platform as a permanent modifier for hydride-forming elements in electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 1. Optimization studies, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 1003-1009.
91. VOLYNSKII, A. B.; Chemical Modifiers Based on Platinum-Group Metal Compounds in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 59 (2004) 502–520.
92. ORTNER, H. M.; BULSKAB, E.; ROHRA, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUCH, S.; WELZ, B.; Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review), *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1835–1853.
93. ORTNER, H. M.; ROHR, U.; WEINBRUCH, S.; SCHLEMMER, G.; WELZ, B.; Modifiers in ETAAS-How do they work? 2nd European Furnace Symposium, Book of Abstracts, O IV/2, St. Petersburg, 1996.
94. YAN, X. P.; NI, Z. M.; Electrothermal atomization of lead from different atomizer surfaces, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1315-1323.
95. YAN-ZHONG, L.; ZHE-MING, N.; Atom release of Mn, Co, Ag and Tl in a graphite furnace atomizer with and without palladium modifier, *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 229-241.

- 
96. VOLYNSKII, A. B.; Ispol'zovanie nitrata palladiya v kachestve modifikatora v elektrotermicheskoi atomnoabsorbtsionnoi spektrometrii: Vozmozhnyi mekhanizm ego deistviya (Application of Palladium Nitrate as a Modifier in Electrothermal Atomic-Absorption Spectrometry: The Possible Mechanism of Its Action), Available from VINITI, n. 4977 Moscow, 89 (1989).
97. VOLYNSKY, A. B.; Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 103–150.
98. VOLYNSKY, A. B.; KRIVAN, V.; TIKHOMIROV, S. V.; A radiotracer study on effectiveness of platinum metals as chemical modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry: behaviour of selenium in a graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 51(1996) 1253-1261.
99. STYRIS, D. L.; PRELL, L. J.; REDFIELD, D. A.; Mechanisms of palladium-induced stabilization of arsenic in electrothermal atomization atomic absorption spectroscopy, *Anal. Chem.* 63 (1991) 503-507.
100. STYRIS, D. L.; PRELL, L. J.; REDFIELD, D. A.; HOLCOMBE, J. A.; BASS, D. A.; MAJIDI, V.; Mechanisms of selenium vaporization with palladium modifiers using electrothermal atomization and mass spectrometric detection, *Anal. Chem.* 63 (1991) 508-517.
101. FISCHER, J. L.; RADEMEYER, C. J.; Kinetics of selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS). Part 3: Chemical interference of sulphate using palladium modifiers, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 975-983.
102. MROCZEK, A.; WERNER, G.; WENNRICH, R.; SCHROEN, W.; Investigation of sulfur release in ETV-ICP-AES and its application for the determination of sulfates, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 361 (1998) 34-42.

- 
103. TITTARELLI, P.; BIFFI, C.; Vapour-phase behaviour of slurries in electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 409-415.
104. RADEMEYER, C. J.; RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y.; TITTARELLI, P.; Reduction of background absorption in the measurement of cadmium, lead and selenium in whole blood using iridium-sputtered graphite tubes in electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 81-84.
105. SAEED, K.; THOMASSEN, Y.; Spectral interferences from phosphate matrices in the determination of arsenic, antimony, selenium and tellurium by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 130 (1981) 281–287.
106. SHIUE, M. Y.; CHAN, Y. C.; MIERZWA, J.; YANG, M. H.; Determination of tellurium in indium antimonide by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 69–74.
107. RADZIUK, B.; THOMASSEN, Y.; Chemical modification and spectral interferences in selenium determination using Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 397–403.
108. LI, M.; NI, Z.-M.; RAO, Z.; Determination of selenium in biological tissue samples rich in phosphorus using electrothermal atomization with Zeeman-effect background correction and  $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}$  + citric acid as a mixed chemical modifier, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1381-1389.
109. MARQUÉS, M. J.; SALVADOR, A.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA, M.; Electrothermal Atomic Absorption Determination of Chromium in Sediments, *Microchem. J.* 62 (1999) 363–370.

- 
110. MIERZWA, J.; SUN, Y.-C.; YANG, M.-H.; Determination of chromium, manganese and vanadium in sediments and soils by modifier free slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 63-69.
111. LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; ARRUDA, M. A. Z.; Direct determination of lead in sweet fruit-flavored powder drinks by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 601-611.
112. BOBROWSKA-GRZESIK, E.; JAKÓBIK-KOLON, A.; Leaching of cadmium and lead from dried fruits and fruit teas to infusions and decoctions, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 326–331.
113. ACAR, O.; KILIC, Z.; TÜRKER, A. R.; Determination of lead in cookies by electrothermal atomic absorption spectrometry with various chemical modifiers, *Food Chem.* 71 (2000) 117-122.
114. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A.; Usefulness of the chemical modification and the multi-injection technique approaches in the electrothermal atomic absorption spectrometric determination of silver, arsenic, cadmium, chromium, mercury, nickel and lead in sea-water, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 777–786.
115. XIAO-QUAN, S.; BEI, W.; Is Palladium or Palladium-Magnesium Nitrate a More Universal Chemical Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry?, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 791–798.

- 
116. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; BERMEJO-BARRERA, A.; Effectiveness of palladium as a chemical modifier for direct silver and manganese determination in cocaine and heroin by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 43 (1996) 1783–1792.
117. Orientação Sobre Validação de Métodos De Ensaio Químicos, INMETRO, DOQ-CGCRE-008 (2007).
118. KRIVAN, V.; DONG, H. M.; Direct Analysis of Pieces of Materials by Solid Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Demonstrated Using High-Purity Titanium, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5312-5321.
119. HORNING, M.; KRIVAN, V.; Solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry for analysis of high-purity tungsten trioxide and high-purity tungsten blue oxide, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 1177–1191.
120. PHARMACOPEIAL FORUM, 36 (2010) 1-9.