UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo da utilização de padrão interno em determinações
multielementares por espectrometria de absorção atômica com
atomização eletrotérmica e detecção simultânea

Paulo Rogério Miranda Correia
Tese de doutorado

Pedro Vitoriano de Oliveira
Orientador

São Paulo, 4 de junho de 2004

"A universidade, principalmente no Brasil, exige de todos nós uma obstinada busca do impossível"

Jacques Marcovitch

Habitar o tempo

João Cabral de Melo Neto

*Para não matar seu tempo, imaginou:
vivê-lo enquanto ele ocorre, ao vivo;
no instante finíssimo em que ocorre,
em ponta de agulha e porém acessível;
viver seu tempo: para o que ir viver
num deserto literal ou de alpendres;
em ermos, que não distraiam de viver
a agulha de um só instante, plenamente.
Plenamente: vivendo-o de dentro dele;
habitá-lo, na agulha de cada instante,
em cada agulha instante: e habitar nele
tudo o que habitar cede ao habitante.*

*E de volta de ir habitar seu tempo:
ele corre vazio, o tal tempo ao vivo;
e como além de vazio, transparente,
o instante a habitar passa invisível.*

*Portanto: para não matá-lo, matá-lo;
matar o tempo, enchendo-o de coisas;
em vez do deserto, ir viver nas ruas
onde o enchem e o matam as pessoas;
pois como o tempo ocorre transparente
e só ganha corpo e cor com seu miolo
(o que não passou do que lhe passou),
para habitá-lo: só no passado, morto.*

*Aos meus amados pais Tânia e Germano,
querido irmão Caio
e a minha eterna companheira Melissa*

Pela felicidade de ter uma família tão especial

Dedico

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

Pela felicidade de ter uma família científica tão especial

Dedico

Agradecimentos

Ao Professor Pedro Vitoriano de Oliveira pela amizade, orientação e ensinamentos que extrapolam os limites da pós-graduação.

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

Ao Professor Mauro Bertotti, pelos ensinamentos oferecidos desde a graduação e pela amizade que se construiu ao longo da minha caminhada pela pós-graduação.

Ao Professor Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, pela amizade, pelas discussões envolvendo o ensino de Química Analítica e pela leitura cuidadosa do texto da tese.

Ao Professor Célio Pasquini, pela recepção calorosa e cordial que recebi no Instituto de Química da Unicamp e pela avaliação crítica do presente trabalho.

Ao Professor Francisco José Krug, meu “avô” científico, pela amizade, pelas importantes contribuições ao trabalho e ao texto final da tese.

Ao Professor Ivano Gebhardt Rolf Gutz, pelos ensinamentos que começaram nos anos de graduação, pelas valiosas oportunidades de colaborar com a Olimpíada de Química e pela apreciação crítica do trabalho durante o Exame de Qualificação.

Ao Professor Joaquim de Araújo Nóbrega, meu “tio” científico, pela amizade, pelas oportunidades de refletir sobre os rumos da pesquisa em Química Analítica e pelos questionamentos feitos durante o Exame de Qualificação.

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

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

À assessoria científica da FAPESP que, desde a concepção desse projeto de pesquisa, contribuiu para que o objetivo final fosse atingido plenamente.

Aos meus pais, pelo incentivo permanente e por suportarem discussões químicas mesmo sem compreender nada.

À Melissa, minha eterna companheira, pela paciência, apoio e carinho irrestritos durante todos os momentos difíceis dessa longa caminhada pela Pós-Graduação.

Aos professores Nelson Queiroz Guimarães e Orlando Marques, que despertaram meu interesse pela Química, durante o Ensino Médio no Colégio Rio Branco.

À pesquisadora Tomoe Oide Tsubaki, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, pela oportunidade de participar do cotidiano de um laboratório de análise durante a graduação, mostrando pela primeira vez a importância, a beleza e os desafios da Química Analítica.

Às minhas “irmãs” científicas Cassiana e Juliana, pela amizade e companheirismo desde o primeiro momento em que se estabeleceu essa maravilhosa família científica.

Aos amigos Angerson, Bruno, Cíntia, Daniela, Darilena, Flávio, Kalil, Márcia, Patrícia e Rita pela convivência harmoniosa no laboratório, pelas discussões científicas no café e pelo apoio cotidiano.

Aos amigos da biblioteca do IQ-USP, sempre atenciosos e muito eficientes.

Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP, pelo atendimento cordial e competente oferecido durante minha permanência na Pós-Graduação.

Às amigas da Secretaria de Química Analítica pelo suporte e amizade.

À Fundacentro, pelas amostras de sangue fornecidas durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao pessoal do laboratório e amigos da Química Analítica, pelas amostras de urina fornecidas sempre que necessário.

Ao LAC-FCF-USP, por fornecer amostras de soro sanguíneo durante o desenvolvimento dos métodos analíticos.

À Elizabeth Dantas do IPEN, pelo empréstimo de várias lâmpadas a fundo quase perdido durante o desenvolvimento dos trabalhos experimentais.

Ao DQ-IPT e a Central Analítica do IQ-USP, pelas soluções analíticas de referência de elementos exóticos.

À FAPESP por acreditar no presente projeto e pelo auxílio financeiro fornecido durante o seu desenvolvimento (Processo 01/02590-2).

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado.

Sumário

Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Glossário.....	vii
1. Introdução	
1.1 Os erros na Química Analítica.....	01
1.2 A utilização de padrão interno na espectrometria atômica.....	04
1.2.1 A utilização de padrão interno na espectrometria de absorção atômica.....	06
1.3 Proposta de trabalho.....	12
2. Parte Experimental	
2.1 Instrumentação.....	13
2.2 Reagentes e soluções.....	15
2.3 Amostras clínicas e materiais de referência certificados.....	17
2.4 Procedimento.....	18
2.4.1 Estudo do comportamento térmico dos elementos.....	19
2.4.2 Otimização do programa de aquecimento na presença das amostras.....	20
2.4.3 Comparação da sensibilidade obtida com tubo de grafite convencional e "end-capped".....	20
2.4.4 Estudo de repetibilidade.....	21
2.4.5 Obtenção dos gráficos de correlação.....	21
2.4.6 A comparação dos sinais de absorbância.....	22
2.4.7 Determinação simultânea de Cd e Pb em sangue.....	22
2.4.8 Determinação simultânea de Cd e Pb em urina.....	23
2.4.9 Determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo.....	24
3. Resultados e discussão	
3.1 Condições gerais para a seleção de padrão interno.....	26
3.1.1 A seleção de padrão interno em ETAAS.....	27
3.1.2 Interpretação dos dados experimentais para avaliar a eficiência da padronização interna em ETAAS.....	30

3.2 Comparação do desempenho de Ag, Bi, In e Tl como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb	32
3.2.1 O desempenho de Ag como padrão interno para Cd e Pb.....	35
3.2.2 O desempenho de Tl como padrão interno para Cd e Pb.....	39
3.2.3 O desempenho de Bi como padrão interno para Cd e Pb.....	43
3.2.4 O desempenho de In como padrão interno para Cd e Pb.....	46
3.3 Otimização do programa de aquecimento na presença das amostras.....	51
3.4 A padronização interna para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue.....	59
3.4.1 Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue.....	63
3.5 A padronização interna para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina.....	69
3.5.1 Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina.....	74
3.6 Comparação do desempenho de Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se.....	80
3.6.1 O desempenho de Bi como padrão interno para Mn, Ni e Se.....	82
3.6.2 O desempenho de Te como padrão interno para Mn, Ni e Se.....	84
3.6.3 O desempenho de Sn como padrão interno para Mn, Ni e Se.....	86
3.6.4 O desempenho de Ge, In e Sb como padrão interno para Mn, Ni e Se..	89
3.7 A padronização interna para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo.....	94
3.7.1 Comparação do desempenho de Bi e Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo.....	103
4. Conclusões.....	113
5. Perspectivas futuras.....	116
6. Referências bibliográficas.....	117

Resumo

Um estudo sistemático a respeito da utilização de padrão interno em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica (ETAAS) foi desenvolvido. O objetivo principal do presente trabalho foi verificar a possibilidade de melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos, que são obtidos na análise de fluidos biológicos. O pré-tratamento dessas amostras foi simplificado e reduzido a uma única etapa de diluição com surfactante (Triton X-100) e ácido (HNO_3). Conseqüentemente, a complexidade da solução diluída de amostra, a ser introduzida no tubo de grafite, apresenta uma elevada quantidade de concomitantes que podem provocar interferências químicas. A seleção preliminar dos elementos a serem testados como padrão interno considerou a semelhança de parâmetros físico-químicos relacionados com o processo de atomização. Desta forma, Ag, Bi, In e Tl foram testados como padrão interno para a determinação simultânea de Cd/Pb em sangue e urina, enquanto Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te foram os elementos selecionados para a determinação de Mn/Ni/Se em soro sangüíneo. A melhoria da qualidade dos resultados analíticos obtidos na determinação simultânea de Cd e Pb em sangue foi observada quando Ag foi utilizada como padrão interno, na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico. Verificou-se uma melhoria na exatidão dos resultados obtidos para Cd e Pb, após a correção com padrão interno. Por outro lado, os resultados obtidos na análise de urina não foram corrigidos por nenhum dos elementos testados. Os melhores resultados para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se foram obtidos com a utilização de Bi, Sn e Te como padrão interno. Entretanto, verificou-se que a correção de todos os resultados não seria viável com o uso de um único padrão interno. O melhor desempenho nos testes realizados na presença de soro sangüíneo foi obtido com Bi, que melhorou discretamente a precisão dos resultados obtidos para Se. Desta forma, a padronização interna visando a determinação simultânea de Mn, Ni e Se não foi eficiente. A padronização interna em ETAAS, com a finalidade de melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos, é uma estratégia tão complexa, quanto os efeitos interferentes que se pretende corrigir: são necessários mais estudos para compreender melhor como a utilização de uma condição de compromisso afeta os processos de atomização, bem como mais informações a respeito das

interferências físicas e químicas causadas por amostras complexas, analisadas por ETAAS após uma simples etapa de diluição. Deve-se considerar com especial atenção o modificador químico e as temperaturas das etapas de pirólise e de atomização empregadas, que são parâmetros críticos para o desempenho de um elemento como padrão interno.

Abstract

A systematic study involving the use of internal standard for multielement determinations by electrothermal atomic absorption spectrometry was developed. The main objective of this work was evaluate the possibility of improving precision and accuracy of the analytical results for biological fluids. The sample pre-treatment was reduced to a single dilution step with surfactant (Triton X-100) and acid (HNO_3), increasing the amount of concomitant introduced into the atomizer. The preliminary selection of the elements to be tested as internal standard considered the resemblance of physico-chemical parameters related with the atomization process. Thus, Ag, Bi, In and Tl were tested as internal standard for the simultaneous determination of Cd/Pb in blood and urine, and Bi, Ge, In, Sb, Sn and Te were the selected elements for the determination of Mn/Ni/Se in blood serum. The correction of the results obtained for the simultaneous determination of Cd and Pb in blood was achieved when Ag was used as internal standard, in presence of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ as chemical modifier. An improvement for the accuracy of the results was observed for both analytes after their correction with the internal standard. On the other hand, the results obtained for the urine analysis were not corrected by using the tested elements. The best results for the simultaneous determination of Mn, Ni and Se were observed when Bi, Sn and Te were used as internal standard. However, the correction for the results for all analytes was not possible by using only one internal standard. The best performance in presence of the serum was obtained for Bi, which improves slightly the precision for the Se results. Thus, the internal standardization for the simultaneous determination of Mn, Ni and Se was not efficient. The internal standardization in ETAAS, aiming the improvement of precision and accuracy of the analytical results, is a strategy as complex as the interference effects to be corrected: more studies are required in order to better understand how the adoption of a compromised condition disturbs the atomization processes, as well as to get more information about the physical and chemical interference caused by complex samples, analyzed by ETAAS after a single dilution step. The chemical modifier and the selected temperatures for the pyrolysis and atomization steps are critical parameters for the performance of an internal standard and they should be carefully considered.

Glossário

a: Coeficiente linear da equação da reta obtida a partir da regressão linear dos resultados experimentais.

AAS: acrônimo, do inglês Atomic Absorption Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Absorção Atômica.

b: Coeficiente angular da equação da reta obtida a partir da regressão linear dos resultados experimentais.

DPR: abreviação de Desvio Padrão Relativo, expresso em porcentagem.

ETAAS: acrônimo, do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica.

FAAS: acrônimo, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama.

ICP-OES: acrônimo, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente.

ICP-MS: acrônimo, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente.

PI: abreviação de Padrão Interno.

r: Coeficiente de correlação da equação da reta obtida a partir da regressão linear dos resultados experimentais.

SIMAAC: acrônimo, do inglês SIMultaneous Atomic Absorption Continuum source, pode ser traduzido por Espectrômetro de Absorção Atômica Simultâneo com Fonte Contínua.

SIMAAS: acrônimo, do inglês SIMultaneous Atomic Absorption Spectrometry, pode ser traduzido por Espectrometria de Absorção Atômica Simultânea.

STPF: acrônimo, do inglês Stabilized Temperature Platform Furnace, é um conjunto de requisitos experimentais e instrumentais que garantem uma condição adequada para a realização de análises por ETAAS.

THGA: acrônimo, do inglês Transversely Heated Graphite Atomizer, pode ser traduzido por Atomizador de Grafite Aquecido Transversalmente.

1. Introdução

1.1 Os erros na Química Analítica

“Analytical Chemistry is the science of chemical measurements.”

*Miguel Valcárcel
Universidade de Córdoba*

O caráter empírico da Ciência Química confere ao trabalho experimental um papel fundamental na compreensão do comportamento da matéria, permitindo elucidar fenômenos atômicos e moleculares. No entanto, as medidas obtidas em laboratório apresentam a incerteza como característica intrínseca, refletindo a somatória dos erros que foram cometidos durante o trabalho experimental. Estimar a incerteza associada aos resultados é fundamental para avaliar como a medida foi afetada durante o trabalho experimental.

Essa discussão ganha ainda mais importância quando se considera a Química Analítica. Em meio às várias tentativas de defini-la, pode-se considerar que a missão da Química Analítica é desenvolver instrumentação e métodos que permitam obter informações a respeito da composição e da estrutura da matéria¹⁻⁴. Os erros associados às medidas experimentais afetam algumas propriedades analíticas como a exatidão e a precisão dos resultados⁵. A indicação da incerteza do resultado analítico é indispensável para garantir a qualidade do processo de medição e viabilizar a avaliação da informação gerada após uma análise química⁶⁻¹¹.

Os erros experimentais que ocorrem durante o processo analítico podem ser classificados em três categorias^{5,12}:

1. Indeterminados ou Aleatórios, que são devidos às flutuações típicas dos procedimentos experimentais necessários para a realização da análise. A média e o desvio padrão de um conjunto de determinações são utilizados para avaliar a magnitude dos erros aleatórios, que afetam a precisão dos resultados analíticos.
2. Determinados ou Sistemáticos, que são devidos às alterações operacionais bem definidas no processo analítico. O valor verdadeiro atribuído à concentração do analito em uma amostra é utilizado para avaliar a magnitude dos erros sistemáticos, que afetam a exatidão dos resultados analíticos.

3. Grosseiros, que produzem resultados bastante diferentes dos demais dados de um conjunto de replicatas.

A relação existente entre a qualidade do resultado analítico e os erros experimentais está esquematicamente apresentada na Fig. 1. Verifica-se que a precisão e a exatidão são propriedades que estão diretamente relacionadas com a magnitude dos erros associados às medidas experimentais^{5,11}.

Fig. 1: Relação entre os parâmetros do resultado analítico, os tipos de erros experimentais e as propriedades analíticas⁵.

A exatidão é considerada uma das propriedades capitais na busca pela qualidade dos resultados analíticos (Fig. 2). Ela refere-se à consistência entre os resultados experimentais e o valor verdadeiro da concentração do analito em uma amostra particular¹¹. Os materiais de referência certificados são freqüentemente utilizados para avaliar a exatidão dos resultados gerados pelos procedimentos analíticos.

A precisão é classificada como uma propriedade analítica básica (Fig. 2), que pode afetar a exatidão e comprometer a qualidade dos resultados analíticos¹¹. A precisão pode ser definida como o grau de concordância entre um grupo de resultados obtidos ao se aplicar o mesmo procedimento analítico de maneira repetida e independente para analisar diferentes alíquotas da mesma amostra⁵. A dispersão dos resultados experimentais com relação ao valor médio é utilizada para avaliar quantitativamente a precisão. A repetibilidade e a reprodutibilidade são parâmetros que indicam como se obteve o conjunto de resultados experimentais, permitindo avaliar qualitativamente a precisão⁵. As diferenças entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, bem como a relação desses parâmetros com a precisão, são apresentadas na Fig. 3.

Fig. 2: Classificação das propriedades analíticas e suas relações com a qualidade dos resultados e do processo analítico⁵.

Fig. 3: Parâmetros que podem ser considerados para avaliar a precisão dos resultados analíticos em termos de repetibilidade e reprodutibilidade⁵.

1.2 A utilização de padrão interno na espectrometria atômica

“Prior to the development of sensitive analytical techniques, particularly AAS, trace elements were largely ignored.”

*A. P. Taylor
Universidade de Surrey*

Muitas técnicas de análise instrumental exigem que o analito seja convertido em uma espécie adequada para ser detectado. No caso da espectrometria atômica, há uma série de eventos físicos e químicos que ocorrem antes da detecção dos elementos de interesse (Fig. 4). Ao final de todos esses processos físico-químicos, o analito é transformado em átomo ou íon no estado gasoso para, posteriormente, ser detectado por meio da emissão de radiação, absorção de radiação ou relação massa/carga.

Fig. 4: Processos físico-químicos de transformação do analito antes da detecção instrumental por técnicas de espectrometria atômica.

Qualquer concomitante presente na amostra que altere a eficiência desses processos de transformação do analito, antes da detecção instrumental, pode prejudicar a exatidão do resultado analítico, devido às interferências provocada pela matriz^{13,14}. Além disso, as variações das condições instrumentais e experimentais durante o processo de medição podem provocar erros sistemáticos e aleatórios, deteriorando a precisão e a exatidão dos resultados¹⁴.

A utilização de padrão interno em Química Analítica tem sido proposta como uma estratégia para minimizar os erros aleatórios e sistemáticos provocados durante o processo de medição¹²⁻¹⁵. O padrão interno é uma substância que apresenta características similares àquelas do analito, mas que pode ser quantificada separadamente. Sua concentração na amostra de interesse deve estar abaixo do limite de detecção da técnica a ser utilizada, e seu comportamento durante o processo de medição deve ser semelhante ao do analito. Uma mesma concentração de padrão interno é adicionada às soluções analíticas de referência e às amostras. O cálculo da concentração do analito, após a calibração do instrumento com padrão interno, é realizado considerando a resposta relativa do analito e do padrão interno, que estão sujeitos às mesmas condições experimentais durante a medição¹²⁻¹⁵.

Vários procedimentos de análise instrumental utilizam padrão interno para realizar a calibração do instrumento de medida. Considerando-se somente a espectroscopia atômica, verifica-se que a utilização de padrão interno é intensamente explorada nas técnicas que permitem realizar determinações multielementares, como a espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio induzido (ICP-OES)¹⁶⁻²⁰ e a espectrometria de massas acoplada a fonte de plasma (ICP-MS)²¹⁻²³. O principal objetivo da utilização de padrão interno em ICP-OES e ICP-MS é corrigir os erros associados às variações dos parâmetros instrumentais, experimentais e aos efeitos provocados pela matriz¹⁶⁻²³.

Os estudos envolvendo a utilização de padrão interno em ICP-OES e ICP-MS são mais numerosos do que aqueles verificados para a espectrometria de absorção atômica (AAS), visto que a condição essencial e indispensável que viabiliza a utilização de padrão interno é a detecção multielementar. O desempenho do padrão interno em ICP-OES pode ser avaliado por meio de gráficos de correlação, construídos a partir dos sinais instrumentais normalizados obtidos para o padrão interno, em função dos sinais normalizados obtidos para o

analito¹⁸. Além de facilitar a visualização das respostas analíticas para uma série de medidas consecutivas, os parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação ($y = a + bx$) permitem comparar a eficiência de diferentes elementos utilizados como padrão interno. O coeficiente de correlação (r) reflete o grau de similaridade entre as variações dos sinais obtidos para o analito e para o padrão interno. Idealmente, o coeficiente de correlação para esse gráfico deve assumir valor igual a 1. O coeficiente angular (b) permite avaliar a semelhança entre a amplitude das variações dos sinais obtidos para o analito e para o padrão interno. As variações de intensidade observadas para esses sinais devem ser proporcionais e, caso isso se verifique, o coeficiente angular do gráfico de correlação será igual a 1. Valores diferentes de 1 para o coeficiente angular indicam que a correção dos resultados não é eficiente, mostrando que o padrão interno e o analito são afetados de maneiras diferentes frente às variações instrumentais e físico-químicas. O coeficiente linear (a) pode indicar a existência de erro sistemático na padronização interna, fato que somente é confirmado quando o valor obtido para o coeficiente linear for estatisticamente diferente de zero¹⁸.

1.2.1 A utilização de padrão interno na espectrometria de absorção atômica

"AAS, as first described by Walsh and Alkemade and Milatz, derived its success from the use of hollow cathode lamps as the radiation source. (...) Unfortunately, these lamps are not suitable as multielement sources. (...) Consequently, although AAS is a powerful analytical tool, it has always remained a single-element technique."

James M. Harnly

Departamento de Agricultura dos EUA

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica instrumental bem estabelecida que já atingiu a maturidade²⁴⁻²⁶. Apesar de sua proposição ter ocorrido há 50 anos, ainda é grande o interesse em desenvolver novas pesquisas utilizando essa técnica, visando aprimoramentos instrumentais e o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos²⁷⁻³⁴. Os aspectos mais freqüentemente explorados são:

1. o emprego de sistemas de fluxo para realizar a separação e a pré-concentração do analito em linha^{28,29};
2. a introdução direta de amostras sólidas nos atomizadores eletrotérmicos^{28,30} e chama³¹;
3. o desenvolvimento de sistemas de alta pressão para a introdução de pequenos volumes de amostras nos atomizadores com chama³²;
4. o acoplamento com técnicas cromatográficas para desenvolver procedimentos analíticos visando a especiação química^{27,33-35};
5. o estudo de modificadores químicos permanentes³⁶;
6. o desenvolvimento de espectrômetros simultâneos visando as determinações multielementares^{28,37}.

Entre os avanços recentes que marcaram o desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), a introdução comercial de um espectrômetro de absorção atômica simultâneo com atomizador eletrotérmico merece um destaque especial. Esse espectrômetro apresenta todas as condições instrumentais que permitem realizar as análises sob as condições STPF³⁸, minimizando as interferências na fase condensada e vapor: tubo de grafite recoberto com grafite pirolítico, plataforma integrada e aquecimento transversal; corretor de sinal de fundo por efeito Zeeman; fonte que permite elevadas taxas de aquecimento (~ 2000 °C/s); detector e eletrônica adequados para a rápida aquisição do sinal transiente. Desta maneira, o tubo de grafite atinge rapidamente a temperatura necessária para a atomização, antes que ocorra a vaporização do analito a partir da plataforma integrada. Conseqüentemente, os processos físico-químicos responsáveis pela atomização ocorrem sob condições mais isotérmicas, minimizando interferências na fase vapor. Somente a partir da introdução das condições STPF, a análise de amostras complexas foi efetivamente viabilizada por ETAAS, tornando essa técnica instrumental uma das mais utilizadas na determinação de elementos traço e ultratraço em uma grande variedade de amostras^{24,27,39}. Uma vez que é possível determinar até seis elementos simultaneamente^{40,41}, o desenvolvimento de um espectrômetro com detecção multielementar viabilizou a utilização de padrão interno em AAS.

Os estudos visando o desenvolvimento de espectrômetros simultâneos surgiram logo após a proposição da AAS, na tentativa de transformá-la em uma

técnica multielementar^{28,37,42}. Os esforços dos pesquisadores levaram a duas concepções instrumentais diferentes, considerando a fonte de radiação a ser utilizada: além do desenvolvimento do espectrômetro simultâneo com fontes de radiação convencionais, surgiu a proposta da utilização de uma lâmpada de xenônio como fonte de radiação contínua (SIMAAC)⁴³. Apesar de parecer mais promissor, o espectrômetro simultâneo com fonte contínua ainda permanece sob desenvolvimento e sua comercialização ainda não foi estabelecida^{28,37,41}.

Sistemas multicanaís empregando lâmpadas de catodo oco multielementares podem ser considerados como o primeiro resultado concreto na busca por instrumentos multielementares^{42,44}. Propostos ao longo das décadas de 60 e 70, esses espectrômetros permitiram desenvolver procedimentos analíticos visando a determinação simultânea de dois elementos, bem como iniciar estudos explorando a utilização de padrão interno para melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos. A forte vinculação entre o desenvolvimento de espectrômetros simultâneos e os estudos envolvendo padrão interno indica que a predominância de instrumentos monoelementares foi o principal motivo que limitou a exploração sistemática da utilização de padrão interno em AAS.

Uma revisão da literatura permite encontrar alguns trabalhos científicos que abordam a utilização de padrão interno em AAS (Tabela 1). Verifica-se que há uma predominância dos trabalhos utilizando chama como atomizador, sobretudo durante as décadas de 60 e 70^{44-49,51}. A instrumentação que viabilizou esses estudos era composta por espectrômetros com dois sistemas óticos e detecção independente, que faziam a aquisição do sinal de absorbância do analito e do padrão interno simultaneamente.

Nessas aplicações, o principal papel do padrão interno foi corrigir os erros associados às variações dos parâmetros instrumentais e experimentais durante as análises por FAAS, tais como:

1. Flutuações na intensidade do feixe de radiação, devido às variações de corrente elétrica aplicada às lâmpadas de catodo oco⁴⁴.
2. Alterações das condições da chama, devido às variações nos fluxos dos gases^{44-49,51}.
3. Mudanças na eficiência de transporte e nebulização, devido à diferença das propriedades físicas entre as soluções de referência analítica e amostras⁴⁴⁻⁴⁹.

4. Interferências químicas provocadas pela matriz, devido à presença de elementos facilmente ionizáveis⁴⁹.

5. Erros de diluição da amostra durante as etapas de pré-tratamento^{45,48}.

A estabilidade das condições de medição durante a análise por FAAS foi melhorada com o aprimoramento da instrumentação. O controle dos parâmetros instrumentais, tais como o fluxo dos gases e a corrente elétrica aplicada às fontes de radiação, é bem mais rigoroso nos espectrômetros atuais, tornando desnecessário utilizar padrão interno para minimizar erros dessa natureza. No contexto das pesquisas recentemente desenvolvidas^{31,32}, a utilização de padrão interno em FAAS poderia ser associada aos estudos envolvendo a introdução direta de suspensões e de sólidos, a fim de minimizar os erros que podem ocorrer durante a etapa de introdução desse tipo de amostra. Cabe ressaltar que a inexistência de um espectrômetro de absorção atômica com chama, que permita realizar medidas multielementares simultâneas, dificulta as investigações de padrão interno em FAAS.

Tabela 1: Relação de trabalhos científicos que estudaram a utilização de padrão interno em AAS.

Analito	Padrão Interno	Amostra	Atomizador	Ref
Cu	Au	Ligas metálicas	Chama	44
Al, Cd, Cu, Fe, Mg, Pb	Cr, Zn	Zinco para fundição	Chama	45
Fe	Mn	Sangue	Chama	46
Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Si, Zn	Cd, Cr, Mn, Zn	Aço, ligas metálicas, cimento e ração animal	Chama	47
Al, Au, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mg, Mo, Na, Ni, Pb, Si, V, Zn	Au, Cd, Cr, Li, Mn, Sr, V, Zn	Aço, ligas metálicas, cimento, criolita, sangue	Chama	48
Ca	Sr	Soro sanguíneo	Chama	49

Fe	Co	Água	Eletrotérmico	50
Ba, Ca, Cs, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sr, Tl, Zn		-	Chama	51
Pb	Ti, Bi	Sangue, urina, placenta	Eletrotérmico	52
Pb	Bi	Vinho	Eletrotérmico	53

Em comparação com FAAS, a espectrometria de absorção atômica com atomizador eletrotérmico (ETAAS) demorou mais tempo para atingir a maturidade²⁶. Somente após o estabelecimento das condições STPF³⁸ foi possível reduzir drasticamente as interferências químicas observadas durante os processos de atomização, que dificultavam as análises por ETAAS. O primeiro estudo propondo a utilização de padrão interno em ETAAS surgiu em 1979, visando reduzir os erros devidos às flutuações dos parâmetros instrumentais e minimizar as interferências químicas provocadas por alguns cátions⁵⁰. Devido aos problemas causados pelos concomitantes presentes na amostra, a utilização de padrão interno em procedimentos analíticos por ETAAS visa também reduzir as interferências químicas que ocorrem durante os processos de atomização.

O recente desenvolvimento de um espectrômetro simultâneo comercial despertou novamente o interesse em estudar a utilização de padrão interno em ETAAS. Após duas décadas da publicação do primeiro estudo⁵⁰, surgiram na literatura dois trabalhos que exploram Ti⁵² e Bi^{52,53} como padrão interno para a determinação de Pb em amostras clínicas⁵² (urina, sangue e placenta) e vinhos⁵³ por ETAAS. Em ambos os casos, verificaram-se os seguintes benefícios associados à utilização de padrão interno:

1. Melhor repetibilidade para os resultados analíticos, indicando a diminuição dos erros aleatórios^{52,53}.
2. Redução dos efeitos interferentes provocados pela matriz, colaborando com a diminuição dos erros sistemáticos^{52,53}.
3. Diminuição do efeito da degradação da superfície pirolítica da plataforma integrada do tubo de grafite sobre os resultados analíticos, aumentando o tempo de vida útil do atomizador⁵³.

A escolha do padrão interno a ser utilizado em determinações por ETAAS não é tarefa simples. A condição que garante a obtenção das melhorias descritas acima é a similaridade entre as propriedades físico-químicas do analito e do padrão interno: ambos precisam se comportar da mesma maneira frente às variações dos ajustes instrumentais e das condições experimentais. Por esse motivo, parâmetros como número atômico, massa molar, temperatura de fusão, temperatura de ebulição, calor de vaporização, energia de ativação para a atomização de óxidos (MO), energia de dissociação dos óxidos (MO) e dos cloretos (MCl) foram avaliados para selecionar Tl e Bi como padrão interno nas determinações de Pb⁵². Apesar de apresentarem características similares às daquelas do analito, verificou-se que Tl não é um padrão interno adequado para Pb. Somente a utilização de Bi mostrou resultados que justificou o seu emprego como padrão interno: o desvio padrão relativo foi drasticamente reduzido para as amostras estudadas^{52,53} e o tempo de vida útil do tubo de grafite foi ampliado⁵³ (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação do desvio padrão relativo e do tempo de vida útil do atomizador verificado na ausência e na presença de padrão interno, para a determinação de Pb por ETAAS^{52,53}.

Parâmetro	Amostra	Padrão Interno	
		Ausente	Bi
Desvio padrão relativo (%)	Urina	29	7
	Sangue	19	2
	Placenta	22	4
	Vinho	7,3	3,4
Tempo de vida do tubo de grafite (ciclos de aquecimento)	Vinho	600	750

Nesses trabalhos, o espectrômetro simultâneo com atomizador eletrotérmico foi utilizado para realizar a determinação monoelementar de Pb^{52,53}. O desenvolvimento de procedimentos multielementares por ETAAS empregando padrão interno não tinha sido explorado até o presente trabalho.

Os intensos efeitos interferentes provocados pelos concomitantes durante o programa de aquecimento podem ser considerados como uma das principais fontes de erro que causa a perda de precisão e de exatidão dos resultados analíticos obtidos por ETAAS. O uso das condições SPTF atenuou esse problema, uma vez que o atomizador opera sob condição *quasi* isotérmica³⁸. Essa melhoria tornou possível a introdução e análise de suspensões no tubo de grafite, restringindo o tratamento das amostras de fluidos biológicos a uma etapa de diluição com surfactante e ácido. Conseqüentemente, a complexidade da solução a ser analisada é muito elevada e a atomização do analito é suscetível às interferências químicas causadas pelos concomitantes. Essa situação é especialmente agravada quando se desenvolvem procedimentos visando determinações multielementares: a necessidade de utilizar uma única condição instrumental e experimental pode comprometer ainda mais os processos que ocorrem durante a atomização, degradando a precisão e a exatidão dos resultados analíticos.

O desenvolvimento de espectrômetros simultâneos trouxe, ao mesmo tempo, um complicador e uma possível solução para as determinações multielementares por ETAAS. A possível perda de qualidade dos resultados analíticos devido à imposição de uma condição compromissada de análise pode ser minimizada com a utilização de padrão interno.

1.3 Proposta de trabalho

“Não há bom vento para quem não conhece o seu porto.”

Seneca

A hipótese levantada para o desenvolvimento do presente trabalho propõe a utilização da padronização interna em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), a fim de melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos.

O objetivo principal foi compreender quais são os principais aspectos que devem ser considerados para a correta seleção do padrão interno, visando a determinação multielementar em amostras complexas. Para isso, foi feito um estudo sistemático envolvendo utilização de padrão interno nas determinações de Cd e Pb em sangue e urina e de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo.

2. Parte Experimental

“Sem dados não há Ciência; sem sonhos ela pode dar passos, mas não grandes saltos.”

Marcelo Gleiser

2.1 Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e detecção simultânea (SIMAA-6000, Perkin-Elmer, Shelton, CT, EUA) foi utilizado no desenvolvimento desse trabalho. As alterações instrumentais que conferem a esse equipamento a capacidade de realizar a detecção simultânea de até seis elementos simultaneamente se concentram na parte ótica e no detector, conforme apresentado na Fig. 5.

Fig. 5: Diagrama representando os principais componentes óticos do espectrômetro simultâneo utilizado⁵⁴.

Os feixes de radiação (1) produzidos por até quatro lâmpadas de catodo vazio (HCL) ou lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL) são colimados (2) e direcionados por espelhos ao interior do tubo de grafite (3), onde ocorrerá a absorção parcial desses feixes devido à presença de átomos livres no estado fundamental. Através de uma fenda (4), os feixes de radiação entram no sistema dispersor do espectrômetro que possui um prisma (5) e uma grade de difração

Echelle (6) para separá-los em função do comprimento de onda. Esse arranjo é denominado policromador Echelle, devido ao fato de existirem dois elementos dispersores²⁴. O resultado final é a separação das diferentes radiações em duas dimensões^{55,56}, permitindo a utilização de detectores de estado sólido. Um arranjo de 60 fotodiodos (7) é responsável pela detecção simultânea dos feixes de radiação. Outras características do equipamento são o aquecimento transversal do tubo de grafite, dotado de plataforma integrada de grafite pirolítico, corretor de radiação de fundo por efeito Zeeman longitudinal e amostrador automático (AS-72) para introdução de soluções no interior do atomizador. O espectrômetro utilizado apresenta todos os atributos necessários para operar sob as condições STPF³⁸.

As fontes primárias de radiação empregadas no desenvolvimento dos experimentos e os ajustes operacionais estão indicados na Tabela 3. O programa de aquecimento utilizado nos estudos iniciais está descrito na Tabela 4.

Tabela 3: Fontes primárias de radiação e seus ajustes operacionais.

Elemento	λ (nm)	Tipo de lâmpada^a	i (mA)
Ag	328,1	HCL	10
Bi	223,1	EDL	380
Cd	228,8	EDL	230
Ge	265,1	HCL	30
In	303,9	HCL	20
Mn	279,5	HCL	20
Ni	232,0	HCL	25
Pb	283,3	EDL	450
Sb	217,6	EDL	380
Se	196,0	EDL	290
Sn	286,3	EDL	324
Te	214,3	EDL	380
Tl	276,8	HCL	10

^aHCL: Hollow cathode lamp, EDL: Electrodeless discharge lamp

Tabela 4: Programa de aquecimento do tubo de grafite utilizado para os estudos iniciais.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de argônio (mL min⁻¹)
Secagem I	110	10	15	250
Secagem II	130	5	10	250
Pirólise	Tp ^a	5	15	250
Atomização	Ta ^a	0	5	0
Limpeza	2500	1	2	250

^aTp, Ta: Temperaturas otimizadas em função dos elementos e do modificador químico utilizado
Tempo total do programa: 68 s; Volume de amostra: 10 µL; Volume de modificador químico: 10 µL; Temperatura de injeção da amostra: 20 °C.

Argônio 99,999% v/v (Air Liquide, São Paulo, SP) foi utilizado como gás protetor do tubo de grafite e como gás de purga. O fluxo de argônio para proteger a superfície externa do tubo de grafite foi fixado pelo fabricante em 200 mL min⁻¹. Durante o programa de aquecimento, um fluxo interno de argônio (gás de purga) foi fixado em 250 mL min⁻¹ nas etapas de secagem, pirólise e limpeza, sendo interrompido durante a etapa de atomização. O fluxo interno de argônio arrasta os vapores formados durante as etapas de secagem, pirólise e limpeza, bem como protege a superfície interna do tubo de grafite.

2.2 Reagentes e soluções

A água utilizada para preparar as soluções analíticas de referência, dos modificadores químicos e dos reagentes foi destilada e bi-deionizada, em colunas de troca aniônica e catiônica (Permuton, Curitiba, PR) e em sistema de ultrapurificação Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), permitindo obter água com elevado grau de pureza (18,2 MΩ cm).

O ácido nítrico (Synth, Diadema, SP) utilizado na preparação das soluções analíticas de referência e na diluição das amostras foi purificado através de destilação abaixo do ponto de ebulição, realizada em subdestilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP).

As soluções estoque, contendo 1000 mg L^{-1} de cada elemento, que foram utilizadas durante o trabalho estão indicadas na Tabela 5.

Tabela 5: Informações a respeito das soluções utilizadas durante o trabalho.

Elemento	Composto	Fabricante	Diluyente
Ag	AgNO_3	Merck	HNO_3
Bi	BiCl_3	Spex	HCl
Cd	CdCl_2	Tritisol (Merck)	HNO_3
Ge	GeO_2	Wako Industries Ltd.	H_2O
In	$\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Aldrich	HNO_3
Mn	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Tritisol (Merck)	HNO_3
Ni	NiCl_2	Tritisol (Merck)	HNO_3
Pb	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Tritisol (Merck)	HNO_3
Sb	SbCl_3	Aldrich	HCl
Se	SeO_2	Tritisol (Merck)	HNO_3
Sn	SnCl_4	Aldrich	HCl
Te	TeCl_4	Wako Industries Ltd.	HCl
Tl	TlNO_3	Aldrich	HNO_3

As seguintes soluções foram preparadas através de diluições sucessivas das soluções estoques:

- (a) $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cd(II)} + 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Pb(II)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (b) $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Mn(II)} + 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Ni(II)} + 250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Se(IV)}$ em 0,1% v/v HNO_3 .
- (c) $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Ag(I)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (d) $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Bi(III)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (e) $2500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Ge(IV)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (f) $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ In(III)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (g) $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Sb(III)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;
- (h) $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Sn(IV)}$ em 0,1% v/v HNO_3 ;

(i) 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ Te(IV) em 0,1% v/v HNO_3 ;

(j) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Tl(I) em 0,1% v/v HNO_3 ;

As soluções analíticas de referência para calibração do espectrômetro e para os estudos visando o desenvolvimento dos procedimentos com detecção simultânea, foram obtidas a partir da diluição (1+9) das soluções indicadas anteriormente com 0,11% m/v Triton X-100 (Merck) + 1,1% v/v HNO_3 . Uma solução contendo 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 na ausência dos elementos de interesse foi preparada e utilizada como branco analítico sempre que necessário.

Os modificadores químicos foram preparados a partir de sais de elevado grau de pureza destinados a esta finalidade: $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Uma mistura oxidante contendo 15% v/v H_2O_2 + 1% v/v HNO_3 , preparada a partir de peróxido de hidrogênio (Merck) e ácido nítrico sub-destilado, foi utilizada para a decomposição da matéria orgânica nos estudos envolvendo soro sanguíneo⁵⁷.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno descontaminados (Nalge Company, Rochester, NY, USA).

2.3 Amostras clínicas e materiais de referência certificados

As amostras de sangue, utilizadas durante as etapas de desenvolvimento do procedimento analítico, foram fornecidas pela Fundacentro. A coleta foi realizada em tubos plásticos Vacutainer® contendo heparina para evitar a coagulação do sangue. Imediatamente após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e armazenadas sob refrigeração a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ ⁵⁸.

As amostras de soro sanguíneo foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (LAC-FCF-USP). A coleta de sangue foi realizada em tubos plásticos Vacutainer® e, após 20 minutos à temperatura ambiente, as amostras de sangue foram centrifugadas (2500 rpm, 15 min). O soro sanguíneo, sobrenadante obtido após a centrifugação, foi transferido para tubos de polipropileno descontaminados. As amostras de soro sanguíneo foram armazenadas sob refrigeração a $4\text{ }^\circ\text{C}$ ⁵⁸.

As amostras de urina foram obtidas entre os integrantes do laboratório. A coleta foi realizada em frascos de polietileno previamente descontaminados. Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, sendo utilizadas para os estudos analíticos. Após 48 horas de armazenamento, as amostras eram descartadas⁵⁸.

Materiais de referência certificados para sangue (Seronom Trace Elements in Whole Blood, Sero AS, Billingstad, Noruega), soro sanguíneo (Seronom Trace Elements in Serum, Sero AS) e urina (Seronom Trace Elements in Urine, Sero AS) foram utilizados para validar os procedimentos desenvolvidos, bem como para avaliar a utilização de padrão interno em ETAAS. As amostras liofilizadas de material de referência certificado foram reconstituídas com água, seguindo as instruções do fabricante.

2.4 Procedimento

Toda a vidraria e frascos plásticos utilizados para preparo e armazenamento das amostras e soluções foram lavados com detergente, enxaguados com água destilada, preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v durante 24 horas e, novamente, enxaguados com água destilada e deionizada. Após a descontaminação, os balões volumétricos e frascos para armazenamento das soluções analíticas de referência foram preenchidos com solução de ácido nítrico 10% v/v e, somente antes da utilização, esses materiais foram enxaguados com água bi-deionizada.

A manipulação das amostras e o preparo das soluções analíticas de referência e dos modificadores químicos foram realizados em capela de fluxo laminar classe 100 (Veco, Campinas, SP) para minimizar as contaminações provenientes do ambiente do laboratório.

Para a preparação das soluções analíticas de referência e das amostras adotou-se o princípio do frasco único⁵⁹. Com base nesse procedimento, uma alíquota de solução analítica ou amostra é adicionada ao copo do amostrador automático com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável (Eppendorf, Westbury, NY, USA). Em seguida, acrescenta-se um volume adequado de diluente ou reagente e a homogeneização é feita enchendo-se e esvaziando-se sucessivamente a ponteira com a solução resultante dessa mistura.

Para tornar a limpeza do capilar do auto amostrador do instrumento mais eficiente, uma mistura de 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃ foi adicionada no frasco de lavagem.

Todas as medidas experimentais foram baseadas na área do sinal de absorvância. Durante todo o desenvolvimento dos procedimentos analíticos, os resultados experimentais obtidos representaram a média de 3 replicatas, exceto durante os estudos de repetibilidade, quando 20 replicatas foram utilizadas.

2.4.1 Estudo do comportamento térmico dos elementos

Curvas de temperatura de pirólise e de atomização foram obtidas para os analitos (Cd, Mn, Ni, Pb e Se) e para os elementos testados como padrão interno (Ag, Bi, Ge, In, Sb, Sn, Te e Tl). Durante esse estudo, os elementos foram separados em grupos diferentes, de acordo com suas características eletrotérmicas: (1) Cd e Pb, (2) Mn, Ni e Se, (3) Ag e Tl, (4) Bi e In, (5) Ge, Sb, Sn e Te. As seguintes soluções analíticas de referência foram utilizadas durante a obtenção das curvas de temperatura de pirólise e de atomização:

1. Cd e Pb: na presença de 5 µg Pd + 3 µg Mg e 25 µg NH₄H₂PO₄
1,0 µg L⁻¹ Cd(II) + 10 µg L⁻¹ Pb(II) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃;
2. Mn, Ni e Se: na presença de 20 µg Pd + 10 µg Mg
2,5 µg L⁻¹ Mn(II) + 10 µg L⁻¹ Ni(II) + 25 µg L⁻¹ Se(IV) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃;
3. Ag e Tl: na presença de 5 µg Pd + 3 µg Mg e 25 µg NH₄H₂PO₄
2 µg L⁻¹ Ag(I) + 50 µg L⁻¹ Tl(I) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃;
4. Bi e In: na presença de 5 µg Pd + 3 µg Mg, 20 µg Pd + 10 µg Mg e 25 µg NH₄H₂PO₄
20 µg L⁻¹ Bi(III) + 40 µg L⁻¹ In(III) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃;
5. Ge, Sb, Sn e Te: na presença de 20 µg Pd + 10 µg Mg
450 µg L⁻¹ Ge(IV) + 30 µg L⁻¹ Sb(III) + 50 µg L⁻¹ Sn(IV) + 50 µg L⁻¹ Te(IV) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃.

Foram introduzidos 10 µL da solução de referência e 10 µL da solução do modificador químico no interior do tubo de grafite.

Na presença dos modificadores químicos, as curvas de temperatura de pirólise foram obtidas fixando-se a temperatura de atomização em 1700 °C (para Cd e Pb), ou 2300 °C (para Ag, Bi, Ge, In, Sb, Sn, Te e Tl) e variando-se a

temperatura de pirólise na faixa de 200 °C a 2300 °C. As curvas de temperatura de atomização foram obtidas fixando-se a temperatura de pirólise entre 700 °C e 1400 °C, de acordo com a estabilidade térmica dos elementos, e variando-se a temperatura de atomização na faixa de 1200 °C a 2300 °C.

As curvas de temperatura de pirólise e de atomização foram obtidas com soluções analíticas de referência em meio ácido e na presença das amostras diluídas dos fluidos biológicos a serem analisados: urina (1+4), soro sanguíneo (1+3) e sangue (1+9).

2.4.2 Otimização do programa de aquecimento na presença das amostras

Alguns parâmetros do programa de aquecimento foram otimizados em função do tipo e da quantidade de amostra a ser analisada:

1. Temperatura de injeção da amostra: avaliou-se a introdução a frio (20 °C) e a quente (100 °C) das soluções no tubo de grafite, através da comparação do desvio-padrão obtido para 5 injeções consecutivas de amostras diluídas de urina (1+4) e sangue (1+9).
2. Duração da etapa de pirólise: a intensidade do sinal de fundo provocado pela matriz das amostras diluídas de urina (1+4) e sangue (1+9) foi observada, em função do tempo de duração da etapa de pirólise.

2.4.3 Comparação da sensibilidade obtida com tubo de grafite convencional e "end-capped"

A utilização de tubos "end-capped" foi avaliada para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina. A comparação da sensibilidade obtida utilizando-se o atomizador convencional (THGA) e o atomizador com "end-caps" (EC-THGA) foi realizada por meio da introdução de diferentes alíquotas (5 a 20 µL) de 1,0 µg L⁻¹ Cd(II) + 10 µg L⁻¹ Pb(II) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃. A inclinação da reta obtida a partir da regressão linear dos pontos no gráfico que relaciona absorvância em função da massa de analito permite comparar a sensibilidade nessas duas condições.

2.4.4 Estudo de repetibilidade

Os estudos de repetibilidade foram realizados com soluções analíticas de referência em meio aquoso e na presença das amostras diluídas (urina 1+4, soro sanguíneo 1+3 e sangue 1+9) em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃. Sob condições otimizadas para as etapas de pirólise e atomização, vinte medidas de absorbância consecutivas foram obtidas para cada solução, contendo os elementos de interesse e o padrão interno em teste. A média, o desvio-padrão e o desvio-padrão relativo do conjunto de dados, obtidos sem e com a correção utilizando padrão interno, permitiram realizar uma análise preliminar da eficiência dos elementos selecionados para essa finalidade. O mesmo teste, quando realizado na presença da amostra diluída, pode ser empregado para avaliar os efeitos de matriz e a possibilidade de minimizar esses efeitos por meio da padronização interna.

2.4.5 Obtenção dos gráficos de correlação

A comparação do comportamento apresentado pelos elementos de interesse e padrão interno foi realizada por meio de gráficos de correlação, conforme descrito na literatura¹⁸.

As 20 medidas de absorbância obtidas para cada elemento durante os testes de repetibilidade foram normalizadas com respeito ao primeiro valor da série. Desta forma, obtiveram-se os valores de absorbância normalizados para os analitos e para o padrão interno em teste. Posteriormente, um gráfico foi construído a partir dos valores normalizados de absorbância, sendo que no eixo das abcissas foram relacionados os dados para o analito e no eixo das ordenadas foram relacionados os dados para o padrão interno. Desta forma, um gráfico de correlação foi gerado para cada par de elementos composto por um padrão interno e um analito. Por exemplo, nos testes de Ag como padrão interno para Cd e Pb foram gerados dois gráficos de correlação diferentes (Cd/Ag e Pb/Ag), para cada condição experimental utilizada.

A regressão linear dos gráficos de correlação foi empregada para avaliar mais detalhadamente o potencial dos elementos testados como padrão interno. Por esse motivo, os parâmetros obtidos a partir da regressão linear desses

gráficos (coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de correlação) foram considerados para comparar o desempenho dos diferentes elementos selecionados como padrões internos visando a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue e urina, e a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo.

2.4.6 Comparação dos sinais de absorbância

A comparação dos sinais de absorbância pode ser útil para avaliar as potencialidades dos elementos a serem testados como padrão interno. Em última análise, os formatos desses sinais são o reflexo da cinética dos processos de atomização, que devem ser o mais semelhante possível para os analitos e para o padrão interno.

Os sinais transientes de absorbância, obtidos simultaneamente para os elementos de interesse e para o padrão interno, foram representados graficamente, a fim de permitir a comparação do tempo de aparecimento e do tempo necessário para a completa formação dos picos. A partir desses parâmetros, foi possível verificar a semelhança existente entre os processos de atomização dos analitos e do padrão interno e, conseqüentemente, selecionar os elementos mais adequados para a padronização interna.

2.4.7 Determinação simultânea de Cd e Pb em sangue

O preparo das soluções de referência para a calibração do instrumento e a diluição das amostras foi executado seguindo o princípio do frasco único. Para isso, utilizou-se uma solução diluente contendo 0,27 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,11 % m/v Triton X-100 + 1,1 % v/v HNO_3 + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I).

As soluções de referência para calibração do espectrômetro foram preparadas através da adição de 540 μL da solução diluente a 60 μL de soluções de referência, obtendo-se as seguintes concentrações de Cd e Pb:

1. $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) + $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II);
2. $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) + $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II);
3. $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II);
4. $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) + $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II);

5. $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 20 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

6. $2,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 25 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$.

As soluções foram diluídas em 0,25% m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 + $9 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag(I)}$. O branco utilizado para a curva analítica foi obtido misturando 60 μL de água e 540 μL da solução diluente.

O pré-tratamento da amostra foi minimizado e seguiu o mesmo procedimento descrito para as soluções de referência. Uma alíquota de 60 μL das amostras de sangue foi diluída (1+9) com 540 μL da solução diluente. Ao final, as soluções de referência para a calibração do espectrômetro e as amostras de sangue estavam diluídas da mesma maneira, em 0,25% m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 + $9 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag(I)}$.

Testes de adição e recuperação foram realizados com as amostras analisadas. Para isso, $0,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 5,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$ foram adicionados às amostras durante o processo de preparo.

A utilização de uma única solução diluente contendo surfactante (Triton X-100), ácido (HNO_3), modificador químico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e padrão interno (Ag) torna prático o processo de preparo das amostras, economizando tempo e minimizando os erros devido a medida de volume. Durante o período de aquecimento das lâmpadas (45 min), é possível preparar as soluções analíticas de referência para calibrar o espectrômetro e cerca de 30 amostras para análise.

2.4.8 Determinação simultânea de Cd e Pb em urina

As soluções de referência para calibração do espectrômetro foram preparadas através da adição de 480 μL da solução diluente (0,31 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,125 % m/v Triton X-100 + 2,5 % v/v HNO_3 + $10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag(I)}$) a 120 μL de soluções de referência, obtendo-se as seguintes concentrações de Cd e Pb:

1. $0,125 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 1,25 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

2. $0,25 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 2,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

3. $0,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 5,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

4. $1,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

5. $1,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 15 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$;

6. $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd(II)} + 20 \mu\text{g L}^{-1} \text{Pb(II)}$.

As soluções acima foram diluídas em 0,25% m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,1% m/v Triton X-100 + 2% v/v HNO_3 + $8 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I). O branco utilizado para a curva analítica foi obtido misturando 120 μL de água e 480 μL da solução diluente.

O pré-tratamento da amostra seguiu o mesmo procedimento descrito para as soluções analíticas de referência. Uma alíquota de 120 μL das amostras de urina foi diluída (1+4) com 480 μL da solução diluente. Ao final, as soluções de referência para a calibração do espectrômetro e as amostras de urina estavam diluídas da mesma maneira, em 0,25% m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,1% m/v Triton X-100 + 2% v/v HNO_3 + $8 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I).

Testes de adição e recuperação foram realizados com as amostras analisadas. Para isso, $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) + $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II) foram adicionados às amostras durante o processo de preparo.

2.4.9 Determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo

As soluções de referência para calibração do espectrômetro foram preparadas através da adição de 300 μL da solução diluente (0,13 % m/v Triton X-100 + 1,3 % v/v HNO_3 + $160 \mu\text{g L}^{-1}$ Bi(III) + $160 \mu\text{g L}^{-1}$ Te(IV)) a 100 μL de soluções de referência, obtendo-se as seguintes concentrações de Mn, Ni e Se:

1. $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV);
2. $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV);
3. $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV);
4. $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV);
5. $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $16 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $40 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV);
6. $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II) + $24 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) + $60 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV).

As soluções acima foram diluídas em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 + $120 \mu\text{g L}^{-1}$ Bi(III) + $120 \mu\text{g L}^{-1}$ Te(IV). O branco utilizado para a curva analítica foi obtido misturando 100 μL de água e 300 μL da solução diluente.

O pré-tratamento da amostra seguiu o mesmo procedimento descrito para as soluções analíticas de referência. Uma alíquota de 100 μL das amostras de soro sanguíneo foi diluída (1+3) com 300 μL da solução diluente. Ao final, as soluções de referência para a calibração do espectrômetro e as amostras de soro sanguíneo estavam diluídas da mesma maneira, em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 + $120 \mu\text{g L}^{-1}$ Bi(III) + $120 \mu\text{g L}^{-1}$ Te(IV).

Testes de adição e recuperação foram realizados com as amostras analisadas. Para isso, $1,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Mn(II)}$ + $4,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ni(II)}$ + $10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Se(IV)}$ foram adicionados às amostras durante o processo de preparo.

3. Resultados e discussão

“Não sei de que modo o mundo me vê; mas a mim mesmo pareço ter sido apenas um menino brincando na praia, entretendo-me com encontrar de quando em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bela do que o ordinário enquanto todo o vasto oceano da verdade jazia inexplorado diante de mim.”

Isaac Newton

3.1 Condições gerais para a seleção de padrão interno

A seleção de padrão interno para o desenvolvimento de procedimentos analíticos por ETAAS deve considerar as seguintes observações:

1. O padrão interno deve estar presente na amostra em concentração não detectável, isto é, inferior ao limite de detecção proporcionado pela técnica.
2. A estabilidade térmica do padrão interno deve ser igual ou maior do que aquela apresentada pelo analito, para não comprometer o tratamento térmico da amostra durante o programa de aquecimento.
3. O padrão interno deve ser estabilizado pelo mesmo modificador químico utilizado para o analito.
4. O comportamento do padrão interno deve ser o mais próximo possível daquele apresentado pelo analito frente à variação das condições instrumentais e experimentais.
5. O padrão interno e o analito devem ser afetados de maneira semelhante na presença dos concomitantes da amostra e ao desgaste da superfície pirolítica do atomizador.

O primeiro critério para a seleção de Ag, Bi, Ge, In, Sb, Sn, Te e Tl como candidatos à padrão interno para a determinação de Cd/Pb e Mn/Ni/Se baseou-se na comparação do teor desses elementos nas amostras de fluidos biológicos⁶⁰ (Tabela 6). Verifica-se que os elementos candidatos à padrão interno estão em concentrações reduzidas nas amostras de interesse, sendo que para alguns deles há pouca ou nenhuma informação disponível na literatura.

Tabela 6: Concentração dos elementos a serem avaliados como padrão interno e dos analitos presente nos fluidos biológicos de indivíduos saudáveis⁶⁰.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Sangue	Soro	Urina ^a
Cd	1-2	1-2	1-2
Pb	30-150	~1	~20
Mn	~10	~1	<1
Ni	~5	~2,5	~2
Se	~150	~120	~30
Ag	<5	<1	<1
Bi	<5	-	~1,6
Ge	-	<30	-
In	-	-	-
Sb	~1	~0,7	~1
Sn	<5	<4	~10
Te	<1	-	<10
Tl	~0,5	-	~0,5

^aValores em $\mu\text{g dia}^{-1}$

3.1.1 A seleção de padrão interno em ETAAS

A semelhança das características físicas e químicas apresentadas pelo analito e o padrão interno deve ser um aspecto a ser considerado. Ambos elementos devem ser afetados da mesma maneira por mudanças nas condições de atomização e pela presença dos concomitantes existentes na amostra. Por esse motivo, é necessário avaliar alguns parâmetros físicos e químicos para verificar se há ou não compatibilidade entre os analitos (Cd/Pb e Mn/Ni/Se) e os elementos a serem testados como padrão interno (Ag, Bi, Ge, In, Sb, Sn, Te e Tl).

Além dos aspectos já descritos na literatura^{52,53}, devem ser considerados parâmetros que estão associados com o processo de atomização desses elementos. Nesse contexto, os estudos cinéticos empregando gráficos de Arrhenius são importantes para a elucidação dos mecanismos químicos envolvidos no processo de atomização⁶¹⁻⁶³. Por esse motivo, foram considerados os parâmetros relacionados na Tabela 7:

1. Ed: Energia de dissociação de óxidos diatômicos⁶⁴, que pode ser representada por meio da seguinte equação química:

2. T, ΔH_T° , ΔS_T° : Parâmetros utilizados na equação de Arrhenius⁶⁵ para os seguintes processos químicos:

3. Ea, A: Energia de ativação e fator pré-exponencial obtidos a partir da equação de Arrhenius⁶⁵.
4. λ , m_0 : Comprimento de onda e massa característica para condições otimizadas visando a determinação monoelementar⁶⁶.
5. M.Q., Tp, Ta: Modificador químico usualmente empregado e temperaturas de pirólise e de atomização para condições otimizadas visando a determinação monoelementar^{66,67}.

A avaliação dos parâmetros físicos e químicos selecionados foi realizada considerando prioritariamente as condições recomendadas para a determinação monoelementar dos elementos. Para isso, o modificador químico e os valores para as temperaturas de pirólise e de atomização foram comparados (Tabela 7), permitindo a divisão dos analitos em dois grupos diferentes: o primeiro os elementos mais voláteis (Cd e Pb); o segundo incluiu os elementos menos voláteis (Mn, Ni e Se).

Tabela 7: Parâmetros físicos e químicos considerados para a escolha dos elementos candidatos a padrão interno.

Funções termodinâmicas				Parâmetros da equação de Arrhenius		Condições recomendadas para a determinação monoelementar					
Ed ^a (kcal/mol)	T (K)	ΔH _T ^o (kJ/mol)	ΔS _T ^o (J/mol.K)	Ea (kJ/mol)	logA	λ (nm)	Tp (°C)	Ta (°C)	M.Q. ^b	m _o ^c (pg)	
Cd	88	800	368	201	245	12,1	228,8	700	1400	PO ₄ ³⁻ +Mg	1,3
Pb	94±1	1000	402	191	268	11,8	283,3	850	1500	PO ₄ ³⁻ +Mg	30
Mn	96±3	1600	654	191	436	11,8	279,5	1300	1900	Pd+Mg	6,3
Ni	97	1600	418	140	418	12,2	232,0	1100	2300	-	20
Se	81±10	-	-	-	-	-	196,0	1300	1900	Pd+Mg	45
Ag	57±10	1000	280	123	280	11,2	328,1	800	1500	Pd+Mg	4,5
Bi	85±20	1200	449	205	257	11,1	223,1	1100	1700	Pd+Mg	60
Ge	159±4	-	-	-	-	-	265,1	1500	2300	Pd+Mg	25
In	23±10	1400	690	255	394	12,8	325,6	1200	2100	Pd+Mg	80
Sb	102±20	1200	575	204	329	11,5	217,6	1300	1900	Pd+Mg	55
Sn	134±2	1400	864	305	432	13,2	286,3	1400	2200	Pd+Mg	90
Te	63	-	-	-	-	-	214,3	1200	1800	Pd+Mg	50
Tl	-	-	-	-	-	-	276,8	700	1600	Pd+Mg	53

^aEnergia de dissociação do óxido diatômico correspondente; ^bModificador químico; ^cMassa característica

A energia de dissociação de óxidos diatômicos, as funções termodinâmicas e os parâmetros da equação de Arrhenius (Tabela 7) foram considerados para selecionar os elementos candidatos a padrão interno, os quais foram testados para a determinação simultânea de Cd/Pb e Mn/Ni/Se. As semelhanças entre os analitos e os candidatos a padrão interno foram utilizadas como critério de seleção inicial. Desta forma, o estudo sistemático para a investigação de padrão interno em determinações multielementares por ETAAS foi realizado da seguinte maneira:

1. Determinação de Cd/Pb em sangue e urina, utilizando Ag, Bi, In ou Tl como padrão interno.
2. Determinação de Mn/Ni/Se em soro sanguíneo, utilizando Bi, Ge, In, Sb, Sn ou Te como padrão interno.

3.1.2 Interpretação dos dados experimentais para avaliar a eficiência da padronização interna em ETAAS

A utilização de padrão interno em AAS tem sido pouco explorada e as informações existentes na literatura sobre esse tópico estão concentradas em poucos trabalhos científicos^{50,52,53,68}. A redução do desvio padrão relativo dos resultados analíticos foi o principal argumento que motivou a utilização de Co e Bi como padrão interno para determinar Fe e Pb, respectivamente^{50,52,53}.

Uma outra abordagem para o estudo de padrão interno em ETAAS pode ser desenvolvida a partir do uso dos gráficos de correlação. Essa estratégia, que já se mostrou eficiente nos estudos de padronização interna em ICP-OES^{18,19}, também pode ser explorada em ETAAS. As informações obtidas a partir dos gráficos de correlação permitem comparar o desempenho de vários elementos testados como padrão interno por meio de uma avaliação quantitativa dos parâmetros obtidos a partir da regressão linear¹⁸.

A conveniência dos gráficos de correlação para interpretar os resultados experimentais pode ser ilustrada a partir dos dados referentes à utilização de Bi como padrão interno na determinação de Pb. Na presença da mistura 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico e utilizando 1000 °C durante a etapa de pirólise, o desvio padrão relativo para 20 medidas consecutivas de uma solução contendo 20 µg L⁻¹ Bi(III) e 10 µg L⁻¹ Pb(II) foi reduzido de 7,0% para 1,8%. Isso

mostra a eficiência do Bi como padrão interno para a determinação de Pb por SIMAAS^{52,53}. Adicionalmente, a comparação do comportamento desses elementos pode ser avaliada a partir do gráfico de correlação dos sinais normalizados (Fig. 6).

Fig. 6: Gráfico de correlação para 20 medidas consecutivas de 200 pg Bi(III) e 100 Pb(II) em meio aquoso. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

A equação de reta que melhor descreve o comportamento dos resultados experimentais é $Bi = (-0,01 \pm 0,06) + (1,03 \pm 0,06) Pb$, com coeficiente de correlação (r) igual a $0,97 \pm 0,02$. A partir dos parâmetros fornecidos pela regressão linear é possível verificar a existência de uma elevada correlação para os sinais de absorbância de Bi e Pb ($r = 0,97$). Além disso, o coeficiente angular da reta ($b = 1,03 \pm 0,06$) é próximo de 1, indicando que os sinais de Bi e Pb são afetados proporcionalmente devido às variações instrumentais e físico-químicas ocorridas durante o programa de aquecimento. O coeficiente linear obtido ($a = -0,01 \pm 0,06$) mostra que os erros sistemáticos cometidos ao se utilizar a padronização interna são desprezíveis. A proximidade observada entre a reta que representa a condição ideal ($a = 0$, $b = 1$ e $r = 1$) e a regressão linear dos dados experimentais é um indicativo de que Bi pode ser utilizado como padrão interno na determinação monoelementar de Pb.

A necessidade de comparar o desempenho de diferentes elementos como padrão interno e as informações valiosas que podem ser extraídas a partir dos gráficos de correlação sugerem a utilização desse procedimento para avaliar os resultados obtidos visando às determinações simultâneas de Cd/Pb em urina e sangue, e Mn/Ni/Se em soro sanguíneo. Desta forma, os gráficos de correlação serão discutidos e considerados durante a interpretação dos dados experimentais.

3.2 Comparação do desempenho de Ag, Bi, In e Tl como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb

A baixa estabilidade térmica apresentada pelo Cd, mesmo na presença de modificadores químicos, restringe as opções de elementos que poderiam ser utilizados como padrão interno na determinação simultânea de Cd e Pb. Poucos elementos apresentam um comportamento eletrotérmico semelhante ao de Cd e Pb (Tabela 7). Desta forma, Ag, Bi, In e Tl foram preliminarmente selecionados como candidatos a padrão interno.

A avaliação do desempenho de Ag, Bi, In e Tl como padrão interno para Cd e Pb considerou o comportamento de 20 sinais de absorbância obtidos consecutivamente para os analitos e o padrão interno, sob as mesmas condições experimentais e instrumentais. A comparação do desempenho dos elementos testados como padrão interno foi baseada nos seguintes aspectos:

1. O valor do desvio padrão relativo para Cd e Pb sem e com o uso de padrão interno.
2. A avaliação do coeficiente de correlação (r), do coeficiente linear (a) e do coeficiente angular (b) obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação para os sinais de absorbância normalizados.
3. Os sinais de absorção atômica obtidos para os analitos e para o padrão interno, verificando o tempo de aparecimento e o tempo total necessário para a completa formação dos sinais transientes de absorbância.

A otimização do programa de aquecimento envolveu a obtenção de curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Cd, Pb, Ag, Bi, In e Tl, na presença de 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 5 μg Pd + 3 μg Mg, que são os modificadores químicos freqüentemente empregados nas determinações monoelementares de

Cd e Pb^{66,67}. As melhores temperaturas de pirólise e de atomização obtidas estão indicadas na Tabela 8.

Tabela 8: Temperaturas otimizadas para as etapas de pirólise (Tp) e de atomização (Ta), obtidas com soluções aquosas.

	25 µg NH₄H₂PO₄		5 µg Pd + 3 µg Mg	
	Tp (°C)	Ta (°C)	Tp (°C)	Ta (°C)
Cd	600	1400	600	1600
Pb	1300	1700	1050	1600
Ag	800	1300	1400	1800
Bi	800	1400	1600	1800
In	1000	1800	1800	2100
Tl	700	1700	900	1800
Cc ^a	600	1700	600	1600

^aCc: condição compromissada para o programa de aquecimento visando a determinação simultânea de Cd e Pb.

As condições compromissadas a serem utilizadas para a determinação simultânea de Cd e Pb devem ser estabelecidas considerando o comportamento eletrotérmico observado para esses elementos. Em geral, a temperatura de pirólise é selecionada considerando o elemento mais volátil e a temperatura de atomização o elemento menos volátil⁶⁹. Desta forma, 600/1700 °C e 600/1600 °C foram escolhidas como temperaturas de pirólise e de atomização para NH₄H₂PO₄ e Pd + Mg, respectivamente.

A eficiência de um elemento como padrão interno para Cd e Pb deve ser considerada sob as melhores condições compromissadas estabelecidas para os analitos. Para isso, 20 medidas consecutivas foram obtidas para Cd, Pb e cada um dos elementos testados como padrão interno (Ag, Bi, In e Tl), na presença dos modificadores químicos selecionados para essa determinação. Os parâmetros da regressão linear, calculados a partir dos gráficos de correlação, e o desvio padrão relativo sem e com a padronização interna obtidos na presença de NH₄H₂PO₄ e Pd + Mg são apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	$-0,12 \pm 0,34$	$1,04 \pm 0,35$	$0,60 \pm 0,04$	3,6	3,4
	Bi	$1,29 \pm 0,44$	$-0,23 \pm 0,46$	$-0,12 \pm 0,04$	2,3	4,9
	In	$-3,2 \pm 1,3$	$4,2 \pm 1,1$	$0,66 \pm 0,20$	3,6	18
	Tl	$0,60 \pm 0,19$	$0,42 \pm 0,20$	$0,46 \pm 0,01$	1,5	1,4
Pb	Ag	$0,25 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,03$	5,5	3,0
	Bi	$-0,49 \pm 0,42$	$1,55 \pm 0,41$	$0,66 \pm 0,03$	1,8	3,1
	In	$-0,5 \pm 2,2$	$2,0 \pm 2,1$	$0,22 \pm 0,03$	2,7	20
	Tl	$0,86 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,01$	5,6	4,8

Tabela 10: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb utilizando 5 μg Pd + 3 μg Mg como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	$1,16 \pm 0,46$	$-0,16 \pm 0,47$	$-0,08 \pm 0,03$	1,4	3,4
	Bi	$-0,42 \pm 0,50$	$1,30 \pm 0,50$	$0,52 \pm 0,05$	2,4	6,0
	In	$0,89 \pm 0,46$	$0,03 \pm 0,46$	$0,01 \pm 0,06$	3,0	6,6
	Tl	$0,86 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,13$	$0,24 \pm 0,01$	4,0	4,2
Pb	Ag	$1,02 \pm 0,11$	$-0,02 \pm 0,12$	$-0,04 \pm 0,03$	5,9	6,7
	Bi	$-0,38 \pm 0,18$	$1,32 \pm 0,19$	$0,86 \pm 0,03$	4,0	4,2
	In	$1,00 \pm 0,78$	$-0,08 \pm 0,77$	$-0,02 \pm 0,06$	1,7	6,1
	Tl	$0,89 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,01$	3,7	3,4

3.2.1 O desempenho de Ag como padrão interno para Cd e Pb

Os resultados observados quando Ag foi utilizada como padrão interno indicaram que seu desempenho foi significativamente afetado pelo modificador químico selecionado (Tabelas 9 e 10). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos entre Cd/Ag e Pb/Ag mostraram que não há boa correlação entre os sinais de absorbância desses elementos quando Pd + Mg foi utilizado como modificador químico (Cd/Ag: $r = -0,08 \pm 0,03$; Pb/Ag: $r = -0,04 \pm 0,03$). Por outro lado, os resultados observados na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ indicaram a existência de uma elevada correlação entre os sinais de Ag e Pb (Pb/Ag: $r = 0,93 \pm 0,03$) e uma boa correlação entre os sinais de Ag e Cd (Cd/Ag: $r = 0,60 \pm 0,04$). A influência do modificador químico no desempenho da Ag como padrão interno fica mais evidente quando se compara os gráficos de correlação obtidos na presença de Pd + Mg (Fig. 7) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Fig. 8).

Fig. 7: Gráficos de correlação para (a) Cd/Ag e (b) Pb/Ag em meio aquoso, utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

Fig. 8: Gráficos de correlação para (a) Cd/Ag e (b) Pb/Ag em meio aquoso, utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

A avaliação dos sinais obtidos simultaneamente para Cd, Pb e Ag mostrou que houve uma grande semelhança temporal na formação dos picos de absorvância quando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foi utilizado como modificador químico (Fig. 9). Nessa situação, o tempo de aparecimento dos sinais de absorvância foi entre 0,62 – 0,91 s (Fig. 9) e foram necessários, aproximadamente, 0,75 s para a completa formação de todos os picos (Cd = 0,60 s, Pb = 0,77 s, Ag = 0,62 s). Já na presença de Pd + Mg, o tempo de aparecimento dos sinais de absorvância variou entre 0,72 – 1,22 s (Fig. 10), sendo que o tempo para a completa formação dos picos foi de 0,98 s, 2,93 s e 1,15 s para Cd, Pb e Ag, respectivamente. A maior semelhança temporal dos sinais de absorvância na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ indica que a atomização de Cd, Pb e Ag ocorre quase simultaneamente (Fig. 9). A concordância temporal observada para os sinais transientes de absorvância possibilita a correção de fenômenos que possam perturbar a etapa de atomização, tais como as flutuações de parâmetros instrumentais e as interferências na fase vapor, que podem ocorrer durante a formação da nuvem atômica.

Fig. 9: Sinais de absorbância obtidos para (a) 10 pg Cd(II), (b) 100 pg Pb(II) e (c) 20 pg Ag(I) em meio aquoso, utilizando 25 µg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Fig. 10: Sinais de absorbância obtidos para (a) 10 pg Cd(II), (b) 100 pg Pb(II) e (c) 20 pg Ag(I) em meio aquoso, utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg.

Uma possível explicação para o comportamento de Ag, Cd e Pb na presença dos modificadores químicos testados pode ser obtida comparando-se os prováveis precursores atômicos formados para cada um desses elementos. Os precursores atômicos são as espécies químicas que darão origem aos átomos livres durante a etapa de atomização. Quanto maior a semelhança entre os precursores atômicos dos analitos (Cd e Pb) e do padrão interno (Ag), maior a semelhança entre os mecanismos de atomização. Nesse contexto, as possibilidades de correção dos efeitos provocados pela interferência química causada pela matriz na fase condensada são maiores, visto que os processos de formação dos precursores atômicos são similares e são igualmente afetados pelos concomitantes presentes na matriz. Como os mecanismos de atomização também são semelhantes, a redução das interferências na fase vapor também é possível por meio da padronização interna.

O mecanismo de estabilização térmica de Cd e Pb na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ está baseado na formação de compostos de fórmula $x \text{ MO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ ⁷⁰⁻⁷², que se comportam de maneira semelhante: os átomos de Cd e Pb podem ser formados após a decomposição térmica desses compostos derivados de pirofosfato (equação 1), a partir da redução dos seus óxidos (equação 2), ou pela dissociação térmica dos seus óxidos (equação 3)⁷⁰:

Essa similaridade observada para a atomização de Cd e Pb na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ não é verificada para Ag, visto que a interação desse elemento com o modificador químico é muito discreta^{71,72}. O mecanismo de atomização da Ag, mesmo na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ocorre por meio da volatilização de átomos de Ag formados a partir da redução desse metal na superfície do atomizador (equação 4)^{73,74}:

Verifica-se que o mecanismo de atomização para os analitos (Cd e Pb) é diferente daquele observado para o padrão interno (Ag). Isso pode estar relacionado com o fato da precisão dos resultados obtidos para Cd e Pb não melhorar com o emprego de Ag como padrão interno: os valores de desvio padrão relativo obtidos sem e com a utilização de padrão interno (Tabela 9)

praticamente se mantiveram inalterados (DPR: Cd = 3,6 % e Cd/Ag = 3,4 %; Pb = 5,5 % e Pb/Ag = 3,0 %). Assim, pode-se supor que a melhoria da precisão dos resultados analíticos somente será significativa se o analito e o padrão interno apresentarem mecanismos similares para a atomização. Cabe ressaltar que, apesar de não melhorar a precisão das medidas, a regressão linear dos gráficos de correlação obtidos para Cd/Ag e, sobretudo para Pb/Ag, foi satisfatória (Fig. 8), indicando que os processos de atomização de Cd, Pb e Ag são afetados de maneira parecida quando ocorre alguma variação nas condições de atomização.

Considerando os resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, a variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna e a avaliação dos tempos de aparecimento e formação dos sinais transientes de absorbância, conclui-se que a utilização de Ag como padrão interno é possível, desde que $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ seja o modificador químico selecionado para a determinação simultânea de Cd e Pb. Portanto, os testes visando a utilização de Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue e urina foram realizados na presença das amostras.

3.2.2 O desempenho de TI como padrão interno para Cd e Pb

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação de Cd/TI e Pb/TI indicaram que os resultados obtidos com TI como padrão interno para Cd e Pb foram inferiores àqueles verificados para a Ag (Tabelas 9 e 10). Comparativamente, os coeficientes de correlação obtidos na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Cd/TI: $r = 0,46 \pm 0,01$; Pb/TI: $r = 0,68 \pm 0,01$) foram melhores do que os valores observados quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico (Cd/TI: $r = -0,06 \pm 0,01$; Pb/TI: $r = 0,37 \pm 0,01$). Apesar de distantes da situação ideal ($r = 1$), os valores calculados para os coeficientes de correlação permitiram verificar que o desempenho de TI como padrão interno pode ser afetado em função do modificador químico selecionado (Figs. 11 e 12).

Fig. 11: Gráficos de correlação para (a) Cd/Tl e (b) Pb/Tl em meio aquoso, utilizando 5 μg Pd + 3 μg Mg como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

Fig. 12: Gráficos de correlação para (a) Cd/Tl e (b) Pb/Tl em meio aquoso, utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

O desvio padrão relativo dos sinais de Cd e Pb foi pouco reduzido após a padronização interna com Tl na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: o desvio padrão relativo para Pb foi reduzido de 5,6 % para 4,8 % após a correção com Tl, enquanto os resultados obtidos para Cd permaneceram praticamente constantes, considerando a variação do desvio padrão relativo de 1,5 % para 1,4 % (Tabela 9). Não foram encontrados na literatura estudos que explorem o mecanismo de estabilização de Tl por meio de utilização de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Apesar da atomização de Tl ocorrer a partir do seu óxido²⁴, não é possível afirmar se a presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ altera os processos físico-químicos que levam à formação desse óxido. Por esse motivo, a comparação dos mecanismos de atomização dos analitos (Cd e Pb) e do padrão interno (Tl) fica prejudicada nesse caso.

Quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico, o desvio padrão relativo de Cd aumentou de 4,0 % para 4,2 % após a padronização interna, e os valores obtidos para Pb foram de 3,7 % e 3,4 % sem e com a correção com Tl, respectivamente (Tabela 10). Cabe ressaltar que a avaliação da repetibilidade utilizando soluções analíticas em meio aquoso (0,1 % m/v Triton X-100 + 1 % v/v HNO_3) deve ser utilizada com cautela, servindo como um indicativo do desempenho de um elemento como padrão interno. Essa condição é bem diferente da situação encontrada na presença de matriz, considerando que as interferências físicas e químicas causadas pelos concomitantes não são observadas em meio aquoso. Desta forma, a variação da precisão dos sinais de absorbância obtidos para Cd e Pb em meio aquoso não pode ser considerada suficiente para julgar o desempenho de um elemento como padrão interno de maneira conclusiva.

A comparação dos sinais obtidos simultaneamente para Cd, Pb e Tl mostrou que na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ou de Pd + Mg houve uma semelhança temporal na formação dos picos de absorbância (Figs. 13 e 14). Isso indica que a atomização desses elementos ocorre quase simultaneamente, fato que pode permitir a correção das flutuações instrumentais e interferências na fase vapor que podem ocorrer durante a etapa de atomização. Considerando os modificadores químicos selecionados, observou-se que a semelhança temporal foi maior na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Nessa situação, o tempo de aparecimento dos sinais de absorbância variou de 0,68 – 0,89 s e o tempo para a completa

formação do sinal transiente foi de 0,98 s para Cd, 0,94 s para Pb e 1,08 s para Tl (Fig. 13). Já na presença de Pd + Mg, o tempo de aparecimento dos sinais de absorbância variou entre 0,78 – 1,31 s, sendo que o tempo para a completa formação dos picos foi de 1,08 s, 1,73 s e 1,64 s para Cd, Pb e Tl, respectivamente (Fig. 14).

A avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, e dos tempos de aparecimento e formação dos sinais transientes de absorbância, permitiu verificar que o comportamento de Cd, Pb e Tl é mais parecido quando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foi utilizado como modificador químico (Tabela 10). Cabe ressaltar que o desempenho obtido para Ag foi superior ao observado para Tl na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. De qualquer maneira, os testes visando a utilização de Tl como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue e urina foram realizados na presença das amostras, a fim de fornecer maiores subsídios para julgar o desempenho desse elemento como padrão interno.

Fig. 13: Sinais de absorbância obtidos para (a) 10 pg Cd(II), (b) 100 pg Pb(II) e (c) 500 pg Tl(I) em meio aquoso, utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Fig. 14: Sinais de absorbâncias obtidos para (a) 10 pg Cd(II), (b) 100 pg Pb(II) e (c) 500 pg Tl(I) em meio aquoso, utilizando 5 μ g Pd + 3 μ g Mg.

3.2.3 O desempenho de Bi como padrão interno para Cd e Pb

O desempenho apresentado pelo Bi como padrão interno para Cd e Pb foi pior do que o esperado, visto que ele foi utilizado com sucesso na determinação monoelementar de Pb em amostras clínicas e vinho (Tabela 2). A avaliação dos resultados obtidos permitiu verificar que a utilização de Bi como padrão interno pode ser afetada significativamente por dois fatores: modificador químico e temperatura de pirólise.

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação para Cd/Bi e Pb/Bi na presença de Pd + Mg foram melhores do que os valores observados para $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, em contraste com o que foi verificado para Ag e Tl (Tabelas 9 e 10). Os coeficientes de correlação obtidos na presença da mistura Pd + Mg (Cd/Bi: $r = 0,52 \pm 0,05$, Pb/Bi: $r = 0,86 \pm 0,03$) foram mais próximos da condição ideal do que os valores observados quando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foi utilizado como modificador químico (Cd/Bi: $r = -0,12 \pm 0,04$, Pb/Bi: $r = 0,66 \pm 0,03$).

A eficiência do Bi como padrão interno nas determinações monoelementares de Pb por ETAAS^{52,53} não foi observada a partir dos dados experimentais obtidos na presença da mistura Pd + Mg (Tabela 10). O desvio padrão relativo para Pb ficou praticamente inalterado após a padronização interna com Bi (4,0 % sem correção e 4,2 % com correção), contrastando com a significativa melhora da precisão dos resultados para a determinação monoelementar de Pb (Tabela 2). A comparação das condições experimentais empregadas nessas duas situações permitiu verificar que a temperatura de pirólise foi o parâmetro que sofreu a alteração mais significativa, sendo reduzida de 1000 °C para 600 °C, a fim de viabilizar a determinação simultânea de Cd e Pb. Um estudo foi realizado para avaliar qual a influência da temperatura de pirólise no desempenho do Bi como padrão interno: 20 medidas consecutivas foram obtidas para Cd, Pb e Bi, na presença de 5 µg Pd + 3 µg Mg, selecionando 600 °C e 1100 °C como temperaturas de pirólise (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação da repetibilidade dos resultados obtidos para Bi, Cd e Pb em meio aquoso e utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico (n=20).

Tp (°C)	Desvio padrão relativo (%)				
	Bi	Cd	Pb	Cd/Bi	Pb/Bi
600	7,4	2,4	4,0	6,0	4,1
1100	7,3	- ^a	7,0	- ^a	1,8

^aNão foi possível detectar Cd utilizando essa temperatura de pirólise

A repetibilidade dos sinais de Bi não foi alterada com a mudança da temperatura de pirólise, sendo pouco superior a 7 % (Tabela 11). O desvio padrão relativo dos sinais de Cd aumentou de 2,4 % para 6,0 % após a correção com Bi, indicando a baixa eficiência do Bi como padrão interno quando a temperatura de pirólise é baixa (600 °C). De maneira análoga, a precisão dos sinais de Pb também não foi alterada nessas condições, observando-se um desvio padrão relativo da ordem de 4 % sem e com a padronização interna com Bi (Tabela 11). Por outro lado, a elevação da temperatura de pirólise para 1100 °C confirmou que Bi pode ser utilizado como padrão interno apenas para corrigir

flutuações sobre o sinal de Pb. O desvio padrão relativo para os sinais de Pb foi reduzido de 7,0 % para 1,8% após a correção com Bi (Tabela 11).

Uma possível explicação para essa mudança de comportamento pode ser a alteração dos mecanismos de atomização causada pela mudança na temperatura de pirólise. Além de favorecer a eliminação de concomitantes, as espécies químicas precursoras dos átomos livres são formadas durante essa etapa do programa de aquecimento, a partir de processos químicos que dependem da temperatura. A redução da temperatura para 600 °C provavelmente alterou o processo de formação dos precursores atômicos e os mecanismos de atomização para Bi e Pb. Verifica-se que há diferentes mecanismos que podem levar à formação de átomos livres de Bi e Pb, dependendo da temperatura de pirólise e dos precursores atômicos que foram formados. Pode-se supor que os processos físico-químicos e os mecanismos de atomização para Bi e Pb são mais parecidos quando a etapa de pirólise ocorre a 1100 °C, permitindo a eficiente correção dos resultados obtidos por meio da padronização interna (Tabela 11). Por outro lado, o desempenho do Bi como padrão interno ficou comprometido sob condições compromissadas de análise (Tabela 10). Os gráficos de correlação obtidos para Pb/Bi utilizando 600 °C e 1100 °C durante a etapa de pirólise confirmam que o Bi somente é eficiente quando uma elevada temperatura de pirólise é adotada (Fig. 15).

Estudos de distribuição de espécies de Bi e Pb em função da temperatura indicam que a 600 °C predominam os respectivos óxidos na fase condensada [$\text{Bi}_2\text{O}_{3(s)}$ e $\text{PbO}_{(s)}$]⁷⁵. O aumento da temperatura para 1100 °C altera a distribuição das espécies, sendo que nessa temperatura predomina $\text{Bi}_{(g)}$ e coexistem em proporções semelhantes $\text{PbO}_{(g)}$ e $\text{Pb}_{(g)}$ ⁷⁵. Assim, verifica-se que os precursores atômicos de Bi e Pb, que são formados durante a etapa de pirólise, variam em função da temperatura selecionada, alterando o mecanismo de atomização para esses elementos. Essas observações confirmam que, além do modificador químico, a temperatura de pirólise é um parâmetro que pode afetar o desempenho de um elemento como padrão interno.

Considerando os resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, a variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna e, sobretudo, a influência da temperatura de pirólise sobre o desempenho do Bi, conclui-se que a utilização de Bi como padrão interno não é

viável sob as condições compromissadas estabelecidas para a determinação simultânea de Cd e Pb na presença de Pd + Mg ($T_p = 600\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_a = 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$). Desta forma, foram interrompidos os testes visando a utilização de Bi como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue e urina.

Fig. 15: Gráficos de correlação para Bi e Pb em meio aquoso, utilizando $5\text{ }\mu\text{g}$ Pd + $3\text{ }\mu\text{g}$ Mg como modificador químico e empregando (a) $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (b) $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a etapa de pirólise. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

3.2.4 O desempenho de In como padrão interno para Cd e Pb

Os resultados observados quando In foi utilizado como padrão interno indicaram que não foi possível melhorar a precisão dos sinais de absorvância obtidos para Cd e Pb, independentemente do modificador químico empregado (Tabelas 9 e 10). O desvio padrão relativo para Cd e Pb sem a correção com In foi sempre menor do que os valores obtidos após a padronização interna. Na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, o desvio padrão relativo obtido foi igual a 3,6 % para Cd e 2,7 % para Pb e aumentou, respectivamente, para 18 % e 20 % após a correção com In (Tabela 9). A mesma tendência foi observada quando a mistura Pd + Mg foi utilizada: o desvio padrão relativo obtido foi igual a 3,0 % para Cd e 1,7 % para Pb e aumentou, respectivamente, para 6,6 % e 6,1 % após a correção com In (Tabela 10).

Esse fato pode ser explicado pela repetibilidade das 20 medidas consecutivas de absorbância obtidas simultaneamente para Cd, Pb e In. Os sinais para Cd e Pb apresentaram um comportamento semelhante na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, com repetibilidade melhor do que aquela verificada para In. Comparativamente, o desvio padrão relativo foi inferior a 4 % para os sinais Cd e Pb (DPR para Cd = 3,6 % e Pb = 2,7 %, $n = 20$), enquanto os sinais de In apresentaram uma variação maior (DPR para In = 17 %, $n = 20$). Desta forma, a imprecisão das medidas do padrão interno (In) comprometeu a correção dos resultados de Cd e Pb, sendo que o desvio padrão relativo calculado para as razões Cd/In (18 %) e Pb/In (20 %) reflete a imprecisão observada para o padrão interno. A comparação dos sinais de absorbância obtidos para Cd, Pb e In na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ mostra que as condições compromissadas que foram estabelecidas (Tabela 8) não são adequadas para permitir a atomização eficiente do In (Fig. 16).

Fig. 16: Sinais de absorbâncias obtidos consecutivamente para (a) 10 pg Cd(II), (b) 100 pg Pb(II), (c) 400 pg In(III) em meio aquoso, utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Na presença de Pd + Mg, o aumento observado para o desvio padrão relativo também está relacionado com a baixa repetibilidade das medidas de

absorbância para In (DPR para In = 6,2 %, n = 20), que apresentaram uma variação maior do que aquelas verificadas para Cd e Pb (DPR para Cd = 3,0 % e Pb = 1,7 %, n = 20). A comparação dos sinais de absorbância obtidos empregando-se diferentes temperaturas de atomização evidencia a grande diferença do comportamento eletrotérmico observado entre Cd, Pb e In, visto que a atomização do In exige temperaturas superiores a 2100 °C durante a etapa de atomização (Fig. 17). Provavelmente, o composto intermetálico formado pela interação do In com o Pd é termicamente mais estável do que aqueles formados entre Cd/Pd e Pb/Pd. Conseqüentemente, a temperatura necessária para promover a adequada atomização do In (2100 °C) é muito maior do que aquela selecionada (1600 °C) para a determinação simultânea de Cd e Pb (Tabela 8). Nessas condições, a atomização do In foi prejudicada (Fig. 17).

Fig. 17: Sinais de absorbância obtidos para 400 pg In(III) em meio aquoso utilizando 5 μ g Pd + 3 μ g Mg como modificador químico, em função da temperatura de atomização: (a) 1600 °C, (b) 1900 °C, (c) 2100 °C e (d) 2200 °C.

Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos Cd/In e Pb/In mostraram que não há correlação entre os sinais de absorbância desses elementos quando Pd + Mg foi utilizado como modificador químico (Cd/In: $r = 0,01 \pm 0,06$; Pb/In: $r = -0,02 \pm 0,06$). Os coeficientes de correlação calculados na

presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Cd/In: $r = 0,66 \pm 0,20$; Pb/In: $r = 0,22 \pm 0,03$) foram melhores, mas muito distantes da condição ideal ($r = 1$). A comparação dos coeficientes angulares é ainda mais significativa, visto que os valores calculados foram sempre muito diferentes de 1 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Cd/In: $b = 4,2 \pm 1,1$ e Pb/In: $b = 2,0 \pm 2,1$; Pd + Mg, Cd/In: $b = 0,03 \pm 0,46$ e Pb/In: $b = -0,08 \pm 0,77$). As retas obtidas a partir da regressão linear dos gráficos de correlação Cd/In e Pb/In são muito distantes da condição ideal e comprometem a correção dos resultados (Figs. 18 e 19).

A avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, e dos sinais transientes de absorbância, permitiu verificar que o comportamento térmico do In é muito diferente daquele apresentado por Cd e Pb. Desta forma, conclui-se que a utilização de In como padrão interno não é viável sob as condições compromissadas estabelecidas para a determinação simultânea de Cd e Pb. Observando novamente os parâmetros físico-químicos utilizados na seleção preliminar de candidatos a padrão interno para Cd e Pb, verifica-se que Ag, Bi e Tl apresentam maior similaridade com os analitos (Tabela 7). Por outro lado, as diferenças nos valores observados para Cd, Pb e In podem explicar o desempenho insatisfatório desse elemento como padrão interno nessa situação. Verifica-se, então, que os parâmetros físico-químicos selecionados são indicadores adequados para a seleção dos elementos a serem testados como padrão interno, sendo necessário que os valores observados para os analitos (Cd e Pb) e o padrão interno sejam similares (Tabela 7). Portanto, os testes visando a utilização de In como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue e urina foram interrompidos.

Fig. 18: Gráficos de correlação para (a) Cd/In e (b) Pb/In em meio aquoso, utilizando 25 µg NH₄H₂PO₄ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

Fig. 19: Gráficos de correlação para (a) Cd/In e (b) Pb/In em meio aquoso, utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

3.3 Otimização do programa de aquecimento na presença das amostras

A elaboração de um programa de aquecimento deve contemplar uma etapa final de ajustes na presença da amostra a ser analisada. Por esse motivo, foram desenvolvidos alguns estudos para avaliar os seguintes aspectos:

1. A estabilidade térmica dos analitos (Cd e Pb) na presença das amostras diluídas de sangue (1+9) e urina (1+4);
2. A duração da etapa de pirólise para minimizar a intensidade do sinal de fundo provocado pelos concomitantes;
3. A possibilidade de introduzir a amostra no tubo de grafite pré-aquecido a 100 °C, sem prejudicar a repetibilidade dos resultados analíticos;
4. O volume de amostra introduzido no atomizador, verificando o desvio-padrão das medidas e a intensidade do sinal de fundo obtido.

Curvas de temperatura de pirólise e de atomização foram obtidas na presença das amostras diluídas para otimizar o programa de aquecimento a ser utilizado e verificar se a estabilidade térmica de Cd e Pb foi afetada pela presença da matriz (Fig. 20 e 21). Foram adicionados às amostras 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II) para permitir uma melhor visualização dos sinais de absorbância.

Fig. 20: Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Cd e Pb na presença de sangue diluído 1+9 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 .

Fig. 21: Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para Cd e Pb na presença de urina diluída 1+4 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃.

Observou-se que a estabilidade térmica do Cd foi reduzida na presença das amostras, e a máxima temperatura de pirólise que pode ser utilizada foi igual a 550 °C para sangue (Fig. 20) e varia entre 500 °C e 600 °C para urina (Fig. 21). Uma possível explicação para esse fato pode ser o elevado teor de íons cloreto presente nesses fluidos biológicos⁶⁰: no sangue, a concentração é de, aproximadamente, 2900 mg L⁻¹; na urina a concentração pode variar de 400 a 10000 mg L⁻¹. Na presença dessa elevada concentração de íons cloreto, a formação de espécies voláteis (CdCl₂ e PbCl₂) é favorecida e pode ocorrer antes da interação entre o analito (Cd e Pb) e o modificador químico. Desta forma, a volatilização desses compostos pode acontecer a baixas temperaturas, antes da etapa de atomização^{24,75-77}.

Após a realização dos estudos do comportamento térmico na presença das amostras, verificou-se que as condições otimizadas que foram obtidas em solução aquosa não podem ser implementadas para a determinação multielementar de Cd e Pb nas amostras selecionadas. Deste modo, foi necessário adotar condições de aquecimento que não favorecessem a perda dos analitos durante a etapa de pirólise, na presença das amostras diluídas de sangue (1+9) e urina (1+4). As melhores temperaturas de pirólise e atomização a serem utilizadas foram as seguintes:

1. amostras de sangue (1+9): 550 °C e 1700 °C de temperatura de pirólise e atomização, respectivamente;
2. amostras de urina (1+4): 500 °C e 1700 °C de temperatura de pirólise e atomização.

Mesmo ocorrendo a temperaturas baixas (500 °C para urina e 550 °C para sangue), a etapa de pirólise é indispensável para a eliminação parcial dos concomitantes. Para otimizar esse processo, avaliou-se a intensidade do sinal de fundo obtido para os analitos em função da duração da etapa de pirólise para sangue (Fig. 22) e urina (Fig. 23).

A intensidade do sinal de fundo observado para as amostras não foi significativamente alterada no intervalo de 15 s a 60 s (Figs. 22 e 23). Esse fato pode ser facilmente verificado comparando a intensidade da absorbância, que foi normalizada a partir dos valores encontrados quando a etapa de pirólise teve sua maior duração (60 s). A redução do tempo dessa etapa para 10 s permitiu verificar uma diminuição da intensidade dos sinais de fundo para ambas as amostras (Figs. 22 e 23). Esse fato, que aparentemente indica uma maior eficiência na eliminação dos concomitantes, é explicado pela incapacidade do corretor de sinal de fundo do espectrômetro em corrigir adequadamente os sinais obtidos.

Fig. 22: Intensidade normalizada para o sinal de fundo observado para Cd e Pb na presença de sangue diluído 1+9 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 , utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Fig. 23: Intensidade normalizada para o sinal de fundo observado para Cd e Pb na presença de urina diluída 1+4 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃, utilizando 25 µg NH₄H₂PO₄ como modificador químico.

A avaliação dos sinais de absorbância obtidos quando o tempo de duração da etapa de pirólise foi de apenas 10 s mostra que a linha de base dos picos fica posicionada abaixo do eixo das abscissas, gerando um valor negativo de absorbância que é considerado pelo software do instrumento no momento de calcular a magnitude do sinal analítico (Figs. 24 e 25). Esse fato indica que o corretor Zeeman não conseguiu realizar a correção de maneira eficiente devido à elevada concentração de concomitantes presentes durante a atomização. A duração mínima da etapa de pirólise para evitar essa situação foi igual a 20 s para sangue; já para urina 15 s foi suficiente.

A redução do tempo total necessário para o aquecimento do atomizador é um aspecto importante que pode ser otimizado para aumentar a frequência analítica dos procedimentos desenvolvidos por ETAAS⁷⁸⁻⁸⁰. Após a otimização da etapa de pirólise na presença das amostras, realizou-se um estudo comparativo entre a introdução da amostra no tubo de grafite sem e com pré-aquecimento. O tempo total do programa de aquecimento pode ser reduzido em cerca de 30% caso o atomizador seja previamente aquecido a 100 °C, uma vez que a duração das etapas de secagem é reduzida para 25 s (Tabela 12).

Fig. 24: Sinais de absorbância de fundo produzidos para Cd na presença de sangue diluído 1+9 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 .

Fig. 25: Sinais de absorbância de fundo produzidos para Pb na presença de sangue diluído 1+9 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 .

Tabela 12: Comparação da duração das etapas de secagem sem e com o pré-aquecimento do tubo de grafite.

	Sem pré-aquecimento ^a			Com pré-aquecimento ^b		
	T(°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	T(°C)	Rampa (s)	Patamar (s)
Etapa 1	80	10	10	130	10	5
Etapa 2	110	10	10	200	5	5
Etapa 3	130	5	5	-	-	-
Tempo	50 s			25 s		

^aTemperatura de injeção: 20 °C; ^bTemperatura de injeção: 100 °C.

Alguns cuidados devem ser tomados para que a utilização do pré-aquecimento do atomizador não prejudique os resultados. A velocidade do pipetador em dispensar a amostra no interior do tubo de grafite deve ser reduzida, a fim de evitar a rápida evaporação do solvente. Por isso, a velocidade do pipetador foi diminuída pela metade, permitindo que a secagem da amostra sobre a superfície pré-aquecida fosse controlada. A comparação do desvio-padrão para 5 medidas consecutivas obtidas com amostras diluídas de sangue e urina indicaram que a precisão dos resultados não foi prejudicada quando as amostras foram introduzidas no tubo de grafite pré-aquecido a 100 °C (Tabela 13). A introdução da amostra sobre o tubo de grafite pré-aquecido permite a utilização de um maior volume de solução. A avaliação dos sinais de fundo obtidos para Cd e Pb indica que até 15 µL de solução de amostra diluída de sangue (1+9) ou urina (1+4) podem ser injetados no tubo de grafite.

Alguns testes foram realizados com o tubo "end-capped", que possui as extremidades parcialmente fechadas. Há um aumento da sensibilidade obtida devido à menor difusão da nuvem atômica formada durante a etapa de atomização, sobretudo para elementos voláteis como Cd e Pb^{81,82}. Os estudos envolvendo a utilização de tubo "end-capped" visando determinações multielementares são escassos⁸³ e, por esse motivo, a sensibilidade obtida ao se utilizar esses dois modelos de atomizadores foi comparada pela introdução de alíquotas crescentes de uma solução aquosa contendo 2,5 µg L⁻¹ Cd(II) e 25 µg L⁻¹ Pb(II) (Figs. 26 e 27). A comparação dos coeficientes angulares obtidos a partir

da regressão linear para Cd (tubo convencional: $2,8 \cdot 10^{-3}$; tubo "end-capped": $3,2 \cdot 10^{-3}$) e Pb (tubo convencional: $1,4 \cdot 10^{-4}$; tubo "end-capped": $1,8 \cdot 10^{-4}$) indicou que houve um aumento de sensibilidade de 14% e 29% para o Cd e o Pb, respectivamente. No caso da utilização de tubos "end-capped", optou-se por injetar no máximo 10 μL de solução.

Tabela 13: Avaliação da repetibilidade dos resultados obtidos para Cd e Pb na presença das amostras diluídas, sem e com o pré-aquecimento to atomizador (n=5).

		Sem pré-aquecimento ^a		Com pré-aquecimento ^b	
		Média	DPR (%)	Média	DPR (%)
Cd	Urina	0,0441±0,0013	3,0	0,0448±0,0011	2,5
	Sangue	0,0193±0,0009	4,7	0,0204±0,0009	4,4
Pb	Urina	0,0134±0,0003	2,2	0,0138±0,0004	2,9
	Sangue	0,0293±0,0007	2,4	0,0291±0,0003	1,0

^aTemperatura de injeção: 20 °C; ^bTemperatura de injeção: 100 °C; ^cDPR: desvio padrão relativo.

Fig. 26: Sinal de absorbância em função da massa de Cd, utilizando tubo de grafite convencional e "end-capped".

Fig. 27: Sinal de absorbância em função da massa de Pb, utilizando tubo de grafite convencional e "end-capped".

Após todos os estudos de otimização na presença das amostras foi possível estabelecer um programa de aquecimento rápido para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina e sangue (Tabela 14). Essas condições foram utilizadas durante os estudos subsequentes.

Tabela 14: Programa de aquecimento otimizado para a determinação multielementar de Cd e Pb em sangue e urina.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de argônio (mL min⁻¹)
Secagem I	130	10	5	250
Secagem II	200	5	5	250
Pirólise	550 ^a , 500 ^b	10	20 ^a , 10 ^b	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2200	1	4	250

^aAmostras de sangue; ^bAmostras de urina

Tempo total do programa: 63 s (sangue) e 53 s (urina). Volume de amostra: 12 µL. Volume de modificador químico: 10 µL; Temperatura de injeção da amostra: 100 °C.

3.4 A padronização interna para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue

A otimização dos parâmetros do programa de aquecimento na presença das amostras diluídas foi realizada considerando somente os sinais obtidos para os elementos de interesse (Cd e Pb). Desta maneira, garante-se que a condição de compromisso estabelecida é a melhor possível para a determinação simultânea de Cd e Pb. Os testes envolvendo a utilização de padrão interno somente foram realizados na presença da amostra após o estabelecimento do programa de aquecimento otimizado (Tabela 14).

A partir dos resultados obtidos com soluções aquosas (Tabelas 9 e 10), Ag e Tl foram selecionados como candidatos a padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue, utilizando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico. O comportamento de Ag e Tl como padrão interno foi verificado por meio do estudo da repetibilidade dos sinais na presença da amostra. Os efeitos interferentes causados pela matriz devem ser considerados e o desempenho dos elementos testados como padrão interno precisa ser observado na presença dos concomitantes da matriz.

Utilizando o programa de aquecimento otimizado para a determinação de Cd e Pb em sangue (Tabela 14), realizou-se o estudo de repetibilidade dos sinais na presença da amostra. A partir de 20 sinais consecutivos para Cd, Pb e o elemento testado como padrão interno (Ag ou Tl), avaliaram-se os parâmetros da regressão linear obtidos para os gráficos de correlação e o desvio padrão relativo sem e com a padronização interna (Tabelas 15 e 16).

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear para os gráficos de correlação de Cd/Tl e Pb/Tl indicaram que o desempenho do Tl como padrão interno para Cd e Pb foi semelhante àquele verificado em meio aquoso. Os coeficientes de correlação obtidos na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Cd/Tl: $r = 0,43 \pm 0,02$; Pb/Tl: $r = 0,61 \pm 0,03$) foram melhores do que os valores observados quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico (Cd/Tl: $r = 0,12 \pm 0,04$; Pb/Tl: $r = 0,42 \pm 0,03$). Apesar de distantes da situação ideal ($r = 1$), os valores calculados para os coeficientes de correlação permitiram verificar que o desempenho de Tl como padrão interno pode ser afetado em função do modificador químico selecionado e da presença da matriz.

Tabela 15: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb na presença de sangue (1+9), utilizando 25 µg NH₄H₂PO₄ como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	0,12 ± 0,11	1,09 ± 0,10	0,93 ± 0,03	5,8	3,6
	TI	0,55 ± 0,28	0,53 ± 0,22	0,43 ± 0,02	3,3	3,2
Pb	Ag	0,12 ± 0,08	0,89 ± 0,08	0,93 ± 0,02	7,2	3,1
	TI	0,44 ± 0,06	0,26 ± 0,12	0,61 ± 0,03	7,3	7,5

Tabela 16: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb na presença de sangue (1+9), utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	0,72 ± 0,27	0,21 ± 0,29	0,17 ± 0,06	5,0	7,9
	TI	0,65 ± 0,10	-0,31 ± 0,07	-0,12 ± 0,04	6,1	6,2
Pb	Ag	0,56 ± 0,16	0,39 ± 0,18	0,46 ± 0,05	7,7	7,7
	TI	0,49 ± 0,18	0,31 ± 0,06	0,42 ± 0,03	5,4	5,6

O desvio padrão relativo foi pouco alterado para os sinais de Cd e Pb após a padronização interna com TI na presença de NH₄H₂PO₄. Nesse caso, o desvio padrão relativo para Pb variou de 7,3 % para 7,5 % após a correção com TI, enquanto os resultados obtidos para Cd permaneceram praticamente inalterados, considerando a variação do desvio padrão relativo de 3,3 % para 3,2 % (Tabela 15). Quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico, o desvio padrão relativo de Cd variou de 6,1 % para 6,2 % após a padronização interna, e os valores obtidos para Pb foram iguais a 5,4 % e 5,6 % sem e com a correção com TI, respectivamente (Tabela 16).

Os resultados observados quando Ag foi utilizada como padrão interno indicaram que seu desempenho foi significativamente afetado pelo modificador químico selecionado (Tabelas 15 e 16). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos entre Cd/Ag e Pb/Ag mostraram que a correlação entre os sinais de absorbância desses elementos não é satisfatória quando Pd + Mg foi utilizado como modificador químico (Cd/Ag: $r = -0,12 \pm 0,04$; Pb/Ag: $r = 0,42 \pm 0,03$). Por outro lado, os resultados observados na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ indicaram a existência de uma elevada correlação entre os sinais de Ag e Pb (Cd/Ag: $r = 0,93 \pm 0,03$; Pb/Ag: $r = 0,93 \pm 0,02$). Esses resultados concordam com aqueles obtidos a partir de soluções aquosas (Tabelas 9 e 10), indicando que o desempenho de Ag como padrão interno é melhor quando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ é utilizado como modificador químico.

A correção dos sinais de Pb utilizando Ag como padrão interno foi possível sob as condições compromissadas de aquecimento impostas pela determinação simultânea de Cd e Pb com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($T_p = 550\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 1700\text{ }^\circ\text{C}$). O desvio padrão relativo para Pb foi reduzido de 7,2 % para 3,1 % após a correção com Ag (Tabela 15). Os resultados obtidos para Cd também foram corrigidos, visto que o desvio padrão relativo diminuiu de 5,8 % para 3,6 % após a padronização interna (Tabela 15).

Os sinais de absorbância obtidos para os analitos (Cd e Pb) e elementos testados como padrão interno (Ag e Tl) na presença da amostra são apresentados (Figs. 28 e 29), para que seja possível compará-los em função do tempo de aparecimento e do tempo necessário para a completa formação do sinal transiente. Na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, o tempo de aparecimento dos sinais de absorbância variou de 0,77 a 1,01 s e o tempo para a completa formação do sinal transiente foi de 0,65 s para Cd, 0,62 s para Pb, 0,91 para Ag e 1,12 s para Tl (Fig. 28). Já na presença de Pd + Mg, o tempo de aparecimento dos sinais de absorbância variou entre 0,65 e 1,12 s, sendo que o tempo para a completa formação dos picos foi de 0,92 s, 1,66 s, 1,34 s e maior do que 1,88 s para Cd, Pb, Ag e Tl, respectivamente (Fig. 29). Comparando essas duas situações, verifica-se que a semelhança temporal entre os sinais de absorbância é maior quando se utiliza $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico, sendo esta a condição mais interessante para a utilização de Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue.

Fig. 28: Sinais de absorbâncias para (a) Cd, (b) Pb, (c) Ag e (d) Tl em presença de sangue (1+9), utilizando 25 µg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Fig. 29: Sinais de absorbâncias para (a) Cd, (b) Pb, (c) Ag e (d) Tl em presença de sangue (1+9), utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico.

Comparando os resultados obtidos para Ag e Tl a partir dos parâmetros da regressão linear dos gráficos de correlação e da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, conclui-se que a utilização de Ag como padrão interno é a opção mais interessante, desde que $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ seja o modificador químico selecionado para a determinação simultânea de Cd e Pb.

3.4.1 Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue

As melhores condições analíticas obtidas para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue, após a realização dos estudos para a otimização do programa de aquecimento e dos testes de avaliação da Ag como padrão interno, estão indicadas na Tabela 17. A calibração do equipamento foi realizada com soluções analíticas de referência contendo de 0,25 – 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) e 2,5 – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II). Após o preparo, o meio químico obtido para essas soluções apresentava 0,1 % m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 (surfactante e ácido indicados para a diluição de fluidos biológicos⁵⁹) + 0,25 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (modificador químico) + 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I) (padrão interno). Adicionalmente, curvas de calibração na presença da amostra foram obtidas de maneira análoga, por meio da adição de analito. Os parâmetros das curvas de calibração para Cd e Pb, sem e com a padronização interna, estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 17: Parâmetros instrumentais e experimentais otimizados para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de argônio (ml min⁻¹)
Secagem I	130	10	5	250
Secagem II	200	5	5	250
Pirólise	500	10	20	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2200	1	4	250

Tempo total: 63 s; Volume de amostra: 12 μL ; Temperatura de injeção da amostra: 100 °C.

A comparação dos coeficientes angulares obtidos para Cd e Pb em meio aquoso e na presença da amostra pode ser utilizada como um indicativo da existência de interferências causadas pela matriz. Idealmente, a razão entre esses valores deve ser 1, fato que indica que as curvas de calibração são paralelas. Nessa situação, a inexistência de efeitos de matriz possibilita a utilização de soluções aquosas para calibrar o instrumento antes das determinações. Os resultados obtidos a partir dos coeficientes angulares das curvas de calibração (Tabela 18) indicaram que os efeitos interferentes causados pela matriz foram minimizados após a padronização interna com Ag (Tabela 19).

Tabela 18: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração de Cd e Pb.

	Meio	Correção com Ag	b (L µg⁻¹)	r
Cd	Aquoso	Não	$(3,15 \pm 0,01) 10^{-2}$	$0,9999 \pm 0,0004$
		Sim	$(2,57 \pm 0,03) 10^{-1}$	$0,998 \pm 0,001$
	Sangue	Não	$(3,81 \pm 0,04) 10^{-2}$	$0,9996 \pm 0,0005$
		Sim	$(2,55 \pm 0,01) 10^{-1}$	$0,995 \pm 0,012$
Pb	Aquoso	Não	$(1,74 \pm 0,01) 10^{-3}$	$0,9998 \pm 0,0004$
		Sim	$(1,42 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,999 \pm 0,006$
	Sangue	Não	$(2,68 \pm 0,08) 10^{-3}$	$0,995 \pm 0,001$
		Sim	$(1,79 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,995 \pm 0,023$

Tabela 19: Comparação dos coeficientes angulares obtidos em meio aquoso e na presença da amostra para as curvas de calibração de Cd e Pb.

	Correção com Ag	b aquoso^a / b sangue^b
Cd	Não	$0,827 \pm 0,009$
	Sim	$1,01 \pm 0,01$
Pb	Não	$0,65 \pm 0,02$
	Sim	$0,79 \pm 0,02$

^ab aquoso: coeficiente angular da curva de calibração em meio aquoso. ^bb sangue: coeficiente angular da curva de calibração em presença de sangue (1+9).

Considerando as principais características e a composição química do sangue (Tabela 20), destaca-se o elevado teor de matéria orgânica (gordura e proteína) e a alta concentração de íons Na^+ e Cl^- como prováveis interferentes. As interferências causadas pelos cloretos sobre a atomização de Cd e Pb podem ocorrer na fase condensada e na fase vapor, diminuindo a intensidade do sinal de absorbância observado para os analitos⁷⁵⁻⁷⁷. Cabe ressaltar que, diante da elevada complexidade da amostra analisada e das condições compromissadas adotadas para a determinação simultânea de Cd e Pb, a identificação das espécies interferentes somente poderá ser feita com maior detalhamento por meio de um estudo sistemático testando-se, individualmente, cada um dos potenciais interferentes e avaliando os sinais obtidos para Cd, Pb e Ag.

Tabela 20: Parâmetros físico-químicos e concentração das principais substâncias presentes no sangue humano⁶⁰.

Parâmetro	Sangue
Massa seca (g L^{-1})	210
Cinzas (% m/m)	1
Densidade (g cm^{-3})	1,050 - 1,064
pH	7,39
Gordura total (% m/m)	0,65
Proteína total (% m/m)	18
Ca^{2+} (mg L^{-1})	60,5
Cl^- (mg L^{-1})	2886
K^+ (mg L^{-1})	1662
Mg^{2+} (mg L^{-1})	37,8
Na^+ (mg L^{-1})	1969
P (mg L^{-1})	345

Provavelmente, os concomitantes presentes no instante da atomização afetaram de maneira semelhante os processos físico-químicos que levam à formação dos átomos livres de Cd, Pb e Ag, permitindo a minimização da

interferência de matriz por meio da padronização interna. Assim, verifica-se que o padrão interno em AAS pode, além de melhorar precisão dos resultados analíticos^{52,53}, melhorar a exatidão devido à minimização dos efeitos de matriz. Esse fato pode ser constatado a partir da comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração na ausência e presença da matriz (Tabela 19).

A utilização de Ag como padrão interno na determinação simultânea de Cd e Pb melhora a precisão somente das medidas analíticas de Pb, considerando-se os resultados obtidos nos testes de repetibilidade em meio aquoso (Tabela 9) e na presença de sangue (Tabela 15). Por outro lado, a padronização interna permite a calibração do instrumento com soluções aquosas, uma vez que os efeitos interferentes causados pela matriz podem ser minimizados (Tabela 19).

A massa característica, que corresponde à quantidade de analito capaz de absorver 1 % da radiação incidente (absorbância = 0,0044), foi calculada para Cd e Pb a partir das curvas de calibração. Os valores encontrados, considerando o volume de solução introduzido no tubo de grafite (12 μL), foram iguais a 1,7 pg e 30 pg para Cd e Pb, respectivamente.

Os limites de detecção (LD) foram estimados a partir do desvio de 20 medidas consecutivas de uma solução contendo 0,1 % m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 + 0,25 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I), de acordo com a equação $3 dp_{\text{BCO}} / b$, onde dp_{BCO} representa o desvio padrão das medidas obtidas para o branco analítico e b é o coeficiente angular da curva de calibração. Os valores obtidos foram iguais a 0,095 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e 0,86 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb. A partir desses valores foi possível estimar os limites de quantificação (LQ) utilizando a equação $\text{LQ} = k \text{ LD}$, e assumindo $k=3$. Desta forma, 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ podem ser considerados como os limites de quantificação para Cd e Pb utilizando o procedimento desenvolvido. Essa estimativa confirma a possibilidade de iniciar as curvas de calibração para Cd e Pb utilizando soluções de referência analítica contendo 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II).

Os resultados obtidos para a determinação simultânea de Cd e Pb são apresentados sem e com a padronização interna (Tabelas 21 e 22). Sinais de absorbâncias típicos para Cd, Pb e Ag são apresentados para um material de referência certificado (Fig. 30).

A melhoria da exatidão dos resultados obtidos a partir de curvas de calibração em meio aquoso foi o maior benefício obtido com a utilização de Ag

como padrão interno. A comparação dos resultados experimentais com os valores recomendados para os materiais de referência certificados mostra que a utilização de Ag como padrão interno melhorou a concordância entre os resultados experimentais e os valores recomendados. A partir da recuperação calculada para os materiais de referência certificados (que indica a porcentagem do analito encontrada na determinação) em comparação com o valor recomendado no certificado (Tabelas 21 e 22), verifica-se que mesmo ficando sistematicamente abaixo de 100 % (situação ideal), os valores obtidos se aproximam mais dessa condição quando a padronização interna é empregada: os valores médios calculados para Cd são iguais a $87 \pm 5 \%$ e $94 \pm 3 \%$ e para Pb $87 \pm 2 \%$ e $96 \pm 3 \%$, sem e com a padronização interna, respectivamente.

Tabela 21: Comparação dos resultados obtidos para Cd, sem e com a utilização de Ag como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção		
	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM I ^c	$0,57 \pm 0,08$	14	81	$0,65 \pm 0,07$	11	93
CRM II ^c	$5,7 \pm 0,2$	3,5	92	$5,7 \pm 0,3$	5,3	92
CRM III ^c	$9,5 \pm 0,2$	2,1	89	$10,4 \pm 0,2$	1,9	97
A	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
B	$2,1 \pm 0,3$	27	84	$2,1 \pm 0,3$	27	93
C	$2,5 \pm 0,2$	13	64	$2,6 \pm 0,3$	19	86
D	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
E	$2,1 \pm 0,2$	18	78	$2,3 \pm 0,2$	15	84
F	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
Média	-	-	81 ± 10	-	-	91 ± 5

^aRecuperação: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 6 pg Cd(II) nas amostras e comparando-se os valores recomendados para os materiais de referência certificados (CRM).

^b<LQ: menor do que o limite de quantificação.

^cValores recomendados para Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$): CRM I = 0,7; CRM II = 6,2 (5,4-7,2) e CRM III = 10,7 (10,6-11,5).

Tabela 22: Comparação dos resultados obtidos para Pb, sem e com a utilização de Ag como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção		
	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM I ^b	28 $\pm$ 4	14	85	30 $\pm$ 2	6,6	92
CRM II ^b	352 $\pm$ 4	1,1	88	385 $\pm$ 6	1,5	96
CRM III ^b	575 $\pm$ 8	1,4	87	617 $\pm$ 7	1,1	93
A	134 $\pm$ 2	1,5	90	140 $\pm$ 1	0,7	91
B	281 $\pm$ 2	0,7	88	288 $\pm$ 2	0,7	91
C	90 $\pm$ 4	4,4	77	95 $\pm$ 3	3,2	108
D	256 $\pm$ 9	3,5	60	273 $\pm$ 3	1,1	92
E	282 $\pm$ 8	2,8	64	308 $\pm$ 3	1,0	84
F	133 $\pm$ 5	3,5	80	140 $\pm$ 6	4,2	95
Média	-	-	80 $\pm$ 11	-	-	94 $\pm$ 6

^aRecuperação: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 60 pg Pb(II) nas amostras e comparando-se os valores recomendados para os materiais de referência certificados (CRM).

^bValores recomendados para Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$): CRM I = 33; CRM II = 401 (353-443) e CRM III = 660 (611-687).

Fig. 30: Sinais de absorbância de Cd, Pb e Ag obtidos para o material de referência certificado (CRM I).

3.5 A padronização interna para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina

O comportamento de Ag e Tl como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina foi verificado por meio do estudo da repetibilidade dos sinais na presença da amostra. Os efeitos causados pela matriz foram considerados, bem como o desempenho dos melhores elementos testados como padrão interno na presença dos concomitantes.

Utilizando o programa de aquecimento otimizado para a determinação de Cd e Pb em urina (Tabela 14), realizou-se o estudo de repetibilidade dos sinais na presença de uma amostra de urina diluída (1+4). A partir de 20 sinais consecutivos para Cd, Pb e o elemento testado como padrão interno (Ag ou Tl), avaliaram-se os parâmetros da regressão linear obtidos para os gráficos de correlação e o desvio padrão relativo sem e com a padronização interna (Tabelas 23 e 24).

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação de Cd/Tl e Pb/Tl indicaram que os coeficientes de correlação obtidos na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Cd/Tl: $r = 0,72 \pm 0,02$; Pb/Tl: $r = 0,62 \pm 0,02$) foram melhores do que os valores observados quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico (Cd/Tl: $r = 0,60 \pm 0,01$; Pb/Tl: $r = 0,11 \pm 0,01$). A comparação desses valores permitiu verificar que o desempenho de Tl como padrão interno pode ser afetado em função do modificador químico selecionado e da presença da matriz. Esse fato já tinha sido observado durante os testes com solução aquosa e sangue, sendo que o desempenho do Tl como padrão interno também foi superior na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Tabelas 9 e 10).

O desvio padrão relativo foi reduzido após a padronização interna com Tl para os sinais de Cd e Pb na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Nesse caso, o desvio padrão relativo para Cd diminuiu de 6,3 % para 4,6 % após a correção com Tl, enquanto os resultados obtidos para Pb foram iguais a 3,0 % e 2,5 % sem e com a padronização interna, respectivamente (Tabela 23). Quando a mistura Pd + Mg foi utilizada como modificador químico, o desvio padrão relativo de Cd diminuiu de 2,2 % para 1,8 % e para Pb aumentou de 3,0 % para 3,3 % após a padronização interna (Tabela 24).

Tabela 23: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb na presença de urina (1+4), utilizando 25 µg NH₄H₂PO₄ como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	-0,32 ± 0,22	1,28 ± 0,23	0,79 ± 0,04	3,8	4,1
	Tl	0,74 ± 0,07	0,29 ± 0,07	0,72 ± 0,02	6,3	4,6
Pb	Ag	-0,06 ± 0,17	0,99 ± 0,18	0,79 ± 0,03	4,8	4,0
	Tl	0,51 ± 0,16	0,53 ± 0,16	0,62 ± 0,02	3,0	2,5

Tabela 24: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Cd e Pb na presença de urina (1+4), utilizando 5 µg Pd + 3 µg Mg como modificador químico.

	Padrão	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Cd	Ag	0,05 ± 0,43	0,93 ± 0,44	0,44 ± 0,04	2,0	4,0
	Tl	0,58 ± 0,14	0,43 ± 0,13	0,60 ± 0,01	2,2	1,8
Pb	Ag	0,38 ± 0,10	0,60 ± 0,11	0,79 ± 0,02	5,5	3,4
	Tl	0,95 ± 0,13	0,06 ± 0,12	0,11 ± 0,01	3,0	3,3

Os resultados observados quando Ag foi utilizada como padrão interno indicaram que seu desempenho também foi significativamente afetado pelo modificador químico selecionado (Tabelas 23 e 24). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos entre Cd/Ag e Pb/Ag mostraram que a correlação entre os sinais de absorbância desses elementos foi satisfatória somente para Pb, quando Pd + Mg foi utilizado como modificador químico (Cd/Ag: $r = 0,44 \pm 0,04$; Pb/Ag: $r = 0,79 \pm 0,02$). Por outro lado, os resultados observados na presença de NH₄H₂PO₄ indicaram a existência de uma melhor correlação entre os sinais de Ag, Cd e Pb (Cd/Ag: $r = 0,79 \pm 0,03$; Pb/Ag: $r = 0,79 \pm 0,04$).

A correção dos sinais de Pb utilizando Ag como padrão interno foi possível sob as condições compromissadas de aquecimento impostas pela determinação simultânea de Cd e Pb com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($T_p = 500\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 1700\text{ }^\circ\text{C}$) e Pd + Mg ($T_p = 600\text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 1700\text{ }^\circ\text{C}$). O desvio padrão relativo para Pb foi reduzido de 4,8 % para 4,0 % e de 5,5 % para 3,4 % após a correção com Ag, na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e de Pd + Mg, respectivamente (Tabelas 23 e 24). Por outro lado, os resultados obtidos para Cd não foram corrigidos, visto que o desvio padrão relativo aumentou de 3,8 % para 4,1 % com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e de 2,0 % para 4,0 % quando Pd + Mg foi utilizado como modificador químico (Tabelas 23 e 24).

Os sinais de absorvância obtidos na presença de urina para os analitos (Cd e Pb) e elementos testados como padrão interno (Ag e Tl) estão apresentados nas Figs. 31 e 32, a fim de permitir uma comparação em função do tempo de aparecimento e do tempo necessário para a completa formação do sinal transiente.

Fig. 31: Sinais de absorvância para (a) Cd, (b) Pb, (c) Ag e (d) Tl em presença de urina (1+4), utilizando $25\text{ }\mu\text{g}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Fig. 32: Sinais de absorvância para (a) Cd, (b) Pb, (c) Ag e (d) Tl em presença de urina (1+4), utilizando 5 μg Pd + 3 μg Mg como modificador químico.

Na presença de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, o tempo de aparecimento dos sinais de absorvância variou de 0,34 – 0,70 s e o tempo para a completa formação do sinal transiente foi de 1,35 s para Cd, 1,04 s para Pb, 0,89 para Ag e 1,27 s para Tl (Fig. 31). Já na presença de Pd + Mg, o tempo de aparecimento dos sinais de absorvância variou entre 0,55 – 1,18 s, sendo que o tempo para a completa formação dos picos foi de 1,13 s, 0,96 s, 0,99 s e 1,28 s para Cd, Pb, Ag e Tl, respectivamente (Fig. 32). Comparando-se essas duas situações (Figs. 31 e 32), é possível verificar que a semelhança temporal para os sinais de absorvância não se alterou em função do modificador químico. É interessante notar que os resultados obtidos para a amostra de sangue (1+9) foram diferentes, visto que naquela situação a semelhança temporal dos sinais de absorvância variou em função do modificador químico selecionado (Figs. 28 e 29).

Uma avaliação preliminar dos sinais obtidos para Tl em diferentes amostras de urina indicou que a perda desse elemento pode ocorrer antes da etapa de atomização, principalmente quando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ é utilizado como modificador químico (Fig. 33). A variação da intensidade do sinal de absorvância verificada para Tl em diferentes amostras de urina pode ser explicada pela

presença de uma elevada concentração de íons cloreto, que favoreceu a formação de TlCl_3 na fase condensada. O baixo ponto de ebulição dessa espécie sugere que a volatilização do Tl na forma de cloreto pode ter ocorrido durante a etapa de pirólise^{84,85}. Desta forma, o elemento selecionado como padrão interno mostrou-se suscetível à interferência química causada por um dos concomitantes presentes na matriz. Considerando a elevada variabilidade da composição química das amostras de urina, a utilização de Tl como padrão interno nessas condições fica inviabilizada.

Fig. 33: Sinais de absorbâncias para 500 pg Tl(I) em presença de (a) solução aquosa e (b-d) diferentes amostras de urina (1+4), utilizando 25 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador químico.

Comparando os resultados obtidos para Ag e Tl, a partir dos gráficos de correlação e da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, conclui-se que a utilização de Ag como padrão interno mostrou ser a opção mais interessante. A avaliação dos parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação na presença dos modificadores químicos testados (Tabelas 23 e 24) indica que $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ é a opção mais promissora para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina, utilizando Ag como padrão interno.

3.5.1 Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina

As melhores condições analíticas obtidas para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina, após a realização dos estudos térmicos para a otimização do programa de aquecimento e dos testes de avaliação da Ag como padrão interno, estão indicadas na Tabela 25. Devido às baixas concentrações de Cd e Pb presentes na urina, tubos "end-capped" foram utilizados nessa determinação. A calibração do equipamento foi realizada com soluções analíticas de referência contendo de 0,125 – 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) e 1,25 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II). Após o preparo, o meio químico obtido para essas soluções apresentava 0,1 % m/v Triton X-100 + 2,0% v/v HNO_3 (surfactante e ácido indicados para a diluição de fluidos biológicos⁵⁹) + 0,25 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (modificador químico) + 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I) (padrão interno). Adicionalmente, curvas de calibração na presença da amostra foram obtidas de maneira análoga, por meio da adição de analito. Os parâmetros das curvas de calibração para Cd e Pb, sem e com a padronização interna, estão apresentados na Tabela 26. Verifica-se que os coeficientes de correlação obtidos após a padronização interna são sistematicamente menores do que aqueles obtidos sem a correção com Ag, principalmente para as curvas de calibração obtidas na presença de urina. Esse resultado é diferente daquele obtido para as amostras de sangue (Tabela 18).

Tabela 25: Parâmetros instrumentais e experimentais otimizados para a determinação simultânea de Cd e Pb em urina.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de argônio (ml min⁻¹)
Secagem I	130	10	5	250
Secagem II	200	5	5	250
Pirólise	500	10	10	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2200	1	4	250

Tempo total do programa: 53 s; Volume de amostra: 12 μL ; Temperatura de injeção da amostra: 100 °C.

Tabela 26: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração de Cd e Pb.

	Meio	Correção com Ag	b (L µg⁻¹)	R
Cd	Aquoso	Não	$(5,12 \pm 0,04) 10^{-2}$	$0,9998 \pm 0,0007$
		Sim	$(2,69 \pm 0,05) 10^{-1}$	$0,998 \pm 0,005$
	Urina	Não	$(4,67 \pm 0,08) 10^{-2}$	$0,997 \pm 0,003$
		Sim	$(1,4 \pm 0,2) 10^{-1}$	$0,97 \pm 0,02$
Pb	Aquoso	Não	$(2,40 \pm 0,01) 10^{-3}$	$0,9999 \pm 0,0004$
		Sim	$(1,49 \pm 0,07) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,002$
	Urina	Não	$(2,28 \pm 0,08) 10^{-3}$	$0,995 \pm 0,001$
		Sim	$(1,1 \pm 0,1) 10^{-2}$	$0,98 \pm 0,03$

A comparação dos coeficientes angulares obtidos para Cd e Pb em meio aquoso e na presença da amostra pode ser utilizada como um indicativo da existência de efeitos de matriz. Os resultados obtidos a partir dos coeficientes angulares das curvas de calibração (Tabela 26) indicaram que os efeitos interferentes causados pela matriz foram agravados após a padronização interna com Ag, principalmente para Cd (Tabela 27).

Considerando as principais características e a composição química da urina (Tabela 28), destaca-se o elevado teor de íons presentes na matriz e a alta variabilidade na composição química de amostras diferentes de urina. Por exemplo, a concentração de íons Na⁺ e Cl⁻ pode variar na faixa de 900 a 5100 mg L⁻¹ e 400 a 10000 mg L⁻¹, respectivamente⁶⁰. Cabe ressaltar que, diante da elevada complexidade da amostra analisada e das condições compromissadas adotadas para a determinação simultânea de Cd e Pb, a identificação das espécies interferentes somente poderá ser feita com maior detalhamento por meio de um estudo sistemático, testando individualmente cada um dos potenciais interferentes e avaliando os sinais obtidos para Cd, Pb e Ag.

Tabela 27: Comparação dos coeficientes angulares obtidos em meio aquoso e na presença da amostra para as curvas de calibração de Cd e Pb.

Correção com Ag		b aquoso^a / b urina^b
Cd	Não	1,10 ± 0,02
	Sim	1,9 ± 0,3
Pb	Não	1,05 ± 0,04
	Sim	1,1 ± 0,1

^ab aquoso: coeficiente angular da curva de calibração em meio aquoso. ^bb sangue: coeficiente angular da curva de calibração em presença de urina (1+4).

Tabela 28: Parâmetros físico-químicos e concentração das principais substâncias presentes na urina⁶⁰.

Parâmetro	Urina
Massa seca (% m/m)	2 – 10
Cinzas (% m/m)	1,08
Densidade (g cm ⁻³)	1,001 - 1,050
pH	4,8 – 8
Uréia (g dia ⁻¹)	14 – 35
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	500 – 1500
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	400 – 10000
K ⁺ (mg L ⁻¹)	1000 – 5000
Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	48 – 200
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	900 – 5100
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	1200 – 4000
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	60 – 140

Provavelmente, os concomitantes presentes no instante da atomização afetaram de maneira diferente os processos físico-químicos que levam à formação dos átomos livres de Cd, Pb e Ag, inviabilizando a padronização interna nessa situação. No caso da determinação simultânea de Cd e Pb em urina, a

correção dos resultados analíticos obtidos utilizando Ag como padrão interno piorou a exatidão e a precisão.

A massa característica, que corresponde à quantidade de analito capaz de absorver 1 % da radiação incidente (absorbância = 0,0044), foi calculada para Cd e Pb a partir das curvas de calibração (Tabela 26). Os valores encontrados, considerando o volume de solução introduzido no tubo de grafite (12 μL), foram iguais a 1,0 pg e 22 pg para Cd e Pb, respectivamente. Esses valores são menores do que aqueles obtidos para os tubos de grafite convencionais (THGA), utilizados na análise do sangue (Cd = 1,7 pg; Pb = 30 pg). Esse fato confirma o aumento da sensibilidade que pode ser obtido para Cd e Pb por meio da utilização de tubos "end-capped", mesmo quando condições compromissadas são adotadas visando determinações simultâneas.

Os limites de detecção (LD) foram estimados a partir dos desvios de 20 medidas consecutivas de uma solução contendo 0,1 % m/v Triton X-100 + 2,0% v/v HNO_3 + 0,25 % m/v $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I), de acordo com a equação $3 dp_{\text{BCO}}/b$, onde dp_{BCO} representa o desvio padrão das medidas obtidas para o branco analítico e b é o coeficiente angular da curva de calibração. Os valores obtidos foram iguais a 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e 0,57 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb. A partir desses valores é possível estimar os limites de quantificação (LQ) utilizando a equação $\text{LQ} = k \text{ LD}$, e assumindo $k=3$. Desta forma, 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ podem ser considerados como os limites de quantificação para Cd e Pb utilizando o procedimento desenvolvido. Essa estimativa confirma a possibilidade de iniciar as curvas de calibração para Cd e Pb utilizando soluções de referência analítica contendo 0,125 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd(II) e 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II).

Os resultados obtidos para a determinação simultânea de Cd e Pb são apresentados sem e com a padronização interna (Tabelas 29 e 30). Sinais de absorbâncias típicos para Cd, Pb e Ag são apresentados para o material de referência certificado (Fig. 34).

A comparação dos resultados experimentais com os valores recomendados para os materiais de referência certificados mostra que a utilização de Ag como padrão interno piorou a concordância entre os resultados experimentais e os valores recomendados. A partir da recuperação calculada para os materiais de referência certificados (que indica a porcentagem do analito encontrada na determinação) em comparação com o valor recomendado no certificado (Tabelas

21 e 22), verifica-se que mesmo ficando sistematicamente abaixo de 100 % (situação ideal), os valores obtidos se aproximam mais dessa condição quando os cálculos são realizados desconsiderando-se a padronização interna: os valores médios calculados para Cd são iguais a 94 ± 5 % e 64 ± 17 % e para Pb 92 ± 5 % e 82 ± 6 %, sem e com a padronização interna, respectivamente.

A degradação dos resultados analíticos devido à utilização de padrão interno sugere que os concomitantes presentes na matriz causaram interferência sobre o processo de atomização de Ag. Comparativamente, as interferências verificadas para os elementos de interesse (Cd e Pb) não foram tão severas na presença da amostra diluída, tornando possível a obtenção de resultados analíticos satisfatórios sem a utilização de padrão interno.

Tabela 29: Comparação dos resultados obtidos para Cd, sem e com a utilização de Ag como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção		
	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	$5,10 \pm 0,03$	0,6	102	$3,3 \pm 0,6$	18	76
A	$0,45 \pm 0,04$	8,9	92	$0,8 \pm 0,4$	50	63
B	$0,40 \pm 0,04$	10	94	$0,6 \pm 0,4$	67	55
C	$0,45 \pm 0,06$	13	88	$0,8 \pm 0,3$	37	42
D	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
E	$0,70 \pm 0,05$	7,1	96	$0,5 \pm 0,3$	60	85
F	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
Média	-	-	94 ± 5	-	-	64 ± 17

^aRecuperação: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 6 pg Cd(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM). ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação.

^cValor recomendado para Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$): 5,0.

Tabela 30: Comparação dos resultados obtidos para Pb, sem e com a utilização de Ag como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção		
	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM I ^b	83,0 $\pm$ 0,5	0,6	98	71 $\pm$ 3	4,2	83
A	7,7 $\pm$ 0,1	1,3	97	5,8 $\pm$ 0,7	12	79
B	7,8 $\pm$ 0,4	5,1	95	6 $\pm$ 1	17	86
C	6,5 $\pm$ 0,3	4,6	94	5 $\pm$ 1	20	90
D	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
E	9,2 $\pm$ 0,3	3,3	90	8,3 $\pm$ 0,5	6,0	75
F	8,5 $\pm$ 0,2	2,4	85	7,1 $\pm$ 0,6	8,5	78
Média	-	-	92 $\pm$ 5	-	-	82 $\pm$ 6

^aRecuperação: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 60 pg Pb(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM).

^bValor recomendado para Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$): 85.

Fig. 34: Sinais de absorbância para o material de referência certificado.

3.6 Comparação do desempenho de Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se

A seleção dos elementos a serem testados como padrão interno visando a determinação multielementar de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo foi realizada considerando-se a baixa concentração desses elementos na amostra a ser analisada (Tabela 6), a comparação de parâmetros físicos e químicos relacionados com o processo de atomização desses elementos e as condições de análise recomendadas para procedimentos monoelementares (Tabela 7).

A avaliação do desempenho de Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te como padrão interno para Mn, Ni e Se considerou o comportamento de 20 sinais de absorbância obtidos consecutivamente para os analitos e o padrão interno, sob as mesmas condições experimentais e instrumentais. A otimização do programa de aquecimento envolveu a obtenção de curvas de temperatura de pirólise e atomização para Mn, Ni, Se, Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te, na presença de 20 µg Pd + 10 µg Mg, que é o modificador químico indicado para a determinação simultânea de Mn e Se em soro sangüíneo⁵⁷. As melhores temperaturas de pirólise e de atomização obtidas estão indicadas na Tabela 31.

Tabela 31: Temperaturas otimizadas para as etapas de pirólise (Tp) e atomização (Ta), obtidas a partir de soluções aquosas.

	Mn	Ni	Se	Bi	Ge	In	Sb	Sn	Te	Cc^a
Tp (°C)	1900	1900	1500	1500	1500	1500	1400	1500	1500	1500
Ta (°C)	2300	2300	2100	2000	2300	2200	2000	2100	2100	2300

^aCc: condição compromissada para o programa de aquecimento visando a determinação simultânea de Mn, Ni e Se.

As condições compromissadas a serem utilizadas para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se devem ser estabelecidas considerando-se o comportamento eletrotérmico observado para esses elementos. Desta forma, 1500/2300 °C foram escolhidas como temperaturas de pirólise e atomização.

A eficiência de um elemento como padrão interno para Mn, Ni e Se deve ser considerada sob as melhores condições compromissadas estabelecidas para os analitos. Para isso, 20 medidas consecutivas foram obtidas para Mn, Ni, Se e

cada um dos elementos testados como padrão interno (Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te) na presença de Pd + Mg. Os parâmetros da regressão linear, calculados a partir dos gráficos de correlação, e o desvio padrão relativo sem e com a padronização interna estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32: Comparação do desempenho dos elementos selecionados como padrão interno para Mn, Ni e Se utilizando 20 µg Pd + 10 µg Mg como modificador químico.

Padrão		Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Mn	Bi	-0,30 ± 0,29	1,26 ± 0,25	0,77 ± 0,07	5,2	5,8
	Ge	1,43 ± 0,25	-0,37 ± 0,24	-0,35 ± 0,06	5,6	9,8
	In	0,40 ± 0,39	0,54 ± 0,39	0,31 ± 0,11	6,7	12
	Sb	0,39 ± 0,72	0,54 ± 0,74	0,17 ± 0,12	4,0	18
	Sn	-1,70 ± 0,25	2,62 ± 0,25	0,91 ± 0,11	9,4	30
	Te	0,20 ± 0,10	0,79 ± 0,10	0,88 ± 0,01	3,1	1,4
Ni	Bi	0,09 ± 0,20	1,04 ± 0,19	0,79 ± 0,06	7,3	5,3
	Ge	0,59 ± 0,64	0,42 ± 0,62	0,16 ± 0,06	2,3	6,4
	In	-1,02 ± 0,58	2,06 ± 0,60	0,63 ± 0,09	3,7	12
	Sb	0,99 ± 0,57	-0,08 ± 0,60	-0,03 ± 0,13	4,6	19
	Sn	-0,74 ± 0,09	1,82 ± 0,10	0,97 ± 0,07	16	23
	Te	0,45 ± 0,10	0,55 ± 0,11	0,75 ± 0,02	3,9	2,6
Se	Bi	0,32 ± 0,30	0,82 ± 0,30	0,54 ± 0,09	6,4	7,5
	Ge	0,75 ± 0,21	0,23 ± 0,17	0,30 ± 0,06	6,8	7,9
	In	0,36 ± 0,36	0,55 ± 0,34	0,36 ± 0,11	7,1	14
	Sb	0,43 ± 0,40	0,46 ± 0,38	0,28 ± 0,12	5,7	17
	Sn	0,14 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,98 ± 0,05	34	5,5
	Te	0,69 ± 0,07	0,28 ± 0,07	0,69 ± 0,02	6,8	5,3

Comparativamente com o estudo da utilização de padrão interno visando a determinação simultânea de Cd e Pb, verifica-se que no presente caso há mais opções no momento de selecionar os elementos candidatos a padrão interno. Esse fato pode ser atribuído à obtenção de uma condição de compromisso apropriada para a determinação de vários elementos usualmente estabilizados pela mistura Pd + Mg^{67,86,87}. A semelhança observada entre os parâmetros físico-químicos considerados durante a seleção preliminar de padrão interno, para Mn, Ni, Se, Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te confirma a possibilidade de se estabelecer uma condição compromissada satisfatória para todos esses elementos (Tabela 7). Por esse motivo seis elementos foram escolhidos como candidatos à padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo.

Os resultados apresentados na Tabela 32 permitem comparar a eficiência da padronização interna para Mn, Ni e Se. Uma discussão pormenorizada envolvendo o desempenho de cada um dos elementos testados como padrão interno será feita nos itens subseqüentes.

3.6.1 O desempenho de Bi como padrão interno para Mn, Ni e Se

Os resultados observados quando Bi foi utilizado como padrão interno indicaram que seu desempenho foi adequado para Mn e satisfatório para Ni e Se (Tabela 32). A comparação dos gráficos de correlação obtidos para Bi evidencia que o Se foi o analito que menos se beneficiou com a padronização interna (Fig. 34). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos entre Mn/Bi, Ni/Bi e Se/Bi mostraram que há uma correlação entre os sinais de Mn, Ni e Bi quando 20 µg Pd + 10 µg Mg foi utilizado como modificador químico (Mn/Bi: $r = 0,77 \pm 0,07$; Ni/Bi: $r = 0,79 \pm 0,06$; Se/Bi: $r = 0,54 \pm 0,09$). Os coeficientes angulares calculados também indicam que a padronização interna com Bi é possível (Mn/Bi: $b = 1,26 \pm 0,25$; Ni/Bi: $r = 1,04 \pm 0,19$; Se/Bi: $r = 0,82 \pm 0,30$). Desta forma, verifica-se que a proximidade com a condição ideal ($a = 0$, $b = 1$, $r = 1$) obedeceu a seguinte seqüência: Ni > Mn > Se.

A correção dos sinais de Ni utilizando Bi como padrão interno foi possível sob as condições compromissadas de aquecimento impostas pela determinação simultânea de Mn, Ni e Se na presença de Pd + Mg ($T_p = 1500\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_a = 2300\text{ }^{\circ}\text{C}$). O desvio padrão relativo para Ni foi reduzido de 7,3 % para 5,3 % após a

correção com Bi. Os resultados obtidos para Mn praticamente permaneceram inalterados, visto que o desvio padrão relativo variou de 5,2 % para 5,8 % após a padronização interna. Por outro lado, os valores calculados para Se indicaram um aumento do desvio padrão relativo de 6,4 % para 7,5 % quando Bi foi utilizado como padrão interno (Tabela 32). A melhoria da repetibilidade dos sinais de absorbância para os analitos pode ser relacionada com os parâmetros da regressão linear, considerando a eficiência da correção dos resultados com Bi: $Ni > Mn > Se$.

Fig. 34: Gráficos de correlação para (a) Mn/Bi , (b) Ni/Bi e (c) Se/Bi em meio aquoso, utilizando $20 \mu g Pd + 10 \mu g Mg$ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

A avaliação dos sinais obtidos simultaneamente para Mn, Ni, Se e Bi mostrou que houve uma grande semelhança temporal na formação dos picos de absorbância (Fig. 35). O tempo de aparecimento dos sinais de absorbância foi entre 0,31 – 0,66 s (Fig. 35) e foram necessários 2,09 s, 2,16 s, 1,71 s e 1,34 s para a completa formação dos picos de Mn, Ni, Se e Bi, respectivamente. Esses resultados indicam que os eventos responsáveis pela atomização de Mn, Ni, Se e Bi ocorrem quase simultaneamente quando a mistura Pd + Mg é utilizada como modificador químico.

Considerando os resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, a variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna e a avaliação dos tempos de aparecimento e formação dos sinais transientes de absorbância, verificou-se que a utilização de Bi como padrão interno é viável para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se sob as condições compromissadas adotadas (Tabela 31). A correção por meio da padronização interna não é igualmente eficaz para todos os analitos, porém esse fato não invalida o prosseguimento dos estudos na presença da amostra.

Fig. 35: Sinais de absorbâncias obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 200 pg Bi(III) em meio aquoso, na presença de 20 μg Pd + 10 μg Mg.

3.6.2 O desempenho de Te como padrão interno para Mn, Ni e Se

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação para Mn/Te, Ni/Te e Se/Te indicaram que o desempenho do Te como padrão interno foi satisfatório para Mn, Ni e Se (Tabela 32). Comparativamente, o coeficiente de correlação obtido para Mn foi melhor do que os valores observados para Ni e Se (Mn/Te: $r = 0,88 \pm 0,01$; Ni/Te: $r = 0,75 \pm 0,02$; Se/Te: $r = 0,69 \pm 0,02$). A avaliação dos coeficientes angulares calculados para os

elementos de interesse indica que a correção para o Mn é a que mais se aproxima da condição ideal ($b = 1$), sendo que os valores obtidos para Ni e Se são mais distantes dessa condição (Mn/Te: $b = 0,79 \pm 0,10$; Ni/Te: $r = 0,55 \pm 0,11$; Se/Te: $r = 0,28 \pm 0,07$). Isso pode indicar que, sob as condições compromissadas estabelecidas, o comportamento do Te é semelhante ao do Mn e diferente daquele observado para Ni e Se.

O desvio padrão relativo para os sinais de Mn, Ni e Se foi reduzido após a padronização interna com Te. Nesse caso, o desvio padrão relativo para Mn foi reduzido de 3,1 % para 1,4 % após a correção com Te; para Ni a queda foi de 3,9 % para 2,6 % e para Se a diminuição foi de 6,8 % para 5,3 % (Tabela 32). Comparativamente, o desvio padrão relativo para os sinais de Mn, Ni e Te foi inferior a 4 % (DPR para Mn = 3,1 %, Ni = 3,9 % e Te = 2,7 %, $n = 20$), enquanto os sinais de Se apresentaram uma variação maior (DPR para Se = 6,8 %, $n = 20$). Desta forma, a precisão das medidas do padrão interno (Te) favoreceu mais a correção dos sinais de Mn e Ni. A partir da comparação dos valores do desvio padrão relativo sem e com a padronização interna, verifica-se que Te melhorou os resultados para os 3 elementos a serem analisados, apresentando um caráter multielementar. Essa situação indicou o potencial do Te em atuar como um padrão interno multielementar, ou seja, um único elemento foi capaz de melhorar a repetibilidade dos 3 analitos sob condições compromissadas de análise.

A comparação dos sinais obtidos simultaneamente para Mn, Ni, Se e Te mostrou a existência de uma semelhança temporal na formação dos picos de absorbância (Fig. 36). O tempo de aparecimento dos sinais de absorbância variou de 0,67 – 0,95 s e o tempo para a completa formação do sinal transiente foi de 1,44 s para Mn, 1,84 s para Ni, 1,11 s para Se e 1,32 s para Te (Fig. 35).

O comportamento do Ni foi ligeiramente diferente daquele observado para os demais elementos, visto que o tempo de aparecimento e o tempo necessário para a completa formação do sinal de absorbância são um pouco mais elevados (Fig. 36). Cabe ressaltar que essa diferença não foi suficientemente pronunciada a ponto de comprometer os resultados obtidos com a utilização de Te como padrão interno.

A avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem

e com a padronização interna, e dos tempos de aparecimento e formação dos sinais transientes de absorvância, permitiu verificar que o comportamento de Se e, sobretudo, Mn, Ni e Te são similares sob as condições compromissadas estabelecidas após a otimização do programa de aquecimento (Tabela 31). Os testes visando a utilização de Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo devem ser realizados na presença das amostras, a fim de fornecer maiores subsídios para julgar o desempenho desse elemento como padrão interno.

Fig. 36: Sinais de absorvâncias obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 250 pg Te(IV) em meio aquoso, na presença de 20 μ g Pd + 10 μ g Mg.

3.6.3 O desempenho do Sn como padrão interno para Mn, Ni e Se

Os resultados observados quando Sn foi utilizado como padrão interno indicaram que seu desempenho foi significativamente diferente para os elementos de interesse (Tabela 32). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos entre Mn/Sn, Ni/Sn e Se/Sn mostraram que há uma elevada correlação entre os sinais de absorvância desses elementos (Mn/Sn: $r = 0,91 \pm 0,11$; Ni/Sn: $r = 0,97 \pm 0,07$; Se/Sn: $r = 0,98 \pm 0,05$). Os coeficientes angulares

calculados também indicam que a padronização interna com Sn é apropriada para Se, visto que essa é a situação mais próxima do ideal (Mn/Sn: $b = 2,62 \pm 0,25$; Ni/Sn: $b = 1,82 \pm 0,10$; Se/Sn: $b = 0,79 \pm 0,03$). A comparação dos gráficos de correlação obtidos para Sn mostra que, apesar da elevada correlação entre os dados experimentais, os coeficientes angulares das retas Mn/Sn e Ni/Sn estão muito distantes da condição ideal (Fig. 36).

Fig. 36: Gráficos de correlação para (a) Mn/Sn, (b) Ni/Sn e (c) Se/Sn em meio aquoso, utilizando $20 \mu\text{g Pd} + 10 \mu\text{g Mg}$ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

A correção dos sinais de Se utilizando Sn como padrão interno foi possível sob as condições compromissadas de aquecimento ($T_p = 1500 \text{ }^\circ\text{C}$ e $T_a = 2300 \text{ }^\circ\text{C}$). O desvio padrão relativo para Se foi reduzido de 34 % para 5,5 % após a correção com Sn (Tabela 32). Por outro lado, os resultados obtidos para Mn e Ni pioraram, visto que o desvio padrão relativo aumentou de 9,4 % para 30 % e de 16 % para 23 % após a padronização interna com Sn para Mn e Ni, respectivamente (Tabela 32). Esse fato pode ser explicado pela repetibilidade das 20 medidas consecutivas de absorbância obtidas simultaneamente para Mn, Ni, Se e Sn. Os sinais para Se e Sn apresentaram um comportamento semelhante, com repetibilidade pior do que aquelas verificadas para Mn e Ni (Fig. 37). Comparativamente, o desvio padrão relativo para os sinais de Se e Sn foi

superior a 29 % (DPR para Se = 34 % e Sn = 29 %, $n = 20$), enquanto os sinais de Mn e Ni apresentaram uma variação menor (DPR para Mn = 9,4 % e Ni = 16 %, $n = 20$). Desta forma, a imprecisão das medidas do padrão interno (Sn) favoreceu a correção dos sinais de Se, mas comprometeu a correção dos resultados de Mn e Ni, sendo que o desvio padrão relativo calculado para a razão Mn/Sn (30 %) e Ni/Sn (23 %) reflete a imprecisão observada para o padrão interno.

Fig. 37: Sinais de absorbância consecutivos (a) sem padronização interna e (b) com padronização interna.

A avaliação dos sinais obtidos simultaneamente para Mn, Ni, Se e Sn mostrou que houve uma grande semelhança temporal na formação dos picos de absorbância (Fig. 38). O tempo de aparecimento dos sinais de absorbância foi entre 0,42 – 0,88 s (Fig. 38) e foram necessários 1,61 s, 1,85 s, 1,16 s e 1,05 s para a completa formação dos picos de Mn, Ni, Se e Sn, respectivamente.

Considerando os resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, a avaliação dos tempos de aparecimento e formação dos sinais transientes de absorbância e, sobretudo, a variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, conclui-se que a utilização de Sn como padrão interno é viável para corrigir os sinais de Se sob as condições

compromissadas de análise. Por esse motivo, os testes visando a utilização de Sn como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se na presença da amostra foram realizados.

Fig. 38: Sinais de absorbâncias obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 500 pg Sn(IV) em meio aquoso, na presença de 20 μg Pd + 10 μg Mg.

3.6.4 O desempenho do Ge, In e Sb como padrão interno para Mn, Ni e Se

Os resultados observados quando Ge, In e Sb foram utilizados como padrão interno indicaram que não foi possível melhorar a precisão dos sinais de absorbância obtidos para Mn, Ni e Se (Tabela 32). Os parâmetros obtidos para a regressão linear dos gráficos para esses elementos mostraram que não há correlação entre os sinais de absorbância, sendo que a melhor situação foi observada para Ni/In ($r = 0,63 \pm 0,09$). Nos demais gráficos o valor calculado para o coeficiente de correlação ficou muito distante da condição ideal ($r = 1$), variando entre $-0,35 \pm 0,06$ (Mn/Ge) e $0,36 \pm 0,11$ (Se/In). A comparação dos coeficientes angulares é ainda mais significativa, visto que os valores calculados foram sempre muito diferentes de 1, sendo que as melhores condições obtidas para Mn, Ni e Se foram com In, Ge e In, respectivamente (Mn/In: $b = 0,54 \pm$

0,39; Ni/Ge: $b = 0,42 \pm 0,62$; Se/In: $b = 0,55 \pm 0,34$). A visualização gráfica dos valores obtidos para os coeficientes de correlação (Fig. 39), os coeficientes angulares (Fig. 40) e os coeficientes lineares (Fig. 41) permitem comparar o desempenho de Ge, In e Sb como padrão interno e verificar a distância observada entre os comportamentos obtidos e a condição ideal.

O desvio padrão relativo para Mn, Ni e Se sem a correção com Ge, In e Sb foi sempre menor do que os valores obtidos após a padronização interna (Fig. 42). Comparativamente, a repetibilidade foi menos degradada quando Ge foi utilizado como padrão interno (DPR: Mn = 5,6 % e Mn/Ge = 9,8 %; Ni = 2,3 % e Ni/Ge = 6,4 %; Se = 6,8 % e Se/Ge = 7,9 %, $n = 20$). Esse fato pode ser explicado pela repetibilidade das 20 medidas consecutivas de absorbância obtidas simultaneamente para Ge (DPR para Ge = 6,2 %, $n = 20$), que foi semelhante aquela observada para Mn, Ni e Se. Por outro lado, a variação observada para In e Sb foi elevada (DPR para In = 12 % e Sb = 13 %, $n = 20$) e a imprecisão das medidas desses elementos comprometeu a correção dos resultados de Mn, Ni e Se, sendo que o desvio padrão relativo calculado para as razões Mn/In (12 %), Ni/In (12 %), Se/In (14 %), Mn/Sb (18 %), Ni/Sb (12 %) e Se/Sb (17 %) reflete a imprecisão observada para o padrão interno.

Fig. 39: Comparação dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos gráficos de correlação durante o estudo de Ge, In e Sb como padrão interno para (a) Mn, (b) Ni e (c) Se. (A linha tracejada indica o valor ideal)

Fig. 40: Comparação dos coeficientes angulares obtidos a partir dos gráficos de correlação durante o estudo de Ge, In e Sb como padrão interno para (a) Mn, (b) Ni e (c) Se. (A linha tracejada indica o valor ideal)

Fig. 41: Comparação dos coeficientes lineares obtidos a partir dos gráficos de correlação durante o estudo de Ge, In e Sb como padrão interno para (a) Mn, (b) Ni e (c) Se. (A linha tracejada indica o valor ideal)

Fig. 42: Comparação do desvio padrão relativo obtido sem e com a padronização interna para (a) Mn, (b) Ni e (c) Se.

A avaliação dos sinais obtidos simultaneamente para Mn, Ni, Se, Ge, In e Sb mostrou que houve uma grande semelhança temporal na formação dos picos de absorbância (Figs. 43 a 45). O tempo de aparecimento dos sinais de absorbância esteve sempre entre 0,74 – 1,02 s e o tempo necessário para a completa formação dos sinais de absorbância foi de, aproximadamente, 1,2 s, 1,6 s, 1,0 s, 0,98 s, 1,01 s e 0,92 s para Mn, Ni, Se, Ge, In e Sb, respectivamente (Figs. 43 a 45). Por outro lado, os sinais de absorbância obtidos para In (Fig. 44) e Sb (Fig. 45) mostram que as condições compromissadas que foram estabelecidas (Tabela 31) não são adequadas para permitir a atomização eficiente desses elementos, comprometendo a utilização como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se (Tabela 32). Adicionalmente, os sinais de Ge apresentaram sistematicamente um problema relacionado com a inadequada correção do sinal de fundo durante o intervalo de tempo compreendido entre 1,0 a 1,3 s (Fig. 43). Esse fenômeno não comprometeu a repetibilidade das medidas de Ge (DPR para Ge = 6,2 %, n = 20), visto que ele ocorreu durante todo o teste de repetibilidade com esse elemento. De qualquer maneira, esse problema na correção do sinal de fundo indica que as condições compromissadas para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se também não favoreceram a atomização de Ge.

Fig. 43: Sinais de absorbância obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 2000 pg Ge(IV) em meio aquoso, na presença de 20 μg Pd + 10 μg Mg.

Fig. 44: Sinais de absorbância obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 400 pg In(III) em meio aquoso, na presença de 20 μg Pd + 10 μg Mg.

Fig. 45: Sinais de absorbância obtidos para (a) 50 pg Mn(II), (b) 200 pg Ni(II), (c) 500 pg Se(IV) e (d) 300 pg Sb(III) em meio aquoso, na presença de 20 μ g Pd + 10 μ g Mg.

A avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir dos gráficos de correlação, da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, e dos sinais transientes de absorbância permitiu verificar que os comportamentos térmicos de Ge, In e Sb são muito diferentes daquele apresentado por Mn, Ni e Se. Desta forma, conclui-se que a utilização desses elementos como padrão interno não é viável sob as condições compromissadas estabelecidas (Tabela 31). Desta forma, foram interrompidos os testes visando a utilização de Ge, In e Sb como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo.

3.7 A padronização interna para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo

O comportamento de Bi, Sn e Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo foi verificado por meio do estudo da repetibilidade dos sinais na presença da amostra. Os efeitos

causados pela matriz foram considerados e o desempenho dos elementos testados como padrão interno foi observado quando os concomitantes estão presentes.

Para verificar se a estabilidade térmica de Mn, Ni e Se foi afetada pela presença da matriz, curvas de temperatura de pirólise e atomização foram obtidas na presença de soro sangüíneo diluído (1+3) para otimizar o programa de aquecimento a ser utilizado (Fig. 46). Foram adicionados $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II), $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) à amostra diluída para permitir uma melhor visualização dos sinais de absorbância. As condições experimentais e instrumentais foram otimizadas considerando as informações descritas na literatura⁵⁷, que indicam a utilização de uma mistura oxidante contendo 15 % v/v H_2O_2 e 1% HNO_3 em conjunto com uma etapa de pirólise a baixa temperatura (400°C) para favorecer a oxidação dos constituintes orgânicos do soro sangüíneo no interior do tubo de grafite durante o programa de aquecimento. Essa estratégia tem sido empregada na análise de amostras que apresentam um elevado teor de matéria orgânica, tais como fluidos biológicos^{88,89} e leite^{90,91}.

Fig. 46: Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Mn, Ni e Se na presença de soro sangüíneo diluído 1+4 em 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 .

A contínua introdução de soro sangüíneo no tubo de grafite produz um resíduo carbonáceo sobre a plataforma integrada do atomizador, comprometendo a precisão e a exatidão dos resultados analíticos. Nesse caso, a otimização do programa de aquecimento deve favorecer a oxidação *in situ* dos concomitantes orgânicos presentes em elevada quantidade na amostra, devido ao reduzido fator de diluição adotado (1+3). A superfície pirolítica do tubo de grafite fica seriamente comprometida quando a mistura oxidante não é utilizada, sendo que o tempo de vida útil de um tubo de grafite fica limitado a, no máximo, 50 ciclos de aquecimento.

As imagens da superfície da plataforma integrada (Figs. 47 a 49), obtidas por microscopia eletrônica de varredura, permitem verificar a estrutura do resíduo carbonáceo formado após 150 ciclos de aquecimento com soro sangüíneo diluído (1+3). Verifica-se que a oxidação parcial da matéria orgânica, mesmo com a utilização da mistura oxidante, provoca o acúmulo de um resíduo de carbono (Fig. 47) sobre o grafite pirolítico que recobre a plataforma integrada. A superfície original do tubo (Fig. 48) foi ocluída por um resíduo irregular e poroso (Fig. 49), que compromete os processos físico-químicos que ocorrem durante o programa de aquecimento do atomizador. A consequência desse fato é a perda qualidade dos resultados analíticos⁵⁷.

Fig. 47: Microscopia eletrônica de varredura da plataforma integrada do tubo de grafite com resíduo carbonáceo (ampliação: 20x).

Fig. 48: Microscopia eletrônica de varredura da plataforma integrada do tubo de grafite sem resíduo carbonáceo (ampliação: 200x).

Fig. 49: Microscopia eletrônica de varredura da plataforma integrada do tubo de grafite com resíduo carbonáceo (ampliação: 200x).

A utilização de padrão interno nessa situação pode minimizar o efeito prejudicial causado pela formação progressiva desse resíduo carbonáceo. Caso os analitos (Mn, Ni e Se) e o padrão interno (Bi, Sn ou Te) sejam igualmente afetados pela presença do resíduo, a melhoria da precisão e da exatidão dos resultados analíticos pode ser obtida.

Após a realização dos estudos do comportamento térmico na presença das amostras (Fig. 46), verificou-se que as melhores condições para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se foram obtidas quando 1300 °C e 2300 °C foram selecionadas como temperatura de pirólise e atomização, respectivamente. Sob condições experimentais otimizadas, 20 sinais consecutivos para Mn, Ni, Se e o elemento testado como padrão interno (Bi, Sn ou Te), avaliou-se os parâmetros da regressão linear obtidos para os gráficos de correlação e o desvio padrão relativo sem e com a padronização interna (Tabela 33).

Tabela 33: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear dos gráficos de correlação e desvio padrão relativo sem e com a padronização interna para Mn, Ni e Se na presença de soro sangüíneo (1+3), utilizando 20 µg Pd + 10 µg Mg como modificador químico.

	Padrão Interno	Parâmetros da regressão linear			DPR (%), n=20	
		a	b	r	Sem PI	Com PI
Mn	Bi	-0,9 ± 0,5	2,2 ± 0,6	0,66 ± 0,04	7,4	13
	Te	0,18 ± 0,34	1,30 ± 0,47	0,54 ± 0,33	11	14
	Sn	-1,2 ± 0,6	2,7 ± 0,6	0,72 ± 0,04	5,8	9,5
Ni	Bi	-1,1 ± 0,5	2,5 ± 0,6	0,72 ± 0,04	7,2	15
	Te	0,10 ± 0,32	0,85 ± 0,27	0,69 ± 0,04	9,0	11
	Sn	-0,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6	0,58 ± 0,03	6,5	9,2
Se	Bi	-0,10 ± 0,25	1,21 ± 0,25	0,75 ± 0,04	12	7,5
	Te	0,18 ± 0,09	0,56 ± 0,05	0,92 ± 0,04	11	6,3
	Sn	0,4 ± 0,2	0,95 ± 0,08	0,73 ± 0,04	10	8,1

A avaliação dos resultados obtidos para Mn permitiu verificar que a melhoria da precisão não foi obtida por meio da padronização interna (Tabela 33). Os coeficientes de correlação obtidos ficaram distantes da condição ideal ($r = 1$) e variaram de 0,54 (Mn/Te) a 0,72 (Mn/Sn). A comparação conjunta dos coeficientes angular e linear mostrou que o melhor resultado foi obtido quando Te foi utilizado como padrão interno. Mesmo nessa situação, o desvio padrão relativo não foi reduzido após a padronização interna, visto que seu valor aumentou de 11 % (antes da correção com Te) para 14 % (após a correção com Te). Essa mesma tendência foi observada quando Bi e Sn foram utilizados como padrão interno: o desvio padrão relativo para Mn variou de 7,4 % para 7,5 % após a correção com Bi e de 6,0 % para 9,5 % após a correção com Sn (Tabela 33). A partir desses resultados, obtidos na presença da amostra, pode-se verificar que a correção dos resultados obtidos para Mn parece não ser possível quando Bi, Sn ou Te foram empregados como padrão interno.

Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear para os gráficos de correlação de Ni/Bi, Ni/Te e Ni/Sn indicaram um resultado semelhante àquele obtido para Mn: nenhum dos elementos testados como padrão interno apresentou um desempenho satisfatório (Tabela 33). Os coeficientes de correlação obtidos ficaram distantes da condição ideal ($r = 1$) e variaram de 0,58 (Ni/Te) a 0,72 (Ni/Bi). A comparação conjunta dos coeficientes angular e linear mostra que o melhor resultado foi obtido quando Te foi utilizado como padrão interno. Mesmo nessa situação, o desvio padrão relativo permaneceu praticamente inalterado após a padronização interna, visto que seu valor variou de 9,0 % (antes da correção com Te) para 11 % (após a correção com Te). O aumento do desvio padrão relativo foi observado quando Bi e Sn foram utilizados como padrão interno: o desvio padrão relativo para Ni variou de 7,2 % para 15 % após a correção com Bi e de 6,5 % para 9,2 % após a correção com Sn (Tabela 33). Desta maneira, a correção dos resultados obtidos para Ni também parecer não ser possível quando Bi, Sn ou Te foram empregados como padrão interno.

A avaliação dos resultados obtidos para Se indicou que os três elementos testados como padrão interno apresentaram um desempenho satisfatório (Tabela 33). Os coeficientes de correlação obtidos ficaram próximos da condição ideal ($r = 1$), principalmente quando Te foi utilizado como padrão interno ($r = 0,92$). Esse

fato indica que há uma boa correlação entre os sinais do analito (Se) e dos elementos testados como padrão interno (Bi, Sn e Te). A comparação conjunta dos coeficientes angular e linear mostra que o melhor resultado foi obtido quando Sn foi utilizado como padrão interno, sendo essa a situação mais próxima da condição ideal ($a = 0$, $b = 1$). Em todas as situações, o desvio padrão relativo foi reduzido após a padronização interna, sendo que as reduções mais expressivas foram obtidas para Bi e Te: o desvio padrão relativo para Se variou de 12 % para 7,5 % após a correção com Bi e de 11 % para 6,3 % após a correção com Te (Tabela 33). A utilização de Bi, Sn ou Te como padrão interno para corrigir os resultados obtidos para Se é viável, visto que a alteração das condições experimentais (acúmulo de resíduo carbonáceo no interior do tubo) em função do tempo afeta de maneira semelhante a atomização desses elementos.

Os resultados obtidos para Sn foram prejudicados devido à existência de uma contaminação sistemática do peróxido de hidrogênio, utilizado para auxiliar na oxidação dos constituintes orgânicos do soro sanguíneo^{57,88,89}. A obtenção de elevados sinais de absorbância para Sn em três diferentes frascos de peróxido de hidrogênio (Fig. 50) prejudicou a repetibilidade dos sinais de absorbância para esse elemento, piorando seu desempenho na presença da amostra (Tabela 33), em comparação com aquele obtido em meio aquoso (Tabela 32). Dessa forma, a utilização de Sn como padrão interno foi descartada para a análise de soro sanguíneo. Cabe ressaltar que os resultados obtidos para Sn como padrão interno, sobretudo quando os experimentos foram realizados em meio aquoso (sem água oxigenada), devem servir de incentivo às investigações futuras envolvendo a utilização de Sn como padrão interno para a determinação de Se em outras amostras.

Uma apreciação conjunta dos resultados obtidos para Mn, Ni e Se quando Bi, Sn e Te são empregados como padrão interno permite verificar que o comportamento observado para Se é mais próximo daquele obtido para Bi, Sn e Te. Dessa maneira, a eficiência da padronização interna foi maior para esse analito do que para Mn e Ni. Isso sugere que, para corrigir simultaneamente os sinais analíticos de Mn, Ni e Se seria necessário utilizar mais do que um único padrão interno. Além de empregar Bi, Sn ou Te para a correção dos resultados obtidos para Se, seria necessário selecionar outros elementos como padrão interno para corrigir os sinais de Mn e Ni. A utilização de vários elementos como

padrão interno visando determinações multielementares já é algo bastante explorado em procedimentos analíticos envolvendo ICP-OES e ICP-MS¹⁶⁻²³. Essa situação também pode ser encontrada quando a padronização interna for aplicada para ETAAS, sendo que nesse caso a limitação do caráter simultâneo é um sério complicador: deve-se lembrar que o espectrômetro utilizado no desenvolvimento do presente trabalho permite o acionamento de, no máximo, quatro fontes de radiação diferentes, com a detecção simultânea de até seis elementos.

Fig. 50: Sinais de absorbância obtidos para Sn a partir da introdução de 10 μL de H_2O_2 .

Entre todos os elementos envolvidos nesse estudo (Bi, Mn, Ni, Se, Sn e Te), observou-se que os sinais obtidos para Mn poderiam ser eficientemente corrigidos se Ni fosse utilizado como padrão interno. Considerando os dados experimentais dos estudos de repetibilidade realizados para Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te, um gráfico de correlação envolvendo Mn (analito) e Ni (padrão interno) foi construído utilizando os 120 sinais de absorbância acumulados (Fig. 51). Os parâmetros obtidos a partir da regressão linear para o gráfico de correlação de Mn/Ni indicaram um resultado extremamente satisfatório: os coeficientes de correlação ($r = 0,84 \pm 0,16$), angular ($r = 0,85 \pm 0,05$) e linear ($r = 0,16 \pm 0,06$)

estão próximos da condição ideal. Isso se refletiu na redução do desvio padrão relativo observado para as medidas de Mn antes (24 %) e depois da correção com Ni (12 %). Cabe ressaltar que, entre todas as possibilidades avaliadas considerando os analitos (Mn, Ni e Se) e os elementos testados como padrão interno (Bi, Sn e Te), a combinação de Mn como analito e Ni como padrão interno foi a que apresentou os resultados mais animadores. Devido ao reduzido teor de Ni encontrado no soro sanguíneo de pessoas não expostas a esse metal de maneira sistemática ($\sim 2,5 \mu\text{g L}^{-1}$)⁶⁰, a possibilidade de realizar a determinação simultânea de Mn e Se utilizando Ni e Bi, Sn ou Te como padrões internos pode ser considerada.

Fig. 51: Gráficos de correlação para Mn/Ni na presença de soro sanguíneo (1+3), utilizando $20 \mu\text{g Pd} + 10 \mu\text{g Mg}$ como modificador químico. (A linha tracejada indica a correlação ideal)

Comparando os resultados obtidos para Bi, Sn e Te a partir dos gráficos de correlação e da variação do desvio padrão relativo dos sinais de absorbância sem e com a padronização interna, conclui-se que a utilização de Bi e Te como padrão interno é a opção mais interessante, sendo possível a melhoria dos resultados analíticos obtidos para Se.

3.7.1 Comparação do desempenho de Bi e Te como padrão interno para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo

As melhores condições analíticas obtidas para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo, após a realização dos estudos térmicos para a otimização do programa de aquecimento e dos testes de avaliação de Bi como padrão interno, estão indicadas na Tabela 34. A calibração do equipamento foi realizada com soluções analíticas de referência contendo de 0,50 – 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II), 2,0 – 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) e 5,0 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV). Após o preparo, o meio químico obtido para essas soluções apresentava 0,1 % m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 + 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ Bi(III) e Te(IV) (padrão interno). Adicionalmente, curvas de calibração na presença da amostra foram obtidas de maneira análoga, por meio da adição de analito. Os parâmetros das curvas de calibração para Mn, Ni e Se, sem e com a padronização interna, estão apresentados nas Tabelas 35 e 36. Os coeficientes de correlação obtidos após a padronização interna são sistematicamente menores do que aqueles obtidos sem a correção com Bi ou Te, mas sempre superiores a 0,996.

Tabela 34: Parâmetros instrumentais e experimentais otimizados para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sanguíneo.

Programa de aquecimento				
Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de argônio (ml min ⁻¹)
Secagem I ^a	80	5	10	250
Secagem II ^b	80	5	10	250
Secagem III	130	20	5	250
Pirólise I	400	20	5	250
Pirólise II	1200	10	30	250
Atomização	2300	0	5	0
Limpeza	2600	1	2	250

^aIntrodução de 15 μL de amostra + 10 μL de mistura oxidante antes de iniciar essa etapa;

^bIntrodução de 10 μL de modificador químico antes de iniciar essa etapa.

Tempo total do programa: 128 s; Temperatura de injeção da amostra: 20 °C.

Tabela 35: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração de Mn, Ni e Se utilizando Bi como padrão interno.

	Meio	Correção com Bi	b	r
Mn	Aquoso	Não	$(8,64 \pm 0,02) 10^{-3}$	$0,9989 \pm 0,0003$
		Sim	$(9,97 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,001$
	Soro	Não	$(9,02 \pm 0,03) 10^{-3}$	$0,998 \pm 0,002$
		Sim	$(1,25 \pm 0,04) 10^{-1}$	$0,996 \pm 0,002$
Ni	Aquoso	Não	$(1,85 \pm 0,01) 10^{-3}$	$0,9999 \pm 0,0001$
		Sim	$(2,17 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,9997 \pm 0,0002$
	Soro	Não	$(1,77 \pm 0,02) 10^{-3}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(2,58 \pm 0,03) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,002$
Se	Aquoso	Não	$(8,68 \pm 0,01) 10^{-4}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(1,01 \pm 0,01) 10^{-2}$	$0,999 \pm 0,001$
	Soro	Não	$(8,18 \pm 0,04) 10^{-4}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(1,08 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,999 \pm 0,001$

A comparação dos coeficientes angulares obtidos para Mn, Ni e Se em meio aquoso e na presença da amostra pode ser utilizada como um indicativo da existência de interferências causadas pela matriz. Idealmente, a razão entre esses valores deve ser 1, fato que confirma a coincidência da curva de calibração obtida em meio aquoso e na presença da amostra. Nessa situação, a inexistência de interferências de matriz possibilita a utilização de soluções aquosas para calibrar o instrumento antes das determinações.

Os resultados obtidos a partir dos coeficientes angulares das curvas de calibração (Tabelas 35 e 36) indicaram que os efeitos interferentes causados pela matriz não foram minimizados após a padronização interna com Bi (Tabela 37) ou Te (Tabela 38), sendo que Mn e Ni foram os elementos mais afetados. O resultado obtido para Se indicou que os efeitos causados pela matriz não foram significativamente corrigidos pela utilização de padrão interno (Tabelas 37 e 38).

Tabela 36: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração de Mn, Ni e Se utilizando Te como padrão interno.

	Meio	Correção com Te	b	r
Mn	Aquoso	Não	$(8,91 \pm 0,02) 10^{-3}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(6,32 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,001$
	Soro	Não	$(9,08 \pm 0,04) 10^{-3}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(8,04 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,002$
Ni	Aquoso	Não	$(2,03 \pm 0,02) 10^{-3}$	$0,9996 \pm 0,0001$
		Sim	$(1,50 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,999 \pm 0,001$
	Soro	Não	$(1,89 \pm 0,03) 10^{-3}$	$0,999 \pm 0,002$
		Sim	$(2,34 \pm 0,02) 10^{-2}$	$0,998 \pm 0,001$
Se	Aquoso	Não	$(9,43 \pm 0,02) 10^{-4}$	$0,999 \pm 0,001$
		Sim	$(6,84 \pm 0,03) 10^{-3}$	$0,9997 \pm 0,0001$
	Soro	Não	$(9,05 \pm 0,04) 10^{-4}$	$0,998 \pm 0,001$
		Sim	$(7,74 \pm 0,05) 10^{-3}$	$0,998 \pm 0,001$

Tabela 37: Comparação dos coeficientes angulares obtidos em meio aquoso e na presença da amostra para as curvas de calibração de Mn, Ni e Se utilizando Bi com padrão interno.

	Correção com Bi	b aquoso^a / b soro^b
Mn	Não	$0,958 \pm 0,004$
	Sim	$0,798 \pm 0,003$
Ni	Não	$1,04 \pm 0,01$
	Sim	$0,84 \pm 0,01$
Se	Não	$1,061 \pm 0,005$
	Sim	$0,94 \pm 0,02$

^ab aquoso: coeficiente angular da curva de calibração em meio aquoso. ^bb soro: coeficiente angular da curva de calibração em presença de soro (1+3).

Tabela 38: Comparação dos coeficientes angulares obtidos em meio aquoso e na presença da amostra para as curvas de calibração de Mn, Ni e Se utilizando Te com padrão interno.

Correção com Te		b aquoso^a / b soro^b
Mn	Não	0,981 ± 0,005
	Sim	0,786 ± 0,003
Ni	Não	1,07 ± 0,02
	Sim	0,64 ± 0,01
Se	Não	1,042 ± 0,005
	Sim	0,884 ± 0,007

^ab aquoso: coeficiente angular da curva de calibração em meio aquoso. ^bb soro: coeficiente angular da curva de calibração em presença de soro (1+3).

De maneira geral, os resultados obtidos foram diferentes daqueles observados quando se empregou Ag como padrão interno para a determinação simultânea de Cd e Pb em sangue (Tabela 19). Assim, verifica-se que a redução dos efeitos da interferência química provocada pela matriz pode ou não ser minimizada por meio da padronização interna.

Considerando as principais características e a composição química do soro sangüíneo (Tabela 39), destaca-se o elevado teor de matéria orgânica (gordura e proteína) e a alta concentração de íons Na⁺ e Cl⁻ como prováveis interferentes. Cabe ressaltar que, diante da elevada complexidade da amostra analisada e das condições compromissadas adotadas para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se, a identificação das espécies interferentes somente poderá ser feita com maior detalhamento por meio de um estudo sistemático, testando individualmente cada um dos potenciais interferentes e avaliando os sinais obtidos para Mn, Ni, Se, Bi e Te.

Provavelmente, os concomitantes presentes no instante da atomização afetaram de maneira diferente os processos físico-químicos que levam à formação dos átomos livres dos analitos (Mn, Ni e Se) e dos elementos utilizados como padrão interno (Bi e Te). Por esse motivo, a padronização interna nessa situação ficou inviabilizada. A correção dos resultados analíticos obtidos utilizando

Bi ou Te como padrão interno piorou a exatidão e a precisão dos resultados analíticos, sobretudo para Mn e Ni.

A massa característica foi calculada para Mn, Ni e Se a partir das curvas de calibração (Tabela 36). Os valores encontrados, considerando o volume de solução introduzido no tubo de grafite (15 μL), foram iguais a 7,4 pg, 32 pg e 59 pg para Mn, Ni e Se, respectivamente. Esses valores são um pouco maiores do que aqueles obtidos para a determinação monoelementar desses analitos (Mn = 6,3 pg, Ni = 20 pg e Se = 45 pg)⁶⁶. Desta maneira, verifica-se que a utilização de uma condição compromissada visando a determinação simultânea desses três elementos implica em uma pequena redução da sensibilidade.

Tabela 39: Parâmetros físico-químicos e concentração das principais substâncias presentes no soro sanguíneo⁶⁰.

Parâmetro	Soro sanguíneo
Massa seca (g L^{-1})	80
Cinzas (% m/m)	0,93
Densidade (g cm^{-3})	1,03
pH	7,39
Gordura total (% m/m)	0,74
Proteína total (% m/m)	6,8
Ca^{2+} (mg L^{-1})	97
Cl^{-} (mg L^{-1})	3665
K^{+} (mg L^{-1})	191
Mg^{2+} (mg L^{-1})	21,7
Na^{+} (mg L^{-1})	3251
P (mg L^{-1})	142

Os limites de detecção (LD) foram estimados a partir do desvio de 20 medidas consecutivas de uma solução contendo 0,1 % m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 , de acordo com a equação $3 dp_{\text{BCO}} / b$, onde dp_{BCO} representa o desvio

padrão das medidas obtidas para o branco analítico e b é o coeficiente angular da curva de calibração. Os valores obtidos foram iguais a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para Mn, $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ni e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para Se. A partir desses valores é possível estimar os limites de quantificação (LQ) utilizando a equação $LQ = k LD$, e assumindo $k=3$. Desta forma, $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,4$ e $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ podem ser considerados como os limites de quantificação para Mn, Ni e Se utilizando o procedimento desenvolvido. Essa estimativa confirma a possibilidade de iniciar as curvas de calibração para Mn, Ni e Se utilizando soluções de referência analítica contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II), $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II) e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV).

Os resultados obtidos para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se são apresentados sem e com a padronização interna utilizando Bi (Tabelas 40 a 42) e Te (Tabelas 43 a 45). Sinais de absorbâncias típicos para Mn, Ni, Se, Te e Bi na presença da amostra são apresentados para o material de referência certificado (Fig. 52).

A comparação dos resultados experimentais com os valores recomendados para os materiais de referência certificados mostra que a utilização de Bi ou Te como padrão interno piorou a concordância entre os resultados experimentais e os valores recomendados. A partir da recuperação calculada para os materiais de referência certificados (que indica a porcentagem do analito encontrada na determinação) em comparação com o valor recomendado no certificado (Tabelas 40 a 45), verifica-se que os valores obtidos se aproximam mais da condição ideal (100 % de recuperação) quando os cálculos são realizados desconsiderando-se a padronização interna. Essa mesma tendência também foi observada para as amostras analisadas: as recuperações médias obtidas pioram após a correção com Bi ou Te. A comparação das recuperações médias sem e com a padronização interna para os materiais de referência certificados e amostras permite observar o efeito negativo da utilização de Bi (Tabelas 40 a 42) ou Te (Tabelas 43 a 45). Cabe ressaltar que a correção dos sinais de Se com Bi foi a única situação onde não se verificou a perda da qualidade dos resultados analíticos (Tabela 42).

Tabela 40: Comparação dos resultados obtidos para Mn, sem e com a utilização de Bi como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Bi)		
	Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	6,7 $\pm$ 0,8	12	108	5 $\pm$ 2	40	81
A	11 $\pm$ 1	9,1	95	9 $\pm$ 1	11	76
B	4,1 $\pm$ 0,7	17	114	3,3 $\pm$ 0,5	15	116
C	3,2 $\pm$ 0,8	25	112	3,1 $\pm$ 0,6	19	82
D	4,9 $\pm$ 0,8	16	100	3,8 $\pm$ 0,5	13	71
E	9 $\pm$ 1	11	95	8 $\pm$ 1	12	70
Média	-	-	104 $\pm$ 8	-	-	83 $\pm$ 17

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 25 pg Mn(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$): 6,2 (5,6-6,7).

Tabela 41: Comparação dos resultados obtidos para Ni, sem e com a utilização de Bi como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Bi)		
	Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
A	<LQ ^b	-	92	<LQ ^b	-	76
B	<LQ ^b	-	104	<LQ ^b	-	120
C	12 $\pm$ 2	17	94	9 $\pm$ 2	22	85
D	<LQ ^b	-	108	<LQ ^b	-	73
E	13 $\pm$ 1	7,8	97	10 $\pm$ 3	30	75
Média	-	-	99 $\pm$ 7	-	-	86 $\pm$ 20

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 100 pg Ni(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$): 3,1 (2,8-3,6).

Tabela 42: Comparação dos resultados obtidos para Se, sem e com a utilização de Bi como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Bi)		
	Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	86 $\pm$ 6	7,0	108	83 $\pm$ 4	4,8	104
A	22 $\pm$ 4	18	115	25 $\pm$ 2	8,0	110
B	49 $\pm$ 4	8,2	85	44 $\pm$ 4	9,1	88
C	58 $\pm$ 5	8,6	110	54 $\pm$ 4	7,4	110
D	42 $\pm$ 6	14	110	40 $\pm$ 5	12	113
E	131 $\pm$ 8	6,1	90	127 $\pm$ 6	4,7	102
Média	-	-	103 $\pm$ 12	-	-	105 $\pm$ 9

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 250 pg Se(IV) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Se ($\mu\text{g L}^{-1}$): 80 (73-86).

Tabela 43: Comparação dos resultados obtidos para Mn, sem e com a utilização de Te como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Te)		
	Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	6,3 $\pm$ 0,9	14	102	5 $\pm$ 2	40	81
A	10 $\pm$ 2	20	94	4 $\pm$ 1	25	64
B	5,2 $\pm$ 0,8	15	105	3 $\pm$ 1	33	85
C	3,9 $\pm$ 0,8	20	89	3,1 $\pm$ 0,8	26	68
D	3,8 $\pm$ 0,6	16	116	4 $\pm$ 1	25	69
E	8 $\pm$ 1	12	91	6 $\pm$ 2	33	83
Média	-	-	100 $\pm$ 10	-	-	75 $\pm$ 9

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 25 pg Mn(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$): 6,2 (5,6-6,7).

Tabela 44: Comparação dos resultados obtidos para Ni, sem e com a utilização de Te como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Te)		
	Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	<LQ ^b	-	-	<LQ ^b	-	-
A	<LQ ^b	-	90	<LQ ^b	-	70
B	<LQ ^b	-	100	<LQ ^b	-	92
C	13 $\pm$ 2	15	112	8 $\pm$ 3	37	80
D	<LQ ^b	-	88	<LQ ^b	-	80
E	11 $\pm$ 1	9,1	90	9 $\pm$ 2	22	69
Média	-	-	96 $\pm$ 10	-	-	78 $\pm$ 9

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 100 pg Ni(II) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$): 3,1 (2,8-3,6).

Tabela 45: Comparação dos resultados obtidos para Se, sem e com a utilização de Te como padrão interno.

Amostra	Sem correção			Com correção (Te)		
	Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)	Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	Rec ^a (%)
CRM ^c	74 $\pm$ 6	8,1	93	87 $\pm$ 10	11	109
A	25 $\pm$ 4	16	105	29 $\pm$ 5	17	83
B	44 $\pm$ 3	6,8	87	46 $\pm$ 7	15	70
C	53 $\pm$ 5	9,4	97	50 $\pm$ 9	18	93
D	39 $\pm$ 6	15	115	33 $\pm$ 5	15	77
E	126 $\pm$ 8	6,3	87	115 $\pm$ 16	14	83
Média	-	-	97 $\pm$ 11	-	-	86 $\pm$ 14

^aRec: a porcentagem de recuperação foi obtida após a adição de 250 pg Se(IV) nas amostras e comparando-se o valor recomendado para o material de referência certificado (CRM); ^b<LQ: menor do que o limite de quantificação; ^cValor recomendado para Se ($\mu\text{g L}^{-1}$): 80 (73-86).

Fig. 52: Sinais de absorbância obtidos na presença de soro sangüíneo.

4. Conclusões

“Há um dom acima de todos os outros que torna o homem único entre os animais [...] o imenso prazer de exercer e aprimorar sua habilidade [...] A descoberta é uma dupla relação de análise e síntese juntas. Como análise, ela sonda à procura do que já existe [...] Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa transcenda o esqueleto simples fornecido pela natureza.”

Jacob Bronowski

A utilização de padrão interno em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) é uma estratégia que pode melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos, obtidos sob condições compromissadas. Para isso, a escolha do padrão interno deve ser feita cuidadosamente, considerando parâmetros físico-químicos que estão associados à formação dos átomos no estado fundamental. O elemento a ser utilizado como padrão interno e os analitos devem apresentar comportamentos eletrotérmicos similares. Além disso, parâmetros como modificador químico, as temperaturas de pirólise e de atomização devem ser semelhantes.

A comparação de diferentes elementos testados como padrão interno por meio dos gráficos de correlação incorporou parâmetros quantitativos ao processo de seleção do melhor candidato. O estabelecimento de valores de referência para a perfeita correlação entre a variação dos sinais do analito e do padrão interno ($a = 0$, $b = 1$, $r = 1$) permitiu avaliar o desempenho de diferentes elementos e classificá-los em função da proximidade com a situação ideal. O processo de seleção de padrão interno ficou mais robusto com a utilização dos gráficos de correlação.

A determinação simultânea de Cd e Pb impôs temperaturas baixas como condições compromissadas para as etapas de pirólise ($\sim 600\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de atomização ($\sim 1700\text{ }^{\circ}\text{C}$). Além disso, o modificador químico $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ apresentou um desempenho superior àquele verificado para a mistura Pd + Mg. Desta forma, ficou estabelecida uma condição pouco adequada para a maioria dos elementos candidatos à padrão interno, que não devem estar presentes na amostra em quantidades detectáveis. Desta maneira, verificou-se que há poucos elementos

semelhantes aos elementos de interesse (Cd e Pb), quando os parâmetros físico-químicos foram utilizados como critério de seleção preliminar (Tabela 7). Os elementos mais promissores foram Ag, Bi e Tl, sendo que a inclusão do In como candidato a padrão interno ratificou a impossibilidade de utilizar para essa finalidade um elemento com características eletrotérmicas diferentes daquelas apresentadas pelos analitos. Como a condição para a determinação de Cd e Pb é muito peculiar a esses elementos, o desempenho dos elementos testados como padrão interno foi prejudicado, visto que a atomização deles não ocorreu nas melhores condições possíveis. Somente a utilização de Ag como padrão interno melhorou a exatidão dos resultados analíticos obtidos para Cd e Pb. Por outro lado, o desempenho de Ag como padrão interno foi afetado pelo modificador químico e pelas interferências químicas causadas pelos concomitantes presentes na amostra. Além desses parâmetros, a temperatura de pirólise também pode afetar a padronização interna, visto que é nessa etapa que ocorre a formação dos precursores atômicos. Isso ficou evidente quando o desempenho do Bi como padrão interno para Pb^{52,53} foi comparado com aquele obtido sob condições compromissadas para a determinação simultânea de Cd e Pb. Desta forma, fica evidente que a eficiência de um padrão interno em ETAAS é dependente do modificador químico, da temperatura de pirólise e da amostra a ser analisada.

As condições compromissadas para a determinação simultânea de Mn, Ni e Se em soro sangüíneo são adequadas para que a atomização de vários elementos ocorra de maneira satisfatória. O modificador químico selecionado (Pd + Mg) estabilizou de maneira semelhante os analitos (Mn, Ni e Se) e vários candidatos a padrão interno (Bi, Ge, In, Sb, Sn e Te). A similaridade entre o comportamento eletrotérmico desses elementos (Tabela 7) e as condições compromissadas permitiram que uma quantidade maior de elementos fosse testada como padrão interno. Apesar disso, somente Bi, Sn e Te apresentaram um desempenho satisfatório, mostrando que os testes experimentais são um complemento indispensável à análise dos parâmetros físico-químicos encontrados na literatura. Os subsídios definitivos para a seleção de padrão interno somente são obtidos no laboratório. Na presença da amostra de soro sangüíneo, os resultados obtidos não justificaram a utilização de Bi ou Te como padrão interno. Os efeitos interferentes causados pelos concomitantes e pelo acúmulo de

resíduos carbonáceos no interior do atomizador não foram minimizados para nenhum dos elementos de interesse.

A padronização interna em ETAAS, com a finalidade de melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos, é uma estratégia tão complexa quanto os efeitos interferentes que se pretende corrigir: são necessários mais estudos para compreender melhor como a utilização de uma condição de compromisso afeta os processos de atomização que não ocorrem sob as melhores condições, bem como mais informações a respeito das interferências físicas e químicas causadas por amostras complexas, analisadas por ETAAS após uma simples etapa de diluição.

5. Perspectivas futuras

A partir dos resultados observados no presente trabalho, verificou-se a possibilidade de prosseguir os estudos envolvendo a padronização interna em ETAAS explorando os seguintes aspectos:

1. Estudos para verificar o potencial da padronização interna na determinação de suspensões.
2. Explorar a utilização de Ag como padrão interno multielementar para Cd e Pb para outras amostras.
3. Explorar a utilização de Ni como padrão interno para Mn, sob condições compromissadas de aquecimento.
4. Explorar a utilização de Sn como padrão interno para Se, sob condições compromissadas de aquecimento.
5. Estudos sistemáticos para avaliar a capacidade de minimizar efeitos interferentes causados por íons inorgânicos e compostos orgânicos, tais como lipídeos, açúcares e gorduras.

6. Referências bibliográficas

1. G. M. Hieftje, The two sides of Analytical Chemistry, *Anal. Chem.* 57 (1985) 257A-267A.
2. H. Malissa, Analytical Chemistry: kitchenmaid or lady of science – deduction versus induction, *Fresenius J. Anal. Chem.* 326 (1987) 324-330.
3. K. Cammann, Analytical Chemistry – today's definition and interpretation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992) 812-813.
4. M. Valcárcel, Analytical Chemistry – today's definition and interpretation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992) 814-816.
5. M. Valcárcel, "Princípios de Química Analítica", Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, Espanha, 1999, p. 58-64.
6. M. Thompson, Uncertainty in an uncertain world, *Analyst* 120 (1995) 117N-118N.
7. Analytical Methods Committee, Uncertainty of measurement: implications of its use in Analytical Science, *Analyst* 120 (1995) 2303-2308.
8. W. Horwitz, Uncertainty – a chemist's view, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 785-794.
9. K. Byrjalsen, J. Kristiansen, J. M. Christensen, Trends in quality assurance of metal determination in clinical chemistry, *Analyst* 123 (1998) 7-12.
10. M. Thompson, Towards a unified model of errors in analytical measurement, *Analyst* 125 (2000) 2020-2025.
11. M. Valcárcel, A. Rios, The Hierarchy and Relationships of Analytical Properties, *Anal. Chem.* 65 (1993) 781A-787A.
12. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, "Fundamentals of Analytical Chemistry", Saunders College Publishing, New York, USA, 6ª edição, 1992, p. 1-33.
13. F. A. Settle (ed), "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, USA, 1997, p. 73-80.
14. R. Lobinski, Z. Marczenko, "Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. XXX, Spectrochemical Trace Analysis for Metals and Metalloids", Elsevier, Amsterdã, Holanda, 1996, p. 105-108.
15. L. Cuadros-Rodríguez, L. Gámiz-Gracia, E. M. Almansa-López, J. M. Bosque-Sendra, Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach, *Trends in Anal. Chem.* 20 (2001) 620-635.
16. W. B. Barnett, V. A. Fassel, R. N. Kniseley, An experimental study of internal standardization in analytical emission spectroscopy, *Spectrochim. Acta* 25B (1970) 139-161.
17. A. S. Al-Ammar, R. M. Barnes, Correction for non-spectroscopic matrix effects in inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy by internal standardization using spectral lines of the same analyte, *Spectrochim. Acta* 53B (1998) 1583-1593.

18. J. M. Mermet, J. C. Ivaldi, Real-time standardization for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using a custom segmented-array charge coupled device detector, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 795-801.
19. J. C. Ivaldi, J. F. Tyson, Real-time internal standardization with an axially-viewed inductively coupled plasma for optical emission spectrometry, *Spectrochim. Acta* 51B (1996) 1443-1450.
20. R. Kucharkowski, D. Jankova, E. Herrmann, A. John, Contributions to accuracy improvement of simultaneous ICP atomic emission spectrometry using multi-line measurements of analyte and internal standard elements. Applications for the analysis of permalloys, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 532-539.
21. F. Vanhaecke, H. Vanhoe, R. Dams, C. Vandecasteele, The use of internal standard in ICP-MS, *Talanta* 39 (1992) 737-742.
22. C. J. Amarasiriwardena, N. Lupoli, V. Potula, S. Korrick, H. Hu, Determination of the total arsenic concentration in human urine by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison of the accuracy of three analytical methods, *Analyst* 123 (1998) 441-445.
23. F. De Ridder, R. Pintelon, J. Schoukens, J. Navez, L. Andre, F. Dehairs, An improved multiple internal standard normalisation for drift in LA-ICP-MS measurements, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1461-1470.
24. B. Welz, M. Sperling, "Atomic absorption spectrometry", 3ª edição, Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 1999.
25. D. J. Butcher, J. Sneddon, "Chemical Analysis, Vol. 149, A Practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry", John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, 1998.
26. F. Wach, GFAAS - A mature technique for a modest investment, *Anal. Chem.* 67 (1995) 51A-55A.
27. N. H. Bings, A. Bogaerts, J. A. C. Broekaert, Atomic Spectroscopy, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2691-2712.
28. B. Welz, Atomic absorption spectrometry – pregnant again after 45 years, *Spectrochim. Acta* 54B (1999) 2081-2094.
29. J. L. Burguera, M. Burguera, On-line flow injection-atomic spectroscopic configurations: road to practical environmental analysis, *Quim. Anal.* 20 (2002) 255-273.
30. S. Muniategui, D. Prada, Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000, *Talanta* 56 (2002) 1-51.
31. E. M. D. Flores, J. N. G. Paniz, A. P. F. Saidelles, E. I. Muller, A. B. Costa, Direct cadmium determination in sediment samples by flame atomic absorption spectrometry using multivariate calibration procedures, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 769-774.
32. A. Gaspar, H. Berndt, Beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry: a new flame method, *Anal. Chem.* 72 (2000) 240-246.

33. L. A. Ellis, D. J. Roberts, Chromatographic and hyphenated methods for elemental speciation analysis in environmental media, *J. Chromatogr.* 774A (1997) 3-19.
34. A. K. Das, R. Chakraborty, Electrothermal atomic absorption spectrometry in the study of metal ion speciation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 1-17.
35. J. F. Tyson, High-performance, flow-based, sample pre-treatment and introduction procedures for analytical atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 169-178.
36. D. L. Tsalev, V. I. Slaveykova, L. Lampugnani, A. D'Ulivo, R. Georgieva, Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry – advances, anticipations and reality, *Spectrochim. Acta* 55B (2000) 473-490.
37. J. M. Harnly, The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 137-146.
38. W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carnrick, The stabilized temperature platform furnace, *At. Spectros.* 2 (1981) 137-145.
39. C. Vandecasteele, C. B. Block, "Modern methods for trace element determination", John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra, 1993.
40. K. S. Farah, J. Sneddon, Developments and applications of multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Appl. Spectros. Rev.* 30 (1995) 351-371.
41. B. E. Erickson, Graphite furnace AAS, *Anal. Chem.* 72 (2000) 543A-546A.
42. J. Sneddon, B. D. Farah, K. S. Farah, Multielement atomic absorption spectrometry: a historical perspective, *Microchem. J.* 48 (1993) 318-325.
43. J. M. Harnly, T. C. O'Haver, B. Golden, W. R. Wolf, Background-corrected simultaneous multielement atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 51 (1979) 2007-2014.
44. L. R. P. Butler, A. Strasheim, Multiple element atomic absorption analysis, *Spectrochim. Acta* 21 (1965) 1207-1216.
45. S. B. Smith Jr., J. A. Blasi, F. J. Feldman, Analysis of zinc die cast by atomic absorption spectroscopy utilizing an internal standard, *Anal. Chem.* 40 (1968) 1525-1529.
46. F. J. Feldman, J. A. Blasi, The use of an internal standard to eliminate interferences in hemoglobin iron determinations by atomic absorption, *Clin. Chem.* 15 (1969) 790.
47. F. J. Feldman, J. A. Blasi, S. B. Smith Jr., Determination of major constituents by atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1095-1097.
48. F. J. Feldman, Internal standardization in atomic emission and absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 42 (1970) 719-724.

49. J. Pybus, F. J. Feldman, G. N. Bowers Jr., Measurement of total calcium in serum by atomic absorption spectrophotometry, with use of a strontium internal reference, *Clin. Chem.* 16 (1970) 998-1007.
50. T. Takada, K. Nakano, Evaluation and application of internal standardization in atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization, *Anal. Chim. Acta* 107 (1979) 129-138.
51. T. Takada, K. Nakano, Internal standard method in flame atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta* 36B (1981) 735-745.
52. B. Radziuk, N. P. Romanova, Y. Thomassen, Evaluation of internal standardisation in electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Commun.* 36 (1999) 13-16.
53. K. G. Fernandes, M. de Moraes, J. A. G. Neto, J. A. Nóbrega, P. V. Oliveira, Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the determination of lead in wines by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analyst* 127 (2002) 157-162.
54. Perkin-Elmer, "SIMAA 6000: Installation, maintenance and system description", Release 1.2, Überlingen, Alemanha, 1995.
55. P. N. Keliher, C. C. Wohlers, Echelle grating spectrometers in analytical spectrometry, *Anal. Chem.* 48 (1976) 333A-340A.
56. J. W. Olesik, Echelle grating spectrometers for inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a review of basic equations and operating principles, *Spectros.* 14 (1999) 36-41.
57. P. R. M. Correia, E. Oliveira, P. V. Oliveira, Simultaneous determination of manganese and selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 57 (2002) 527-535.
58. R. Cornelis, B. Heinzow, R. F. M. Herber, J. M. Christensen, O. M. Paulsen, E. Sabbioni, D. M. Templeton, Y. Thomassen, M. Vahter, O. Vesterberg, Sample collection guidelines for trace-elements in blood and urine, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1575-1608.
59. K. S. Subramanian, Determination of metals in biofluids and tissues: Sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta* 51B (1996) 291-319.
60. D. L. Tsalev, "Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice, Vol. 1, Analytical Aspects and Health Significance", CRC Press, Boca Raton, EUA, 1984.
61. P. W. Atkins, "Physical Chemistry", 5ª ed, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1994, p. 877-881.
62. G. D. Rayson, J. A. Holcombe, Spatially resolved Arrhenius determinations within a graphite tube atomizer, *Spectrochim. Acta* 38B (1983) 987-993.
63. C.-H. Chung, Atomization mechanism with Arrhenius plots taking the dissipation function into account in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 56 (1984) 2714-2720.

64. B. V. L'vov, "Atomic Absorption Spectrochemical Analysis", Adam Hilger, Londres, Inglaterra, 1970, p. 131.
65. B. V. L'vov, Interpretation of atomization mechanisms in electrothermal atomic absorption spectrometry by analysis of the absolute rates of the processes, *Spectrochim. Acta* 52B (1997) 1-23.
66. Perkin-Elmer, "The THGA Graphite Furnace: Techniques and Recommended Conditions", Release 1.2, Überlingen, Alemanha, 1995.
67. B. Welz, G. Schlemmer, J. R. Mudakavi, Palladium nitrate – magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry – Part 5. Performance for the determination of 21 elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1257-1271.
68. K. G. Fernandes, M. de Moraes, J. A. G. Neto, J. A. Nóbrega, P. V. Oliveira, Padronização interna em espectrometria de absorção atômica, *Química Nova* 26 (2003) 249-252.
69. P. R. M. Correia, C. S. Nomura, P. V. Oliveira, Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas, *Analytica* 5 (2003) 52-59.
70. D. A. Bass, J. A. Holcombe, Mass-spectral investigation of mechanisms of lead vaporization from a graphite surface used in electrothermal atomizers, *Anal. Chem.* 59 (1987) 974-980.
71. D. C. Hassell, V. Majidi, J. A. Holcombe, Temperature programmed static secondary ion mass-spectrometric study of phosphate chemical modifiers in electrothermal atomizers, *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 105-108.
72. C. Eloi, J. D. Robertson, V. Majidi, Investigation of high-temperature reactions on graphite with rutherford backscattering spectrometry - intercalation of cadmium, lead and silver with phosphate modifier, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 217-222.
73. W. B. Rowston, J. M. Ottaway, Determination of noble metals by carbon furnace atomic absorption spectrometry – Part 1. Atom formation processes, *Analyst* 104 (1979) 645-659.
74. R. W. Fonseca, J. McNally, J. A. Holcombe, Mechanisms of vaporization for silver and gold using electrothermal atomization, *Spectrochim. Acta* 48B (1993) 79-89.
75. W. Frech, E. Lundberg, A. Cedergren, Investigations of some methods used to reduce interference effects in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Prog. Anal. Spectros.* 8 (1985) 257-370.
76. J. Carroll, N. J. Miller-Ihli, J. M. Harnly, T. C. O'Haver, D. Littlejohn, Comparison of sodium-chloride and magnesium-chloride interferences in continuum source atomic absorption spectrometry with wall, platform and probe electrothermal atomization, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 533-538.
77. M. M. Chaudhry, D. Mouillere, B. J. Ottaway, D. Littlejohn, J. E. Whitley, Investigation of chloride salt decomposition and preatomization interferences in electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 701-706.

78. D. J. Halls, Speeding up determinations by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analyst* 109 (1984) 1081-1084.
79. M. Hoenig, A. Cilissen, Electrothermal atomic absorption spectrometry – fast or conventional programs, *Spectrochim. Acta* 48B (1993) 1003-1012.
80. D. J. Halls, Analytical minimalism applied to the determination of trace-elements by atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 169-175.
81. N. Hadgu, W. Frech, Performance of side-heated graphite atomizers in atomic absorption spectrometry using tubes with end caps, *Spectrochim. Acta* 49B (1994) 445-457.
82. M. Hoenig, O. Dheere, Evaluation of end-capped tubes for transverse heated graphite atomizer electrothermal atomic absorption spectrometry, *Mikrochim. Acta* 119 (1995) 259-264.
83. M. Hoenig, A. Cilissen, Performances and practical applications of simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry: the case of the SIMAA 6000, *Spectrochim. Acta* 52B (1997) 1443-1449.
84. T. M. Mahmood, K. W. Jackson, Wall-to-platform migration in electrothermal atomic absorption spectrometry. 1. Investigation of the mechanism of chloride interference on thallium, *Spectrochim. Acta* 51B (1996) 1155-1162.
85. H. C. Qiao, T. M. Mahmood, K. W. Jackson, Mechanism of the action of palladium in reducing chloride interference in electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta* 48B (1993) 1495-1503.
86. H. C. Qiao, K. W. Jackson, Mechanism of modification by palladium in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta* 46B (1991) 1841-1859.
87. G. Schlemmer, B. Welz, Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta* 39B (1984) 1157-1165.
88. N. Campillo, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Selenium determination in biological fluids using Zeeman background correction electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Biochem.* 280 (2000) 195-200.
89. N. Campillo, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction, *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 207-215.
90. N. Campillo, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Direct determination of copper and zinc in cow milk, human milk and infant formula samples using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 46 (1998) 615-622.
91. P. Vinas, N. Campillo, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of molybdenum, aluminum, chromium and manganese in milk, *Anal. Chim. Acta* 356 (1997) 267-276.