

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

Ananda Fagundes Guarda

**DETERMINAÇÃO DE Cl, I e Hg DE FORMA DIRETA EM AMOSTRAS  
DIVERSAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA E  
MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA EM  
FORNO DE GRAFITE**

Santa Maria, RS  
2017

Ananda Fagundes Guarda

**DETERMINAÇÃO DE Cl, I e Hg DE FORMA DIRETA EM AMOSTRAS  
DIVERSAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA E  
MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA EM  
FORNO DE GRAFITE**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

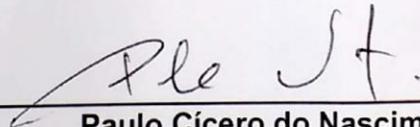
Santa Maria, RS, Brasil  
2017

Ananda Fagundes Guarda

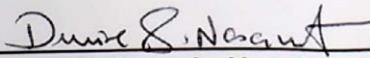
**DETERMINAÇÃO DE Cl, I e Hg DE FORMA DIRETA EM AMOSTRAS  
DIVERSAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA E  
MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA EM  
FORNO DE GRAFITE**

Tese de Doutorado apresentado no  
Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de **Doutor  
em Química**

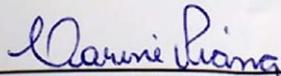
**Aprovado em 11 de janeiro de 2017:**



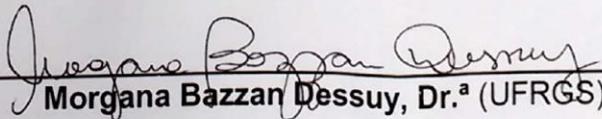
**Paulo Cícero do Nascimento, Dr.**  
(Presidente/Orientador)



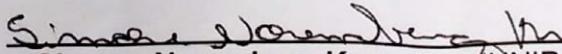
**Denise Bohrer do Nascimento, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**



**Carine Viana Silva, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**



**Morgana Bazzan Dessuy, Dr.<sup>a</sup> (UFRGS)**



**Simone NoreMBERG Kunz, Dr.<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2017

Dedico

**Aos meus pais,**

Gilson Antônio Guarda e Marlene Fagundes

Guarda: Em mil vidas, mil vezes eu os  
escolheria.

## AGRADECIMENTOS

Na hora de escrever os agradecimentos, estive pensando em tantas pessoas que passaram ou ainda estão na minha vida, e que talvez eu não tenha dito o quão importante elas são para que eu tenha chegado até aqui. E eu não estou falando em ajuda nos preparos de soluções, cálculos estequiométricos ou limpeza de vidraria. Estou falando das pessoas que estão ali quando você não sabe mais o que fazer. Quando você já tentou resolver os seus problemas analíticos, de todas as maneiras possíveis, mas o equipamento parece que naquele dia (ou semanas) simplesmente não quer trabalhar e te dar os resultados que você tanto deseja. Você se sente incapaz. Estuda, lê artigos. Volta e tenta. E nada. Aquela lágrima já está pra sair e alguém chega dizendo “Vamos lanchar?”. Você suspira e diz “Graças a Deus, já era hora”. Vai para a cozinha, e por 15 min (ok, 30 min) em meio a risadas, você esquece as interferências da amostra, o sinal que não quer aparecer, o artigo que não está pronto, seu currículo que não melhora, os concursos que você não passa. Então meus amores, Alex, Bruna e Thaís, obrigada não só por isso, mas por todo o ombro que precisei. Principalmente por sempre acreditarem em mim. Vocês nunca tiveram dúvidas de que eu conseguiria. E como sempre, tinham razão. Meu sincero obrigada.

Também a amiga Dai, obrigada por sempre falar o que eu preciso (e nem sempre o que quero) ouvir e por sempre se lembrar de mim. Não importa o tempo e a distância, nossa amizade e minha admiração são sempre as mesmas. Quero-te sempre na minha vida! Obrigada por tudo negrinha!

Thieli, Aline e Jaque, amigas de sempre e para sempre, obrigada pela compreensão e ajuda em momentos difíceis, além de me proporcionarem as minhas memórias mais doces.

Aos demais colegas do Lachem, vocês também são importantes e levo o melhor de vocês sempre comigo. Obrigada por todos os ensinamentos!

Ao coordenador da pós-graduação, Prof. Fábio Andrei e ao secretário Ademir Sartori, obrigada pela ajuda no processo da bolsa do doutorado sanduíche e pela competência em todos os serviços prestados durante a minha passagem pela pós-graduação.

Então, depois de pensar em todas as pessoas que te ajudam e acreditam que você é capaz de superar os obstáculos, você suspira, volta e tenta de novo. Afinal, não fui criada para desistir tão fácil. Quando chego em casa, com a cabeça e as costas doendo, sou sempre recebida com as minhas lambidas preferidas e aqueles tocos de rabo abanando. Kelvin e Belinha, sua mãe queria que vocês fossem eternos. A casa está tomada pelo cheiro maravilhoso do almoço do dia seguinte sendo preparado. Você não aguenta mais essa vida acadêmica, quer chegar e se jogar na cama, mas tira tempo para o mate, para saber como foi o dia dela na empresa. Isso salva a sua mente de entrar em pane e tira o foco do seu umbigo. Obrigada por tudo Gi. Não teria conseguido sem você. Mesmo!

Tira tempo também para saber se está tudo bem com seu amado pai que trabalha demais, como sua irmã foi no ballet e no colégio, se sua mãe está bem, pois ela deveria se cuidar mais para durar para sempre, com a pressão da minha vó, com a sua outra irmã também (mas isso é segredo). Isso aquece o coração. Saber que eles estão bem e ver que realmente se interessam sobre sua vida, um interesse sincero e do bem, salva o dia.

Todas essas pessoas estão sempre ali, dizendo “você vai conseguir, não desiste” e isso te dá forças para seguir. Porém, eu nunca fui aquela aluna que entende por osmose os conteúdos. Sempre tive que estudar (e muito) para tudo. Mas cara\*\*\*, chega uma hora que você não sabe mais o que fazer. Então, me dirijo a sala 22, para pedir uma luz. Vem o Prof. Paulo, com toda aquela paciência e educação, raciocinar de uma maneira invejável sobre o problema. Saiba professor, que sou muito grata pela oportunidade de ser sua aluna e por sempre expor sua opinião de uma forma educada, pois nunca precisou me desmerecer para se elevar, e é isso o que lhe faz tão grande aos meus olhos. Além disso, me ajudou e incentivou na ideia do doutorado sanduíche e a minha melhor experiência de vida não seria possível sem a sua ajuda. Foi com a luz já apagada, mas não há o que não haja, não é mesmo? Fica aqui registrada a minha admiração e gratidão! Obrigada também a Prof. Denise, que com sua paciência e doçura esteve sempre disponível para me ajudar.

Ao chegar na Espanha, fui recebida pelo Prof. Dr. Martin Resano, Prof.<sup>a</sup> Dr. Maria Tereza Aramendia e Prof.<sup>a</sup> Dr. Esperanza García da forma mais gentil possível. Saibam que me sinto muito abençoada por ter aprendido tanto com

peessoas tão legais como vocês. Apesar de ser pouco tempo, vocês agregaram tanta bagagem a minha vida acadêmica, que não há palavras em português ou espanhol que agradeçam o suficiente a oportunidade. Obrigada também ao Diego e Natália, pela parceria, risadas, viagens... A estadia em Zaragoza foi melhor com vocês!

Eu realmente acredito que ninguém entra ou sai da nossa vida por acaso. E nessa caminhada enfrentei dias nebulosos. Mas ou vocês eram o meu sol ou dançavam comigo na chuva. É preciso a chuva para florir, não é? Cada um de nós trilha uma história, e estou orgulhosa da minha. Obrigada por fazerem parte dela.

Obrigada **CAPES**, pela bolsa de doutoramento e de doutorado sanduíche.

**À Deus pela vida..**

*“Ananda, vai e não me decepçiona”.*

*Guarda, Gilson Antônio*

*- Nunca.*

## RESUMO

# DETERMINAÇÃO DE Cl, I e Hg DE FORMA DIRETA EM AMOSTRAS DIVERSAS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA E MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA EM FORNO DE GRAFITE

AUTORA: ANANDA FAGUNDES GUARDA  
ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

Foram desenvolvidos três métodos analíticos para a determinação de cloro, iodo e mercúrio em amostras sólidas e líquidas, de forma direta por espectrometria de absorção atômica e molecular de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite. O primeiro método objetivou a determinação de cloro em amostras sólidas e em suspensão de diferentes naturezas e teores de cloro (CRM 81002b cabelo humano, SRM 1568b farinha de arroz, ERM EC681 polietileno, CRM BCR 460 carvão, SRM 2692c carvão betuminoso, SRM 1575 folha de pinheiro, CRM 686-1 óxido de ferro, SEM 1549 leite em pó), através da formação molecular de CaCl. Os resultados foram comparados com os já existentes para a molécula de SrCl e mostraram-se superiores, especialmente em amostras com alto teor de cálcio. O limite de detecção e quantificação obtidos para as duas linhas de absorção molecular de CaCl foram de 2,6 e 8,7 ng (620,862 nm) e 14,2 e 61,6 ng (377,501 nm), respectivamente. Já a determinação de iodo realizou-se através da formação da molécula de Srl, em duas amostras de medicamentos contendo iodo. A exatidão do método foi comprovada através de análise comparativa por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente. Os resultados obtidos se mostraram superiores em comparação com molécula já existente Bal que não proporciona a determinação direta em sólidos. O limite de detecção e quantificação obtidos foram de 0,035 e 0,117 µg, respectivamente. Por fim, foi desenvolvido um método analítico para a determinação de mercúrio em amostras de sangue (SERONORM® LEVEL III e II) e urina (SERONORM®, Clincheck Control nível I e II lote 432 e nível II lote 923) certificadas, de forma direta, utilizando nanopartículas de ouro. O método foi comparado ao método já existente que utiliza permanganato de potássio como agente oxidante. O limite de detecção e quantificação obtidos foram de 0,057 e 0,190 ng, respectivamente.

Palavras-chave: CaCl. Cloro. Srl. Iodo. Mercúrio. Amostra sólida. Amostragem direta. HR-CS GF AAS. HR-CS GF MAS.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF Cl, I, AND Hg DIRECTLY IN DIFFERENT SAMPLES BY HIGH-RESOLUTION CONTINUUM SOURCE ATOMIC AND MOLECULAR ABSORPTION SPECTROMETRY IN GRAPHITE FURNACE

AUTHOR: ANANDA FAGUNDES GUARDA  
ADVISOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

Three analytical methods were developed for the determination of chlorine, iodine and mercury in solid and liquid samples, directly by high resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry in graphite furnace. The first method objected the determination of chlorine in solid and slurry samples of different natures and chlorine contents (CRM 81002b human hair, SRM 1568b rice flour, ERM EC681 polyethylene, CRM BCR 460 coal, SRM 2692c bituminous coal, SRM 1575 sheet Of pine, CRM 686-1 iron oxide, SRM 1549 powdered milk) through the molecular formation of CaCl. The results were compared with those already available for the SrCl molecule and were superior, especially in samples with a high calcium content. The limit of detection and quantification obtained for the two molecular absorption lines of CaCl were 2.6 and 8.7 ng (620.862 nm) and 14.2 and 61.6 ng (377.501 nm), respectively. The iodine determination was performed through the formation of the Srl molecule in two samples of medicines containing iodine. The accuracy of the method was proved by comparative analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. The results obtained were higher compared to the existing Bal molecule that does not provide direct determination in solids. The limit of detection and quantification obtained were 0.035 and 0.117  $\mu\text{g}$ , respectively. Finally, an analytical method for the determination of mercury in blood samples (SERONORM® LEVEL III and II) and urine (SERONORM®, Clincheck Control level I and II batch 432 and level II batch 923) were developed, directly, using gold nanoparticles. The method was compared to the existing method that uses potassium permanganate as oxidizing agent. The limit of detection and quantification obtained were 0.057 and 0.190 ng, respectively.

Keywords: CaCl. Chlorine. Srl. Iodine. Mercury. Solid sample. Direct sampling. HR-CS GF AAS. HR-CS GF MAS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Espectros de absorção molecular para as 4 regiões espectrais mais intensas da molécula de CaCl. Todos os espectros foram obtidos pela vaporização de 100 ng de Cl (na forma de NaCl) + 20 de  $\mu\text{g}$  Pd (na forma de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  em 15% de ácido nítrico) e 400  $\mu\text{g}$  Ca (na forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela 2. ....61
- Figura 2 – Otimização da quantidade de cálcio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 40 ng de Cl (como NaCl), com a adição de 20  $\mu\text{g}$  paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 620,862 nm de CaCl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas. ....65
- Figura 3 – Otimização da quantidade de paládio adicionada a 40 ng de Cl (como NaCl), com a adição de 400  $\mu\text{g}$  de Ca como reagente formador da molécula, monitorando a linha de absorção molecular de 620,862 nm de CaCl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas. ....67
- Figura 4 – Curvas de pirólise e vaporização obtidas através da análise de 40 ng de Cl com 400  $\mu\text{g}$  de Ca, com a adição de 20  $\mu\text{g}$  de Pd (■) ou sem a adição de modificador químico (□), monitorando a linha de absorção molecular para CaCl, 620,862 nm. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas. ....68
- Figura 5 – Espectro de absorção molecular resolvidos no tempo para a molécula de CaCl provenientes da vaporização de 0,513 mg da amostra de polietileno (ERM EC 681), juntamente com 20  $\mu\text{g}$  de Pd e 400  $\mu\text{g}$  de Ca, utilizando o programa de temperatura da Tabela 2. O valor da absorvância integrada para o pico central (620,862 nm) é de 0,5829. 70

- Figura 6 – Espectro de absorção molecular resolvido no tempo para a molécula de CaCl provenientes da vaporização de 200 ng de padrão aquoso de Cl, juntamente com 20 µg de Pd e 400 µg de Ca, utilizando o programa de temperatura da Tabela 2. .... 71
- Figura 7 – Dois espectros de absorção molecular, onde A) é resolvido no tempo e B) não é resolvido no tempo, ambos para a região espectral mais intensa da molécula de Srl, correspondendo a banda de vibração  $\Delta v=0$  e seguinte transição eletrônica:  $X^2\Sigma \rightarrow B^2\Pi$  ( $\lambda_{\text{máximo}}$ : 677,700 nm), utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela 8..... 96
- Figura 8 – Otimização da quantidade de estrôncio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5 µg de iodo (na forma de KI), com a adição de 10 µg paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 677,700 nm de Srl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas..... 100
- Figura 9 – Otimização da quantidade de bário adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5 µg de I (como KI), monitorando a linha de absorção molecular de 538,308 nm de Bal. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas. .... 101
- Figura 10 – Otimização da quantidade de paládio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5 µg de iodo (como KI), com a adição de 400 µg de Sr e quantidades crescentes de paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 677,700 nm de Srl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas. .... 102
- Figura 11 – Curvas de pirólise e vaporização obtidas através da análise de 1 µg de I e 400 µg de Sr (quadro A) e 400 µg de Ba (quadro B), com a adição de 10 µg de Pd (■) ou sem a adição de modificador químico (□), monitorando a linha de absorção molecular para Srl, 677,700 nm e 538,308 nm para Bal. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas. .... 105

- Figura 12 – Espectros de absorção molecular resolvidos no tempo para a molécula de Srl provenientes da vaporização de 1,606 mg do medicamento Yodocefol® (quadro A) e 2,973 mg do medicamento Levotiroxina Sanofi® (quadro B), juntamente com 10 µg de Pd e 400 µg de Sr. O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 8. .... 108
- Figura 13 – Otimização do tamanho de nanopartículas de ouro adicionadas a 1 ng de Hg ao forno de grafite, monitorando a linha de absorção atômica de 253,652 nm. Condições de temperatura da Tabela 15. .... 133
- Figura 14 – Avaliação do sinal de absorvância de 1 ng de Hg frente a 500 ng de nanopartículas de ouro comerciais de tamanho de 10 nm ( ... ) e 1,16 µg de sintetizadas em laboratório ( --- ). Condições de temperatura da Tabela 15. .... 135
- Figura 15 – Perfis de sinal de absorvância em função do tempo para 1 ng de Hg utilizando 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm) e 300 µg de permanganato de potássio. Programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 15. .... 136
- Figura 16 – Curva de atomização obtida através da análise de 5 ng de Hg com 500 ng de nanopartículas de ouro (Δ), 10 µg de ácido cloroáurico (▼), 300 µg de permanganato de potássio (□), 10 µg de paládio (▲) e sem modificador (■). A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas. .... 137
- Figura 17 – Curvas de pirólise obtidas através da análise de 5 ng de Hg com 500 ng de nanopartículas de ouro (Δ), 10 µg de ácido cloroáurico (▼), 300 µg de permanganato de potássio (□), 10 µg de paládio (▲) e sem modificador (■). A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas. .... 139

- Figura 18 – Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo para o sinal analítico do padrão aquoso contendo 1 ng de mercúrio, juntamente com (A) 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm) e (B) 300 µg de permanganato de potássio, utilizando o programa de temperatura da Tabela 15..... 140
- Figura 19 – Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo para mercúrio nas amostras de A) urina (ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848) e B) sangue (Seronom® Elements Whole Blood – Level III). O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 15. .... 142

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Detalhes da composição dos materiais de referência certificados utilizados neste trabalho para a determinação de cloro, utilizando CaCl e SrCl em HR-CS GF MAS. ....56
- Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para a determinação de cloro utilizando HR-CS GF MAS em amostras sólidas certificadas.....57
- Tabela 3 – Parâmetros instrumentais para a determinação de cloro utilizando HR-CS GF MAS em amostras sólidas certificadas.....58
- Tabela 4 – Características das linhas rotacionais da molécula de CaCl, sob condições apresentadas na Tabela 2. As faixas de comprimento de onda (A, B, C e D) e os números dos picos entre parênteses são baseados na Figura 1.....63
- Tabela 5 – Resultados da determinação de Cl em oito materiais de referência certificados utilizando análise direta de sólidos por HR-CS GF MAS (n=5) via CaCl, utilizando 20 µg de Pd, 400 µg de Ca e as condições de temperatura da Tabela 2. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de cinco replicatas. ....72
- Tabela 6 – Informações sobre a constituição e determinação de cloro em materiais de referência certificados, através da análise direta de sólidos usando HR-CS GF MAS (n=5) através da formação molecular de CaCl e SrCl utilizando as condições da Tabela 2. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de cinco replicatas.....73
- Tabela 7 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de cloro por HR-CS GF MAS via absorção molecular de CaCl. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ).....77

Tabela 8 – Detalhes da composição dos medicamentos utilizados neste trabalho para a determinação de iodo, utilizando Srl e Bal em HR-CS GF MAS. . . . .	91
Tabela 9 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de iodo através das moléculas Srl e Bal, utilizando HR-CS GF MAS para amostras sólidas de medicamento. . . . .	92
Tabela 10 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de iodo por ICP-MS para amostras de medicamento, após diluição e decantação. . . . .	95
Tabela 11 – Massa característica, faixa linear e limite de detecção para linhas rotacionais da molécula de Srl, obtidos sob condições apresentadas na Tabela 8. As faixas de comprimento de onda e os números dos picos entre parênteses são baseados na Figura 7. . . . .	98
Tabela 12 – Resultados da determinação em dois medicamentos utilizando análise direta de sólidos por HR-CS GF MAS via Srl expressos através da mediana de 10 replicatas, utilizando 10 µg de Pd, 400 µg de Sr e as condições de temperatura da Tabela 8. As incertezas expressas são referentes ao desvio padrão. . . . .	108
Tabela 13 – Informações sobre a constituição e determinação de iodo em Yodocefol® e Levotiroxina Sanofi®, através da análise direta de sólidos usando HR-CS GF MAS expressos através da mediana de 10 replicatas, pela da formação molecular de Srl e Bal, utilizando as condições da Tabela 8. As incertezas expressas são referentes ao desvio padrão. . . . .	110
Tabela 14 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de iodo por HR-CS GF MAS via absorção molecular de Srl. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ). . . . .	111

Tabela 15 - Detalhes da composição das amostras certificados de urina e sangue utilizados neste trabalho para a determinação de mercúrio por HR-CS GF AAS.....	129
Tabela 16 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de mercúrio utilizando HR-CS GF AAS e nanopartículas de ouro ou permanganato de potássio como estabilizantes para análise de amostras de urina e sangue de forma direta. ....	130
Tabela 17 – Resultados da determinação de mercúrio em amostras certificadas de urina e sangue utilizando análise direta por HR-CS GF AAS (n=5) utilizando 500 ng de nanopartículas de ouro e as condições de temperatura da Tabela 15. As incertezas expressas são referentes aos valores de desvio padrão das replicatas. ....	143
Tabela 18 – Informações sobre a constituição e determinação de mercúrio em amostras de urina e sangue certificados, através da análise direta usando HR-CS GF AAS utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio, com as condições da Tabela 15. Incertezas foram expressas como o desvio padrão das replicatas.....	144
Tabela 19 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de mercúrio por HR-CS GF AAS utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada (CP ± 1). ....	146

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACGIH	<i>Advancing Occupational and Environmental Health</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
CCD	<i>Charge-Coupled device</i>
CEC	<i>Commission of the European Communities</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	<i>Center pixel</i>
CVG	<i>Cold Vapor Generation</i>
DEMON	<i>Double-Echelle Monochromator</i>
DP	Desvio Padrão
$E_{el}$	Energia de transição eletrônica
$E_{rot}$	Energia de rotação
$E_{vib}$	Energia de vibração
GF AAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-CS AAS	<i>High Resolution – Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>
HR-CS FAAS	<i>High Resolution – Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
HR-CS GF AAS	<i>High Resolution – Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HR-CS GF MAS	<i>High Resolution – Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry</i>
HR-CS MAS	<i>High Resolution – Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC	Inclinação da Curva
ICCIDD	<i>International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders</i>

ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LS AAS	<i>Line Source Atomic Absorption Spectrometry</i>
LS FAAS	<i>Line Source Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
LSBC	<i>Least-Squares Background Correction</i>
MCL	<i>Maximum Contaminant Level</i>
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MS/CGVAM	Coordenação Geral de Vigilância Ambiental do Ministério da Saúde
NAS	<i>National Academy of Science</i>
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PE	<i>European Pharmacopeia</i>
PVC	Policloreto de vinila
S/N	<i>Signal/Noise</i>
SIMAAC	<i>Simultaneous Multielement Atomic Absorption Continuum</i>
SP-ICP-MS	<i>Single Particle - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	24
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>26</b>
2.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS) .....	26
<b>2.1.1 Histórico</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.2 Instrumentação e funcionamento</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.3 Correção de fundo e espectral</b> .....	<b>31</b>
2.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS MAS) .....	33
<b>2.2.1 Espectro molecular</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.2 Correção de fundo e espectral</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.3 Análise multielementar</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2.4 Características e Vantagens</b> .....	<b>41</b>
<b>3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE CLORO UTILIZANDO AMOSTRAGEM SÓLIDA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE</b> .....	<b>43</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
<b>3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>45</b>
3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	46
<b>3.2.1 Cloro</b> .....	<b>46</b>
3.2.1.1 Histórico e Características .....	46
3.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação .....	47
3.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento.....	48

3.2.1.4 Legislação .....	48
3.2.1.5 Determinação de cloro .....	51
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	54
<b>3.3.1 Equipamento.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3.2 Reagentes e soluções.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3.3 Amostras.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3.4 Procedimento para a análise de cloro por HR-CS GF MAS .....</b>	<b>57</b>
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	60
<b>3.4.1 Otimização das condições experimentais .....</b>	<b>60</b>
3.4.1.1 Investigação das linhas de absorção de CaCl.....	60
3.4.1.2 Cálcio e modificadores químicos.....	64
3.4.1.3 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização.....	67
<b>3.4.2 Análise direta em amostras sólidas usando CaCl.....</b>	<b>69</b>
<b>3.4.3 Comparação das moléculas CaCl e SrCl.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4.4 Parâmetros de mérito.....</b>	<b>74</b>
3.5 CONCLUSÕES .....	78
<b>4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE IODO UTILIZANDO AMOSTRAGEM SÓLIDA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE.....</b>	<b>80</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	80
<b>4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>82</b>
4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	83
<b>4.2.1 Iodo.....</b>	<b>83</b>
4.2.1.1 Histórico e Características.....	83
4.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação.....	84

4.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento.....	85
4.2.1.4 Legislação.....	87
4.2.1.5 Determinação de iodo.....	88
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	90
<b>4.3.1 Equipamento .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3.2 Reagentes e soluções .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3.3 Amostras .....</b>	<b>91</b>
<b>4.3.4 Procedimento para a medida de iodo por HR-CS GF MAS .....</b>	<b>91</b>
<b>4.3.5 Procedimento para a medida de iodo por ICP-MS .....</b>	<b>94</b>
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	96
<b>4.4.1 Otimização das condições experimentais.....</b>	<b>96</b>
4.4.1.1 Investigação das linhas de absorção de Srl .....	96
4.4.1.2 Estrôncio e modificadores químicos .....	99
4.4.1.3 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização.....	104
<b>4.4.2 Análise direta em amostras sólidas usando Srl.....</b>	<b>107</b>
<b>4.4.3 Comparação das moléculas Srl e Bal .....</b>	<b>109</b>
<b>4.4.4 Parâmetros de mérito .....</b>	<b>111</b>
4.5 CONCLUSÕES.....	112
<b>5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO UTILIZANDO AMOSTRAGEM DIRETA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE .....</b>	<b>113</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	113
<b>5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>115</b>
5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	116
<b>5.2.1 Mercúrio.....</b>	<b>116</b>

5.2.1.1 Histórico e características .....	116
5.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação.....	117
5.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento .....	120
5.2.1.4 Legislação .....	123
5.2.1.5 Determinação de mercúrio .....	126
5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	128
<b>5.3.1 Equipamento.....</b>	<b>128</b>
<b>5.3.2 Reagentes e soluções.....</b>	<b>128</b>
<b>5.3.3 Amostras.....</b>	<b>129</b>
<b>5.3.4 Procedimento para a medida de mercúrio por HR-CS GF MAS .....</b>	<b>129</b>
<b>5.3.5 Procedimento para a síntese de nanopartículas de ouro .....</b>	<b>131</b>
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	132
<b>5.4.1 Otimização das condições experimentais .....</b>	<b>132</b>
5.4.1.1 Ouro e permanganato de potássio .....	132
5.4.1.2 Otimização da temperatura de pirólise e atomização.....	136
<b>5.4.2 Análise direta em amostras de urina e sangue usando nanopartículas de ouro .....</b>	<b>141</b>
<b>5.4.3 Comparação dos modificadores químicos nanopartículas de ouro e permanganato de potássio.....</b>	<b>144</b>
<b>5.4.4 Parâmetros de mérito.....</b>	<b>145</b>
5.5 CONCLUSÕES .....	147
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>149</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>158</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em razão da necessidade e dificuldade do monitoramento de elementos voláteis como o cloro, iodo e mercúrio em amostras de alta complexidade, este trabalho propõe o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação desses elementos através da análise direta em amostras sólidas e líquidas. A técnica utilizada foi a espectrometria de absorção molecular e atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF MAS, do inglês, *High Resolution-Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectroscopy* e HR-CS GF AAS, *High Resolution-Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*).

Para melhor compreensão, após uma breve revisão sobre a técnica utilizada, é apresentado 3 capítulos que correspondem ao desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de cloro, iodo e mercúrio, respectivamente. A exatidão de todos os métodos foi avaliada em amostras certificadas, através da análise direta de amostras na forma sólida e líquida e na ausência das mesmas, a avaliação deste parâmetro foi realizada por comparação utilizando método de referência.

Os elementos não metálicos, como o iodo e cloro, foram analisados sob a forma diatômica inédita, CaCl e Srl, sendo comparados os resultados obtidos com os de outras moléculas previamente descritas na literatura. Já o mercúrio, ao utilizar nanopartículas de ouro como estabilizador foi possível ser melhorados seus limites de detecção e a aplicabilidade do método em amostras de forma direta, quando comparado aos resultados já existentes na literatura.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese foi desenvolver métodos analíticos para a determinação de cloro, iodo e mercúrio empregando a análise direta, em amostras de alta complexidade. Além disso, os métodos foram aplicados em amostras

certificadas, e na ausência delas, utilizou-se um método de referência para a confirmação dos resultados.

A otimização dos métodos analíticos envolveu a adequada escolha do comprimento de onda de trabalho, escolha de modificadores químicos e suas massas. Além disso, para os elementos cloro e iodo que foram analisados na forma molecular, a otimização da massa do reagente formador da molécula também foi realizada.

Após a otimização dos três métodos, os mesmos foram aplicados em amostras biológicas, industriais, farmacêuticas e ambientais, com diferentes concentrações dos analitos.

Os resultados obtidos foram comparados com os previamente relatados na literatura. Dessa maneira, também se propõem alternativas e melhorias nos métodos já existentes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS AAS)

#### 2.1.1 Histórico

Bunsen e Kirchoff são os responsáveis pelo desenvolvimento do primeiro espectrômetro relatado na literatura, datado na segunda metade do século XIX. Eles utilizavam uma fonte contínua de radiação, a única acessível na época (KIRCHOFF; BUNSEN, 1861). Como não estava disponível uma tecnologia suficientemente adequada para diferenciar os pequenos espectros subtraídos de um espectro de uma fonte luminosa, a espectrometria de absorção atômica perde o interesse e espaço no meio científico para a emissão ótica, sendo esta a técnica que predominou até a primeira metade do século XX.

Alan Walsh em 1952, após muitos anos de pesquisa, não consegue entender o negligenciamento do espectro de absorção atômica e calcula então, um requisito básico para consegui-lo: a resolução do espectrômetro teria que ser de no mínimo 2 picômetros (pm) se uma fonte contínua de emissão fosse utilizada, o que era totalmente incompatível com a resolução oferecida pelo melhor espectrômetro disponível. Uma vez que este requisito era inalcançável para a época, a maneira encontrada de realizar medidas quantitativas de absorção atômica seria então trocar a fonte luminosa contínua por uma que, ao invés de apresentar um amplo espectro, apresentasse um espectro mais estreito possível, isto é, uma fonte de linha para que fosse desnecessária a presença de um monocromador de alta resolução. Dessa forma, a função do monocromador seria somente separar a linha de medida de outras linhas emitidas pela fonte (WALSH, 1974).

O primeiro relato de construção de uma lâmpada de fonte de linha (LS, do inglês *Line Source*) foi realizado por Louis Karl Heinrich Friedrich Paschen (PASCHEN, 1916). Porém, com o interesse do grupo de pesquisa de Alan Walsh pelo desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica, os mesmos

desenvolveram um modelo de lâmpada de cátodo oco mais parecido com o que temos atualmente. Sem a insistência em descobrir uma emissão de luz adequada para a técnica, a espectrometria de absorção atômica provavelmente não seria uma técnica com tamanha aceitação no meio científico como possui atualmente (WALSH; JONES, 1960).

Apesar da consolidação da técnica de espectrometria de absorção atômica com fonte de linhas, realizada com base no desenvolvimento da pesquisa de Walsh, a mesma ainda possuía algumas limitações, como por exemplo: (i) incapacidade de análise multielementar, já que é necessário ter uma lâmpada para cada elemento, (ii) pouca informação sobre o ambiente espectral, uma vez que os intervalos espectrais emitidos pela fonte de linha são estreitos, (iii) lâmpadas com baixa energia para uma gama de elementos como os não metais e terras raras e (iv) correção de fundo por efeito Zeeman, que apesar de ser um avanço importante, não é adequada em alguns casos (WELZ et al., 2005).

Por isso, a pesquisa sobre a utilização da fonte contínua como fonte luminosa se manteve paralela ao sucesso e plena consolidação da fonte de linha. O primeiro relato na literatura que utiliza uma fonte contínua em uma medida utilizando espectrometria de absorção atômica foi realizada em 1974 por Keliher e Wohlers, que utilizaram um monocromador de alta resolução de grade de *echelle*. Na época a limitação encontrava-se na fonte de linha de emissão, onde a mesma possuía baixa potência (150 W) e, portanto, baixa energia em comprimentos de onda abaixo de 320 nm, onde muitos analitos possuem suas linhas mais sensíveis (KELIHER; WOHLERS, 1974).

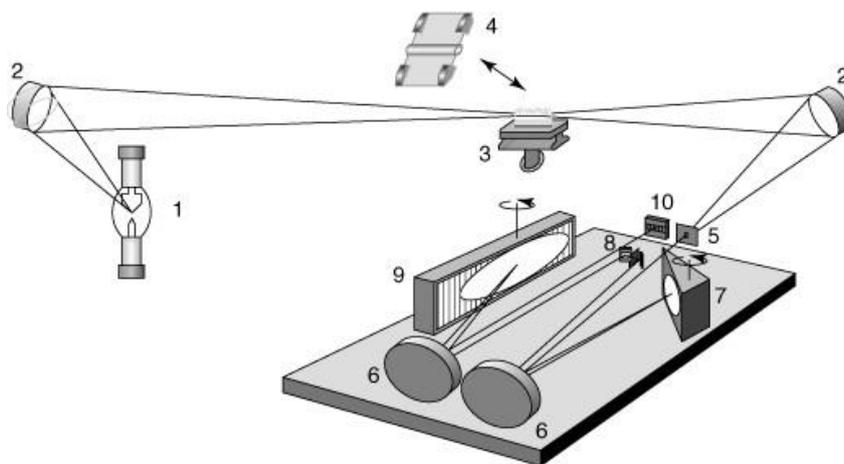
Por mais 25 anos, pesquisadores continuaram o desenvolvimento de uma adequada fonte contínua, destacando nesse período o grupo de pesquisa de O'Haver e Harnly. Porém o maior avanço em HR-CS AAS (do inglês, *High Resolution – Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*) foi realizado por Beacker-Ross, em Berlin, na Alemanha em 1996. Eles, diferentemente dos pesquisadores supracitados, não partiram de equipamentos disponíveis e tentaram modifica-los, e sim, determinaram os constituintes ideais para um HR-CS AAS e começaram a fabricá-los, começando pela fonte contínua adequada, depois o

espectrômetro e por fim o detector. Nessa época eles desenvolveram o equipamento mais semelhante ao que se encontra no mercado atualmente (WELZ et al., 2005).

### 2.1.2 Instrumentação e funcionamento

O instrumento desenvolvido pelo grupo de Becker-Ross basicamente consistia de uma lâmpada de fonte contínua de emissão de arco curto de xenônio, operando no modo *hot-spot*, com alta intensidade, com emissão de 190 a 900 nm. Possui um duplo monocromador, composto de um prisma e uma rede *echelle*, que resolve a radiação contínua emitida pela fonte. Por último, um detector com arranjo linear de dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge-Coupled Device*). A seguir, o Esquema 1 mostra a representação da instrumentação do HR-CS AAS.

Esquema 1 – Instrumentação de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Na figura, têm-se: (1) lâmpada de arco curto de Xenônio; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3-4) atomizador (chama ou forno de grafite); (5) fenda de entrada do monocromador; (6) espelhos parabolóides; (7) prisma; (8) fenda intermediária ajustável; (9) rede *echelle* e (10) detector CCD.



Fonte: WELZ, B. et al, High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry – The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry, p. 38, Weinhein: Wiley – VCH, 2005.

A fonte luminosa, representada pelo número 1 no Esquema 1, sendo uma lâmpada de arco curto de xenônio, é constituída basicamente de dois eletrodos de tungstênio distanciados por aproximadamente 1 mm, em uma atmosfera de xenônio com pressão de 15 bar, quando fria. Apesar de apresentar uma estrutura parecida com as lâmpadas de arco tradicionais, esta opera no chamado modo *hot-spot*. Esse modo de operação baseia-se no surgimento de um pequeno plasma (menor que 0,2 mm) próximo a superfície do cátodo. Isso é devido ao material utilizado nos eletrodos, a curta distância entre eles e a alta pressão da atmosfera de Xe (quando em funcionamento faz com que a pressão aumente um fator de 3 ou 4 vezes) gerando um pequeno plasma com temperatura de aproximadamente 10.000 K. Para manter a temperatura da lâmpada em uma condição operável, a mesma possui um sistema de refrigeração próprio.

Devido ao pequeno tamanho de plasma obtido, o mesmo possui um movimento aleatório, sendo necessária a correção do seu posicionamento. Para isso, existe um sistema de estabilização ativa do feixe, constituído de um espelho elipsoidal controlado por um dispositivo piezoelétrico, localizado em frente a lâmpada. O mesmo garante a passagem do adequado feixe de radiação que passará pelo atomizador e chegará até o monocromador, sendo ilustrado pelo número 2 do Esquema 1. Com todas essas configurações, a intensidade de emissão ultrapassa a lâmpada de cátodo oco convencional em até 3 ordens de grandeza (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2005).

A radiação, após a passagem pelo atomizador (chama ou forno de grafite, representados pelos números 3 e 4 do Esquema 1), chega até a fenda de entrada do monocromador, representado pelo número 5 do mesmo esquema.

Após a passagem pela fenda, a radiação é dirigida até um duplo monocromador, denominado DEMON (do inglês, *Double-Echelle Monochromator*). O primeiro monocromador é constituído por um prisma em arranjo *Littrow* (representado pelo número 7 do Esquema 1) e tem a função de obter uma prévia dispersão da radiação. O mesmo realiza essa função através da rotação do prisma e da rede de *echelle* por um motor de passos.

Após a prévia dispersão da radiação contínua a mesma passa por uma fenda intermediária (representada pelo número 8 do Esquema 1) de largura ajustável, estreitando ainda mais o espectro. A fração do espectro selecionado então chega a segunda parte do monocromador, a rede *echelle* (número 9 do Esquema 1), responsável pela alta resolução do espectro.

Em um monocromador de alta resolução como o descrito, faz-se necessário um sistema de estabilização para prevenir qualquer flutuação do sistema. Para tal, uma lâmpada de neônio, que emite linhas relativamente estreitas, é posicionada em frente a fenda intermediária. Nessa posição a radiação da lâmpada de neônio não passa pelo prisma, sendo as linhas separadas somente pela rede de *echelle*, onde a luz emitida por esta lâmpada deve atingir uma determinada posição na rede e assim chegar ao detector, atingindo um *pixel* correspondente. Dessa maneira, o motor de passos ajusta a posição da rede *echelle*.

O espectro então, altamente resolvido pelo duplo monocromador, chega ao detector constituído de um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), de tamanho unitário 24 x 24  $\mu\text{m}$  (representado pelo número 10 do Esquema 1). Além de ser sensível na região UV o mesmo possui 512 x 58 *pixels*, onde cada *pixel* possui um amplificador individual, ou seja, o equipamento opera com 512 detectores independentes, sendo 200 o número de *pixels* utilizado para fins analíticos. Os outros *pixels* são utilizados para registro da vizinhança da linha analítica e para corrigir eventos espectrais indesejáveis. Dessa maneira, a resolução do detector atinge 2 pm por pixel na região do ultravioleta distante.

Além disso, o registro das intensidades é resolvido tanto espectral como temporalmente, possibilitando a informação do ambiente espectral cerca de 0,2 nm para cada lado da linha analítica principal. Unindo as informações geradas temos um espectro de duas e três dimensões, fornecendo uma informação clara e temporal do sinal analítico, além de informações sobre o ambiente espectral em que o sinal de interesse se encontra (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2005).

Devido à grande quantidade de informação, o instrumento é controlado por um *software* que permite o processamento total dos dados e os apresenta de forma fácil e completa. Além disso, possui a capacidade de corrigir automaticamente

eventos contínuos que atingem de maneira similar todos os *pixels* do detector. Essa correção somada a alta intensidade da fonte contínua de emissão torna desnecessária a modulação da radiação, uma vez que a emissão de radiação proveniente do atomizador ou flutuações da fonte são eventos contínuos e são corrigidos automaticamente (BORGES et al., 2005).

O *software* também permite a correção de outras espécies que absorvam radiação no intervalo espectral do analito, mesmo se houver sobreposição espectral e temporal. A correção é realizada pela subtração de um espectro de referência, que pode ser obtido pela análise de uma solução padrão do interferente. O mesmo realiza a subtração espectral através de funções matemáticas, utilizando um algoritmo dos mínimos quadrados. Detalhes desses procedimentos de correção são descritos no próximo item.

### 2.1.3 Correção de fundo e espectral

A radiação emitida pela fonte luminosa, ao passar pelo atomizador, pode ser modificada não somente pela absorção pelo analito, mas também por eventos chamados de “contínuos” e “descontínuos ou fundo”.

Eventos contínuos são os que se repetem independente da presença do analito, como por exemplo, a luminosidade proveniente da fonte de atomização ou, ainda, o ruído da lâmpada de arco curto de xenônio (*flicker noise*). Quando isso acontece, os *pixels* do detector são iluminados simultaneamente e da mesma forma, sendo realizada a correção automaticamente pelo equipamento. Assim, a possibilidade de conhecer o ambiente espectral que se encontra o sinal analítico, além de trazer informações sobre a composição da amostra e identificar possíveis interferentes, faz com que o equipamento identifique de forma eficiente eventos contínuos e possa, automaticamente, eliminar o sinal do resultado final. Essa correção é importante, uma vez que ao realizá-la, aumenta-se a relação sinal/ruído (S/N, do inglês *signal/noise*) e conseqüentemente, melhora o limite de detecção.

Já o evento descontínuo ou fundo se dá pela absorção de radiação pelo analito e de outros elementos ou moléculas diatômicas coexistentes no atomizador.

Quando isso acontece, a absorção molecular pode causar sérios problemas na espectrometria de absorção atômica por fonte de linhas (LS AAS, do inglês Line Source Atomic Absorption Spectrometry), pois dependendo do tipo de corretor de fundo, a correção pode ser ineficiente.

Isso é facilmente e simultaneamente corrigido no HR-CS AAS. Esses eventos não são corrigidos automaticamente, porém esta correção não é necessária se o sinal do interferente não se sobrepõe ao sinal do analito, ou seja, se não ocorrem no mesmo *pixel* de detecção do analito. Se isso acontecer, ainda existe a possibilidade da separação temporal do sinal de interesse em relação ao sinal de fundo modificando o tempo de integração, otimizando o programa de temperatura na tentativa de eliminar o átomo ou molécula interferente ou ainda, com a adição de modificadores químicos. Quando a separação temporal não é possível, a correção pode ser realizada através da subtração de um espectro de referência. Ou seja, ao conhecer o átomo ou molécula que está causando a interferência, gera-se um espectro de referência desta espécie através da medida do seu padrão (sólido ou líquido). Após o registro, o *software* possibilita salvar o mesmo para que este possa ser subtraído do espectro do qual se deseja eliminar a interferência através de um algoritmo, sendo essa correção denominada correção de fundo por mínimos quadrados (LSBC, do inglês *Least-Squares Background Correction*).

A aplicação dessa correção LSBC elimina a correção específica de fundo, mas nem sempre é necessário realizar experimentos para conhecer a identidade do interferente. As maiorias destes são normalmente provenientes de moléculas diatômicas, onde as mesmas possuem um espectro rotacional de estrutura fina, sendo comumente encontrados na literatura (WELZ et al., 2005).

## 2.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA (HR-CS MAS)

A possibilidade da medida de absorção molecular é dada pelo uso de uma fonte de contínua, pois a mesma proporciona os comprimentos de onda e energia suficientes para determinações desse tipo associado a um detector capaz de corrigir eventos contínuos provenientes de moléculas poliatômicas. Dessa maneira, é possível a análise de elementos não metálicos como o iodo e cloro, que formam moléculas diatômicas estáveis que absorvem a radiação dentro da faixa de trabalho da lâmpada e proporcionam linhas de absorção com largura compatível com as linhas atômicas. Mais detalhes deste tipo de análise serão descritos a seguir.

### 2.2.1 Espectro molecular

O espectro molecular consiste em diferentes transições e cada uma delas possui sua energia específica. Porém, assim como nos átomos, essas transições também podem ser quantizadas. Todavia, por possuir graus de liberdade a mais, quando comparadas aos átomos, devido a energias de vibração, rotação e transição eletrônica, o número de estados energéticos possíveis de se encontrar em uma molécula é muito maior do que em um átomo. Dessa maneira, o espectro de uma molécula apresenta muito mais linhas de absorção do que o de um átomo e conseqüentemente uma banda larga de absorção é observada sobre uma faixa de comprimentos de onda no espectro eletromagnético.

A energia proveniente da transição eletrônica ( $E_{el}$ ) se baseia na interação dos núcleos com os elétrons. Já a energia proveniente da vibração ( $E_{vib}$ ) e rotação ( $E_{rot}$ ) são devidas aos movimentos dos núcleos, onde a vibracional é proveniente das vibrações interatômicas e a rotacional leva em consideração a energia de rotação da molécula em torno do centro de gravidade. A energia total associada a uma molécula diatômica é dada por:

$$E_{total} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (\text{Equação 1})$$

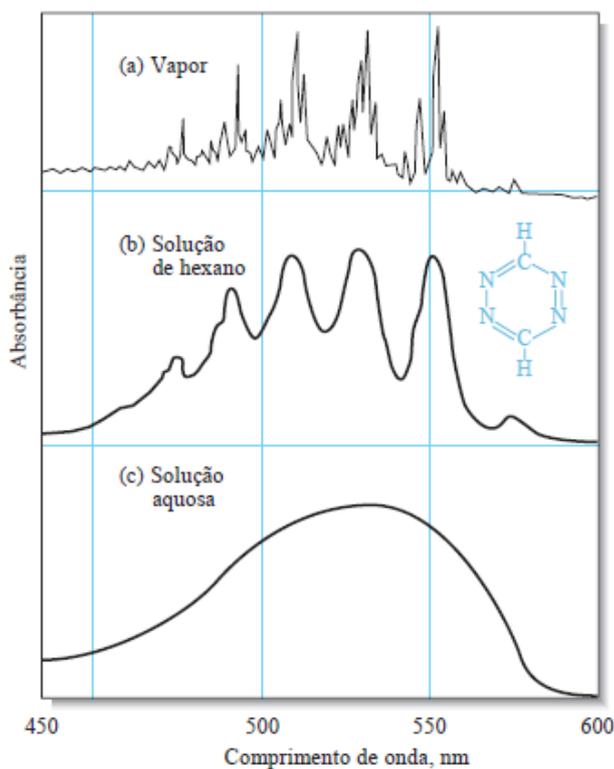
Onde:

$$E_{\text{rot}} \ll E_{\text{vib}} \ll E_{\text{el}} \quad (\text{Equação 2})$$

Enquanto as energias do tipo  $E_{\text{vib}}$  e  $E_{\text{rot}}$  estão presentes na região de micro-ondas até infravermelho, a  $E_{\text{el}}$  apresenta absorção na região do visível até o ultravioleta e, quando presentes, se tornam uma interferência espectral para os sinais atômicos ou podem ser a causa de erro em correções de fundo.

Esse comportamento pode ser melhor elucidado com a Esquema 2 a seguir, que apresenta os espectros de absorção molecular de 1,2,4,5-tetrazina em diferentes solventes.

Esquema 2 – Espectros de absorção molecular de 1,2,4,5-tetrazina na região do visível em a) fase gasosa, b) solvente apolar e c) solvente polar.



Fonte: SKOOG, D. A., et al., Fundamentos de química analítica, Editora Thomson, 8ª edição, p. 687, 2006.

O composto químico 1,2,4,5-tetrazina em fase gasosa apresenta muitas linhas em função das linhas de absorção das transições eletrônicas, vibracionais e rotacionais serem diferenciáveis. Já quando a mesma molécula se encontra em um solvente apolar como o hexano, as transições eletrônicas podem ser visualizadas e as provenientes da estrutura vibracional e rotacional não. Em uma solução aquosa, polar, a soma das forças dessas interações intermoleculares leva a esses picos eletrônicos fundidos, fornecendo um sinal de absorção contínuo (SKOOG, 2006).

Portanto, a análise por absorção molecular só é possível para moléculas diatômicas, pois as mesmas são estáveis nas condições de atomização (altas temperaturas) e possuem estruturas rotacionais finas, podendo ser comparados a estrutura atômica. Já moléculas poliatômicas, possuem bandas de absorção largas devido à grande quantidade de linhas rotacionais que não são resolvidas pelo equipamento, sendo tratado como evento contínuo e automaticamente descartado. Devido a essa possibilidade e sua importância, a análise elementar de não metais por HR-CS MAS vem ganhando cada vez mais destaque. (BORGES et al, 2005; WELZ et al, 2005).

O quadro 1 apresenta uma breve revisão bibliográfica envolvendo elementos não metálicos, como enxofre, cloro, iodo, flúor, nitrogênio, bromo e fósforo determinados pela técnica supracitada.

Quadro 1 – Breve revisão bibliográfica sobre elementos não metálicos determinados via formação molecular em amostras diversas por HR-CS MAS utilizando chama ou forno de grafite como atomizador.

(continua)

<b>Elemento</b>	<b>Molécula</b>	<b>Amostra</b>	<b>Atomizador</b>	<b>Referências</b>
<b>S</b>	CS	Vinho	Chama	HUANG et al., 2008A
		Ferro fundido	Chama	HUANG et al., 2006B
		Plantas	Chama	WANG; LI, 2009
		Amostras biológicas	Forno de grafite	FERREIRA, et al., 2010; GUNDUZ; AKMAN, 2015; HEITMANN, 2006
		Fungicida e fertilizante	Chama	VIRGILIO, et al., 2011
		Carvão e petróleo	Chama	BAYSAL; AKMAN, 2011; KOWALEWSKA, 2011

Quadro 1 – Breve revisão bibliográfica sobre elementos não metálicos determinados via formação molecular em amostras diversas por HR-CS MAS utilizando chama ou forno de grafite como atomizador.

(continuação)

<b>S</b>	<b>CS</b>	Carvão, petróleo, polietileno e aço	Forno de grafite	RESANO; FLÓREZ, 2012; NAKADI; ROSA; VEIGA, 2013; MIOR, et al., 2013
		Diesel	Forno de grafite	HUBER, et al., 2015; NAKADI; SOARES; VEIGA, 2014
		Fármacos	Chama	BECHLIN; NETO; NOBREGA, 2013
		Alimentos e bebidas	Chama	OZBEK; BAYSAL, 2015; ZAMBRZYCKA; ZYLKIEWICZ, 2014
		Alimentos	Forno de grafite	OZBEK; AKMAN, 2013
	<b>SH</b>	Fungicida e fertilizante	Chama	VIRGILIO, et al., 2011
	<b>SnS</b>	Água	Forno de grafite	BAUMBACH; LIMBURG; EINAX, 2013
		Carvão	Forno de grafite	BAUMBACH; EINAX, 2014
		Óleo cru de petróleo	Forno de grafite	CADORIM, et al., 2016
<b>Cl</b>	<b>CaCl</b>	Amostras sólidas diversas	Forno de grafite	GUARDA, et al., 2016
	<b>SrCl</b>	Amostras biológicas	Forno de grafite	PEREIRA et al., 2014
	<b>InCl</b>	Leite em pó	Chama	HUANG et al., 2006A
	<b>AlCl</b>	Alimentos	Forno de grafite	HEITMANN et al., 2006; FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012
<b>I</b>	<b>Bal</b>	Medicamentos	Forno de grafite	HUANG et al., 2009
<b>F</b>	<b>GaF</b>	Minério de zinco e proteína	Forno de grafite	HEITMANN et al., 2006
		Água e sal	Forno de grafite	GLEISNERA; WELZ; EINAX, 2010
<b>N</b>	<b>NO</b>	Água e fertilizante	Chama	HUANG et al., 2010
<b>Br</b>	<b>AlBr e CaBr</b>	Sal e fármaco	Forno de grafite	HUANG et al., 2008B
<b>P</b>	<b>PO</b>	Ferro fundido	Chama	HUANG et al., 2005
		Amostras biológicas	Forno de grafite	RESANO; BRICEÑO; BELARRA, 2009B

### 2.2.2 Correção de fundo e espectral

Em termos práticos, toda a radiação que passa através do atomizador não é absorvida somente pelos átomos de interesse, mas também pode ser absorvida por alguma molécula gasosa ou, ainda, algum radical que possa estar presente. Além disso, a radiação pode ser espalhada por partículas que podem estar presentes no atomizador. As moléculas gasosas, por possuírem muitos graus de liberdade, não apresentam uma fina estrutura, apresentando uma banda larga de absorção em um intervalo espectral. Ademais, esse tipo de sinal não sofre alteração, ou seja, atinge todos os *pixels* do detector ao mesmo tempo.

As moléculas podem estar presentes no atomizador devido a constituição da amostra ou mesmo do atomizador, sendo mais comumente encontradas na chama. Já a radiação que é espalhada, normalmente é encontrada em matrizes que possuem em sua constituição elementos refratários e que não puderam ser eliminados na etapa de pirólise. Da mesma forma que as moléculas, esse tipo de diminuição da radiação que chega ao atomizador, sendo lida pelo detector como absorção, é classificada como um evento contínuo por não possuir uma estrutura fina definida. Dessa maneira, toda a atenuação da radiação que não se deve a absorção específica pelo analito, é chamada de absorção de fundo ou, ainda, não específica.

Como a medida de absorção não é uma medida absoluta e sim, uma medida da absorção total subtraindo-se o sinal da absorção do fundo, a investigação de como realizar a medida de fundo corretamente, sempre esteve em discussão. Nos espectrômetros de fonte de linha convencionais isso era realizado de duas formas: através da correção da lâmpada de deutério ou a correção por efeito Zeeman.

Esses dois tipos de correções possuem suas limitações e introduzem erros quando não realizadas adequadamente, uma vez que nesse tipo de técnica é pouco provável que se saiba qual é fonte que está contribuindo para o surgimento desse sinal de fundo. Os dois tipos de correções funcionam relativamente bem, porém quando o sinal analítico sofre alguma flutuação, devido à baixa concentração, essas correções não conseguem distinguir os tipos de absorção.

Dentre os tipos de correção mencionados, se destaca aquele por efeito Zeeman, que apresenta excelente correção, exceto para moléculas ou átomos que sofrem alteração na absorção quando estão sob efeito de um campo magnético, o que não acontece para certas moléculas, como a de fósforo (PO).

Já no HR-CS MAS (do inglês, *High Resolution – Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry*) o processamento do sinal ocorre da seguinte maneira: primeiramente, um espectro negro, ou seja, com o bloqueio da luminosidade emitida pela lâmpada de arco curto de xenônio. Depois, logo antes de começar a aplicar a rampa de temperatura, o feixe luminoso passa pelo atomizador na ausência de qualquer analito ou possíveis interferentes, sendo registrada a intensidade da luz como sinal de branco. Isso serve para que a distribuição dos comprimentos de onda chegue a locais corretos na rede *echelle* e atinja os *pixels* do detector CCD, onde registra-se a intensidade média do espectro.

A próxima etapa é a passagem de luz durante a atomização/vaporização, onde um *scan* da intensidade do analito é registrada, gerando um gráfico de três dimensões (intensidade x comprimento de onda x tempo). Pode-se obter três tipos de sinais: devido a absorção atômica pelo analito, sinal de fundo e estruturas finas de outros analitos atômicos ou moleculares que estejam presentes na amostra ou padrões.

O sinal de fundo é automaticamente removido do espectro final gerado pelo equipamento, restando apenas os sinais do analito e mais algum possível componente atômico ou molecular da amostra, ambos com estruturas finas e definidas. Porém, a presença de outros metais ou ainda espécies moleculares, dependendo de sua natureza e quantidade, podem sobrepor o sinal analítico. Quando isso acontece, um segundo método de correção pode ser usado, chamado de correção matemática por um algoritmo de mínimos quadrados (LSBC).

Esse tipo de correção matemática se baseia na possibilidade de armazenar um espectro de referência dos interferentes e subtraí-los do espectro gerado pela análise da amostra real. Esse procedimento acontece através de uma regressão linear do espectro de referência, sendo aumentado ou diminuído através de um fator de correção. O quadrado da diferença entre as intensidades dos sinais do espectro

de referência e o espectro da amostra são calculados *pixel* por *pixel*. Dessa forma é encontrado um algoritmo de correção, que corrige os sinais estruturados do espectro da amostra, sem importar a concentração do interferente (WELZ et al., 2005).

### **2.2.3 Análise multielementar**

A busca pela determinação multielementar simultânea sempre esteve presente nas investigações envolvendo espectrometria de absorção atômica, tendo menos destaque devido à grande dificuldade instrumental inerente a técnica.

Os primeiros relatos da tentativa de construção de um espectrômetro de absorção atômica multielementar datam de 1975, onde Aldous e colaboradores ((ALDOUS; MITCHELL; JACKSON, 1975) utilizam duas lâmpadas multielementares de cátodo oco, policromadores, atomizadores de chama e detectores convencionais para a determinação de 7 metais em água potável de forma simultânea. Porém, o instrumento apresentava baixa sensibilidade quando comparado ao equipamento convencional, além de não proporcionar flexibilidade na escolha dos analitos. A razão desse desempenho insatisfatório está relacionada com a combinação das lâmpadas de cátodo oco, que perdem intensidade devido à divisão e combinação do feixe de radiação (ALDOUS; MITCHELL; JACKSON, 1975; AMORIM et al., 2008).

Devido a isso, a busca por uma fonte de radiação contínua para a espectrometria de absorção atômica que proporcionasse uma intensidade adequada ganhava destaque. Embora a confecção de uma fonte contínua que trabalhe na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético não seja realmente difícil de obter, a dificuldade se encontra no isolamento da largura da banda pelo monocromador, de baixa resolução. Devido a isso e uma largura demasiada grande da fenda, ocorre uma passagem excessiva de radiação e, portanto, uma diminuição da sensibilidade e aumento da possibilidade de interferências. Além disso, apresentam uma quantidade elevada de ruído e conseqüentemente elevados limites de detecção, relacionados a instabilidade da fonte contínua mais intensa. Dessa forma, não se pode trabalhar com esse tipo de

fonte em substituição da lâmpada de cátodo oco, se não houver mudanças no restante do equipamento.

Para obter o adequado estreitamento das linhas emitidas pela fonte contínua, O'Haver e colaboradores, em 1976, (ZANDER; O'HAYER; KELIHER, 1976) utilizaram um policromador de *echelle* com alta resolução, onde o mesmo proporcionava um estreitamento maior das linhas espectrais. Já em 1979, Harnly e colaboradores (HARNLY et al., 1979) desenvolveram um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua para determinações multielementares simultâneas, chamado de SIMAAC (do inglês, *Simultaneous Multielement Atomic Absorption Continuum*), que possuía um policromador *echelle* modificado, uma lâmpada de arco curto de xenônio como fonte contínua de emissão. Porém, problemas com a estabilização da fonte de emissão dificultaram a viabilidade da técnica (AMORIM et al., 2008).

Com o decorrer dos anos, alguns trabalhos sugeriam a determinação simultânea de diversos analitos, ainda que com algumas dificuldades em relação a interferência espectral (CORREIA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; FRESCHI et al., 2001; SUNG; SHANG, 2003; AJTONY, et al., 2008).

Atualmente temos disponível no mercado um espectrômetro de absorção atômica e molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS do inglês, *High Resolution – Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*). O mesmo possui uma fonte luminosa de arco curto de xenônio de alta intensidade e um monocromador duplo de alta resolução de prisma e *echelle*, além de um detector em arranjo de carga acoplado (CCD), no qual permite uma resolução de 2 pm por *pixel*.

Este tipo de instrumentação proporciona uma excelente resolução e sensibilidade, onde o detector CCD possui 588 *pixels*, dos quais somente 200 são usados para fins analíticos, e o restante é usado para correções espectrais. Cada um desses 200 *pixels* monitora um intervalo de 1 a 2 pm, o que significa que esse instrumento somente consegue obter resultados de um intervalo de 0,2 a 0,3 nm na região do ultravioleta e até 0,5 nm na região do visível. Esse intervalo é muito estreito, limitando a análise multielementar simultânea para elementos que tenham sinais analíticos dentro desta diminuta faixa.

Essa limitação é mais acentuada para análises em forno de grafite, onde os elementos de interesse são disponíveis todos ao mesmo tempo dentro do atomizador. Atomização por chama se torna mais adequada, uma vez que a análise multielementar sequencial rápida pode ser realizada sem problemas (RESANO, M. et al., 2011).

Apesar da dificuldade de atomização multielementar por forno de grafite, onde cada elemento possui uma particularidade na temperatura de pirólise e atomização e também do uso de modificadores, alguns trabalhos apresentam determinações simultâneas de metais em diferentes amostras (ADOLFO et al., 2016; DITTERT et al., 2009, 2010; OZBEK; OZCAN, 2016A; QUADROS et al., 2010; SANTOS et al., 2009).

## 2.2.4 Características e Vantagens

As vantagens do uso da técnica de HR-CS AAS ficam mais evidentes quando comparamos suas características com a técnica utilizando LS AAS:

1. Estabilidade do sinal: Como o detector utilizado em HR-CS AAS monitora 200 *pixels*, permite a visualização de eventos espectrais contínuos, como a variação da fonte luminosa (*flicker noise*). Esse aspecto somado a grande intensidade da lâmpada de arco curto de xenônio, faz com que sinais mais definidos e com elevada sensibilidade sejam obtidos, melhorando o limite de detecção em um fator de 3 a 5 vezes quando comparado a lâmpada de cátodo oco.

2. Ambiente espectral: Por possuir o detector supracitado, além de visualizar o sinal analítico, é possível ter uma visão do ambiente espectral em que este sinal se encontra, ou seja, possibilita a identificação e monitoramento de possíveis interferentes. Dessa maneira, possibilita a visualização do sinal analítico (absorvância x tempo) acrescido de um terceiro eixo, o comprimento de onda.

3. Correção de fundo: A correção de fundo é realizada de forma simultânea a obtenção do sinal, ou seja, até mesmo a mais rápida variação de fundo é registrada e corrigida. Porém, quando o sinal do interferente (atômico ou na forma

de molécula diatômica) estão sobrepostos temporalmente e não puderam ser mais bem resolvidos, o programa oferece a possibilidade de eliminação através da subtração espectral de referência através da correção matemática de algoritmos com mínimos quadrados.

4. A utilização de uma única fonte luminosa para todos os analitos dentro da faixa de trabalho UV-Vis proporciona uma diminuição nos gastos de compra de várias lâmpadas. Além disso, devido a sua alta energia de emissão é possível utilizar de maneira adequada linhas secundárias.

5. Análise multielementar: Com a utilização de uma fonte contínua, um monocromador duplo de alta resolução e um detector CCD com 200 *pixels*, a análise simultânea pode ser realizada em forno de grafite, desde que as linhas de absorção dos analitos estejam próximas. As análises sequenciais, ou seja, em diferentes comprimentos de onda para cada analito, normalmente são empregadas por atomizadores com chama.

Apesar de ser encontrado na literatura relatos de análise simultânea ou sequencial utilizando LS AAS, muitos problemas relacionados a sensibilidade, correção de fundo e estabilização de sinal são descritos (CORREIA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; FRESCHI et al., 2001; SUNG; SHANG, 2003; AJTONY, et al., 2008).

Além disso, devido a possibilidade de escolha de comprimento de onda aliada a um detector CCD, é possível a determinação de elementos não metálicos com maior facilidade, através da formação de moléculas diatômicas. Alguns desses trabalhos estão relatados no Quadro 1.

A literatura relata que não há desvantagens na utilização de HR-CS AAS em comparação ao uso de um espectrômetro de fonte de linhas convencional, sendo a única diferença o preço, uma vez que o espectrômetro de alta resolução com fonte contínua é mais recente e possui maior tecnologia em sua fabricação e, obviamente, é mais caro. Esse aspecto é de alguma forma amenizado, uma vez que é necessário a compra de uma única lâmpada como fonte luminosa e para o espectrômetro tradicional é necessário a compra de uma lâmpada para cada elemento de interesse (RESANO; RUIZ, 2011; WELZ et al., 2007).

### **3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE CLORO UTILIZANDO AMOSTRAGEM SÓLIDA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Cloro é considerado um dos elementos mais abundantes na superfície terrestre, sendo encontrado em maior quantidade solubilizado nos oceanos na forma de cloreto (~2 %). Devido a sua alta solubilidade, este elemento consegue ser facilmente transportado através de diferentes tipos de barreiras geoquímicas, sendo rapidamente absorvido por distintos seres vivos e considerado um componente essencial para os mesmos. Sua função no corpo humano é basicamente o controle adequado da pressão osmótica, equilíbrio ácido-base, proporcionando adequado valores de pH à vida. Além disso, também é encontrado no sangue e proporciona adequada digestibilidade dos alimentos, uma vez que o ácido clorídrico é um dos principais componentes do suco gástrico (FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012; GRIZEL et al., 2015; YUDOVICH; KETRIS, 2006).

A utilização desse elemento em escala industrial, parte da eletrólise de uma solução de cloreto de sódio, para a obtenção do cloro elementar, na forma de gás. Uma vez liquefeito, o cloro é transportado para uma vasta gama de aplicações, tais como: a fabricação de polímeros como o PVC (policloreto de vinila), solventes clorados, defensivos agrícolas, branqueamento de celulose, tratamento de águas, reagente intermediário na síntese de produtos (anticoagulantes, amaciantes de tecidos, produtos automotivos e insumos farmacêuticos), entre outros (FERNANDES; GLÓRIA; GUIMARÃES, 2009).

Porém, na forma elementar, ao entrar em contato com a água, por exemplo, presente na mucosa nasal, produz HCl, causando elevada toxicidade aos seres vivos. Os sintomas de intoxicação por cloro aparecem instantaneamente após a exposição, e podem ser: secreção nasal, lacrimação e dor nas vias aéreas

superiores. A concentração de apenas 0,001% de  $\text{Cl}_2$  pode causar sérios danos ao pulmão e com uma concentração de 0,01% pode ser fatal (PEREIRA et al., 2014).

Devido à importância desse elemento para os seres vivos e seu potencial efeito tóxico em certas condições e concentrações, o monitoramento do mesmo tanto em amostras de tecido vegetal e animal, combustíveis fósseis e amostras industriais são muito importantes (CVJETKO; CVJETKO; PAVLICA, 2010).

Diferentes técnicas instrumentais são utilizadas para o monitoramento qualitativo e quantitativo de cloro, porém a maioria utiliza métodos de decomposição de amostras. A decomposição via ácida, ainda que realizada em sistema fechado, agrega a possibilidade de contaminação proveniente dos reagentes utilizados, uma vez que a presença do elemento monitorado se encontra, muitas vezes, em nível de traço.

A análise direta de sólidos se apresenta como uma alternativa a esse problema, uma vez que diminui o tempo de análise, aumenta a sensibilidade, pois não há diluição da amostra e reduz o risco de contaminação ou perda por volatilização. Em amostras de difícil decomposição, como o carvão, que buscam a determinação de elementos voláteis como o cloro, tornam este tipo de análise ainda mais atrativa (GOIS et al., 2014).

Com base nisso, a recente técnica HR-CS GF MAS, utilizando análise direta de sólidos, foi escolhida para investigar a presença de cloro em amostras de diferentes naturezas.

### 3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O desenvolvimento deste método analítico para a determinação de cloro, através da formação da molécula  $\text{CaCl}$ , utilizando espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, teve por principal objetivo a análise direta de amostras sólidas e líquidas, com diferentes concentrações de cloro. Para que este objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- I. Escolher a melhor molécula e comprimento de onda que proporcione a determinação de cloro nas amostras e nos padrões aquosos com a adequada sensibilidade;
- II. Otimizar a temperatura de pirólise e vaporização no comprimento de onda escolhido;
- III. Escolher o modificador químico adequado para garantir a estabilidade e sensibilidade da molécula.
- IV. Otimizar tanto a massa de modificador químico quanto a do reagente formador da molécula (cálcio);
- V. Validar o método proposto, onde serão avaliados os parâmetros: precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão (frente a amostra certificada) e massa característica;
- VI. Aplicar o método validado em amostras de natureza distintas para comprovar a ampla gama de sua aplicabilidade.

## 3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.2.1 Cloro

#### 3.2.1.1 Histórico e Características

O elemento cloro foi o primeiro halogênio a ser identificado pelo químico Carl William Scheele, em 1774, publicado em *De Magnesia Negra*, na Suécia. Apesar de sua identificação nessa época, sua utilização e investigação sobre sua natureza é datada de muito antes disso. A utilização do cloreto de sódio como um sal vital é conhecido desde 77 D.C.. A descoberta de W. Scheele foi realizada através do aquecimento de ácido clorídrico (conhecido como ácido muriático) e dióxido de manganês, que liberava um gás amarelo-esverdeado, o qual possuía odor da água régia. Suas conclusões foram de que substâncias ácidas em contato com o óxido de manganês, rapidamente o dissolvia, conseqüentemente o gás liberado deveria ser o muriático sem a presença do hidrogênio (WISNIAK, 2002).

Em 1810, Humphry Davy demonstrou que o elemento não poderia ser decomposto, e que o ácido muriático era na verdade, formado de hidrogênio e cloro. Dessa forma, reconheceu-se como um novo elemento, dando a ele o nome de cloro, devido a sua coloração amarelo esverdeada (PEIXOTO, 2003).

Somente em 1823, Faraday determinou de forma quantitativa a formação de cloretos e cloro liquefeito, sendo somente fabricado em larga escala em 1888, por Rudolph Knietsch. Nessa época, o principal uso para o elemento estava relacionado ao branqueamento e a desinfecção em hospitais (WISNIAK, 2002).

Entre 1920 e 1940, o cloro teve um considerado aumento na participação como matéria prima de diversos solventes clorados. Também foi utilizado na primeira guerra mundial, na forma de gás mostarda (bis(2-cloroetil) sulfeto), sendo a primeira substância utilizada como arma química (FERNANDES; GLÓRIA; GUIMARÃES, 2009).

### 3.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação

A quantidade de cloro distribuída em toda a crosta terrestre, é de aproximadamente 0,0314%, podendo ser encontrado na forma elementar, na forma de HCl em gases vulcânicos e na forma iônica, cloreto (Cl<sup>-</sup>), presente em sua maioria nos oceanos (~2%) (FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012; LUZ; LINS, 2005; PEIXOTO, 2003).

O principal processo de obtenção do elemento utiliza a água do mar como matéria prima, uma vez que possui elevado teor de NaCl. Essa água sofre um processo de eletrólise, na qual converte os íons cloreto em cloro elementar. Sua formação resulta num gás de coloração amarelo-esverdeado, com odor forte e muito irritante. A indústria, para conseguir manusear o cloro elementar, aplica um processo que envolve pressão a baixa temperatura, liquefazendo o gás cloro, passando então a um líquido de coloração âmbar (FERNANDES; GLÓRIA; GUIMARÃES, 2009).

A partir desse produto, inúmeros outros podem ser fabricados, sendo os principais reagentes químicos: 60% de todos os produtos de relevância comercial e 85% dos produtos farmacêuticos. Além disso, é constituinte da principal matéria prima para a confecção do PVC, o dicloroetano, do óxido de propeno, utilizado na fabricação de espumas para colchões/estofados, do ácido clorídrico, do hipoclorito de sódio, de defensivos agrícolas, na indústria alimentícia, entre outros (ABICLOR, 2014).

Como o elemento está presente em diversos tipos de produtos e é considerado um elemento essencial a vida, ele é facilmente encontrado em diversas amostras biológicas ou industriais. Porém, em excesso em produtos consumidos pelo homem, pode causar disfunção hormonal ou danos no sistema nervoso.

Já quando presente em produtos industriais, que utilizam a queima dos mesmos como produção de um subproduto, como por exemplo, o carvão ou combustíveis fósseis, colabora para a poluição ambiental (GOIS et al., 2014). No tabaco, durante o processo do fumo, a ingestão demasiada deste elemento pode contribuir para uma intoxicação do organismo (BARBOSA et al., 2013).

### 3.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento

A toxicidade do cloro frente a humanos dependerá do tipo de composto e do tempo de contato a essa espécie. O cloro na forma molecular, além de ser extremamente irritante, em contato com água, seja do ambiente ou da mucosa do sistema respiratório, forma o ácido hipocloroso e ácido clorídrico. O exato mecanismo do dano epitelial é desconhecido, porém se pode inferir que a espécie de  $\text{Cl}_2$  reaja com espécies de oxigênio, presentes nas vias aéreas, podendo formar uma diversa gama de compostos oxidantes altamente reativos. O primeiro tratamento realizado para este tipo de intoxicação é a hidratação das vias respiratórias. Caso haja uma obstrução das vias respiratórias, é recomendado o uso de agentes adrenérgicos. Apesar de existirem outros tratamentos, este procedimento e o repouso do paciente parecem ser os mais comumente aceitos (WHITE; MARTIN, 2010).

A intoxicação por sais inorgânicos comuns de cloro, como o  $\text{KCl}$  e o  $\text{NaCl}$ , não são comuns uma vez que sua ingestão em grandes quantidades causa vômito e são facilmente excretados pelo rim e fígado. Um consumo não tão elevado, porém regular, pode causar aumento da pressão sanguínea, juntamente com possíveis danos aos órgãos excretores (WHO, 2003).

Hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ) quando ingerido pode causar queimação na boca e garganta, ocasionando também irritação no sistema gastrointestinal, além de náusea, vômito e diarreia. Quando o hipoclorito é utilizado como agente de limpeza, e é misturado com outros produtos de limpeza contendo um pH ácido ou básico, pode ocorrer a liberação de cloro na forma gasosa, resultando na irritação das vias aéreas. A exposição ocular também pode causar irritação, dor, lacrimação, fobia a luz e inflamação na retina (PHE, 2015).

### 3.2.1.4 Legislação

De acordo com o Instituto Médico da Academia Nacional de Ciência dos Estados Unidos (Washington, USA), para o correto funcionamento do organismo de

um ser humano entre 19 e 50 anos é recomendado a ingestão de 2,3 g de cloreto na dieta diária (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006).

Como dito antes, o excesso ou a deficiência desse elemento podem causar danos metabólicos ao corpo humano, sendo necessária a investigação e a criação/monitoração de regulamentações sobre a quantidade que cada produto deve conter, e que estes sejam discernidos quanto a sua via de introdução no organismo: respiratório, gastrointestinal, tópica ou intravenosa.

A quantidade máxima permitida (MCL, do inglês *Maximum Contaminant Level*) para cloro em água potável, de acordo com a US EPA (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*) é de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  (EPA, 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade através da Portaria nº 2.914, de 2011. Essa portaria prevê uma quantidade mínima de cloro residual livre de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e máxima de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  em qualquer ponto do abastecimento (BRASIL, 2011).

O US FDA (do inglês, *United States Food and Drug Administration*) traz a regulamentação de diferentes tipos de alimentos, variando o nível máximo permitido de cloreto de cálcio (usado como agente antifementante, antimicrobiano, controle de pH, intensificador de sabor, umectante, estabilizador, espessante e texturizante) entre 0,05 e 2 % (FDA, 2016).

Já os defensivos agrícolas, com organoclorados em sua composição, foram utilizados em grandes quantidades na metade do século XX. Além do uso na agricultura, esses compostos foram utilizados para o controle de proliferação de mosquitos transmissores da Dengue e Leishmaniose, além de piolhos em crianças.

Devido a sua estabilidade associada a fácil solubilização em tecidos lipídicos, esse tipo de defensivo agrícola possui a propriedade de bioacumulação, até as mais altas posições da cadeia alimentar. Dessa maneira, esses compostos estariam em tecidos de origem animal e vegetal, sendo diretamente consumidos e acumulados em humanos.

Esses compostos organoclorados atacam enzimas ou sistemas específicos dos organismos das pragas, e por estas serem muito semelhantes as que estão

presentes no corpo humano, esses compostos apresentam um grande risco para a saúde humana e do meio ambiente. Dessa maneira, a monitoração deste elemento ou moléculas que contenham o mesmo, em diferentes tipos de amostras, se tornou análise de rotina em diversos laboratórios (CHUNG; CHEN, 2011).

Nos Estados Unidos, o uso do DDT (1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil) etano) foi banido do seu território, em 1972 pela proibição da US EPA. Depois disso, a maioria dos países seguiu o mesmo comportamento, no entanto, em alguns países em desenvolvimento ele ainda é utilizado em combate a doenças transmitidas por mosquitos. No Brasil, o uso, comercialização e distribuição do mesmo e de outros defensivos agrícolas organoclorados foram proibidos efetivamente pela Portaria do Ministério da Agricultura nº 329, de 02 de setembro de 1985 (JARDIM; ANDRADE, 2009; BRASIL, 1985).

A presença de cloro em carvão também é alvo de investigações e limitado por legislações internacionais e nacionais. Esse produto, ao ser queimado em usinas termelétricas, pode levar esse elemento ao estado de vapor e liberado ao meio ambiente se não houver correta captura desse elemento. Além disso, o cloro está associado a liberação do mercúrio, uma vez que forma compostos facilmente com esse metal, e dependendo da sua concentração promove ou inibe a formação de mercúrio reduzido ou oxidado (CHU; MEHTA; CARTY, 2005).

A Administração de Segurança e Saúde Ocupacional Norte Americana (OSHA, do inglês *Occupational Safety and Health Administration*) regula o limite de 5 ppm de HCl no ambiente de trabalho de uma usina termelétrica (OSHA, 1991).

Apesar de órgãos brasileiros, como o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), apresentar resoluções de controle de poluentes emitidos por fontes fixas, não foram encontrados valores máximo permitidos para compostos clorados (BRASIL, 2002).

### 3.2.1.5 Determinação de cloro

Os métodos analíticos, encontrados na literatura, utilizados para a determinação de cloro podem ser divididos em métodos clássicos (volumetria, gravimetria ou colorimetria) e métodos instrumentais de análise.

Apesar dos métodos clássicos apresentarem adequada exatidão e precisão, possuem baixa sensibilidade e são limitados ao tipo de amostra. Dessa maneira, os mesmos se tornam mais utilizados em amostras que sejam compatíveis com o método e que possuam um elevado teor do analito (porcentagem) (SKOOG, 2006).

Os métodos instrumentais de análise possibilitam uma alta sensibilidade, fazendo com que diversos elementos sejam quantificados a níveis cada vez menores utilizando pouco volume/massa de amostra. Apesar de possuir um maior custo, sua rapidez, sensibilidade, exatidão, precisão e versatilidade de amostra (sólida ou líquida) são fatores que fazem com que estes tipos de métodos analíticos sejam mais investigados em pesquisas científicas.

Métodos como Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) (NAKATA et al., 2015; PEREIRA et al., 2009), Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) (ANTES et al., 2013; BARBOSA et al., 2013), Cromatografia iônica (PENG et al., 2012; WANG; MAKISHIMA; NAKAMURA, 2009), Análise por ativação com nêutrons (SEKIMOTO; EBHARA, 2016), Espectrometria de fluorescência de raio-x (DOYLE et al., 2011, 2013; DHARA et al., 2012), Potenciometria (DZIUBANIUK et al., 2012; MURTHY et al., 2010), Amperometria (MUÑOZ; CÉSPEDES; BAEZA, 2015; OLIVÉ-MONLLAU et al., 2010) e Voltametria (SAPUTRO et al., 2010) são descritos na literatura para a determinação de cloro.

A absorção atômica utilizando atomização por forno de grafite (GF AAS, do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) possui adequada sensibilidade e relativo baixo custo. Porém, a determinação direta de cloro pela técnica de absorção atômica é possível, uma vez que a linha de absorção atômica deste elemento localiza-se no ultravioleta no vácuo.

Com o surgimento de um equipamento mais moderno de absorção atômica e molecular, o HR-CS MAS, surge a concreta possibilidade de determinação de não metais, uma vez que a possibilidade de escolha do comprimento de onda dentro do intervalo de comprimento de onda fornecido pela lâmpada de arco curto de xenônio (190 a 900 nm) que permite a determinação indireta do não metal através da formação de moléculas diatômicas do mesmo (RESANO; RUIZ, 2011).

A formação de moléculas diatômicas apresenta maior interferência espectral e não-espectral quando comparada a atômica, uma vez que a espécie a ser formada precisa ser estável em altas temperaturas. Além disso, outras espécies presentes na amostra podem competir com o átomo formador da molécula, ocorrendo principalmente em amostras sólidas. A fim de minimizar este comportamento, moléculas com elevado valor de energia de ligação são comumente utilizadas.

A absorção molecular de InCl foi relatada na literatura primeiramente por Haraguchi e Fuwa em 1975 (HARAGUCHI; FUWA, 1975) utilizando LS FAAS (do inglês, *Line Source Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e, posteriormente, utilizando a técnica de HR-CS MAS por Huang e colaboradores em 2006 (HUANG et al., 2006A). Ambos utilizavam como atomizador, chama composta de ar/acetileno. As amostras utilizadas por Huang e colaboradores foram leite em pó, que foram totalmente dissolvidas em água e sedimentos marinhos, que foram decompostos com ácido nítrico. O principal interferente neste trabalho foi o flúor, que pode diminuir o sinal analítico da molécula alvo pela competição na formação de InF. Isso pode ser explicado pela energia de formação das moléculas diatômicas que são para o InCl o valor de  $439 \pm 8 \text{ KJ mol}^{-1}$  e para InF de  $506 \pm 14,6 \text{ KJ mol}^{-1}$ .

A molécula de AlCl foi escolhida em trabalhos posteriores (HEITMANN et al., 2006; FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012) por possuir maior energia de ligação ( $511 \text{ KJ mol}^{-1}$ ), por apresentar estreitas bandas de absorção e isoladas umas das outras, possibilitando a correção espectral. Ambos os trabalhos utilizaram forno de grafite como atomizador e decomposição ácida para as amostras.

No primeiro trabalho (HEITMANN et al., 2006), a presença de cobalto teve que ser evitada a fim de diminuir a sua sobreposição e interferência espectral. Já no

trabalho mais recente, a presença do modificador Al-Ag-Cl também deve ser evitada com o mesmo propósito.

Pereira e colaboradores (2014) propuseram a determinação de cloro via SrCl, que apresenta energia de ligação relativamente alta  $409 \text{ KJ mol}^{-1}$  (PEREIRA et al., 2014). Os autores relatam ainda que para as moléculas InCl e AlCl, por possuírem comprimentos de onda muito próximos (267,24 e 261,42 nm, respectivamente), pode ocorrer a sobreposição de linhas. Além disso, aplicaram o método proposto em análise direta de sólidos, mostrando insignificativas interferências espectrais e não espectrais.

Porém, mesmo que a molécula alvo esteja bem definida e isolada de outras possíveis espécies, a não-interferência de outros elementos é difícil de ser totalmente assegurada em absorção molecular, uma vez que a composição das amostras pode variar significativamente.

Como por exemplo, o trabalho de Nakadi, e colaboradores de 2015 (NAKADI et al., 2015) relata a interferência significativa de cálcio na formação de AlCl ( $511 \text{ KJ mol}^{-1}$ ). Apesar da molécula CaCl ter uma energia de dissociação de ligação menor ( $409 \pm 8,7 \text{ KJ mol}^{-1}$ ), a presença comum deste analito, em grandes quantidades e em diferentes tipos de amostras, faz com que sua formação seja favorecida em comparação a outras moléculas já propostas. Isso se deve a uma população significativa de átomos de cálcio presente na fase gasosa, podendo assim competir para a formação da molécula diatômica de cloro e diminuir a sensibilidade da molécula estudada.

Dessa maneira, este trabalho propõe a utilização da molécula CaCl para a quantificação de cloro, uma vez que o elemento cálcio é comumente encontrado em elevadas concentrações em diversas amostras e também pode atuar como interferente em outras espécies de moléculas diatômicas de cloro.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Equipamento

Todas as medidas de absorção molecular foram realizadas em um espectrômetro de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (AnalytikJena®, Alemanha). A fonte de emissão é composta de uma lâmpada de arco curto de xenônio (GLE, Berlim, Alemanha), operando em modo “*hot-spot*”. O sistema também inclui um duplo monocromador (prisma como pré-monocromador associado a um monocromador de alta resolução com rede de *echelle*) e um detector CCD, atuando como detector. Este detector possui 588 *pixels*, sendo 200 deles usados com finalidade analítica e o restante utilizado para correções internas do equipamento.

O atomizador utilizado foi o forno de grafite para análise direta de sólidos, aquecido transversalmente, e sem o orifício dosador (AnalytikJena®, *part number* 407-A81.303). Os fornos e plataformas para análise de sólidos utilizadas (AnalytikJena®, *part number*, 407-152.023) são recobertos piroliticamente.

As plataformas foram inseridas ao forno de grafite através do amostrador sólido automático (AnalytikJena®, SSA 600), que também possui uma microbalança (Sartorius M2P, Gotinga, Alemanha) com precisão de 0,001 mg.

O gás argônio utilizado como gás de proteção e purga possui pureza de 99,999% (Praxair, Zaragoza, Espanha). A quantificação do sinal analítico foi realizada através da medida de absorvância proveniente da área do pico, considerando  $CP \pm 1$ .

#### 3.3.2 Reagentes e soluções

A fim de evitar contaminação, a água de elevada pureza utilizada em todas as soluções foi fornecida pela Fluka (*Trace Selec Ultra*, nível de cloro inferior a  $1 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ , Fluka, Buchs, Suíça).

Os padrões de cloro foram preparados através da devida diluição da solução estoque de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  (NaCl em água, Darmstadt, Merck, Alemanha) em água ultrapura. A solução de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de cálcio, utilizada como reagente formador da molécula diatômica, foi preparada através da pesagem de quantidade adequada do sal de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemanha) e dissolvida em água de elevada pureza (Fluka, Buchs, Suíça).

Para a realização das medidas comparativas e formação da molécula de SrCl, o reagente formador da molécula diatômica foi preparado pesando adequada massa de  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  (Merck, Alemanha), o qual foi dissolvido em água de elevada pureza (Fluka, Buchs, Suíça) para a obtenção da solução de concentração  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de Sr.

Nas duas situações, o emprego de paládio (na forma de nitrato) foi investigado como possível modificador químico. Esta solução foi preparada através da adequada diluição da solução estoque de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de paládio ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  em 15% de ácido nítrico, Merck, Alemanha), para a concentração final de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ .

Além disso, soluções de nanopartículas dispersas de paládio e platina foram também investigadas como possíveis modificadores químicos. A solução de nanopartículas de paládio tem sua síntese descrita na literatura (RESANO; FLÓREZ, 2012) e foi reproduzida para a utilização neste trabalho com concentração final de  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$  e tamanho de 20 nm. A solução de nanopartículas de platina foi adquirida da Nanocomposix (San Diego, Estados Unidos) com concentração de  $1,07 \text{ g.L}^{-1}$  e tamanho de 5 nm.

Ainda, somente para a formação de SrCl foi utilizado Zr como modificador químico permanente, através da utilização da solução de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de Zr (Merck, Alemanha), sendo adicionado um total de 400  $\mu\text{g}$  de Zr em cada plataforma, em procedimento descrito por Pereira e colaboradores em 2014 (PEREIRA et al., 2014).

### 3.3.3 Amostras

Oito materiais de referência certificados, de diferentes naturezas e com quantidade de cloro compatíveis com a faixa de trabalho das linhas de absorção de

CaCl, foram selecionados, sendo elas: a amostra de carvão betuminoso (SRM 2692c, *Bituminous Coal*), folha de pinheiro (SRM 1575, *Pine needles*), farinha de arroz (SRM 1568b, *Rice flour*) e leite em pó sem gordura (SRM 1549, *Non-fat milk powder*), todas provenientes do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, Estados Unidos), carvão (CRM BCR 460, *Coal*) e Polietileno (ERM EC681, *Polyethylene*) provenientes do Instituto de materiais de referência e medidas (*European Commission, Joint Reserch Centre, Institute for Reference Materials and Measurements*, Bruxelas, Bélgica), cabelo humano (CRM NCS ZC 81002b, *Human Hair, BeijingChina*) proveniente do Centro Nacional de Análises para Ferro e Aço (do inglês, *National Analysis Centre for Iron and Steel*) e Óxido de ferro (III) ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , CRM 686-1, Düsseldorf, Alemanha) proveniente do Comitê Europeu para Ferro e Aço (do inglês, *European Committe for Iron and Steel Standardization*). Os detalhes da constituição das amostras são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Detalhes da composição dos materiais de referência certificados utilizados neste trabalho para a determinação de cloro, utilizando CaCl e SrCl em HR-CS GF MAS.

Referência	Tipo de amostra	Conteúdo certificado de Cl ( $\text{ng.mg}^{-1}$ )	Conteúdo certificado de Ca (% m/m)
NCS ZC 81002b	Cabelo humano	48,2*	0,1537 ± 0,0068
CRM BCR 460	Carvão	59 ± 18	-
ERM EC681	Polietileno	92,9 ± 2,8	-
SRM 1575	Folha de pinheiro	293 ± 20	0,41 ± 0,02
SRM 1568b	Farinha de arroz	301,1 ± 3,8	0,012 ± 0,00031
CRM 686-1	Óxido de ferro	950 ± 60	0,0097 ± 0,0007
SRM 2692c	Carvão betuminoso	1338 ± 22	-
NIST SRM 1549	Leite em pó sem gordura	10900 ± 200	1,30 ± 0,05

\* valor informativo

### 3.3.4 Procedimento para a análise de cloro por HR-CS GF MAS

A otimização das condições e parâmetros experimentais, juntamente com as características de cada linha de absorção, são mostradas em detalhes na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para a determinação de cloro utilizando HR-CS GF MAS em amostras sólidas certificadas.

(continua)

	CaCl		SrCl	
Transições eletrônicas (faixa de comprimento de onda)	X <sup>2</sup> Σ <sup>+</sup> →C <sup>2</sup> Π (364 – 402 nm) X <sup>2</sup> Σ <sup>+</sup> →A <sup>2</sup> Π (604 – 636 nm)		X <sup>2</sup> Σ <sup>+</sup> →B <sup>2</sup> Σ <sup>+</sup> (646 – 689 nm)	
Comprimento de onda do <i>pixel</i> central (amostras analisadas em cada comprimento de onda)	377,501 nm (SRM 1575, CRM 686-1, SRM 2692c, SRM 1549) 620,862 nm (NCS ZC 81002b, BCR 460, ERM EC681, SRM 1568b)		635,862 nm (SRM 1575, SRM 1568b, SRM 1549)	
<i>Pixels</i> somados por linha (resolução)	3 (~2,20 pm para 377,501 nm; ~4,00 pm para 620,862 nm)		3 (~4,15 pm)	
Reagente formador da molécula	Ca (400 µg)		Sr (100 µg)	
Modificadores químicos	Pd (como nitrato - 20 µg)		Zr (permanente - 400 µg) + Pd (como nitrato - 20 µg)	
Faixa de massa de amostra analisada diretamente como sólido (mg)	SRM 2692c	0,25 – 0,60	SRM 1575	0,15 – 0,30
	BCR 460	0,25 – 0,60	SRM 1568b	0,20 – 0,35
	NCS ZC 81002b	0,20 – 0,50		
	SRM 1575	0,50 – 0,70		
	SRM 1568b	0,15 – 0,30		
	ERM EC681	0,25 – 0,50		
	CRM 686-1	0,30 – 0,50		

Tabela 3 – Parâmetros instrumentais para a determinação de cloro utilizando HR-CS GF MAS em amostras sólidas certificadas.

(continuação)

Programa de Temperatura				
Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Fluxo de gás Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	30	20	2,0
Secagem	110 <sup>a</sup> /130 <sup>b</sup>	30	20	2,0
Pirólise	700 <sup>a</sup> /600 <sup>b</sup>	50	10	2,0
Vaporização	2200 <sup>a</sup> /2300 <sup>b</sup>	3000	10	0
Limpeza	2600	100	4	2,0

<sup>a</sup>CaCl / <sup>b</sup>SrCl

A otimização deste método foi realizada em duas etapas, sendo a primeira dedicada a molécula CaCl e suas características e a segunda a molécula SrCl, já descrita na literatura, para comparação dos resultados obtidos.

Para a determinação de cloro utilizando CaCl, realizou-se a curva de calibração com padrão líquido de cloro, em concentrações de acordo com a linha e sensibilidade requerida pela amostra. Como mostra a Tabela 1 e 2, as amostras que possuem uma concentração de cloro acima de 900 ng.mg<sup>-1</sup> foram analisadas utilizando o comprimento de onda menos sensível, 377,501 nm. Porém, quando a quantidade de cloro é pequena, o comprimento de onda escolhido foi então o mais sensível, 620,862 nm. A discussão mais aprofundada sobre as características destas linhas é realizada no item 3.4.1.1.

Depois de definido o comprimento de onda mais adequado para a amostra, as curvas de calibração foram realizadas através da medida de um branco e cinco concentrações crescentes dos padrões de cloro, em triplicata. A faixa utilizada para a linha 377,501 nm foi de 100 a 800 ng e para a linha 620,862 nm foi de 20 a 100 ng. Juntamente com cada padrão, foram adicionados 10 µL (400 µg) de cálcio como reagente formador da molécula diatômica e 10 µL (20 µg) do modificador químico de paládio, diretamente sobre a plataforma de sólido e transportado até o forno de grafite pelo amostrador automático. O programa de temperatura apresentado na Tabela 2 foi aplicado e o sinal registrado. Após ser construída a curva de calibração,

a plataforma vazia foi introduzida na microbalança para tarar, e então a plataforma foi levada novamente até a posição inicial pelo par de pinças do amostrador de sólidos, onde uma quantidade apropriada de amostra foi introduzida na mesma. Depois disso, a plataforma foi levada novamente até a microbalança para verificação e posterior ajuste de massa. Depois de ajustada a massa da amostra, foi adicionada sobre a mesma o formador de molécula (400 µg de cálcio) e o paládio como modificador químico. Em seguida, a plataforma e seus componentes foram levados até o forno de grafite e o mesmo programa de temperatura realizado na curva de calibração foi aplicado e o sinal registrado. Em todas as análises, a absorvância integrada foi selecionada como modo de registro de sinal, ou seja, a soma dos sinais de 3 *pixels* (o central e mais dois adjacentes a este,  $CP \pm 1$ ) foram considerados como resultado analítico para cada análise, independente da linha ou molécula.

Para a amostra de leite em pó sem gordura (SRM 1549), foi realizada uma suspensão através da homogeneização com água ultrapura em banho de ultrassom durante 1 minuto. Essa suspensão foi adicionada na plataforma, vazia e já tarada, juntamente com o cálcio e o paládio, sendo levada até o forno de grafite e aplicado o mesmo programa de temperatura das amostras sólidas e padrões aquosos.

Para cada amostra, foram analisadas cinco replicatas e a mediana dos resultados foi considerada como valor representativo (BELARRA; RESANO; CASTILLO, 1999; 1995).

Já para o estudo comparativo utilizando a molécula de SrCl, foi utilizado o trabalho descrito por Pereira e colaboradores (2014) como base (PEREIRA et al., 2014). Assim como descrito neste trabalho, somente foi encontrada uma faixa de comprimentos de onda onde foram observados sinais de absorção molecular, sendo o 635,862 nm o comprimento de onda pertencente ao *pixel* central desta zona.

Sendo assim, as plataformas foram recobertas com Zr como modificador químico permanente. Para tal, 40 µL de uma solução de 1 g.L<sup>-1</sup> foram adicionadas sobre a plataforma vazia e submetidas a tratamento térmico, onde o programa de temperatura utilizado está descrito no mesmo trabalho. Esse procedimento foi realizado 10 vezes, totalizando uma massa de 400 µg.

Juntamente com os padrões de cloro, foi adicionado à plataforma 10  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{g}$ ) da solução de estrôncio como reagente formador de molécula e 10  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}$ ) de paládio como modificador químico. O programa de temperatura descrito na Tabela 2 foi aplicado. Da mesma forma que a molécula anterior, três replicatas de cada ponto da curva de calibração (branco + 5 concentrações crescentes) foram realizadas e a absorvância integrada foi registrada, também com  $\text{CP} \pm 1$ .

As duas amostras sólidas escolhidas para análise comparativa foram aquelas que apresentaram valores relativamente altos de cálcio em sua constituição, sendo a folha de pinheiro - SRM 1575 e farinha de arroz - SRM 1568b.

Do mesmo modo, as amostras foram introduzidas na plataforma de sólidos, vazia e tarada, adicionados de 100  $\mu\text{g}$  de estrôncio e 20  $\mu\text{g}$  de paládio. O mesmo programa de temperatura aplicado aos padrões e descrito na Tabela 2 foi realizado. Para cada determinação, foram analisadas cinco repetições, e a mediana dos resultados foi considerada como valor representativo.

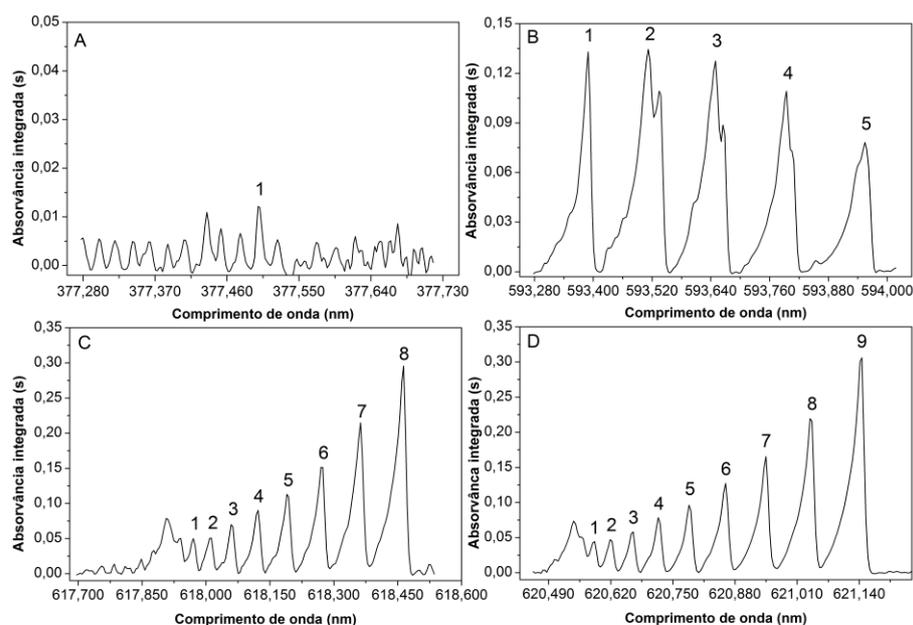
### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.4.1 Otimização das condições experimentais

##### 3.4.1.1 Investigação das linhas de absorção de $\text{CaCl}$

A literatura clássica apresenta diversas bandas de absorção da molécula de  $\text{CaCl}$ , na região do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (PEARSE; GAYDON, 1976). Dessa maneira, buscou-se o monitoramento de bandas de absorção dessa molécula nessas regiões, utilizando HR-CS GF MAS, para melhor compreensão do comportamento e características de cada uma delas, apresentadas a seguir pela Figura 1.

Figura 1 – Espectros de absorção molecular para as 4 regiões espectrais mais intensas da molécula de CaCl. Todos os espectros foram obtidos pela vaporização de 100 ng de Cl (na forma de NaCl) + 20 de  $\mu\text{g}$  Pd (na forma de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  em 15% de ácido nítrico) e 400  $\mu\text{g}$  Ca (na forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela 2.



Os espectros da Figura 1, foram registrados utilizando 100 ng de Cl, na forma de solução de NaCl, juntamente com 20  $\mu\text{g}$  de Pd, na forma de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  em 15% de ácido nítrico e 400  $\mu\text{g}$  Ca, na forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 2. As janelas espectrais foram centradas de forma que a visualização permitisse a melhor visão do ambiente molecular em cada um dos casos.

Em todas as janelas espectrais da Figura 1, as estruturas de linhas rotacionais finas pertencem a banda vibracional  $\Delta v=0$ , com transição eletrônica  $X^2\Sigma \rightarrow C^2\Pi$  para a banda de absorção na região do ultravioleta ( $\lambda_{\text{máximo}}= 377,501$  nm),  $X^2\Sigma \rightarrow B^2\Sigma$  para a banda da região laranja ( $\lambda_{\text{máximo}}= 593,390$  nm) e  $X^2\Sigma \rightarrow A^2\Pi$  para as duas bandas nas regiões do vermelho ( $\lambda_{\text{máximo}}= 618,464$  nm e  $\lambda_{\text{máximo}}= 621,146$  nm).

As estruturas simples, finas e bem resolvidas apresentadas por esta molécula fazem com que o processo de definição de linha base se torne mais fácil

do que em moléculas que apresentam linhas mais largas (ARAMENDÍA et al., 2011; NAKADI et al., 2015).

Além disso, os três sistemas de transições eletrônicas apresentam diferentes sensibilidades, o que agrega uma característica interessante ao método de análise de sólidos, uma vez que amplia a possibilidade de aplicação para um maior número de amostras, que possuem diferentes concentrações de cloro (RESANO et al., 2011).

Após a análise de cada janela espectral, as bandas de absorção de cada linha dentro desse intervalo são registradas simultaneamente no *software* do equipamento, permitindo a análise individual das linhas após a medida, sem a necessidade de repetição de análise. Essa opção agrega características interessantes, como a possibilidade da soma de vários picos com sensibilidade semelhante para a melhoria do limite de detecção ou então, a ampliação da faixa linear através da seleção de uma linha menos sensível. Para a molécula de CaCl, ambas as possibilidades foram utilizadas.

Como se pode observar na Figura 1, as três janelas espectrais, representadas pelas letras B, C e D apresentam linhas com diferentes sensibilidades, numeradas de acordo com a ordem de surgimento. Já a janela espectral representada pela letra A, apresenta somente uma linha de absorção muito pouco sensível que pode ser usada. Para todas estas linhas (ou combinações delas), foram calculadas as massas características, faixas lineares e limite de detecção e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.

A massa característica, que é definida como a massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância x tempo com área integrada de 0,0044s, foi calculada como 0,0044 dividido pela inclinação da curva de calibração (BEATY; KERBER, 1993). O limite de detecção (LOD, do inglês Limit Of Detection) foi calculado como três vezes o desvio padrão do branco (n=10) dividido pela inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

Tabela 4 – Características das linhas rotacionais da molécula de CaCl, sob condições apresentadas na Tabela 2. As faixas de comprimento de onda (A, B, C e D) e os números dos picos entre parênteses são baseados na Figura 1.

Faixa de comprimento de onda	Comprimento de onda (nm) (pico)	Massa característica (ng)	Faixa linear (ng)	Limite de detecção (ng)
A	377,501 (1)	25,9	até 860	14,2
	593,390 (1)	0,759	até 200	4,9
B	593,512 (2)	1,02	até 200	4,8
	593,650 (3)	0,846	até 200	5,5
	593,795 (4)	1,26	até 200	6,5
	593,954 (5)	1,76	até 200	7,8
	617,970 (1)	2,59	até 300	14,2
C	618,012 (2)	2,44	até 300	7,0
	618,059 (3)	1,63	até 300	4,9
	618,122 (4)	1,19	até 300	5,7
	618,190 (5)	1,05	até 300	8,7
	618,274 (6)	0,772	até 300	5,8
	618,363 (7)	0,595	até 300	4,7
	618,464 (8)	0,436	até 300	5,3
	D	620,587 (1)	3,38	até 300
620,623 (2)		2,32	até 300	7,2
620,667 (3)		1,76	até 300	2,5
620,719 (4)		1,33	até 300	6,7
620,788 (5)		1,07	até 300	2,2
620,862 (6)		0,800	até 300	2,6
620,945 (7)		0,677	até 300	3,9
621,041 (8)		0,524	até 300	3,2
621,146 (9)		0,400	até 300	2,7
(7)+(8)+(9)		0,072	até 300	0,75

Como é possível observar, a janela espectral que possui as linhas mais sensíveis é a D ( $\lambda_{\max} = 621,146$  nm) e proporciona os melhores limites de detecção, na faixa de 2 a 3 ng para as linhas mais sensíveis. Isso pode ser melhorado combinando os sinais das linhas mais sensíveis, como mostra a última linha da Tabela 3. O limite de detecção obtido pela combinação é de 0,75 ng, valor bem

menor quando consideramos o valor individual de uma das linhas mais sensíveis: 2,7 ng.

Os valores de limite de detecção vão ao encontro dos relatados na literatura, como para a molécula de AlCl investigada por Fechetia, em 2012 (1,2 ng) (FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012). Já para a molécula de SrCl, Pereira e colaboradores reportaram valores de 1,0 ng em 2014 (PEREIRA et al., 2014) e 0,85 ng em 2015 (PEREIRA et al., 2015).

Contrário ao comportamento esperado, a seleção de uma linha menos sensível não resultou em uma extensão da faixa linear, sendo obtido para todos os picos o mesmo valor superior: 200 ng para a janela espectral B ( $\lambda_{\text{máximo}}= 593,390$  nm), 300 ng para C e D ( $\lambda_{\text{máximo}}= 618,464$  nm e  $621,146$  nm, respectivamente). A janela espectral A, que possui apenas uma linha de absorção útil ( $\lambda_{\text{máximo}}= 377,501$  nm) foi a que apresentou uma maior faixa linear, chegando a 860 ng. A perda da linearidade se deve, muito provavelmente, a perda da eficiência na formação da molécula de CaCl em altas concentrações de cloro, isto é, por razões mais químicas do que espectroscópicas.

#### 3.4.1.2 Cálcio e modificadores químicos

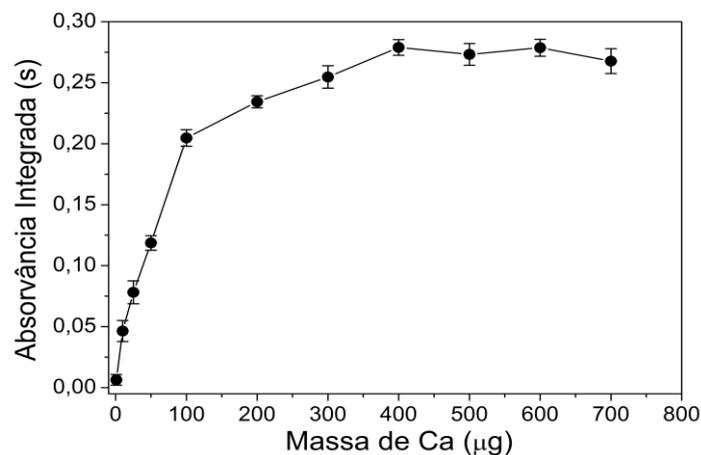
Com o objetivo de atingir as melhores condições para a formação da molécula de CaCl, utilizando HR-CS GF MAS, todos os experimentos realizados na otimização utilizaram soluções aquosas de cloro, proveniente de NaCl, com monitoração da linha de absorção de 620,860 nm, uma das mais sensíveis para esta molécula.

O primeiro parâmetro a ser otimizado foi a massa de cálcio adicionada ao forno de grafite, para a formação de CaCl. Este, precisa estar presente em excesso, a fim de garantir o ambiente reacional propício para a formação da espécie molecular (CaCl), e também para que a variação do sinal analítico seja, unicamente, correspondente a variação de cloro, e não a quantidade de cálcio presente na amostra.

Para tal, 40 ng de cloro foram vaporizados juntamente com massas crescentes de cálcio adicionadas ao forno de grafite, na presença de 20  $\mu\text{g}$  paládio como modificador químico. A Figura 2 mostra a absorvância integrada para cloro em

função da variação de massa de cálcio, que apresenta uma relativa estabilidade de sinal para massas de cálcio superiores a 400  $\mu\text{g}$ .

Figura 2 – Otimização da quantidade de cálcio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 40 ng de Cl (como NaCl), com a adição de 20  $\mu\text{g}$  paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 620,862 nm de CaCl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas.



Antes de selecionar 400  $\mu\text{g}$  de Ca como massa otimizada, o mesmo experimento foi realizado para a linha menos sensível, 377,501 nm, utilizando 400 ng de cloro, uma vez que as duas linhas serão utilizadas para a determinação de cloro em amostras sólidas. Resultados semelhantes foram encontrados para ambas as linhas e a massa de 400  $\mu\text{g}$  de cálcio foi finalmente selecionada para todos os experimentos realizados a seguir.

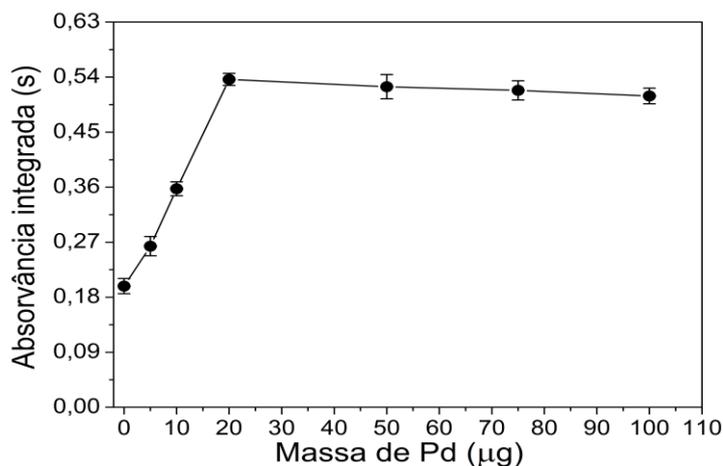
O segundo passo foi a seleção de um modificador químico que proporcionasse maior estabilidade de formação da molécula diatômica. De fato, outros trabalhos na literatura relatam que a presença de um adequado modificador químico é essencial para o aumento da estabilidade molecular durante as etapas de pirólise e vaporização. Com base nisso, foi investigado o modificador permanente, zircônio (PEREIRA et al., 2014) e modificadores químicos em solução, como o estrôncio (HEITMANN et al., 2006) e a mistura de prata e estrôncio (FECHETIA; TOGNON; VEIGA, 2012).

Alguns autores preferem a utilização de um modificador permanente, baseado na simplificação e rapidez de análise. Neste trabalho em particular, devido a necessidade de se adicionar Ca como agente formador da molécula, tanto nos padrões aquosos como nas amostras sólidas, a adição de mais um componente (modificador químico) não foi considerado uma complicação dentro do protocolo de análise. Além disso, o modificador permanente zircônio não proporcionou melhorias no sinal analítico, nem aumento de vida útil do forno de grafite. Dessa maneira, somente a utilização de modificadores químicos em solução foi considerada.

Levando em consideração a experiência positiva com metais do grupo da platina como modificadores para absorção molecular pelo grupo de pesquisa em que este trabalho foi desenvolvido (Universidade de Zaragoza, Espanha), Paládio (na forma de nitrato e nanopartículas) e platina (nanopartículas), sendo 20 µg a massa de teste para todos os modificadores químicos. Embora as adições destes modificadores proporcionassem picos bem definidos e semelhante estabilização molecular, o paládio em forma de nitrato foi selecionado como a melhor opção, devido ao menor ruído de linha base. O ruído da linha base apresentado pelas nanopartículas são provavelmente provenientes de alguma contaminação de um dos reagentes utilizados na sua síntese (RESANO; FLÓREZ, 2012).

Dessa maneira, a massa de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foi otimizada e os dados são apresentados na Figura 3. Esta figura mostra a absorvância integrada da análise de 40 ng de Cl, na presença de 400 µg de Ca e massas crescentes de paládio.

Figura 3 – Otimização da quantidade de paládio adicionada a 40 ng de Cl (como NaCl), com a adição de 400 µg de Ca como reagente formador da molécula, monitorando a linha de absorção molecular de 620,862 nm de CaCl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas.



Como pode ser visto na Figura 3, os melhores resultados foram obtidos a partir de uma quantidade de 20 µg de Pd adicionado a plataforma.

O mesmo estudo foi realizado para a linha menos sensível, 377,501 nm, utilizando as mesmas condições e resultados semelhantes foram encontrados.

Dessa maneira, a otimização da quantidade de cálcio resultou em uma massa de 400 µg e para paládio uma massa de 20 µg e essas quantidades foram utilizadas em todos os experimentos relatados a seguir.

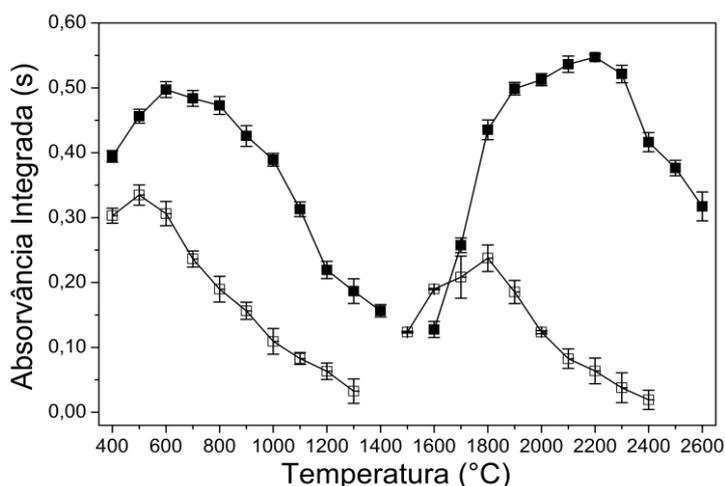
#### 3.4.1.3 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização

Assim como os modificadores, a adequada escolha de temperatura de pirólise e vaporização é uma etapa fundamental do processo de otimização. A adequada temperatura de pirólise proporciona a separação do analito dos possíveis contaminantes e matéria orgânica antes do processo de formação da molécula, na etapa de vaporização. Dessa forma, a escolha da temperatura de pirólise deve ser aquela que seja alta o bastante para proporcionar a eliminação dos interferentes, mas não tão alta que o analito seja volatilizado. De forma análoga, a temperatura de

vaporização deve respeitar a temperatura adequada em que a molécula diatômica seja formada, não podendo ser demasiadamente alta, a ponto de proporcionar o rompimento da mesma.

Por conta disso, curvas de pirólise e vaporização foram construídas a fim de elucidar o comportamento térmico da molécula, na presença e ausência de modificadores químicos. A Figura 4 apresenta estas curvas para 40 ng de Cl com mais 400  $\mu\text{g}$  de Ca, ambos com e sem a adição de Pd como modificador químico, monitorando a linha de absorção molecular para CaCl, 620,862 nm.

Figura 4 – Curvas de pirólise e vaporização obtidas através da análise de 40 ng de Cl com 400  $\mu\text{g}$  de Ca, com a adição de 20  $\mu\text{g}$  de Pd (■) ou sem a adição de modificador químico (□), monitorando a linha de absorção molecular para CaCl, 620,862 nm. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas.



Como pode ser visto na Figura 4, na etapa de pirólise, a adição de paládio como modificador químico proporcionou duas melhorias. A primeira em relação a intensidade de sinal, que melhora consideravelmente em toda a faixa de temperatura utilizada, e a segunda em relação a estabilidade de formação proporcionada até os 900 °C.

Na etapa de vaporização, as mesmas melhorias são observadas, sendo que na curva que utiliza paládio como modificador químico os valores máximos de absorvância são encontrados na zona de 2000 °C a 2300 °C e para a curva que não

utiliza paládio, o valor máximo é encontrado em 1800 °C. Como não há diferença significativa entre os perfis temporais dos sinais em nenhuma dessas temperaturas, o valor de 2200 °C, utilizando paládio como modificador químico, foi selecionado e utilizado em todas as análises a seguir. Já para a etapa de pirólise, a temperatura escolhida foi de 700 °C, que permitiu a adequada decomposição da matéria orgânica para todas as amostras utilizadas neste trabalho.

A escolha de uma temperatura baixa de pirólise possui benefícios em relação ao número de queimas da plataforma e forno de grafite, uma vez que o mesmo já é reduzido pela alta concentração necessária do agente formador da molécula. Utilizando este método, cada forno de grafite e plataforma proporcionou cerca de 200 a 250 ciclos de aquecimento.

Resíduos na plataforma de sólidos somente foram observados para as amostras de carvão e óxido de ferro. A remoção dos resíduos manualmente foi o suficiente para garantir a boa reprodutividade.

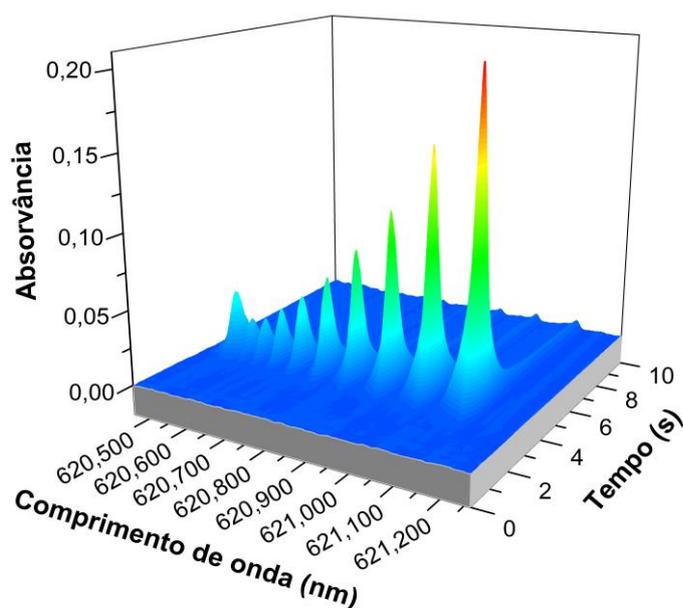
### **3.4.2 Análise direta em amostras sólidas usando CaCl**

Após a otimização do método, realizou-se a aplicação do mesmo nas amostras certificadas apresentadas na Tabela 1. Esta parte do trabalho busca a determinação da exatidão para amostras sólidas, sendo somente a mostra de leite em pó sem gordura analisado na forma de suspensão aquosa devido ao seu alto teor de cloro.

A seleção das linhas a serem utilizadas em cada amostra foi baseada na quantidade de cloro esperada em cada uma delas. Portanto, a linha mais sensível (D,  $\lambda_{\text{máximo}} = 621,146$  nm) foi utilizada para amostras que continham uma concentração baixa de cloro. Por conveniência e por apresentarem LOD semelhantes, a linha de 620,862 nm (pico 6 da Figura 1) foi utilizada para as determinações que requeriam maior sensibilidade. Para o restante das amostras, a linha menos sensível 377,501 nm foi utilizada. Além disso, as massas das amostras sólidas foram adaptadas (ver Tabela 2) para adequar a intensidade do sinal em cada faixa linear.

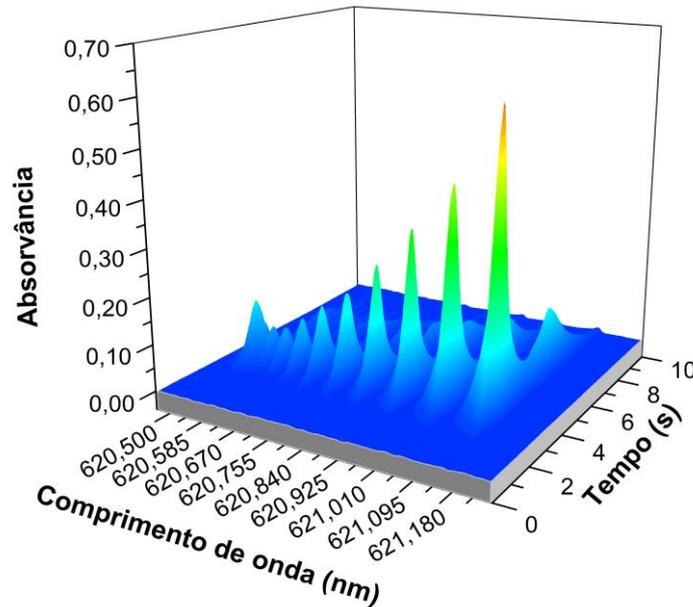
A Figura 5 apresenta um exemplo do espectro de absorção molecular, resolvido no tempo, obtido pela formação e vaporização de CaCl, utilizando 0,513 mg da amostra de polietileno (ERM EC 681), no comprimento de onda central de 620,862 nm e sua vizinhança. O sinal proporcionado pela análise direta do sólido para esta amostra é bem definido, e o mesmo comportamento foi alcançado para todas as amostras.

Figura 5 – Espectro de absorção molecular resolvidos no tempo para a molécula de CaCl provenientes da vaporização de 0,513 mg da amostra de polietileno (ERM EC 681), juntamente com 20 µg de Pd e 400 µg de Ca, utilizando o programa de temperatura da Tabela 2. O valor da absorvância integrada para o pico central (620,862 nm) é de 0,5829.



Os sinais obtidos pelos padrões aquosos e amostras apresentaram perfis de sinais muito semelhantes aos da amostra da Figura 5, mas somente para concentrações abaixo de 150 ng de Cl. Acima desta quantidade, os picos começam a apresentar uma cauda ou até mesmo o surgimento de dois picos, como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Espectro de absorção molecular resolvido no tempo para a molécula de CaCl provenientes da vaporização de 200 ng de padrão aquoso de Cl, juntamente com 20 µg de Pd e 400 µg de Ca, utilizando o programa de temperatura da Tabela 2.



Independentemente da forma do pico, os valores das áreas integradas dos padrões aquosos de cloro e dos obtidos pelas amostras sólidas foram sempre comparáveis, assegurando desta forma a quantificação.

Finalmente, os resultados obtidos para a determinação de cloro em oito amostras certificadas, de diferentes naturezas, são apresentados na Tabela 4 e se mostram de acordo com os fornecidos pelos tabelados, além de possuírem valores adequados de desvio padrão relativo para sólidos, ficando entre 5-11% (BELARRA, et al., 2002).

Tabela 5 – Resultados da determinação de Cl em oito materiais de referência certificados utilizando análise direta de sólidos por HR-CS GF MAS (n=5) via CaCl, utilizando 20 µg de Pd, 400 µg de Ca e as condições de temperatura da Tabela 2. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de cinco replicatas.

Material de referência certificado	Conteúdo de cloro		Comprimento de onda (nm)
	Valor certificado (µg g <sup>-1</sup> )	Valor encontrado (µg g <sup>-1</sup> )	
CRM 81002b – Cabelo Humano	48,2*	46,5 ± 3,74	620,862
SRM 1568b – Farinha de arroz	301,1 ± 3,8	294,2 ± 26	
ERM EC681 – Polietileno	92,9 ± 2,8	100,5 ± 7,8	
CRM BCR 460 – Carvão	59 ± 18	42 ± 1,8	377,501
SRM 2692c – Carvão betuminoso	1338 ± 22	1333 ± 85	
SRM 1575 – Folha de pinheiro	293 ± 20	291 ± 16	
CRM 686-1 – Óxido de ferro	950 ± 60	1075 ± 120	
SRM 1549 – Leite em pó**	10900 ± 200	10400 ± 96,8	

\* Valor informativo

\*\* SRM 1549 foi analisado na forma de suspensão aquosa.

Os valores encontrados para a determinação de cloro por HR-CS GF MAS via CaCl nas amostras certificadas apresentadas na Tabela 4, foram verificados pelo Teste t de Student com um nível de confiança de 95% e um grau de liberdade igual a 4. A partir dos resultados encontrados, o valor de  $t_{\text{calculado}}$  para cada uma das amostras, na ordem em que aparecem na Tabela 4, foram: 1,02986, 1,70763, 2,07225, 1,34557, 0,52099, 0,22223, 2,33221 e 2,23607. O valor de  $t_{\text{tabelado}}$  para este intervalo de confiança e grau de liberdade é de 2, 2,2776. Dessa maneira, os valores para a determinação de cloro obtidos utilizando a molécula de CaCl via HR-CS GF MAS para todas as amostras foram considerados estatisticamente semelhantes aos certificados.

### 3.4.3 Comparação das moléculas CaCl e SrCl

Após a otimização e verificação da exatidão do método utilizando a molécula de CaCl para a determinação de cloro, buscou-se o método já descrito na literatura (PEREIRA et al., 2014) que utiliza a molécula de SrCl para fins de comparação. Essa escolha tem como justificativa a investigação da competição de cálcio e estrôncio na formação da molécula diatômica com o cloro, uma vez que a presença de um alto teor de cálcio é comumente encontrada em diversas amostras.

A Tabela 1 apresenta os valores informados para as amostras referentes a quantidade de cloro e cálcio. Dentre as oito amostras, selecionou-se três para a análise comparativa, pois representam três situações analíticas diferentes: uma amostra que apresenta a relação Ca/Cl menor que uma unidade (SRM 1568b – Farinha de arroz), próxima a uma unidade (SRM 1549 – Leite em pó sem gordura) e uma amostra que possui a relação Ca/Cl bem maior que uma unidade (SRM 1575 Folha de pinheiro). Detalhes sobre essas informações podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 6 – Informações sobre a constituição e determinação de cloro em materiais de referência certificados, através da análise direta de sólidos usando HR-CS GF MAS (n=5) através da formação molecular de CaCl e SrCl utilizando as condições da Tabela 2. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de cinco replicatas.

Material de referência certificado	Valor certificado para Cl ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Valor certificado para Ca ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Relação Ca/Cl	Resultados usando CaCl ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Resultados usando SrCl ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
SRM 1568b Farinha de arroz	301,1 $\pm$ 3,8	120 $\pm$ 3,1	0,3985	294,2 $\pm$ 26	306 $\pm$ 44
SRM 1549 Leite em pó	10900 $\pm$ 200	13000 $\pm$ 500	1,9266	10400 $\pm$ 96,8	8920 $\pm$ 630
SRM 1575 Folha de pinheiro	293 $\pm$ 20	4.100 $\pm$ 200	13,9	291 $\pm$ 16	244 $\pm$ 57

Como pode ser visto na Tabela 5, a relação Ca/Cl presente na amostra apresenta uma forte influência nos resultados obtidos nas determinações de cloro usando a molécula de SrCl. A primeira relação Ca/Cl apresentada (Ca/Cl: 0,3985)

mostra resultados semelhantes nos dois métodos. Essa similaridade foi testada com base no Teste t de Student com um nível de confiança de 95% e um grau de liberdade igual a 4, obtendo-se um  $t_{\text{calculado}}$  de 1,70763 e 1,073967 para as moléculas de CaCl e SrCl, respectivamente. O  $t_{\text{tabelado}}$  para os mesmos parâmetros é de 2,776. Dessa maneira, pode-se inferir que os valores são estatisticamente similares aos fornecidos pela certificação das amostras.

Os valores de precisão foram testados com base no teste F, com o mesmo intervalo de confiança ( $F_{\text{calculado}}= 1,73$ ;  $F_{\text{crítico}}=6,388$ ).

A situação muda quando a relação de Ca/Cl aumenta, como para a amostra de leite em pó sem gordura (SRM 1549) que apresenta valor de relação de 1,9266 e para amostra de folha de pinheiro (SRM 1575) de 13,9. A segunda amostra (leite em pó sem gordura - SRM 1549), quando analisada via SrCl apresenta valores mais baixos que o certificado. Após análise estatística utilizando o teste t de Student com nível de 95% do intervalo de confiança e um grau de liberdade igual a 4 apresentou valores de  $t_{\text{calculado}}$  superiores ao  $t_{\text{tabelado}}$ , confirmando a baixa exatidão.

A terceira amostra (folha de pinheiro - SRM 1575), ao utilizar a molécula de SrCl os resultados da avaliação da exatidão pelo teste t de Student, nas mesmas condições da amostra anterior, apresentou um  $t_{\text{calculado}}$  inferior ao  $t_{\text{tabelado}}$ . Porém, sua precisão é significativamente pior que a obtida pelo método utilizando a molécula de CaCl, como mostra o teste F com intervalo de confiança de 95% ( $F_{\text{calculado}}= 7,91$ ;  $F_{\text{crítico}}=6,388$ ).

Estes resultados corroboram com a ideia publicada em trabalhos recentes de que problemas podem ser encontrados na determinação de cloro, ao utilizar HR-CS GF MAS com moléculas como AlCl ou SrCl em amostras com elevado teor de cálcio. (NAKADI et al., 2015)

#### **3.4.4 Parâmetros de mérito**

Os parâmetros de mérito avaliados para a molécula de CaCl, em ambas linhas de absorção (620,862 e 377,501 nm), neste trabalho foram: Faixa linear,

curva de calibração, sensibilidade, LOD e limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*).

A faixa linear é o parâmetro de um método analítico que busca o intervalo de concentração onde a resposta analítica do equipamento, neste caso absorção molecular, seja diretamente proporcional a concentração do analito ( $r \geq 0,90$ ). (INMETRO, 2003) Esta faixa possui como limite inferior o limite de quantificação e o superior a quantidade máxima que proporciona um coeficiente de  $r \geq 0,90$ .

A curva de calibração representa matematicamente a relação entre a resposta do equipamento com a concentração conhecida do analito. A mesma deve incluir a análise de um branco e no mínimo mais 5 pontos com níveis de concentração crescentes do analito. A equação da reta que relaciona estas duas variáveis é representada pela equação 1:

$$y = ax + b$$

Equação 1

Onde  $y$  representa a resposta do equipamento (valores de absorção molecular de CaCl),  $a$  representa a inclinação da curva analítica (sensibilidade),  $x$  é a concentração do analito e  $b$  representa a intersecção com o eixo  $y$  ( $x = 0$ ). Quanto maior o valor da inclinação, mais sensível é o método, pois pequenas variações na concentração resultam em uma maior variação da resposta do equipamento.

O coeficiente de correlação linear ( $R$ ) é frequentemente usado para indicar o quanto a reta de calibração pode ser adequada como modelo matemático para o método desenvolvido (INMETRO, 2003). Quanto mais próximo de 1,0 menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e, portanto, menor a incerteza. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2003) recomenda um coeficiente de correlação no mínimo igual a 0,99 e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90.

O LOD pode ser definido como a quantidade mínima detectável, com uma determinada certeza analítica. O LOD para o equipamento é determinado como a menor quantidade do analito que pode ser diferenciado do ruído do sistema, com uma segurança estatística. O cálculo do LOD foi realizado através de 10 medidas do

branco (mesmo branco utilizado na curva de calibração) e aplicado a Equação 2 (BRASIL, 2003):

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{DP}}{\text{IC}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, DP representa o desvio padrão das 10 medidas do branco e IC representa o coeficiente angular da curva de calibração, ou inclinação da curva.

O LOQ para o equipamento corresponde a menor concentração do analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de precisão e exatidão. O LOQ pode ser calculado pela multiplicação de 10 vezes o desvio padrão de dez medidas do branco (DP), dividido pelo coeficiente angular da curva (IC) ou inclinação da curva, como mostra a Equação 3:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{DP}}{\text{IC}} \quad \text{Equação 3}$$

Além disso, foram verificados experimentalmente o LOD e LOQ para o método proposto, com o objetivo de determinar os valores destes parâmetros de mérito para o método desenvolvido. O LOD do método é definido como a concentração mínima do analito com 95 ou 99% de confiança de que a concentração encontrada é maior que zero. Esse cálculo foi realizado da seguinte maneira (INMETRO, 2007):

$$\text{LOD}_{\text{Método}} = t_{(n-1)} \times \text{DP} \quad \text{Equação 4}$$

Onde t é abcissa da distribuição de Student para um grau de liberdade n, em um nível de confiança de 95 ou 99%. DP é o desvio padrão dos brancos da amostra, com adição. O valor encontrado é expresso em concentração.

Já o valor de LOQ para o método foi calculado da seguinte maneira: 7 replicatas de adições próximas aos valores de concentração encontrados no LOD foram realizados e seus DP calculados para cada replicata. Realizou-se um gráfico,

DP x concentração e a escolha do valor mais baixo e aceitável foi definido como o LOQ do método e expressos em concentração.

Os parâmetros de mérito anteriormente descritos, foram calculados para o método de determinação de cloro utilizando HR-CS GF MAS via absorção molecular de CaCl e estão descritos na Tabela 6:

Tabela 7 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de cloro por HR-CS GF MAS via absorção molecular de CaCl. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ).

Parâmetro		Comprimento de onda (nm)
Faixa linear	8,7 – 300 ng	
Curva analítica	$y_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0093x_{\text{cl}} + 0,0352$	
R	0,9995	620,862
LOD	2,6 ng / 0,26 mg.L <sup>-1</sup>	
LOQ	8,7 ng / 0,87 mg.L <sup>-1</sup>	
Faixa linear	61,6 – 860 ng	
Curva analítica	$y_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,0002x_{\text{cl}} + 0,0007$	
R	0,9965	377,501
LOD	14,2 ng / 1,42 mg.L <sup>-1</sup>	
LOQ	61,6 ng / 6,16 mg.L <sup>-1</sup>	

O parâmetro de mérito escolhido para a comparação dos resultados obtidos pela molécula CaCl com outras moléculas diatômicas foram o LOD para a mesma técnica.

Para a molécula de InCl estudada por Huang e colaboradores (HUANG, 2006A) o valor de LOD encontrado foi de 3 mg.L<sup>-1</sup>.

Para a molécula de AlCl estudada por Nakadi e colaboradores (NAKADI et al., 2015), por Heitmann e colaboradores (HEITMANN et al., 2006) e por Enders e

colaboradores (ENDERS et al., 2015), o valor de LOD relatado foi de  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $70 \text{ pg}$  e  $1,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , respectivamente.

Para a molécula de SrCl estudada também por Enders e colaboradores (ENDERS, et al., 2015) e Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2014), os valores de LOD relatados foram idênticos, de  $1,0 \text{ ng}$ . A mesma molécula, no trabalho de Ozbek e Akman (OZBEK; AKMAN, 2016B) apresentou um LOD do método de  $1,76 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Dessa maneira, pode-se inferir que os valores obtidos de LOD obtidos com o método proposto neste trabalho estão compatíveis com os encontrados na literatura.

### 3.5 CONCLUSÕES

Uma nova molécula para a determinação de cloro (CaCl) via HR-CS GF MAS foi proposta, utilizando amostragem direta, a fim de promover um aumento da aplicabilidade da determinação de cloro em diversos tipos de amostras. Para tal, foram otimizados os comprimentos de onda ( $620,862$  e  $377,501 \text{ nm}$ ) que proporcionaram adequada sensibilidade e exatidão para as amostras certificadas analisadas. A seguinte etapa de otimização envolveu a escolha da adequada temperatura de pirólise e vaporização, na ausência e na presença de modificador químicos em solução (paládio na forma de nitrato). Além disso, otimizou-se a massa de paládio ( $20 \text{ }\mu\text{g}$ ) e de cálcio como reagente formador da molécula ( $400 \text{ }\mu\text{g}$ ) para garantir a formação, estabilidade e adequada sensibilidade da molécula.

Uma vez otimizado as condições experimentais, avaliou-se a exatidão do método com a determinação de cloro, via CaCl, em oito amostras certificadas com diferentes conteúdos de cloro. Após análise estatística dos resultados encontrados, verificou-se que os mesmos são considerados estatisticamente semelhante aos certificados.

Além disso, quando o método desenvolvido neste trabalho é comparado com outra molécula de cloro já descrita na literatura por absorção molecular (SrCl), o mesmo apresenta resultados mais precisos e com menores valores de incerteza em amostras com elevado teor de cálcio.

O método proposto apresenta limite de detecção (2,6 e 14,2 ng) e quantificação (8,7 e 61,6 ng) para as duas linhas estudadas (620,862 e 377,501 nm, respectivamente) compatíveis com os resultados já relatados na literatura e com as diversas amostras empregadas. Foi apresentado também, a possibilidade de combinação de três das linhas mais sensíveis de CaCl, que proporciona uma melhora do limite de quantificação de 2,7 para 0,75 ng.

Dessa forma, o método desenvolvido apresentou uma melhora na determinação de cloro quando comparado ao método já desenvolvidos na literatura, além de apresentar maior flexibilidade quanto a concentração de cloro e cálcio e a complexidade das amostras.

## 4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE IODO UTILIZANDO AMOSTRAGEM SÓLIDA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE

### 4.1 INTRODUÇÃO

O iodo é um micronutriente considerado essencial para os seres vivos que possuem a glândula tireoide. Esta glândula produz os hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotiroxina), que são responsáveis por uma série de processos bioquímicos reguladores do metabolismo (LEITERER; TRUCKENBRODT; FRANKE, 2001).

Devido a sua importância, a ingestão deste elemento deve ser realizada pela população e seu valor de ingestão diária recomendada (IDR) vem sendo definida por órgãos reguladores nacionais e internacionais. A Unicef (do inglês, *United Nations Children's Fund*), ICCIDD (do inglês, *International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders*) e WHO (do inglês, *World Health Organization*) recomendam como dose diária de iodo os seguintes valores e faixas etárias: 90 µg para crianças entre 0 e 59 meses, 120 µg para crianças de 6 a 12 anos, 150 µg para adolescentes e adultos e 250 µg para mulheres grávidas ou em fase de amamentação (WHO; UNICEF; ICCIDD, 2007).

Já a Anvisa, apresenta valores mais detalhados em função da idade; valor do IDR é de 90 µg para lactentes de 0 a 6 meses e 135 µg de 7 a 11 meses. Para crianças de 1 a 3 anos esse valor é de 75 µg, de 4 a 6 anos é de 110 µg e de 7 a 10 anos é de 100 µg. Para gestantes e lactantes o valor do IDR de iodo é de 200 µg e para um adulto é de 130 µg (BRASIL, 2005).

A inserção do iodo no organismo humano ocorre através do consumo de alimentos, que ao conter iodo, de forma natural ou adicionada, proporciona adequada absorção do elemento. Dessa maneira, a quantidade de iodo distribuída em diferentes regiões do planeta, altera a quantidade de iodo disponível nos alimentos (WHO, 1994).

O iodo, na forma de iodeto, está amplamente distribuído na crosta terrestre, porém de forma desigual. Devido ao processo natural de lixiviação, erosão e inundações, as terras que possuíam uma quantidade maior de iodo se tornaram empobrecidas com o passar dos anos, sendo localizada nos oceanos a maior concentração do elemento.

Está presente nos oceanos (cerca de  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e se oxida a iodo elementar, sendo volatilizado para a atmosfera e retornando ao solo através das chuvas, completando seu ciclo. No entanto, em muitas regiões este ciclo ocorre de forma incompleta, levando ao empobrecimento do solo e da água potável (GOLDSCHMIDT, 1954).

Em muitos países, a adição de iodo no sal de cozinha se tornou a melhor alternativa para evitar a deficiência do elemento, pois além de ser consumido pela maioria da população, o mesmo não sofre perdas após o cozimento dos alimentos (ZIMMERMANN, 2009; DELANGE et al., 1998). Apesar disso, durante a gestação deve haver uma suplementação de iodo bem como a monitoração de seus níveis no organismo, pois a deficiência do mesmo no útero e durante o crescimento da criança pode resultar em cretinismo, uma condição grave de atraso no crescimento físico e mental (DELONG, 1989).

Por conta desta importância no monitoramento da quantidade de iodo em diversos tipos de amostras, este elemento vem sendo alvo de muitos trabalhos utilizando diferentes técnicas analíticas instrumentais.

No entanto, não foram encontrados relatos na literatura que abordem a análise de iodo utilizando amostragem sólida direta, ainda que este tipo de análise proporcione uma série de vantagens, como por exemplo a diminuição do risco de perda/contaminação do analito. Além disso, a análise direta de sólidos utiliza uma quantidade de amostra bem reduzida quando comparada a decomposição de amostra, coerente com a química verde, uma vez que não faz uso de reagentes oxidantes utilizados na decomposição de amostras.

Dessa maneira, este trabalho propõe o desenvolvimento de método analítico que permita a análise de iodo utilizando amostragem sólida direta por HR-CS GF MAS em amostras de medicamentos à base de iodo.

#### 4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o desenvolvimento do método analítico, que tem como objetivo principal a determinação de iodo, através da absorção molecular de Srl, utilizando HR-CS GF MAS com amostragem direta de sólidos em amostras de medicamento (Yodocefol® e Levotiroxina Sanofi®) a base de iodo, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- I. Estabelecer as melhores condições (comprimento de onda) que permitam a determinação de iodo nas amostras e nos padrões aquosos com a adequada sensibilidade;
- II. Investigar o comportamento térmico da molécula de Srl através da realização de curvas que proporcionem a otimização das temperaturas de pirólise e vaporização;
- III. Escolher um modificador químico adequado para a estabilização da molécula alvo, juntamente com a otimização de sua massa;
- IV. Otimizar a massa de estrôncio para adequada formação da molécula de Srl;
- V. Aplicar o método desenvolvido de absorção molecular para Srl em amostras de medicamento a base de iodo;
- VI. Comparar os resultados obtidos com a molécula de Srl com a de Bal, já descrita na literatura;
- VII. Validar o método desenvolvido por análise comparativa utilizando ICP-MS;

## 4.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.2.1 Iodo

#### 4.2.1.1 Histórico e Características

Em 1811, o químico francês Bernard Courtois (1777-1838) descobriu o elemento iodo através da adição equivocada de uma maior quantidade de ácido sulfúrico em resíduos da queima de algas provenientes da Normandia e Grã-Bretanha. Nesse erro, surgiram vapores de coloração violeta e odor irritante. Os mesmos ao condensarem, geravam a formação de cristais negros com um brilho metálico. Depois de algum tempo realizando experimentos, estes cristais reagem com hidrogênio, fósforo e alguns metais, e não reagem com carbono e oxigênio. Como nenhum outro elemento possuía este comportamento, ele suspeitou que poderia estar lidando com um novo elemento (WEEKS, 1945).

Em 1814, Davy e Gay-Lussac continuaram o trabalho de Courtois e seus experimentos indicavam que as características atribuídas ao novo elemento eram semelhantes às do cloro. O nome iodo (do grego *iodes*, significa violeta) é uma referência aos vapores produzidos por Courtois. O elemento na sua forma molecular ( $I_2$ , número atômico: 53) possui coloração cinza-violeta e brilho metálico. Volátil a temperatura ambiente, sob aquecimento sublima facilmente (DAVY, 1814).

Iodo diatômico líquido (coloração preta) é obtido pelo aquecimento brando e lento do sólido. Sua solubilidade é de  $0,0013 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ . A adição de KI ao iodo líquido aumenta a sua solubilidade, pela formação do triiodeto ( $I_3^-$ ). Sua solubilidade aumenta em solventes orgânicos, sendo sua coloração marrom para solventes polares e violeta para solventes de baixa polaridade (RAMETTE; SANDFORD, 1965).

Os estados de oxidação em soluções aquosas podem ser ao +1, como o ICl, +3, como o  $ICl_3$ , +5, como os iodatos ( $IO_3^-$ ) e +7, como os periodatos ( $IO_4^-$ ). Sua eletronegatividade é baixa, proporcionando um comportamento catiônico sob condições de elevada acidez. A manipulação de iodo na sua forma de  $I_2$  deve ser

cuidadosa e requer o uso de luvas, máscaras, óculos e jaleco devido a sua rápida absorção e irritação (SANTOS; AFONSO, 2013).

#### 4.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação

Comparado aos outros halogênios (com exceção do astato), a presença de iodo é consideravelmente menor, sendo normalmente encontrado na crosta terrestre ( $0,14 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e na água do mar ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Nos oceanos, a concentração de iodo em algas marinhas, que o absorvem da água, pode chegar a concentrações de 55 a  $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ , dependendo da espécie e da estação do ano (GAMALLO-LORENZO et al., 2005).

Pode ser obtido através da secagem e posterior queima das algas marinhas, onde suas cinzas, que contém altos teores de iodeto, sofrem um processo de oxidação eletrolítico ou por aquecimento com dióxido de manganês em meio de ácido sulfúrico, formando o  $\text{I}_2$ . Também pode ser obtido através do processo de purificação do adubo nitrogenado chamado Salitre do Chile, como iodato ( $\text{IO}_3^-$ ). Os iodatos obtidos são reduzidos pela adição de hidrogenosulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) (ERICKSEN, 1983).

O iodo elementar e seus compostos possuem muitas aplicações, com destaque na área médica, por possuir características antissépticas (solução de iodo de 2 a 10% de KI em etanol + polivinilpirrolidona), expectorante (KI,  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ), como medicamento para complementação de dieta, principalmente por mulheres grávidas ou ainda administradas por pessoas atingidas por radiação para impedir/reduzir a absorção de iodo radioativo pela tireoide (BACKER; HOLLOWELL, 2000).

Pode ser usado também na análise química, como por exemplo: determinação do nível de instauração de lipídeos, utilizado no método de Karl Fischer para a determinação de água, determinações titulométrica de oxirredução, e ainda em algumas sínteses de compostos orgânicos (SANTOS; AFONSO, 2013).

O consumo excessivo de iodo é considerado raro, uma vez que a tolerância do organismo é de pelo menos 1 mg por dia. Porém, em algumas situações onde isso acontece, ocorre o hipotireoidismo provocado pelo efeito “rebote” do excesso de

iodo em pacientes que apresentam nódulos da tireoide, ou pela incapacidade da glândula em produzir os hormônios. As consequências deste excesso normalmente estão relacionadas a um aumento do desenvolvimento de doenças autoimune da tireoide, como a doença de Graves ou tireoidite de Hashimoto. O aumento da ocorrência de carcinoma papilar da tireoide também é relatado, embora sua comprovação não tenha sido realizada.

Apesar dos efeitos indesejados, o excesso de iodo não leva a consequências tão graves como seu déficit, uma vez que o mesmo prejudica seriamente o desenvolvimento cerebral (TENG et al., 2006).

Dessa maneira, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a análise de iodo em medicamentos sólidos se faz necessária para que o controle de qualidade e monitoramento da quantidade de iodo seja realizado de forma simples e eficaz.

#### 4.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento

Antes de entender os mecanismos de toxicidade, é necessária a compreensão da absorção do iodo pelo organismo. O iodo proveniente da alimentação é reduzido a iodeto e absorvido dentro do sistema gastrointestinal, e posteriormente levado a corrente sanguínea. As células tireoidianas são capazes então de capturá-lo através de um transportador específico, o co-transportador sódio-iodeto, para posterior organificação do mesmo (DOHÁN et al., 2003).

São conhecidos 35 isótopos do elemento iodo, variando o número de prótons de 108 a 142. O único estável é o  $^{127}\text{I}$ , sendo os demais radioativos. Apenas 4 destes isótopos ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{129}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ ) possuem um maior interesse no que diz respeito a toxicidade humana, pois são utilizados clinicamente e possuem meia vida longa o suficiente para ser transportado até os receptores para posterior eliminação pelo organismo. O iodo radioativo é usado para a visualização de anormalidades tireoidianas ou então, para destruir a glândula quando a mesma apresenta células tumorais (WAGNER, 1995).

A administração de iodo, por via oral, na sua forma estável, também é realizada em pessoas cuja suplementação seja necessária. Seja através da ingestão de iodo ou do hormônio sintético produzido pela glândula tireoidiana. Dessa maneira, os estudos que avaliam a toxicidade do iodo sempre analisam o efeito causado na tireoide, uma vez que a glândula é responsável pela absorção de 90% do iodo corporal.

Quando ocorre o aumento da ingestão de iodo, o efeito toxicológico vai depender da quantidade de iodo já existente no organismo e as adaptações fisiológicas associadas a essa condição pré-existente (SANG et al., 2012).

O valor de ingestão crônica definido pela ASTDR é de 150 a 950 µg. Os principais efeitos dessa ingestão de iodo de forma excessiva estão relacionados a falhas no processo de produção e secreção dos hormônios tireoidianos. Esses problemas podem ser de três tipos: hipotireoidismo, hipertireoidismo e tireoidite. O primeiro refere-se à diminuição da produção hormonal, levando a diversas manifestações sintomáticas, ocorrendo com ou sem bócio. O hipertireoidismo refere-se a uma produção excessiva de hormônios e a tireoidite a uma inflamação na glândula (ATSDR, 2004; SANG et al., 2012).

Quando ocorre uma ingestão excessiva de iodo, ao contrário do que se pode imaginar, ocorre hipotireoidismo, conhecido como efeito Wolff-Chaikoff. Na maioria das pessoas, este efeito é seguido de um retorno dos níveis normais de produção hormonal, conhecido como um escape ao efeito Wolff-Chaikoff.

Em pessoas que já apresentam uma pré-disposição ao hipotireoidismo, o efeito Wolff-Chaikoff pode ser permanente. Esses pacientes normalmente incluem recém-nascidos, pacientes que possuem tireoidite autoimune ou pós-parto, com doença de Graves ou pacientes tratados com iodo radioativo (ATSDR, 2004).

Dessa maneira, fica clara a necessidade do adequado controle de qualidade na monitoração de iodo em medicamentos, uma vez que os pacientes devem ter um controle rigoroso da dosagem. Dosagens muito acima ou muito abaixo podem levar a complicações graves da doença a ser tratada.

Devido a seu alto poder irritante, a manipulação de iodo na sua forma elementar exige uma série de cuidados para prevenir um possível contato direto do

iodo através de mucosas, ingestão oral ou intravenosa. Os sintomas apresentados pelos pacientes que sofreram este tipo de intoxicação ocupacional podem variar desde irritação nas mucosas, dores de cabeça, tosse, até mesmo vômito, diarreia ou colapso do organismo em doses elevadas. Para evitar tais situações, além do uso dos equipamentos de proteção individual, o ambiente de trabalho deve ser arejado, devendo ser sempre manipulado em capela, sendo permitida a máxima concentração ocupacional de 0,1 mg.m<sup>3</sup> (SANTOS; AFONSO, 2013).

#### 4.2.1.4 Legislação

Órgãos internacionais de regulamentação trazem quantidades máximas recomendadas de iodo na sua forma gasosa para diversos tipos de ambientes laborais, como a presença de iodo no ar em 0,1 ppm pela ACGIH (do inglês, *Association Advancing Occupational and Environmental Health*) (ACGIH, 2005), NIOSH (do inglês, *National Institute for Occupational Safety and Health*) (NIOSH, 2007) e OSHA (do inglês, *Occupational Safety and Health Administration*) (OSHA, 2004).

De acordo com a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos (NAS, do inglês *National Academy of Science*) (NAS, 2000), a ingestão de iodo através dos alimentos é considerada baixa, pois pode ser afetada pela qualidade do solo, irrigação e uso de defensivos agrícolas. A maioria dos alimentos fornece em torno de 3 a 75 µg por porção, sendo maiores em alimentos provenientes do mar, onde a concentração de iodo é maior. Já nos produtos processados, essa concentração pode ser bem maior, uma vez que os aditivos alimentares podem ser ricos em iodo, sendo os principais: iodato de cálcio e de potássio, iodeto de potássio e iodeto cuproso.

O US FDA relata os níveis de iodo como aditivos permitidos em alimentos (como iodeto de potássio) para consumo direto humano diário é definido por 45 µg para recém-nascidos, 105 µg para crianças com menos de 4 anos, 225 µg adultos ou crianças com mais de 4 anos e 300 µg para gestantes. Para aditivos alimentares indiretos alimentares, o limite é de 5 µg a cada 100 Kcal do alimento (FDA, 2016).

No Brasil, a preocupação com a iodação do sal e seu monitoramento começou em 1953, com a Lei número 1.944, que tornou obrigatório o processo de adição de iodo ao sal de cozinha, em áreas bocígenas. Já em 2000, a porcentagem de bócio da população brasileira caiu de 20,6% para 1,4%, mostrando o grande avanço no controle da deficiência de iodo.

A Anvisa monitora a quantidade de iodo em alimentos e medicamentos através do programa Pro-Iodo, atuando de forma investigativa para a atualização dos parâmetros legais dos teores de iodo no sal (BRASIL, 2014a).

#### 4.2.1.5 Determinação de iodo

Há uma grande quantidade de métodos de análise de iodo, e para a correta escolha deve-se observar alguns critérios, como: complexidade da amostra, o teor e as espécies que se deseja analisar.

A análise clássica que envolve titulação e a quantificação de iodo é chamada de iodometria, onde a reação de oxi-redução ocorre entre o iodo livre no meio e o enxofre presente no titulante tiosulfato de sódio. O ponto de viragem ocorre através da descoloração do complexo de cor azul de iodo/amido (HARRIS, 2008).

Apesar de apresentar rapidez de execução e baixo custo, este método apresenta elevados valores de limite de detecção, quando comparado a técnicas analíticas instrumentais modernas.

Dentre estas podemos citar a espectrofotometria UV-vis (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009), ICP-OES (NAOZUKA et al., 2003), ICP-MS (SILVA, S. V. et al., 2016), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (NITSCHKE; STENGEL, 2015), cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gás Chromatography*) (YEH; HUNG; LIN, 2014), voltametria (CAMPOS, 1997), análise por ativação de nêutrons (SEKIMOTO; EBIHARA, 2016), espectrometria de fluorescência de raio-X (LEE et al., 2016) e HR-CS GF MAS (HUANG et al., 2009).

Apesar da dificuldade de análise de elementos não metálicos como o iodo por LS AAS devido as linhas de ressonância de absorção atômica estarem situadas

entre 10 a 190 nm. Para superar este obstáculo, foram relatadas medidas indireta do elemento, ou seja, era realizado alguma reação química entre o iodo e outra substância/elemento passível de ser determinada por LS AAS, e devido a estequiometria da reação era possível realizar a medida (YEBRA; BOLLAÍN, 2010; BERMEJO-BARRERA et al., 1995; 2001; HAASE; BROEKAER, 2002).

A espectrometria de absorção molecular também era realizada para este tipo de determinação e alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura (ZHI-HE; HUI-MING, 1989; DITTRICHI et al., 1984).

Apesar da existência de um grande número de métodos desenvolvidos para a análise de iodo, o mesmo pode ser considerado desafiador, uma vez que o elemento é considerado altamente volátil.

Além disso, os métodos existentes até o momento na literatura utilizam decomposição de amostra como primeiro tratamento das mesmas. Este procedimento pode acarretar sérios problemas na determinação de iodo, uma vez que nesta etapa pode ocorrer a volatilização do analito pelo aquecimento, como também o aumento da possibilidade de contaminação.

O espectrômetro de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua por forno de grafite apresenta características desejáveis ao cumprimento dos objetivos do trabalho, uma vez que permite a análise de medicamentos de iodo com adequada sensibilidade, além de possibilitar a amostragem sólida direta.

Na literatura, somente um trabalho utilizando esta técnica para a determinação de iodo foi encontrado (HUANG et al., 2009). No entanto, o mesmo não utiliza a análise direta da amostra, e sim, realiza a dissolução do conteúdo das pílulas em água, com posterior análise do sobrenadante.

Sendo assim, este trabalho buscou a determinação ainda não encontrada na literatura de iodo de forma direta em amostras sólidas de medicamentos utilizando espectrômetro de alta resolução com fonte contínua, com forno de grafite.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Equipamento

O mesmo equipamento descrito no item 3.3.1 foi utilizado.

A verificação da exatidão do método foi realizado através das medidas das amostras por ICP-MS da Perkin-Elmer (Whaltam, Estados Unidos) de modelo NexION, 300X.

### 4.3.2 Reagentes e soluções

A água utilizada em todas as etapas de preparo de soluções foi purificada através da deionização da água pelo sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, USA).

Os padrões de iodo foram preparados através da devida pesagem do sólido de iodeto de potássio (KI, Merck, Alemanha) com posterior dissolução em água deionizada. A solução de 40 g.L<sup>-1</sup> de estrôncio, utilizada como agente formador da molécula diatômica, foi preparada através da pesagem de quantidade adequada do sal de Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> anidro (Merck, Alemanha) e dissolvido em água deionizada.

Para a realização das medidas comparativas e formação da molécula de BaI, o agente formador da molécula diatômica, bário, foi preparado pesando adequada massa de Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> anidro (Sigma-aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) e dissolvida em água deionizada para a obtenção da solução de concentração 40 g.L<sup>-1</sup> de Ba.

Ao utilizar a molécula SrI, o emprego de paládio (na forma de nitrato) foi investigado como possível modificador químico. Esta solução foi preparada através da adequada diluição da solução estoque de 10 g.L<sup>-1</sup> de paládio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) em 15% de ácido nítrico, Merck, Alemanha), para a concentração final de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Além disso, a adição de ácido cítrico e tiourea foram necessárias para que os padrões aquosos tivessem um sinal analítico mais semelhante às amostras de medicamento contendo iodo na forma orgânica. O ácido cítrico monohidratado foi preparado através da dissolução em água deionizada de uma quantidade apropriada do sólido C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O (Merck, Alemanha), com a concentração final de 200 g.L<sup>-1</sup>. A

tiourea,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$  (Merck, Alemanha) também foi preparada da mesma forma, sendo a concentração final de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ .

O padrão interno, ródio ( $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$  em  $\text{HNO}_3$ ) foi utilizado na verificação da exatidão do método por ICP-MS através da diluição adequada em água deionizada do padrão estoque de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  (CRM, Merck, Alemanha).

#### 4.3.3 Amostras

Dois medicamentos foram escolhidos como amostras para a aplicação deste método, sendo um deles fornecedor de iodo na forma inorgânica (Yodocefol<sup>®</sup>, 200  $\mu\text{g}$  de iodo na forma de iodeto de potássio por comprimido) e outro na forma orgânica (Levotiroxina Sanofi<sup>®</sup>, 75  $\mu\text{g}$  de levotiroxina sódica por comprimido). Os detalhes da constituição das amostras são descritos na Tabela 7.

Tabela 8 – Detalhes da composição dos medicamentos utilizados neste trabalho para a determinação de iodo, utilizando Srl e Bal em HR-CS GF MAS.

Medicamento	Forma de iodo	Quantidade de iodo por comprimido ( $\mu\text{g}$ )
Yodocefol <sup>®</sup>	Inorgânico (KI)	200
Levotiroxina Sanofi <sup>®</sup>	Orgânico ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{I}_4\text{NNaO}_4$ )	47,65

#### 4.3.4 Procedimento para a medida de iodo por HR-CS GF MAS

As condições experimentais otimizadas, os parâmetros instrumentais, juntamente com as características de cada linha de absorção para as duas moléculas são detalhadas na Tabela 8.

Tabela 9 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de iodo através das moléculas Srl e Bal, utilizando HR-CS GF MAS para amostras sólidas de medicamento.

	Srl	Bal
Transições eletrônicas (faixa de comprimento de onda)	$X^2\Sigma \rightarrow B^2\Sigma$ (677 – 678 nm)	$X^2\Sigma^+ \rightarrow C^2\Sigma^+$ (538 – 561 nm)
Comprimento de onda do <i>pixel</i> central	677,700 nm	538,308 nm
<i>Pixels</i> somados por linha (resolução)	3 (~7,5 pm)	3 (~5,1 pm)
Reagente formador da molécula	Sr (400 µg)	Ba (400 µg)
Modificadores químicos	Pd (10 µg) Ácido cítrico (2 mg)* Tiourea (100 µg)*	
Faixa de massa de amostra analisada diretamente como sólido (mg)	Yodocefal® 0,20 – 2,30 Levotiroxina 1,00 – 4,50 Sanofi®	Yodocefal® 0,50 – 1,30 Levotiroxina 0,60 – 2,35 Sanofi®

\* Somente usado para análise de Levotiroxina Sanofi®

#### Programa de Temperatura

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Fluxo de gás Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	10	20	2,0
Secagem	110	5	20	2,0
Secagem	150 <sup>a</sup>	10	20	2,0
Pirólise	600	200	20	2,0
Vaporização	2000 <sup>a</sup> /2200 <sup>b</sup>	3000	15	0
Limpeza	2500	3000	5	2,0

<sup>a</sup> Srl / <sup>b</sup> Bal

A otimização deste método foi realizada em duas etapas, sendo a primeira dedicado a molécula Srl e a segunda parte a molécula Bal, já descrita na literatura, para comparação dos resultados obtidos (HUANG et al., 2009).

Para a determinação de iodo utilizando a molécula de Srl, realizou-se a curva de calibração com solução padrão de iodeto de potássio (0,25 a 5 µg), onde cada ponto (branco + 5 concentrações crescentes) desta curva foi realizado em triplicata, e a média das absorvâncias integradas por área ( $CP \pm 1$ ) foram registradas. Juntamente com cada ponto da curva foram adicionados 10 µL da solução de 40 g.L<sup>-1</sup> de estrôncio (400 µg) como reagente formador da molécula, 10 µL da solução de 1 g.L<sup>-1</sup> de paládio (10 µg), 10 µL da solução 200 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico (2 mg) e 10 µL da solução 10 g.L<sup>-1</sup> de tioureia (100 µg). A adição dos dois últimos componentes somente foi utilizada nos padrões aquosos, quando a calibração é realizada para a análise de amostras contendo composto orgânico de iodo. Quando a amostra contém iodo inorgânico, o mesmo se comporta de forma mais semelhante ao padrão aquoso, não sendo necessária a adição de ácido cítrico e tioureia.

Para a realização da análise comparativa utilizando Bal, na curva de calibração também se utilizou a solução padrão de iodeto de potássio (contendo iodo na faixa de 0,1 a 1 µg) onde as medidas para cada ponto (branco + 5 concentrações crescentes) desta curva foram realizadas em triplicata, e a média das absorvâncias integradas por área ( $CP \pm 1$ ) foram registradas. Juntamente com cada ponto da curva foram adicionados 10 µL da solução de 40 g.L<sup>-1</sup> de bário (400 µg). A utilização de modificadores para esta molécula, como o nitrato de paládio, não se mostrou eficiente.

O programa de temperatura para as duas moléculas descrito na Tabela 8 foi aplicado, para a curva de calibração e amostras sólidas.

Para ambas as moléculas, após a construção da curva de calibração, a plataforma vazia foi introduzida na microbalança para tarar, e levada novamente até a posição inicial pelo par de pinças do amostrador de sólidos, onde uma quantidade apropriada de amostra foi introduzida na mesma. Um *pool* de 10 comprimidos foi pesado e posteriormente macerado em um gral com um auxílio de um pistilo. Com o auxílio de uma espátula, pequenas amostras deste medicamento sólido foram introduzidas na plataforma vazia e taradas. Após a inserção da amostra, a plataforma foi levada novamente até a microbalança para ajuste de massa.

Depois de ajustada a massa da amostra, foi adicionado sobre a amostra o reagente formador de molécula (400 µg de estrôncio ou bário) e o paládio como modificador químico para a molécula Srl. Em seguida, a plataforma e seus componentes foram levados até o forno de grafite e o mesmo programa de temperatura realizado na curva de calibração foi aplicado e o sinal registrado. Em todas as análises, a absorvância integrada foi selecionada como modo de registro de sinal, ou seja, a soma dos sinais de 3 *pixels* (o central e mais dois adjacentes a este, CP ± 1) foram considerados como resultado analítico para cada análise, independente da linha ou molécula.

Para cada determinação, foram analisadas cinco replicatas, e a mediana dos resultados foi considerada como valor representativo (BELARRA; RESANO; CASTILLO, 1999).

#### **4.3.5 Procedimento para a medida de iodo por ICP-MS**

Após a otimização do método de determinação de iodo por HR-CS GF MAS e realizada a análise dos medicamentos descritos na Tabela 7, a determinação da exatidão do método proposto foi comparada por ICP-MS.

A análise dos medicamentos foi realizada após a maceração dos mesmos em gral e pistilo e posterior solubilização em água deionizada para o Yodocefol® e em 0,1 M de NaOH para a Levotiroxina Sanofi®. Após este processo, os mesmos ficaram em repouso por 48 horas para que os componentes insolúveis (prováveis silicatos) decantassem. O sobrenadante foi analisado por ICP-MS.

As soluções padrão utilizadas para a calibração (branco + cinco concentrações crescentes) com ICP-MS foram preparadas pela simples dissolução de uma quantidade apropriada do sal de iodeto de potássio em água deionizada. (branco + cinco concentrações crescentes). A faixa de concentração de iodo utilizada foi de 2 a 10 µg.L<sup>-1</sup>. A adição de um padrão interno (Rh) foi realizada para a diminuição das flutuações de sinais provenientes do transporte da amostra. Uma concentração fixa de 10 µg.L<sup>-1</sup> deste foi adicionada em cada ponto da curva de calibração. Os parâmetros utilizados no equipamento são descritos na Tabela 9.

Tabela 10 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de iodo por ICP-MS para amostras de medicamento, após diluição e decantação.

Modo	Standard
Fluxo do gás nebulizador	0,87 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás auxiliar	1,4 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás do plasma	16,5 L min <sup>-1</sup>
RF power	1000 W
RPa	0
RPq	0,65
Varredura/Leitura	100
Leitura/Replicata	1
Replicata	5
Dwell time	20 ms

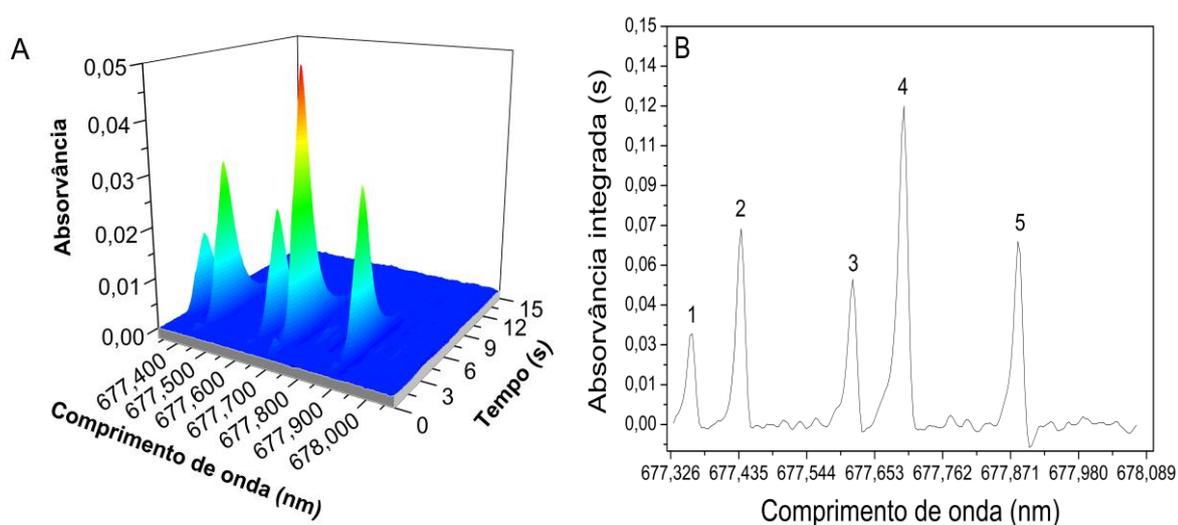
## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.4.1 Otimização das condições experimentais

#### 4.4.1.1 Investigação das linhas de absorção de Srl

A literatura clássica apresenta diversas bandas de absorção da molécula de Srl, na região do visível e ultravioleta (335 a 710 nm), do espectro eletromagnético (PEARSE; GAYDON, 1976). Dessa maneira, buscou-se o monitoramento de bandas de absorção dessa molécula nessas regiões, utilizando HR-CS GF MAS, para melhor compreensão do comportamento e características de cada uma delas. Apesar disso, somente uma região apresentou bandas de absorção molecular de forma significativa, como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Dois espectros de absorção molecular, onde A) é resolvido no tempo e B) não é resolvido no tempo, ambos para a região espectral mais intensa da molécula de Srl, correspondendo a banda de vibração  $\Delta v=0$  e seguinte transição eletrônica:  $X^2\Sigma \rightarrow B^2\Pi$  ( $\lambda_{\text{máximo}}$ : 677,700 nm), utilizando o programa de temperatura descrito na Tabela 8.



Os espectros da Figura 7, foram registrados utilizando 2,5 µg de iodo, na forma de solução de KI, juntamente com 10 µg de Pd, na forma de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em 15% de ácido nítrico e 400 µg Sr, na forma de Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 8. As janelas espectrais foram centradas de forma que a visualização permitisse a melhor visão do ambiente molecular em cada um dos casos. Os espectros obtidos com a adição de 2 mg de ácido cítrico e 100 µg de tiourea não sofrem modificações em suas formas, somente sendo alterado seu valor de absorvância.

Ao observar a janela espectral da Figura 7, pode-se perceber que a molécula de Srl possui estruturas finas de linhas rotacionais, que pertencem a banda vibracional  $\Delta v=0$ , com transição eletrônica  $X^2\Sigma \rightarrow B^2\Pi$  para a banda de absorção na região do visível ( $\lambda_{\text{máximo}}= 677,700 \text{ nm}$ ), na região do vermelho.

Assim como para o cloro, as estruturas simples, finas e bem resolvidas apresentadas por esta molécula fazem com que o processo de definição de linha base se torne mais fácil do que em moléculas que apresentam linhas mais largas (ARAMENDÍA et al., 2011; NAKADI et al., 2015).

Da mesma maneira que para a molécula de CaCl, após a análise de cada janela espectral, a possibilidade da soma de vários picos com sensibilidade semelhantes para a melhoria do LOD ou então, a ampliação da faixa linear através da seleção de uma linha menos sensível, foram utilizadas para a molécula de Srl.

Como se pode observar na Figura 7, a janela espectral apresentada pela representação em 2D das linhas de absorção molecular possuem linhas com diferentes sensibilidades, numeradas de acordo com a ordem de surgimento. Para estas linhas (ou combinações delas), foram calculadas as massas características, faixas lineares e LOD. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 10.

A massa característica e o LOD foram calculados da mesma forma que para a molécula de CaCl.

Tabela 11 – Massa característica, faixa linear e limite de detecção para linhas rotacionais da molécula de Srl, obtidos sob condições apresentadas na Tabela 8. As faixas de comprimento de onda e os números dos picos entre parênteses são baseados na Figura 7.

Comprimento de onda (nm) (pico)	Massa característica (ng)	Faixa linear ( $\mu\text{g}$ )	LOD (ng)
677,356 (1)	48,6	até 10	44,78
677,439 (2)	24,3	até 10	27,52
677,619 (3)	31,6	até 10	31,90
677,700 (4)	14,6	até 10	35,05
677,888 (5)	23,7	até 10	43,70
(3)+(4)+(5)	7,04	até 10	9,13

Como é possível observar, a linha que possui maior sensibilidade é a de 677,700 nm e proporciona um dos melhores limites de detecção, na faixa de 35 ng. A sensibilidade pode ser melhorada combinando os sinais das três últimas linhas por exemplo, como mostra a última linha da Tabela 10. O limite de detecção obtido pela combinação é de 9,13 ng, valor bem menor quando consideramos o valor individual de qualquer uma das linhas.

Os valores de limite de detecção encontrados nesse trabalho, apesar de maiores em relação ao calculado pelo trabalho de Huang e colaboradores em 2009 para a molécula de Bal (0,6 ng), se mostrou adequado para análise de medicamentos de forma direta.

Da mesma forma que a molécula de CaCl contida neste trabalho, a molécula de Srl mostrou um comportamento inesperado, onde a seleção da linha menos sensível não resultou numa extensão da faixa linear, sendo obtido o valor máximo de 10  $\mu\text{g}$  para todas as linhas. Esse comportamento é justificado da mesma maneira que para a molécula de CaCl.

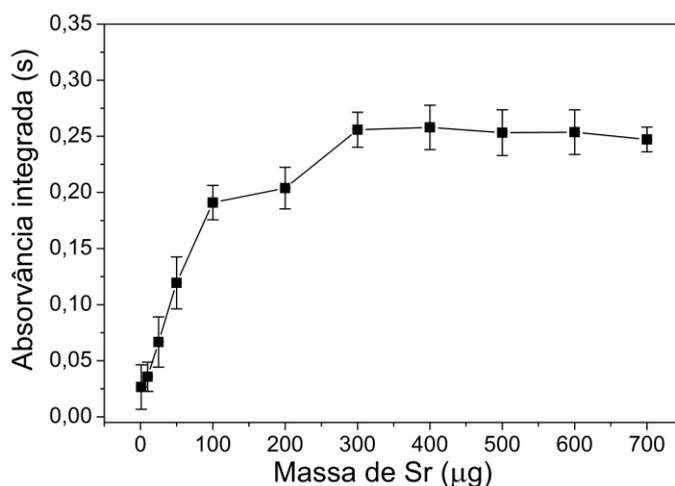
#### 4.4.1.2 Estrôncio e modificadores químicos

Com o objetivo de atingir as melhores condições para a formação da molécula de Srl, utilizando HR-CS GF MAS, todos os experimentos realizados na otimização utilizaram soluções padrão aquosas de iodo, proveniente do KI, e monitorando a linha de absorção de 677,700 nm, a linha mais sensíveis para esta molécula.

O primeiro parâmetro a ser otimizado foi a massa de estrôncio adicionado ao forno de grafite, para a formação de Srl. Este precisa estar presente em excesso, a fim de garantir a completa reação de formação e também para que a variação do sinal analítico seja correspondente somente à variação da quantidade de iodo, e não a quantidade de estrôncio presente na amostra.

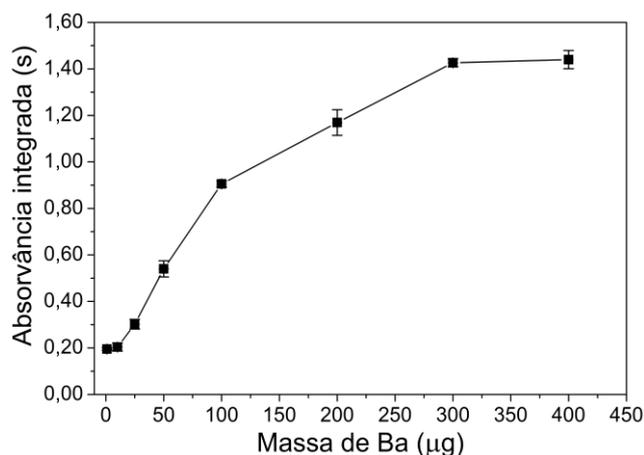
Para tal, 0,5 µg de iodo foram vaporizados juntamente com massas crescentes de estrôncio adicionadas ao forno de grafite, na presença de 10 µg paládio como modificador químico. A Figura 8 mostra a absorvância integrada para iodo em função da variação de massa de estrôncio, que apresenta uma relativa estabilidade de sinal para massas de estrôncio superiores a 300 µg. A massa de 400 µg foi escolhida como otimizada de forma a garantir a formação da molécula e evitar possíveis variações de absorvância.

Figura 8 – Otimização da quantidade de estrôncio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5  $\mu\text{g}$  de iodo (na forma de KI), com a adição de 10  $\mu\text{g}$  paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 677,700 nm de SrI. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas.



Também foi realizada a mesma investigação para a molécula de BaI, com o objetivo de garantir as melhores condições experimentais para a molécula já estudada. A mesma massa de iodo, 0,5  $\mu\text{g}$ , foi adicionada ao forno de grafite, juntamente com quantidades crescentes de bário. Não foi adicionado modificador químico, como relatado na literatura. O resultado desta otimização encontra-se na Figura 9, onde a absorvância integrada para iodo apresenta relativa estabilidade também com massas superiores a 300  $\mu\text{g}$  de bário.

Figura 9 – Otimização da quantidade de bário adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5  $\mu\text{g}$  de I (como KI), monitorando a linha de absorção molecular de 538,308 nm de BaI. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas.



A segunda etapa foi a escolha da quantidade de modificadores químicos que proporcionassem uma adequada formação e estabilidade da molécula diatômica em temperaturas altas.

Apesar do escasso número de trabalhos relatados na literatura, utilizando a formação de moléculas diatômica para análise de iodo por HR-CS GF MAS, muitos trabalhos utilizam modificadores permanentes e modificadores em solução para estabilizar a molécula alvo durante a pirólise e vaporização.

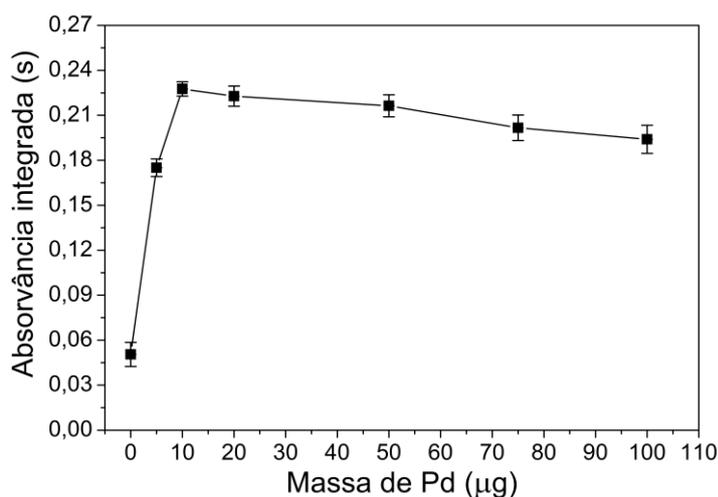
O modificador permanente testado neste trabalho foi o zircônio e que apesar de proporcionar maior simplificação e rapidez de análise, não contribuiu de maneira significativa para a estabilidade da molécula ou proteção do forno de grafite.

A investigação dos modificadores químicos convencionais iniciou-se analisando a influência dos metais do grupo da platina na estabilização molecular. Foram eles: paládio (na forma de nitrato e nanopartículas) e platina (nanopartículas).

Os mesmos problemas encontrados na determinação de cloro com os modificadores de paládio e platina na forma de nanopartículas foram encontrados. As nanopartículas possuem algum tipo de contaminação dos reagentes utilizados na sua síntese, que contribuem para a elevação do ruído da linha base (RESANO; FLÓREZ, 2012).

Dessa forma, paládio na forma de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  foi utilizado como modificador em solução, pois a presença do mesmo no forno de grafite melhora a sensibilidade e a estabilidade da molécula diatômica. A Figura 10 apresenta a variação de absorvância integrada para 0,5  $\mu\text{g}$  de iodo (na forma de KI), com 400  $\mu\text{g}$  de estrôncio e concentrações crescentes de paládio, utilizando a molécula Srl com linha de monitoramento de 677,700 nm.

Figura 10 – Otimização da quantidade de paládio adicionada ao forno de grafite. A confecção desta curva utilizou 0,5  $\mu\text{g}$  de iodo (como KI), com a adição de 400  $\mu\text{g}$  de Sr e quantidades crescentes de paládio (como nitrato), monitorando a linha de absorção molecular de 677,700 nm de Srl. A incerteza de cada ponto é expressa como o desvio padrão de três réplicas.



Como pode ser visto na Figura 10, os melhores resultados foram obtidos a partir de uma quantidade de 10  $\mu\text{g}$  de Pd adicionada a plataforma.

O mesmo estudo foi realizado para a linha de Bal (538,308 nm), utilizando as mesmas condições e nenhuma melhoria no sinal analítico foi observada. Mais informações sobre esse comportamento são discutidas na próxima seção.

A determinação de iodo nas formas inorgânica e orgânica nas amostras sólidas de medicamento apresentaram intensidades de absorvância diferentes, para a mesma massa de iodo. Dessa forma, fica claro que a formação da molécula

acontece de forma diferente para as duas amostras, o que explica a ausência de trabalhos recentes envolvendo este tipo de determinação.

Quando a análise tem como objetivo a determinação de iodo em medicamento contendo sua forma inorgânica, a absorvância encontrada em uma massa da amostra deste medicamento é semelhante à encontrada na mesma massa de iodo de soluções padrão aquosas de KI somados de 400 µg de estrôncio como formador da molécula e 10 µg de paládio.

Porém, quando a amostra contém iodo na sua forma orgânica, a absorvância de uma massa do medicamento é cerca de 50% superior a encontrada na mesma massa de iodo em soluções padrão aquosas de KI somados de 400 µg de estrôncio e 10 µg de paládio. Foram realizados alguns testes com variação de temperatura de pirólise e atomização, assim como massa de modificadores e reagente formador de molécula, onde não se obteve a diminuição do sinal analítico em relação ao sinal obtido pelo padrão aquoso nas mesmas condições. A possibilidade de interferência espectral e não espectral foi descartada após alguns estudos sobre interferentes e pela alta reprodutividade da medida do sólido.

Dessa maneira, foi necessário adicionar outros componentes para que os padrões aquosos de iodo proporcionassem sinais analíticos mais semelhantes aos produzidos pela amostra. A maneira encontrada para isso, foi deixando o padrão aquoso mais semelhante a matriz do medicamento Levotiroxina Safoni®, com a adição de dois componentes: ácido cítrico e tioureia.

A adição de ácido cítrico é facilmente encontrada em trabalhos relatados na literatura, com o objetivo de aumentar o teor de carbono dentro do forno de grafite (BURGUERA et al, 2001; RESANO et al., 2009).

Somente com a adição do ácido cítrico, os padrões aquosos apresentaram uma melhora de sensibilidade, porém ainda insuficiente quando comparado ao sinal analítico da amostra de medicamento a base de iodo orgânico. Sendo assim, buscou-se outro modificador que proporcionasse a compatibilidade do sinal analítico dos padrões aquosos com o obtido na amostra.

A adição da tioureia à curva de calibração aquosa proporcionou um sinal analítico bastante adequado quando comparado ao obtido pela amostra sólida de

Levotiroxina Safoni<sup>®</sup>, apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado. Apesar disso, algumas inferências podem ser realizadas a fim de elucidar uma futura proposta de mecanismo.

Em um primeiro momento, ao adicionar a solução de tioureia sob a plataforma contendo os demais componentes da curva de calibração aquosa, observou-se uma mudança da coloração levemente amarelada para um ocre com precipitação visível. Ao reagir os componentes de forma separada e de dois em dois, observou-se que a formação desse novo composto acontece ao misturar as soluções de tioureia com nitrato de paládio. Assim, fica claro que ocorre a formação de algum tipo de complexo entre o metal e a tioureia, que pode estar proporcionando uma maior estabilidade/interação do paládio para a formação da molécula de Srl, aumentando a sensibilidade da mesma.

A literatura relata que a tioureia é comumente encontrada como agente recuperador do paládio em reações nas quais o mesmo é utilizado como catalisador. O complexo formado tem possível fórmula molecular  $\text{Pd}(\text{CH}_4\text{N}_2\text{S})_4^{2-}$ , de coloração laranja escura, compatível com a encontrada sob a plataforma (PAIVA et al., 2014).

Ao adicionar tioureia na amostra sólida de iodo orgânico (Levotiroxina Safoni<sup>®</sup>) e inorgânico (Yodocefal<sup>®</sup>) uma diminuição da intensidade do sinal analítico é observada, provavelmente pela difícil formação do complexo em fase sólida ou pela interação do restante da matriz com o complexo formado.

Então, para a análise de iodo na forma orgânica, somente para a curva de calibração aquosa, massas crescentes de iodo na forma de KI foram adicionadas juntamente com 400 µg de estrôncio como formador da molécula, 2 mg ácido cítrico, 10 µg de paládio e 100 µg de tioureia. Para a análise de amostra de medicamento, foram adicionados somente 400 µg de estrôncio como formador da molécula e 10 µg de paládio.

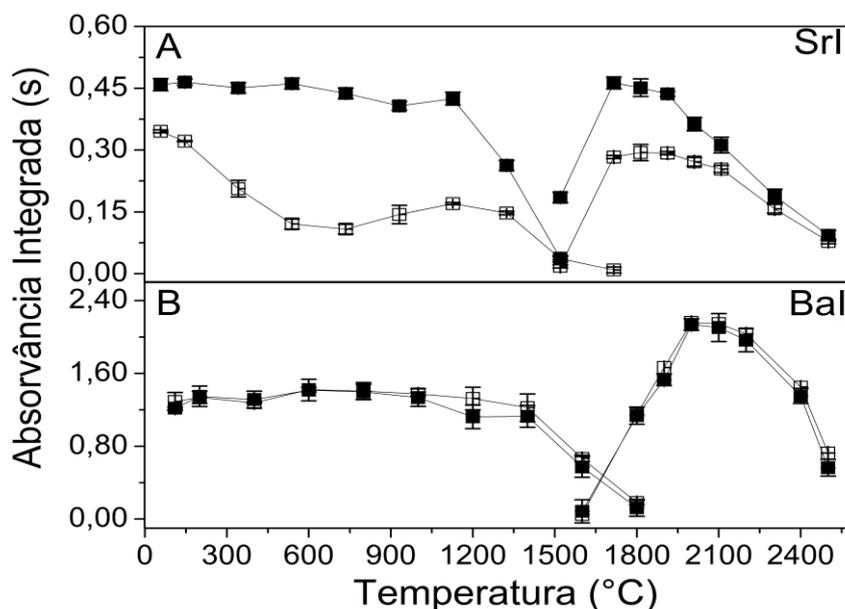
#### 4.4.1.3 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização

Assim como para a molécula de CaCl, as curvas de otimização das temperaturas de pirólise e vaporização foram elaboradas para que o comportamento

térmico, das moléculas de Srl e Bal, na presença e ausência do modificador químico paládio, fosse investigado. Nas curvas de pirólise e vaporização a adição de ácido cítrico e tioureia para a molécula de Srl não foi apresentado, uma vez que a adição dos mesmos proporciona o mesmo comportamento térmico, somente sendo alterado a intensidade das absorvâncias integradas.

A Figura 11 mostra estas curvas para 1  $\mu\text{g}$  de iodo na presença de 400  $\mu\text{g}$  de Sr quando monitorado a linha de absorção molecular 677,700 nm, para a molécula Srl e 400  $\mu\text{g}$  de bário quando monitorado a linha de absorção molecular 538,308 nm para a molécula de Bal, ambos com e sem a adição de 10  $\mu\text{g}$  de Pd como modificador químico.

Figura 11 – Curvas de pirólise e vaporização obtidas através da análise de 1  $\mu\text{g}$  de I e 400  $\mu\text{g}$  de Sr (quadro A) e 400  $\mu\text{g}$  de Ba (quadro B), com a adição de 10  $\mu\text{g}$  de Pd (■) ou sem a adição de modificador químico (□), monitorando a linha de absorção molecular para Srl, 677,700 nm e 538,308 nm para Bal. A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas.



Como pode ser visto na Figura 11, no quadro A, para a molécula de Srl tanto na etapa de pirólise quanto na vaporização, a adição de paládio proporciona uma

melhora na sensibilidade da molécula e um aumento da estabilização da mesma até 1200 °C na etapa de pirólise.

Na etapa de vaporização, os valores máximos de absorvância integrada são obtidos entre 1800 e 2000 °C, e para a curva que não utiliza paládio a estabilidade é alcançada entre 1800 e 2200 °C. Apesar de maior estabilização, a não utilização de paládio proporciona uma diminuição da sensibilidade.

Dessa maneira, as temperaturas utilizadas na determinação de iodo utilizando a molécula de Srl foram de 600 °C para a pirólise e 2000 °C para a vaporização. Uma temperatura mais baixa de pirólise, além de eliminar de forma eficiente a matriz orgânica dos medicamentos, aumenta o número de ciclos úteis do forno de grafite, uma vez que com a utilização de altas concentrações do agente formador da molécula, o mesmo tende a diminuir o tempo de vida do forno de grafite. Utilizando este método, cada forno de grafite e plataforma de sólidos proporciona cerca de 250 queimas.

Ao analisar o comportamento térmico da molécula Bal, apresentado no quadro B da Figura 11, os resultados vão ao encontro do que está descrito na literatura a respeito desta molécula, onde a adição de paládio não contribui de forma significativa para a formação e estabilização da molécula (HUANG et al., 2009).

Como não houve diferença significativa entre os perfis temporais e de intensidade de absorção molecular em nenhuma das temperaturas analisadas, foi definido 600 °C para a etapa de pirólise e 2200 °C para a vaporização.

O trabalho publicado por Huang e colaboradores (2009) apresenta diversos testes com outras moléculas, incluindo Srl. Os autores relatam que não houve aparição de sinal analítico, apesar do uso de elevada concentração de iodo. Isso pode ser justificado pelas condições usadas, uma vez que os testes não abrangeram a utilização de modificadores químicos e o mecanismo da formação de Srl, como mostra a Figura 11, é fortemente dependente do mesmo.

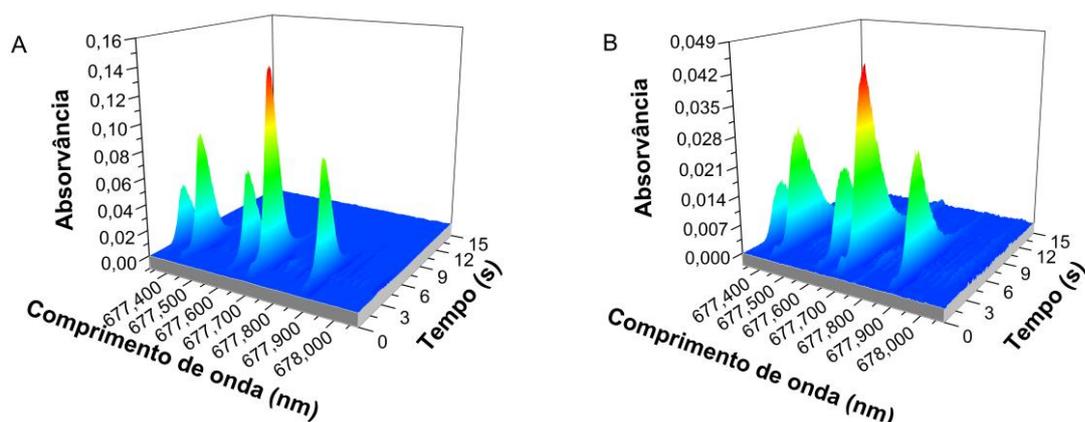
Resíduos na plataforma de sólidos somente foram observados ao utilizar massas elevadas de amostra (acima de 2 mg). A remoção destes resíduos foi realizada manualmente, e foi suficiente para garantir a boa reprodutividade.

#### 4.4.2 Análise direta em amostras sólidas usando Srl

Após a otimização dos métodos, foram realizadas as aplicações dos mesmos às amostras de medicamentos, apresentadas na Tabela 7. A curva de calibração foi realizada adicionando de forma direta os padrões líquidos, formadores de molécula e modificadores químicos à plataforma e, posteriormente, levadas até o forno de grafite. O programa de temperatura da Tabela 8 foi aplicado e o sinal registrado. Para análise dos sólidos, a plataforma foi pesada e tarada pela microbalança, e com o auxílio das pinças do amostrador sólido, a plataforma é trazida a posição inicial para a inserção da amostra sólida. Previamente, a amostra de medicamento foi macerada com o auxílio de gral e pistilo, e com uma espátula, pequenas quantidades de amostra são inseridas na plataforma e levadas a microbalança para a pesagem. Após o ajuste da massa de amostra, o formador de molécula e os modificadores químicos são adicionados sobre esta massa de amostra e levadas pelas pinças do amostrador ao forno de grafite. O mesmo programa de temperatura da curva de calibração foi aplicado.

A Figura 12 apresenta dois espectros resolvidos no tempo obtidos pela formação e vaporização de Srl, utilizando 1,606 mg do medicamento Yodocefal® (quadro A) e 2,973 mg do medicamento Levotiroxina Sanofi®, ambos centralizados no comprimento de onda 677,700 nm. Os sinais proporcionados pela análise direta dos sólidos para estas amostras são bem definidos e semelhantes.

Figura 12 – Espectros de absorção molecular resolvidos no tempo para a molécula de Srl provenientes da vaporização de 1,606 mg do medicamento Yodocefol® (quadro A) e 2,973 mg do medicamento Levotiroxina Sanofi® (quadro B), juntamente com 10 µg de Pd e 400 µg de Sr. O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 8.



Finalmente, os resultados obtidos para a determinação de iodo em duas amostras de medicamentos contendo iodo, de diferentes formas, são apresentados na Tabela 11 e se mostram de acordo com os fornecidos pelos rótulos e pela análise comparativa por ICP-MS, além de possuírem valores adequados de desvio padrão relativo para sólidos, ficando entre 7 e 9%.

Tabela 12 – Resultados da determinação em dois medicamentos utilizando análise direta de sólidos por HR-CS GF MAS via Srl expressos através da mediana de 10 replicatas, utilizando 10 µg de Pd, 400 µg de Sr e as condições de temperatura da Tabela 8. As incertezas expressas são referentes ao desvio padrão.

	Valor informado no rótulo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Valor encontrado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) HR-CS GF MAS	Valor encontrado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) ICP-MS
Yodocefol®	2000	$2127 \pm 155,6$	$1998 \pm 131,3$
Levotiroxina Sanofi®	317,6	$327,8 \pm 28,75$	$316,7 \pm 2,104$

Como o valor apresentado pelo rótulo do medicamento não pode ser considerado como valor verdadeiro, e sim como valor indicativo, para a confirmação dos resultados obtidos por HR-CS GF MAS, estes foram comparados com os obtidos por ICP-MS para as duas amostras de medicamento a base de iodo. Para

tal, foram realizados o Teste t de Student, ambos com um nível de confiança de 95%, entre os resultados das duas técnicas.

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  para os resultados das duas técnicas envolvendo a análise de Yodocefal® foi de 1,925, e para Levotiroxina Sanofi® foi de 2,126, sendo o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  igual a 2,262 para um intervalo de confiança de 95% e grau de liberdade igual a 9. Como os valores de  $t_{\text{calculado}}$  são menores que o de  $t_{\text{tabelado}}$ , podemos dizer que os valores apresentados pelas duas técnicas para a análise de iodo, em ambos os medicamentos são estatisticamente similares.

Considerando a dificuldade da formação molecular no forno de grafite associado a análise direta de sólidos, os resultados foram considerados satisfatórios para a análise de iodo em medicamentos.

#### **4.4.3 Comparação das moléculas Srl e Bal**

Após a otimização e validação do método utilizando a molécula de Srl para a determinação de iodo em amostras sólidas de medicamentos, buscou-se o método já descrito na literatura como base (HUANG et al., 2009), que utiliza a molécula de Bal, para fins de comparação. Essa escolha tem como justificativa a investigação da aplicabilidade das duas moléculas na determinação de iodo utilizando amostragem sólida.

A Tabela 12 apresenta os valores informados no rótulo dos medicamentos Yodocefal® e Levotiroxina Safoni®, juntamente com os resultados obtidos pelas análises de iodo neste medicamento por HR-CS GF MAS utilizando as moléculas de Srl e Bal.

Tabela 13 – Informações sobre a constituição e determinação de iodo em Yodocefol® e Levotiroxina Sanofi®, através da análise direta de sólidos usando HR-CS GF MAS expressos através da mediana de 10 replicatas, pela da formação molecular de Srl e Bal, utilizando as condições da Tabela 8. As incertezas expressas são referentes ao desvio padrão.

Medicamento	Informação do rótulo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Resultados usando Srl ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Resultados usando Bal ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Yodocefol®	2000	2127 $\pm$ 155,6	1117 $\pm$ 246,8
Levotiroxina Sanofi®	317,6	327,8 $\pm$ 28,75	117,2 $\pm$ 25,98

Como pode ser visto na Tabela 12, os resultados obtidos utilizando a molécula Bal, mesmo após a otimização, não foram satisfatórios para análise de medicamentos de forma direta. Isso não é um resultado surpreendente, uma vez que não há relato na literatura deste tipo de análise direta envolvendo esta molécula para a determinação de iodo.

Para verificar se os resultados de iodo obtidos através das duas moléculas estudadas neste trabalho eram estatisticamente similares, foi aplicado o Teste t de Student. Os resultados do Teste t para a molécula de Srl já foi apresentado no item anterior, sendo estatisticamente similares a informação oferecida pelo rótulo.

Para a análise estatística entre os resultados das duas moléculas utilizando a técnica de HR-CS GF MAS, aplicamos o Teste t que leva em consideração as diferenças individuais. Sendo assim foi encontrado um valor de  $t_{\text{calculado}}$  de 14,485 para as duas moléculas. Como o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  para um intervalo de confiança de 95% e um grau de liberdade igual a 9, temos o valor de 2,262, podemos inferir que os resultados obtidos entre as duas moléculas são considerados estatisticamente diferentes.

Dessa maneira podemos concluir que os resultados obtidos para a molécula de Srl utilizando amostragem sólida direta apresenta valores estatisticamente semelhantes ao apresentado pelo rótulo de ambos os medicamentos e aos valores obtidos pela técnica de ICP-MS. Já a molécula de Bal, também utilizando

amostragem sólida direta apresenta valores estatisticamente diferentes daqueles declarados nos rótulos dos medicamentos e que os mesmos são sistematicamente menores do que os de referência.

Dessa forma, este trabalho propõe de forma satisfatória a superação do problema envolvendo análise direta em sólidos para a determinação de iodo através da utilização da molécula de Srl pela técnica de HR-CS GF MAS.

#### 4.4.4 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito avaliados para a molécula de Srl, na linha de absorção molecular de 677,700 nm, neste trabalho foram: Faixa linear, curva de calibração, massa característica, sensibilidade, LOD e LOQ. Estes parâmetros já foram elucidados no item 3.4.4 e estão descritos na Tabela 13.

Tabela 14 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de iodo por HR-CS GF MAS via absorção molecular de Srl. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ).

Parâmetro	
Faixa linear	0,117 – 10 $\mu\text{g}$
Curva analítica	$y_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,3001x_i + 0,0169$
R	0,9995
Massa característica	14,66 ng
LOD	0,035 $\mu\text{g}$ / 3,5 $\text{mg.L}^{-1}$
LOQ	0,117 $\mu\text{g}$ / 11,7 $\text{mg.L}^{-1}$

## 4.5 CONCLUSÕES

Após a investigação das janelas espectrais dos comprimentos de onda e suas sensibilidades, juntamente com o comportamento térmico da molécula de Srl, realizou-se a etapa de otimização das massas de reagente formador da molécula e do modificador em solução (paládio).

A aplicação do método otimizado foi realizado através da análise de medicamentos contendo iodo (Yodocefol® e Levotiroxina Sódica®). Os resultados obtidos foram avaliados por ICP-MS para avaliação da exatidão. Após análise estatística, os mesmos foram considerados semelhantes.

Realizou-se para comparação a determinação de iodo através da análise direta dos mesmos medicamentos via absorção molecular de Bal. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente distintos dos encontrados por ICP-MS.

Os resultados obtidos acrescentam uma inovação à determinação de iodo por amostragem direta de sólidos, uma vez que o único trabalho relatado na literatura pela mesma técnica apresenta a determinação de iodo em solução após a dissolução e posterior decantação de medicamentos (HUANG et al., 2009). A mesma molécula utilizada neste trabalho (Bal) também não apresentou bons resultados na análise direta de sólidos, justificando a necessidade da dissolução dos medicamentos.

Dessa maneira, este trabalho propôs de forma satisfatória a determinação de iodo por HR-CS GF MAS via Srl utilizando amostragem direta de sólidos. Os resultados obtidos estão de acordo com os informados pelo rótulo dos medicamentos, além de terem sido comparados por ICP-MS. O método possui um bom limite de quantificação (0,117 µg), podendo ser aplicado a diferentes teores de iodo em diversos medicamentos.

## **5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO UTILIZANDO AMOSTRAGEM DIRETA EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

O mercúrio apresenta características interessantes, como ser um bom condutor e baixa temperatura de fusão (líquido em temperatura ambiente) que permite a combinação com outros metais na formação de amálgama. Essas características permitem seu uso em eletrodos e lâmpadas, assim como diversos produtos industriais como: fungicidas, herbicidas, corantes e medicamentos (MARTÍN-YERGA; GONZÁLEZ-GARCÍA; COSTA-GARCÍA, 2013).

Apesar disso, somente a partir da década de 50, após a contaminação das águas marítimas da costa de Minamata, no Japão, que trouxe sérias consequências na saúde de milhares de pessoas, tomou-se consciência do grau de sua toxicidade (HA et al., 2016).

Desde então, o monitoramento deste elemento, em todas as suas formas (orgânica, inorgânica e elementar), em diversos tipos de amostras, vem sendo o objetivo de muitos trabalhos de pesquisa. Apesar da toxicidade de cada forma do mercúrio ser diferente, todas possuem consequências graves à saúde humana e ao meio ambiente.

A intoxicação pode ocorrer de diferentes maneiras, sendo a mais comum a ingestão de alimentos que foram contaminados em seu ambiente de cultivo. Mesmo quando a intoxicação acontece em pequenas quantidades, devido a sua capacidade de bioacumulação, o consumo contínuo deste alimento pode resultar em um aumento da concentração do metal no organismo e conseqüentemente, sérios problemas de saúde. Essa contaminação ambiental pode ser proveniente de fontes naturais ou antropogênicas, sendo a última mais significativa e proveniente de aplicações de fungicidas e herbicidas em alimentos, bem como a utilização na indústria do papel e eletroquímica e seu mau gerenciamento de resíduos.

Após a inserção do metal no organismo, sua acumulação ocorre no fígado, cérebro e tecido ósseo, causando falência renal, transtornos neurológicos e até mesmo a morte (MARTÍN-YERGA; GONZÁLEZ-GARCÍA; COSTA-GARCÍA, 2013).

A avaliação da intoxicação por mercúrio é normalmente realizada pela análise do metal em amostras de urina e sangue. O teor de mercúrio encontrado na urina normalmente remete a exposição recente do metal na sua forma inorgânica ou elementar. No entanto, a forma  $\text{Hg}^{2+}$  se acumula nos rins, sendo lentamente excretado através da urina, dessa forma atuando também como um marcador de intoxicação a longo prazo. Normalmente os níveis do metal encontrados na urina são inferiores a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ , em uma população que não foi exposta de forma direta ao metal (FERNÁNDEZ et al., 2016).

Já o mercúrio na sua forma orgânica, é normalmente eliminado através do processo de desmetilação e excreção nas fezes, sendo raramente encontrado em urina. O mercúrio nesta forma possui uma meia vida maior, e é rapidamente absorvido pelo sistema digestivo e acumulado nas células vermelhas do sangue. Como esse tipo de composto circula no sangue por um tempo maior, sua acumulação em diferentes órgãos também é maior, podendo ser encontrado principalmente no sistema nervoso central. Sua concentração normal, em adultos de uma população não exposta é menor que  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  em adultos.

Com isso, há uma constante busca por métodos que proporcionem o adequado monitoramento da quantidade total de mercúrio em amostras de urina e sangue. Nesse sentido, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de método analítico para a determinação direta de mercúrio nessas amostras por HR-CS GF AAS, empregando nanopartículas de ouro como modificador químico.

Como método comparativo, foi realizada a análise de mercúrio nas mesmas amostras de urina e sangue, utilizando como base o trabalho publicado na literatura que emprega permanganato de potássio como estabilizante do analito, em amostras sólidas para a determinação de mercúrio (SILVA et al., 2006).

### 5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, o qual visa o desenvolvimento de método analítico para a determinação de mercúrio, por análise direta em amostras de sangue e urina de forma direta por HR-CS GF AAS, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- I. Estabelecer as melhores condições que permitam a determinação de mercúrio nas amostras e nos padrões aquosos com a adequada sensibilidade;
- II. Investigar o comportamento térmico através da realização de curvas que proporcionem a otimização de temperatura de pirólise e atomização;
- III. Verificar a possibilidade de utilização de nanopartículas de ouro como modificador químico para proporcionar adequada volatilidade ao analito, juntamente com a otimização de sua massa e tamanho;
- IV. Aplicar o método desenvolvido para a determinação de mercúrio em amostras de urina e sangue certificadas;
- V. Comparar os resultados obtidos com o método já publicado que utiliza o permanganato de potássio como estabilizador de mercúrio.

## 5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.2.1 Mercúrio

#### 5.2.1.1 Histórico e características

O elemento químico mercúrio, de símbolo Hg (do latim *hydrargyrum*, que significa prata líquida) é conhecido e usado desde a antiguidade, principalmente na forma de amálgama, desde 500 AC (GREENE, 2014). O elemento recebeu esse nome relacionado ao Deus grego Mercúrio, cuja característica é a velocidade e mobilidade. Na China, cinábrio (HgS), de cor vermelha ou preta, era utilizado como pigmento em tintas vermelhas há mais de 3000 anos.

Já no século IV AC, Aristóteles usou o nome “fluido de prata” para a substância usada em cerimônia religiosa. Hipócrates também menciona o seu uso na medicina. Já no primeiro século depois de cristo, surgiram os primeiros relatos de intoxicação pelos escravos que trabalhavam nas minas de extração de ouro. Apesar disso, o elemento continuou a ser usado, principalmente na tentativa de transformar mercúrio em ouro.

Um dos alquimistas da era renascentista, Philippus Aureolus Theophrastus Bombast von Hohenheim (1493 - 1541), fez o primeiro relato do motivo da intoxicação dos escravos, sendo esta devido à inalação da poeira tóxica e não devido à espíritos como se acreditava na época (FORRAI, 2007).

Sua aplicação teve seu ápice na mineração do ouro, onde é usado para formar um amálgama com o metal precioso, possibilitando sua extração, posterior aquecimento e separação. Esse processo, ainda que pouco fiscalizado, é usado até os dias de hoje.

O elemento químico mercúrio possui a coloração branco-prateado e é inodoro, localizado no sexto período e família IIIB da tabela periódica atual. Seu número atômico é 80 e sua massa 200,59 u. Seu ponto de fusão igual a  $-38,83^{\circ}\text{C}$  proporciona uma característica única a esse elemento, que é estar na forma líquida a temperatura ambiente. Possui elevada densidade ( $13,546 \text{ g.dm}^3$  a  $19,85^{\circ}\text{C}$ ),

apresentando características que sempre instigaram a curiosidade humana, de ser um líquido muito denso e prateado.

Possui alta tensão superficial (não ficando aderido a superfícies vítreas), condutividade térmica ( $8,34 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) e grande poder de assepsia por oxidar facilmente a matéria orgânica. É considerado um metal não-essencial a vida, ou seja, não é essencial para nenhum tipo de processo biológico, porém apresenta uma alta capacidade de acumulação nos seres vivos.

Devido a sua configuração eletrônica (Xe):  $4f^{14} 5d^{10} 6s^2$ , seus estados de oxidação mais comuns são o 0, +1 e +2. Sua forma inorgânica pode ser normalmente encontrada nesses três diferentes estados de oxidação: a forma elementar ( $\text{Hg}^0$ ), e as oxidadas, como o íon mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Quando presentes em compostos orgânicos, normalmente o íon mercúrio está ligado covalentemente a um radical, sendo os mais comumente encontrados o metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) e o dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) (MICARONI et al., 2000).

#### 5.2.1.2 Abundância, obtenção, uso e contaminação

A concentração de mercúrio na crosta terrestre é de, aproximadamente,  $80 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  e se distribui através de processos naturais, como a erupção de vulcões, incêndios, movimento dos rios, lagos e oceanos e processos biológicos (IQBAL; ASMAT, 2012). O mercúrio pode estar presente em diversos tipos de minérios, sendo mais comumente encontrado em calcário, arenito, serpentina, andesita, basalto e riolita. Dentre esses tipos, o minério que possui maior teor de mercúrio é a cinábrio (86,2% de Hg).

Em combustíveis fósseis a concentração de mercúrio pode variar de 10 a 8.530 ppb, em carvão de 20 a 300.000 ppb, em petróleo bruto de 20 a 2.000 ppb, em petróleo sem refino, em terreno com elevados teores de mercúrio de 1.900 a 21.000 ppb e betume e asfalto de 200 a 900.000 ppb.

Os combustíveis fósseis que contém elevados teores de mercúrio proporcionam uma maior contaminação ambiental, uma vez que durante a sua

queima libera o metal ao ar, ocorrendo a posterior contaminação de solos e águas (NASCIMENTO; CHASIN, 2001).

A emissão de mercúrio através de atividades antropogênicas é estimada em 2.000 a 3.000 toneladas/ano, e existem dados que apontam que de 2.000 toneladas de mercúrio emitidas desde 1890, cerca de 95% permanecem no solo, 3% em águas oceânicas superficiais e 2% na forma de vapor na atmosfera (MICARONI et al., 2000).

A produção de mercúrio é realizada com maior intensidade nos países como Espanha, Rússia e Canadá. A maior parcela de produção de mercúrio ocorre através da extração do minério cinábrio. Normalmente essa extração ocorre através da reação do minério com oxigênio, oxidando o enxofre e liberando o mercúrio metálico (IQBAL; ASMAT, 2012).

O mercúrio é utilizado por indústrias na fabricação de lâmpadas e tubos fluorescentes, termômetros e outros instrumentos, como medidores de pressão, lentes de telescópios, lâmpadas ultravioletas, interruptores, eletrodos e turbinas de vapor. Outras indústrias também utilizam mercúrio, como a metalurgia de ouro e prata, fabricação de pilhas e baterias, amálgamas dentários, pesticidas e produtos farmacêuticos.

Sempre que uma indústria utiliza mercúrio como matéria-prima ou componente, existe associado a esse processo o risco de intoxicação ocupacional. Ainda que a utilização desse elemento em grande parte dessas indústrias tenha sido diminuída, tanto pela consciência ambiental e toxicológica quanto pelo avanço da tecnologia que permite a substituição desse elemento por outros, a emissão de mercúrio pela queima de combustíveis fósseis é ainda preocupante (RAMÍREZ, 2008).

A mineração do ouro é maior fonte de demanda e emissão de mercúrio (37%), sendo que entre 2005 e 2010 as emissões do metal duplicaram (UNEP, 2013). Mercúrio é usado na mineração do ouro com a função de extração do ouro, isso se dá pela capacidade do mercúrio de formar amálgama com a maioria dos metais, com exceção do ferro e a platina. Amálgama pode ser definido como uma

liga entre o mercúrio com outro metal, onde nesse caso é composta por partes iguais de mercúrio e ouro.

Uma vez formado o amálgama e extraído o ouro, a liga é aquecida e o mercúrio é levado ao estado de vapor, separando o ouro. Esse tipo de extração ainda é utilizada, principalmente em comunidades pequenas, devido ao baixo custo e facilidade da separação, quando comparado a métodos alternativos (UNEP, 2013a).

O aumento pela demanda e escassez de ouro faz com que seu preço aumente consideravelmente, e com isso a busca por novas minas acontece pelo mundo todo. A exploração em pequena escala e utilizando mercúrio como extrator ocorre principalmente na América do Sul, África e Ásia, sendo também encontrado em menores proporções na América do Norte e Austrália (GIBB; O'LEARY, 2014).

A contaminação por mercúrio no homem pode ocorrer de duas maneiras: ocupacional ou ambiental. A primeira é aquela que ocorre através da exposição trabalhista, como por exemplo, em mineração e indústrias. Essa contaminação normalmente ocorre através das vias respiratórias, podendo ser identificada por meio da dosagem de mercúrio na urina. Os compostos que causam esse tipo de intoxicação são normalmente sais de mercúrio ou a substância simples. Já contaminação ambiental, pode ser provocada pela ingestão de alimentos ou águas contaminadas, proveniente do ambiente marinho ou de água doce. Esse tipo de contaminação leva o metal diretamente a corrente sanguínea, onde irá provocar problemas ao sistema nervoso central. A comprovação desta contaminação pode ser através da determinação de mercúrio em amostras de cabelo ou sangue. Os compostos de mercúrio normalmente responsáveis por este tipo de contaminação são os orgânicos, dentre os quais metilmercúrio ganha destaque.

Ambos os tipos de contaminação, ocupacional e ambiental, apresentam compostos que atravessam a barreira placentária, causando sérios problemas no desenvolvimento do feto (SOUZA; BARBOSA, 2000).

### 5.2.1.3 Toxicidade, mecanismos de ação e tratamento

A toxicidade do mercúrio em humanos varia de acordo com a espécie química, quantidade e tempo de exposição ao metal. Além disso, as espécies que ocasionaram a intoxicação podem se interconverter em outras. Por exemplo, vapor de mercúrio ( $\text{Hg}^0$ ) inalado é facilmente absorvido pelas membranas do sistema respiratório e rapidamente convertido a sua forma oxidada ( $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{Hg}_2^{2+}$ ), mas não tão rápido a ponto de evitar a deposição do metal no cérebro (BERNHOF, 2012).

Em todos os seus estados de oxidação o mercúrio pode causar alteração na estrutura de proteínas por causa da sua elevada afinidade de ligação com o enxofre presente nesses aminoácidos. Por causa disso, o metal pode ser um potencial responsável pelo mau funcionamento de qualquer órgão ou célula.

Apesar do cérebro ser o órgão mais afetado, mercúrio metálico também se deposita nas glândulas mamárias, tireoide, suprarrenais, salivares, miocárdio, músculos, fígado, rins, pele, pâncreas, pulmões, testículos, próstata, sendo associado a disfunção apresentada por esses órgãos (ADAMS et al., 2010; AZEVEDO et al., 2012; BERNHOF, 2012).

Os principais sintomas de intoxicação são bronquite erosiva, podendo levar a insuficiência respiratória, associada a tremores devido à danos ao sistema nervoso central. Quando a intoxicação ocorre de forma crônica, disfunções neurais mais severas são apresentadas (GARNIER; FUSTER; CONSO, 1981)

A excreção do mercúrio metálico se dá através da oxidação do mesmo até a formação do mercúrio mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). A meia vida dos dois compostos varia muito, pois dependem do órgão em que se encontram depositados e o seus estados de oxidação, podendo variar desde poucos dias a vários meses, e em alguns grupamentos como o CNS possui uma meia vida de vários anos (BERLIN; ZALUPS; FOWLER, 2007).

Por sua vez, o sal de mercúrio  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (calomelano), que tem como íon o mercúrio mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ), tende a ser mais insolúvel e menos estável, dessa maneira apresenta menor absorção, quando comparado a outros tipos de compostos de mercúrio. Quando essa intoxicação ocorre, normalmente ocasiona dor

e descoloração das mãos e pés, conhecida como doença rosa ou acrodínia (GOODMAN; GILMAN, 1990).

O calomelano é ainda usado em algumas regiões do mundo como laxativo. Ainda que sua absorção no intestino seja pequena, alguma porção do mesmo é convertida em íon mercúrico, sendo absorvido pelo organismo. O íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ , proveniente do sal  $\text{HgCl}_2$ ) é usado como preservativo na fabricação de filmes fotográficos e em alguns cremes clareadores de pele. Somente 2% do mercúrio ingerido nessa forma são absorvidos inicialmente. Porém, acredita-se que o seu efeito corrosivo no sistema digestivo pode aumentar a sua absorção, quando a intoxicação ocorre por um tempo prolongado (NORSETH; CLARKSON, 1971; KOSTIAL; KELLO; JUGO, 1978).

Esse estado de oxidação do metal não permite que o mesmo atravesse a membrana hematoencefálica eficientemente, mas se acumula na placenta, tecidos fetais e fluídos amnióticos. A sua excreção é normalmente realizada através da urina e fezes, e em menor quantidade através do suor, lágrimas, leite materno e saliva (SUZUKI et al., 1977).

Assim como o mercúrio metálico, o íon mercúrico possui meia vida variável. São 42 dias para 80% da dose oral e os outros 20% não aparecem nas vias excretoras. Esse fato pode estar relacionado com a interconversão em outras espécies que levam muito tempo para ser excretadas. Já a forma orgânica, normalmente sendo referenciada como metilmercúrio, é amplamente estudada devido a sua estabilidade e presença nos diversos tecidos humanos (RAHOLA; HATTULA; LOROLAINEN, 1971).

O etilmercúrio apresenta um comportamento semelhante ao metilmercúrio em nível celular, porém apresenta um terço da meia vida de excreção do metilmercúrio. O vapor do metilmercúrio é absorvido com 80% de eficiência, semelhante ao mercúrio metálico. A intoxicação pelo sistema digestivo, a partir de alimento contaminado é uma via de fácil absorção, assim como a cutânea (BERLIN; ZALUPS; FOWLER, 2007).

Ao entrar na corrente sanguínea, o metilmercúrio também é atraído pelos grupos sulfidril das proteínas, em especial a cisteína. Dessa maneira, também pode

ser o desregulador de funções celulares de diferentes órgãos, sendo o cérebro o mais atingido. Ele é depositado em diversos tecidos, através da corrente sanguínea, onde o equilíbrio entre o sangue e os tecidos ocorre aproximadamente 4 dias após a exposição. A deposição do metilmercúrio ocorre no cérebro, fígado, rins, placenta, tecido fetal (especialmente o cérebro), bem como os nervos periféricos e medula óssea. O metilmercúrio depositado nesses tecidos, lentamente é convertido em mercúrio inorgânico (BERLIN; ZALUPS; FOWLER, 2007; SUDA; TAKAHASHI, 1992).

O tempo de meia vida de excreção do metilmercúrio no corpo humano é cerca de 39 a 70 dias, dependendo do grau de contaminação, sendo excretado 90% nas fezes. Dependendo do tempo de exposição, 20%, pode ser excretado no leite materno. O teor do mesmo no cabelo humano reflete a quantidade presente no sangue no momento da exposição, mas não o mercúrio na sua forma elementar e, portanto, não deve ser usado como medida total de mercúrio (BERGLUND et al., 2005; BERNHOFT, 2012; RICE et al., 2014).

O tratamento realizado para a intoxicação de mercúrio, seja qual for sua forma, é primeiramente remover o paciente da fonte de exposição. Como o mercúrio é eliminado gradualmente pelas vias excretoras, somente a retirada do paciente da fonte de exposição pode ser suficiente para a melhora ou reversão dos sintomas.

Em casos em que os indicadores biológicos (urina e/ou sangue) não apresentarem sinais de mercúrio ou os sintomas não regredirem, um tratamento mais agressivo é indicado, como o processo de quelação. O mesmo consiste em introduzir uma molécula com carga (normalmente uma que contenha enxofre em sua composição) no corpo humano com o intuito de que se realize uma ligação específica com o metal de carga oposta, facilitando a excreção do composto formado. Os agentes quelantes mais comumente usados para mercúrio é o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), BAL (2,3-dimercaptopropanol), NAP (N-acetil-D,L-penicilamina), DMSA (ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico) e DMPS (2,3-dimercapto-1-propanosulfonato) (RISHER; AMLER, 2005).

#### 5.2.1.4 Legislação

Devido à sua elevada toxicidade, persistência e elevado tempo de meia vida no ambiente e corpo humano, o monitoramento do elemento mercúrio é considerado de grande importância.

Como dito anteriormente, dependendo da sua forma, via e nível de exposição, a contaminação por esse metal pode trazer sérios riscos ao ecossistema, seja ele em sua forma aquática ou terrestre. Uma vez emitido ao ar, é levado por correntes aéreas, sendo levado até ambientes aquáticos para posterior depósito terrestre. A prova desse ciclo é a determinação de mercúrio em áreas não populadas, como o Ártico e Antártica, que estão localizadas muito distantes das fontes emissoras de mercúrio. Essa evidência classifica o mercúrio como um poluente global.

Desde 1970, a preocupação com a emissão acarretou no surgimento de considerável número de regulamentações, em diferentes países, no intuito de diminuir os níveis emitidos e, conseqüentemente, os riscos relacionados à exposição desse elemento. Estas propõem limites para diversos tipos de vias de exposição, como ar, água, solo, combustíveis fósseis, alimentos e materiais industrializados.

O nível de mercúrio normalmente encontrado no ar atmosférico é de 2 a 10 ng.m<sup>-3</sup>, entretanto a Agência Americana de Registro de Substâncias Químicas Tóxicas e Doenças (ATSDR, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) (ATSDR, 1999) reporta como nível máximo aceitável de mercúrio o valor de 200 ng.m<sup>-3</sup> para exposição crônica. Já a US EPA propõe um nível maior, de 300 ng.m<sup>-3</sup> (EPA, 1995).

A EPA e a WHO propõem um limite de mercúrio para água potável de 0,002 mg.L<sup>-1</sup> e 0,006 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (EPA, 2007; WHO, 2005).

A legislação brasileira através da portaria nº 2.914 (BRASIL, 2011) apresenta um valor ainda mais baixo para o controle de mercúrio em água potável, sendo 0,001 mg.L<sup>-1</sup> o valor máximo permitido. Para alimentos provenientes de ambientes aquáticos, como peixes, mariscos, crustáceos, entre outros, na sua forma fresca, congelada ou processada, e grãos de trigo rosa, o FDA apresenta um valor de 1

ppm, para uma porção de peixe comestível ou de 500 g de trigo, como o valor limite onde o produto pode ser retirado do mercado (EPA, 2000).

Órgãos europeus, como a comissão da comunidade europeia (CEC, do inglês, *Commission of the European Communities*) apresentam os mesmos valores para os alimentos supracitados (COMMISSION REGULATION, nº 1881, 2006).

Já no Brasil, para atender os interesses comerciais do Mercado Comum do Sul (Mercosul) os limites de mercúrio em peixes predadores são de 1 mg.Kg<sup>-1</sup> e 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> para os demais frutos do mar (RDC nº 42, 2013). Já para as embalagens de alimentos, a Anvisa possui a resolução nº 105 que define um máximo de 0,005 % (m/m) solúvel em HCl 0,1N (BRASIL, 1999).

Como o Brasil não é um produtor de mercúrio, a utilização do metal por indústrias ou qualquer outra instituição deve ser feita por importação. A entrada do metal e a sua devida comercialização é controlada pelo Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) através da portaria número 32, de 1995 (BRASIL, 1995) e o decreto número 97.634/89 (BRASIL, 1989)

Essas legislações obrigam o cadastramento de pessoas físicas e jurídicas que irão utilizar o mercúrio importado, juntamente com as atividades exercidas com o metal. Caso as atividades sejam potencialmente poluidoras, deverão ser classificados como comércio e transporte de substâncias perigosas, bem como controlados os seus resíduos sólidos ou qualquer outro impacto ambiental.

Apesar da consciência ambiental mundial sobre a utilização e toxicidade de mercúrio, o Brasil ainda não possui legislação que permita ao Ibama limitar o uso/comércio do metal, uma vez que a atividade esteja licenciada.

O uso de mercúrio na atividade da extração do ouro é proibido pelo decreto nº 97.507/89, com exceção de empresas licenciadas pelo órgão ambiental competente, além da obrigatoriedade da recuperação dessas áreas, degradadas pela atividade garimpeira (BRASIL, 1989)

Já o conteúdo não intencional de mercúrio em fertilizantes é controlado pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, sob número 27 de 2006, onde dispõe de um limite de 10 mg.Kg<sup>-1</sup> para fertilizantes de origem orgânica (BRASIL, 2006).

Para o esgoto urbano tratado e para a utilização na agricultura, o CONAMA apresenta uma resolução, sob número 357 de 2006, que estipula um limite máximo de  $17 \text{ mg.Kg}^{-1}$  do metal. Esse limite é maior do que o estipulado pelo ministério da agricultura para fertilizantes orgânicos (BRASIL, 2005).

A resolução 306 de 2004 da Anvisa estabelece que os resíduos de amálgamas dentários que contém mercúrio devem ser armazenados em recipientes resistentes e hermeticamente fechados, com selo de enxofre, e devidamente encaminhados para a recuperação dos resíduos, sendo o profissional da área responsável pelo adequado destino. Todos esses cuidados são realizados para tentar diminuir as possibilidades de contaminação ambiental (BRASIL, 2004).

Além disso, o decreto 7.404 de 2010 estabelece a responsabilidade e penalidade reversa, ou seja, os produtores também são responsáveis pelos cuidados com os resíduos gerados do produto vendido (BRASIL, 2010). Porém, em 2014, o projeto de lei nº 7.627 proíbe a utilização de mercúrio para a produção de amálgamas dentários e justifica sua aprovação com base na existência de materiais alternativos e esteticamente mais viáveis, como a resina composta (BRASIL, 2014b).

O carvão, como fonte energética de indústrias termelétricas, possui naturalmente mercúrio em sua composição, sendo a maioria na forma HgS. Sua concentração varia de 0,02 a 1 ppm, sendo normalmente encontrado de 0,05 a 0,8 ppm no Brasil e de 0,01 a 8 ppm nos Estados Unidos.

Após a sua combustão, ele é emitido na forma de material particulado (cinza volante) e outra parte fica retido na forma de cinzas pesadas ou ainda, retido no precipitador eletrostático (cinzas leves). Portanto, a quantidade de mercúrio liberada ao ambiente dependerá da tecnologia envolvida para a retenção do metal na saída da chaminé. Como o licenciamento para a geração de energia não exige monitoramento das emissões de metais na chaminé, o controle não está sendo monitorado por nenhuma resolução do CONAMA (BRASIL, 2011).

### 5.2.1.5 Determinação de mercúrio

Devido a sua elevada toxicidade ao homem e ao meio ambiente, causada por todos os seus estados de oxidação e compostos, é um elemento amplamente investigado na literatura.

A escolha da técnica analítica instrumental deve ser feita de forma adequada, uma vez que a pequena concentração encontrada naturalmente em algumas amostras, independente da espécie do mercúrio, deve ser compatível com o limite de detecção da mesma. Quando isso não é possível, pode-se utilizar uma etapa de pré-concentração, de forma a tornar compatível a quantidade encontrada naturalmente ao limite de detecção da técnica.

Além disso, outras etapas de preparação de amostra podem ser necessárias para adequar a amostra a técnica utilizada, como por exemplo, a decomposição por via ácida ou básica, micro-ondas e ultravioleta. Porém, qualquer uma destas etapas são passíveis de erro, pois podem perder o analito por volatilidade ou contaminação pelos reagentes empregados.

A técnica mais empregada para a determinação de mercúrio é a geração de vapor frio (CVG, do inglês *Cold Vapor Generation*) acoplada a espectrometria de absorção atômica (ALMEIDA et al., 2016) e espectrometria de fluorescência (HAN et al., 2007). Outras técnicas também são utilizadas como a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CENTINEO; GONZÁLEZ; SANZ-MEDEL, 2004), HPLC com detecção ultravioleta (DONG et al., 2004), ICP-MS (KRATA; VASSILEVA; BULSKA, 2016) e voltametria (SOMÉ et al., 2016).

Relatos da utilização de GF AAS para determinação de mercúrio em diferentes amostras podem ser encontrados na literatura (LIANG; KANG; MO, 2016; IZGI; DEMIR; GÜÇER, 2000; LÓPEZ-GARCÍA; SÁNCHEZ-MERLOS; HERNANDEZ-CÓRDOBA, 1997; BAXTER; FRECH, 1989). Porém a utilização desta técnica apresenta alguns problemas como o elevado sinal de fundo e dificuldades na correção do mesmo dependendo do tipo de amostra.

O uso de técnicas que permitam a análise direta de sólidos para a determinação de mercúrio se tornam uma atraente alternativa aos procedimentos

tradicionais de decomposição de amostras, devido a diminuição do risco de perda/contaminação de analito neste processo associado ao aumento de sensibilidade pela ausência de diluição.

Apesar da existência de equipamentos chamados “analisadores de mercúrio” permitir a análise de metal em amostras sólidas, eles possuem problemas como a falta de correção de fundo, que resulta em possíveis problemas com interferências, principalmente em amostras com alto teor orgânico. Além disso, a pesquisa científica prioriza o desenvolvimento de trabalhos utilizando equipamentos que permitam também a análise de outros elementos (RESANO; BRICEÑO; BELARRA, 2009A).

A espectrometria de absorção atômica utilizando forno de grafite se mostrou uma técnica adequada para a determinação de sólidos (TOROK; ZEMBERYOVÁ, 2012) ou suspensões (BERMEJO-BARRERA et al., 1994; LÓPEZ-GARCÍA; SÁNCHEZ-MERLOS; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 1997), utilizando a calibração com padrões aquosos, tornando o método mais adaptável a uma rotina laboratorial.

Com o surgimento da instrumentação HR-CS GF AAS utilizando amostrador sólido, a determinação de mercúrio passaria por significativos avanços quando comparado a espectrometria de absorção atômica clássica. Seu desempenho de correção de fundo superior pode ser aplicado em amostras com matrizes mais complexas e também utilizar a calibração aquosa (MANDJUKOV et al., 2015; SOUZA et al., 2015).

Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento da determinação de mercúrio em amostras de sangue e urina de forma direta utilizando HR-CS GF AAS.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.3.1 Equipamento

O mesmo equipamento descrito no item 3.3.1 foi utilizado.

Espectrofotômetro V370 (Jasco, Espanha) foi utilizado para avaliar o tamanho das nanopartículas de ouro sintetizadas.

### 5.3.2 Reagentes e soluções

A água utilizada em todas as etapas de preparo de soluções foi purificada através do processo de deionização pelo sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, USA).

Os padrões de mercúrio foram preparados através da devida diluição do padrão de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  1000  $\text{mg.L}^{-1}$  em ácido clorídrico 1% (Merck, Alemanha). Os padrões foram estocados em frascos de vidro.

A solução de ouro iônico foi obtida através da solução padrão de ácido cloroáurico  $\text{HAuCl}_4$  de 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  (Merck, Alemanha).

As soluções de nanopartículas de ouro comercialmente disponíveis utilizadas na otimização do método foram as com diâmetro de 20, 50, 80 e 100 nm da Nanocomposix, San Diego, Estados Unidos e as de 10, 30 e 60 nm do NIST, Alemanha, ambas com concentração de 50  $\text{mg.L}^{-1}$ . Todas foram utilizadas após 5 minutos no sonicador e protegido da luz, sem diluição.

Também foi realizada a síntese de nanopartículas de ouro, onde a mesma foi preparada a partir de uma solução padrão Au 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  (Merck, Alemanha) e do sal de citrato de sódio. O procedimento desta síntese é descrito no item 5.3.5.

A solução de permanganato de potássio foi obtida através da adequada pesagem do sólido  $\text{KMnO}_4$  (Scharlau, Barcelona, Espanha) e posterior dissolução em água deionizada para a concentração final de 30  $\text{g.L}^{-1}$ .

### 5.3.3 Amostras

As informações sobre as amostras de urina e sangue certificadas utilizadas para a verificação da exatidão do método desenvolvido e estão detalhadas na Tabela 14.

Tabela 15 - Detalhes da composição das amostras certificados de urina e sangue utilizados neste trabalho para a determinação de mercúrio por HR-CS GF AAS.

Amostras	Tipo de amostra	Conteúdo certificado de Hg ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Seronorm® – Trace Elements Urine ref 201205	Urina	$40,7 \pm 2,3$
ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848		$39,5 \pm 15,8$
ClinCheck® - Control Nível II lote 432 ref 201205		$17,3 \pm 8,7$
ClinCheck® - Control Nível I lote 432 ref 201205		$2,30 \pm 1,38$
Seronorm® Elements Whole Blood – Level III	Sangue	$37,1 \pm 7,5$
Seronorm® Elements Whole Blood – Level II		$16,0 \pm 3,2$

Conforme recomendação dos fabricantes, todas as amostras de urina da Clincheck® - Control foram compradas na forma sólida, e sua reconstituição foi realizada através da adição de 10 mL de água purificada e posterior agitação. Já a amostra de urina da Seronorm® – Trace Elements Urine foi reconstituída com 5 mL de água deionizada.

As amostras de sangue também foram compradas na mesma forma, sendo reconstituídas com 3 mL de água deionizada.

### 5.3.4 Procedimento para a medida de mercúrio por HR-CS GF MAS

As condições experimentais, bem como os parâmetros instrumentais e as características da linha de absorção de mercúrio para os dois estabilizantes são detalhadas na Tabela 15.

Tabela 16 – Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de mercúrio utilizando HR-CS GF AAS e nanopartículas de ouro ou permanganato de potássio como estabilizantes para análise de amostras de urina e sangue de forma direta.

		KMnO <sub>4</sub> e Nanopartículas de Au		
Comprimento de onda do <i>pixel</i> central		253,652 nm		
<i>Pixels</i> somados por linha (resolução)		3 (~2,7 pm)		
Programa de Temperatura				
Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Fluxo de gás Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	150	7	45	2,0
Atomização	700	3000	10	0
Limpeza	2600	3000	3	2,0

Para a determinação de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro como estabilizante, realizou-se a curva de calibração com 10 µL de solução padrão aquosa de mercúrio (0,1 a 0,9 ng), onde cada ponto (branco + 5 concentrações crescentes) desta curva foi realizado em triplicata, e a média das absorvâncias integradas por área (CP ± 1) foram registrados. Juntamente com cada ponto da curva de calibração foram adicionados 10 µL da solução 50 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de ouro (500 ng) de 10 nm de diâmetro como estabilizante.

Para a realização da análise comparativa utilizando KMnO<sub>4</sub>, a curva de calibração também se utilizou 10 µL de solução de mercúrio (0,1 a 0,9 ng) onde cada ponto (branco + 5 concentrações crescentes) desta curva foi realizado em triplicata, e a média das absorvâncias integradas por área (CP ± 1) foram registrados. Juntamente com cada ponto da curva foram adicionados 10 µL da solução de 30 g.L<sup>-1</sup> de KMnO<sub>4</sub> (300 µg).

O programa de temperatura para os dois estabilizadores descritos na Tabela 15 foi aplicado, para a curva de calibração e amostras de urina e sangue.

Para ambos os estabilizadores, após a construção da curva de calibração, 10 µL ou 20 µL (somente para a amostra de urina ClinCheck® - Control Nível I lote

432) foram introduzidas na plataforma, juntamente com o estabilizador que foi utilizado na curva de calibração.

Em seguida, a plataforma e seus componentes foram levados até o forno de grafite e o mesmo programa de temperatura empregado na curva de calibração foi aplicado e o sinal registrado. Em todas as análises, a absorvância integrada foi selecionada como modo de registro de sinal, ou seja, a soma dos sinais de 3 *pixels* (o central e mais dois adjacentes a este,  $CP \pm 1$ ) foram considerados como resultado analítico para cada análise, independente do estabilizador.

Para cada determinação, foram analisadas cinco repetições, e a mediana dos resultados foi considerada como valor representativo (BELARRA; RESANO; CASTILLO, 1999).

### **5.3.5 Procedimento para a síntese de nanopartículas de ouro**

A síntese das nanopartículas de ouro tem como objetivo baratear e simplificar a análise. Além disso, com a síntese foi possível aumentar a concentração das nanopartículas e avaliar o número de partículas por volume utilizado. Esta avaliação foi necessária, uma vez que as nanopartículas comercializadas com tamanhos diferentes possuem a mesma concentração e por conta disso, um número diferente de partículas por volume é adicionado ao forno de grafite. Como consequência, a área superficial de ouro que interage com o mercúrio será diferente.

Para a síntese de nanopartículas, foi adicionado em um béquer 2,31 mL da solução padrão de ouro  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ . O mesmo foi colocado sob manta de aquecimento, até a evaporação total do solvente, restando somente um sal dourado ( $\text{HAuCl}_4$ ). Este sal foi redissolvido com 20 mL de água deionizada e novamente foi levado a aquecimento. Após a ebulição, foram adicionados 2 mL de 38,8 mM de citrato de sódio diidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). O aquecimento se manteve até o aparecimento de uma coloração vermelha escura (aproximadamente 10 minutos). Após o surgimento da cor, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e completado o volume até 22 mL com água deionizada.

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.4.1 Otimização das condições experimentais

#### 5.4.1.1 Ouro e permanganato de potássio

Devido à alta volatilidade do mercúrio, programas curtos de temperatura são empregados, normalmente sem a etapa de pirólise, para que a separação do analito da matriz ocorra de forma mais eficiente.

A utilização de permanganato de potássio descrita na literatura (SILVA et al., 2006) para a determinação de mercúrio é justificada pelo seu elevado poder oxidante, que previne a redução de Hg (II) da solução para Hg<sup>0</sup>, tornando o elemento mais estável frente a temperatura de secagem. A utilização de outros modificadores químicos (como paládio) não apresentaram bons resultados, podendo ser justificada pelo mecanismo desses modificadores com o metal, onde não proporcionam a mudança do seu estado de oxidação, levando a perdas ainda na etapa de secagem.

A utilização de ouro na forma iônica ou de nanopartículas (comercialmente disponíveis ou sintetizadas no laboratório) também podem promover a estabilização do mercúrio através da formação de amálgama. A utilização de nanopartículas visa aumentar a área superficial de contato com o mercúrio e, assim melhorar a interação Hg – Au.

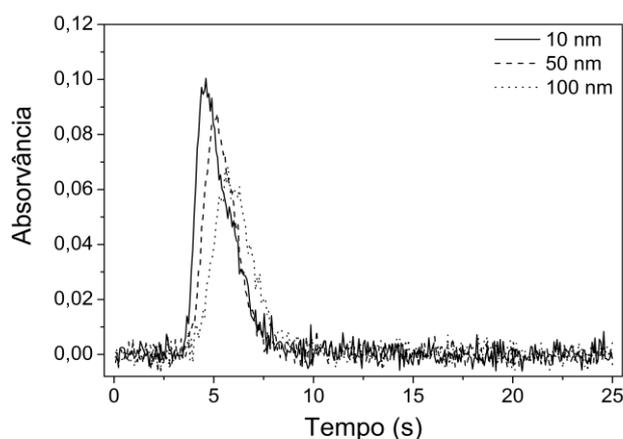
Para fins de comparação foi realizada a otimização das temperaturas de pirólise e atomização (apresentadas no item a seguir) com os modificadores de ouro na forma iônica e de nanopartículas (sintetizadas e comerciais), assim como paládio.

Dentre os modificadores a base de ouro, o ácido cloroáurico não causou uma estabilidade térmica expressiva ao mercúrio, levando a valores de absorvância mais baixos, quando comparado ao ouro na forma de nanopartículas. Além disso, na temperatura que apresenta maior valor de absorvância (700 °C), o mesmo apresenta um duplo pico. Dessa maneira, o mesmo foi descartado como modificador.

Ao utilizar nanopartículas de ouro como modificador químico, devemos garantir que a massa seja suficientemente alta para que o amálgama seja formado de forma adequada. Levando em consideração que uma alta concentração de ouro proporcionaria um custo elevado para análise, optou-se por trabalhar com a concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , variando então seu tamanho de partícula e número de partículas por volume.

Para tal, 1 ng de mercúrio foi atomizado juntamente com tamanhos de nanopartículas de ouro crescentes. A Figura 14 mostra a absorvância integrada para mercúrio em função da variação do tamanho de nanopartículas de ouro, que apresenta um aumento de sinal analítico significativo para a nanopartícula de tamanho 10 nm.

Figura 13 – Otimização do tamanho de nanopartículas de ouro adicionadas a 1 ng de Hg ao forno de grafite, monitorando a linha de absorção atômica de 253,652 nm. Condições de temperatura da Tabela 15.



Como pode ser observado, além do aumento considerável do valor de absorvância, um pequeno deslocamento temporal também ocorre. Isso pode ser justificado pela área superficial que cada tamanho de nanopartículas oferece.

Nanopartículas maiores, oferecem uma área superficial menor, ocorre uma menor interação efetiva com o mercúrio para a formação do amálgama e, portanto, o analito pode ser perdido na etapa de pirólise, justificando a diminuição da intensidade de absorvância.

Além da investigação da influência do tamanho de partícula no sinal analítico de mercúrio, investigou-se também a concentração de partículas por volume definido. Isso se fez necessário, pois as nanopartículas de ouro comerciais apresentam a mesma concentração de massa/volume e tamanho de partículas diferentes.

A solução de nanopartículas de ouro com tamanho de 10, 20, 30, 50, 60, 80 e 100 nm apresentam  $5,1 \times 10^{12}$ ,  $6,8 \times 10^{11}$ ,  $1,7 \times 10^{11}$ ,  $4,4 \times 10^{10}$ ,  $2,4 \times 10^{10}$ ,  $1,3 \times 10^{10}$  e  $5,1 \times 10^9$  partículas.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

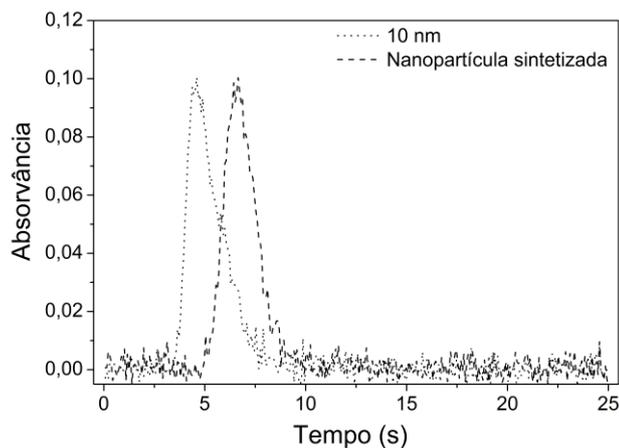
Para realizar a comparação adequada entre o número de partículas por mililitro, foi necessária a síntese de nanopartículas, que ao possuir maior concentração (116 mg.L<sup>-1</sup>) permitiu a adequada comparação de tamanho e número de partículas com as soluções industriais.

Para verificar o tamanho das nanopartículas de ouro sintetizadas, realizou-se uma medida comparativa com as comercialmente disponíveis por espectrofotômetro de absorção no UV-Vis (HAISS et al., 2007), sendo o valor máximo de absorvância de todas as nanopartículas obtido em 526 nm. Dessa maneira, ao realizar a comparação entre as nanopartículas, as sintetizadas tem comportamento (intensidade e forma de sinal) semelhante às de 10 e 20 nm, devendo possuir um tamanho intermediário a estas. Como essa faixa de tamanho não é possível de ser analisado por SP-ICP-MS (do inglês, *Single Particle - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), foi realizado o cálculo teórico do diâmetro médio da partícula e o número de partículas por mililitro de solução a partir dos dados das medidas espectrofotométricas (HAISS et al., 2007), chegando a um valor médio de 13 nm e  $5,2 \times 10^{12}$  partículas.ml<sup>-1</sup>.

Dessa maneira, comparamos os resultados obtidos da absorvância atômica de 1 ng de Hg com as nanopartículas comerciais e a sintetizada no laboratório para verificar se os resultados teóricos obtidos caracterizam corretamente a nanopartícula sintetizada.

Assim, a Figura 15 apresenta os sinais de absorvância para 1 ng de Hg utilizando 500 ng de nanopartículas de ouro comerciais de tamanho 10 nm, assim como 1,16 µg de nanopartículas de ouro sintetizadas.

Figura 14 – Avaliação do sinal de absorvância de 1 ng de Hg frente a 500 ng de nanopartículas de ouro comerciais de tamanho de 10 nm ( ··· ) e 1,16 µg de sintetizadas em laboratório ( --- ). Condições de temperatura da Tabela 15.

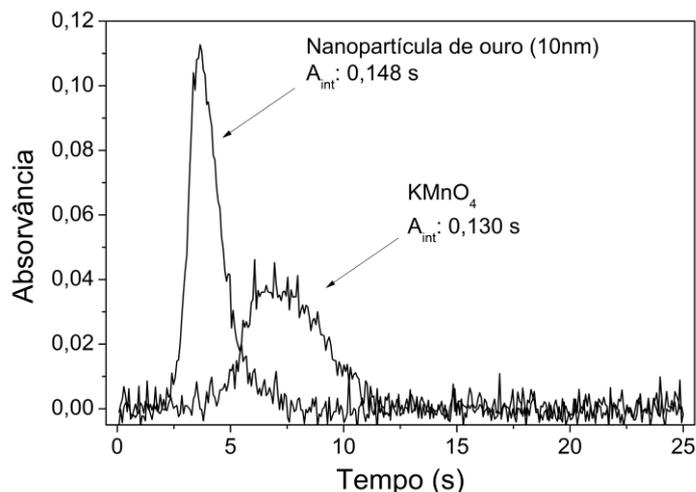


Avaliando a Figura 15, é possível verificar que a solução de nanopartículas de ouro sintetizada proporciona um sinal de absorção semelhante a comercial de 10 nm. Dessa maneira, a síntese dessas nanopartículas, além de reduzir o custo da análise e serem facilmente sintetizadas, torna o método atrativo e capaz de ser aplicado a rotina de um laboratório.

Uma vez otimizado o processo envolvendo a análise de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro, é necessário comparar os resultados obtidos com o trabalho mais recente de mercúrio por espectrometria de absorção atômica utilizando permanganato de potássio. Para as otimizações de temperatura de pirólise e atomização foi utilizada a massa de 300 µg do  $\text{KMnO}_4$ , como indicado pelo trabalho publicado (SILVA et al., 2006).

A comparação dos sinais analíticos de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio foi realizada, como mostra a Figura 15. Foi utilizado 1 ng da solução aquosa de mercúrio com 500 ng de nanopartículas de ouro de 10 nm e com 300 µg de permanganato de potássio. Ambos os sinais foram registrados com o programa de temperatura descrito na Tabela 15.

Figura 15 – Perfis de sinal de absorvância em função do tempo para 1 ng de Hg utilizando 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm) e 300 µg de permanganato de potássio. Programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 15.



Os sinais de 1 ng de mercúrio na presença de nanopartículas de ouro e permanganato de potássio possuem perfis de sinais analíticos visualmente diferentes, como apresentado pela Figura 15. Os mesmos possuem altura, largura e tempos diferentes. Entretanto, seus valores de absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ) são semelhantes, isto é, de 0,148 s para nanopartículas de ouro e de 0,130 s para permanganato de potássio. Apesar desta semelhança, o limite de detecção para os dois métodos deve ser bastante diferente, uma vez que a definição do mesmo está baseado na diferenciação do sinal analítico da linha base.

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

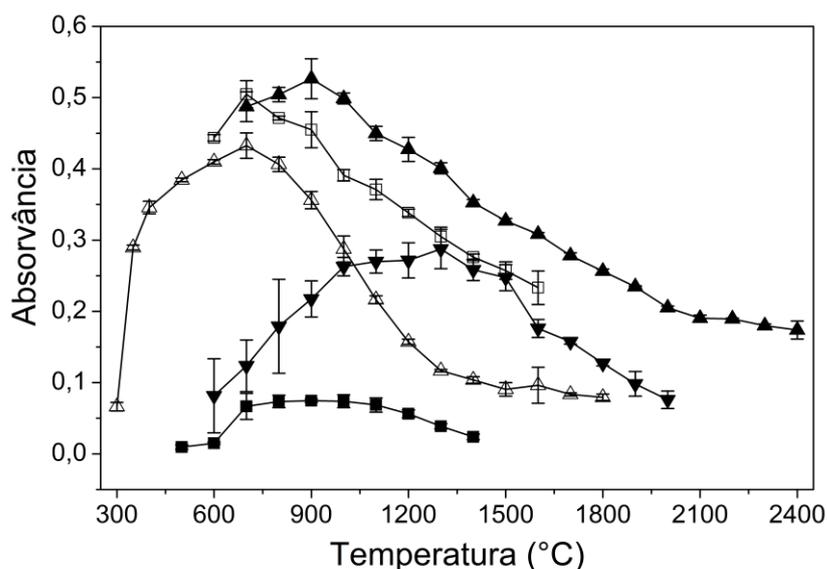
A escolha da adequada temperatura das etapas de pirólise e atomização pode ser considerada uma etapa crucial do processo de otimização do método envolvendo um elemento de alta volatilidade, como o mercúrio.

Dessa forma, esta etapa foi realizada para que seja possível conhecer o perfil térmico do sinal analítico proporcionado pelos modificadores químicos: ouro na sua

forma iônica e nanoparticulada (10 nm), nitrato de paládio, 300 µg de permanganato de potássio e para fins de comparação na ausência de modificadores químicos.

A Figura 16 mostra as curvas de atomização para 5 ng de mercúrio na ausência de modificador, com 10 µg de paládio (como nitrato), 500 ng de ouro na forma de nanopartículas (10 nm), 300 µg de permanganato de potássio e 10 µg de ácido cloroáurico, todos monitorando a linha de absorção atômica de 253,652 nm. A etapa de pirólise para estas curvas não foi realizada para evitar perdas do analito.

Figura 16 – Curva de atomização obtida através da análise de 5 ng de Hg com 500 ng de nanopartículas de ouro ( $\Delta$ ), 10 µg de ácido cloroáurico ( $\blacktriangledown$ ), 300 µg de permanganato de potássio ( $\square$ ), 10 µg de paládio ( $\blacktriangle$ ) e sem modificador ( $\blacksquare$ ). A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas.



Como pode ser visto na Figura 16, a curva de atomização do mercúrio na ausência de modificador químico apresenta poucas variações nas suas formas e em valores de absorvância, sendo estes últimos baixos. Isso pode ser explicado devido à elevada volatilidade do metal, que antes de chegar a etapa de atomização foi vaporizado nas etapas de secagem. Dessa maneira, fica evidenciada a necessidade de um modificador químico que proporcione uma estabilidade térmica ao metal.

O permanganato de potássio apresenta os maiores valores de absorvância, porém suporta temperaturas menores de atomização e um maior ruído na linha base. A temperatura escolhida para a etapa de atomização utilizando este modificador químico foi de 700 °C.

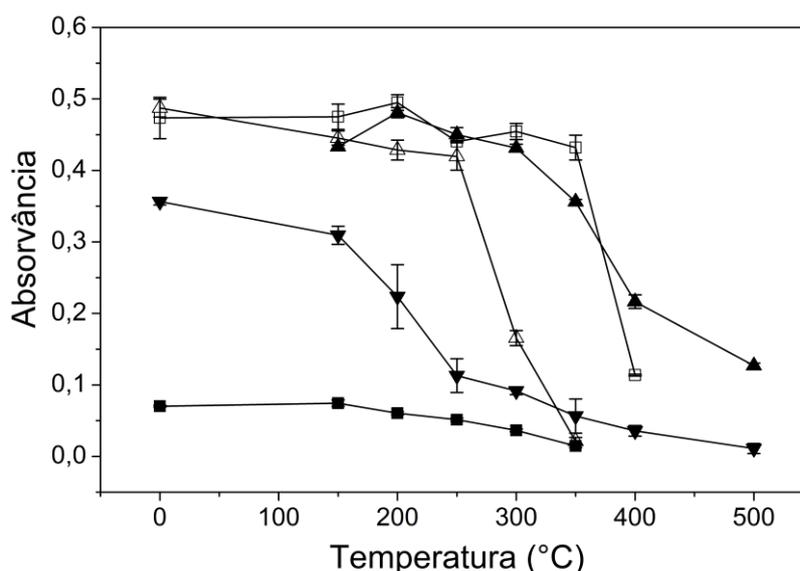
Para o paládio, o sinal de mercúrio não apresenta um patamar estável de valores de absorvância, apresentando uma queda de sinal a partir da temperatura de 900°C. Além disso, proporcionou sinais duplos para estas temperaturas, indicando mais de um mecanismo de atomização, não sendo escolhido neste trabalho como modificador.

O ácido cloroáurico possui um patamar mais estável de temperatura de atomização (1000 a 1300°C), porém as intensidades dos valores de absorvância são inferiores aos obtidos com permanganato de potássio e nanopartículas de ouro. Além disso, nas temperaturas em que o patamar é alcançado, o sinal analítico aparece como um duplo sinal, não sendo escolhido como modificador químico para este método.

Já para as nanopartículas de ouro, apesar de apresentarem um sinal de absorvância com intensidade semelhante a obtida com permanganato, seus sinais analíticos são mais estreitos e altos, associados a uma linha base com menos ruído que proporciona um melhor limite de detecção, quando comparado ao permanganato de potássio. Sua temperatura otimizada foi escolhida como a de 700 °C na etapa de atomização, pois nessa temperatura, além da maior intensidade de sinal, temos também um menor ruído de linha base.

Após a otimização desta temperatura, iniciou-se a investigação da temperatura de pirólise. A Figura 17 mostra estas curvas para 5 ng de mercúrio na ausência de modificador, com 10 µg de paládio (como nitrato), 500 ng de ouro na forma de nanopartículas (10 nm), 300 µg de permanganato de potássio e 10 µg de ácido cloroáurico, todos monitorando a linha de absorção atômica de 253,652 nm. A temperatura de atomização utilizada para cada modificador foi a otimizada anteriormente definida.

Figura 17 – Curvas de pirólise obtidas através da análise de 5 ng de Hg com 500 ng de nanopartículas de ouro ( $\Delta$ ), 10  $\mu\text{g}$  de ácido cloroáurico ( $\blacktriangledown$ ), 300  $\mu\text{g}$  de permanganato de potássio ( $\square$ ), 10  $\mu\text{g}$  de paládio ( $\blacktriangle$ ) e sem modificador ( $\blacksquare$ ). A incerteza de cada ponto é expressa como desvio padrão de três replicatas.



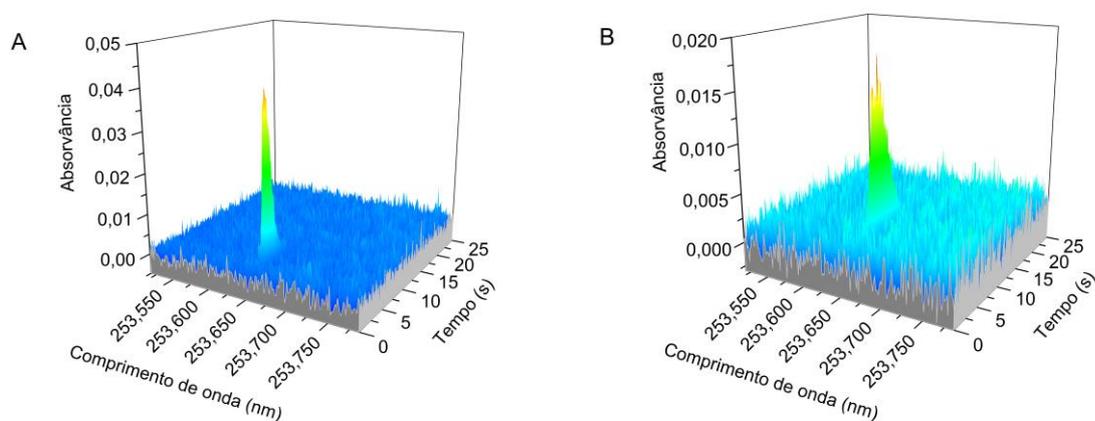
Como pode ser visto na Figura 17, a curva de pirólise do mercúrio na ausência de modificador químico também apresenta o mesmo comportamento da curva de atomização.

Dentre os modificadores químicos estudados, nenhum proporcionou uma etapa de pirólise adequada maior que 200°C. Apesar de esta temperatura ser baixa, alguns trabalhos relatados na literatura propõem a análise de mercúrio por absorção atômica sem a etapa de pirólise para evitar perdas do analito (LÓPEZ-GARCÍA; SÁNCHEZ-MERLOS; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 1997; SILVA et al., 2006). Como a ausência desta etapa não causou interferência das matrizes de urina e sangue, a mesma não foi realizada no método otimizado.

A Figura 18 apresenta os espectros tridimensionais, resolvidos no tempo para os dois modificadores químicos utilizados neste trabalho para análise de urina e sangue. É possível ver o ruído que a linha base apresenta na análise do padrão

aquoso de 1 ng de Hg com A) 500 ng de nanopartículas de ouro e B) 300  $\mu\text{g}$  de permanganato de potássio.

Figura 18 – Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo para o sinal analítico do padrão aquoso contendo 1 ng de mercúrio, juntamente com (A) 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm) e (B) 300  $\mu\text{g}$  de permanganato de potássio, utilizando o programa de temperatura da Tabela 15.



Os resultados encontrados neste trabalho utilizando permanganato de potássio, referente a forma do sinal analítico, ruído de linha base e limite de detecção vão ao encontro com os apresentados pela literatura (SILVA et al., 2006). Além disso, com o uso frequente deste modificador químico observou-se resíduos na plataforma, e conseqüentemente maior desgaste da plataforma de sólidos, quando comparada a utilização de nanopartículas de ouro.

Por todas as razões previamente citadas, este trabalho propõe a utilização de nanopartículas de ouro (comerciais ou sintetizadas) como modificador químico para análise de mercúrio por absorção atômica. Estas análises sempre foram realizadas em comparação as análises empregando permanganato de potássio.

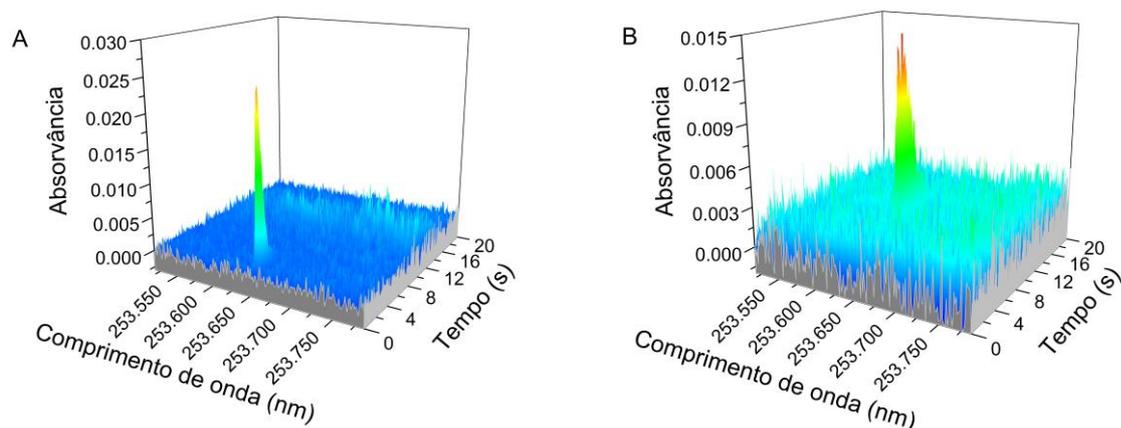
#### **5.4.2 Análise direta em amostras de urina e sangue usando nanopartículas de ouro**

Após a otimização do método, foi realizada a aplicação do mesmo nas amostras certificadas de urina e sangue apresentadas na Tabela 14. A curva de calibração foi realizada adicionando massas crescentes de mercúrio em solução e 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm) comerciais de forma direta sobre a plataforma de sólidos. A mesma foi levada até o forno de grafite pelas pinças do amostrador sólido, e o programa de temperatura apresentado pela Tabela 15 foi aplicado e o sinal registrado.

Para análise das amostras de urina e sangue, as mesmas eram recompostas com um volume adequado de água deionizada e pipetadas diretamente sob a plataforma de sólidos, juntamente com os 500 ng de nanopartículas de ouro (10 nm). Para as amostras que possuíam uma menor quantidade de mercúrio (próxima ao limite de quantificação do método) (ClinCheck® - Control Nível I lote 432 ref 201205) foi pipetado um volume de 20 µL e o restante das amostras, um volume de 10 µL.

A Figura 19 apresenta dois espectros tridimensionais obtidos pela atomização de mercúrio em amostras de urina (ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848) e sangue (Serorm® Elements Whole Blood – Level III), ambos nas condições apresentadas pela Tabela 15. Os sinais proporcionados pela análise direta para estas amostras são bem definidos e semelhantes.

Figura 19 – Espectros de absorção atômica resolvidos no tempo para mercúrio nas amostras de A) urina (ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848) e B) sangue (Serorm® Elements Whole Blood – Level III). O programa de temperatura utilizado está descrito na Tabela 15.



Como pode ser observado na Figura 19, a amostra de urina por possuir uma menor complexidade de matriz, apresenta um menor ruído de linha base e na amostra sangue, esse ruído é mais acentuado. Independentemente desse fato, em ambas as amostras foi possível quantificar de forma adequada os níveis de mercúrio indicados pela certificação das amostras. Dessa maneira, os resultados obtidos para a determinação de mercúrio em amostras de urina e sangue, em diferentes concentrações, são apresentados na Tabela 16 e se mostram de acordo com os fornecidos pela certificação.

Tabela 17 – Resultados da determinação de mercúrio em amostras certificadas de urina e sangue utilizando análise direta por HR-CS GF AAS (n=5) utilizando 500 ng de nanopartículas de ouro e as condições de temperatura da Tabela 15. As incertezas expressas são referentes aos valores de desvio padrão das replicatas.

Amostras	Tipo de amostra	Conteúdo certificado de Hg ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Conteúdo encontrado de Hg ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Seronorm® – Trace Elements Urine ref 201205	Urina	40,7 $\pm$ 2,3	40,8 $\pm$ 2,9
ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848		39,5 $\pm$ 15,8	38,3 $\pm$ 4,37
ClinCheck® - Control Nível II lote 432 ref 201205		17,3 $\pm$ 8,7	17,0 $\pm$ 1,61
ClinCheck® - Control Nível I lote 432 ref 201205		2,30 $\pm$ 1,38	2,3 $\pm$ 0,13
Seronorm® Elements Whole Blood – Level III	Sangue	37,1 $\pm$ 7,5	30,7 $\pm$ 7,2
Seronorm® Elements Whole Blood – Level II		16,0 $\pm$ 3,2	16,6 $\pm$ 3,0

Após os resultados serem obtidos, aplicou-se o Teste t de Student para verificar se os valores encontrados pela técnica de HR-CS GF AAS são similares aos fornecidos pela certificação.

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  para as amostras de urina Seronorm® – Trace Elements Urine ref 201205, ClinCheck® - Control Nível II lote 923 ref 8848, ClinCheck® - Control Nível II lote 432 ref 201205 e ClinCheck® - Control Nível I lote 432 ref 201205 são respectivamente: 0,047534, 0,60708, 0,40017 e 0,29632. O  $t_{\text{tabelado}}$  para um nível de confiança de 95% e um grau de liberdade igual a 4 é de 2,776.

Já os valores de  $t_{\text{calculado}}$  para as amostras de sangue Seronorm® Elements Whole Blood – Level III e Seronorm® Elements Whole Blood – Level II são respectivamente: 2,00124 e 0,02879. O  $t_{\text{tabelado}}$  para o mesmo intervalo de confiança e grau de liberdade das amostras de urina também é de 2,776. Como o  $t_{\text{calculado}}$  é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  para todas as amostras, os resultados encontrados pela técnica de HR-CS GF AAS para a determinação de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro para análise direta de urina e sangue foi considerado estatisticamente semelhante aos valores certificados.

### 5.4.3 Comparação dos modificadores químicos nanopartículas de ouro e permanganato de potássio

Após a otimização e validação do método para a determinação de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro, buscou-se o método já descrito na literatura (SILVA et al., 2006) que utiliza permanganato de potássio como agente oxidante. Essa escolha tem como justificativa a melhoria no limite de detecção do método associado à nova possibilidade de determinação de amostras de sangue de forma direta. A Tabela 17 apresenta os valores informados para as amostras de urina e sangue referentes aos teores de mercúrio certificados, juntamente com os resultados obtidos utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio.

Tabela 18 – Informações sobre a constituição e determinação de mercúrio em amostras de urina e sangue certificados, através da análise direta usando HR-CS GF AAS utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio, com as condições da Tabela 15. Incertezas foram expressas como o desvio padrão das replicatas.

Amostras	Tipo de amostra	Conteúdo certificado de Hg ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Resultados nanopartículas de Au ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Resultados $\text{KMnO}_4$ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Seronorm®		$40,7 \pm 2,3$	$40,8 \pm 2,9$	$43,2 \pm 1,9$
ClinCheck® Nível II 923	Urina	$39,5 \pm 15,8$	$38,3 \pm 4,37$	$42,6 \pm 6,45$
ClinCheck® Nível II 432		$17,3 \pm 8,7$	$17,0 \pm 1,61$	<LOD
ClinCheck® Nível I 432		$2,30 \pm 1,38$	$2,3 \pm 0,13$	<LOD
Seronorm® Level III	Sangue	$37,1 \pm 7,5$	$30,7 \pm 7,2$	<LOD
Seronorm® Level II		$16,0 \pm 3,2$	$16,6 \pm 3,0$	<LOD

Após os resultados serem obtidos, aplicou-se o Teste t de Student para verificar se os valores encontrados pela técnica de HR-CS GF AAS utilizando permanganato de potássio são estatisticamente similares aos fornecidos pela certificação.

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  para as amostras de urina Seronorm® – Trace Elements Urine ref 201205 e ClinCheck® - Control Nível II lote 923 são respectivamente: 2,1245 e 1,5534. O  $t_{\text{tabelado}}$  para um nível de confiança de 95% e um grau de liberdade igual a 4 é de 2,776. Para estas duas amostras, pode-se inferir que os resultados obtidos através da determinação de mercúrio utilizando permanganato de potássio pela técnica HR-CS GF AAS para a análise de forma direta de urina são estatisticamente semelhantes aos certificados. Porém, estes resultados só foram possíveis em amostras de urina com concentração superior a  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , devido ao limite de detecção não ser adequado, associado ao maior ruído da linha base.

Para as amostras de sangue, que estariam dentro da concentração quantificável utilizando permanganato de potássio, a análise resultou na ausência de sinal analítico para as duas amostras certificadas. Esse comportamento pode ser justificado pelo permanganato de potássio ser um excelente agente oxidante, que ao entrar em contato com a matriz mais complexa de sangue acaba por oxidar a matriz, resultando em uma linha base muito ruidosa, impossibilitando a visualização do sinal analítico.

Resíduos na plataforma de sólidos somente foram observados ao utilizar volumes elevados de amostra (acima de  $10 \mu\text{L}$ ), sendo esta visualização mais frequente com o uso de permanganato de potássio, assim como a maior corrosão da plataforma de sólidos.

Dessa forma, o método proposto neste trabalho para a determinação de mercúrio utilizando nanopartículas de ouro pela técnica de HR-CS GF AAS para análise de urina e sangue de forma direta se mostrou com maior aplicabilidade ao trabalho publicado utilizando permanganato de potássio.

#### **5.4.4 Parâmetros de mérito**

Os parâmetros de mérito avaliados para o método de determinação de mercúrio, utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio na linha de absorção atômica de 253,652 nm por HR-CS GF AAS foram: Faixa linear, curva de calibração, massa característica, sensibilidade, LOD e LOQ. Com exceção do LOD e

LOQ, os outros parâmetros já foram elucidados no item 3.4.4 e estão descritos na Tabela 18.

Tabela 19 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de mercúrio por HR-CS GF AAS utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio. Os valores de absorvância para a curva de calibração foram realizados através da média de três réplicas, onde cada uma levou em consideração a absorvância integrada ( $CP \pm 1$ ).

<b>Nanopartículas de ouro - Parâmetros</b>	
Faixa linear	0,190 – 400 ng
Curva analítica	$y_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,1278x_{\text{Hg}} + 0,0063$
R	0,998
Massa característica	34 $\mu\text{g}$
LOD	0,057 ng / 2,85 $\mu\text{g.L}^{-1}$
LOQ	0,190 ng / 9,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
<b>Permanganato de potássio - Parâmetros</b>	
Faixa linear	0,611 – 300 ng
Curva analítica	$y_{\Sigma 3, \text{int}} = 0,2388x_{\text{Hg}} - 0,0013$
R	0,997
Massa característica	18 $\mu\text{g}$
LOD	0,183 ng / 18,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$
LOQ	0,611 ng / 61,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Ao calcular os limites de detecção e quantificação para os dois métodos utilizados neste trabalho, os dois resultados seriam bem próximos, sendo o LOQ de 0,185 e 0,145 ng utilizando nanopartículas de ouro e permanganato de potássio, respectivamente. Isso vai de encontro aos resultados experimentais, uma vez que essa quantidade para o método de permanganato de potássio não é passível de ser quantificada. Isso pode ser explicado pela forma dos sinais, que apresentam valores de absorvância integrada semelhantes, uma vez que apresentam áreas

semelhantes. Porém suas formas são distintas, pois o sinal analítico de mercúrio obtido utilizando nanopartículas de ouro é mais estreito e mais alto e o sinal utilizando permanganato de potássio é mais largo e baixo. Dessa maneira, fica claro que a maneira de calcular o limite de detecção e quantificação para dos dois métodos não está adequada.

A fórmula utilizada é a mesma descrita pela Equação 2 e 3, porém a sensibilidade não é mais a inclinação da reta que foi confeccionada a partir de valores relacionados a área do pico, e sim, utilizando a altura do sinal (RIBANI et al., 2004). Dessa forma, podemos calcular de forma mais adequada o valor de limite de detecção e quantificação. Os mesmos estão descritos na Tabela 18.

## 5.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico para a determinação de mercúrio de forma direta em amostras de sangue e urina certificadas utilizando HR-CS GF AAS.

Após os estudos de otimização de temperatura de pirólise e atomização de diferentes modificadores, fica claro a melhora do formato e intensidade do sinal analítico do mercúrio ao utilizar nanopartículas de ouro. Ainda, foi possível a realização da síntese das nanopartículas de ouro com o mesmo comportamento térmico e analítico das sintetizadas, possibilitando uma alternativa a compra das mesmas.

Após a realização desses procedimentos, a verificação da exatidão do método foi realizada através da determinação de mercúrio em amostras de sangue e urina certificadas de forma direta. Os resultados obtidos pelo método proposto neste trabalho nestas amostras foram analisados pelo Teste t de Student que mostra que os mesmos são estatisticamente semelhantes aos informados pela certificação.

Posteriormente, as amostras foram analisadas pelo método já publicado pela literatura para a determinação de mercúrio, que utiliza permanganato de potássio. Ao comparar os resultados obtidos, o método desenvolvido neste trabalho apresenta melhorias, uma vez que possui um limite de detecção e quantificação mais

adequado, possibilitando a determinação de mercúrio em amostras que possuem um menor teor de mercúrio. Além disso, para as amostras de sangue certificadas que possuem um teor de mercúrio passível de ser analisado pelo método que utiliza permanganato de potássio, não foi possível de ser realizado, pois por ser um excelente agente oxidante, acaba oxidando a matéria orgânica, e a mesma se sobrepõe ao sinal analítico.

Dessa maneira, o método proposto neste trabalho apresenta um elevado potencial de ser aplicado na determinação de mercúrio em amostras de urina e sangue de forma direta, de forma simples e completamente adaptável a rotina de um laboratório de análises químicas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de quantificação de elementos voláteis e de importância toxicológica como o cloro, iodo e mercúrio formaram a base da investigação deste trabalho, resultando no desenvolvimento de três métodos analíticos utilizando HR-CS GF MAS ou HR-CS GF AAS por amostragem direta.

A determinação de cloro por HR-CS GF MAS inseriu de forma satisfatória uma nova molécula (CaCl) na literatura científica, juntamente com a aplicação do método desenvolvido em diversas amostras, com concentrações distintas de cloro. Além disso, proporciona uma melhoria no quesito determinação de cloro em amostras com alto teor de cálcio, uma vez que o mesmo é extremamente comum em inúmeras amostras e é o formador da molécula alvo.

A determinação direta de iodo em amostras sólidas de medicamentos por HR-CS GF MAS foi realizada pela primeira vez, através da molécula de Srl. Apesar de apresentar alguns desafios em relação aos mecanismos existentes ao adicionar ácido cítrico e tioureia, o método apresentado mostra uma evolução científica na determinação de iodo em amostras sólidas.

A determinação de mercúrio via HR-CS GF AAS utilizando nanopartículas de ouro como estabilizador do elemento volátil, proporcionou uma melhoria no limite de detecção quando comparado ao método já existente que utiliza permanganato de potássio, além de descrever a síntese das nanopartículas de forma fácil e rápida. O método desenvolvido neste trabalho permitiu de forma adequada a análise de mercúrio em amostras de urina e sangue certificadas de forma direta.

Assim, o desenvolvimento desses três métodos analíticos possibilitou de forma inovadora, através da determinação molecular e atômica, a determinação de cloro, iodo e mercúrio em amostras sólidas e líquidas de forma direta por HR-CS GF MAS ou HR-CS GF AAS. Até o presente momento, somente o artigo científico referente a determinação de cloro via CaCl foi publicado (GUARDA et al., 2016) e os dois restantes estão em fase de escrita e submissão à revistas científicas de alto fator de impacto. O mesmo se encontra no anexo I desta tese.

## ANEXO I – ARTIGO CIENTÍFICO

Talanta 162 (2017) 354–361



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Determination of chlorine via the CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis



Ananda Guarda<sup>a,b</sup>, Maite Aramendia<sup>a,c</sup>, Irene Andrés<sup>a</sup>, Esperanza García-Ruiz<sup>a</sup>, Paulo Cicero do Nascimento<sup>b</sup>, Martín Resano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Aragón Institute of Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Pedro Cerbasi 12, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, C.P. 5051, 97105-970 Santa Maria - RS, Brazil

<sup>c</sup> Centro Universitario de la Defensa de Zaragoza, Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090 Zaragoza, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Solid sample analysis  
High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry  
Chlorine determination  
CaCl molecular absorption

### ABSTRACT

This work investigates the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry for the direct determination of Cl in solid samples via the CaCl molecule and measurement of its molecular absorption. The method proposed is based on addition of 400  $\mu\text{g}$  Ca as molecule-forming reagent and of 20  $\mu\text{g}$  Pd as chemical modifier, which helps to stabilize the analyte and enhances sensitivity.

The molecular spectrum for CaCl offers different lines with different limits of detection and linear ranges, which permitted to analyze solid samples with different Cl contents. The lowest limit of detection (0.75  $\text{ng Cl}$ , corresponding to 0.75  $\mu\text{g g}^{-1}$  for a typical sample mass of 1 mg) could be achieved by combination of three of the most sensitive lines in the vicinity of 620.862 nm, while the amplest linear range (up to 860  $\text{ng Cl}$ ) was achieved by selection of the less sensitive line at 377.501 nm.

The method developed enabled the direct determination of Cl in solid samples using simple external calibration with aqueous standards. Good precision (5–9% RSD) and accuracy was attained in a series of certified samples of very different nature (i.e. coal, iron oxide, polyethylene, human hair, pine needles, rice flour and milk) and with very different Cl contents, ranging from about 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  to 1% (w/w) Cl. The method appears as particularly useful for Cl determination in samples with elevated Ca contents, for which biased results with other diatomic molecules, such as AlCl or SrCl, may be obtained.

### 1. Introduction

Chlorine (Cl) is relatively abundant in the Earth's crust (0.0314% w/w), where is found in the bound state only and mainly as common salt (NaCl). This compound is one of the most abundant and easy to transform raw material on earth, and is the basis of a vast number of applications of the chlorine chemistry family: products for drinking water sanitation, paper products, dyestuffs, textiles, petroleum products, medicines, antiseptics, insecticides, foodstuffs, solvents, paints, plastics, among many other consumer products and industrial applications [1,2].

Concerning toxicity, chlorine is essential to all known species of life in the form of chloride ions, while in other chemical forms the effects of this element and its compounds range from inert to highly toxic [1]. As a result of all of the above, and given the extensive presence of chlorine

and its derivatives in everyday life, determination of trace levels of this element in a wide variety of samples is important in many contexts.

Besides the classical methods for determination of chloride ions such as gravimetric, volumetric or colorimetric methods, chlorine determination in different samples and chemical forms can be accomplished by a variety of analytical techniques including potentiometry, total reflection X-ray fluorescence, neutron activation analysis or inductively coupled plasma mass/optical emission spectrometry [3]. When aiming at analyzing solid samples, however, most of these analytical techniques generally require extensive sample treatment before analysis [4], which involves high risk of analyte losses and/or contamination and require longer analysis times. In these situations, the use of direct solid sample analysis could help overcoming these problems [5–7].

Among techniques for direct solid sample analysis, graphite furnace

\* Corresponding author.

E-mail address: [mresano@unizar.es](mailto:mresano@unizar.es) (M. Resano).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.039>

Received 31 July 2016; Received in revised form 4 October 2016; Accepted 8 October 2016

Available online 10 October 2016

0029-1440/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

atomic absorption spectrometry (GFAAS) is an attractive and versatile alternative providing high sensitivity at a reasonable cost [5–7]. However, chlorine has been traditionally inaccessible for this technique since the analytical lines for this element lie in the vacuum ultraviolet, not available for conventional AAS spectrometers.

This situation changed substantially after the commercial introduction of high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS AAS) in the last decade [8]. Among other advantages, the introduction of this technique opened the possibility for the determination of non-metals (including chlorine) via the formation of diatomic molecules in the graphite furnace and subsequent measurement of their molecular absorption at any wavelength lying in the spectral range provided by the continuum source used in these instruments (189–900 nm for a Xe short-arc lamp) [9–11]. Such strategy had been already tested in the past for chlorine determination, and the monitoring of the molecular absorption corresponding to different monochlorides (namely AlCl, GaCl or InCl) using conventional AA spectrometers [12–16] was explored. However, the low resolution of the spectrometers available at the time resulted in many problems for these determinations.

With the introduction of high-resolution continuum source instruments these problems were overcome and the determination of non-metals via molecular absorption spectrometry (MAS) was made possible for routine analytical laboratories. Since that moment, a few papers have been published exploring this possibility for chlorine determination, mostly in graphite furnaces, and based on the formation and measurement of AlCl [17–19], InCl [19] or SrCl [19–21]. The latter molecule was introduced only very recently by Pereira et al. [20] and its use has allowed the development of the only two direct solid sample analysis approaches available to date based on HR-CS GFMAAS, aiming at Cl determination in biological samples [20] or coal [21], respectively.

The preferential use of these molecules for Cl determination via HR-CS MAS is based on different reasons. Compared to atomic absorption spectrometry (AAS), MAS has the disadvantage of being more prone to both spectral and, particularly, non-spectral interferences. HR-CS MAS does not simply require the atomization of the analyte, but it necessitates the formation of analyte molecules with other species that need to be stable at the high temperatures of the graphite furnace, even in the potential presence of concomitants. These concomitants, if highly concentrated in the samples (which can be particularly problematic in the case of direct solid sample analysis), might compete for the analyte. As a result, molecules with elevated bond dissociation energy are usually selected for HR-CS MAS in order to favor their formation and stability in the graphite furnace.

With a bond dissociation energy of  $511 \text{ kJ mol}^{-1}$  [2], AlCl is one of the strongest monochlorides and, therefore, it is not surprising that the first papers published for Cl determination by HR-CS GFMAAS were based on the formation of the AlCl molecule [17,18]. SrCl, on the other hand, presents a lower bond dissociation energy ( $406 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [2] but offers high sensitivity for Cl determination by HR-CS GFMAAS as well. Moreover, this molecule shows the advantage that its main band is considerably narrower than that of AlCl, and it lies in a spectral range where the risk for spectral overlap is also considerably lower (261.42 nm for AlCl vs. 635.862 nm for SrCl). This is why the most recent papers have been published based on the formation of this molecule [19–21], permitting to avoid, e.g., Co spectral overlap with the band of the AlCl molecule at 261.42 nm.

Unfortunately, and even after carefully selecting the target molecule according to the parameters described, complete absence of non-spectral interferences cannot be assured for HR-CS GFAAS if concomitants being able to form other strong chemical species with the analyte are present at high concentrations in the samples. Self-evidently, this fact limits applicability of the technique in some particular situations. In this sense, for instance, in a recent paper by our research group [22], Ca was found to significantly interfere in the

determination of Cl in hard water samples by means of HR-CS GFMAAS after formation of the AlCl molecule. In fact, although CaCl has a lower bond dissociation energy ( $409 \pm 8.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [2] than AlCl, the massive presence of Ca ions in hard water samples probably results in a significant population of Ca atoms in the gas phase competing for the chlorine atoms, thus reducing yield for the AlCl molecule. As a consequence, analytical results were significantly affected for samples presenting Ca/Cl ratios well above unity, when simple calibration with aqueous standards was attempted. For overcoming this problem, the use of isotope dilution for calibration proved successful, taking advantage of the fact that  $\text{Al}^{27}\text{Cl}$  and  $\text{Al}^{27}\text{Cl}$  absorb at slightly different wavelengths and, hence, chlorine isotope ratios can be accurately measured [22].

The problem of Ca interference cannot be considered as trivial, as this element is present at high concentrations in a wide variety of samples commonly analyzed for Cl (e.g. foodstuff like dairy products, vegetal samples, etc.), while the strategy based on the use of isotope dilution for solving the problem is not as straightforward and might not be suitable for use in routine labs. The alternative use of SrCl, on the other hand, is not probably solving the problem either (as will be shown in this work for different samples naturally showing elevated Ca contents), as this molecule has a weaker bond dissociation energy than AlCl and is bound to be affected by this interference in a similar way. Given the circumstances, it is worthwhile to explore new diatomic molecules for the determination of chlorine in this kind of samples. In fact, investigating CaCl, and therefore taking advantage of the element at the origin of the interference as counter ion, seems to be an interesting option.

In this context, this work explores for the first time the use of the CaCl molecule to determine Cl at trace levels by means of solid sample analysis with HR-CS GFMAAS. As previously mentioned, this molecule has a relatively high bond dissociation energy (similar to that of SrCl), and also presents several line-like transitions with different sensitivities located in the near UV and visible regions of the spectrum (around 377 nm and 618–620 nm), where the potential risk for spectral overlap is also minimized. Besides temperature program optimization, selection of adequate chemical modifiers and evaluation of figures of merit, analysis of reference materials of various nature, some of them containing high amounts of Ca in their composition, will be conducted for method validation. For comparison purposes, analysis of some of these samples by means of HR-CS GFAAS after formation of the SrCl molecule will be also carried out.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

All molecular absorption measurements were conducted with a high-resolution continuum source absorption atomic spectrometer, the ContraAA 700, commercially available from Analytik Jena AG (Jena, Germany). The optical system comprises a xenon short-arc lamp (GLE, Berlin, Germany) operating in “hot-spot” mode as the radiation source. It also includes a double monochromator with a prism premonochromator, a high-resolution echelle grating monochromator and a charge-coupled device (CCD) array detector with 588 pixels, 200 of which are used for analytic purposes, while the rest are used for internal functions of the instrument. More details on this instrumental configuration can be found elsewhere [8]. This instrument is equipped with a transversely heated graphite tube atomizer. As additional accessories, the instrument is also equipped with an automated accessory (SSA 600) enabling the introduction of solid samples, which includes a microbalance (Sartorius M2P, Gottingen, Germany) with a precision of 0.001 mg. Pyrolytic graphite tubes and platforms designed for the direct analysis of solid samples were used throughout the study.

## 2.2. Reagents, standards and certified reference materials

High-purity water (Trace Select Ultra, Cl level lower than  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , Fluka, Buchs, Switzerland) was used for the preparation of all solutions, while the rest of chemicals employed were of analytical grade or better. Cl standards were prepared by proper dilution of a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  chloride stock solution (NaCl in water, Darmstadt, Merck, Germany). A  $40 \text{ g L}^{-1}$  Ca solution was prepared by dissolving appropriate amounts of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Germany) in high purity water and was used as the molecule-forming solution to generate CaCl. For the comparative measurements based on formation of the SrCl molecule, the molecule-forming solution was prepared by dissolving appropriate amounts of  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  (Merck) in high purity water up to a concentration of  $10 \text{ g L}^{-1}$  Sr. In both cases, Pd (as nitrate) was used as chemical modifier. Modifier solutions were prepared from a stock

standard Pd solution of  $10 \text{ g L}^{-1}$  ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  in 15%  $\text{HNO}_3$ , Merck) that was properly diluted to a concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$ . In the case of the SrCl molecule, moreover, Zr was also used as permanent chemical modifier and a  $1 \text{ g L}^{-1}$  Zr solution (Merck) was used for pretreating the sampling platforms as described in Section 2.3. Additionally, two Pd and Pt nanoparticles dispersions were tested as chemical modifiers. A  $1.8 \text{ g L}^{-1}$  20 nm Pd nanoparticle dispersion was prepared following the method described in a previous work [23], while a  $1.07 \text{ g L}^{-1}$  5 nm Pt nanoparticle dispersion (Citrate BioPure Platinum) was purchased from Nanocomposix (San Diego, USA).

Finally, eight certified reference materials (CRM) of very different nature, with certified Cl levels covering a wide range of concentrations at the minor and trace levels and, in some cases, showing a naturally occurring elevated Ca concentration were analyzed in this work: SRM 2692c Bituminous Coal, SRM 1575 Pine Needles, SRM 1568b Rice Flour and SRM 1549 Non-fat milk powder, all four available from NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA); CRM BCR 460 Coal and ERM EC681 Polyethylene (European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Brussels, Belgium), CRM NCS ZC 81002b Human Hair (China National Analysis Centre for Iron and Steel, Beijing, China), and CRM 686-1  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , (European Committee for Iron and Steel Standardization, Düsseldorf, Germany). Some details for each material tested are gathered in Table 1.

## 2.3. Procedure for analysis of the certified reference materials

Most CRMs were directly analyzed as solids by means of HR-CS SS-GFMAS. Only SRM 1549 Non-fat milk powder was analyzed as an aqueous suspension due to its high Cl content. For preparing the suspension, 0.5 g of the solid sample were weighed in a polypropylene tube and volume was made up to 20 mL with ultrapure water. Before

**Table 1**  
Certified reference materials analyzed in this work.

CRM reference	Type of sample	Certified Cl content / $\mu\text{g g}^{-1}$	Certified Ca content /% w/w
NCS ZC 81002b	Human Hair	48.2 <sup>a</sup>	0.1537 ± 0.0068
CRM BCR 460	Coal	59 ± 18	–
ERM EC681	Polyethylene	92.9 ± 2.8	–
SRM 1575	Pine Needles	293 ± 20	0.41 ± 0.02
SRM 1568b	Rice Flour	301.1 ± 3.8	0.012 ± 0.00031
CRM 686-1	Iron Oxide	950 ± 60	0.0097 ± 0.0007
SRM 2692c	Bituminous Coal	1338 ± 22	–
NIST SRM 1549	Non-fat milk powder	10900 ± 200	1.30 ± 0.05

<sup>a</sup> Informative value.

**Table 2**  
Instrumental parameters used to determine Cl by monitoring the CaCl and SrCl molecules using HR-CS GFMAS.

	CaCl	SrCl
Electronic transitions (range of wavelength)	$X^2\Sigma^- \leftarrow C^2\Delta^1$ (364 – 402 nm) $X^2\Sigma^- \leftarrow A^2\Delta^1$ (604 – 636 nm)	$X^2\Sigma^+ \leftarrow B^2\Sigma^+$ (646 – 689 nm)
Wavelength of the central pixel (samples analyzed at each wavelength)	377.501 nm (SRM 1575, CRM 686-1, SRM 2692c, SRM 1549) 620.862 nm (NCS ZC 81002b, BCR 460, ERM EC681, SRM 1568b)	635.862 nm (SRM 1575, SRM 1568b, SRM 1549)
Detector pixels summed per line (resolution)	3 (–2.20 $\mu\text{m}$ for 377.501 nm; –4.00 $\mu\text{m}$ for 620.862 nm)	3 (–4.15 $\mu\text{m}$ )
Chemical modifiers	Ca (400 $\mu\text{g}$ ) Pd (as nitrate – 20 $\mu\text{g}$ )	Sr (100 $\mu\text{g}$ ) Zr (permanent – 400 $\mu\text{g}$ ) + Pd (as nitrate – 20 $\mu\text{g}$ )
Sample mass range for samples directly analyzed as solids	SRM 2692c 0.25–0.60 mg BCR 460 0.25–0.60 mg NCS ZC 81002b 0.20–0.50 mg SRM 1575 0.50–0.70 mg SRM 1568b 0.15–0.30 mg ERM EC681 0.25–0.50 mg CRM 686-1 0.30–0.50 mg	SRM 1575 0.15–0.30 mg SRM 1568b 0.20–0.35 mg
Temperature program	Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	Ramp/ $^{\circ}\text{C s}^{-1}$
Stage		Hold/s
Drying	90	30
Drying	110 /130 <sup>b</sup>	20
Pyrolysis	700 /600 <sup>b</sup>	10
Vaporization	2200 /2300 <sup>b</sup>	5
Cleaning	2600	4
		Ar gas flow/ $\text{L min}^{-1}$
		2.0
		2.0
		2.0
		0
		2.0

<sup>a</sup> CaCl.

<sup>b</sup> SrCl.

analysis and to adjust Cl concentration to the linear range of the calibration curve, further dilution of this suspension with ultrapure water (1:50) was carried out. Instrumental parameters used for analysis of the samples are described in Table 2.

The accessory (SSA 600) used allows for automatic weighing and transport of the samples to the furnace by means of a pair of tweezers. For the CRMs analyzed as solids, after first taring the empty sample platform, an adequate mass of the solid sample was deposited in the graphite platform to be weighed. Afterwards, 10  $\mu\text{L}$  of the molecule forming and the chemical modifier solutions (prepared as described in Section 2.2) were directly pipetted over the samples. Finally, the loaded platforms were transported to the graphite furnace and were subjected to the corresponding temperature program in Table 2, which was carefully optimized for the CaCl molecule as described in Section 3.2. For SRM 1549 non-fat milk powder, 10  $\mu\text{L}$  of the suspension (homogenized in an ultrasonic bath for 1 min before analysis), plus 10  $\mu\text{L}$  of the modifier and 10  $\mu\text{L}$  of the molecule forming agent were placed on the empty platform and were also subjected to the corresponding temperature program in Table 2.

In the case of the analysis based on the formation of the SrCl molecule, the method described in the work by Pereira et al. [20] was used with little modifications. In particular, graphite platforms were treated with Zr as permanent chemical modifier before the procedure described above was executed. For this purpose, 40  $\mu\text{L}$  of a 1 g L<sup>-1</sup> Zr solution were loaded onto the platform and subsequent thermal treatment in the graphite furnace was carried out. This protocol was repeated 10 times.

In all cases, quantitation was performed by calibration with aqueous standards. To this end, calibration curves prepared with one blank and five Cl standards covering the interval 100–800 ng (CaCl line

at 377.501 nm) and 20–100 ng (CaCl line at 620.862 nm and SrCl line at 635.860 nm) were used.

For every determination, five replicates of each CRM were analyzed and the median of the five results was taken as representative value [24]. In all cases, integrated absorbance ( $A_{int}$ ) was selected as measurement mode and the sum of the signals obtained for 3 pixels (the central pixel of each line plus the two adjacent ones,  $CP \pm 1$ ) was considered as the analytical result for each line studied.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. CaCl molecular absorption spectra

As described in the classical literature [25], the CaCl molecule presents a series of absorption bands in the visible and ultraviolet regions of the electromagnetic spectrum. Typical absorption profiles acquired with HR-CS GFMS for the four more intense bands described for this molecule are depicted in Fig. 1. These spectra were obtained after vaporization of a Cl solution (100 ng Cl) under the conditions listed in Table 2, but centering the spectral window at wavelengths permitting to obtain the broadest overview of the molecular transitions in each case. As seen in Fig. 1, all systems present a structure of fine rotational lines, all of them corresponding to the  $\Delta v=0$  vibrational band of the corresponding electronic transitions:  $X^2\Sigma^+ \rightarrow C^2\Pi$  for the band in the ultraviolet region (A,  $\lambda_{max}=377.501$  nm),  $X^2\Sigma^+ \rightarrow B^2\Sigma^+$  for the band in the orange region (B,  $\lambda_{max}=593.390$  nm) and  $X^2\Sigma^+ \rightarrow A^2\Pi$  for the two bands in the red region (C,  $\lambda_{max}=618.464$  nm and D,  $\lambda_{max}=621.146$  nm). This well resolved fine structure simplifies the procedure for setting the baseline as compared to other molecules giving rise to very broad bands [26], as is the case of AlCl [22]. On the

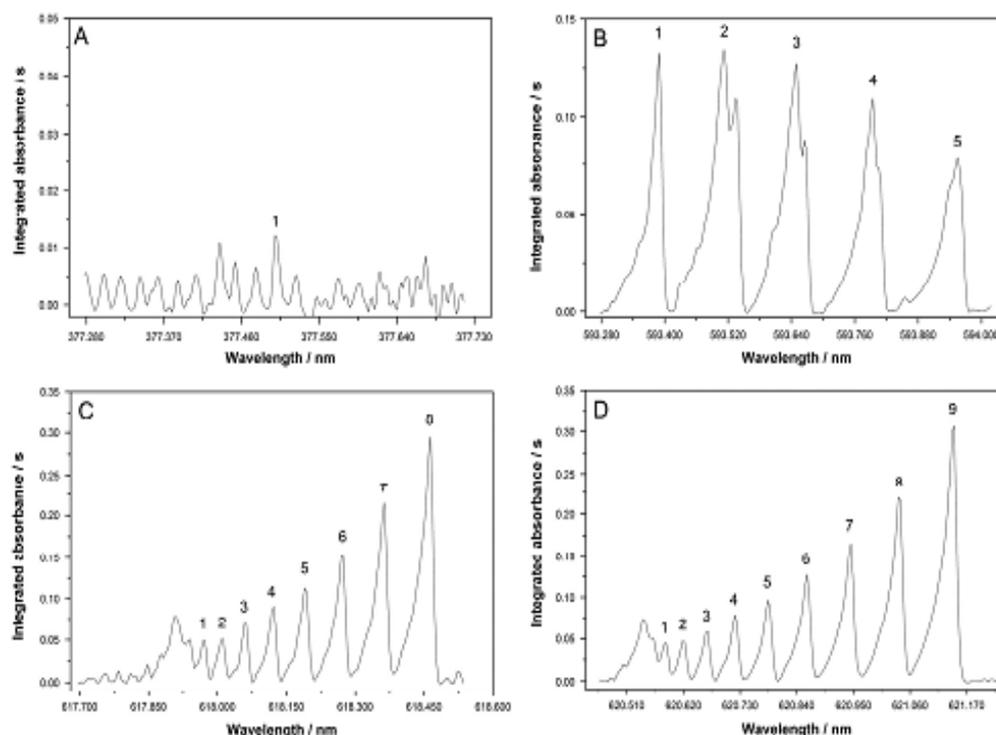


Fig. 1. Wavelength resolved time-integrated molecular absorption spectra for the four more intense systems of CaCl corresponding to the  $\Delta v=0$  vibrational band of the following electronic transitions: A)  $X^2\Sigma^+ \rightarrow C^2\Pi$  ( $\lambda_{max}=377.501$  nm); B)  $X^2\Sigma^+ \rightarrow B^2\Sigma^+$  ( $\lambda_{max}=593.390$  nm); C)  $X^2\Sigma^+ \rightarrow A^2\Pi$  ( $\lambda_{max}=618.464$  nm) and D)  $X^2\Sigma^+ \rightarrow A^2\Pi$  ( $\lambda_{max}=621.146$  nm). All spectra were obtained by vaporization of 100 ng Cl (as NaCl solution), 20  $\mu\text{g}$  Pd (as nitrate) and 400  $\mu\text{g}$  Ca, and applying the temperature program described in Table 2.

other hand, the existence of these different systems showing different sensitivities can be particularly useful in the case of direct solid sample analysis, as it opens the possibility to analyze samples with different Cl contents. These aspects will be studied in detail in Section 3.3.

### 3.2. Optimization of the working conditions for Cl determination after formation of the CaCl molecule in HR-CS GFMAS: chemical modifiers and temperature program

In order to select the best working conditions for the formation of the CaCl molecule and for the measurement of its molecular absorption with HR-CS GFMAS, all optimization experiments were carried out with aqueous solutions of Cl and monitoring the CaCl absorption at 620.860 nm, one of the most sensitive lines for this molecule, unless otherwise stated.

The first parameter to be optimized was the mass of Ca added to the graphite furnace. Ca, as the molecule-forming agent, needs to be in great excess in the furnace in order to ensure complete reaction with the analyte, thus assuring that variations in the analytical signal solely respond to variations in the amount of analyte (and not in the amount of Ca) present in the sample. For this optimization, 40 ng Cl were vaporized with increasing mass of Ca added to the furnace, in the presence of Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> as chemical modifier and applying the temperature program shown in Table 2. As shown in Fig. 2A where the evolution of the analytical response towards higher Ca mass is depicted, a fairly constant response is obtained for Ca mass higher than 400 µg. Before selecting this mass of Ca for further experiments, and taking into account that development of a method for direct solid sample analysis was intended, the optimization was also carried out monitoring the line at 377.501 nm (of much lower sensitivity, see Section 3.3), and vaporizing 400 ng Cl, to verify that the same behavior was observed for significantly higher Cl amounts. Similar results were also obtained in this case, and 400 µg Ca was finally selected as the optimum value for all further experiments.

At a second stage, selection of a chemical modifier was investigated. In fact, and as reported in all works considering Cl determination by means of HR-CS GFMAS, addition of a proper chemical modifier seems mandatory for increasing the stability of the different chlorine molecules tested during the pyrolysis and vaporization stages. For this purpose, the use of both permanent modifiers, such as Zr [20], and non-permanent modifiers, such as Sr [17] or a mixture of Ag and Sr [18], were proposed in the literature.

Generally speaking, and with the exception of analytes prone to strongly interact with graphite, similar effects can be often obtained for MAS with permanent and non-permanent modifiers and a great deal of examples of both types of strategies can be found in the literature [11]. In spite of this fact, some authors prefer the use of permanent modifiers as a means to simplify the analytical procedure. In this particular case, and considering that the molecule forming agent solution has to be added to the sample before analysis anyway, the addition of a second solution with the modifier was not considered a serious complication to the experimental protocol, and only the use of non-permanent modifiers was considered. Taking also into account our positive experience with platinum group metals modifiers for MAS, addition of Pd, either as nitrate or as nanoparticles, and addition of Pt as nanoparticles was investigated in further experiments.

While addition of all three modifiers provided similar well-defined peaks and similar thermal stabilization for the CaCl molecule (see below for details), Pd nitrate was finally selected as the best option. The Pt nanoparticles provided slightly lower sensitivity for the CaCl molecule than Pd modifiers, and yielded elevated blank values probably due to some Cl contamination in the reagents used to synthesize these nanoparticles [23].

The mass of Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> added was subsequently optimized (see Fig. 2B). This figure shows the integrated absorbance recorded for 40 ng Cl with increasing mass of Pd (as nitrate), in the presence of

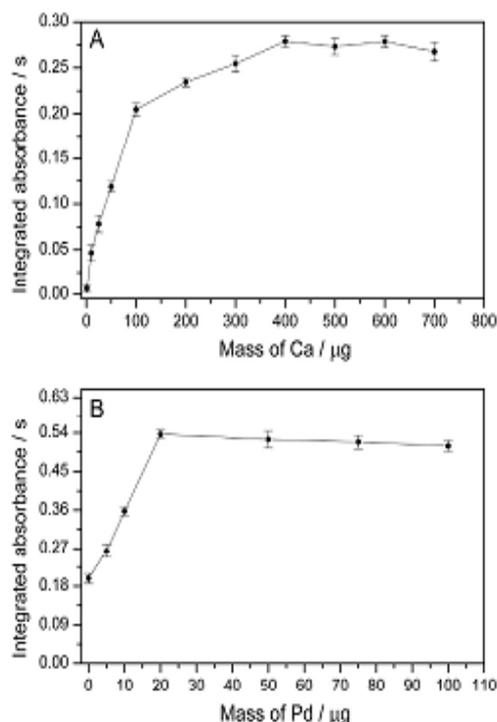


Fig. 2. (A) Optimization of the amount Ca added. This curve was obtained upon vaporization of 40 ng Cl (as NaCl solution), with the addition of 20 µg of palladium (as nitrate) by monitoring the 620.862 nm CaCl molecular absorption line. (B) Optimization of the amount of Pd added. This curve was obtained in the same conditions described in A), but fixing the amount of Ca added to 400 µg, while varying the amount of Pd added. In both cases, uncertainties are expressed as the standard deviation of three replicates.

400 µg Ca and applying the temperature program shown in Table 2. As seen from this figure, best results were obtained when masses of Pd higher than 20 µg were added to the platform. The study was also repeated using significantly higher mass of Cl (400 ng Cl measured at 377.501 nm). Similar results were obtained in this case, and 20 µg Pd were finally selected for further experiments.

Fig. 3 shows the pyrolysis and vaporization curves obtained for 40 ng Cl+400 µg Ca, both with and without the addition of Pd as chemical modifier. As seen from this figure, the benefits of Pd as chemical modifier are twofold. First, it significantly improves sensitivity for the CaCl molecular absorption at all temperatures tested. Second, it ensures stability until 900 °C for the pyrolysis stage. As for the vaporization, maximum absorption signals are obtained for 2000–2200 °C and 1800 °C, respectively, both in the presence and in the absence of Pd.

Considering that no significant differences were observed for the temporal profile of the signals at any of the different temperatures providing the maximum integrated absorbance results, a vaporization temperature of 2200 °C was finally chosen for further work. The pyrolysis temperature was fixed at 700 °C, which permitted decomposition of the matrices of all samples studied. Only in the case of the two carbon samples and the iron oxide sample some residues were left on the platform after analysis. Removal of these residues with a brush after every determination was sufficient for obtaining good results also for these samples.

The use of this mild temperature program has a positive effect on the lifetime of all graphite parts, which is usually compromised for molecular absorption methods needing a high concentration for the

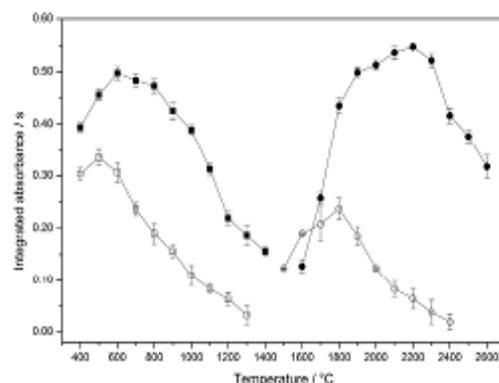


Fig. 3. Pyrolysis (squares) and vaporization (circles) curves obtained for 40 ng of Cl (as NaCl solution) +400 µg Ca both with the addition of 20 µg Pd (filled symbols) and without any chemical modifier (empty symbols), when monitoring the 620.862 nm CaCl molecular absorption line. The vaporization ( $T_{\text{vap}}$ ) and pyrolysis ( $T_{\text{pyr}}$ ) temperatures selected for establishing the pyrolysis and vaporization curves, respectively, were  $T_{\text{vap}}=2200$  °C and  $T_{\text{pyr}}=700$  °C. Uncertainties are expressed as the standard deviation of three replicates.

molecule forming agent. In particular, each graphite tube and platform could be used for about 200–250 heating cycles.

### 3.3. Selection of lines and analytical properties of the method

When aiming at the direct analysis of solid samples, the availability of different absorption lines for a given analyte is always desirable to enable direct analysis of solid samples with different analyte contents [27,28]. In this sense, the monitoring of the rotational structure of a molecular absorption band usually offers interesting characteristics as, very often, several analytically useful lines with different sensitivities lie in the narrow spectral window that can be recorded by HR-CS instruments. This opens the possibility to improve the LOD by combining several peaks of similar sensitivity, or enlarging the linear working range by selecting a less sensitive line, with the advantage that all this can be done *a posteriori*, without the need for repeating the measurement.

Both strategies were explored in this case for the four CaCl systems monitored. As shown in Fig. 1, three of the four bands monitored for the CaCl molecule show a sequence of absorption lines with different sensitivities, while the other band only shows one line potentially useful of much lower sensitivity. In this figure, each band has been identified with a letter (A, B, C, D) and all lines potentially useful have been identified with a number. For all of these lines (or their combinations), characteristic mass, linear range and LOD were studied and results are summarized in Table 3.

As seen from this table the most sensitive system (D,  $\lambda_{\text{max}}=621.146$  nm) provides the best LODs, of about 2–3 ng, for the most sensitive lines. These LODs can be further improved by combining the signal for several of the most sensitive peaks. For instance, it is possible to improve the LOD by a factor of 3 when combining the signal of the three most sensitive peaks for this system (peaks 7, 8 and 9 in Fig. 1; 0.75 ng Cl), in comparison to the LOD obtained when monitoring the most sensitive CaCl line only (621.146 nm, 2.7 ng Cl). This value is similar to those reported by Fehetia et al. (1.2 ng Cl) [18] or Pereira et al. (1.0 ng [20] and 0.85 ng Cl [21]) using the AlCl and SrCl molecules, respectively.

Contrary to what could be expected, selection of less sensitive lines did not result in an extension of the linear range and all peaks for a given band provided exactly the same upper limit: 200 ng Cl for band B ( $\lambda_{\text{max}}=593.390$  nm) and 300 ng Cl for bands C and D ( $\lambda_{\text{max}}=618.464$  nm and 621.146 nm, respectively). The band in the ultraviolet region (A,  $\lambda_{\text{max}}=377.501$  nm), is the only one that permitted expansion of the linear range to 860 ng. This seems to indicate that the reason for the loss of linearity is chemical (loss of efficiency for the formation of the CaCl molecule for high Cl concentrations) more than spectroscopic.

Table 3

Characteristic mass ( $m_c$ ), linear range and limit of detection for the CaCl rotational lines monitored under the conditions listed in Table 2. LODs were calculated as three times the standard deviation of the blank ( $n=10$ ) divided by the slope of the calibration curve, obtained as described in Section 2.3. Characteristic masses were calculated as 0.0044 divided by the slope of the calibration curve. Range of wavelength (A, B, C, D) and peak numbers between brackets refer to those used in Fig. 1.

Range of wavelength	Wavelength/nm (peak)	$m_c$ /ng	Linear range /ng	LOD /ng	
A	377.501 (1)	25.9	up to 860	14.2	
	B	593.390 (1)	0.759	up to 200	4.9
		593.512 (2)	1.02	up to 200	4.8
		593.650 (3)	0.846	up to 200	5.5
		593.795 (4)	1.26	up to 200	6.5
593.954 (5)		1.76	up to 200	7.8	
C	617.970 (1)	2.59	up to 300	14.2	
	618.012 (2)	2.44	up to 300	7.0	
	618.059 (3)	1.63	up to 300	4.9	
	618.122 (4)	1.19	up to 300	5.7	
	618.190 (5)	1.05	up to 300	8.7	
	618.274 (6)	0.772	up to 300	5.8	
	618.363 (7)	0.595	up to 300	4.7	
	618.464 (8)	0.436	up to 300	5.3	
D	620.587 (1)	3.38	up to 300	11	
	620.623 (2)	2.32	up to 300	7.2	
	620.667 (3)	1.76	up to 300	2.5	
	620.719 (4)	1.33	up to 300	6.7	
	620.788 (5)	1.07	up to 300	2.2	
	620.862 (6)	0.800	up to 300	2.6	
	620.945 (7)	0.677	up to 300	3.9	
	621.041 (8)	0.524	up to 300	3.2	
	621.146 (9)	0.400	up to 300	2.7	
(7)+(8)+(9)	0.072	up to 300	0.75		

$\lambda_{\text{min}}=618.464$  nm and 621.146 nm, respectively). The band in the ultraviolet region (A,  $\lambda_{\text{max}}=377.501$  nm), is the only one that permitted expansion of the linear range to 860 ng. This seems to indicate that the reason for the loss of linearity is chemical (loss of efficiency for the formation of the CaCl molecule for high Cl concentrations) more than spectroscopic.

### 3.4. Direct analysis of solid samples

To validate the method developed, direct solid sample analysis of seven of the certified reference materials listed in Table 1 was carried out. Only SRM 1549 Non-fat milk powder was analyzed as an aqueous suspension due to its high Cl content. Selection of the lines used for analysis was made according to the expected Cl content for each sample. Therefore, the most sensitive band (D,  $\lambda_{\text{max}}=621.146$  nm) was used for analysis of four of the samples, including those with lower Cl contents. For convenience and considering that most lines for this band provided similar LODs, the line at 620.862 nm (peak 6 in Fig. 1), located in the centre of the spectrum, was used for the determinations. For the rest of the samples the less sensitive line at 377.501 nm was used. On the other hand, sample masses were adapted for each sample (see Table 2) in order to obtain signal intensities within the linear range of each absorption line. In any case, different sample masses within the typical HR-CS GFMAS range for direct analysis (0.1–10 mg) could be used for other samples with different Cl contents.

As an example, Fig. 4 shows a three-dimensional spectrum of the CaCl band absorption in the vicinity of 620.862 nm for the vaporization of 0.513 mg of the polyethylene sample (ERM EC 681). The signal for the solid sample is unimodal and well-defined, which was always the case for all samples. Signals for the aqueous standards were very similar to that shown in Fig. 4, but only for Cl contents below 150 ng. Above this quantity, peaks started to show some tailing and even double peaks appeared. In any case, and despite these dissimilar signal

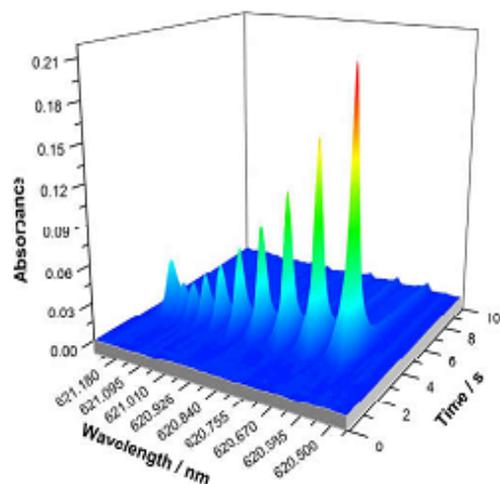


Fig. 4. Time and wavelength resolved absorbance spectrum for the CaCl molecule obtained after direct vaporization of 0.513 mg of a polyethylene sample (ERM EC 681), with the addition of 20  $\mu\text{g}$  of Pd and 400  $\mu\text{g}$  of Ca and under the working conditions gathered in Table 2.  $A_{\text{CaCl}}$ =0.5829 for the central peak at 620.862 nm.

Table 4

Determination of Cl in certified reference materials of various nature by means of solid sample analysis using HR-CS GFMAS<sup>a</sup> (n=5) using the molecular absorption for CaCl and SrCl and the conditions described in Table 2. Uncertainties are expressed as 95% confidence intervals.

Certified reference material	Chlorine content/ $\mu\text{g g}^{-1}$		
	Certified value	CaCl molecular absorption	SrCl molecular absorption
NCS ZC 81002b	48.2 <sup>c</sup>	46 $\pm$ 5	NA <sup>b</sup>
CRM BCR 460	59 $\pm$ 18	42 $\pm$ 2	NA <sup>b</sup>
ERM EC681	92.9 $\pm$ 2.8	100.5 $\pm$ 9.7	NA <sup>b</sup>
SRM 1575	293 $\pm$ 20	291 $\pm$ 20	244 $\pm$ 56
SRM 1568b	301.1 $\pm$ 3.8	294 $\pm$ 33	306 $\pm$ 44
CRM 686-1	950 $\pm$ 60	1075 $\pm$ 120	NA <sup>b</sup>
SRM 2692c	1338 $\pm$ 22	1333 $\pm$ 100	NA <sup>b</sup>
NIST SRM 1549	10900 $\pm$ 200	10400 $\pm$ 650	8920 $\pm$ 630

<sup>a</sup> NIST SRM 1549 was analyzed as an aqueous dispersion.

<sup>b</sup> Informative value.

<sup>c</sup> Not analyzed.

profiles, integrated peak areas for the solid samples and the aqueous standards were always comparable so that quantitation remained possible.

The results obtained for Cl determination in the eight CRM are shown in Table 4. All results are in good agreement with certified values. On the other hand, precision can be considered as adequate for solid sample analysis, with values between 5% and 9% RSD for all CRM.

Analysis based on the measurement of the molecular absorption for the SrCl molecule using the method proposed by Pereira et al. [20] was also carried out, as a means of testing if the presence of Ca in the samples could pose potential problems for analysis after formation of the SrCl molecule. Three of the eight samples considered in this work were analyzed with this method, representing different analytical situations: one sample with a Ca/Cl ratio slightly lower than unity (SRM 1568b Rice flour), one sample with a Ca/Cl ratio close to unity (SRM 1549 Non-fat milk powder), and one sample with a Ca/Cl ratio well above unity (SRM 1575 Pine needles). Results for these analyses

are also shown in Table 4.

As seen from this table, the Ca/Cl ratio present in the CRM seems to exert a clear influence on the results obtained for Cl determination using the method based on the formation of the SrCl molecule. Results for the sample with lower Ca/Cl ratio (SRM 1568b; Ca/Cl ratio=0.4) are similar for the two methods, either based in the CaCl molecule or in the SrCl molecule. In both cases a good agreement with the certified value is obtained based on a Student's *t*-test at a confidence level of 95%, and similar precision values are also obtained based on an F-test at the same confidence level ( $F_{\text{CaCl}}$ =1.73;  $F_{\text{SrCl}}$ =6.388).

The situation changes when the Ca/Cl ratio increases. For SRM 1549 (Ca/Cl ratio=1.2) and SRM 1575 (Ca/Cl ratio=14), the method based on formation of the SrCl molecule provides values biased low, to the point that the result for the first sample is not in agreement with the certified value at the 95% confidence level. The result obtained for the second sample is still in agreement with the certified value at this confidence level, but precision for this method is significantly worse than precision obtained with the CaCl molecule based on an F-test at a confidence level of 95% ( $F_{\text{CaCl}}$ =7.91;  $F_{\text{SrCl}}$ =6.388). These results seem to support the idea indicated by our research group in a recent paper [22] that problems can be expected for determination of Cl by means of HR-CS GFMAS with molecules such as AlCl (or SrCl), if elevated Ca contents are present in the samples to be analyzed and simple calibration with aqueous standards is intended to be used. The method proposed in this paper, based on the formation of the CaCl molecule does not show this limitation, providing good results for a wide variety of samples, while still offering a limit of detection below the ng level. This means that this method can compete in terms of LOD with more complex ones, such as those based on solid sample analysis electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry [29].

It is interesting to notice that, despite not being considered as the molecule forming agent in the first articles in which HR-CS GFMAS was used [17], Ca has already been shown to be the preferred element for Br determination [11,30], a very good alternative for F determination [31] and, as shown in this work, a good choice for Cl determination via HR-CS GFMAS as well.

#### 4. Conclusion

This work adds a new molecule (CaCl) to the existing repertoire of molecules used for Cl determination by HR-CS GFMAS, in order to extend the applicability of this technique to a wider range of analytical situations. Moreover, and in contrast to methods based in the formation of other molecules, the method developed permitted to obtain good results for samples naturally containing elevated Ca levels. This aspect is not trivial as Ca is an element commonly present at high concentrations in many samples where Cl determination needs to be performed, and having a robust methodology that can be deployed in such situations is clearly beneficial.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the funding from CTQ2015-64684-P (MINECO/FEDER) and from the Aragón Government (Fondo Social Europeo and project Innova-A1-020-15), as well as to Inycom S.A. A.G. thanks the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for the doctoral and 'sandwich' scholarship (BEX 6349/15-3). P.C.N. also thanks the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

#### References

- [1] J. Fauvaque, The chlorine industry, *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 1713–1720.
- [2] D. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90th ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 2009.

- [3] P.A. Mello, J.S. Barin, F.A. Duarte, C.A. Rizzo, L.D. Diehl, E.I. Müller, E.M.M. Flores, Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical samples: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7615–7642.
- [4] S.R. Krzyżeniak, R.F. Santos, F.M. Dalla Nora, S.M. Cruz, E.M.M. Flores, P.A. Mello, Determination of halogens and sulfur in high-purity polyimide by IC after digestion by MIC, *Talanta* 158 (2016) 193–197.
- [5] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, Slurry sampling device for use in electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 777–779.
- [6] M.G.R. Vale, N. Olsocznik, W.N.L. dos Santos, 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) 577–600.
- [7] M. Rosano, M. Aramendia, M.A. Belarra, High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2229–2250.
- [8] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Flörck, U. Heitmann, High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.
- [9] B. Welz, F.G. Leyri, R.G.O. Araújo, S.L.C. Ferreira, M.D. Huang, M. Okrasa, H. Becker-Ross, Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in (jams and furnaces—A review, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 137–148.
- [10] D.J. Butcher, Molecular absorption spectrometry in (jams and furnaces: a review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1–15.
- [11] M. Rosano, M.R. Flórez, E. García-Ruiz, Progress in the determination of metalloids and non-metals by means of high-resolution continuum source atomic or molecular absorption spectrometry. A critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2239–2250.
- [12] K.I. Tsunoda, H. Haraguchi, K. Furui, Studies on the occurrence of atoms and molecules of aluminum, gallium, indium and their monohalides in an electrothermal carbon furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 35 (1980) 715–729.
- [13] K.I. Tsunoda, K. Fujisawa, K. Fusa, Determination of chlorine and bromine by molecular absorption of aluminum mono-halides at high-temperature, *Anal. Chem.* 50 (1978) 861–865.
- [14] K. Ditríck, B. Vorberg, J. Funk, V. Beyer, Determination of some nonmetals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 39 (1984) 349–363.
- [15] K. Ditríck, P. Maister, Molecular absorption spectrometry with electrothermal volatilization in a graphite tube Part 6. Determination of traces of chloride by molecular absorption of AlCl, GaCl and InCl molecules, *Anal. Chim. Acta* 121 (1980) 205–217.
- [16] P. Parvinen, L.H.J. Lajunen, Determination of chloride in drinking and ground water by AIC molecular absorption spectrometry using graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Talanta* 50 (1999) 67–71.
- [17] U. Heitmann, H. Becker-Ross, S. Flörck, M.D. Huang, M. Okrasa, Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1314–1320.
- [18] M. Fiechtel, A.L. Toggiani, M.A.M.S. da Veiga, Determination of chlorine in food samples via the AIC molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 71–72 (2012) 98–101.
- [19] M.S.P. Enderx, A.O. Gomes, R.F. Oliveira, R.C.L. Guimarães, M.F. Meskin, E.M.M. Flores, E.I. Müller, Determination of chlorine in crude oil by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using AlCl, InCl and SrCl molecules, *Energy Fuels* 30 (2016) 3637–3643.
- [20] E.R. Pereira, B. Welz, A.H.D. Lopez, J.S. de Góis, G.F. Curranzi, D.L.G. Borges, E. Carasak, J.B. de Andrade, Strontium mono-chloride — A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 102 (2014) 1–6.
- [21] E.R. Pereira, L.M. Rocha, H.R. Cadorní, V.D. Silva, B. Welz, E. Carasak, J.B. de Andrade, Determination of chlorine in coal via the SrCl molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 114 (2015) 46–50.
- [22] F.V. Nakadi, M.A.M.S. da Veiga, M. Aramendia, E. García-Ruiz, M. Rosano, Chlorine isotope determination via the monitoring of the AIC molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry — a case study, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1531–1540.
- [23] M. Rosano, M.R. Flórez, Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 401–412.
- [24] M.A. Belarra, M. Rosano, J.R. Castillo, Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 547–552.
- [25] R.W.B. Pearse, A.G. Gaydon, *The Identification of Molecular Spectra*, 4th ed., Chapman and Hall, London, UK, 1976.
- [26] M. Aramendia, M.R. Flórez, M. Piette, F. Vanhaecke, M. Rosano, Al determination in whole blood samples as AlF via high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry: potential application to forensic diagnosis of drowning, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1964–1973.
- [27] U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Leyri, Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 1222–1230.
- [28] M. Rosano, L. Bello, M. Flórez, M.A. Belarra, On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 321–328.
- [29] J.S. de Góis, E.R. Pereira, B. Welz, D.L.G. Borges, Application of direct solid sample analysis for the determination of chlorine in biological materials using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 105 (2015) 12–17.
- [30] M.R. Flórez, M. Rosano, Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32–39.
- [31] A.R. Borges, L.L. Francini, B. Welz, E. Carasak, M.G.R. Vale, Determination of (uorine in plant materials via calcium mono-(uoride using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry with direct solid sample introduction, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1564–1569.

## 7 REFERÊNCIAS

ABICLOR, Relatório anual –Indústria Brasileira de Álcalis, Cloro e Derivados, 2014.

ACGIH, Association Advancing Occupational and Environmental Health, Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists Inc. Cincinnati, Ohio, 2005.

ADAMS, D. et al, Mercury contamination in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*: An assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health, **Sci. Total Environ.**, n. 408, p. 5808-5816, 2010.

ADOLFO, F. R. et al Simultaneous determination of cobalt and nickel in vitamin B12 samples using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, **Talanta**, n. 147, p. 241-245, 2016.

AJTONY, Z. et al, Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content, **Talanta**, n. 76, p. 627-634, 2008.

ALDOUS, K. M., MITCHELL, D. G., JACKSON, K. W. Simultaneous Determination of Seven Trace Metals in Potable Water Using a Vidicon Atomic Absorption Spectrometer, **Anal. Chem.**, v. 47, n. 7, p. 1034-1037, 1975.

ALMEIDA, I. L. S. et al Suitable extraction of soils and sediments for mercury species and determination combined with the cold vapor generation atomic absorption spectrometry technique, **Microchem. J.**, n. 124, p. 326-330, 2016.

AMORIM, F. A. C. et al Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares, **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.

ANTES, F. G. et al, Development of a vaporization system for direct determination of chlorine in petroleum coke by ICP-MS, **Microchem. J.**, v. 109, p. 117-121, 2013.

ARAMENDÍA, M. Al determination in whole blood samples as AlF via high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry: potential application to forensic diagnosis of drowning, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 26, p. 1964–1973, 2011.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, TOXICOLOGICAL PROFILE FOR IODINE, Atlanta, Georgia, 2004.

ATSDR. 1999. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

AZEVEDO, B. F. et al., Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems, **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

BACKER, H., HOLLOWELL, J., Use of Iodine for Water Disinfection: Iodine Toxicity and Maximum Recommended Dose, **Environ. Health Persp.**, v.108, n. 8, 2000.

BARBOSA, J. T. P. et al., Bromine, Chlorine, and Iodine Determination in Soybean and its Products by ICP-MS After Digestion Using Microwave-Induced Combustion, **Food Anal. Methods**, n. 6, p. 1065–1070, 2013.

BAUMBACH, G., LIMBURG, T., EINAX, J.W., Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry, **Microchem. J.**, 106, p. 295-299, 2013.

BAUMBACH, G., EINAX, J.W., Determination of sulfur in coal by solid sampling graphite furnace high-resolution molecular absorption spectrometry, **Microchem. J.**, 117, p. 89-93, 2014.

BAYSAL, A., AKMAN, S., A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry, **Talanta**, n. 85, p. 2662-2665, 2011.

BELARRA, M. A., RESANO, M., CASTILLO, J. R., Discrimination of the causes of imprecision in the direct determination of metals in organic solid samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 13, p. 489-494, 1995.

BELARRA, M. A., RESANO, M., CASTILLO, J. R. Theoretical evaluation of solid sampling–electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 14, p. 547-552, 1999.

BELARRA, M. A. et al., Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how?, **Trends Anal. Chem.**, v. 21, n. 12, 2002.

BEATY, D., KERBER, J. D., Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrometry, **Perkin Elmer Corporation**, 2<sup>a</sup> edição, 1993.

BECHLIN, M. A., NETO, J.A. G., NOBREGA, J. A., Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis, **Microchem. J.**, n. 109, p. 134-138, 2013.

BERGLUND, M. et al., Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment, **Environ. Health**, v. 4, n. 20, 2005.

BERLIN, M., ZALUPS, R. K., FOWLER, B. A., “Mercury,” in Handbook on the Toxicology of Metals, capítulo 33, Elsevier, New York, NY, USA, 3<sup>a</sup> edição, 2007.

BERMEJO-BARRERA, P. et al., Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, n. 296, p. 181-193, 1994.

BERMEJO-BARRERA, P. et al., Studies on solvent extraction to determine iodide indirectly by electrothermal atomic absorption spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 10, p. 227-232, 1995.

BERMEJO-BARRERA, P. et al., Indirect atomic absorption spectrometry IAAS as a tool for the determination of iodide in infant formulas by precipitation of AgI and redissolution with cyanide, **Microchem. J.**, v. 69, p. 205-211, 2001.

BERNHOF, R. A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature, **J. Environ. Public Health**, p.1-10, 2012.

BORGES, D. L. G. et al., Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, **Anal.**, n.18, p. 58-66, 2005.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Decreto número 97.634 - Dispõe sobre o controle de produção e da comercialização de substância que comporta risco para a vida e o meio ambiente, e dá outras providências, 1989.

BRASIL, Decreto nº 97.507 de 13 de fevereiro de 1989 – Dispõe sobre o licenciamento da atividade mineral, o uso do mercúrio e do cianeto em áreas de extração de ouro e dá outras providências, 1989.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 105, de 1999 – Aprova os regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, 1999.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899, de 2003 – Determina a publicação do “guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, 2003.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 – Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, 2004.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº. 269, 2005 – Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, 2005.

BRASIL, CONAMA – Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 – Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências, 2005.

BRASIL, CONAMA – Resolução nº 316 de 29 de outubro de 2002 – Dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos, 2002.

BRASIL, Instrução normativa SDA nº 27 de 05 de junho de 2006 – Dispõe sobre a importação ou comercialização, para produção de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes, 2006.

BRASIL, Decreto nº 7.404 de 23 de dezembro de 2010 – Regulamenta a Lei nº 12.305 de 2 de agosto de 2010, que institui a política nacional de resíduos sólidos, cria o comitê Interministerial da política nacional de resíduos sólidos e o comitê orientador para a implantação dos sistemas de lógica reversa, e dá outras providências, 2010.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional da Vigilância Sanitária, Resultado do monitoramento do teor de iodo no sal para o consumo humano, 2014a.

BRASIL, Projeto de Lei nº 7.627 de 2014 – Dispõe sobre a proibição do uso de amálgama dentária, composta por mercúrio para restauração dentária, 2014b.

BRASIL, Ministério da agricultura, portaria Nº 329, de 2 de setembro de 1985.

BRASIL, Portaria IBAMA Nº 32, de 12 de maio de 1995.

BRASIL, Ministério do meio ambiente, Perfil do Gerenciamento de Mercúrio no Brasil, incluindo seus Resíduos, Brasília: MMA, 2011.

BRASIL, Ministério da saúde, Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011.

BURGUERA, M. et al Determination of boron in blood, urine and bone by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium and citric acid as modifiers, **Spectrochim. Acta B**, v. 56, p. 1845-1857, 2001.

CADORIM, H. R. et al., Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace, **Talanta**, n. 146, p. 203-208, 2016.

CAMPOS, M. L. A. M. New approach to evaluating dissolved iodine speciation in natural waters using cathodic stripping voltammetry and a storage study for preserving iodine species, **Mar. Chem.**, n. 57, p. 107-117, 1997.

CENTINEO, G., GONZÁLEZ, E. B., SANZ-MEDEL, A. Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, **J. Chromatogr. A.**, n. 1034, p. 191-197, 2004.

CHU, P, MEHTA, A. K., CARTY, R., Impact of Coal Chlorine on Mercury Speciation and Emission from a 100-MW Utility Boiler with Cold-Side Electrostatic Precipitators and Low-NO<sub>x</sub> Burners, **Energ. Fuel**, v. 19, p. 842-854, 2005.

CHUNG, S. W. C., CHEN, B. L. S., Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities, **J. Chromatogr. A**, n. 1218, p. 5555-5567, 2011.

COMMISSION REGULATION (EC), n<sup>o</sup> 1881, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006.

CORREIA, P. R. M., OLIVEIRA, E., OLIVEIRA, P. V., Simultaneous determination of Cd and Pb in foodstuffs by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, v. 405, p. 205-211, 2000.

CVJETKO, P., CVJETKO, I., PAVLICA, M. Thallium toxicity in humans, **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, n. 61, p. 111-119, 2010.

DAVY, H., Some Experiments and Observations on a New Substance Which Becomes a Violet Coloured Gas by Heat, **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v.104, p. 74-93, 1814.

DELANGE, F. et al., Elimination of iodine deficiency disorders in Central and Eastern Europe, the Commonwealth of Independent States, and the Baltic States. Proceeding of a Conference held in Munich, Germany, Geneva, **World Health Organization**, 1998.

DELONG, G. R., Observations on the neurology of endemic cretinism. Iodine and the brain, New York, **Plenum Press**, 1989.

DHARA, A. et al., A total reflection X-ray fluorescence method for the determination of chlorine at trace levels in nuclear materials without sample dissolution, **X-ray Spectrom.**, v. 41, p. 316-320, 2012.

DITTERT, I. M. et al., Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, n. 64, p. 537-543, 2009.

DITTERT, I. M. et al., Simultaneous determination of cobalt and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 25, p. 590-595, 2010.

DITTRICHI, K. et al., Determination of some nonmetals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite furnace, **Spectrochim. Acta B**, v. 39, n. 2-3, p. 349-363, 1984.

DOHÁN, O. et al., The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance, **Endocr. Rev.**, n. 24, n. 1, p. 48–77, 2003.

DONG, L. M. et al., On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood, **J. Chromatogr. A**, n. 1036, p. 119-125, 2004.

DOYLE, A. et al., Direct chlorine determination in crude oils by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry: An improved method based on a proper strategy for sample homogenization and calibration with inorganic standards, **Spectrochim. Acta B**, v. 66, p. 368-372, 2011.

DOYLE, A. et al., Spectrometric methods for the determination of chlorine in crude oil and petroleum derivatives - A review, **Spectrochim. Acta B**, v. 86, p. 102-107, 2013.

DZIUBANIUK, M. et al Application of anion-conducting lanthanum oxychloride for potentiometric chlorine gas sensors, **Solid State Ionics**, v. 225, p. 324-327, 2012.

ENDERS, M. S. P., et al., Determination of Chlorine in Crude Oil by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry Using AlCl, InCl, and SrCl Molecules, **Energ Fuel**, v. 30, n. 5, 2015.

EPA, Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed, Agosto de 2000.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency, Drinking water standards and health advisories table, 2007.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS), Mercury, elemental; CASRN 7439-97-6, 1995.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency, National primary drinking water standards, 2003.

ERICKSEN, G. E., The Chilean Nitrate Deposit, **Am. Sci.**, v. 71, 1983.

FDA, Food and Drug Administration, Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. CFR Título 21, Volume 3, 21CFR172, seção 172.365, 2016.

FDA, U. S. Food and Drug Administration, GRAS Determination for the Use of Calcium Chloride in Potato Snacks, Washington, DC, 2016.

FECHETIA, M., TOGNON, A. L., VEIGA, M. A. M. S. Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, **Spectrochim. Acta B**, v. 71-72, p. 98-101, 2012.

FERNANDES, E.; GLÓRIA, A. M. DA S.; GUIMARÃES, B. DE A., O Setor de soda-cloro no Brasil e no mundo, BNDES Setorial – Petroquímica, Rio de Janeiro, n. 29, p. 279-320, 2009.

FERNÁNDEZ, E. et al., Mercury determination in urine samples by gold nanostructured screen-printed carbon electrodes after vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid e liquid microextraction, **Anal. Chim. Acta**, n. 915, p. 49-55, 2016.

FORRAI, J. History of amalgam in dentistry, **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, n. 3, v. 1, p. 65-71, 2007.

FERREIRA, H. S. et al., Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 25, p. 1039-1045, 2010.

FRESCHI, G. P. G. et al., Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v. 56, p. 1987-1993, 2001.

GAMALLO-LORENZO, D. et al., Microwave-assisted alkaline digestion combined with microwave-assisted distillation for the determination of iodide and total iodine in edible seaweed by catalytic spectrophotometry, **Anal Chim Acta**, n. 542, p. 287-295, 2005.

GARNIER, R., FUSTER, J. M., CONSO, F., "Acute mercury vapour poisoning," Toxicological European Research, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1981.

GIBB, H., O'LEARY, K. G. Mercury Exposure and Health Impacts among Individuals in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining Community: A Comprehensive Review, **Environ. Health Perspect.**, n. 122, p. 667-672, 2014.

GLEISNER, H., WELZ, B., EINAX, J. W., Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer, **Spectrochim. Acta B**, v. 65, p. 864-869, 2010.

GOIS, J. S. et al., Simultaneous determination of bromine and chlorine in coal using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and direct solid sample analysis, **Anal. Chim. Acta**, v. 852, p. 82-87, 2014.

GOODMAN, GILMAN, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª edição, 1990.

GREENE, J. E. Tracing the 5000-year recorded history of inorganic thin films from similar to 3000 BC to the early 1900s AD, **Appl. Phys. Rev.**, v. 1, n. 4, 2014.

GRIZEL, M. G. et al., A new method for chlorine determination in commercial pet food after decomposition by microwave-induced combustion, **Anal. Methods**, n. 7, p. 4315–4320, 2015.

GUARDA, A. et al., Determination of chlorine via the CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, **Talanta**, v. 162, p. 354-361, 2016.

GUNDUZ, S., AKMAN, S., Determination of sulphur in various vegetables by solid sampling high-resolution electrothermal molecular absorption spectrometry, **Food Chem.**, n. 172, p. 213-218, 2015.

HA, et al Current progress on understanding the impact of mercury on human health, **Environ. Res.**, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.042>, 2016.

HAASE, O., BROEKAER, J. A.C., Development of an on-line procedure for the indirect determination of iodide by flow-injection cold-vapor atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v. 57, p. 157-165, 2002.

HAISS, W. et al., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra, **Anal. Chem.**, n. 79, p. 4215-4221, 2007.

HAN, C. et al., Photo-induced cold vapor generation with low molecular weight alcohol, aldehyde, or carboxylic acid for atomic fluorescence spectrometric determination of mercury, **Anal. Bioanal. Chem.**, n. 388, p. 825-830, 2007.

HARAGUCHI, H., FUWA, K., Atomic and molecular absorption spectra of indium in air-acetylene flame, **Spectrochim. Acta**, v. 30B, p. 535-545, 1975.

HARNLY, J. M. et al., Background-Corrected Simultaneous Multielement Atomic Absorption Spectrometer, **Anal. Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2007-2014, 1979.

HARRIS, D. C., Análise Química Quantitativa, 7ª edição, Rio de Janeiro, LTC, 2008.

HEITMANN, U. et al., Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 21, p. 1314-1320, 2006.

HUANG, M. D. et al., Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 338–345, 2006.

HUANG, M. D. et al., Determination of halogens via molecules in the air-acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry, Part II: Chlorine, **Spectrochim. Acta B**, v. 61, p. 959-964, 2006A.

HUANG, M. D. et al., Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame, **Spectrochimica Acta B**, v. 61, p. 181-188, 2006B.

HUANG, M. D. et al., Determination of sulfur forms in wine including free and total sulfur dioxide based on molecular absorption of carbon monosulfide in the air-acetylene flame, **Anal. Bioanal. Chem.**, n. 390, p. 361-367, 2008A.

HUANG, M. D. et al., High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine, **Spectrochim. Acta B**, v. 63, p. 566-570, 2008B.

HUANG, M. D. et al., Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, **Spectrochim. Acta B**, v. 64, p. 697-701, 2009.

HUANG, M. D. et al., High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of nitrogen monoxide and its application for the determination of nitrate, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 25, p. 163-168, 2010.

HUBER, et al., Investigation of chemical modifiers for sulfur determination in diesel fuel samples by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using direct analysis, **Spectrochim. Acta B**, v. 108, p. 68-74, 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 02, 2007.

IQBAL, K., ASMAT, M. Uses and effects of mercury in medicine and dentistry, **J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad**, n. 24, n. 3-4, p. 204-207, 2012.

IZGI, B., DEMIR, C., GÜÇER, S. Application of factorial design for mercury determination by trapping and graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v. 55, p. 971-977, 2000.

JARDIM, I. C. S. F., ANDRADE, J. A. A., Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs, **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KELIHER, P. N., WOHLERS, C. C., High Resolution Atomic Absorption Spectrometry Using an Echelle Grating Monochromator, **Anal. Chem.**, v. 46, n. 6, 1974.

KIRCHHOFF, G., BUNSEN, R. Chemical Analysis by Spectrum-observations - Second Memoir, **Phil. Mag. S.**, 4<sup>o</sup> série, v. 22, n.148, p. 329-349, 1861.

KOSTIAL, K., KELLO, D., JUGO, S., "Influence of age on metal metabolism and toxicity," *Environmental Health Perspectives*, v. 25, p. 81-86, 1978.

KOWALEWSKA, Z., Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products, **Spectrochim. Acta B**, v. 66, p. 546-556, 2011.

KRATA, A., VASSILEVA, E., BULSKA, E., Reference measurements for total mercury and methyl mercury content in marine biota samples using direct or species-specific isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry, **Talanta**, n. 160, p. 562-569, 2016.

LEE, J. et al., Effectiveness of activated carbon disk for the analysis of iodine in water samples using wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry, **Chemosphere**, n. 142, p. 72-76, 2016.

LEITERER, M., TRUCKENBRODT, D., FRANKE, K. Determination of iodine species in milk using ion chromatographic separation and ICP-MS detection, **Eur. Food Res. Technol.**, n. 213, p. 150–153, 2001.

LIANG, P., KANG, C., MO, Y. One-step displacement dispersive liquid-liquid microextraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the selective determination of methylmercury in environmental samples, **Talanta**, v. 149, p. 1-5, 2016.

LÓPEZ-GARCÍA, I., SÁNCHEZ-MERLOS, M., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of mercury in soils and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling, **Spectrochim. Acta B**, v. 52, p. 2085-2092, 1997.

LUZ, A. B., LINS, F. A. F. Rochas & Minerais Industriais – Usos e especificações, Ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Rio de Janeiro, Capítulo 6, edição 1, 2005.

MANDJUKOV, P. et al., Determination of total mercury for marine environmental monitoring studies by solid sampling continuum source high resolution atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v. 103-104, p. 24-23, 2015.

MARTÍN-YERGA, D., GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B., COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical determination of mercury: A review, **Talanta**, n. 116, p. 1091-1104, 2013.

MICARONI, R. C. C. M. et al., Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Quím. nova**, n. 23, v. 4, p. 487-495, 2000.

MIOR, R. et al., Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace, **Talanta**, n. 106, p. 368-374, 2013.

MUÑOZ, J., CÉSPEDES, F., BAEZA, M. Modified multiwalled carbon nanotube/epoxy amperometric nanocomposite sensors with CuO nanoparticles for electrocatalytic detection of free chlorine, **Microchem J.**, v. 122, p.189-196, 2015.

MURTHY, M. R. et al., An immobilized dehydrohalogenase based potentiometric biosensor for the detection of chlorinated pesticides, **Anal. Methods**, v. 2, p.1355-1359, 2010.

NAKADI, F. V., ROSA, L. R., VEIGA, M. A. M. S., Determination of sulfur in coal and ash slurry by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, v. 88, p. 80-84, 2013.

NAKADI, F. V., SOARES, A. L. C., VEIGA, M. A. M. S., Determination of sulfur in diesel via CS molecule by high-resolution molecular absorption spectrometry applying palladium nanoparticles as chemical modifier, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 29, p. 1871-1879, 2014.

NAKADI, F. V. et al., Chlorine isotope determination via the monitoring of the AlCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry – a case study, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 30, p. 1531-1540, 2015.

NAKATA, K. et al., Direct solid sampling system for electrothermal vaporization and its application to the determination of chlorine in nanopowder samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, **Talanta**, v. 138, p. 279-284, 2015.

NAOZUKA, J. et al., Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 18, p. 917-921, 2003.

NAS, National Academy of Science, Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, **National Academies Press**, Washington, D.C., 2000.

NASCIMENTO, E. S., CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos, **Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 1, Salvador, CRA, 2001.

NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH pocket guide to chemical hazards, DHHS (NIOSH) Publication No. 2005-149, Cincinnati, Ohio, 2007.

NITSCHKE, U., STENGEL, D. B. A new HPLC method for the detection of iodine applied to natural samples of edible seaweeds and commercial seaweed food products, **Food Chem.**, n. 172, p. 326-334, 2015.

NORSETH, T., CLARKSON, T. W., Intestinal transport of  $^{203}\text{Hg}$ -labeled methyl mercury chloride. Role of biotransformation in rats, **Arch. Environm. Health**, v. 22, n. 5, p. 568-577, 1971.

OLIVÉ-MONLLAU, R. et al., Highly sensitive CNT composite amperometric sensors integrated in an automated flow system for the determination of free chlorine in Waters, **Talanta**, v. 81, p. 1593-1598, 2010.

OSHA, Occupational Safety and Health Administration, Chlorine In Workplace Atmospheres, OSHA Method ID-101, Revised 1991.

OSHA, Pocket Guide to Chemical Hazards, Iodine: chemical description, physical properties, potentially hazardous incompatibilities, and more, OSHA IMIS Code Number: 1515, 2004.

OTTEN, J., HELLWIG, J.P., MEYERS, L.D., Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements, 1 ed., National Academies Press, Washington DC, 2006.

OZBEK, N., AKMAN, S., Determination of Total Sulfur in Food Samples by Solid Sampling High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry, **J. Agric. Food. Chem.**, n. 61, p. 4816-4821, 2013.

OZBEK, N., OZCAN, M. Simultaneous determination of Co, Al and Fe by HR CS-GFAAS, **Talanta**, n. 148, p. 17-21, 2016.

OZBEK, N., AKMAN, S., Determination of Chlorine in Milk via Molecular Absorption of SrCl Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, **J. Agric. Food Chem.**, 2016, v. 64, n. 28, p. 5767–5772, 2016.

OZBEK, N., BAYSAL, A., A new approach for the determination of sulphur in food samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometer, **Food Chem.**, n. 168, p. 460-463, 2015.

PAIVA, A. P. et al., Catalisadores de Automóvel: Caracterização, Reciclagem e Recuperação de Metais Preciosos, **Química: Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, p. 29-36, 2014.

PASCHEN, F. Bohrs Heliumlinien, **Annalen. der Physik**, v. 355, n. 16, p. 901-940, 1916.

PEARSE, R.W.B., GAYDON, A. G. The Identification of Molecular Spectra, 4<sup>o</sup> ed., Chapman and Hall, Londres, Reino Unido, 1976.

PEIXOTO, E. M. A., Elemento químico – Cloro, **Quim. Nova Esc.**, n. 17, 2003.

- PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Headspace single-drop microextraction coupled to microvolume UV–vis spectrophotometry for iodine determination, **Anal. Chim. Acta**, n. 631, p. 223-228, 2009.
- PENG, B. et al., Simultaneous determination of halogens (F, Cl, Br, and I) in coal using pyrohydrolysis combined with ion chromatography, **Fuel**, v. 94, p. 629-631, 2012.
- PEREIRA, J. S. F. et al., Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion, **Spectrochim. Acta B**, v. 64, p. 554–558, 2009.
- PEREIRA, M. P. et al., Determination of chlorine in coal via the SrCl molecule using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, **Spectrochim. Acta B**, v. 114, p. 46–50, 2015.
- PEREIRA, M. P. et al., Strontium mono-chloride — A new molecule for the determination of chlorine using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, **Spectrochim. Acta B**, v. 102, p. 1-6, 2014.
- PHE, Public Health England, Compendium of Chemical Hazards: Sodium Hypochlorite, p. 1-10, 2015.
- QUADROS, D. P. C. et al., Evaluation of Brazilian and Venezuelan Crude Oil Samples by Means of the Simultaneous Determination of Ni and V as Their Total and Non-volatile Fractions Using High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, **Energy Fuels**, n. 24, p. 5907–5911, 2010.
- RAHOLA, T., HATTULA, T., LOROLAINEN, A. The Elimination of <sup>203</sup>Hg-methylmercury in man, **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 27, supplement 116, p. 77, 1971.
- RAMETTE, R. W., SANDFORD, JR., Thermodynamics of Iodine Solubility and Triiodide Ion Formation in Water and in Deuterium Oxide, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 87, n. 22, p. 5001-5005, 1965.
- RAMÍREZ, A. V. Mercury occupational poisoning, **An. Fac. Med.**, n. 69, v. 1, p. 46-51, 2008.
- RDC, nº 42, de 29 de agosto de 2013, Dispõe sobre o regulamento técnico MERCOSUL sobre os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, 2013.
- RESANO, M. et al., On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential

monitoring of multiple atomic lines, **Spectrochim. Acta Part B**, n. 66, p. 321–328, 2011.

RESANO, M. et al., Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of boron in plant tissues, **Anal. Chim. Acta**, n. 582, p. 214-222, 2009.

RESANO, M., BRICEÑO, J., BELARRA, M. A. Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: comparison of atomic and molecular absorption spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 24, p. 1343-1354, 2009B

RESANO, M., BRICEÑO, J., BELARRA, M. A. Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation, **Spectrochim. Acta B**, n. 64, p. 520-529, 2009A.

RESANO, M., RUIZ, E. G. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review, **Anal Bioanal Chem**, n. 399, p. 323–330, 2011.

RESANO, M.; FLÓREZ, M.R., Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier, **J. Anal. At. Spectrom.**, n. 27, p. 401-412, 2012.

RIBANI, M. et al., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE, K. M. et al., Environmental Mercury and Its Toxic Effects, **J. Prev. Med. Public Health**, v. 47, p. 74-78, 2014.

RISHER, J. F., AMLER, S. N. Mercury Exposure: Evaluation and Intervention The Inappropriate Use of Chelating Agents in the Diagnosis and Treatment of Putative Mercury Poisoning, **Neurotoxicology**, n. 26, p. 691–699, 2005.

SANG, Z. N. et al., Thyroid Dysfunction during Late Gestation Is Associated with Excessive Iodine Intake in Pregnant Women, **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, n. 97, v. 8, p. 1363-1369, 2012.

SANTOS, L. M. G. et al., Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, **Talanta**, n. 78, p. 577-583, 2009.

SANTOS, V. M., AFONSO, J. C., Recuperação de compostos de iodo de reagentes e soluções laboratoriais, **Quim. Nova**, v. 35, n. 2, p. 398-402, 2013.

SAPUTRO, S. et al., Differential Pulse Voltammetric Determination of Free Chlorine for Water Disinfection Process, **Electroanal.**, v. 22, p. 2765-2768, 2010.

SEKIMOTO, S., EBIHARA, M. Accurate Determination of Chlorine, Bromine and Iodine in U.S. Geological Survey Geochemical Reference Materials by Radiochemical Neutron Activation Analysis, **Geostand. Geoanal. Res.**, DOI: 10.1111/ggr.12145, 2016.

SILVA, S. V. et al., Evaluation of bromine and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination, **Food Chem.**, n. 190, p. 364-367, 2016.

SKOOG, A. D. et al., Fundamentos de química analítica, Editora Thonson, 8ª edição, 2006.

SOMÉ, I. S. et al., Determination of groundwater mercury (II) content using a disposable gold modified screen printed carbon electrode, **Talanta**, n. 152, p. 335-340, 2016.

SOUZA, J. R., BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia, **Quim. Nov. Esc.**, n. 12, p. 3-7, 2000.

SOUZA, S. O. et al., Determination of copper and mercury in phosphate fertilizers employing direct solid sampling analysis and high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, n. 114, p. 58-64, 2015.

SUDA, I., TAKAHASHI, H., Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by other reactive oxygen species besides hydroxyl radical, **Archives of Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 34-39, 1992.

SILVA, A. F. et al., Determination of mercury in biological samples using solid sampling high-resolution continuum source electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with calibration against aqueous standards, **J. Anal. At. Spectrochim.**, n. 21, p. 1321-1326, 2006.

SUNG, Y-H., SHANG, D-H., On-line preconcentration system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of bismuth, cadmium, and lead in urine, **Anal. Chim. Acta**, v. 495, p. 165-176, 2003.

SUZUKI, T. et al., "Mercury in human amniotic fluid," *Scandinavian Journal of Work, Environm. Health*, v. 3, n. 1, p. 32-35, 1977.

TENG, W. et al., Effect of iodine intake on thyroid diseases in China, **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 26, p. 2783-2793, 2006.

TOROK, P., ZEMBERYOVÁ, M. Direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of toxic and potentially toxic elements in certified reference materials of brown coal fly ash, **Spectrochim. Acta B**, n. 71-72, p. 80-85, 2012.

UNEP, United Nations Environment Programme, Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013.

UNEP, United Nations Environment Programme, Technical Background Report for the Global Mercury Assessment 2013. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway/UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013a.

VIRGILIO, et al., Determination of Total Sulfur in Agricultural Samples by High-Resolution Continuum Source Flame Molecular Absorption Spectrometry, **J. Agric. Food Chem.**, n. 59, p. 2197-2201, 2011.

ZAMBRZYCKA, E., ZYLKIEWICZ, B. G., Determination of sulfur in food by high resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta B**, n. 101, p. 234-239, 2014.

WAGNER, H. N., Principles of nuclear medicine, **Saunders**, 1995.

WALSH, A. Atomic Absorption Spectroscopy – Stagnant or Pregnant, **Anal. Chem.**, v. 46, n. 8, 1974.

WALSH, A., JONES, W. G., Hollow-cathode discharges - the construction and characteristics of sealed-off tubes for use as spectroscopic light sources, **Spectrochim. Acta**, v. 16, p. 249-254, 1960.

WANG, Q., MAKISHIMA, A., NAKAMURA, E. Determination of Fluorine and Chlorine by Pyrohydrolysis and Ion Chromatography: Comparison with Alkaline Fusion Digestion and Ion Chromatography, **Geostand. Geoanal. Res.**, v. 34, n. 2, p. 175-183, 2009.

WANG, Y., LI, J. X., Determination of sulfur in plant using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, **Guang pu**, n. 29, p. 1418-1421, 2009.

WEEKS, M. E., Discovery of the elements, 5th ed., **J. Chem. Educ. Easton**, p. 442-449, 1945.

WELZ, B. et al., High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - An analytical and diagnostic tool for trace analysis, **Spectrochim. Acta B**, n. 62, p. 873-883, 2007.

WELZ, B., BECKER-ROSS, H., FLOREK, S., HEITMANN, U., High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry - The Better Way to do Atomic Absorption Spectrometry, Weinheim: Wiley – VCH, 2005.

WHITE, C. W., MARTIN, J. G., Chlorine Gas Inhalation - Human Clinical Evidence of Toxicity and Experience in Animal Models, **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 7, p. 257-263, 2010.

WHO, UNICEF, ICCIDD, Geneva, Indicators for assessing Iodine Deficiency Disorders and their control through salt iodization; pp. 12–16, 1994

WHO, Chloride in Drinking-water - Background document for development Guidelines for Drinking-water Quality, 2003.

WHO, UNICEF, ICCIDD Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring of their elimination: a guide for programme managers, 3ª edição, 2007. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/iodine\\_deficiency/9789241595827/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/iodine_deficiency/9789241595827/en/) (acessado em 26/10/2016).

WHO, World Health Organization, Mercury in Drinking-water, 2005.

WISNIAK, J., The history of chlorine -From discovery to commodity, **Indian J. Chem. Techn.**, v. 9, p. 450-463, 2002.

YEH, T. S., HUNG, N. H., LIN, T. C. Analysis of iodine content in seaweed by GC-ECD and estimation of iodine intake, **J. Food Drug Anal.**, n. 22, p. 189-196, 2014.

YEBRA, M. C., CESPÓN, R. M., Indirect automatic determination of iodide by flame atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, v. 405, p.191-196, 2001.

YEBRA, M. C., BOLLAÍN, M. H., A simple indirect automatic method to determine total iodine in milk products by flame atomic absorption spectrometry, **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 828-833, 2010.

YUDOVICH, YA.; KETRIS, E. M. P., Chlorine in coal: A review, **Int. J. Coal Geol.**, n. 67, p. 127-144, 2006

ZANDER, A. T., O'HAVER, T. C., KELIHER, P. N. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry with High Resolution and Wavelength Modulation, **Anal. Chem.**, v. 48, n. 8, p.1166-1175, 1976.

ZHI-HE, Y., HUI-MING, H., Determination of iodine by molecular absorption spectrometry of thallium iodide in the graphite furnace, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 44, n. 6, p. 617-623, 1989.

ZIMMERMANN, M. B., Iodine Deficiency, **Endocr. Ver.**, n. 30, v. 4, p. 376-408, 2009.