**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MANGANÊS/SELÊNIO E
COBRE/ZINCO EM SORO SANGÜÍNEO POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA**

**Paulo Rogério Miranda Correia
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ORIENTADORA
PROF^a Dr^a ELISABETH DE OLIVEIRA**

**SÃO PAULO
10/05/2001**

Que estranha é a sina que cabe a nós, mortais! Cada um de nós está aqui para uma temporada; com que propósito não se sabe [...] Os ideais que têm iluminado meu caminho, e repetidamente me têm renovado a coragem para enfrentar a vida com ânimo, são a bondade, a beleza e a verdade.

Albert Einstein
The world as I see it (1931)

*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

*Aos meus orientadores Elisabeth e Pedro,
responsáveis 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

À Dr^a Elisabeth de Oliveira pela orientação, amizade e apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pela orientação, pelo exemplo de ética, de respeito e de obstinação para conseguir transformar sonhos em realidade.

A assessoria científica da FAPESP que, desde a concepção desse projeto de pesquisa, tem contribuído para que o objetivo final seja atingido plenamente.

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

Ao Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz, pela apreciação crítica e contribuições ao trabalho e ao texto final da dissertação.

Ao Dr. Lúcio Agnes, pela amizade e por ter contribuído aceitando participar do Exame de Qualificação.

Ao Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, meu “tio” científico, pela amizade, pela oportunidade de dois excelentes cursos na UFSCar 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 convivência durante os últimos dois anos.

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

Aos meus pais, por suportarem discussões bioquímicas e químicas mesmo sem compreender nada.

À Melissa, minha eterna companheira, pela paciência, apoio e carinho irrestritos durante todos os momentos.

À Fernanda Yuri pela amizade e pelas discussões sobre a beleza que existe quando observamos as reações bioquímicas responsáveis pela vida.

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

A 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 da Química Analítica.

Aos amigos do LEEAA, pela convivência harmoniosa, pelas discussões científicas e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Tan, pela ajuda nessa difícil parte final de preparação da dissertação.

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 eficiente oferecido durante o Mestrado.

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

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

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP pelo apoio financeiro que permitiu minha participação em dois relevantes encontros científicos.

A FAPESP por acreditar no presente projeto e pelo auxílio financeiro fornecido durante os dois últimos anos (Processo 99/00913-7).

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

Muito obrigado.

Sumário

Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	viii
Glossário	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
1.1 Os elementos essenciais traço nos sistemas biológicos	7
1.2 Determinação de cobre, manganês, selênio e zinco em soro sangüíneo e sangue total por espectrometria de absorção atômica	11
2. Objetivo	18
3. Parte experimental	19
3.1 Instrumentação	19
3.2 Reagentes e soluções	20
3.3 Amostras de soro sangüíneo	21
3.4 Procedimento	22
3.4.1 Procedimento analítico para a determinação simultânea de manganês e selênio	23
3.4.1.1 Estudo das curvas de temperatura de pirólise e atomização	23
3.4.1.2 Estudo das curvas de temperatura de pirólise e atomização na presença de soro sangüíneo	25
3.4.1.3 Estudo do tempo de pirólise	26
3.4.1.4 Estudo da decomposição da matéria orgânica	26
3.4.1.5 Estudo da temperatura e do tempo da etapa de pirólise orgânica	27
3.4.1.6 Preparação das soluções analíticas de referência e das amostras	27

3.4.2 Procedimento analítico para a determinação simultânea de cobre e zinco	28
3.4.2.1 Estudo das curvas de temperatura de pirólise e atomização	28
3.4.2.2 Estudo do fluxo de argônio durante a atomização	29
3.4.2.3 Estudo do tempo de pirólise	29
3.4.2.4 Verificação da precisão dos sinais analíticos obtidos para cobre e zinco	30
3.4.2.5 Preparação das soluções analíticas de referência e das amostras	30
4. Resultados e discussão	32
4.1 Considerações gerais	32
4.2 Avaliação do comportamento das fontes de radiação utilizadas	34
4.3 Determinação simultânea de manganês/selênio por SIMAAS	36
4.3.1 Estudo do comportamento térmico de manganês e selênio	37
4.3.1.1 Ausência de modificador químico	37
4.3.1.2 Pd como modificador químico	39
4.3.1.3 Mistura Pd+Mg como modificador químico	41
4.3.1.4 Rh como modificador químico	45
4.3.1.5 Mistura Rh+Mg como modificador químico	48
4.3.1.6 Mistura W+Rh como modificador químico permanente	51
4.3.2 Estudo do comportamento térmico de manganês e selênio na presença da amostra de soro sanguíneo	52
4.3.3 Estudo do tempo de duração da etapa de pirólise	57
4.3.4 A decomposição da matéria orgânica presente no soro sanguíneo	59
4.3.5 Metodologia para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sanguíneo	64
4.4 Determinação simultânea de cobre/zinco por SIMAAS	67
4.4.1 Curvas de temperatura de pirólise e atomização para cobre e zinco	69
4.4.2 Utilização de mini fluxo de argônio durante a etapa de atomização	71

4.4.3 Influência do tempo da etapa de pirólise na redução da sensibilidade do zinco	73
4.4.4 Estudo da precisão do sinal de absorbância empregando as estratégias de perda controlada de sinal analítico	74
4.4.5 Metodologia para a determinação simultânea de cobre e zinco em soro sangüíneo	76
5. Conclusão	81
6. Referências bibliográficas	85

Lista de figuras

Figura 1. Variação da condição fisiológica de um organismo humano em função da concentração dos elementos essenciais traço.

Figura 2. Fluxograma da preparação das soluções analíticas de referência e das amostras, seguindo o princípio do frasco único.

Figura 3. Intensidade das linhas de emissão selecionadas para manganês e selênio em função do tempo de operação (*cps: contagens por segundo, i: corrente de operação da lâmpada).

Figura 4. Intensidade das linhas de emissão selecionadas para cobre e zinco em função do tempo de operação (*cps: contagens por segundo, i: corrente de operação da lâmpada).

Figura 5. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na ausência de modificador químico ($T_a=1900^{\circ}\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=200^{\circ}\text{C}$ durante o estudo da atomização).

Figura 6. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando Pd como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 7. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando Pd como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 8. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença de $20\ \mu\text{g}$ Pd como modificador químico ($T_a=2300^{\circ}\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1300^{\circ}\text{C}$ durante o estudo da atomização).

Figura 9. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando a mistura de Pd+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 10. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando a mistura de Pd+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 11. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Pd+Mg utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1100°C; temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 12. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença de 20 µg Pd + 10 µg Mg(NO₃)₂ como modificador químico (Ta=2300°C durante o estudo de pirólise; Tp=1100°C durante o estudo da atomização).

Figura 13. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando Rh como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 14. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando Rh como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 15. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Rh utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1200°C; temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 16. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença 10 µg Rh como modificador químico (Ta=2300°C durante o estudo de pirólise; Tp=1200°C durante o estudo da atomização).

Figura 17. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando a mistura de Rh+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 18. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando a mistura de Rh+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 19. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Rh+Mg utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1550°C; temperatura de atomização: 2200°C).

Figura 20. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença 10 µg Rh + 10 µg Mg como modificador químico ($T_a=2300^{\circ}\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1550^{\circ}\text{C}$ durante o estudo da atomização).

Figura 21. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio utilizando a mistura de W+Rh como modificador químico ($T_a=2200^{\circ}\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1100^{\circ}\text{C}$ durante o estudo da atomização).

Figura 22. Curvas de temperatura de pirólise para 10 pg de Mn^{2+} em 0,10% m/v Triton X-100 e 1,0% v/v HNO_3 , na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Figura 23. Curvas de temperatura de pirólise para 100 pg de Se^{4+} em 0,10% m/v Triton X-100 e 1,0% v/v HNO_3 , na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Figura 24. Variação do sinal de fundo em função do tempo de patamar da etapa de pirólise (Temperatura de pirólise = 1200°C , Temperatura de atomização = 2300°C).

Figura 25. Variação da precisão dos sinais analíticos obtidos para manganês e selênio, em função da variação do tempo de patamar da etapa de pirólise.

Figura 26. Variação do desvio padrão relativo de 10 conjuntos de dados experimentais obtidos em triplicata, na ausência da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$.

Figura 27. Variação do desvio padrão relativo de 10 conjuntos de dados experimentais obtidos em triplicata, na presença da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$.

Figura 28. Curva analítica de referência para o manganês.

Figura 29. Curva analítica de referência para o selênio.

Figura 30. Curvas de temperatura de pirólise para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,01% m/v Triton X-100 e 0,1% v/v HNO_3 .

Figura 31. Curvas de temperatura de atomização para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,01% m/v Triton X-100 e 0,1% v/v HNO_3 .

Figura 32. Magnitude dos sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em função da variação do fluxo de argônio utilizado durante a etapa de atomização ($T_p = 200^{\circ}\text{C}$, $T_a = 2300^{\circ}\text{C}$).

Figura 33. Magnitude dos sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em função da variação do fluxo de argônio utilizado durante a etapa de atomização ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2300^\circ\text{C}$).

Figura 34. Magnitude dos sinais de cobre e zinco em função do tempo de patamar da pirólise: sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,1% v/v HNO_3 ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2000^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 50 \text{ ml min}^{-1}$).

Figura 35. Sinais de absorbância integrada obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2300^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 0 \text{ ml min}^{-1}$).

Figura 36. Sinais de absorbância integrada obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2300^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 50 \text{ ml min}^{-1}$).

Figura 37. Perda de sinal analítico provocada pelas estratégias adotadas (* valor aproximados de concentração de zinco e cobre em soro sanguíneo de pessoas saudáveis).

Figura 38. Curva analítica de referência para o cobre.

Figura 39. Curva analítica de referência para o zinco.

Lista de tabelas

Tabela 1. Requisitos instrumentais e operacionais necessários para atender as condições STPF e suas conseqüências.

Tabela 2. Características analíticas de alguns métodos descritos na literatura para a determinação mono elementar de cobre, manganês, selênio e zinco em amostras de sangue, por ETAAS.

Tabela 3. Teores aproximados de cobre e zinco no sangue total e no plasma sangüíneo de pessoas saudáveis.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais utilizados durante os estudos envolvendo a detecção simultânea de cobre/zinco e manganês/selênio.

Tabela 5. Modificadores químicos estudados para a determinação simultânea de manganês e selênio.

Tabela 6. Programa de aquecimento utilizado para obtenção das curvas de temperatura de pirólise e atomização para manganês e selênio.

Tabela 7. Programa de aquecimento utilizado para obtenção das curvas de temperatura de pirólise e atomização de cobre e zinco.

Tabela 8. Absorbância integrada para manganês e selênio obtidos na ausência de solução analítica e modificador químico.

Tabela 9. Comparação do desempenho dos modificadores químicos selecionados na presença da amostra de soro sangüíneo.

Tabela 10. Resultado do teste de adição e recuperação realizado na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Tabela 11. Programa de aquecimento utilizado para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo por SIMAAS.

Tabela 12. Resultados da análise de amostras de soro sangüíneo e do material de referência certificado e recuperação de manganês e selênio.

Tabela 13. Programa de aquecimento do atomizador utilizado para a determinação simultânea de cobre e zinco em soro sangüíneo.

Tabela 14. Resultados da análise de amostras de soro sangüíneo e do material de referência certificado e verificação da recuperação de cobre e zinco.

Glossário

AAS: do inglês, Atomic Absorption Spectrometry

FAAS: do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry

ETAAS: do inglês, Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

SIMAAS: do inglês, Simultaneous Atomic Absorption Spectrometry

STPF: do inglês, Stabilized Temperature Platform Furnace

HCL: do inglês, Hollow Cathode Lamp

SIMAAC: do inglês, Simultaneous Multielement Atomic Absorption Continuum Source Spectrometer

THGA: do inglês, Transversely Heated Graphite Atomizer

EDL: do inglês Electrodeless Discharge Lamp

Resumo

Neste trabalho, desenvolveu-se dois procedimentos para a determinação multielementar de Mn/Se e Cu/Zn em amostras de soro sangüíneo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea (SIMAAS). O pré-tratamento da amostra foi minimizado e seguiu o princípio do frasco único (diluição da amostra no próprio copo do amostrador automático). Devido a baixa concentração de Mn e Se esperada, as amostras de soro sangüíneo foram diluídas somente 4 vezes para 0,10% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃. O tratamento térmico eficiente da amostra foi obtido através da utilização de uma mistura oxidante (15%v/v H₂O₂+1%v/v HNO₃), que auxiliou na oxidação dos concomitantes orgânicos, e com a utilização da mistura 20µg Pd+10µg Mg como modificador químico, que permitiu aplicar 1200°C durante a etapa de pirólise, favorecendo a eliminação dos concomitantes inorgânicos. Os limites de detecção obtidos foram (Mn=0,43µg/l e Se=3,3µg/l) e as massas características (Mn=11,6pg e Se=91,7pg) permitiram realizar essa determinação utilizando 30µl de soro sangüíneo. As elevadas concentrações de Cu e Zn no soro sangüíneo permitiram diluir as amostras em 80 vezes para 0,01% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO₃, reduzindo a complexidade das soluções resultantes. A utilização de 700°C durante a etapa de pirólise favoreceu a perda parcial do elemento mais volátil (Zn) e o mini-fluxo de 50 ml/min de Ar durante a atomização reduziu o sinal de ambos os elementos, viabilizando a determinação de Cu/Zn por SIMAAS. Os limites de detecção (Cu=4,95µg/l e Zn=0,045µg/l) e as massas características (Cu=26,5pg e Zn=2,7pg) permitiram realizar essa determinação utilizando 20µl de soro sangüíneo.

Abstract

Two analytical procedures were developed for the multi-element determination of Mn/Se and Cu/Zn in serum samples by simultaneous atomic absorption spectrometry (SIMAAS). The sample pre-treatment was reduced to a dilution step with a mixture of Triton X-100 and HNO_3 and carried out directly at the autosampler cup. Due to the low concentration of Mn and Se the serum samples were diluted 4 times to 0.10% w/v Triton X-100 + 1.0% v/v HNO_3 . The improvement of the thermal pre-treatment was achieved through the oxidizing mixture (15%v/v H_2O_2 +1%v/v HNO_3) for collaborate with the organic concomitants decomposition and the mixture of 20 μg Pd+10 μg Mg as chemical modifier to allow 1200°C as pyrolysis temperature, enhancing the inorganic concomitants elimination. The limits of detection founded (Mn=0,43 $\mu\text{g/l}$ and Se=3,3 $\mu\text{g/l}$) and the characteristic masses (Mn=11,6pg and Se=91,7pg) allowed the simultaneous determination of these elements using only 30 μl of sample. The high Cu and Zn concentration in serum allowed the use of a high dilution factor (1:80) to 0.01% w/v Triton X-100 + 1.0% v/v HNO_3 , reducing the complexity of the diluted samples. The selection of 700°C as pyrolysis temperature ensured the partial lose of the most volatile element (Zn) and the argon mini-flow (50 ml/min) during the atomization step reduced the signal for both elements, becoming feasible the Cu/Zn determination by SIMAAS. The detection limits founded (Cu=4,95 $\mu\text{g/l}$ and Zn=0,045 $\mu\text{g/l}$) and the characteristic masses (Cu=26,5pg e Zn=2,7pg) allowed the simultaneous determination of these elements using only 20 μl of sample.

1. Introdução

“Atomic absorption spectrometry (AAS) is a spectroanalytical procedure for the qualitative detection and quantitative determination of elements employing the absorption of optical radiation by free atoms in the gaseous state².”

Bernhard Welz

Passados quase 50 anos da proposta inicial de Sir Alan Walsh¹, a espectrometria de absorção atômica (AAS) é, hoje em dia, uma técnica analítica consagrada, muito bem estabelecida e utilizada na determinação de elementos metálicos, semi metálicos e não metálicos em diversos tipos de amostra².

A proposta de Walsh consistia na utilização de uma chama de baixa temperatura (1900 a 2700°C), para promover a transformação dos íons ou moléculas dos elementos presentes na amostra em átomos livres no estado gasoso, os quais poderiam interagir com um feixe de radiação específico, absorvendo-o parcialmente. A utilização desse fenômeno para fins analíticos foi possível uma vez que a atenuação do feixe de radiação é proporcional a população de átomos no estado fundamental presente no atomizador que, por sua vez, é proporcional a concentração do elemento de interesse na amostra.

O trabalho pioneiro com as idéias fundamentais da FAAS, publicado por Walsh em 1955¹, despertou o interesse de Boris L'vov que quatro anos depois, lança a proposta da espectrometria de absorção atômica com a utilização de um atomizador eletrotérmico (ETAAS)³. Durante a década de 60, L'vov e seus colaboradores verificaram o comportamento de mais de 40 elementos, utilizando um tubo de grafite como atomizador, obtendo limites de detecção entre 0,01pg e 10pg². Entretanto, mesmo com esse destacado desempenho e os primeiros estudos teóricos para o estabelecimento dos princípios dessa técnica, a ETAAS não despertou grande interesse no seu início. Alguns dos motivos que podem justificar essa resistência com relação a

absorção atômica com atomização em tubo de grafite foram os resultados analíticos ruins obtidos para amostras reais e a complexidade instrumental do sistema originalmente proposto por L'vov.

O desenho do tubo de grafite empregado como atomizador foi alterado diversas vezes e, em 1965, Hans Massmann deu a contribuição mais significativa, simplificando drasticamente o aparato instrumental². As simplificações propostas vieram acompanhadas de uma mudança nas condições de atomização, considerando que o forno de Massmann era menos isotérmico do que aquele originalmente proposto por L'vov. Os limites de detecção encontrados por Massmann eram 10 vezes piores do que aqueles obtidos por L'vov. A introdução de um fluxo de gás inerte no interior do tubo reduzia o tempo de residência da nuvem atômica, diminuindo a sensibilidade. Adicionalmente, a taxa de aquecimento do tubo de grafite era menor do que aquela proporcionada pela atomização com arco e, esses dois fatos combinados, tornavam o forno de Massmann pouco atraente para a realização de medições analíticas.

Na tentativa de tornar o tubo de grafite mais isotérmico durante a atomização, L'vov propôs a inserção de uma plataforma de grafite no interior do forno de Massmann. A amostra, introduzida sobre essa plataforma, é aquecida independentemente, por irradiação a partir do aquecimento do gás inerte pelas paredes do tubo. Nessa condição, a nuvem atômica é formada numa atmosfera mais quente do que a superfície da plataforma, minimizando interferências na fase vapor. Os resultados obtidos mostraram ser útil a inserção da plataforma de grafite que, posteriormente, passou a ser conhecida como plataforma de L'vov. Desta forma, foi possível obter uma condição próxima da isothermicidade temporal, melhorando o forno de Massmann².

A utilização de grafite pirolítico, que possui um arranjo de átomos de carbono mais organizado, também colaborou para a melhoria dos resultados analíticos, considerando que a difusão das soluções através da superfície da plataforma foi drasticamente reduzida².

Adicionalmente, L'vov sugeriu, que a área integrada dos sinais de absorbância transientes fosse empregada para fins analíticos, a fim de minimizar os efeitos provocados pela matriz nos processos de atomização⁴.

A construção de um tubo de grafite aquecido transversalmente e com contatos integrados foi proposta por Frech em 1986⁵. O gradiente de temperatura, que se estabelece no eixo axial do tubo aquecido transversalmente, é muito menor do que aquele verificado para os atomizadores com aquecimento longitudinal⁶. A isothermicidade espacial no interior do tubo, obtida com o aquecimento transversal, permitiu reduzir interferências na fase vapor, obter sinais de absorbância mais simétricos e reduzir o efeito de memória. A combinação da plataforma de L'vov com o aquecimento transversal gerou um atomizador isotérmico temporal e espacialmente.

A atenuação do feixe de radiação que passa através do atomizador, devido a absorção por parte dos átomos no estado fundamental, também pode ocorrer por causa de outros fatores como a absorção molecular e o espalhamento de radiação. Como não existe nenhuma maneira de se medir a atenuação do feixe de radiação devido exclusivamente a absorção atômica, é necessário medir a absorção total e a absorção devido a processos não específicos. Ao longo do desenvolvimento instrumental, surgiram quatro técnicas para se realizar essas medições e a correção da atenuação do feixe de radiação:

- através medições de absorção próximas ao comprimento de onda analítico;
- através da utilização de fonte contínua, como a lâmpada de deutério;
- através da aplicação de pulsos de corrente elevada à fonte de radiação;
- através da utilização de um campo magnético, provocando o efeito Zeeman.

Entre todas as opções acima, a correção de sinal de fundo por efeito Zeeman é a mais eficiente, permitindo a correção adequada dos sinais de absorbância, mesmo na presença de matrizes complexas^{7,8}.

Minimizar ou até eliminar os concomitantes presentes nas amostras é fundamental para se obter uma condição analítica adequada. Para isso, é necessário elaborar um programa de aquecimento adequado para o atomizador, que deve contemplar as seguintes etapas: secagem, para a evaporação do solvente e eliminação de concomitantes voláteis; pirólise, para eliminação dos concomitantes menos voláteis; atomização e limpeza do tubo de grafite. É durante a etapa de pirólise que pretende-se eliminar grande parte dos concomitantes presentes na matriz, e esse processo torna-se mais eficiente quanto maior for a temperatura aplicada. Entretanto, para não provocar perdas do elemento a ser analisado durante a etapa de pirólise, deve-se respeitar a volatilidade do analito ao se estabelecer a temperatura de pirólise. A proposta de utilização de uma substância química, adicionada juntamente com a alíquota da solução da amostra, capaz de aumentar a estabilidade térmica do analito ou reduzir a estabilidade térmica dos concomitantes presentes na matriz, foi feita por Richard D. Ediger, em 1975⁹. A utilização dessas substâncias, chamadas de modificador químico, tornou-se um requisito importante para melhorar a qualidade dos resultados analíticos obtidos através da análise por ETAAS.

Todos os progressos instrumentais introduzidos após a proposta do forno de Massmann, melhoraram sensivelmente as condições de atomização e a aceitação da ETAAS. A consolidação dessas alterações, que garantiam um ambiente mais isotérmico ao atomizador, veio com a proposta de Walter Slavin, que propôs as condições STPF para assegurar uma condição analítica adequada, permitindo obter procedimentos mais sensíveis e livres de interferência¹⁰. As condições STPF são um conjunto de pré requisitos instrumentais e experimentais que traduziu, na prática, as idéias de L'vov quanto a isothermicidade do atomizador (Tabela 1). Foi somente a partir de 1981, ano que Slavin lança essa proposta, que a ETAAS ganha força como

técnica analítica, tornando-se uma opção atraente para se realizar análise química de elementos em baixas concentrações. Após 22 anos do artigo de L'vov, propondo a atomização eletrotérmica³, a ETAAS atinge sua maturidade e começa a ser largamente empregada em laboratórios de rotina, além de despertar maior interesse por parte da comunidade científica^{11,12}. Atualmente, essa técnica vem sendo utilizada para determinações de metais, semi metais e não metais em níveis de traço e ultra traço em diversos tipos de amostras, sobretudo em materiais biológicos de interesse clínico¹³⁻¹⁵.

Tabela 1. Requisitos instrumentais e operacionais necessários para atender as condições STPF e suas conseqüências.

Condições STPF	Resultado obtido
Tubo de grafite com plataforma de L'vov	Ambiente temporalmente isotérmico
Sinais de absorbância registrados em área	Minimizar as variações cinéticas do processo de atomização
Atomizador construído com grafite pirolítico	Redução de perdas por difusão através da parede do atomizador
Aquecimento transversal do tubo de grafite	Ambiente espacialmente isotérmico
Correção da radiação de fundo por efeito Zeeman	Redução das interferências químicas e espectrais
Utilização de modificador químico	Aumento da eficiência do tratamento térmico durante a pirólise
Interrupção do fluxo de gás durante a atomização	Aumento do tempo de residência da nuvem atômica na zona de observação
Elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite	Redução de interferência na fase vapor e formação de uma densa nuvem atômica
Eletrônica adequada para permitir a integração do sinal transiente	Permitir registro dos sinais em tempo real

A alta especificidade, seletividade e relativa facilidade de operação são algumas das características favoráveis que ajudaram a espectrometria de absorção atômica a se estabelecer entre as técnicas espectroanalíticas, bem como a manter o seu espaço ao lado de técnicas multielementares como a espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). Em diversas situações, a ETAAS pode ser complementar a ICP-OES, quando as concentrações dos elementos de interesse são inferiores aos limites de quantificação alcançados por essa técnica¹⁶, ou ao ICP-MS, nos casos em que as determinações são fortemente afetadas pelas interferências isobáricas¹⁷.

A crescente demanda por metodologias analíticas que determinem um grande número de elementos presentes em baixas concentrações nas amostras, implicando em maior velocidade analítica e diminuição dos custos, intensificaram as pesquisas no sentido de viabilizar os espectrômetros de absorção atômica multielementares.

O caráter mono elementar, característico da AAS, sempre foi considerado como uma desvantagem dessa técnica, limitando a frequência analítica dos procedimentos. Desde o seu surgimento, várias pesquisas se desenvolveram no sentido de viabilizar a detecção multielementar. As primeiras investidas, que ocorreram durante a década de 60, resultaram no desenvolvimento de lâmpadas de cátodo oco (HCL) multielementares.

Durante a década de 70, essas lâmpadas multielementares foram utilizadas em sistema de multi-canais¹⁸. Paralelamente a esse desenvolvimento, J. M. Harnly propõe, em 1979, um espectrômetro de absorção atômica dotado de uma fonte contínua de radiação (SIMMAC), para realizar determinações multielementares e simultâneas¹⁹. Uma lâmpada de xenônio foi empregada no lugar das lâmpadas de cátodo oco, e o sistema ótico era composto por um policromador Echelle. Apesar do desenvolvimento de um espectrômetro com fonte contínua de radiação estar ocorrendo há mais de duas décadas, não existe nenhum equipamento comercial disponível até o

momento²⁰⁻²². Todo esse desenvolvimento atingiu seu apogeu no final da década de 80, quando tornaram-se comercialmente disponíveis os primeiros espectrômetros de absorção atômica multielementares^{20,22}.

Comparativamente às outras técnicas espectroscópicas multielementares, como ICP-OES e ICP-MS, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea (SIMAAS) não apresenta o mesmo desempenho em termos de velocidade analítica. Os equipamentos disponíveis no mercado permitem a determinação de até seis elementos simultaneamente²². Além das limitações instrumentais, os longos programas de aquecimento ainda são um fator que prejudica a frequência analítica. Entretanto, mesmo para as determinações simultâneas de apenas dois elementos, o custo total da análise é, no mínimo, reduzido pela metade. O consumo de reagentes de alta pureza e de amostra é minimizado e torna-se possível ampliar o número de resultados analíticos obtidos com o mesmo tubo de grafite.

1.1 Os elementos essenciais traço nos sistemas biológicos

“Trace metals play important roles in biological processes, both as essential components and toxins. Monitoring body status of trace metals thus has become an important function of many clinical, industrial, and government laboratories²⁵.”

J. Savory

Os elementos metálicos, semi metálicos e não metálicos, nas formas iônica, livre ou associados a outras espécies químicas, estão presentes nos sistemas biológicos e desempenham importantes papéis na manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos^{23,24}. Alguns desses elementos são considerados essenciais pois algumas patologias são consequência da baixa ingestão desses nutrientes, e os sintomas são minimizados ou até eliminados através de suplementação alimentar²⁵.

Atualmente, cerca de 25 elementos são reconhecidos como essenciais para a vida humana, sendo que 11 deles (Co, Cu, Cr, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V e Zn) estão presentes em baixas concentrações (menos de 7g em um indivíduo de 70 kg) e, por isso, são denominados elementos traço²⁵⁻²⁷. A maioria desses elementos são cofatores de enzimas que participam de importantes eventos biológicos, tais como o transporte de oxigênio, o combate à formação de radicais livres, a organização estrutural de macromoléculas e a atividade hormonal^{27,28}. Em contraste com esse papel benéfico dos elementos essenciais à saúde, é possível contrapor a toxicidade e os efeitos maléficos de elementos como cádmio, chumbo e mercúrio^{24,29}.

Normalmente, os intervalos de concentração que determinam a carência, a essencialidade e a toxicidade desses elementos são extremamente curtos³⁰ (Figura 1). Por esse motivo, é necessário conhecer a concentração dos elementos essenciais em amostras de interesse clínico com adequada precisão e exatidão, o que exige o aprimoramento dos procedimentos analíticos dedicados a esse tipo de análise.

Figura 1. Variação da condição fisiológica de um organismo humano em função da concentração dos elementos essenciais traço³⁰.

A determinação de cobre, manganês, selênio e zinco em amostras de soro sangüíneo enquadra-se nesse contexto. Esses elementos são relevantes do ponto de vista nutricional e vários estudos na literatura apresentam informações a respeito de distúrbios provocados pela carência desses elementos no organismo^{23,25-29,31,32}.

O cobre é um importante componente de várias enzimas que participam de importantes reações metabólicas. Dois exemplos são as enzimas superóxido dismutase (*SOD*), presente no compartimento citossólico, e citocromo oxidase, que participa do processo de fosforilação oxidativa. A deficiência de cobre pode provocar neutropenia e um tipo específico de anemia, que não responde à suplementação de ferro³². Em crianças, há o aparecimento de anormalidades durante a formação do esqueleto e retardamento no crescimento ósseo^{23,26,31,32}. A presença de elevados teores de cobre no organismo implica na redução da quantidade de vitamina A na corrente sangüínea e em problemas renais, que em casos agudos, podem levar a doença de Wilson²³.

O manganês é o metal que compõe a enzima *SOD* no compartimento mitocondrial, que integra o sistema de defesa do organismo contra os radicais livres. Além de prejudicar o combate contra essas espécies, a deficiência desse metal no organismo, está relacionada com distúrbios no crescimento, devido a problemas na formação dos ossos e no sistema nervoso²³. Em condições de carência aguda, verifica-se o aparecimento de osteoporose, acromegalia (deficiência na produção do hormônio do crescimento) e esclerose múltipla^{23,27}. O excesso de manganês no organismo reduz a absorção de ferro provocando anemia, além de afetar os sistemas nervoso central, reprodutivo e respiratório. Em situações de intoxicação crônica, verifica-se o desenvolvimento de psicoses maníaco depressivas, a redução da resistência a infecções pulmonares e a maior incidência de abortos espontâneos²³.

A ação antioxidante do selênio indica que este elemento pode desempenhar um relevante papel na prevenção do câncer. Essa ação

preventiva ocorre principalmente devido ao papel desempenhado pelo selênio no fígado, local onde compostos carcinogênicos são metabolizados através de um conjunto de oxidases. Adicionalmente, o selênio é um metal importante para a produção bioquímica da enzima glutathione peroxidase (GPx), responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, evitando a proliferação dos radicais livres nos organismos vivos^{23,25,29}. A deficiência de selênio, além de aumentar a probabilidade do desenvolvimento de certos tipos de câncer, está associada à uma patologia observada na China, devido aos baixos níveis de selênio no solo daquela região: a doença de Keshan, que é uma cardiomiopatia verificada em crianças e mulheres jovens, que atinge aproximadamente 10 milhões de pessoas. A administração de suplementos alimentares ricos em selênio é o mais eficiente modo de prevenção dessa patologia²⁵. O selênio também afeta a toxicidade do mercúrio, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos desse metal. A redução da toxicidade do mercúrio pode ser atribuída a ação antioxidante do selênio, que minimiza os danos causados pelos radicais livres gerados pelo mercúrio nas membranas celulares²⁹. O selênio presente em elevadas quantidades no organismo torna-se um elemento tóxico. Devido a sua similaridade química com o enxofre, o selênio pode interferir no metabolismo desses compostos, sendo incorporado em aminoácidos como cisteína, cistina e metionina, alterando a estrutura de proteínas como a queratina, resultando em mudanças estruturais nos cabelos e unhas. Em casos agudos de intoxicação, verifica-se distúrbios relacionados com o sistema nervoso central, além de afetar o fígado, retardar o crescimento e levar a infertilidade²³.

O zinco é um cofator indispensável que compõe mais de 100 enzimas presentes nos mamíferos, como a enzima *SOD* presente no citossol. Ele está envolvido nos processos de divisão celular, crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico. Sintomas da deficiência de zinco estão relacionados principalmente ao aumento da suscetibilidade à infecções, devido a menor ação das células T do sistema imunológico, que são responsáveis pela resposta biológica do organismo contra células

infectadas, fungos, parasitas e tecidos estranhos^{23,25,26,30,31}. Elevadas doses de zinco podem causar hiperglicemia, além de afetar o intestino e o fígado²³.

1.2 Determinação de cobre, manganês, selênio e zinco em soro sangüíneo e sangue total por espectrometria de absorção atômica

“Despite the large selection of sensitive analytical techniques for trace element determinations in biological samples, AAS still occupies the place of a routine analytical technique in this field for up to 30 analyte elements³³.”

D. L. Tsalev

Embora existam várias técnicas analíticas instrumentais capazes de realizar a determinação de elementos metálicos, semi metálicos e não metálicos em amostras biológicas de interesse clínico, a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama e, sobretudo, com atomização eletrotérmica, são as mais amplamente utilizadas^{2, 33-36}.

Vários procedimentos analíticos dedicados à determinação mono elementar de cobre, manganês, selênio e zinco em soro sangüíneo e sangue total por ETAAS, vem sendo apresentados nos últimos anos (Tabela 2)³⁷⁻⁶².

Tabela 2. Características analíticas de alguns métodos descritos na literatura para a determinação mono elementar de cobre, manganês, selênio e zinco em amostras de sangue, por ETAAS.

	Fração do sangue	Modificador químico	ΔT^* (s)	T_p^{**} (°C)	LOD*** ($\mu\text{g l}^{-1}$)	m_o^{****} (pg)	Ref.
Cu	Soro (1:10)	-	118	600	-	-	37
Cu	Soro (1:10)	-	30	600	9,5	114	38
Cu	Soro (1:50)	40 $\mu\text{g NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ +	71	900	60	7	39
	Plasma (1:50)	1 $\mu\text{g Mg}$					

	Fração do sangue	Modificador químico	ΔT^* (s)	T_p^{**} (°C)	LOD^{***} ($\mu g\ l^{-1}$)	m_o^{****} (pg)	Ref.
Mn	Total (1:5)	320 μg NH_4Ac	75	1250	-	5	40
Mn	Soro (1:5)	-	30	1257	-	-	41
Mn	Total (1:4)	3,2 μg Mg	127	1300	0,15	2,4	42
Mn	Total	7 μg Pd		1300	0,6	-	43
Mn	Soro (1:2)	-	134	1100	-	-	44
Se	Soro (1:2)	100 μg Ni	248	1050	5,0	-	45
Se	Soro (1:10)	50 μg Ni	117	1100	2,5	-	46
Se	Soro (1:10)	14 μg Ag	137	800	0,95	23	47
Se	Soro (1:2)	12 μg Ni	92	1200	8,0	34	48
Se	Soro (1:3)	9,5 μg Ag + 8 μg Cu + 3 μg Mg	222	1200	8,15	-	49
Se	Soro (1:3)	6 μg Cu + 3 μg Mg	-	900	-	37	50
	Total (1:12)						
Se	Total (1:4)	35 μg Ir + 16 μg Mg	123	1300	-	35	51
Se	Soro (1:10)	15 μg Pd + 10 μg Mg	112	1200	6,5	-	52
Se	Soro e plasma	4 μg Pd	78	1200	0,8	-	53
Se	Total (1:12)	32 μg Ni	50	1200	14	-	54
Se	Plasma (1:4)	20 μg Pd	103	1100	4,2	-	55
Se	Soro (1:5)	2,5 μg Pd	114	1100	2,6	21,1	56
Se	Soro (1:3)	5 μg Pd + 3 μg Mg	198	1000	2,0	41,2	57
Se	Soro (1:4)	26 μg Ni	118	1100	2,9	32,6	58
Se	Soro (1:4)	50 μg Ni	112	1200	12,0	43	59
	Total (1:4)						
Zn	Soro (1:10)	-	118	600	-	-	37
Zn	Soro (1:100)	-	121	450	-	37	60
Zn	Plasma (1:100)	-	66	400	-	-	61
Zn	Soro (1:20)	-	90	700	60	9	62

* ΔT : tempo do programa de aquecimento, ** T_p : temperatura de pirólise, *** LOD: limite de detecção, **** m_o : massa característica.

Considerando a sensibilidade da ETAAS e a concentração de manganês e selênio no sangue total, soro e plasma sangüíneo (Tabela 3), os fatores de diluição das amostras são freqüentemente inferiores a 10^{40-59} . Geralmente, o pré tratamento dessas amostras é reduzido a uma etapa de diluição com uma mistura de reagentes adequados: um surfactante e ácido nítrico^{40,42,43,48-50,55-59}. Triton X-100 é o surfactante não iônico mais utilizado, visto que ele provoca a ruptura das membranas celulares, permitindo uma homogeneização mais eficiente das amostras de sangue total, plasma e soro sangüíneo^{63,64}. Adicionalmente, ele reduz a tensão interfacial entre a solução e o grafite, melhorando o contato entre a amostra e as paredes do atomizador. A concentração de Triton X-100 na solução final da amostra diluída não deve ultrapassar 0,25% v/v, para evitar a formação de resíduos carbonáceos, bem como a difusão desse reagente pelas paredes do atomizador, fato que pode comprometer a qualidade dos resultados analíticos⁶³.

Considerando a determinação de manganês e selênio, verifica-se que os fatores de diluição empregados são reduzidos. Consequentemente, a solução diluída a ser analisada é bastante complexa e contém uma elevada concentração de componentes orgânicos e inorgânicos. O tratamento térmico da amostra, que ocorre durante a etapa de pirólise, deve ser o mais eficiente possível para tentar reduzir a concentração dessas substâncias antes da atomização. Esse esforço em aumentar a eficiência desse tratamento térmico se reflete no emprego de modificador químico e nos elevados tempos de duração dos programas de aquecimento^{40,42-59}.

O uso de modificador químico é necessário sobretudo na determinação de selênio, para aumentar a estabilidade térmica desse elemento. Desta maneira, é possível elevar a temperatura da etapa de pirólise, tornando mais eficiente a eliminação dos concomitantes presentes nessas matrizes.

O emprego de níquel para estabilizar termicamente o selênio foi um dos primeiros exemplos da utilização de modificador químico⁹. Proposto por Ediger em 1975, verificou-se que na ausência de níquel, ocorriam perdas por

volatilização de selênio durante a etapa de pirólise, caso temperaturas superiores a 200°C fossem empregadas. A adição de 20µg de níquel estabilizou termicamente o selênio até 1300°C, aumentando a eficiência do tratamento térmico empregado durante a etapa de pirólise. Essa estabilização térmica pode ser atribuída a dois fenômenos distintos: a conversão química das espécies voláteis de selênio [$\text{Se}_{(g)}$, $\text{SeO}_{2(g)}$] em compostos intermetálicos Se-C-Ni, e a oclusão física do analito quando se emprega uma grande quantidade de modificador químico^{9,65}.

Tabela 3. Teores aproximados de cobre e zinco no sangue total e no plasma sangüíneo de pessoas saudáveis²³.

Elemento	Teor no sangue total (µg l ⁻¹)	Teor no plasma sangüíneo (µg l ⁻¹)
Cu	1000	800 a 1500
Mn	<10	1
Se	150	70 a 110
Zn	4000 a 7000	700 a 1600

Outra substância largamente empregada para estabilizar termicamente o selênio é o paládio, na ausência e na presença de magnésio^{52,53,55-57}. A utilização de paládio como modificador químico foi difundido quando se verificou que a mistura de 5µg Pd + 3µg Mg(NO₃)₂ estabilizava termicamente 21 elementos⁶⁶. Por esse motivo, a mistura paládio e magnésio é conhecida como modificador químico universal, que é bastante apropriada para procedimentos analíticos multielementares por SIMAAS. O mecanismo de estabilização do selênio pelo paládio também ocorre devido a formação de compostos intermetálicos^{67,68}.

O manganês apresenta elevada estabilidade térmica mesmo na ausência de modificador químico que, nesse caso, tem como principal função diminuir a estabilidade térmica dos concomitantes, reduzindo as interferência

provocadas pela matriz⁴⁰⁻⁴⁴. Para essa finalidade, foram utilizados acetato de amônio⁴⁰ e nitrato de magnésio⁴².

Nas determinações de manganês e selênio, o teor de matéria orgânica nas amostras diluídas é elevado, provocando o acúmulo de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite. Para minimizar esse problema, é comum verificar a utilização de oxigênio ou ar como gás auxiliar para favorecer a oxidação dos concomitantes orgânicos^{49,51,57}. Após a secagem da amostra, introduz-se oxigênio ou ar e eleva-se a temperatura entre 500 a 800°C, antes de se realizar a etapa de pirólise acima de 1000°C. Essa estratégia acelera a deterioração da superfície pirolítica do atomizador, reduzindo sua vida útil. Outra proposta para aumentar a eficiência de oxidação da matéria orgânica consiste na adição de uma pequena alíquota da mistura 15% v/v H₂O₂ + 1% v/v HNO₃ juntamente com a amostra⁵⁹.

A calibração do instrumento nas determinações de manganês e selênio raramente é feita utilizando-se soluções analíticas de referência em meio aquoso, devido a complexidade das soluções diluídas das amostras. Os métodos de adição de padrão^{40,45-47,50-52,54-58} e compatibilização de matriz^{41,42,48,49} são largamente utilizados, apesar de apresentar desvantagens como o tempo necessário para realizar as determinações e a dificuldade de se encontrar amostras com reduzidos teores de manganês e selênio. A utilização de soluções analíticas de referência em meio aquoso somente foi empregada quando paládio foi utilizado como modificador químico para selênio⁵⁹ e após a precipitação de proteínas utilizando ácido tricloroacético⁴⁴.

As metodologias analíticas que realizam as determinações de cobre e zinco por ETAAS utilizam soro ou plasma sanguíneo. Devido a sensibilidade da técnica e aos teores desses elementos nas amostras de interesse (Tabela 3), são utilizados elevados fatores de diluição^{37-39,60-62}. A complexidade das soluções diluídas das amostras a serem analisadas é reduzida, viabilizando a calibração do instrumento utilizando soluções analíticas de referência em meio aquoso³⁷⁻³⁹.

Para viabilizar a determinação de cobre e, sobretudo, zinco por ETAAS, é necessário favorecer a perda controlada dos elementos de interesse para adequar a concentração desses elementos na amostra com a faixa analítica de trabalho. A utilização de modificador químico é dispensável, visto que a solução diluída da amostra não contém concomitantes em concentrações elevadas e que não há a necessidade de aumentar a estabilidade térmica dos elementos de interesse. Adicionalmente, a adição de modificador químico pode levar a introdução de contaminação, que deve ser evitada. Por esse mesmo motivo, o preparo da amostra utilizar a menor quantidade possível de reagentes: nas determinações de zinco, utiliza-se somente água como diluente³⁷⁻³⁹; nas determinações de cobre utiliza-se um surfactante (Triton X-100) e ácido nítrico⁶⁰⁻⁶².

Devido a elevada sensibilidade da ETAAS para as determinações de zinco, além dos elevados fatores de diluição empregados, é necessário provocar uma perda adicional do sinal analítico desse elemento. De acordo com as condições STPF, o fluxo interno de gás inerte deve ser interrompido durante a etapa de atomização. Entretanto, os métodos para determinação de zinco utilizam um pequeno fluxo de argônio durante a atomização, variando entre 25 e 150 ml min⁻¹, a fim de promover a rápida expulsão da nuvem atômica do interior do atomizador^{60,62}.

Métodos multielementares envolvendo a determinação simultânea dos elementos cobre, manganês, selênio e zinco em amostras de interesse clínico ainda são pouco numerosos, indicando que a elaboração desses métodos não consiste somente na adaptação de procedimentos monoelementares já existentes.

Utilizando um espectrômetro com fonte contínua de radiação (SIMAAC)¹⁹, cobre, ferro e zinco foram determinados simultaneamente em amostras de soro sanguíneo⁶⁹. As amostras foram diluídas (1:21) com uma mistura de Triton X-100 + HNO₃ + NH₄NO₃ e a calibração do instrumento foi feita com soluções analíticas de referência em meio aquoso. O programa de aquecimento desenvolvido tem 110 s de duração, utilizou-se 500°C durante a

etapa de pirólise e um pequeno fluxo de argônio (50 ml min^{-1}) foi mantido durante a etapa de atomização.

Outro trabalho desenvolvido com esse espectrômetro envolveu a determinação simultânea de sete metais (Al, Co, Cr, Mn, Mo, Ni e V) em amostras de soro sanguíneo⁷⁰. O preparo das amostras envolveu uma etapa prévia de secagem na presença de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, que atua como modificador químico. O resíduo obtido era reconstituído com um pequeno volume de HNO_3 , gerando uma pré-concentração da amostra de 4 vezes. O programa de aquecimento utiliza 1300°C durante a etapa de pirólise, tem 136 s de duração e um fluxo de 20 ml min^{-1} de argônio foi mantido durante a etapa de atomização.

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea de cobre/zinco e manganês/selênio em soro sanguíneo, por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e detecção simultânea (SIMAAS).

3. Parte experimental

3.1 Instrumentação

Durante todo o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e detecção simultânea (SIMAA-6000), fabricado pela Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA). O equipamento possui policromador com arranjo Echelle, detector de estado sólido composto por um conjunto de 60 fotodiodos, forno de grafite com aquecimento transversal (THGA), corretor de radiação de fundo com efeito Zeeman longitudinal e amostrador automático (modelo AS-72), com capacidade para 40 ou 80 amostras.

As fontes primárias de radiação empregadas durante a execução dos experimentos foram lâmpadas de cátodo oco (HCL) para cobre e manganês, e lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL) para selênio e zinco, todas fabricadas pela Perkin-Elmer.

Os parâmetros instrumentais utilizados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais utilizados durante os estudos envolvendo a detecção simultânea de cobre/zinco e manganês/selênio.

Elemento	λ^* (nm)	i^{**} (mA)	Fenda (nm)	Ti^{***} (s)
Cu	324,7	10	0,7	5
Mn	279,5	20	0,7	5
Se	196,0	290	0,7	5
Zn	213,9	200	0,7	3

* λ : comprimento de onda

** i : corrente de operação da lâmpada

*** Ti : tempo de leitura

Argônio 99,999% v/v (Air Liquide, São Paulo, SP) foi utilizado como gás protetor do tubo de grafite e como gás de purga. A vazão de argônio para proteger a superfície externa do tubo de grafite foi fixada em 200 ml min⁻¹,

conforme recomendação do fabricante. Em todos os programas de aquecimento, um fluxo interno de argônio (gás de purga) foi fixado em 250 ml min⁻¹ durante as etapas de secagem, pirólise e limpeza, sendo interrompido ou reduzido 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 as superfícies internas do tubo de grafite.

3.2 Reagentes e soluções

A água utilizada para preparar as soluções analíticas de referência, dos modificadores químicos e dos reagentes foi destilada e bi-desionizada, em colunas de troca aniônica e catiônica (Permuton, Curitiba, PR) e em um sistema de ultrapurificação Milli Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA), permitindo obter água com elevado grau de pureza (18,2 MΩ cm⁻¹).

O ácido nítrico (Synth, Diadema, SP) utilizado na preparação das soluções analíticas de referência e na diluição das amostras foi purificado em subdestiladores de quartzo (Marconi, Piracicaba, SP).

As soluções estoque contendo 1000 mg l⁻¹ de cobre (CuCl₂), manganês [Mn(NO₃)₂.6H₂O], selênio (SeO₂) e zinco (ZnCl₂) foram preparadas a partir de soluções Tritisol (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. As soluções contidas nas ampolas foram diluídas e o volume foi completado para 1000 ml com água.

Soluções analíticas de referência foram preparadas através de diluições sucessivas das soluções estoque: (1) 10 ng Mn²⁺ ml⁻¹ + 100 ng Se⁴⁺ ml⁻¹ e (2) 25 ng Cu²⁺ ml⁻¹ + 2 ng Zn²⁺ ml⁻¹, ambas em 0,1% v/v de HNO₃. Essas soluções foram utilizadas para a realização dos estudos durante o desenvolvimento das metodologias.

A partir das soluções estoques contendo 1000 mg l⁻¹ de manganês e selênio foram preparadas as seguintes soluções analíticas de referência:

- 2 ng Mn²⁺ ml⁻¹ + 20 ng Se⁴⁺ ml⁻¹;
- 4 ng Mn²⁺ ml⁻¹ + 40 ng Se⁴⁺ ml⁻¹;
- 8 ng Mn²⁺ ml⁻¹ + 80 ng Se⁴⁺ ml⁻¹;

- 16 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 160 ng Se^{4+} ml^{-1} ;
- 32 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 320 ng Se^{4+} ml^{-1} .

A partir das soluções estoque contendo 1000 mg l^{-1} de cobre e zinco foram preparadas as soluções analíticas de referência para calibração do instrumento:

- 1,0 μg Cu^{2+} ml^{-1} + 0,5 μg Zn^{2+} ml^{-1} ;
- 2,0 μg Cu^{2+} ml^{-1} + 1,0 μg Zn^{2+} ml^{-1} ;
- 3,0 μg Cu^{2+} ml^{-1} + 1,5 μg Zn^{2+} ml^{-1} ;
- 4,0 μg Cu^{2+} ml^{-1} + 2,0 μg Zn^{2+} ml^{-1} .

Todas essas soluções foram preparadas em 0,1% v/v HNO_3 , sendo que uma solução de 0,1% v/v HNO_3 na ausência dos elementos de interesse foi preparada e utilizada sempre como branco analítico.

Os modificadores químicos foram preparados a partir dos seguintes reagentes: $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Suprapur, Merck), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Suprapur, Merck) e RhCl_3 (Aldrich, Milwaukee, MA, USA).

Uma mistura oxidante contendo 15% v/v H_2O_2 + 1% v/v HNO_3 , preparada a partir de peróxido de hidrogênio (Synth) e ácido nítrico subdestilado, foi utilizada para a decomposição da matéria orgânica na determinação simultânea de manganês e selênio.

Uma solução surfactante contendo 1,0% m/v Triton X-100 (Merck) foi utilizada na preparação das amostras de soro sangüíneo, para a determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos Nalgene[®] (Nalge Company, Rochester, NY, USA).

3.3 Amostras de soro sangüíneo

As amostras de soro sangüíneo, utilizadas durante as etapas de desenvolvimento dos procedimentos analíticos, foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (LAC-FCF-USP).

A coleta de sangue foi realizada em Vacuntainers[®] e, após 20 minutos à temperatura ambiente, as amostras de sangue eram centrifugadas (2500 rpm, 15 min), obtendo-se o soro sangüíneo como sobrenadante que era transferido para tubos de polipropileno descontaminados. As amostras de soro sangüíneo foram armazenadas sob refrigeração de 4°C por até 1 semana⁷¹.

A exatidão dos métodos analíticos desenvolvidos foi avaliada analisando-se um material de referência certificado (SeronormTM Trace Elements in Serum, Sero AS, Billingstad, Noruega). O material liofilizado foi reconstituído com água de elevado grau de pureza, seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Procedimento

Toda a vidraria, frascos de polipropileno e frascos Nalgene[®] para armazenamento das amostras e soluções, respectivamente, 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 desionizada. 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-desionizada.

O preparo das soluções analíticas de referência, modificadores químicos e a manipulação das amostras 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 único⁷². Com base nesse procedimento, uma alíquota das soluções analíticas ou amostras 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 (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma da preparação das soluções analíticas de referência e das amostras, seguindo o princípio do frasco único.

Para tornar a limpeza do capilar do auto amostrador mais eficiente, uma mistura de 0,1% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 foi adicionada ao frasco de lavagem.

Todas as medidas experimentais foram baseadas na área integrada do sinal de absorbância. Durante todo o desenvolvimento dos métodos para a determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco os resultados foram a média de 3 replicatas, exceto durante os estudos envolvendo as amostras de soro sangüíneo, quando utilizaram-se 5 replicatas.

3.4.1 Procedimento analítico para a determinação simultânea de manganês e selênio

3.4.1.1 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização

Curvas de temperatura de pirólise e de atomização foram obtidas utilizando-se solução analítica de referência contendo $10 \text{ ng Mn}^{2+} \text{ ml}^{-1} + 100 \text{ ng Se}^{4+} \text{ ml}^{-1}$ em 0,1% v/v HNO_3 , na ausência e na presença dos modificadores químicos apresentados na Tabela 5. Nesse estudo, foram dispensados no

interior do tubo de grafite 5 μ l da solução analítica de referência e 10 μ l da solução do modificador químico.

A mistura de 250 μ g W + 200 μ g Rh foi utilizada como modificador químico permanente, obtido a partir da deposição térmica sobre a plataforma integrada do tubo de grafite, de acordo com o procedimento descrito na literatura⁷³.

Tabela 5. Modificadores químicos estudados para a determinação simultânea de manganês e selênio.

Modificador químico		Massa (μ g)			
Pd	5	10	20	40	
Pd+Mg	-	10+10	10+20	10+40	
Rh	5	10	20	-	
Rh+Mg	-	10+10	10+20	10+40	
W+Rh*	250+200	-	-	-	

* Modificador químico permanente

O programa de aquecimento utilizado durante esse estudo está apresentado na Tabela 6.

Na ausência de modificador químico, a curva de temperatura de pirólise foi obtida fixando-se a temperatura de atomização em 1900°C e variando-se a temperatura de pirólise entre 200°C e 1300°C. A curva de temperatura de atomização foi obtida fixando-se a temperatura de pirólise em 200°C e variando-se a temperatura de atomização entre 1500°C e 2200°C.

Na presença dos modificadores químicos Pd ou Pd+Mg, as curvas de temperatura de pirólise foram obtidas fixando-se a temperatura de atomização em 2300°C e variando-se a temperatura de pirólise entre 700°C e 1700°C. As curvas de temperatura de atomização foram obtidas fixando-se a temperatura de pirólise em 1200°C para Pd e 1100°C para Pd+Mg, e variando-se a temperatura de atomização entre 1900°C e 2500°C.

Tabela 6. Programa de aquecimento utilizado para obtenção das curvas de temperatura de pirólise e atomização para manganês e selênio.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão Ar (ml min ⁻¹)	Leitura
Secagem	110	5	20	250	Não
Secagem	130	10	40	250	Não
Pirólise	Tp*	10	20	250	Não
Atomização	Ta**	0	5	0	Sim
Limpeza	2600	1	4	250	Não

Temperatura de amostragem: 20°C

* Tp: temperatura de pirólise

** Ta: temperatura de atomização

Na presença dos modificadores químicos Rh ou Rh+Mg, as curvas de temperatura de pirólise foram obtidas fixando-se a temperatura de atomização em 2300°C e variando-se a temperatura de pirólise entre 900°C e 1700°C. As curvas de temperatura de atomização foram obtidas fixando-se a temperatura de pirólise em 1200°C para Rh e 1550°C para Rh+Mg, e variando-se a temperatura de atomização entre 1900°C e 2500°C.

A curva de temperatura de pirólise para a mistura de 250µg W + 200µg Rh como modificador químico permanente, foi obtida fixando-se a temperatura de atomização em 2200°C e variando-se a temperatura de pirólise entre 500°C e 1600°C. A curva de temperatura de atomização foi obtida fixando-se a temperatura de pirólise em 1100°C e variando-se a temperatura de atomização entre 2000°C e 2200°C.

3.4.1.2 Estudo das curvas de temperatura de pirólise e de atomização na presença de soro sanguíneo

Curvas de temperatura de pirólise foram obtidas na presença de soro sanguíneo diluído 4 vezes e com a adição de 1 ng Mn²⁺ ml⁻¹ + 10 ng Se⁴⁺ ml⁻¹ em 0,10% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO₃. Durante esse estudo, a temperatura de atomização foi fixada em 2200°C para 10 µg Rh ou 10 µg Rh

+ 10 μg Mg e 2300°C quando se utilizou 20 μg Pd ou 20 μg Pd + 10 μg Mg como modificador químico. O intervalo de variação da temperatura de pirólise foi de 800 a 1600°C.

3.4.1.3 Estudo do tempo de pirólise

O tempo do patamar da etapa de pirólise foi estudado para aumentar a eficiência do tratamento térmico aplicado à amostra, antes da etapa de atomização, considerando a elevada concentração dos concomitantes presentes na amostra de soro sangüíneo, mesmo após a diluição.

Variou-se o tempo de patamar entre 5 e 40s, mantendo-se constante a temperatura de pirólise em 1200°C. Esses estudos foram realizados na presença de soro sangüíneo diluído 4 vezes e com a adição de 1 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 10 ng Se^{4+} ml^{-1} em 0,10% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 . A mistura 20 μg Pd + 10 μg Mg foi utilizada como modificador químico. Foram consideradas as variações dos sinais analíticos e dos sinais de fundo para selecionar a melhor condição.

3.4.1.4 Estudo da decomposição da matéria orgânica

Ao longo de sucessivos ciclos de aquecimento com soluções de soro sangüíneo diluído (1:4) verificou-se a formação de um resíduo carbonáceo no interior do tubo de grafite, o que comprometia a vida útil do atomizador. Na tentativa de eliminar esse resíduo, preparou-se uma mistura oxidante contendo 15% v/v H_2O_2 + 1% v/v HNO_3 .

Inicialmente, tentou-se introduzir a mistura oxidante diretamente no copo do auto amostrador juntamente com a amostra, entretanto uma grande quantidade de espuma foi gerada, expulsando parte da solução resultante para fora do recipiente. Devido a esse inconveniente, a introdução da mistura oxidante ocorreu durante o programa de aquecimento do atomizador: 15 μl de soro sangüíneo foram introduzidos no interior do tubo de grafite e, após a secagem, adicionou-se 10 μl da mistura oxidante juntamente com 10 μl de modificador químico e o programa de aquecimento foi executado.

3.4.1.5 Estudo da temperatura e do tempo da etapa de pirólise dos compostos orgânicos

Para aumentar a eficiência de decomposição da matéria orgânica através da utilização da mistura oxidante, uma etapa entre a secagem e a pirólise foi adicionada ao programa de aquecimento. Estudos para selecionar a temperatura mais adequada e para determinar qual o tempo de patamar necessário foram realizados.

A seleção da melhor temperatura de pirólise dos compostos orgânicos foi feita variando-se a temperatura dessa etapa entre 200 e 600°C e mantendo-se o tempo de patamar em 20s. Posteriormente, o melhor tempo de duração dessa etapa foi avaliado variando-se esse parâmetro entre 10 a 60s, mantendo-se a temperatura em 400°C. Foram consideradas as variações dos sinais analíticos e dos sinais de fundo para selecionar as melhores condições.

3.4.1.6 Preparação das soluções analíticas de referência e das amostras

A partir das soluções preparadas através de diluições sucessivas da solução contendo 10 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 100 ng Se^{4+} ml^{-1} em 0,1% v/v de HNO_3 (item 3.2), foram obtidas diariamente soluções de referência analítica para a calibração do instrumento, contendo:

- 0,5 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 5,0 ng Se^{4+} ml^{-1} ;
- 1,0 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 10,0 ng Se^{4+} ml^{-1} ;
- 2,0 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 20,0 ng Se^{4+} ml^{-1} ;
- 4,0 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 40 ng Se^{4+} ml^{-1} ;
- 8,0 ng Mn^{2+} ml^{-1} + 80 ng Se^{4+} ml^{-1} .

O procedimento adotado para preparar essas soluções seguiu o princípio do frasco único. Um volume de 300 μl do branco e de cada uma das soluções analíticas de referência foram introduzidos em diferentes copos do auto amostrador com capacidade de 1200 μl , e diluídas com 900 μl de diluente contendo 0,15% m/v Triton X-100 + 1,5% v/v HNO_3 . O meio resultante das soluções analíticas de referência foi de, aproximadamente,

0,1% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO₃. Essas soluções eram preparadas diariamente, durante o aquecimento das lâmpadas.

O pré-tratamento da amostra foi minimizado e seguiu o mesmo procedimento descrito para as soluções analíticas de referência. Uma alíquota de 30 µl das amostras de soro sangüíneo foi diluída 4 vezes com 90 µl de uma mistura contendo 0,15% m/v Triton X-100 + 1,5% v/v HNO₃. Ao final, obteve-se 120µl de soro sangüíneo diluído (1:4) em, aproximadamente, 0,1% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO₃.

3.4.2 Procedimento analítico para a determinação simultânea de cobre e zinco

3.4.2.1 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização

Curvas de temperatura de pirólise e de atomização foram obtidas utilizando-se solução analítica de referência contendo 25 ng Cu²⁺ ml⁻¹ + 2 ng Zn²⁺ ml⁻¹ em 0,1% v/v de HNO₃, na ausência de modificador químico. Nesse estudo, foram dispensados no interior do tubo de grafite 5 µl de solução, utilizando-se o programa de aquecimento descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Programa de aquecimento utilizado para obtenção das curvas de temperatura de pirólise e atomização de cobre e zinco.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão Ar (ml min ⁻¹)	Leitura
Secagem	110	5	5	250	Não
Secagem	130	5	5	250	Não
Pirólise	Tp*	10	15	250	Não
Atomização	Ta**	0	5	0	Sim
Limpeza	2600	1	4	250	Não

Temperatura de amostragem: 100°C, * Tp: temperatura de pirólise, ** Ta: temperatura de atomização

A curva de temperatura de pirólise foi obtida fixando-se a temperatura de atomização em 2000°C e variando-se a temperatura de pirólise entre 200°C e 1600°C. A curva de temperatura de atomização foi obtida fixando-se a temperatura de pirólise em 700°C e variando-se a temperatura de atomização entre 1400°C e 2400°C.

3.4.2.2 Estudo do fluxo de argônio durante a atomização

Para provocar redução do sinal de absorbância de cobre e de zinco, foi avaliado o efeito do fluxo de argônio durante a etapa de atomização, utilizando-se 5 µl de solução contendo 25 ng Cu²⁺ ml⁻¹ + 2 ng Zn²⁺ ml⁻¹ em 0,1% v/v de HNO₃, e executando-se o programa de aquecimento (Tabela 7) em três diferentes situações: ausência de fluxo de argônio, vazões de argônio iguais a 50 ml min⁻¹ e 250 ml min⁻¹.

Esse estudo foi realizado com dois programas de aquecimento diferentes, aplicando-se 200°C ou 700°C durante a etapa de pirólise e fixando-se a temperatura de atomização em 2300°C. Ao utilizar 200°C como temperatura de pirólise, verificou-se a variação dos sinais analíticos devido exclusivamente ao efeito do fluxo de argônio. Quando a temperatura de pirólise foi fixada em 700°C (temperatura utilizada para provocar a perda de zinco durante a pirólise), foi possível avaliar a variação dos sinais devido a combinação dos processos de perda dos elementos de interesse durante as etapas de pirólise e atomização.

3.4.2.3 Estudo do tempo de pirólise

O tempo do patamar da etapa de pirólise foi estudado para verificar a influência da duração dessa etapa na perda de sinal analítico de zinco, considerando-se a temperatura de pirólise de 700°C.

Variou-se o tempo de patamar entre 5 e 30s, mantendo-se constante a temperatura de pirólise em 700°C. Esses estudos foram realizados utilizando-se 25 ng Cu²⁺ ml⁻¹ + 2 ng Zn²⁺ ml⁻¹ em 0,1% v/v de HNO₃.

3.4.2.4 Verificação da precisão dos sinais analíticos obtidos para cobre e zinco

Após a combinação das estratégias para a redução dos sinais de absorbância de cobre e zinco ($T_p = 700^\circ\text{C}$ e mini fluxo de argônio durante a atomização), foi feito um estudo para verificar a precisão dos resultados introduzindo-se sucessivamente 15 alíquotas de uma solução contendo $25\text{ ng Cu}^{2+}\text{ ml}^{-1} + 2\text{ ng Zn}^{2+}\text{ ml}^{-1}$ em 0,1% v/v de HNO_3 . Durante esse estudo, fixou-se a temperatura de atomização em 2300°C e utilizaram-se duas temperaturas de pirólise diferentes: 200°C , para verificar a precisão dos resultados analíticos na presença do mini fluxo de argônio durante a atomização e 700°C , para avaliar a precisão dos resultados quando a perda dos elementos de interesse ocorreu devido à somatória dos dois efeitos.

3.4.2.5 Preparação das soluções analíticas de referência e das amostras

A partir das soluções preparadas através de diluições sucessivas das soluções estoque contendo 1000 mg l^{-1} de cobre e zinco, foram obtidas soluções de referência analítica para a calibração do instrumento, contendo:

- $12,5\text{ ng Cu}^{2+}\text{ ml}^{-1} + 6,25\text{ ng Zn}^{2+}\text{ ml}^{-1}$;
- $25,0\text{ ng Cu}^{2+}\text{ ml}^{-1} + 12,5\text{ ng Zn}^{2+}\text{ ml}^{-1}$;
- $37,5\text{ ng Cu}^{2+}\text{ ml}^{-1} + 18,75\text{ ng Zn}^{2+}\text{ ml}^{-1}$;
- $50,0\text{ ng Cu}^{2+}\text{ ml}^{-1} + 25,0\text{ ng Zn}^{2+}\text{ ml}^{-1}$.

O procedimento adotado para preparar essas soluções seguiu o princípio do frasco único. Um volume de $20\text{ }\mu\text{l}$ do branco e de cada uma das soluções analíticas de referência previamente preparadas (item 3.2) foram introduzidos em diferentes copos do auto amostrador com capacidade de $1600\text{ }\mu\text{l}$, e diluídas com $1580\text{ }\mu\text{l}$ de diluente contendo 0,01% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 . Essas soluções eram preparadas diariamente, durante o aquecimento das lâmpadas.

O pré-tratamento da amostra foi minimizado e seguiu o mesmo procedimento descrito para as soluções analíticas de referência. Uma alíquota de $20\text{ }\mu\text{l}$ das amostras de soro sanguíneo foi diluída 80 vezes com $1580\text{ }\mu\text{l}$ de

uma mistura contendo 0,01% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO₃. Ao final, obteve-se 1600μl de soro sangüíneo diluído (1:80) contendo, aproximadamente, 0,01% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO₃.

4. 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

4.1 Considerações gerais

O desenvolvimento instrumental resultou em espectrômetros de absorção atômica com detecção simultânea de até 6 elementos²². Os métodos analíticos para determinações simultâneas tentam agregar o caráter multielementar as tradicionais vantagens da ETAAS. A possibilidade de minimizar as etapas de pré tratamento das amostras, reduzindo a exposição do analista a materiais potencialmente infectados; a necessidade de pequena quantidade de amostra para realizar uma determinação e a pequena quantidade de resíduos gerados durante as análises, sobretudo se essas amostras forem preparadas no copo do auto amostrador, são as principais vantagens de se utilizar a ETAAS. Adicionalmente, ao se estabelecer métodos analíticos simultâneos, os custos das análises são reduzidos em pelo menos 50% (quando dois elementos são determinados), o consumo de amostras e reagentes e todos os gastos referentes a operação do equipamento (gás, componentes eletrônicos, energia elétrica e tubo de grafite) também são minimizados.

O sucesso das determinações multielementares por SIMAAS depende do ajuste dos parâmetros experimentais, que podem comprometer a sensibilidade caso não seja estabelecida uma condição analítica adequada para todos os elementos a serem detectados simultaneamente.

A grande maioria dos espectrômetros de absorção atômica disponíveis comercialmente é monoelementar e, conseqüentemente, os procedimentos

analíticos que utilizam a ETAAS permitem a determinação de um único elemento a cada ciclo de aquecimento. Nesses casos, parâmetros experimentais como as temperaturas de secagem, pirólise e atomização, o tipo e a vazão de gás, e o modificador químico mais adequado são selecionados em função do elemento de interesse. Quando se utiliza um equipamento simultâneo, os métodos analíticos devem ser elaborados respeitando-se as características eletrotérmicas de todos os elementos de interesse. Por isso, as temperaturas de pirólise e atomização devem ser escolhidas para obter a melhor condição analítica para a análise multielementar, mesmo que estas condições sejam diferentes daquelas utilizadas nos equipamentos monoelementares. Em geral, a temperatura de pirólise é escolhida com base no elemento mais volátil e a temperatura de atomização com base no elemento menos volátil.

A escolha do modificador químico também é um parâmetro crítico, visto que ele deve colaborar com o aumento da estabilidade térmica de todos os elementos a serem analisados simultaneamente. A utilização da mistura de $5\mu\text{g Pd} + 3\mu\text{g Mg}$ nas determinações multielementares é bastante conveniente, uma vez que é possível estabilizar termicamente até 21 elementos determinados por ETAAS. Por esse motivo, essa mistura é considerada como modificador químico universal⁶⁶.

Uma outra dificuldade das determinações multielementares é o estreito intervalo de concentração utilizado para realizar medidas analíticas, que é uma característica da AAS. Isso exige uma atenção especial do analista, que deve encontrar uma relação conveniente entre sensibilidade, intervalos lineares e fator de diluição da amostra.

Considerando-se as concentrações de cobre, manganês, selênio e zinco no soro sangüíneo de indivíduos saudáveis (Tabela 3) e os estreitos intervalos de concentração para a obtenção das curvas analíticas de referência, foi necessário separar esse elementos em dois grupos diferentes. Para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo por ETAAS, a diluição da amostra foi de, no máximo, 10 vezes^{41,44-50,52,53,56-59}.

Por outro lado, a determinação simultânea de cobre e zinco por ETAAS, usualmente emprega elevados fatores de diluição da amostra de soro sangüíneo, entre 10 e 100 vezes^{37-39,60-62}. Por esse motivo, foram desenvolvidos dois procedimentos analíticos independentes que utilizaram diferentes diluições das amostras, de acordo com a sensibilidade e a concentração no soro sangüíneo.

4.2 Avaliação do comportamento das fontes de radiação utilizadas

Nos estudos envolvendo o desenvolvimento dos métodos analíticos para a determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco, foram utilizadas dois tipos de lâmpadas como fonte de radiação primária. Lâmpadas de cátodo oco (HCL) foram empregadas para cobre e manganês e lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL) para selênio e zinco. Para verificar o comportamento dessas diferentes lâmpadas operando simultaneamente, registrou-se o valor da intensidade dos feixes de radiação em função do tempo, para as lâmpadas de manganês/selênio (Figura 3) e cobre/zinco (Figura 4), durante 8 horas de trabalho.

A análise do gráfico obtido para as lâmpadas de manganês e selênio (Figura 3) permitiu verificar que a intensidade do feixe de radiação da lâmpada de manganês é, aproximadamente, 2,5 vezes maior do que o feixe de radiação da lâmpada de selênio nos comprimentos de onda selecionados. Comparando as variações das intensidades dos feixes de radiação ao longo do tempo, observou-se que as lâmpadas apresentaram um comportamento muito parecido, com ligeira tendência de aumento. Após 7,5 horas de operação, a intensidade do feixe de radiação do manganês (HCL) apresentou uma variação em torno de 13%, enquanto que a do selênio (EDL) aumentou aproximadamente 23%, de acordo com os valores de contagens por segundo.

Figura 3. Intensidade das linhas de emissão selecionadas para manganês e selênio em função do tempo de operação (*cps: contagens por segundo, i: corrente de operação da lâmpada).

Figura 4. Intensidade das linhas de emissão selecionadas para cobre e zinco em função do tempo de operação (*cps: contagens por segundo, i: corrente de operação da lâmpada).

O comportamento das lâmpadas de cobre e zinco (Figura 4) permitiu verificar que a intensidade do feixe de zinco é, aproximadamente, 1,5 vezes maior do que o feixe de cobre, nos comprimentos de onda selecionados. Nesse caso, pode-se verificar que as variações das intensidades dos feixes de radiação em função do tempo foram mais evidentes. Após 7,5 horas de operação, a intensidade do feixe de radiação do cobre (HCL) apresentou uma variação em torno de 6%. Já o feixe de radiação do zinco (EDL) aumentou aproximadamente 41%, de acordo com os valores de contagens por segundo.

As lâmpadas de descarga sem eletrodo são reconhecidas por apresentar um feixe de radiação de alta intensidade e linhas de emissão muito estreitas. Entretanto, verificou-se uma instabilidade acentuada na intensidade dos feixes emitidos em função do tempo. Em geral, o tempo de aquecimento das lâmpadas EDL é muito maior (60 minutos) do que aquele necessário para as lâmpadas de cátodo oco (20 minutos). Cabe ressaltar que esse estudo foi realizado ao longo de um dia inteiro de trabalho e o número de contagens por segundo referente a intensidade do feixe de radiação que atinge o detector foi registrado antes de cada ciclo de aquecimento (I_0).

Essa variação não afeta os resultados analíticos porque a cada ciclo de aquecimento o espectrômetro registra as contagens das fontes de radiação (I_0), antes de introduzir a amostra no interior do tubo de grafite. Assim, as medidas de absorbância não são afetadas, mesmo com o aumento sistemático, mas gradual, da intensidade dos feixes de radiação produzidos pelas lâmpadas EDL. Entretanto, esse estudo permitiu verificar o comportamento das duas lâmpadas (HCL e EDL) operando simultaneamente e que a instabilidade temporal da lâmpada EDL parece ser mais evidente.

4.3 Determinação simultânea de manganês/selênio por SIMAAS

Devido ao reduzido fator de diluição a ser empregado na amostra, os estudos para o desenvolvimento do método analítico para determinação simultânea de manganês e selênio visaram encontrar um programa de aquecimento e um modificador químico que permitissem minimizar a

interferência química provocada pelos concomitantes presentes em alta concentração na amostra diluída. Adicionalmente, é necessário eliminar de maneira eficiente os concomitantes orgânicos, para evitar o acúmulo de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite.

4.3.1 Estudo do comportamento térmico de manganês e selênio

O comportamento térmico, bem como as melhores condições para a determinação monoelementar de manganês e selênio em soro sanguíneo já estão descritas na literatura³⁹⁻⁴⁵. Entretanto, para desenvolver um método analítico que permita a determinação simultânea desses elementos, é necessário estabelecer condições de análise compromissadas, a fim de não comprometer a sensibilidade de nenhum dos elementos a serem determinados. Por isso, um estudo inicial envolvendo a obtenção de curvas de temperatura de pirólise e atomização para manganês e selênio, na ausência e presença de vários modificadores químicos, foi realizado.

Os modificadores químicos utilizados nesse estudo foram selecionados com base naqueles utilizados nas determinações monoelementares de manganês e selênio: Pd^{43,53,55,56}, a mistura Pd + Mg^{52,57} e, adicionalmente, Rh e a mistura Rh+Mg, devido a utilização de Rh e ácido cítrico como modificador químico para a determinação de selênio em tecidos biológicos⁷⁴. Além deles, foi feita a avaliação da mistura de 250 µg W+ 200 µg Rh como modificador químico permanente, que apresentou resultados satisfatórios para a determinação de selênio em amostras de água⁷³.

4.3.1.1 Ausência de modificador químico

Para avaliar o ganho de estabilidade térmica associado ao emprego dos modificadores químicos escolhidos, obtiveram-se curvas de temperatura de pirólise e atomização para manganês e selênio na ausência de modificador químico (Figura 5). Sob essa condição, verificou-se a perda de selênio a partir de 200°C, sendo que a perda de manganês só foi verificada quando se aplicaram temperaturas maiores do que 1100°C.

Figura 5. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na ausência de modificador químico ($T_a=1900^\circ\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=200^\circ\text{C}$ durante o estudo da atomização).

A seleção da temperatura de pirólise, para um procedimento que envolva a detecção simultânea de dois ou mais elementos, deve se feita considerando as características daquele que apresentou a menor estabilidade térmica². Desta forma, na ausência de modificador químico, a temperatura de pirólise a ser selecionada para a detecção simultânea de manganês e selênio não deve ser superior a 200°C . Essa temperatura não permitirá um adequado pré-tratamento térmico da amostra durante a etapa de pirólise, momento em que devem ser eliminados grande parte dos concomitantes da amostra para evitar interferências na fase vapor durante a atomização. Considerando a complexidade da amostra de soro sangüíneo e a sua reduzida diluição para a análise de manganês e selênio, é importante tornar a etapa de pirólise mais eficiente para tentar eliminar, principalmente, a grande quantidade de matéria orgânica presente. Por isso, o emprego de um modificador químico que estabilize termicamente o selênio é indispensável para viabilizar o

desenvolvimento do método simultâneo, apesar do manganês não exigir, do ponto de vista térmico, o emprego de um modificador químico, devido à sua elevada estabilidade térmica (Figura 5). Somente desta forma é possível empregar uma elevada temperatura de pirólise para a determinação simultânea de manganês e selênio.

Uma avaliação da curva de temperatura de atomização permitiu verificar que, na ausência de modificador químico, 1900°C é uma opção conveniente para proporcionar a atomização dos elementos de interesse.

4.3.1.2 Pd como modificador químico

O paládio é proposto como modificador químico para manganês⁴³ e selênio^{53,55,56}. As quantidades recomendadas são bem distintas, visto que para a determinação de manganês foram utilizados 15 µg de Pd⁴³, enquanto que para o selênio foram utilizados 2,5 µg⁵⁶, 4 µg⁵³ e 20 µg⁵⁵ de Pd. Baseando-se nos estudos apresentados na literatura, diferentes massas de Pd foram utilizadas (5, 10, 20 e 40 µg) para obtenção de curvas de temperatura de pirólise de manganês e selênio.

Comparando as curvas de temperatura de pirólise que foram obtidas simultaneamente para manganês (Figura 6) e selênio (Figura 7), verificou-se que o elemento termicamente menos estável é o selênio e, conseqüentemente, a temperatura de pirólise para a detecção simultânea de manganês e selênio deverá ser escolhida em função desse elemento. Para 20 µg de Pd, os sinais de absorbância foram ligeiramente maiores e a temperatura de pirólise para o selênio, que é o elemento mais volátil, foi de 1300°C. Empregando-se 40 µg de Pd, a precisão dos sinais analíticos foi deteriorada. Isso pode ter ocorrido devido ao progressivo acúmulo de modificador químico na superfície da plataforma integrada do tubo de grafite, considerando que a etapa de limpeza não removia completamente essa elevada quantidade de Pd. Adicionalmente, observou-se que havia Mn ocluído nessa massa remanescente de Pd, visto que mesmo sem adicionar solução no interior do tubo de grafite, um sinal de absorbância foi obtido. Foram

necessários 5 ciclos de aquecimento consecutivos sem adicionar solução analítica para conseguir limpar totalmente o atomizador (Tabela 8).

Figura 6. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando Pd como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 7. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando Pd como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Tabela 8. Absorbância integrada para manganês e selênio obtidos na ausência de solução analítica e modificador químico.

Ciclo de Aquecimento	Absorbância integrada (s)	
	Mn	Se
1	0,0603	0,0026
2	0,0137	0,0005
3	0,0028	0,0004
4	0,0013	0,0007
5	0,0014	0,0005

Por esse motivo, optou-se por prosseguir com os testes utilizando 20 μg de Pd como modificador químico (Figura 8). A temperatura de atomização foi escolhida considerando-se a magnitude do sinal obtido e a forma dos picos para manganês e selênio.

Figura 8. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença de 20 μg Pd como modificador químico ($T_a=2300^\circ\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1300^\circ\text{C}$ durante o estudo da atomização).

4.3.1.3 Mistura Pd+Mg como modificador químico

O uso da mistura paládio e magnésio como modificador químico foi consagrado após verificar sua eficiência em aumentar a estabilidade térmica de 21 diferentes elementos metálicos⁶⁶. Isso fez com que a mistura de 5 μg Pd + 3 μg Mg recebesse a denominação de modificador químico universal, condição favorável para a determinação simultânea por SIMAAS. Com este modificador químico, o manganês e o selênio suportaram até 1400°C e 1200°C, respectivamente⁶⁶. Esse modificador químico foi proposto para a determinação de selênio em plasma sanguíneo⁵⁷, porém a adição de magnésio ao paládio para realizar a determinação de selênio é controversa. Por um lado, especula-se que a adição de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ não aumenta a estabilidade térmica do selênio, além de provocar perda de sensibilidade e aumento do sinal de fundo^{55,56}. Por outro lado, a literatura indica que as espécies $\text{SeO}_2(\text{g})$ e $\text{Se}(\text{g})$ podem ser quimicamente adsorvidas por MgO à 500°C, auxiliando no processo de estabilização térmica desse elemento⁷⁵.

Para verificar a influência da quantidade de nitrato de magnésio sobre os sinais obtidos para manganês e selênio, manteve-se fixa a quantidade de Pd (20 μg) e variou-se a quantidade de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ adicionada (10, 20 e 40 μg).

As curvas de temperatura de pirólise obtidas para manganês (Figura 9) e selênio (Figura 10), utilizando as diferentes misturas de Pd+Mg, mostraram que o manganês foi estabilizado termicamente até 1500°C para as três misturas de Pd+Mg avaliadas. Já o selênio apresentou um comportamento menos uniforme e, a melhor estabilização térmica foi obtida com 20 μg Pd + 10 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, quando foi possível empregar 1100°C sem a volatilização desse elemento. As temperaturas de pirólise obtidas com a mistura Pd+Mg foram inferiores àqueles obtidos com o 20 μg Pd, indicando que a presença de magnésio não aumenta a estabilidade dos elementos analisados, concordando com a literatura^{55,56}.

Figura 9. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando a mistura de Pd+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 10. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando a mistura de Pd+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

As massas de 20 μg e 40 μg Mg como componente da mistura Pd+Mg, além de não aumentar a estabilidade térmica dos elementos estudados, gerou um pronunciado aumento do sinal de fundo registrado para o selênio e o manganês (Figura 11). Por esse motivo, optou-se por prosseguir com os testes utilizando apenas a mistura de 20 μg Pd + 10 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico. A temperatura de atomização foi escolhida considerando a magnitude do sinal obtido e a forma dos picos para manganês e selênio. Aumentando sucessivamente a temperatura, verificou-se que 2300°C foi a melhor temperatura de atomização para esse modificador químico (Figura 12).

Figura 11. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Pd+Mg utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1100°C; temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 12. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença de 20 μg Pd + 10 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico ($T_a=2300^\circ\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1100^\circ\text{C}$ durante o estudo da atomização).

4.3.1.4 Rh como modificador químico

O ródio é mencionado na literatura como modificador químico para o selênio, associado ao ácido cítrico⁷⁴ ou como modificador químico permanente⁷³.

As curvas de temperatura de pirólise obtidas para manganês (Figura 13) e selênio (Figura 14), utilizando 5 e 10 μg Rh como modificador químico mostraram que o manganês suportou temperaturas de até 1200°C e o selênio até 1300°C. Nessa situação, a temperatura de pirólise a ser utilizada no método analítico com detecção simultânea deve ser baseada na estabilidade térmica do manganês, visto que este é o elemento mais volátil na presença de Rh como modificador químico.

Ao se utilizar 20 μg Rh observou-se uma redução dos sinais analíticos obtidos para manganês e selênio, além de não estabilizar eficientemente o manganês que apresentou perdas a partir de 900°C.

Figura 13. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando Rh como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 14. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando Rh como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Adicionalmente, ao empregar maiores quantidades de Rh como modificador químico, verificou-se um aumento da intensidade do sinal de fundo registrado para o selênio, enquanto que para o manganês foi observado uma discreta redução (Figura 15). Por esse motivo, optou-se por prosseguir os testes utilizando 10 μg desse modificador.

A temperatura de atomização foi escolhida considerando a magnitude do sinal obtido e a forma dos picos para manganês e selênio. Aumentando sucessivamente a temperatura aplicada, verificou-se que 2200°C é a melhor temperatura de atomização para esse modificador químico (Figura 16).

Figura 15. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Rh utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1200°C; temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 16. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença 10 μg Rh como modificador químico ($T_a=2300^\circ\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1200^\circ\text{C}$ durante o estudo da atomização).

4.3.1.5 Mistura Rh+Mg como modificador químico

A mistura Rh+Mg como modificador químico para manganês e selênio também foi estudada para posterior comparação com os resultados obtidos com a mistura Pd+Mg. Manteve-se fixa a quantidade de Rh (10 μg) e variou-se a quantidade de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ adicionada (10, 20 e 40 μg), a fim de avaliar a influência da quantidade de magnésio sobre os sinais obtidos para manganês e selênio.

As curvas de temperatura de pirólise obtidas para manganês (Figura 17) e selênio (Figura 18), utilizando as diferentes misturas de Rh+Mg como modificador químico, mostram que ambos os elementos suportaram até 1550°C sem a verificação de perdas por volatilização, quando se empregou a mistura de 10 μg Rh + 10 μg Mg. Esse modificador químico foi o que proporcionou a maior estabilização térmica para manganês e selênio,

permitindo a utilização de elevada temperatura de pirólise e favorecendo a eficiência do pré-tratamento térmico.

Figura 17. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês utilizando a mistura de Rh+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

Figura 18. Curvas de temperatura de pirólise para 500 pg de selênio utilizando a mistura de Rh+Mg como modificador químico (temperatura de atomização: 2300°C).

O mesmo comportamento verificado para a mistura Pd+Mg, foi observado para 20 μg Mg e 40 μg Mg como componente da mistura Rh+Mg, que além de não aumentar a estabilidade térmica dos elementos analisados, gerou um pronunciado aumento do sinal de fundo registrado para ambos os elementos (Figura 19).

Figura 19. Sinais de fundo obtidos para as diferentes quantidades de Rh+Mg utilizadas como modificador químico (temperatura de pirólise: 1550°C; temperatura de atomização: 2200°C).

Por esse motivo, optou-se por prosseguir os estudos utilizando a mistura 10 μg Rh + 10 μg Mg. Para esse modificador químico, a temperatura de atomização foi escolhida considerando-se a magnitude do sinal obtido e a forma dos picos para manganês e selênio. Verificou-se que 2200°C é a melhor temperatura de atomização com esse modificador químico (Figura 20).

Figura 20. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio na presença 10 μg Rh + 10 μg Mg como modificador químico ($T_a=2300^\circ\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1550^\circ\text{C}$ durante o estudo da atomização).

4.3.1.6 Mistura W+Rh como modificador químico permanente

A mistura 250 μg W+ 200 μg Rh foi proposta como modificador químico permanente para a determinação de selênio em amostras de água, apresentando bons resultados⁷³.

As curvas de temperatura de pirólise e atomização obtidas para manganês e selênio, utilizando a mistura W+Rh como modificador químico permanente (Figura 21), mostram que o manganês suportou 1100°C e o selênio 1200°C sem verificação de perda de sinal analítico.

Para a otimização da temperatura de atomização deve-se considerar que o filme de carbeto de tungstênio e ródio metálico é removido do tubo de grafite, se o aquecimento envolver temperaturas superiores a 2200°C ⁷³. Considerando essa limitação, observou-se que a melhor temperatura de atomização foi 2200°C . Para temperaturas menores do que 2200°C ,

observou-se a obtenção de picos largos para manganês e selênio, indicando que a cinética de formação dos átomos era lenta nessas temperaturas.

Figura 21. Curvas de temperatura de pirólise para 50 pg de manganês e 500 pg de selênio utilizando a mistura de W+Rh como modificador químico ($T_a=2200^{\circ}\text{C}$ durante o estudo de pirólise; $T_p=1100^{\circ}\text{C}$ durante o estudo da atomização).

Como o modificador químico permanente foi menos eficiente em estabilizar os elementos de interesse ($T_p=1100^{\circ}\text{C}$), quando comparado a 10 μg Rh ($T_p=1200^{\circ}\text{C}$) introduzidos na forma de solução, os estudos posteriores foram interrompidos.

4.3.2 Estudo do comportamento térmico de manganês e selênio na presença da amostra de soro sanguíneo

A maior parte do manganês no soro sanguíneo está associado aos eritrócitos²³; já o selênio apresenta diferentes espécies químicas, que podem ser inorgânicas (selenito ou selenato) ou orgânicas, quando o selênio está associado a resíduos de aminoácidos (selenocisteína e selenometionina)^{55,57}. As propriedades físicas e químicas dessas espécies são diferentes, o que

dificulta a obtenção de uma condição analítica única e adequada para todas as formas de selênio^{55,58,75,76}. O comportamento térmico do selênio está relacionado com a estabilidade da espécie predominante: enquanto selenito e selenato são volatilizados em temperaturas acima de 300°C, a selenometionina se decompõe em temperaturas menores do que 200°C⁷⁵. Entretanto, para a determinação do teor total de selênio em soro sangüíneo, é importante que a estabilização térmica das diversas espécies ocorra na mesma extensão, a fim de se evitar a perda seletiva de selênio por volatilização durante a etapa de pirólise.

Um estudo do comportamento térmico de manganês e selênio na presença de soro sangüíneo diluído (1:4) foi necessário para indicar se as temperaturas de pirólise, obtidas com soluções aquosas podem ser empregadas sem que ocorra redução dos sinais analíticos.

A escolha desse fator de diluição das amostras foi feita considerando um estudo comparativo apresentado na literatura entre soro sangüíneo (1:2) e (1:5), para a determinação de selênio⁵⁶. Com o maior fator de diluição, observou-se uma redução dos problemas associados a amostragem, bem como uma melhora na relação entre o sinal analítico e o sinal de fundo. Entretanto, a diluição (1:5) mostrou-se inadequada para o manganês e, considerando o caráter simultâneo do método, optou-se por utilizar soro sangüíneo diluído (1:4).

A utilização de modificador químico é imperativa para se realizar a determinação de selênio por ETAAS, visto que a temperatura máxima de pirólise obtida na ausência de modificador químico é de, aproximadamente, 200°C^{50-59,75,76}. Nessa situação, as espécies $\text{SeO}_{(g)}$ e SeO_2 são os principais precursores atômicos de selênio e, acima de 130°C, inicia-se a volatilização dessas espécies, provocando a perda de selênio antes da etapa de atomização⁷⁷. Considerando a introdução direta de soro sangüíneo no interior do tubo de grafite, sem o pré-tratamento convencional da amostra, a etapa de pirólise ganha ainda mais importância. É durante esse momento que deve ser eliminada grande parte dos concomitantes presentes em elevadas

concentrações, visto que o fator de diluição da amostra é reduzido (1:4). A otimização da temperatura de pirólise, através da escolha de um modificador químico adequado, favorecerá a vaporização dos concomitantes, reduzindo possíveis interferências na fase condensada e na fase vapor².

A revisão da literatura, permitiu verificar que ainda não há um consenso sobre qual o modificador químico ideal para realizar a determinação de selênio⁷⁸. Os modificadores químicos que apresentaram os melhores resultados em solução aquosa (item 4.3.1), considerando-se exclusivamente a temperatura de pirólise, foram testados na presença da amostra: 20µg Pd, 20µg Pd + 10µg Mg, 10µg Rh e 10µg Rh + 10µg Mg.

As curvas de temperatura de pirólise obtidas na presença de soro sanguíneo para 20µg Pd e 20µg Pd + 10µg Mg e para 10µg Rh e 10µg Rh + 10µg Mg são apresentadas nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Comparando a estabilidade térmica obtida através da utilização de Pd e Pd+Mg, verificou-se que na presença da amostra o manganês apresenta temperaturas de pirólise superiores ao selênio (Figura 22). Os valores de temperatura obtidos simultaneamente para manganês e selênio são semelhantes aos valores descritos na literatura, para a condição monoelementar, utilizando a mesma matriz^{56,57,75}.

A estabilização térmica de manganês e selênio na presença da amostra foi menos pronunciada quando se utilizou os modificadores químicos Rh e Rh+Mg. O manganês apresentou temperaturas de pirólise superior ao selênio (Figura 23) somente na presença de Rh; na presença da mistura Rh+Mg ambos os elementos apresentaram a mesma estabilidade térmica, aproximadamente 1100°C.

A comparação do desempenho dos modificadores químicos estudados, considerando a temperatura de pirólise obtida e a massa característica para manganês e selênio está apresentada na Tabela 9. A escolha das temperaturas de pirólise para a determinação simultânea de manganês e selênio, foi feita considerando o elemento menos volátil na presença do respectivo modificador químico.

Figura 22. Curvas de temperatura de pirólise para 10 pg de Mn^{2+} e 100 pg Se^{4+} em 0,10% m/v Triton X-100 e 1,0% v/v HNO_3 , na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Figura 23. Curvas de temperatura de pirólise para 10 pg de Mn^{2+} e 100 pg de Se^{4+} em 0,10% m/v Triton X-100 e 1,0% v/v HNO_3 , na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Tabela 9. Comparação do desempenho dos modificadores químicos selecionados na presença da amostra de soro sangüíneo.

Modificador químico		Temperatura		m_o^{***} Solução aquosa		m_o^{****} Soro sangüíneo	
Massa (μg)		Tp* ($^{\circ}\text{C}$)	Ta** ($^{\circ}\text{C}$)	(pg)		(pg)	
				Mn	Se	Mn	Se
-	-	250	2000	1,18	20,0	-	-
Pd	20	1200	2300	1,97	34,2	4,07	42,7
Pd+Mg	20+10	1200	2300	1,87	34,6	3,64	37,9
Rh	10	1100	2200	1,49	30,5	3,16	31,4
Rh+Mg	10+10	1100	2200	1,69	28,1	3,34	34,9

* Tp: temperatura de pirólise

** Ta: temperatura de atomização

*** m_o : massa característica estimada utilizando solução de referência analítica em meio aquoso (0,1% v/v HNO_3).

**** m_o : massa característica estimada na presença de amostra de soro sangüíneo diluído (1:4).

O aumento da estabilidade térmica proporcionado pelo uso dos modificadores químicos selecionados, que permitiu a realização de uma etapa de pré tratamento térmico mais eficiente e, conseqüentemente, a remoção de maior quantidade dos concomitantes presentes na amostra, vem acompanhado do aumento da massa característica. Comparando-se os valores de massa característica na ausência e na presença dos modificadores químicos testados em solução aquosa, verifica-se um aumento de até 67% para o manganês (na presença de 20 μg Pd + 10 μg Mg) e de até 73% para o selênio (na presença de 20 μg Pd). A perda de sensibilidade, refletida no aumento da massa característica, é uma desvantagem que parece estar associada ao emprego desses modificadores químicos.

Na presença de soro sangüíneo diluído, os valores de massa característica para o selênio se mantiveram próximos daqueles verificados para a solução analítica de referência; entretanto, os valores para o manganês apresentaram-se ainda mais elevados. Comparando os resultados

obtidos com os valores de massa características encontradas na literatura, verifica-se que os métodos monoelementares possuem melhor sensibilidade: $m_o = 20 \text{ pg}$ para selênio⁵⁷ e $m_o = 2,4 \text{ pg}$ para manganês⁴². Esse fato pode ser uma consequência do ajuste compromissado dos parâmetros instrumentais, a fim de se obter uma condição analítica adequada para tornar viável a determinação simultânea desses elementos.

Um teste de adição e recuperação foi realizado na presença de soro sangüíneo diluído, após o estabelecimento das melhores temperaturas de pirólise para os modificadores químicos selecionados (Tabela 9). Esses resultados estão apresentados na Tabela 10.

Na presença de $20 \mu\text{g Pd}$, $20 \mu\text{g Pd} + 10 \mu\text{g Mg}$, verificou-se que as recuperações para selênio foram satisfatórias, enquanto que a presença de magnésio melhorou a recuperação para o manganês.

Já quando foram utilizados $10 \mu\text{g Rh}$ e $10 \mu\text{g Rh} + 10 \mu\text{g Mg}$, o selênio apresentou recuperações inferiores a 90% e o manganês superiores a 112%.

Tabela 10. Resultado do teste de adição e recuperação realizado na presença de soro sangüíneo diluído (1:4).

Modificador químico	Recuperação (%)			
	$1 \mu\text{g Mn}^{2+} \text{ l}^{-1}$	$2 \mu\text{g Mn}^{2+} \text{ l}^{-1}$	$10 \mu\text{g Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$	$20 \mu\text{g Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$
$20 \mu\text{g Pd}$	130	133	109	105
$20 \mu\text{g Pd} + 10 \mu\text{g Mg}$	111	122	102	106
$10 \mu\text{g Rh}$	126	118	76	78
$10 \mu\text{g Rh} + 10 \mu\text{g Mg}$	112	138	89	83

Considerando os valores de recuperação (Tabela 10), bem como as temperaturas de pirólise obtidas na presença dos modificadores químicos selecionados (Tabela 9), escolheu-se o modificador químico $20 \mu\text{g Pd} + 10 \mu\text{g Mg}$ para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo.

4.3.3 Estudo do tempo de duração da etapa de pirólise

A correção do sinal de fundo é especialmente complicada para o comprimento de onda selecionado para o selênio ($\lambda=196$ nm), devido à absorbância causada pelo fosfato e ferro, presentes em quantidades elevadas no soro sangüíneo. A absorção de fundo gerada por essas espécies é estruturada, e sua correção somente ocorre eficientemente se for utilizado um corretor de sinal de fundo por efeito Zeeman^{7,57,74,79,80}. Entretanto, é importante tentar eliminar esses concomitantes durante a etapa de pirólise, para minimizar o sinal de fundo gerado durante a atomização.

Para favorecer a remoção dos concomitantes presentes na matriz, o tempo de patamar da etapa de pirólise, realizada a 1200°C na presença da mistura 20 μg Pd + 10 μg Mg como modificador químico, foi estudado para verificar a variação dos sinais de fundo observados para manganês e selênio (Figura 24). Adicionalmente, avaliou-se a precisão dos sinais analíticos em função do aumento do tempo de patamar da pirólise (Figura 25). Durante a realização desses estudos foi utilizada solução de soro sangüíneo diluída (1:4), com adição de 1 μg $\text{Mn}^{2+} \text{ l}^{-1}$ + 10 μg $\text{Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$ em 0,1% m/v Triton X-100 + 1,0% v/v HNO_3 .

Limitando-se a duração do tempo de patamar a menos de 15 segundos, verificou-se que o sinal de absorção de fundo gerado para o selênio é muito elevado, indicando a presença de grande quantidade de concomitantes durante a etapa de atomização. Entretanto, quando o tempo selecionado foi maior do que 15 segundos, foi observada uma significativa redução na magnitude desse sinal, o que indica que grande parte desses concomitantes foram eliminados de maneira mais eficiente, gerando um sinal de fundo em torno de 0,05 s.

Figura 24. Variação do sinal de fundo em função do tempo de patamar da etapa de pirólise (Temperatura de pirólise = 1200°C, Temperatura de atomização = 2300°C).

O sinal de absorção de fundo para o manganês já era bastante pequeno quando o tempo de patamar da etapa de pirólise foi de 5 para 10 segundos. A precisão dos sinais analíticos obtidos para manganês e selênio foi avaliada considerando-se o coeficiente de variação de 3 medidas consecutivas da solução diluída da amostra. Os melhores resultados foram obtidos quando o tempo de patamar da etapa de pirólise foi superior a 30 segundos. Esse fato pode ser explicado devido a remoção eficiente dos concomitantes orgânicos e inorgânicos, que prejudica a precisão dos sinais analíticos quando estão presentes em elevadas concentrações.

Figura 25. Variação da precisão dos sinais analíticos obtidos para manganês e selênio, em função da variação do tempo de patamar da etapa de pirólise.

Analisando conjuntamente a variação da magnitude do sinal de fundo, observada sobretudo para o selênio, e a precisão dos sinais analíticos obtidos, optou-se por utilizar 30 segundos como tempo de patamar durante a etapa de pirólise.

4.3.4 A decomposição da matéria orgânica presente no soro sangüíneo

Os testes iniciais com amostra de soro sangüíneo mostraram que a eliminação da matéria orgânica não estava ocorrendo de maneira satisfatória durante a etapa de pirólise. Visualmente, foi possível verificar o aparecimento de um resíduo sobre a plataforma integrada do tubo de grafite após 30 injeções sucessivas de 15 μ l de soro sangüíneo diluído (1:4). Esse resíduo é composto pelos produtos da oxidação parcial da matéria orgânica presente na amostra. De acordo com a literatura, a formação desse resíduo no interior do tubo ocorre para amostras que possuem elevados teores de matéria orgânica na sua composição, como fluidos biológicos^{59,81,82} e leite⁸³. Uma consequência da formação desse resíduo carbonáceo sobre a plataforma integrada é a

redução do tempo de vida útil do tubo de grafite, restrita a menos de 50 ciclos de aquecimento para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo. Adicionalmente, verificou-se uma precisão ruim dos sinais analíticos obtidos, sobretudo para o manganês, que pode ficar ocluído nesse resíduo na forma de carbeto de manganês (Mn_3C)^{84,85}. A superfície pirolítica desempenha um importante papel durante os processos de atomização do manganês, considerando que seu precursor atômico (MnO) interage com o grafite, produzindo átomos de manganês e $\text{CO}_{(\text{g})}$. A alteração da superfície pirolítica do tubo de grafite, através do acúmulo de resíduos carbonáceos, prejudica os processos de atomização do manganês, tornando os resultados analíticos pouco precisos^{84,85}.

Na literatura são apresentadas algumas alternativas para evitar a ocorrência dos resíduos carbonáceos sobre a superfície da plataforma integrada, tais como a utilização de um pequeno fluxo de oxigênio ou ar (gás auxiliar) durante a etapa de pirólise, que deve ocorrer com temperaturas em torno de $500\text{-}600^\circ\text{C}$ ^{49,51,57} e a adição de uma mistura de reagentes oxidantes, como $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$ juntamente com a amostra^{59,81-83}.

A utilização de um gás auxiliar como ar ou oxigênio, introduzido no interior do tubo de grafite durante a etapa de pirólise, permite que a decomposição dos concomitantes orgânicos ocorra mais eficientemente, devido ao aumento da pressão parcial de oxigênio. Essa estratégia, entretanto, também provoca a degradação do grafite pirolítico presente na superfície da plataforma integrada, colaborando com a redução do tempo de vida útil do atomizador.

Uma alternativa à introdução de um gás auxiliar durante a etapa de pirólise pode ser a adição de um pequeno volume de reagentes oxidantes, tais como, H_2O_2 e HNO_3 . Um ambiente oxidante é gerado no interior do tubo de grafite, favorecendo a decomposição da matéria orgânica. A digestão da amostra ocorrerá no interior do tubo de grafite, durante as etapas de secagem e pirólise. A vantagem desse procedimento em relação a utilização do gás auxiliar é a preservação do grafite pirolítico que recobre a superfície integrada

do tubo de grafite, menos danificada com a introdução da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$, do que com a utilização de um fluxo de oxigênio ou ar durante a etapa de pirólise^{59,81-83}.

A literatura indica que a composição ideal dessa mistura de reagentes oxidantes, para atuar na decomposição de substâncias orgânicas presentes na matriz, é 15% v/v $\text{H}_2\text{O}_2 + 1\%$ v/v HNO_3 ⁸¹. Assim, é possível evitar a introdução de grandes alíquotas dessa mistura no interior do tubo de grafite, evitando que o excesso desses reagentes provoque a degradação desnecessária da plataforma integrada. Por esse motivo, utilizou-se uma alíquota de 10 μl dessa mistura oxidante.

A adição da mistura oxidante diretamente a amostra de soro sangüíneo, no copo do auto amostrador não foi possível, devido ao grande desprendimento de gases gerados pela decomposição de H_2O_2 , que é catalisada pela catalase. Desta forma, a adição dessa mistura foi realizada após a secagem de 15 μl de soro sangüíneo no interior do tubo de grafite, assegurando a denaturação das enzimas presentes devido a elevação da temperatura.

O programa de aquecimento do atomizador foi alterado e adicionou-se uma etapa de pirólise a baixa temperatura após as etapas de secagem (Tabela 11). Essa etapa (Pirólise I) ocorreu a 400°C e sua função foi permitir que a oxidação da matéria orgânica, presente na amostra, ocorresse eficientemente. Após essa etapa, iniciou-se a pirólise a alta temperatura (Pirólise II), dedicada a eliminação dos concomitantes inorgânicos presentes na amostra.

Para avaliar o efeito causado pela adição da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$ e da introdução da etapa de pirólise a baixa temperatura (Pirólise I), registrou-se o coeficiente de variação de 10 conjuntos de dados analisados em triplicata, na ausência (Figura 26) e na presença da mistura oxidante (Figura 27).

Na ausência da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$, a matéria orgânica presente no soro sangüíneo não é convenientemente oxidada e, conseqüentemente, o acúmulo de resíduos carbonáceos sobre a plataforma integrada ocorre

rapidamente. Os valores do coeficiente de variação observados para o manganês variaram muito nessas condições (Figura 26), atingindo níveis próximos a 80%.

Tabela 11. Programa de aquecimento utilizado para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo por SIMAAS.

Etapas	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão Ar (ml min⁻¹)	Leitura
Secagem	80	5	10	250	Não
Secagem	130	20	5	250	Não
Pirólise I	400	10	15	250	Não
Pirólise II	1200	10	30	250	Não
Atomização	2300	0	3	0	Sim
Limpeza	2600	1	2	250	Não

V=15µl de soro sangüíneo; Temperatura de injeção=20°C; Tempo total do programa=111s.

O processo de atomização do manganês é muito dependente do estado físico da superfície pirolítica da plataforma integrada. A literatura indica que o manganês pode se associar ao grafite da superfície pirolítica, gerando a formação de carbeto de manganês (Mn₃C)^{84,85}. Essa tendência em formar carbeto apresentada pelo manganês pode permitir que esse elemento fique ocluído no interior da massa de resíduo carbonáceo, formado pela inadequada decomposição dos componentes orgânicos presentes no soro sangüíneo.

A liberação desse manganês ocluído ocorre aleatoriamente, gerando os elevados valores de coeficiente de variação observados. O tubo de grafite atingiu essa condição rapidamente (aproximadamente após 50 ciclos de aquecimento) e, a partir da formação desse resíduo, torna-se difícil a obtenção de resultados que possam ser utilizados para fins analíticos.

Figura 26. Variação do coeficiente de variação de 10 conjuntos de dados experimentais obtidos em triplicata, na ausência da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$.

Figura 27. Variação do coeficiente de variação de 10 conjuntos de dados experimentais obtidos em triplicata, na presença da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$.

Com a utilização da mistura $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3$ e da introdução da etapa de pirólise a baixa temperatura (Pirólise I), verificou-se que os valores do coeficiente de variação se estabilizaram em um patamar inferior a 10%

(Figura 27), indicando que o resíduo carbonáceo não estava sendo formado em grande quantidade. A oxidação da matéria orgânica presente no soro sangüíneo pode estar ocorrendo eficientemente e o tubo de grafite pode ser utilizado durante mais tempo (aproximadamente 150 ciclos de aquecimento).

4.3.5 Método para a determinação simultânea de manganês e selênio em soro sangüíneo

As análises das amostras de soro sangüíneo e do material de referência certificado foram realizadas, utilizando-se o procedimento de preparo de amostra seguindo o princípio do frasco único (item 3.4). O programa de aquecimento utilizado está apresentado na Tabela 11.

A calibração do instrumento foi realizada utilizando-se soluções analíticas de referência contendo manganês (Figura 28) e selênio (Figura 29), que foram preparadas seguindo o procedimento previamente descrito (item 3.4.1.6).

O coeficiente angular obtido para a curva analítica de referência do manganês foi igual a $(5,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ s l μg^{-1} e o coeficiente de correlação foi igual a $(0,996 \pm 0,001)$. O coeficiente angular obtido para a curva analítica de referência do selênio foi igual a $(7,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$ s l mg^{-1} e o coeficiente de correlação foi igual a $(0,9997 \pm 0,0008)$.

Testes de adição e recuperação foram realizados utilizando as amostras de soro sangüíneo e adicionando-se 1,0 $\mu\text{g Mn}^{2+} \text{ l}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{g Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$. A preparação dessas amostras seguiu o mesmo procedimento aplicado às soluções analíticas de referência. Os resultados das determinações de manganês e selênio em soro sangüíneo estão apresentados na Tabela 12, bem como os resultados dos testes de adição e recuperação.

Figura 28. Curva analítica de referência para o manganês.

Figura 29. Curva analítica de referência para o selênio.

Os valores obtidos para a amostra de referência certificada foram concordantes com aqueles apresentados no certificado. A recuperação da adição de $1,0 \mu\text{g Mn}^{2+} \text{ l}^{-1} + 10,0 \mu\text{g Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$ variou entre 88 e 111% para o manganês e 89 e 106% para o selênio. Considerando as dificuldades

inerentes à análise desses elementos na amostra de soro sangüíneo pouco diluída, os resultados obtidos através da utilização de soluções aquosas para calibrar o instrumento foram bastante satisfatórios.

Tabela 12. Resultados da análise de amostras de soro sangüíneo e do material de referência certificado e recuperação de manganês e selênio.

Amostra	Mn ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Se ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recuperação** (%)	
			Mn	Se
CRM*	(7,1 $\pm$ 0,7)	(74 $\pm$ 7)	111	95
I	(6,4 $\pm$ 0,8)	(49 $\pm$ 6)	94	89
II	(4,7 $\pm$ 0,5)	(41 $\pm$ 5)	105	106
III	(3,6 $\pm$ 0,4)	(44 $\pm$ 4)	90	102
IV	(5,4 $\pm$ 0,7)	(39 $\pm$ 4)	88	93
V	(6,2 $\pm$ 0,8)	(51 $\pm$ 8)	106	91

*Valores do certificado: Mn=6,2 $\pm$ 0,9 $\mu\text{g l}^{-1}$ e Se=80 $\pm$ 9 $\mu\text{g l}^{-1}$

** Recuperação após a adição de 1,0 $\mu\text{g Mn}^{2+} \text{ l}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{g Se}^{4+} \text{ l}^{-1}$

Os limites de detecção, calculados a partir do desvio padrão de 20 medidas da solução de branco analítico e da inclinação das curvas analíticas de referência analítica, foram de 0,43 $\mu\text{g l}^{-1}$ (6,45 pg) para o manganês e 3,3 $\mu\text{g l}^{-1}$ (49,5 pg) para o selênio. As massas características, calculadas a partir das curvas de referência analítica foram iguais a 11,6 e 91,7 pg para o manganês e o selênio, respectivamente.

A vida útil do tubo de grafite, com a utilização da mistura oxidante para reduzir a formação de resíduos carbonáceos sobre a plataforma integrada, foi de, aproximadamente, 150 ciclos de aquecimento.

4.4 Determinação simultânea de cobre/zinco por SIMAAS

Apesar das concentrações de cobre e zinco no soro sangüíneo serem compatíveis com a sensibilidade obtida por FAAS^{44,86}, há um inconveniente em se realizar essas determinações: a restrição da quantidade de amostra.

O reduzido volume de amostra disponível é, em certos casos, uma realidade dentro do contexto das análises clínicas. Geralmente, o sangue a ser analisado é coletado uma única vez e pode ser destinado a diferentes tipos de análises químicas e biológicas, uma vez que para se conseguir um diagnóstico clínico consistente são necessárias informações sobre a concentração de diversas substâncias²⁷. Essa situação é ainda mais crítica quando se necessita analisar o sangue de fetos prematuros, recém-nascidos e crianças. Pacientes terminais ou indivíduos que são submetidos regularmente a diversos exames também não podem fornecer uma grande quantidade de sangue para análise. Nesses casos, torna-se impossível coletar um apreciável volume de amostra e, caso seja necessário realizar vários exames clínicos com o mesmo material, é imprescindível utilizar métodos analíticos que necessitem de reduzida quantidade de amostra para as respectivas determinações.

Em situações específicas como as citadas acima, a determinação de cobre e zinco por FAAS pode não ser a melhor opção, uma vez que o volume mínimo de amostra necessário para realizar essas determinações é de, aproximadamente, 1 ml^{44,86}, considerando a baixa eficiência do processo de introdução da amostra, freqüentemente realizado através de nebulizadores pneumáticos⁸⁷. Nessas situações, onde a escassez de amostra é um obstáculo, torna-se atraente a possibilidade de realizar essas análises por ETAAS^{37-39,60-62}, sobretudo por SIMAAS. Devido à elevada sensibilidade da técnica e a concentração de cobre e zinco presente no soro sangüíneo, torna-se necessário empregar elevados fatores de diluição da amostra.

Considerando as concentrações de cobre e zinco presente no soro sangüíneo e os limites de detecção obtidos nas determinações desses elementos por ETAAS (Tabela 2), verifica-se que os fatores de diluição a

serem empregados para cada um desses elementos são diferentes. A diluição necessária para realizar a análise de zinco (100 a 200 vezes)^{60-62,88} é maior do que os fatores de diluição utilizados para o cobre (10 a 50 vezes)³⁷⁻³⁹. Desta forma, é necessário utilizar estratégias para reduzir a sensibilidade dos elementos de interesse, bem como tornar viável a análise simultânea de cobre e zinco a partir de uma única diluição da amostra, considerando que os intervalos de concentração em SIMAAS são extremamente estreitos. Por esse motivo, é necessário provocar a perda do zinco em maior extensão, considerando que esse elemento possui maior sensibilidade do que o cobre quando analisado por ETAAS².

As estratégias que permitem a perda deliberada e controlada da sensibilidade podem ser utilizadas para tentar evitar as elevadas diluições da amostra, bem como para tornar possível a utilização de um fator de diluição único da amostra, conveniente para realizar a determinação multielementar. As condições que permitem perder sensibilidade em ETAAS são:

- a utilização de um comprimento de onda menos sensível;
- a redução do volume de amostra introduzida no tubo de grafite;
- a utilização de uma temperatura de pirólise elevada, para provocar a perda seletiva do elemento mais volátil;
- a utilização de um pequeno fluxo de argônio durante a etapa de atomização.

No presente trabalho, a utilização de um comprimento de onda alternativo não foi possível, visto que o espectrômetro utilizado fornece somente uma opção para os elementos de interesse (cobre, $\lambda = 324,8\text{nm}$ e zinco, $\lambda = 213,9\text{ nm}$), que são as linhas de ressonância mais intensas e que permitem obter a maior sensibilidade.

A diminuição do volume de amostra introduzida no tubo de grafite é possível e colabora com a redução dos sinais analíticos. Desta forma, o fator de diluição a ser empregado durante a análise de cobre e zinco em soro sanguíneo pode ser reduzido. Entretanto, a utilização de volumes muito reduzidos pode comprometer a precisão dos resultados analíticos,

considerando-se que os erros associados ao processo de medição do volume tornam-se mais significativos.

A escolha de uma temperatura de pirólise elevada pode ser uma estratégia para a perda de sensibilidade do elemento mais volátil, sem alterar o sinal de absorbância registrado para o elemento menos volátil. Considerando os elementos de interesse, verificou-se que o zinco apresenta maior volatilidade do que o cobre e, através da seleção de uma temperatura de pirólise adequada, é possível provocar a perda seletiva desse elemento. Desta forma, a utilização de um único fator de diluição para as amostras de soro sanguíneo é possível, tornando viável a determinação multielementar de cobre e zinco por ETAAS.

O emprego de um pequeno fluxo de argônio no interior do atomizador durante a etapa de atomização também permite a redução da sensibilidade^{37,60-62}. Esse fluxo de gás promove a rápida expulsão da nuvem atômica formada durante a atomização, reduzindo o tempo de residência dos átomos no volume de observação, diminuindo a sensibilidade para cobre e zinco. Essa estratégia não é seletiva, considerando-se que os átomos desses elementos são arrastados igualmente pelo fluxo de argônio introduzido durante a etapa de atomização.

A combinação da utilização de uma temperatura de pirólise elevada, permitindo a perda de sensibilidade de maneira seletiva somente para o elemento mais volátil (zinco), e o emprego de um mini-fluxo de argônio durante a etapa de pirólise, reduzindo a sensibilidade de ambos os elementos, foi utilizada, tornando possível a determinação simultânea de cobre e zinco por SIMAAS, empregando um único fator de diluição da amostra.

4.4.1 Curvas de temperatura de pirólise e de atomização para cobre e zinco

O estudo do comportamento térmico de cobre e zinco foi realizado através da obtenção de curvas de temperatura de pirólise (Figura 30) e atomização (Figura 31) sem a utilização de modificador químico. Através do perfil das curvas de temperatura de pirólise obtidas (Figura 30), verificou-se

que ocorrem perdas de zinco por volatilização a partir de 300°C; já o cobre suporta um aquecimento até 1000°C sem apresentar alteração do sinal analítico obtido. Sendo o zinco o elemento mais volátil, é possível provocar sua perda de maneira seletiva, através da utilização de uma temperatura de pirólise entre 300 e 750°C. Desta maneira, é possível reduzir somente o sinal analítico de zinco, sem alterar o sinal analítico obtido para o cobre. Utilizando 700°C como temperatura de pirólise, é possível verificar uma redução de 60% do sinal de zinco, sem qualquer redução do sinal analítico obtido para o cobre.

Figura 30. Curvas de temperatura de pirólise para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,01% m/v Triton X-100 e 0,1% v/v HNO_3 (Temperatura de atomização = 2000°C).

As curvas de temperatura de atomização (Figura 31) permitiram verificar que em temperaturas abaixo de 1800°C, a atomização do zinco ocorre mais eficientemente do que a atomização do cobre. Considerando o caráter multielementar do método que está sendo desenvolvido, optou-se pela utilização de 2300°C durante a etapa de atomização, visto que nessa temperatura o coeficiente de variação apresentado por 3 medidas

consecutivas foi o menor para os sinais analíticos de cobre e zinco. Adicionalmente a escolha dessa temperatura pode ser atribuída à tentativa de compensar o resfriamento do interior do atomizador, devido a utilização de um mini-fluxo de argônio durante a atomização.

Figura 31. Curvas de temperatura de atomização para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,01% m/v Triton X-100 e 0,1% v/v HNO_3 (Temperatura de pirólise = 700°C).

4.4.2 Utilização de mini fluxo de argônio durante a etapa de atomização

Apesar da perda de 60% no sinal de absorbância de zinco utilizando uma temperatura de pirólise de 700°C, a concentração desse elemento ainda é muito elevada para realizar a sua determinação por ETAAS. Adicionalmente, é necessário promover a perda de sinal analítico para o cobre, que não sofre alteração durante a etapa de pirólise. Desta forma, um mini-fluxo de argônio foi utilizado na etapa de atomização para provocar a perda dos elementos de interesse, através da redução do tempo de residência da nuvem atômica no interior do atomizador^{37,60-62}.

A influência do fluxo de argônio durante a etapa de atomização sobre a redução dos sinais analíticos foi verificada para avaliar a eficiência dessa

estratégia (Figuras 32 e 33). Duas temperaturas de pirólise foram utilizadas: 200°C, para verificar a perda de sensibilidade provocada exclusivamente pelo fluxo de argônio (Figura 32); 700°C, para verificar a eficiência dessa estratégia após a perda de zinco durante a etapa de pirólise (Figura 33).

Figura 32. Magnitude dos sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu²⁺ e 10 pg de Zn²⁺ em função da variação do fluxo de argônio utilizado durante a etapa de atomização (Tp = 200°C, Ta = 2300°C).

Figura 33. Magnitude dos sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu²⁺ e 10 pg de Zn²⁺ em função da variação do fluxo de argônio utilizado durante a etapa de atomização (Tp = 700°C, Ta = 2300°C).

Os valores dos sinais de absorbância utilizados nos gráficos apresentados (Figuras 32 e 33) foram normalizados e, considerou-se 100% de magnitude para aqueles sinais obtidos na ausência de fluxo de argônio durante a etapa de atomização, empregando-se 200°C (Figura 32) ou 700°C (Figura 33) como temperatura de pirólise.

As figuras 32 e 33 mostram que utilizando 200 e 700°C como temperatura de pirólise, as perdas devido ao fluxo de argônio são praticamente as mesmas. A utilização de 50 ml min⁻¹ de argônio, em ambos os casos, proporcionou a perda de, aproximadamente 20% do sinal de cobre e 30% do sinal de zinco. Esse fato mostra que é possível combinar as duas estratégias de perda de sensibilidade, através da utilização de 700°C durante a etapa de pirólise e de 50 ml min⁻¹ de argônio durante a atomização. A utilização de 250 ml min⁻¹ de argônio provocou atenuação dos sinais de cobre e zinco, porém apresentando menor precisão. Adicionalmente, a isothermicidade do atomizador é comprometida, devido a introdução de um elevado fluxo de argônio no interior do atomizador, impedindo que as condições STPF sejam plenamente atendidas^{2,6,10}. Fluxos intermediários de argônio não foram testados, visto que os valores fixados pelo fabricante para esse parâmetro instrumental são iguais a 0, 50 e 250 ml min⁻¹.

4.4.3 Influência do tempo da etapa de pirólise na redução da sensibilidade do zinco

Após estabelecer a melhor combinação de estratégias para promover a perda deliberada e controlada de sensibilidade para cobre e zinco, realizou-se um estudo para verificar o efeito do tempo da etapa de pirólise nos sinais de absorbância (Figura 34).

O sinal de absorbância do cobre não sofreu nenhuma alteração significativa, uma vez que as perdas por volatilização só são verificadas em temperaturas acima de 1000°C. Entretanto, o sinal de absorbância do zinco é consideravelmente afetado pelo tempo de patamar da etapa de pirólise, com redução no sinal de absorbância de até 90% para 30 segundos de pirólise.

Figura 34. Magnitude dos sinais de cobre e zinco em função do tempo de patamar da pirólise: sinais analíticos obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} em 0,1% v/v HNO_3 ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2000^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 50 \text{ ml min}^{-1}$).

Uma condição analítica apropriada para a determinação multielementar de cobre e zinco em amostras de soro sanguíneo é obtida quando a etapa de pirólise é realizada entre 5 e 20 segundos. Por esse motivo, optou-se pelo menor tempo da etapa de pirólise (5 s), a fim de não aumentar desnecessariamente o tempo total do programa de aquecimento do atomizador, e porque somente a perda de zinco é favorecida. A introdução do fluxo de argônio durante a etapa de atomização ainda é importante, considerando a necessidade de provocar a perda de sinal analítico também para o cobre.

4.4.4 Estudo da precisão do sinal de absorbância empregando as estratégias de perda controlada de sinal analítico

A avaliação da precisão dos sinais de absorbância quando se utilizaram-se as estratégias de perda controlada de sensibilidade para cobre e zinco foi realizada através do registro de 15 sinais analíticos obtidos

sucessivamente a partir de solução analítica de referência em duas condições distintas: utilizando 700°C como temperatura de pirólise, na ausência (Figura 35) e na presença de mini fluxo de argônio durante a etapa de atomização (Figura 36).

Figura 35. Sinais de absorvância integrada obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2300^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 0 \text{ ml min}^{-1}$).

Figura 36. Sinais de absorvância integrada obtidos para 125 pg Cu^{2+} e 10 pg de Zn^{2+} ($T_p = 700^\circ\text{C}$, $T_a = 2300^\circ\text{C}$, $\phi_{\text{Ar}} = 50 \text{ ml min}^{-1}$).

A perda seletiva de zinco durante a etapa de pirólise não comprometeu a precisão dos sinais analíticos (Figura 35). Os coeficientes de variação para o conjunto de 15 sinais registrados para cobre e zinco apresentaram valores inferiores a 5% para ambos os elementos ($\text{Cu} = 1,3\%$ e $\text{Zn} = 4,0\%$).

A combinação das estratégias envolvendo a utilização de uma elevada temperatura de pirólise e de mini-fluxo de argônio durante a etapa de atomização não comprometeu a precisão dos sinais analíticos obtidos (Figura 36). As médias dos 15 sinais registrados para cobre e zinco apresentaram valores de coeficiente de variação inferiores a 3% para ambos os elementos ($\text{Cu} = 1,0\%$ e $\text{Zn} = 2,7\%$). As perdas de sinais analíticos obtidas após a utilização dessas estratégias mostraram uma redução de 20% para o cobre e de 70% para o zinco.

A perda de sinal analítico para os elementos de interesse, através da combinação dessas estratégias instrumentais mostrou-se eficiente, permitindo a utilização de uma única diluição das amostras de soro sanguíneo (1:80) e viabilizando a determinação simultânea de cobre e zinco por SIMAAS.

4.4.5 Método para a determinação simultânea de cobre e zinco em soro sanguíneo

As análises das amostras de soro sanguíneo e do material de referência certificado foram realizadas, utilizando-se o procedimento de preparo de amostra seguindo o princípio do frasco único (item 3.4). O programa de aquecimento do atomizador utilizado está apresentado na Tabela 13.

A utilização de modificador químico não foi necessária para a realização dessas determinações, visto que a elevada diluição das amostras (1:80) reduz a concentração dos concomitantes na solução diluída, minimizando os efeitos de interferência provocados pela matriz. Desta forma, torna-se desnecessário empregar temperaturas superiores a 700°C durante a etapa de pirólise. Além desse fato, deve-se considerar que a introdução de solução de modificador químico poderia acarretar uma elevação do sinal do branco analítico.

Tabela 13. Programa de aquecimento do atomizador utilizado para a determinação simultânea de cobre e zinco em soro sanguíneo.

Etapa	T (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão Ar (ml min ⁻¹)	Leitura
Secagem	130	5	5	250	Não
Pirólise	700	15	5	250	Não
Atomização	2300	0	5	50	Sim
Limpeza	2500	1	3	250	Não

V=5µl de soro sanguíneo; Temperatura de amostragem:100°C; Tempo total do programa de aquecimento: 39s

A combinação da diluição das soluções e amostras utilizadas, do emprego de 700°C durante a etapa de pirólise e de 50 ml min⁻¹ de argônio durante a atomização permitiu adequar a elevada concentração dos elementos de interesse na amostra, com a elevada sensibilidade da ETAAS para esses elementos (Figura 37).

Figura 37. Perda de sinal analítico provocada pelas estratégias adotadas (* valores aproximados de concentração de zinco e cobre em soro sanguíneo de pessoas saudáveis).

A calibração do instrumento foi realizada utilizando soluções analíticas de referência contendo cobre e zinco (Figuras 38 e 39), que foram preparadas seguindo o procedimento previamente descrito (item 3.4.2.5).

Figura 38. Curva analítica de referência para o cobre.

Figura 39. Curva analítica de referência para o zinco.

O coeficiente angular obtido para a curva analítica de referência para o cobre foi igual a $(8,31 \pm 0,05) \cdot 10^{-4} \text{ s l } \mu\text{g}^{-1}$ e o coeficiente de correlação foi igual

a $(0,9999 \pm 0,0003)$. O coeficiente angular obtido para a curva analítica de referência para o zinco foi igual a $(8,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ s l } \mu\text{g}^{-1}$ e o coeficiente de correlação foi igual a $(0,999 \pm 0,005)$.

Testes de adição e recuperação foram realizados utilizando as amostras de soro sangüíneo após a adição de $2,0 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ l}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ l}^{-1}$ em 0,01% m/v Triton X-100 + 1% v/v HNO_3 . A preparação dessas amostras seguiu o mesmo procedimento aplicado às soluções analíticas de referência e às amostras. Os resultados das determinações de cobre e zinco nas amostras estão apresentados na Tabela 14, bem como os resultados dos testes de adição e recuperação.

Os limites de detecção, calculados a partir do desvio padrão de 20 medidas da solução de branco analítico e da inclinação das curvas analíticas de referência analítica, foram de $4,95 \mu\text{g l}^{-1}$ (24,7 pg) para o cobre e $0,045 \mu\text{g l}^{-1}$ (0,2 pg) para o zinco.

Tabela 14. Resultados da análise de amostras de soro sangüíneo e do material de referência certificado e verificação da recuperação de cobre e zinco.

Amostra	Cu (mg l^{-1})	Zn (mg l^{-1})	Recuperação** (%)	
			Cu	Zn
CRM*	$(1,30 \pm 0,06)$	$(1,60 \pm 0,08)$	102	96
I	$(0,95 \pm 0,07)$	$(1,1 \pm 0,1)$	95	98
II	$(1,4 \pm 0,1)$	$(1,7 \pm 0,1)$	105	102
III	$(0,9 \pm 0,1)$	$(1,82 \pm 0,08)$	96	91
IV	$(1,40 \pm 0,06)$	$(1,6 \pm 0,1)$	102	90
V	$(1,2 \pm 0,1)$	$(2,0 \pm 0,1)$	100	92

*Valores do certificado: $\text{Cu} = 1,30 \pm 0,07 \text{ mg l}^{-1}$ e $\text{Zn} = 1,48 \pm 0,11 \text{ mg l}^{-1}$

** Recuperação após a adição de $2,0 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ l}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ l}^{-1}$

As massas características, calculadas a partir das curvas de referência analítica foram iguais a 26,5 e 2,7 pg para o cobre e o zinco, respectivamente.

A vida útil do tubo de grafite foi de, aproximadamente, 350 ciclos de aquecimento.

5. Conclusão

“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 determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco em soro sanguíneo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é possível. A divisão dos elementos de interesse em dois grupos foi necessária devido a diferença de concentração e a estreita faixa de concentração utilizada para a obtenção de dados analíticos que é característica da técnica.

A diluição das amostras para a determinação de manganês/selênio foi de apenas 1:4 e, nessa condição, a concentração dos concomitantes nas soluções diluídas para a análise é elevada. Por esse motivo, o tratamento térmico a ser aplicado à amostra deve ser eficiente para favorecer a remoção dessas substâncias antes da etapa de atomização.

A introdução de 10 µl de uma mistura de reagentes oxidantes (H_2O_2 + HNO_3) após a secagem de 15 µl de amostra, mostrou-se muito útil para decompor os concomitantes orgânicos “*in situ*”, durante o primeiro estágio da etapa de pirólise (Pirólise I), que foi realizada a baixa temperatura (400°C). Além de reduzir o sinal de fundo observado, essa estratégia evitou a formação de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite, aumentando seu tempo de vida útil para até 150 ciclos de aquecimento.

A eliminação dos concomitantes inorgânicos ocorre preferencialmente no segundo estágio da etapa de pirólise (Pirólise II) e, nesse caso, a

temperatura empregada deve ser elevada, o que torna obrigatório o emprego de um modificador químico para estabilizar termicamente o selênio. Os testes realizados na presença da amostra mostraram que a mistura de 20 μg Pd + 10 μg Mg foi a mais adequada para realizar a determinação simultânea de manganês/selênio, permitindo aplicar 1200°C durante a etapa de pirólise.

A análise de material de referência certificado foi utilizado para validar o método desenvolvido, sendo que os resultados obtidos concordaram com os valores certificados (Mn = 114% e Se = 92,5%). Desta maneira, verificou-se que é possível determinar simultaneamente manganês e selênio em soro sangüíneo por SIMAAS, utilizando 30 μl de amostra. Com o programa de aquecimento proposto, foi possível realizar até 20 ciclos de aquecimento por hora, gerando 40 resultados analíticos.

A diluição das amostras para a determinação de cobre/zinco foi de 1:80, e a concentração dos concomitantes nas soluções diluídas para a análise é reduzida, minimizando as interferências provocadas por essas substâncias. Além da diluição das amostras, foram desenvolvidas estratégias para provocar a perda controlada de sinal analítico, para adequar a elevada concentração dos elementos de interesse com a alta sensibilidade da técnica.

Através do estudo do comportamento térmico de cobre e zinco foi possível verificar que seria possível perder seletivamente 60% do sinal analítico de zinco sem perturbar o de cobre, utilizando 700°C como temperatura de pirólise. A perda seletiva de zinco é necessária, visto que ele apresenta maior sensibilidade do que o cobre, quando determinado por ETAAS.

Adicionalmente, a introdução de um mini fluxo de argônio durante a etapa de atomização permite reduzir o sinal analítico para cobre e zinco, através da diminuição do tempo de residência da nuvem atômica na zona de observação. Esse procedimento não apresenta seletividade e os sinais analíticos de cobre e zinco são reduzidos conjuntamente. O fluxo de argônio não deve ser muito elevado, a fim de não comprometer a isothermicidade do tubo de grafite durante a etapa de atomização. Por esse motivo, fixou-se o

fluxo de argônio em 50 ml min^{-1} e obteve-se uma redução de 20% para os sinais de cobre e de 30% para os sinais de zinco.

A perda de sinal deliberada e controlada através da utilização de elevada temperatura de pirólise e de mini fluxo de argônio durante a atomização não prejudicou a repetibilidade dos sinais analíticos. Os valores de repetibilidade obtidos através da combinação dessas estratégias foram reduzidos ($CV = 1,0\%$ para cobre e $CV = 2,7\%$ para zinco, $n=15$), indicando que a determinação multielementar desses elementos pode ser realizada de maneira precisa por SIMAAS, utilizando apenas $20 \mu\text{l}$ de soro sanguíneo e evitando as longas etapas de pré-tratamento da amostra.

A análise de material de referência certificado foi utilizado para validar o método desenvolvido e os resultados obtidos concordaram com os valores certificados ($\text{Cu} = 100\%$ e $\text{Zn} = 92,5\%$). Desta maneira, verificou-se que é possível determinar simultaneamente cobre e zinco em soro sanguíneo por SIMAAS, utilizando $20 \mu\text{l}$ de amostra. Com o programa de aquecimento proposto, foi possível realizar até 72 ciclos de aquecimento por hora, gerando 144 resultados analíticos.

6. Referências bibliográficas

1. A. Walsh, *Spectrochim. Acta*, **7** (1955) 108.
2. B. Welz, M. Sperling, “*Atomic Absorption Spectrometry*”, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemanha, 1999.
3. B. L’vov, *Spectrochim. Acta*, **39** (1984) 149.
4. B. Welz, *Spectrochim. Acta*, **47B** (1992) 1043.
5. W. Frech, D. C. Baxter, B. Hütsch, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 1973.
6. M. Sperling, B. Welz, J. Hertzberg, C. Rieck, G. Marowsky, *Spectrochim. Acta*, **51B** (1996) 897.
7. F. J. Fernandez, W. Bohler, M. M. Beaty, W. B. Barnett, *At. Spectros.*, **2** (1981) 73.
8. G. Schlemmer, *At. Spectros.*, **17** (1996) 15.
9. R. D. Ediger, *At. Absorpt. Newsl.*, **14** (1975) 127.
10. W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carnrick, *At. Spectros.*, **2** (1981) 137.
11. S. R. Koirtiyohann, M. L. Kaiser, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 1515A.
12. F. Wach, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 51A.
13. K. W. Jackson, *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, John Wiley & Sons Ltda, Chichester, England, 1999.
14. D. L. Tsalev, *Atomic Absorption Spectrometry in Environmental Health Practice*, Vol. III, CRC Press, Boca Raton, New York, USA, 1995.
15. G. V. Iyengar, K. S. Subramanian, J. R. W. Woittiez, *Element analysis of Biological Samples - Principle and Practice*, CRC Press, Boca Raton, New York, USA, 1998.
16. G. Tyler, *Spectrosc. Europe*, **7** (1995) 14.
17. A. Krushevskia, S. Waheed, J. Nóbrega, R. M. Barnes, *Appl. Spectrosc.*, **2** (1998) 205.
18. J. Sneddon, B. D. Farah, K. S. Farah, *Microchem. J.*, **48** (1993) 318.
19. J. M. Harnly, *Anal. Chem.*, **51** (1979) 933A.
20. J. M. Harnly, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **355** (1996) 501.
21. J. M. Harnly, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14** (1999) 137.

22. B. E. Erickson, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 543A.
23. D. L. Tsalev, "Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice", vol. III, CRC Press, New York, 1984.
24. R. A. Goyer, C. D. Klaassen, M. P. Waalkes, "Metal Toxicology", Academic Press, San Diego, 1995.
25. J. Savory, M. R. Wills, *Clin. Chem.*, **38** (1992) 1565.
26. P. A. Walravens, *Clin. Chem.*, **26** (1980) 185.
27. M. Patriarca, A. Menditto, G. Di Felice, F. Petrucci, S. Caroli, M. Merli, C. Valente, *Microchem. J.*, **59** (1998) 194.
28. A. T. Diplock, *Am. J. Clin. Nutr.*, **53** (1991) 189S.
29. R. A. Goyer, *Am. J. Clin. Nutr.*, **61(S)** (1995) 646S.
30. C. Vandecasteele, C. B. Block, "Modern Methods for Trace Element Determination", John Wiley & Sons, West Sussex, 1994.
31. H. H. Sandstead, *Am. J. Clin Nutr.*, **61(S)** (1995) 621S.
32. L. Salmenperä, *Clin. Biochem.*, **30** (1997) 115.
33. D. L. Tsalev, *J. Anal. At. Spectrom.*, **9** (1993) 405.
34. N. W. Alcock, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 463A.
35. N. W. Alcock, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 503R.
36. G. Komaromy-Hiller, *Anal. Chem.*, **71** (1999) 338R.
37. S. Levi, R. C. Fortin, W. C. Purdy, *Anal. Chim. Acta*, **127** (1981) 103.
38. S. T. Wang, H. P. Demshar, *Clin. Chem.*, **39** (1993) 1907.
39. S. Lapointe, A. LeBlanc, *At. Spectros.*, **17** (1996) 163.
40. M. S. Clegg, B. Lönnerdal, L. S. Hurley, C. L. Keen, *Anal. Biochem.*, **157** (1986) 12.
41. A. Hulanicki, E. Bulska, B. Godlewska, K. Wrobel, *Anal. Lett.*, **22** (1989) 1341.
42. F. R. Moreira, F. Pivetta, *At. Spectros.*, **19** (1998) 137.
43. A. S. Luna, R. C. de Campos, *At. Spectros.*, **20** (1999) 108.
44. D. Bohrer, S. G. Pomblum, P. C. do Nascimento, J. S. Bastianello, A. Ramirez, *Anal. Lett.*, **33** (2000) 1265.

45. K. Saeed, Y. Thomassen, F. J. Langmyhr, *Anal. Chim. Acta*, **110** (1979) 285.
46. G. Alfthan, J. Kumpulainen, *Anal. Chim. Acta*, **140** (1982) 221.
47. K. Saeed, Y. Thomassen, *Anal. Chim. Acta*, **143** (1982) 223.
48. D. C. Paschal, M. M. Kimberly, *At. Spectros.*, **7** (1986) 75.
49. G. Morisi, M. Patriarca, A. Menotti, *Clin. Chem.*, **34** (1988) 127.
50. D. McMaster, N. Bell, P. Anderson, A. H. G. Love, *Clin. Chem.*, **36** (1990) 211.
51. M. Hoenig, *Analisis*, **19** (1991) 41.
52. P. Van Dael, R. Van Cauwenbergh, H. Robberecht, H. Deelstra, *At. Spectros.*, **16** (1995) 251.
53. I. Harrison, D. Littlejohn, G. S. Fell, *Analyst*, **121** (1996) 189.
54. O. Mestek, M. Suchánek, Z. Vodicková, B. Zemanová, T. Zíma, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12** (1997) 85.
55. B. Gammelgaard, O. Jøns, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12** (1997) 465.
56. R. Sabé, R. Rubio, L. García-Beltrán, *Anal. Chim. Acta*, **398** (1999) 279.
57. M. Feuerstein, G. Schlemmer, *At. Spectros.*, **20** (1999) 180.
58. D. E. Nixon, T. P. Moyer, M. F. Burritt, *Spectrochim. Acta*, **54B** (1999) 931.
59. N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Biochem.*, **280** (2000) 195.
60. N. E. Vieira, J. W. Hansen, *Clin. Chem.*, **27** (1981) 73.
61. R. C. Whitehouse, A. S. Prasad, P. I. Rabbani, Z. T. Cossack, *Clin. Chem.*, **28** (1982) 475.
62. P. C. D'Haese, L. V. Lamberts, A. O. Vanheule, M. E. De Broe, *Clin. Chem.*, **38** (1992) 2439.
63. K. S. Subramanian, *Spectrochim. Acta*, **51B** (1996) 291.
64. M. L. P. Collins, M. R. J. Salton, *Biochim. Biophys. Acta*, **553** (1979) 40.
65. T. M. Mahmood, H. Qiao, K. W. Jackson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **10** (1995) 43.
66. B. Welz, G. Schlemmer, J. R. Mudakavi, *J. Anal. At. Spectrom.*, **7** (1992) 1257.

67. H. Qiao, K. W. Jackson, *Spectrochim. Acta*, **46B** (1991) 1841.
68. D. L. Styris, L. J. Prell, D. A. Redfield, J. A. Holcombe, D. A. Bass, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 508.
69. S. A. Lewis, T. C. O'Haver, J. M. Harnly, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 1651.
70. S. A. Lewis, T. C. O'Haver, J. M. Harnly, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 2.
71. 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, *Pure Appl. Chem.*, **67** (1995) 1575.
72. P. J. Parsons, W. Slavin, *Spectrochim. Acta*, **48B** (1993) 925.
73. E. C. Lima, F. J. Krug, K. W. Jackson, *Spectrochim. Acta*, **53B** (1998) 1791.
74. L. Mei, N. Zhe-Ming, R. Zhu, *Spectrochim. Acta*, **53B** (1998) 1381.
75. H. Docekalová, B. Docekal, J. Komárek, I. Novotný, *J. Anal. At. Spectrom.*, **6** (1991) 661.
76. B. Gammelgaard, E. H. Larsen, *Talanta*, **47** (1998) 503.
77. V. Majidi, J. D. Robertson, *Spectrochim. Acta*, **46B** (1991) 1723.
78. R. Sabé, R. Rubio, L. García-Beltrán, *Anal. Chim. Acta*, **419** (2000) 121.
79. F. J. Fernandez, R. Giddings, *At. Spectros.*, **3** (1982) 61.
80. B. Radziuk, Y. Thomassen, *J. Anal. At. Spectrom.*, **7** (1992) 397.
81. N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, **390** (1999) 207.
82. N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Analyst*, **125** (2000) 313.
83. P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, **356** (1997) 267.
84. H. I. Tekgül, S. Akman, *Spectrochim. Acta*, **52B** (1997) 621.
85. J. P. Byrne, M. M. Lamoureux, C. L. Chakrabarti, T. Ly, D. C. Grégoire, *J. Anal. At. Spectrom.*, **8** (1993) 599.
86. Z. A. Grosser, *At. Spectros.*, **17** (1996) 229.
87. R. F. Browner, A. W. Boorn, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 786A.
88. A. Taylor, *Ann. Clin. Biochem.*, **34** (1997) 142.