

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Tese de doutorado**

**Determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas  
com ácido fórmico por espectrometria de massa com plasma  
indutivamente acoplado**

**Luciano Tormen**

Florianópolis - SC  
2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas  
com ácido fórmico por espectrometria de massa com plasma  
indutivamente acoplado**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Luciano Tormen**

Orientador: Adilson José Curtius  
Co-orientador (a): Vera L. A. Frescura

Florianópolis, maio de 2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tormen, Luciano

Determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado [tese] / Luciano Tormen ; orientador, Adilson José Curtius ; co-orientadora, Vera Lúcia Azzolin Prescura Bascuñan. - Florianópolis, SC, 2012. 113 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

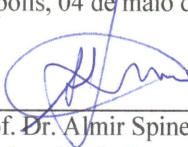
Inclui referências

1. Química. 2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. 3. Preparo de amostras. 4. Ácido fórmico. 5. Amostras biológicas. I. Curtius, Adilson José. II. Azzolin Prescura Bascuñan, Vera Lúcia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Luciano Tormen  
**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS  
BIOLÓGICAS TRATADAS COM ÁCIDO FÓRMICO POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA  
INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

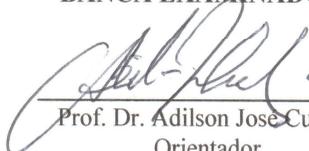
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em  
Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 04 de maio de 2012.



Prof. Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Adilson José Curtius  
Orientador



Prof. Dra. Iolanda Cruz Vieira  
DQ-UFSC



Prof. Dra. Véra Frescura Bascunã  
Co-orientadora



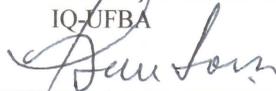
Prof. Dr. Eduardo Carasek  
DQ-UFSC



Prof. Dra. Maria das Graças Andrade Korn  
IQ-UFBA



Prof. Dra. Dirce Pozebon  
IQ-UFRGS



Prof. Dr. Ivan Gonçalves de Souza  
DQ-UFSC



## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Adilson José Curtius, pelos valiosos ensinamentos, profissionalismo, ética e amizade.

À orientadora Vera, pela orientação, carinho e amizade.

Aos professores membros da comissão examinadora deste trabalho, pelas valiosas sugestões.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório, que de uma maneira ou de outra contribuíram com este trabalho e pela amizade, proporcionando um ambiente descontraído e alegre no laboratório.

Ao Jairo e ao Roberto, presenças fundamentais para o bom funcionamento dos equipamentos e do laboratório.

Aos secretários da Pós-Graduação pelo auxílio e prestatividade.

À minha esposa e família, pelo apoio.



## Resumo

Este trabalho propõe a solubilização com ácido fórmico como um procedimento alternativo à digestão ácida no preparo de amostras biológicas. O uso de um micronebulizador ou de um vaporizador eletrotérmico para a introdução da solução da amostra num espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, visando à determinação de elementos traço também foi proposta. O preparo de amostras biológicas usando ácido fórmico é fácil, rápido e eficiente quando realizado a 90 °C, é baixo custo e não exige nenhum equipamento especial, além de um sistema para o aquecimento das amostras, permitindo elevada frequência analítica. O procedimento proposto produz pequena quantidade de resíduos e permite a análise de quantidade pequena da amostra, além de fazer o uso de apenas um reagente, que pode ser obtido em elevado grau de pureza, diminuindo-se as possibilidades de contaminação da amostra. Embora o uso de ácido fórmico na solubilização de amostra resulte em soluções com elevado teor de compostos orgânicos, a análise dessas soluções pode ser facilmente realizada por ICP-MS, usando-se sistemas adequados para a introdução de amostras, como o nebulizador microconcêntrico ou o vaporizador eletrotérmico. Usando o micronebulizador é possível a introdução de soluções com até 90% (v/v) de ácido fórmico no plasma sem causar perturbações no mesmo e sem a formação de depósitos de carbono nos cones da interface. Usando-se potência de radiofrequência de 800 W e vazão do gás do nebulizador de 0,7 L min<sup>-1</sup> foi obtida melhor sensibilidade e os menores sinais de interferentes poliatômicos, permitindo a determinação multielementar de 18 elementos usando-se a calibração externa com solução de calibração contendo ácido fórmico 50% (v/v) e <sup>103</sup>Rh<sup>+</sup> como padrão interno. Os limites de detecção variaram de 0,5 µg kg<sup>-1</sup> (Tl) a 220 µg kg<sup>-1</sup> (Fe). Usando-se o vaporizador eletrotérmico como sistema de introdução de amostra, o número de elementos que pode ser quantificado em uma mesma análise fica limitado devido às diferenças nas propriedades térmicas dos elementos e pela incapacidade do instrumento utilizado medir sinais transientes rápidos; mesmo assim, foram quantificados 8 elementos. A melhor sensibilidade e os menores sinais de interferentes foram obtidos com potência de radiofrequência de 1300 W, pirólise em 1000 °C e vaporização em 2400 °C, com 2 µg de paládio como modificador/carreador. Foram obtidos resultados satisfatórios usando

## II

soluções de calibração sem ou com ácido fórmico 5% (v/v) com limites de detecção que variaram de  $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Co) a  $850 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Fe). Os parâmetros de mérito obtidos usando os dois sistemas de introdução de amostra no plasma são da mesma ordem de grandeza, entretanto o nebulizador microconcêntrico é sistema mais prático, apresenta menor custo de capital e não exige nenhum material de consumo. A frequência analítica usando o nebulizador microconcêntrico é aproximadamente 6 vezes maior do que usando o vaporizador eletrotérmico. Baseadas nessas características, o nebulizador microconcêntrico é o sistema indicado para a análise de rotina.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, preparo de amostras, ácido fórmico, amostras biológicas.

## Abstract

In this work, the solubilization with formic acid is proposed as an alternative procedure to acid digestion for biological samples preparation. The use of a micronebulizer or an electrothermal vaporizer for the introduction of sample solution in an inductively coupled plasma mass spectrometer for the trace elements determination is also proposed. The solubilization of biological samples using formic acid is fast, easy and efficient when performed at 90 °C, has low cost, not requiring especial equipment, except a system to heat the mixture, allowing high sample throughput. The proposed procedure produces little laboratory waste, allows the use of a small amount of sample and uses only one reagent, which can be obtained at high purity degree, reducing the possibility of contamination. Although the sample solubilization with formic acid results in a solution with high load of organic compounds, the analysis of these solutions can be easily performed by ICP-MS using an appropriate sample introduction system, such as a micronebulizer or an electrothermal vaporizer. Using a micronebulizer, it is possible to introduce into the plasma solutions with up to 90% v/v formic acid without plasma disturbance and without the formation of carbon deposits on the cones and interface. Using a radiofrequency power of 800 W and nebulizer gas flow rate of 0.7 L min<sup>-1</sup> the better sensitivity and lower signals of polyatomic interferences were obtained, allowing the multielemental determination of 18 elements using external calibration with standard solution containing 50% v/v formic acid and <sup>103</sup>Rh<sup>+</sup> as internal standard. The detection limits were from 0.5 µg kg<sup>-1</sup> (Tl) to 220 µg kg<sup>-1</sup> (Fe). Using the electrothermal vaporizer as a sample introduction system, the number of elements that can be quantified in the same analysis is limited due to differences in the thermal properties of the elements and the instrument incapability to register fast transient signals, even so, eight elements were quantified. The best sensitivity and the lowest interfering signals were obtained with a radiofrequency power of 1300 W, pyrolysis at 1000 °C, vaporization at 2400 °C and 2 µg of palladium as modifier/carrier. Satisfactory results were obtained using calibration with standard solutions containing or not formic acid 5% v/v. The detection limits were from 0.01 µg kg<sup>-1</sup> (Co) to 850 µg kg<sup>-1</sup> (Fe). The merit parameters obtained using the two sample introduction systems were at the same intensity order, however the microconcentric nebulizer is more practical, has a lower cost and not requires

## IV

consumables. The sampling throughput using a microconcentric nebulizer is approximately 6 times higher than using the electrothermal vaporizer. Based on these characteristics the microconcentric nebulizer system is the best choice for routine analysis.

**Keywords:** Inductively coupled plasma mass spectrometry, sample preparation, formic acid, biological samples.

## Lista de figuras

- Figura 1:** Esquema de um ICP-MS com possíveis sistemas de introdução da amostra..... 18
- Figura 2:** Nebulizadores pneumáticos: **a)** Concêntrico; **b)** fluxo cruzado..... 24
- Figura 3:** Micronebulizadores pneumáticos. **a)** de alta eficiência; **b)** MCN; **c)** Micromist e **d)** nebulizador de consumo total..... 27
- Figura 4:** Esquema do vaporizador eletrotérmico usado em conjunto com ICP-MS, em: (a) etapas de pré-tratamento e (b) etapa de vaporização..... 29
- Figura 5:** Etapas do processo de solubilização da amostra Tort 2: a) 75 mg de amostra dentro do tubo; b) amostra e 5 mL de ácido homogeneizados; c) amostra solubilizada; d) amostra solubilizada, diluída até 10 mL com água e ácido nítrico até a concentração final de 1% (v/v)..... 46
- Figura 6:** Efeito da concentração de ácido fórmico sobre a sensibilidade relativa dos analitos. O sinal é relativo ao valor obtido para uma solução sem ácido fórmico. Concentração dos analitos: 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais. Potência de RF: 1100 W, vazão do gás do nebulizador: 0,9 L  $\text{min}^{-1}$ , vazão da amostra: 30  $\mu\text{L min}^{-1}$  ..... 48
- Figura 7:** Aumento de sensibilidade versus potencial de ionização (eV) para elementos em solução contendo ácido fórmico 90% (v/v). O aumento de sensibilidade refere-se ao sinal do analito em água e ácido nítrico 1% (v/v)..... 49
- Figura 8:** Efeito do ácido fórmico sobre as razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+}$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^{+}$ . Potência de RF: 1100 W, vazão de gás nebulizador: 0,9 L  $\text{min}^{-1}$ , vazão da amostra: 30  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Uma solução contendo 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce foi utilizada..... 51
- Figura 9:** Efeito do ácido fórmico sobre os sinais dos íons poliatômicos. Os sinais são relativos aos valores obtidos para uma solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1100 W, vazão do gás nebulizador: 0,9 L  $\text{min}^{-1}$  e vazão da amostra: 30  $\mu\text{L min}^{-1}$  ..... 53

- Figura 10:** Efeito da vazão do gás do nebulizador nas razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  para uma solução aquosa  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce contendo ácido fórmico 50% (v/v) e  $\text{HNO}_3$  1% (v/v). Potência de RF: 1100 W e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 54
- Figura 11:** Efeito da potência de RF nas razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  para uma solução aquosa com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce contendo ácido fórmico 50% (v/v) e  $\text{HNO}_3$  1% (v/v). Vazão do gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  e Vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 55
- Figura 12:** Efeito da vazão do gás nebulizador (a) e da potência de RF (b) na formação de íons poliatômicos para uma solução aquosa contendo ácido fórmico 50% (v/v),  $\text{HNO}_3$  1% (v/v) e  $\text{HCl}$  0,1% (v/v). O sinal é relativo ao valor máximo obtido para cada íon. Vazão do gás do nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  para a otimização da potência de RF, potência de RF: 1100 W para a otimização vazão do gás nebulizador e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 56
- Figura 13:** Efeito da vazão do gás do nebulizador na intensidade do sinal dos analitos para uma solução aquosa sem ácido fórmico (a) e com ácido fórmico 50% (v/v) (b). O sinal é relativo ao maior valor obtido para cada íon em cada caso. Concentração dos analitos:  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  para os demais, potência de RF: 1100 W e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 58
- Figura 14:** Efeito da potência de RF na intensidade do sinal dos analitos para uma solução aquosa sem ácido fórmico (a) e com ácido fórmico 50% (v/v) (b). O sinal é relativo ao maior valor obtido para cada íon em cada caso. Concentração dos analitos:  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  para os demais, vazão de gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 59
- Figura 15:** Efeito do ácido fórmico na estabilidade do sinal do  $^{103}\text{Rh}^+$  em função do tempo. O sinal é relativo à medida realizada em tempo zero. Concentração de Rh:  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , vazão do gás nebulizador:  $0,7 \text{ L min}^{-1}$ , potência de RF: 800 W e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ..... 61

- Figura 16:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra TORT 2. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1..... 69
- Figura 17:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Oyster Tissue”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1..... 70
- Figura 18:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Bovine Liver”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1..... 71
- Figura 19:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Dolt 3”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1..... 72
- Figura 20:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600°C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL  $\text{min}^{-1}$ , vazão do gás carreador: 1,025 L  $\text{min}^{-1}$  e potência de RF: 1100 W..... 75

- Figura 21:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{13}\text{C}^+$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; Amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600°C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W..... 77
- Figura 22:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$  e  $^{51}\text{V}^+$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; Amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600°C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W..... 79
- Figura 23:** Influência da massa de paládio (µg) nos sinais de  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ : solução aquosa (—■—) e amostra tratada com ácido fórmico (—●—). Volume da solução de paládio: 20 µL, volume de amostra: 20 µL. Pirólise em 1000°C e vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W..... 81
- Figura 24:** Influência da massa de paládio (µg) nos sinais de  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$  e  $^{51}\text{V}^+$ : solução aquosa (—■—) e amostra tratada com ácido fórmico (—●—). Volume da solução de paládio: 20 µL, volume de amostra: 20 µL. Pirólise em 1000°C e vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W..... 83
- Figura 25:** Avaliação da potência de RF no sinal dos analitos, para a amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido para cada analito. Foram usados 2 µg de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20 µL. Pirólise em 1000°C; vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup> e vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup>..... 84

- Figura 26:** Influência da vazão do gás carreador para o sinal dos analitos na amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido para cada analito. Foram usados 2  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$ . Pirólise em 1000°C; vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150  $\text{mL min}^{-1}$  e potência de RF: 1300 W..... 85
- Figura 27:** Influência da vazão de gás interno no sinal dos analitos na amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido em cada curva. Foram usados 2  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$ . Pirólise em 1000°C; vaporização em 2400 °C. Vazão do gás carreador: 1,0  $\text{L min}^{-1}$  e potência de RF: 1300 W..... 86
- Figura 28:** Influência da quantidade de ácido fórmico na intensidade do sinal dos analitos. Concentração dos analitos: 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A intensidade do sinal foi normalizada em relação ao valor obtido para o analito em solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1300 W, vazão do gás carreador: 1,0  $\text{L min}^{-1}$ , vazão do gás interno: 150  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura de pirólise: 1000 °C; temperatura de vaporização: 2400 °C; volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$  e massa de paládio (como modificador/carreador): 2  $\mu\text{g}$ ..... 88
- Figura 29:** Efeito da quantidade de ácido fórmico sobre a intensidade dos íons poliatômicos. A intensidade do sinal foi normalizada em relação ao valor obtido para o analito em solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1300 W, vazão do gás carreador: 1,0  $\text{L min}^{-1}$ , vazão do gás interno: 150  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura de pirólise: 1000 °C; temperatura de vaporização: 2400 °C; volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$  e massa de paládio (como modificador/carreador): 2  $\mu\text{g}$ ..... 89



## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Quantidade usualmente disponível de diferentes tipos de amostra e os elementos determinados nas mesmas..... 26
- Tabela 2:** (A) Parâmetros operacionais e de aquisição de dados nas determinações por ICP-MS (B) Programa de temperatura do ETV..... 38
- Tabela 3:** Isótopos monitorados, suas abundâncias e principais interferências espectrais (a massa de cada isótopo é dada por unidades de massa atômica, u)..... 41
- Tabela 4:** Figuras de mérito do método proposto para a determinação de elementos traço por ICP-MS em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, usando-se nebulizador microconcêntrico como sistema de introdução da amostra no ICP (método proposto) ou amostras digeridas usando-se um nebulizador convencional (método convencional). n = 10 (LOD) e n = 3 (RSD)..... 64
- Tabela 5:** Concentrações obtidas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de referência TORT 2 e “Bovine Liver” tratadas com ácido fórmico, usando-se calibração com padrões aquosos sem ácido fórmico e ácido fórmico 50% (v/v). n = 3..... 66
- Tabela 6:** Concentrações obtidas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de referência “Oyster Tissue” e DOLT 3 tratadas com ácido fórmico, usando-se calibração com padrões aquosos sem ácido fórmico e ácido fórmico 50% (v/v). n = 3..... 67
- Tabela 7:** Figuras de mérito do método desenvolvido para a determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, usando-se ETV como sistema de introdução da amostra no ICP. n = 10 (LOD) ou n = 3 (RSD) 91
- Tabela 8:** Concentrações obtidas, em  $\text{mg kg}^{-1}$  dos elementos, nas amostras biológicas (média  $\pm$  intervalo de confiança de 95%). As amostras foram tratadas com ácido fórmico e analisadas por ETV-ICP-MS, usando-se a calibração externa, com soluções de calibração aquosas, sem e com ácido fórmico 5% (v/v). n = 3..... 93

## XII

**Tabela 9:** Concentrações obtidas, em  $\text{mg kg}^{-1}$  dos elementos, nas amostras biológicas (média  $\pm$  intervalo de confiança de 95%). As amostras foram tratadas com ácido fórmico e analisadas por ETV-ICP-MS, usando-se a calibração externa com soluções de calibração aquosas, sem e com ácido fórmico 5% (v/v). n = 3..... 94  
..

**Lista de abreviaturas**

**AFS:** Espectrometria de fluorescência atômica;  
**CV AAS:** Espectrometria de absorção atômica acoplada a geração de vapor frio;  
**CVG:** Geração química de vapor;  
**DC:** Corrente direta;  
**ET AAS:** Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica;  
**ETV:** Vaporizador eletrotérmico;  
**FI:** Injeção em fluxo;  
**GC:** Cromatografia gasosa;  
**HPLC:** Cromatografia líquida de alta eficiência;  
**ICP OES:** Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado;  
**ICP-MS:** Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado;  
**LA:** Ablação a laser;  
**LOD:** Limite de detecção;  
**LOQ:** Limite de quantificação;  
**MCN:** Nebulizador microconcêntrico;  
**m/z:** Razão entre a massa e a carga de um íon;  
**PN:** Nebulizador pneumático;  
**PFA:** Perfluoralcóxi;  
**PTFE:** Politetrafluoretileno;  
**RF:** Radiofrequência;  
**RSD:** Desvio padrão relativo;  
**TMAH:** Hidróxido de tetrametilamônio;  
**USN:** Nebulizador ultrasônico;  
**UV:** Radiação ultravioleta.



## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1	Preparo de amostras.....	3
2.1.1	Decomposição de amostras por combustão.....	4
2.1.2	Decomposição de amostras por via úmida.....	6
2.1.3	Decomposição assistida por radiação microondas.....	9
2.1.4	Solubilização de amostras com reagentes orgânicos.....	11
2.1.4.1	Procedimentos baseados no uso de hidróxido de tetrametil amônio.....	12
2.1.4.2	Procedimentos baseados no uso de ácido fórmico.....	13
2.1.4.3	Procedimentos baseados no uso de aminas terciárias solúveis em água.....	15
2.2	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado..	17
2.2.1	Princípios de funcionamento.....	17
2.2.2	Interferências em ICP-MS.....	20
2.2.2.1	Interferências espectrais.....	21
2.2.2.2	Interferências não espectrais.....	21
2.2.3	Sistemas para a introdução de amostra em ICP-MS.....	22
2.2.3.1	Nebulizadores pneumáticos.....	23
2.2.3.2	Micronebulizadores.....	25
2.2.3.3	Vaporização eletrotérmica.....	28
2.2.4	A análise de amostras orgânicas por ICP-MS.....	31
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>35</b>
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivo específico.....	35
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>37</b>
4.1	Instrumentação.....	37
4.2	Reagentes e amostras.....	39
4.3	Preparo das amostras.....	39
4.4	Escolha dos isótopos.....	40
4.5	Procedimentos.....	40
4.5.1	Introdução da amostra no ICP com o micronebulizador	40
4.5.2	Introdução da amostra no ICP com o vaporizador eletrotérmico.....	42
<b>5</b>	<b>Resultados e discussões.....</b>	<b>45</b>
5.1	Solubilização de amostras biológicas com ácido fórmico.....	45
5.2	Introdução da amostra no ICP com o micronebulizador.....	47
5.2.1	Efeito do ácido fórmico sobre a sensibilidade.....	47
5.2.2	Efeito do ácido fórmico sobre as interferências.....	50

5.2.3	Avaliação da potência de radiofrequência e vazão do gás do nebulizador.....	57
5.2.4	Aplicação do método.....	62
5.2.5	Conclusões relacionadas com o uso do micronebulizador.....	73
5.3	Introdução da amostra no ICP com o vaporizador eletrotérmico.....	74
5.3.1	Otimização de curvas de pirólise e vaporização.....	74
5.3.2	Efeito da massa de carreador.....	80
5.3.3	Influência da potência de radiofrequência e vazão dos gases.....	84
5.3.4	O efeito da concentração de ácido fórmico.....	87
5.3.5	Aplicação do método.....	90
5.3.6	Conclusões relacionadas com o uso da vaporização eletrotérmica.....	95
<b>6</b>	<b>Conclusões finais</b> .....	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>113</b>

## 1 Introdução

Atualmente, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é a técnica mais versátil para a determinação de elementos traço, podendo determinar rotineiramente quase todos os elementos da tabela periódica em níveis que podem variar de  $\text{pg g}^{-1}$  a  $\text{mg g}^{-1}$  [1]. Desde o surgimento das primeiras publicações que descreveram a fonte de plasma para a espectrometria de massa como uma técnica analítica para a determinação de elementos, um grande número delas detalhou os desenvolvimentos instrumentais e suas aplicações. Também, desde o início não existiam esperanças de que a técnica fosse livre de interferências, mesmo o espectro de massa sendo relativamente simples [2-4]. Assim, os aparelhos de ICP-MS, inicialmente, foram projetados para analisar exclusivamente água, mas o sucesso da técnica e a necessidade de realizar análises de outras matrizes mais complexas fizeram com que sua aplicação se expandisse.

Tal como outras técnicas analíticas, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado também exige um pré-tratamento das amostras, que é uma etapa muito crítica da análise. Em geral, é nesta etapa que se gasta mais tempo e é a de maior custo, na qual se pode cometer muitos erros; por isso, as etapas de um procedimento de pré-tratamento de amostra devem ser sempre executadas cuidadosamente. A maneira de se tratar a amostra para uma análise depende da natureza da amostra, do elemento a ser determinado, da sua concentração, do método e da técnica de determinação, da precisão e da exatidão desejada, etc. Geralmente, amostras biológicas são submetidas a processos de digestão por via úmida, nos quais a amostra é decomposta. Contudo esses procedimentos são demorados, requerem grandes quantidades de reagentes tóxicos e corrosivos, que elevam o custo da análise e podem contaminar as amostras [5]. Como alternativa, tem sido proposta a utilização de reagentes orgânicos, como o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) [6] e o ácido fórmico para o tratamento de amostras biológicas [7,8]. A utilização destes se destaca pela facilidade de manuseio, rapidez no procedimento, baixo custo e a possibilidade da utilização de pouca quantidade de amostra. Além disso, por preservarem intactas algumas espécies químicas de determinados elementos, diversos estudos têm sugerido a utilização destes compostos orgânicos na preparação de amostras para posteriores estudos de especiação.

Embora procedimentos alternativos para o preparo de amostra tenham sido propostos, freqüentemente, eles não podem ser aplicados quando a técnica de análise é ICP-MS, pois elevados níveis de sólidos dissolvidos e/ou a presença de compostos orgânicos podem causar uma série de interferências, impossibilitando o uso desta técnica quando sistemas convencionais de introdução de amostras no ICP, como nebulizadores pneumáticos, forem utilizados. Assim, existe a necessidade de estudos para a utilização de sistemas alternativos de introdução de amostra em ICP-MS, de maneira a possibilitar a análise de amostras mais complexas com precisão e exatidão, sem causar danos ao instrumento e prejuízos à qualidade dos resultados [9].

Muitos grupos de pesquisa têm dedicado esforços em estudos de especiação de elementos, nos quais métodos de separação são acoplados aos espectrômetros de massa com plasma indutivamente acoplado e geralmente são utilizados solventes orgânicos como meio extrator ou eluente, aumentando a necessidade do uso de sistemas alternativos de introdução da amostra no ICP, que permitem a análise da solução resultante. Além disso, os princípios que norteiam a química verde estão indicando novos rumos aos químicos, entre os quais a necessidade de sistemas mais eficientes, que permitem menor uso de reagentes e a menor geração de resíduos [10].

De maneira a permitir a introdução de amostras complexas no plasma e, ao mesmo tempo, estar de acordo com a química verde, os micronebulizadores [11] e o vaporizador eletrotérmico (ETV) [12] têm se destacado, pois além de permitirem a introdução de amostras complexas no plasma, sem causar interferências e danos ao instrumento, eles permitem o uso de quantidades muito pequenas de amostras e, conseqüentemente, de reagentes para o seu preparo, diminuindo os custos de análise e da quantidade de resíduos gerados. Além disso, os micronebulizadores e o ETV se destacam pela alta eficiência de introdução da amostra no ICP, diminuição de interferências, e permitem a análise direta de uma série de amostras que até então não era possível, sem procedimentos laboriosos de preparo das mesmas, aumentando-se a frequência analítica.

Neste trabalho são descritos os efeitos do ácido fórmico sobre as principais interferências e no sinal analítico quando introduzido num ICP-MS, utilizando-se um micronebulizador e o ETV. Também é avaliada a eficiência do uso do ácido fórmico para a solubilização de amostras biológicas e o desempenho do ICP-MS na análise destas amostras em relação a elementos traço.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Preparo de amostras

A análise de amostras *in situ* é, em princípio, ideal, pois pode ser feita diretamente no local original da amostra, além da sequência analítica ficar restrita a menos etapas, tornando-se mais simples. Entretanto, são poucos os equipamentos com as características adequadas para serem levados a campo e usados na determinação de qualquer espécie em todo o tipo de amostra. No laboratório, a amostra deve ser submetida a um tratamento adequado, visando a determinação dos analitos. Este tratamento pode variar desde um simples polimento da superfície das amostras, até a completa transformação das amostras sólidas em uma solução compatível com o método de análise. A maneira de se decompor a amostra para a análise depende de sua natureza, do elemento a ser determinado e sua concentração, do método de determinação, da precisão e exatidão desejadas. Em geral, a amostra deve ser convertida em uma forma adequada, para que a espécie química de interesse seja determinada. Somente na mais simples das situações, a amostra poderá ser analisada sem qualquer tipo de pré-tratamento. Em muitos casos, o pré-tratamento é um método de separação, que permite separar o analito da matriz [5].

Para realizar uma análise elementar, normalmente é necessário um procedimento para liberar os analitos da matriz (biológica ou orgânica) e transformá-los em espécies inorgânicas simples. Frequentemente, mas não sempre, esse procedimento é conduzido em meio aquoso. Em geral, esses procedimentos têm uma relação com o tratamento de sólidos, em que a decomposição química geralmente está envolvida, levando à completa destruição da matriz. A maioria dos procedimentos envolvem a oxidação da matriz, que é convertida em  $\text{CO}_x$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$  e  $\text{N}_2$ , enquanto outros elementos são convertidos em espécies inorgânicas simples. Geralmente, estes processos são oxidativos [13]. Em geral, a amostra biológica original não é adequada para análise direta sem pré-tratamento, pelas seguintes razões: o elemento a ser determinado é mantido na forma de complexos por ácidos orgânicos ou outros ligantes presentes na amostra; a cor da amostra interfere em determinações por espectrometria de absorção molecular; pode ocorrer a formação de emulsão, espuma ou precipitado durante a análise; o elemento a ser determinado não se encontra dissolvido, que é um requisito para a maioria das técnicas de análise; em

tecidos biológicos, os elementos traço estão presentes em formas químicas diversas; algumas espécies não mostram qualquer sinal durante as medidas, enquanto outras oferecem sinal com diferentes intensidades; as amostras geralmente são heterogêneas [5].

De maneira geral, os procedimentos de preparo de amostras biológicas podem ser divididos em três grandes grupos: 1) Decomposição de amostras por combustão; 2) decomposição de amostras por via úmida; 3) solubilização de amostras com reagentes orgânicos (TMAH, ácido fórmico e aminas terciárias solúveis em água).

### **2.1.1 Decomposição de amostras por combustão**

Nestes procedimentos, a amostra é aquecida em um frasco em que temperatura é controlada, no qual a fração orgânica da amostra é queimada com oxigênio. Os resíduos geralmente são óxidos, sulfatos, fosfatos e silicatos de metais não voláteis, que são solubilizados em ácidos inorgânicos para posterior análise [13]. Existem diversas variações desse procedimento, cada uma com suas características específicas.

A decomposição pode ser realizada em frascos abertos (cadinho de porcelana ou quartzo) e aquecimento em forno mufla, sendo este procedimento chamado de “incineração a seco”. O principal problema desta técnica é que o analito pode ser convertido a espécies voláteis e ser parcialmente perdido. Este tipo de problema pode ser facilmente contornado usando-se temperaturas menores, entretanto isso irá resultar na combustão incompleta da amostra, o que também poderá causar erros. Portanto, deve ser utilizada uma temperatura de compromisso, de maneira a eliminar a matriz sem perder o analito. Além de perder C, H e N devido à queima da amostra, também pode haver a volatilização de S, Se, P, As, Sb, Ge, Tl e Hg [14]. O processo de aquecimento pode ser realizado em muflas, banhos de areia ou por microondas. Entretanto, os procedimentos com microondas exigem aparatos de alto custo, além de apresentarem a mesma eficiência de outros sistemas de aquecimento [15].

Devido a decomposição em elevadas temperaturas promover perdas dos analitos mais voláteis, foi desenvolvido um sistema de decomposição em baixas temperaturas. O procedimento é realizado passando um fluxo de oxigênio à baixa pressão (1- 5 torr) em um campo elétrico de alta frequência, que pode ser gerado por uma corrente em radiofrequência ou por microondas. Ao passar por esse campo elétrico, o oxigênio é convertido em “oxigênio excitado” que é uma mistura de

átomos, íons e moléculas de oxigênio (plasma). Essa mistura gasosa muito reativa é capaz de oxidar eficientemente as amostras, mesmo a 150 °C [13,14]. Na prática, esse sistema reduz consideravelmente as perdas por volatilização, exceto para halogênios, Hg e S. As limitações desta técnica são de que o plasma de oxigênio não consegue alcançar o centro da amostra, portanto a amostra deve ser agitada mecanicamente, procedimento que apenas pode ser realizado desligando-se o sistema. Além disso, o processo de decomposição é relativamente lento, frequentemente dura horas ou até mesmo dias [13]. De maneira geral, os benefícios da decomposição em baixas temperaturas são os mesmos da incineração a seco, incluindo a possibilidade de determinação de elementos voláteis, menor possibilidade de contaminação, maior eficiência de decomposição, inclusive permitindo a decomposição de materiais de difícil preparo e a diminuição de interferências. Embora exista um aumento de custos devido à aquisição do sistema e ao consumo de energia e de reagente, em longo prazo torna-se vantajoso pela sua eficiência, além de ser mais seguro [14,16].

Além dos processos de decomposição em sistemas abertos, nos quais pode haver perdas de determinados elementos, também foram desenvolvidos sistemas de decomposição em frascos fechados. O procedimento de Schöniger consiste no uso de um frasco cônico de vidro ou quartzo com uma rolha de vidro. Na rolha é fixada uma haste rígida (geralmente de platina) com uma cesta na extremidade, na qual é fixada a amostra, que deve estar enrolada num papel de filtro. No frasco, são adicionados poucos mL de uma solução, que geralmente é de ácido (para a determinação de metais) ou uma base (para a determinação de não-metais). Posteriormente, o frasco é purgado com oxigênio e imediatamente é fechado com a rolha, que tem fixado em si a haste metálica e a amostra na cesta. No fechamento do sistema, o papel de filtro, que envolve a amostra, deve ter uma saliência acesa. O papel e a amostra queimam na atmosfera de oxigênio, pressurizando consideravelmente o frasco. Após a queima do material dentro do frasco, é adequado deixar o frasco resfriar, sendo posteriormente as cinzas e os compostos voláteis coletados na solução [13,17,18]. O frasco de combustão de Schöniger é um sistema simples e de fácil operação, no qual é possível oxidar amostras orgânicas e biológicas, sendo que os produtos voláteis e não voláteis (cinzas) podem ser recuperados quantitativamente e sem perdas. Entre as principais vantagens desse método é sua simplicidade. Entretanto, pode haver a decomposição

incompleta das amostras, que ocorre geralmente pela quantidade insuficiente de oxigênio no frasco, podendo ser contornada pelo aumento do volume do frasco, diminuição da quantidade de amostra, ou diminuição do tamanho do papel de filtro. Além disso, pode haver a possibilidade de explosão do frasco e baixa precisão (reprodutibilidade do processo), além de sua aplicação ser limitada para a determinação de poucos elementos (S, P, I, F, Cl, Br Se, Cu, Cd e Pb) [17,18].

Existem duas variações do frasco de Schöniger. Em uma delas, as amostras são queimadas dentro de um frasco de aço inox (semelhante a uma bomba calorimétrica) na presença de um excesso de oxigênio, no qual os produtos da reação são absorvidos em uma solução absorvedora (5-10 mL), que é colocada no fundo do frasco. De modo geral, a decomposição por bomba de combustão é um procedimento de decomposição eficiente para todo tipo de amostra, principalmente amostras orgânicas complexas como carvão, combustível e polímeros e resíduos químicos, deixando um teor de carbono residual muito baixo [19-21]. Entretanto é limitada pelas dificuldades de limpeza do sistema e pela baixa taxa de amostragem (uma amostra é queimada de cada vez) [5]. A segunda variação do frasco de Schöniger é chamada de combustão iniciada por microondas, que associa as vantagens da digestão por via úmida com aquecimento por radiação de microondas e as vantagens da combustão em sistemas fechados como a bomba de combustão. O procedimento de preparo da amostra envolve a decomposição das amostras em frascos pressurizados com oxigênio, onde a etapa de ignição é feita através da radiação de microondas. Após o processo de combustão, os analitos são absorvidos em uma solução apropriada; quando necessário pode ser aplicada uma etapa de refluxo para garantir a recuperação quantitativa dos analitos [22,23]. O processo de combustão assistida por radiação de microondas permite uma digestão mais rápida que a digestão por via úmida convencional, utilizando a radiação microondas para o aquecimento. O sistema pode ser adaptado a qualquer forno de microondas [22].

### **2.1.2 Decomposição de amostras por via úmida**

Tal como os processos de decomposição por via seca, a decomposição por via úmida envolvem reações de oxidação, que promovem a decomposição das amostras. Enquanto que por via seca o oxigênio é o agente oxidante, nos processos por via úmida ácidos minerais concentrados agem como oxidantes. A decomposição por via úmida implica no aquecimento das amostras (orgânicas ou biológicas)

na presença de um ou de uma mistura de ácidos minerais. Se o ácido for suficientemente oxidante e a amostra for aquecida o suficiente por um longo período, é possível oxidar completamente os constituintes orgânicos da amostra, deixando os elementos em solução como espécies inorgânicas simples. A decomposição de amostras biológicas ou orgânicas usando ácido nítrico, ácido sulfúrico e o ácido perclórico é um procedimento particularmente útil para a determinação de elementos traço, pois grande parte destes elementos é convertida a cátions, que permanecem estáveis em solução. Essa técnica também pode ser utilizada para a determinação de N, P e S, entretanto alguns elementos como Hg, As, Se, B, Sb e halogênios podem ser perdidos por volatilização se o procedimento for realizado em frascos abertos. A principal vantagem da decomposição por via úmida é que, neste procedimento, as temperaturas são menores do que aquelas alcançadas na decomposição por via seca, o que reduz de maneira significativa as perdas por volatilização. Entretanto, exige maior atenção do usuário, pois, diferentes tipos de ácidos podem ser usados, sendo que em algumas situações somente a combinação de mais de um ácido pode decompor a amostra de maneira desejada, além de que, o tipo de ácido utilizado pode afetar a escolha do método analítico. É muito comum a utilização de ácido nítrico ou ácido sulfúrico em conjunto com peróxido de hidrogênio [5,13,14].

Um procedimento muito conhecido para a decomposição de amostras por via úmida em frasco aberto é o realizado em frasco *Kjeldhal*, que é feito de vidro, com um gargalo longo, estreito e de fundo redondo. Neste procedimento a amostra é pesada e colocada no frasco, adicionando-se em seguida os ácidos, que é então aquecido cuidadosamente. Outro procedimento muito comum é a decomposição em bloco digestor, no qual as amostras e o ácido são aquecidos em frascos de vidro, semelhantes a tubos de ensaio, entretanto maiores. Entre as vantagens desta metodologia estão o baixo custo e a simplicidade, entretanto o procedimento sempre deve ser realizado na capela e, dependendo do tipo de ácido, pode haver perigo de explosão [13,14].

Quando a decomposição é realizada em frascos abertos sob pressão atmosférica, as temperaturas atingidas são limitadas pela pressão de vapor da mistura, restringindo a temperatura de decomposição. Uma reação mais rápida pode ser obtida, fechando-se a amostra e o ácido em um frasco resistente à pressão e ao aquecimento,

assim reduzindo-se o tempo de decomposição da amostra [13,14]. Devido aos diferentes tipos de interferências e riscos causados pelo uso de ácido sulfúrico e ácido perclórico, o ácido nítrico tem sido preferido para a decomposição de amostras biológicas e orgânicas por via úmida. O ácido nítrico não é um agente oxidante forte para mineralizar completamente todo tipo de amostra em frascos abertos, entretanto, este apresenta várias vantagens, entre elas, o fácil manuseio, pode ser obtido em alto grau de pureza, é menos reativo que o ácido perclórico e as perdas por volatilização são reduzidas. Outro aspecto importante do nítrico é que seu potencial de oxidação é proporcional à temperatura, assim, em frasco abertos o seu potencial de oxidação fica restrito ao da temperatura máxima de seu azeótropo, que é de aproximadamente 120 °C. Para explorar o potencial máximo de oxidação do ácido nítrico, sistemas de decomposição sob pressão foram desenvolvidos, permitindo alcançar temperaturas maiores do que 120 °C [5].

Um dos métodos de decomposição por via úmida em frasco fechado é o de *Carius*, no qual a amostra é colocada em um tubo de vidro com um ácido oxidante. Posteriormente, o frasco é fechado e aquecido a 250 – 300 °C por um período de 3 a 6 horas. Devido à alta temperatura e à alta pressão dentro do frasco a amostra é decomposta. Geralmente, o frasco é encaixado dentro de uma luva de metal para evitar a explosão devido à alta pressão. Após a decomposição ter sido completada, o tubo é resfriado e cuidadosamente aberto, ainda sob pressão. Assim, este método supera a limitação das metodologias que fazem o uso de frascos abertos, pois elementos voláteis não são perdidos [13,14]. Existem outros procedimentos, que fazem uso de frascos de PTFE. Nestes, a temperatura de decomposição está limitada à temperatura que o PTFE pode resistir, entre 170 e 200 °C, dependendo da qualidade do PTFE. Estes sistemas são denominados de bombas de decomposição, que consistem de recipientes de PTFE contidos dentro de cilindros de aço. Os recipientes são fechados com tampas de PTFE pressionadas por uma mola, que se abre quando a pressão ultrapassa um valor máximo, deixando os gases escaparem, prevenindo uma explosão. Os frascos geralmente são aquecidos em bloco de metal ou em mufla termostatazada. Dependendo do tipo de análise e da amostra a ser decomposta, recomenda-se a decomposição a 300 °C. Nesta condição o teor de carbono residual é muito baixo, uma vez que 99,9% do carbono original da amostra é oxidado e eliminado. Para alcançar temperaturas tão elevadas, é utilizado um sistema com frascos de quartzo aquecidos em uma autoclave a 320 °C, sendo que a pressão interna dos frascos é equilibrada com uma pressão externa de N<sub>2</sub>. De maneira geral, os

procedimentos de decomposição de amostras em frascos fechados utilizando ácido nítrico são seguros, não há perdas por volatilização, há uma redução na quantidade de reagentes utilizados, não havendo risco de contaminação externa e sendo mais eficientes e mais rápidos [13,14].

### **2.1.3 Decomposição assistida por radiação microondas**

As técnicas de preparo de amostra baseadas no uso de microondas são amplamente utilizadas em todo o mundo. A tecnologia das microondas já avançou tanto, que está revolucionando o preparo de amostras e sínteses orgânicas. Embora seja classificada como um processo de decomposição por via úmida, a decomposição assistida por microondas será tratada em separado devido a sua importância, como método de preparo de amostras.

Os primeiros experimentos utilizando a radiação microondas para a decomposição de amostras foram realizados em 1975, empregando fornos de microondas domésticos e frascos abertos. Desde o início, foi observado o bom desempenho das microondas na decomposição de amostras, que diminuía o tempo de tratamento e aumentava a eficiência do processo. Os sistemas modernos, desenvolvidos especificamente para laboratórios, apresentam facilidades para se medir a temperatura e a pressão no interior do frasco contendo a amostra em decomposição. Além disso, o desenvolvimento de materiais de alta resistência mecânica permite efetuar a decomposição em recipientes fechados em pressões maiores do que aquelas atingidas em frasco aberto, e conseqüentemente, sob temperaturas maiores, que podem ser monitoradas continuamente. Assim, o conhecimento da pressão e da temperatura permite o controle das etapas do processo de decomposição, possibilitando a determinação experimental da duração de cada etapa e da potência mais adequada para cada etapa, de maneira a alcançar a decomposição completa da amostra [24]. A radiação microondas produzida por um magnetron se irradia de maneira homogênea e reproduzível dentro do forno, podendo haver três possibilidades de interação dos materiais com a radiação eletromagnética:

- Reflexão - o material reflete as ondas sem ser afetado pelas mesmas;
- Transparência - as microondas atravessam o material sem provocar nenhum efeito no mesmo;
- Absorção - o material absorve total ou parcialmente a radiação.

Na decomposição assistida por microondas, explora-se o efeito de absorção da energia eletromagnética, que é convertida em energia térmica (calor). Os frascos empregados devem ser transparentes à radiação (PTFE, PFA ou quartzo) de maneira que somente a amostra e o ácido absorvam a mesma. Mesmo que os materiais empregados não absorvam a radiação, os frascos devem ser resfriados durante o processo de decomposição da amostra, de maneira a evitar que sofram um superaquecimento e se danifiquem [24].

O tratamento de amostras mediante o aquecimento por microondas tem demonstrado ser um processo mais rápido, eficiente e seguro em comparação ao aquecimento convencional. Além disso, o uso de recipientes fechados durante o tratamento com microondas minimiza as possibilidades de contaminação das amostras e diminui a quantidade de reagentes a ser utilizada. Nestes sistemas também devem ser observados criteriosamente os volumes de amostra e de ácido a serem utilizados, caso contrário o processo de decomposição pode não ocorrer de maneira satisfatória ou poderá ocorrer excesso de pressão de maneira a explodir os frascos [24].

Uma das maiores limitações da digestão por microondas em frascos fechados é a limitação associada ao tamanho das amostras, que está relacionado à pressão desenvolvida dentro dos frascos. O desenvolvimento de sistemas de microondas com radiação focalizada superam essas dificuldades, pois é possível a digestão de quantidades relativamente grandes de amostras, além de permitir a adição contínua de reagentes. O sistema permite que haja um refluxo dos reagentes e solventes, aproveitando ao máximo a capacidade de decomposição, minimizando as perdas do analito. Alguns sistemas permitem o processamento de amostras com diferentes programas de digestão. Esses sistemas apresentam uma interação amostra-microondas de até 10 vezes maior do que o sistema convencional com frascos fechados (sistema por cavidade) [5].

O aquecimento em frascos fechados com microondas é recomendado quando é preciso se decompor amostras de difícil decomposição, quando se pretende determinar componentes voláteis, e/ou elementos traço. As vantagens da decomposição assistida por microondas em frascos fechados são semelhantes àquelas no qual o processo de decomposição é realizado com aquecimento convencional. Entre as desvantagens estão: a limitação para se digerir amostras de massa muito grande, porque a pressão interna que se desenvolve dentro do frasco depende desta massa e da quantidade de ácido empregado; as

amostras digeridas ao mesmo tempo devem ter conteúdo de carbono semelhante para garantir que o mesmo processo ocorra para todas as amostras. Uma grande variedade de amostras, desde fluidos biológicos até amostras geológicas, metalúrgicas, águas residuais, efluentes industriais, polímeros e alimentos já foram digeridas em sistemas assistidos por microondas [5].

#### **2.1.4 Solubilização de amostras com reagentes orgânicos**

Conforme já citado, a preparação da amostra é uma das etapas mais críticas da análise e, apesar de todos os avanços, ainda é necessário um maior desenvolvimento para alcançar os mesmos padrões das técnicas analíticas. Os avanços das metodologias de preparo de amostras ao longo das últimas décadas foram basicamente impulsionadas pelo uso do forno de microondas. Grande parte dos procedimentos de preparação de amostras, antigos ou novos, baseiam-se na utilização de ácidos concentrados para a promoção de um ataque agressivo nas amostras, especialmente sob alta temperatura e pressão. Em geral, estes procedimentos apresentam as seguintes características [5,13]: a matriz da amostra é decomposta, sendo parcialmente ou totalmente eliminada (dependendo do procedimento) e a identidade do analito é perdida durante o processo; no final do processo, dependendo das espécies do analito, parte delas são convertidas a espécies inorgânicas simples; utilizam-se quantidades relativamente grandes de um ou mais reagentes, em geral tóxicos e corrosivos, de difícil obtenção em alto grau de pureza; são necessários equipamentos específicos para cada procedimento de preparo de amostra, em geral de alto custo e complexos; dependendo da quantidade de reagentes utilizados, implica na necessidade de uma excessiva diluição das amostras para a análise por espectrometria atômica; devido às características de cada sistema são necessárias quantidades razoavelmente grandes de amostra; dependendo do sistema, a contaminação ou a perda de analitos por volatilização deve ser considerada e para a aplicação em rotina muitos dos são consideravelmente demorados e laboriosos.

No entanto, um olhar mais atento na literatura, revela o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras, usando reagentes orgânicos, para a posterior análise por técnicas espectrométricas. Destacam-se o TMAH, o ácido fórmico e as aminas terciárias solúveis em água, temas que serão abordados detalhadamente

a seguir. Além disso, recentemente foi mostrado o uso de um novo reagente, chamado Universol<sup>®</sup> (com pedido de registro de patente), que também tem sido usado com sucesso na solubilização de diversos tipos de amostras, entre elas as de origem vegetal, biológica e clínica. O Universol atua de maneira semelhante ao TMAH, as amostras que não são completamente solubilizadas (contendo ligninas e celulose) permanecem sob a forma de uma suspensão, que pode ser facilmente analisada por AAS ou outras técnicas espectrométricas [25-27].

#### **2.1.4.1 Procedimentos baseados no uso de hidróxido de tetrametil amônio**

O TMAH é um sólido, com a fórmula química  $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ . Geralmente é comercializado na forma de solução 25% (m/v) em água ou metanol. Dependendo da marca e da pureza, pode apresentar contaminação que pode prejudicar a determinação de elementos em nível de traço por causa do sinal de branco. As soluções de TMAH são transparentes, com odor forte e desagradável devido a impurezas de trimetilamina (quando puro o TMAH é inodoro), é estável a temperatura ambiente. Poucas informações sobre sua toxicidade são disponíveis, mas sabe-se que seus vapores causam irritação no nariz, garganta e sistema respiratório [6]. O íon tetrametilamônio pode danificar os nervos e músculos, causando dificuldades na respiração e, possivelmente, a morte em um curto período de tempo após a exposição. É tradicionalmente classificada como uma droga estimulante dos gânglios linfáticos [28]. Os efeitos ganglionares podem levar a óbito, além do TMAH poder causar queimaduras da pele e das mucosas [29].

Esse reagente tem sido usado em procedimentos de pirólise modificada, cujo objetivo é evitar reações de descarboxilação e desidroxilação térmica, e assim, melhorar a eficiência de separação em cromatografia gasosa (GC), pela conversão de ácidos carboxílicos e fenóis em espécies metiladas mais voláteis [30]. O TMAH é capaz de causar a hidrólise e a metilação de ésteres, de amidas e de outras substâncias em temperaturas entre 250 °C e 300 °C, mas em temperaturas acima de 500 °C pode causar a cisão das fortes ligações C-C [31]. Por causa dessas características, o TMAH tem sido muito utilizado em estudos envolvendo macromoléculas, tais como as substâncias húmicas [32,33], a lignina [34] e os ácidos graxos [35-37].

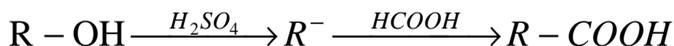
Desde 1973 o TMAH tem sido utilizado na solubilização de tecidos animais para a determinação de espécies inorgânicas por técnicas espectrométricas. Atenção especial foi dada ao

desenvolvimento de métodos que permitem um mínimo de manuseio da amostra e maior rapidez de análise, reduzindo a perda do analito ou a contaminação da amostra. Os procedimentos que empregam o TMAH envolvem a solubilização total ou parcial das amostras, geralmente acompanhada por aquecimento e/ou agitação. Diferentes proporções de TMAH/amostra têm sido utilizadas, em temperatura ambiente ou com aquecimento (60 – 120 °C), pelo uso de banho-maria ou microondas, tanto em frascos abertos quanto em frascos fechados [6].

Além de simplificar o preparo de amostras, o uso de TMAH permite manter a identidade dos analitos, de maneira que este procedimento de amostras possa ser utilizado em estudos de especiação [38-41]. O preparo de amostras com TMAH geralmente é realizado em temperaturas relativamente baixas, quando comparado a outros procedimentos, o que pode ser vantajoso na determinação de elementos voláteis [42]. De uma maneira geral, o uso de TMAH apresenta as seguintes vantagens: permite obter-se boa precisão e exatidão dos resultados; apresenta boa eficiência de solubilização; o procedimento é fácil e rápido; permite o uso de menor quantidade de reagentes; menor diluição; dispensa o uso de equipamentos complexos ou de alto custo.

#### 2.1.4.2 Procedimentos baseados no uso de ácido fórmico

O ácido fórmico, também conhecido como ácido metanóico, cuja fórmula é HCOOH é incolor, tem ponto de ebulição de 101 °C e se solubiliza em qualquer proporção em água. É uma substância corrosiva, que pode causar severos danos à saúde. Seus vapores podem causar irritação nos olhos e no trato respiratório, se ingerido pode ser fatal. É considerado estável sob condições normais de manuseio e de estocagem [43]. Na presença de ácidos fortes, o ácido fórmico se decompõe em água e gás carbônico. Em um processo químico, no qual ocorre a formação de um intermediário reativo, como um carbânion, o ácido fórmico pode promover a carboxilação direta desse intermediário. Os carbânions, por exemplo, podem ser facilmente formados a partir do processo de eliminação de um grupo OH de um álcool quando misturado com um ácido forte, como mostrado abaixo [44].



Além disso, o ácido fórmico é um nucleófilo fraco e polar, portanto é adequado para reações de substituição nucleofílica unimolecular, sendo muito utilizado como solvente neste tipo de reação. O ácido fórmico pode participar nas reações de obtenção de ésteres, a partir da substituição da hidroxila (-OH) por um radical alcoxila (-OR). O método mais comum é a reação de um ácido carboxílico com um álcool, havendo eliminação de água [45].

O ácido fórmico foi sugerido como alternativa ao TMAH na solubilização de amostras biológicas. Inicialmente, em 2004, foi utilizado para a extração de diferentes espécies de arsênio em amostras biológicas, mostrando alta eficiência de extração de dimetilarsênio [46]. No ano seguinte, o ácido fórmico foi utilizado para a solubilização de amostras biológicas de origem marinha, para a determinação de Ag, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, e Se por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) e de Na, Ca, K e Mg por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Entretanto, uma elevada diluição foi necessária para minimizar os efeitos do ácido fórmico no plasma [7]. O ácido fórmico também foi utilizado para a solubilização de tecidos biológicos para a determinação de Hg por espectrometria de absorção atômica acoplada a geração de vapor frio (CV AAS), sendo também proposto seu uso na preparação de amostras em estudos de especiação [8]. Amostras biológicas foram solubilizadas com ácido fórmico, posteriormente as soluções das amostras foram secadas formando depósitos secos. Esses depósitos secos foram utilizados para a análise por ICP-MS usando a ablação a laser (LA), com a vantagem de que as soluções homogêneas após a solubilização das amostras permitem a adição de padrão interno ou padrão para a calibração, antes da secagem das soluções [47]. O ácido fórmico também foi usado na solubilização de poliamida para a determinação de Al, Mn, e Si por ET AAS e por ICP-MS, neste caso usando a nebulização pneumática como sistema de introdução da amostra no ICP e dessolvatação por membrana para minimizar o efeito do solvente no plasma [48].

Segundo os procedimentos citados na literatura, a solubilização de amostras com ácido fórmico é realizada sob aquecimento a 50 °C em um banho ultrasônico, sendo um procedimento não tão rápido e eficiente quanto à solubilização de amostras com TMAH. Entretanto, é mais rápido e menos trabalhoso do que a decomposição por via seca ou por via úmida. Além do ácido fórmico apresentar todas as vantagens do TMAH no preparo de amostras, é de baixo custo, facilidade de

manuseio e pode ser purificado até alto grau de pureza por meio de destilação.

Em nenhum dos trabalhos foram explorados os mecanismos pelos quais o ácido fórmico atua na solubilização das amostras. Além da sua utilização na solubilização de amostras, outras aplicações do ácido fórmico relacionado à determinação de elementos traço foram relatadas na literatura. O ácido fórmico tem sido utilizado na fotoredução, como alternativa à redução química, que é baseada na exposição da amostra à radiação ultravioleta (UV). Quando irradiada sobre compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos, a radiação UV promove a formação de diversos compostos intermediários. Nos sistemas aquosos, a radiação UV promove a formação de radicais  $\text{OH}^*$  e  $\text{O}^*$ , mas na presença de compostos orgânicos podem ser formados os radicais  $\text{CO}^*$  e  $\text{R}^*$ , que promovem a fotoredução de outras espécies. Quando soluções contendo ácido fórmico são irradiadas com UV, tanto o  $\text{Hg}^{++}$  quanto o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  são reduzidos a mercúrio elementar, permitindo a quantificação do mercúrio total [49-51]. A geração fotoquímica de vapor em presença de ácido fórmico também foi utilizada na especiação de Se [52]. O ácido fórmico também foi utilizado na geração fotoquímica para a quantificação de Se, As, Sb, Bi, Te, Sn, Pb, Hg e Cd por AAS e por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) [53-55].

Além das aplicações anteriormente citadas, o ácido fórmico foi utilizado para extração de organometálicos e metais em músculo e sedimento marinho [56]. Frequentemente é utilizado como fase móvel na cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC). Foi ainda utilizado na extração líquido-líquido de diferentes espécies de arsênio em plantas, sendo comprovado que é capaz de extrair arsênio ligado a peptídeos, sem causar interconversão das espécies durante o processo de extração [57,58]. Embora o uso do ácido fórmico em química analítica seja recente (última década), seu uso tem crescido a cada ano, com novas aplicações principalmente em estudos de especiação e na geração fotoquímica.

### **2.1.4.3 Procedimentos baseados no uso de aminas terciárias solúveis em água**

As aminas terciárias solúveis em água utilizadas no preparo de amostras se referem a uma mistura denominada CFA-C produzida pela Spectrasol. A composição da mistura CFA-C não é completamente

conhecida, pois é de direito privado. Sabe-se que a mistura é predominantemente constituída de trietanolamina e de trietilenotetraamina [59]. A trietanolamina, cuja fórmula química é  $C_6H_{15}NO_3$ , tanto é uma amina terciária quanto um triálcool, que atua como uma base fraca muito utilizada para o ajuste de pH em cosméticos, além de ser frequentemente utilizada no preparo de agentes tensoativos. Já a trietilenotetraamina,  $[CH_2NHCH_2CH_2NH_2]_2$ , é frequentemente utilizada como agente reticulador no preparo de polímeros epóxi e na remoção de excesso de cobre do organismo (doença de Wilson's); além disso é precursora de diversas substâncias utilizadas como fungicidas, adesivos e inibidores de corrosão [60].

A CFA-C tem sido utilizada no preparo de amostras desde 1989, sua principal função era a estabilização dos analitos pela desativação do íon fluoreto, ou seja, evitar a formação de fluoretos insolúveis do analito quando o ácido fluorídrico era utilizado no preparo das amostras. Além de estabilizar o analito, a CFA-C diminui consideravelmente o ataque dos íons fluoreto nas partes de vidro ou quartzo dos sistemas de introdução de amostra dos instrumentos de análise. Posteriormente, o uso da CFA-C foi estendido à extração, à diluição e dissolução de amostras botânicas e biológicas. A dissolução é feita com uma mistura em que a concentração de CFA-C varia entre 5 a 10% (v/v), resultando em uma suspensão da amostra. A CFA-C é um reagente menos eficiente do que o TMAH na solubilização das amostras, entretanto, gera soluções analiticamente mais estáveis [6]. O maior sucesso desse reagente é no preparo de amostras de leite, uma vez que a acidificação desse tipo de amostras causa a precipitação da caseína. A CFA-C consegue dissociar completamente as micelas de caseína, formando uma solução estável incolor [61].

Além do seu uso no preparo de amostras, a CFA-C tem se mostrado mais eficiente do que a ação do nitrogênio no plasma para a diminuição de interferências por íons poliatômicos em ICP-MS, além de aumentar a sensibilidade de alguns dos elementos com energia de ionização mais alta, como As e Se, uma vez que a CFA-C atua como fonte de carbono para as reações de transferência de carga [62]. A CFA-C tem se mostrado útil no preparo de suspensões, porque consegue diminuir consideravelmente a aderência de partículas no capilar dos amostradores automáticos, aumentando a precisão das medidas [6]. Recentemente a CFA-C foi utilizada como solução absorvedora de vapores e cinzas na combustão assistida por microondas [63]. Quando introduzidas no plasma, as soluções contendo concentrações maiores do que 10% v/v desse reagente podem causar a deposição de carbono nos

cones e na interface do ICP-MS e podem aumentar o sinal de íons poliatômicos de nitrogênio e carbono [6]. Devido à baixa eficiência na solubilização de amostras, a CFA-C tem sido pouco utilizada para esta finalidade e poucas publicações relatam o seu uso.

## **2.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**

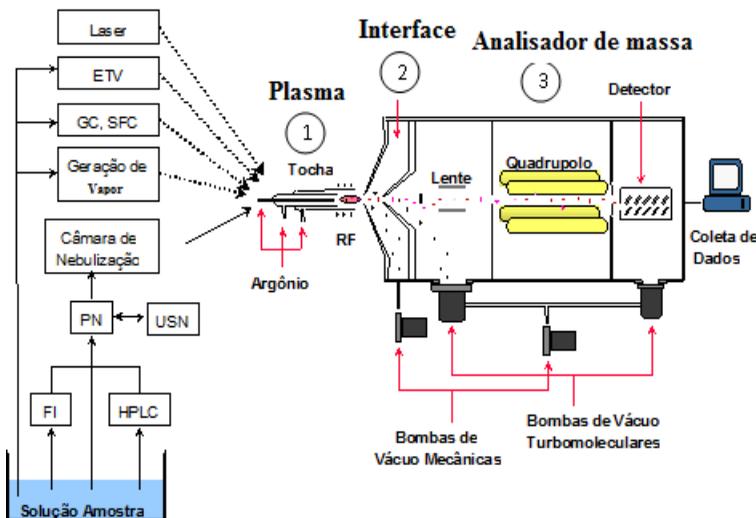
### **2.2.1 Princípios de funcionamento**

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica multielementar utilizada para a determinação de elementos químicos. Além da alta seletividade, sensibilidade e limites de detecção menores daqueles obtidos por outras técnicas analíticas (dependendo do elemento), ela tem ganhado espaço devido ser rápida e ter a capacidade de medir razão isotópica [1,9].

A técnica consiste basicamente de uma fonte de íons, neste caso um plasma indutivamente acoplado, associado através de uma interface a um espectrômetro de massa. Na Figura 1 é mostrado um esquema do instrumento, que é dividido em três partes principais: 1) fonte de íons (plasma); 2) interface e 3) analisador de massa. A amostra pode ser introduzida no ICP por diferentes maneiras, através de nebulizadores pneumáticos (PN), ultra-sônico (USN) ou através de métodos específicos como LA, ETV, GC, HPLC, sistemas em fluxo (FI) e também pela geração química de vapor (CVG) [1,9].

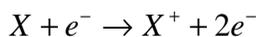
A amostra é introduzida no plasma sob a forma de um aerossol úmido, no caso de uma amostra líquida, juntamente com argônio. Uma descarga elétrica de uma bobina de Tesla gera os primeiros íons e elétrons. Influenciados pelo forte campo magnético gerado em uma bobina de radiofrequência (RF) ao final da tocha, os íons e elétrons são acelerados em direções opostas, tendo mudanças muito rápidas em suas trajetórias, de maneira que, a colisão deles com átomos de argônio provocam a ionização desses átomos formando o plasma (gás parcialmente ionizado). A amostra submetida à elevada energia do plasma, cerca de 15 eV, é dessolvatada e vaporizada, sendo que os átomos livres no estado de vapor são excitados e ionizados. A emissão de radiação dos átomos e/ou íons excitados no plasma é medida na espectrometria de emissão óptica, enquanto que na espectrometria de massa, os íons são separados na interface e lente iônica e conduzidos ao separador de massa e medidos em função da razão massa/carga. Existem

diversas maneiras pelas quais os átomos podem ser ionizados, as principais delas são as que seguem [65].

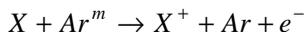


**Figura 1:** Esquema de um ICP-MS com possíveis sistemas de introdução da amostra [64].

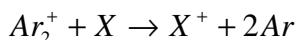
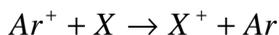
**Ionização térmica:** causada pela energia resultante das colisões entre átomos, íons ou elétrons, onde X e A são átomos neutros de qualquer elemento e M representa átomos do analito;



**Ionização *penning*:** causada pela colisão entre átomos no estado fundamental e espécies metaestáveis de argônio ( $Ar^m$ );



**Ionização por transferência de carga:** causada pela transferência de carga entre íons e átomos;



Na interface, os íons produzidos no plasma à pressão atmosférica são extraídos e transportados para a região de alto vácuo, onde se encontra o analisador de massa quadrupolar. A interface é uma região na qual a pressão, de aproximadamente  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  torr, é intermediária à do plasma e à do analisador de massa. Seu contato com as outras partes do instrumento é feito por um orifício de aproximadamente 1 mm de diâmetro existente em cada um dos dois cones (cone amostrador e cone skimmer) dispostos em sequência.

Na região do analisador de massa, os íons são colimados num feixe, acelerados e conduzidos ao quadrupolo por um conjunto de eletrodos chamados de lentes iônicas. Nesta região do instrumento, a pressão é muito baixa, de aproximadamente  $10^{-7}$  torr, sendo este vácuo mantido por bombas turbomoleculares. Existem diferentes analisadores de massa, embora todos tenham a mesma função, que é separar os íons em função da razão massa/carga ( $m/z$ ). Os analisadores de massa quadrupolares são os mais difundidos, pois além de oferecerem excelente sensibilidade, seletividade e rapidez, apresentam menor custo e tem tecnologia mais bem estabelecida. O quadrupolo é constituído de quatro bastões metálicos suspensos paralelamente sobre um criterioso ajuste, separados em dois pares, um oposto ao outro. Pares opostos são conectados a fontes de corrente direta (DC) chamada componente U e corrente alternada em radiofrequência (RF) chamada componente V. A corrente direta tem potencial positivo em um par e negativo em outro. A RF tem potência de mesma amplitude nos dois pares, mas tem sinal oposto (fora de fase), isto é, em um par é positiva e em outro é negativa. Ao se aplicar voltagens de intensidade U e V, apenas íons de determinada  $m/z$  terão trajetória estável e chegarão à outra extremidade do quadrupolo, enquanto que íons de outras  $m/z$  são perdidos [1].

O sistema de detecção de íons mais utilizado é o multiplicador de elétrons secundários, que consiste de 22 pequenos eletrodos (dinodos) recobertos com um material semi-condutor. Quando os íons passam através do quadrupolo, são direcionados para o detector, onde um potencial negativo atrai os íons positivos. Quando íons se chocam no primeiro dinodo, este emite elétrons que num efeito cascata amplifica o sinal que será detectado.

A descrição acima de um ICP-MS é baseada no modelo Elan 6000 da Perkin Elmer, lançado nos anos 90, mas é similar a de vários outros fabricantes da mesma época. Esses instrumentos evoluíram muito, entre as principais novidades tecnológicas pode-se destacar os

geradores de radiofrequência modificados, que diminuem as descargas secundárias entre o plasma e a interface, aumentando a vida útil dos cones e da tocha, além de aumentar consideravelmente a precisão das medidas. A interface dos instrumentos modernos também mudou, sendo que na região que vai do plasma até a câmara do analisador de massa existem mais estágios de vácuo, ou seja, mais cones ou dispositivos semelhantes, de maneira que seja mais fácil manter a pressão dentro da câmara do analisador de massa, além de que a diferença de pressão de um estágio a outro é menor, diminuindo também as perdas de íons, consequentemente aumentando a sensibilidade. As novidades também chegaram aos sistemas de colimação dos íons, sendo que muitos dos instrumentos novos têm uma configuração na qual o plasma e o detector não estão no mesmo eixo, diminuindo consideravelmente o sinal de fundo e aumentando a sensibilidade, pois não é necessário o uso de um parador de fótons como nos instrumentos mais antigos. Sistemas para o controle de interferências espectrais foram desenvolvidos, chamados de celas de reação e de colisão, que permitem a quantificação em níveis cada vez menores, principalmente os elementos mais sujeitos a interferências [66].

### **2.2.2 Interferências em ICP-MS**

Interferência é definida como algum efeito que faz com que o sinal do analito na solução da amostra seja diferente daquele obtido pela análise da solução de calibração, para uma mesma concentração do analito [67]. As interferências encontradas em ICP-MS podem ser divididas em duas categorias: interferências espectrais e não espectrais. Apesar de não serem encontradas interferências espectrais relevantes em ICP-MS, a não ser para alguns elementos, em especial aqueles com massa menor do que 100 u.m.a, vários estudos têm mostrado os fatores que afetam o sinal do analito. Em ICP-MS, o sinal do analito é influenciado pelos parâmetros operacionais do instrumento, entre eles, a potência de RF e a vazão do gás do nebulizador. O ajuste destes parâmetros está diretamente ligado à eficiência de nebulização, de ionização e à distribuição espacial de íons no plasma e à região do plasma na qual os íons são coletados. Além disso, a presença da matriz da amostra também pode influenciar o sinal analítico [68].

### **2.2.2.1 Interferências espectrais**

As interferências espectrais são as mais difíceis de serem corrigidas em ICP-MS. Elas são causadas por íons que têm a mesma razão  $m/z$  do elemento de interesse, portanto interfere no sinal do analito, causando erroneamente um aumento do sinal do analito. Este tipo de interferência pode ser dividido em duas categorias, dependendo do íon. Na primeira categoria, as interferências são causadas pela sobreposição de isótopos de diferentes elementos, sendo facilmente detectadas e bem conhecidas. Elas podem ser corrigidas pela escolha de um isótopo alternativo do elemento de interesse e pelo uso de equações elementares. A segunda categoria é de interferências causadas por íons poliatômicos formados pela recombinação de átomos presentes nos gases atmosféricos, na água, nos ácidos, na matriz da amostra e no argônio do plasma [1,9].

São diversas as fontes das interferências espectrais, que depende do tipo do íon poliatômico em questão. A superfície do cone amostrador pode contribuir para a formação de óxidos, que devido à elevada temperatura, não podem ser formados no plasma. Assim, estima-se que a formação dos íons poliatômicos seja devida à colisão dos gases nos cones e às reações de condensação na região de expansão dos gases na interface, pois estas são regiões mais frias comparadas ao plasma. Entretanto, reações no próprio plasma também podem ocorrer, principalmente envolvendo íons de elementos refratários [9].

### **2.2.2.2 Interferências não espectrais**

Ao contrário das interferências espectrais, onde o sinal analítico é aumentado pela presença de um isótopo de outro elemento ou íon poliatômico de mesma  $m/z$  do analito, as interferências não espectrais são caracterizadas pelo aumento ou diminuição do sinal analítico. As interferências não espectrais, ou interferências de matriz, ocorrem devido aos fatores que exercem influência sobre o transporte da amostra, ionização no plasma, extração e separação dos íons. Neste tipo de interferência, a concentração e natureza da matriz têm relação direta sobre o sinal analítico [1].

Este tipo de interferência pode ser classificado em dois grupos. O primeiro, já conhecido, da literatura dedicada à AAS e ICP OES, refere-se a todos os efeitos que afetam a nebulização e o transporte do analito,

conseqüentemente, a distribuição do aerossol primário (gotas grandes, rápidas e polidispersas) que sai do nebulizador. Entre esses efeitos, pode-se destacar: O tipo de nebulizador e câmara de nebulização, vazão do gás carreador e as características físico-químicas da solução da amostra (viscosidade, tensão superficial, densidade, taxa de evaporação e pressão de vapor). A nebulização de solventes com baixa tensão superficial irá produzir um aerossol com partículas menores, sendo que a taxa de decantação das gotas do aerossol será tanto maior quanto maior a densidade do solvente. A taxa de evaporação dependerá da pressão de vapor do solvente, sendo que todos estes aspectos irão influenciar a distribuição do aerossol terciário (gotas pequenas, lentas e pouco polidispersas), que alcança o plasma [69,70]. Também foi demonstrado que um aerossol muito polidisperso (larga distribuição do tamanho das gotas) pode causar variações na temperatura do plasma e na ionização do analito e, como consequência, variações do seu sinal [71,72].

O segundo grupo de interferências não espectrais refere-se aquelas que causam variações na temperatura do plasma e, assim, na atomização e nas características de ionização do mesmo. Essas interferências são causadas por soluções com elevado teor de compostos orgânicos e sais dissolvidos. Além disso, pode haver interferências resultantes do efeito espaço-carga, que ocorre após a extração do feixe iônico e a remoção dos elétrons, assim que os íons deixam o come skimmer na interface. O resultado do efeito espaço-carga é a supressão do sinal dos elementos mais leves na presença dos mais pesados. Estes efeitos, geralmente são mais intensamente causados por concentrações elevadas de elementos muito pesados, que são mais eficientemente transmitidos pela(s) lente(s) iônica(s) ao analisador de massa do que os elementos mais leves [9,67,70].

### **2.2.3 Sistemas para a introdução de amostra em ICP-MS**

A introdução da máxima quantidade do analito no plasma para uma dada amostra é sempre desejado. Diversos acessórios foram desenvolvidos para este fim, entretanto sua escolha depende do tipo de amostra a ser analisada, considerando sua disponibilidade e forma física, assim como a sensibilidade desejada [73]. A introdução da amostra no plasma ainda é uma parte crítica, pois até o momento não existe um sistema ideal, que possa ser empregado a todos os tipos de amostra. Vários acessórios para a introdução de amostras gasosas, líquidas ou sólidas no plasma foram desenvolvidos, com a finalidade de aumentar a

sensibilidade, diminuir os limites de detecção, bem como eliminar ou, ao menos, diminuir as interferências [74].

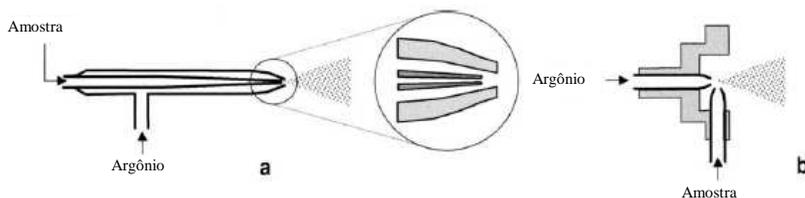
Geralmente, as amostras são preparadas e deixadas em solução aquosa para aumentar sua homogeneidade, facilitar o manuseio e o preparo de soluções de calibração. Os principais componentes do sistema de introdução de amostra líquida no plasma são: 1) um nebulizador que gera um aerossol e 2) uma câmara de nebulização para selecionar as gotas do aerossol que irão alcançar o plasma. Em alguns casos, também podem ser utilizados sistemas dessolvatores, que são capazes de reduzir a massa de solvente que chega ao plasma [74]. Um sistema ideal para a introdução de amostras líquidas deve preencher os seguintes requisitos [1,9,73,74]: elevada eficiência de transporte, parâmetro definido como a quantidade de analito que alcança o plasma em relação à quantidade de amostra aspirada pelo sistema de introdução de amostra; baixa eficiência de transporte de solvente de maneira a evitar flutuações no plasma e interferências causadas pelo solvente; boa reprodutibilidade; pequeno efeito de memória, permitindo elevada frequência analítica; robustez, ou seja, estabilidade quanto às mudanças de matriz; fácil manuseio, baixo custo e pouca manutenção.

Embora nenhum sistema desenvolvido seja ideal, o melhor desempenho de cada um dependerá do tipo de amostra analisada. Geralmente, a escolha do nebulizador é limitada à presença de partículas sólidas, ao elevado teor de sólidos dissolvidos e ao conteúdo de compostos orgânicos na solução analisada. Portanto, quanto mais simples for a matriz da amostra, isto é, quanto mais semelhante à água, mais fácil e eficiente será a sua introdução no plasma e menor será o nível de interferências. Por exemplo, para um nebulizador de fluxo cruzado e uma câmara de nebulização Scott, o teor de sólidos dissolvidos é limitado a 0,2% (m/v). A introdução de soluções com maior quantidade de sólidos dissolvidos no plasma, usando-se o sistema de introdução de amostras citado acima, promoverá a instabilidade do plasma e a deposição de sais nos cones da interface.

### **2.2.3.1 Nebulizadores pneumáticos**

Os nebulizadores pneumáticos são os sistemas mais comuns para a introdução de soluções no plasma. Classificam-se, de acordo com o tipo da geometria de interação do gás com o líquido em concêntricos e

de fluxo cruzado, entre outros. Na Figura 2 são mostrados os esquemas de dois tipos de nebulizadores.



**Figura 2:** Nebulizadores pneumáticos: a) Concêntrico; b) fluxo cruzado.

Os nebulizadores concêntricos mais utilizados são os do tipo Meinhard. Eles foram projetados para a nebulização de soluções com menor teor de sólidos dissolvidos e para aplicações que requerem baixa vazão de gás. É comum o entupimento destes nebulizadores, que pode ser causado por sólidos em suspensão, mas também por solutos que secam e cristalizam na ponta do capilar nas determinações por ICP-MS. Os nebulizadores de fluxo cruzado são mais usados que os do tipo Meinhard por serem mais robustos e fáceis de limpar [9,73].

Tanto os nebulizadores concêntricos quanto os de fluxo cruzado operam a vazões que variam de 0,4 a 2 mL min<sup>-1</sup>, sendo que os concêntricos geralmente operam com vazões menores. Um problema inerente ao sistema nebulizador/câmara de nebulização é a baixa eficiência de transporte, inferior a 5%. Para contornar esta situação, foram desenvolvidos nebulizadores de alta eficiência, entre eles o nebulizador térmico, hidráulico e o ultra-sônico. Entretanto, estes nebulizadores apresentam algumas desvantagens, entre elas: 1) maior custo; 2) são mais difíceis de usar e 3) requerem uma unidade dessolvadora para evitar efeitos negativos do solvente no plasma [75]. Quanto aos problemas relacionados ao entupimento, foram desenvolvidos outros nebulizadores, principalmente do tipo fluxo cruzado, mas com projetos diferentes, entre eles o V-Groove, o nebulizador de Hildebrand, o cone-spray e o Babington [76]. Os nebulizadores de fluxo cruzado têm perdido espaço para os concêntricos uma vez que estes últimos apresentam maior eficiência de nebulização, o aerossol formado é mais homogêneo e, por operar em baixas vazões, permitem menor consumo de reagentes e de amostra, e menor quantidade de resíduos é gerada.

### 2.2.3.2 Micronebulizadores

Devido à alta sensibilidade da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, sempre existiu um grande interesse no desenvolvimento de sistemas de introdução da amostra no plasma para a análise de quantidades muito pequenas das mesmas. As razões para este interesse são [1]: a limitada quantidade da amostra em alguns campos de ciência (forense, biológica e clínica); o desenvolvimento de métodos de pre-concentração “on-line” com ICP-MS, que requerem vazões muito baixas de solução ou a análise de eluentes orgânicos; a presença de solventes orgânicos e matrizes inorgânicas complexas, que podem provocar sérias interferências espectrais e não espectrais e a diminuição do risco ao manejar resíduos perigosos.

Os esforços realizados neste contexto resultaram no desenvolvimento de micronebulizadores capazes de gerar um aerossol com partículas muito pequenas e estável em vazões tão baixas quanto  $1 \mu\text{L min}^{-1}$ . Em outras circunstâncias, quando o volume da amostra é pequeno, o analista costuma aumentá-lo mediante diluição da amostra, mas este procedimento não pode ser usado quando as concentrações dos analitos são muito baixas. Na Tabela 1, são mostradas quantidades disponíveis de diferentes tipos de amostra e os elementos geralmente determinados, comprovando a necessidade do uso de micronebulizadores [77].

Considerando os nebulizadores pneumáticos concêntricos ou de fluxo cruzado, uma redução significativa da vazão da amostra causa uma redução muito grande da sensibilidade, pois nestes sistemas o aerossol formado se deposita quase por completo na câmara de nebulização e, conseqüentemente, uma fração muito pequena do analito alcança o plasma. Além disso, a operação destes sistemas em baixas vazões causa instabilidade no processo de nebulização e elevado efeito de memória [77].

Muitos dos micronebulizadores hoje disponíveis tiveram como precursores os nebulizadores pneumáticos convencionais, sendo que os micronebulizadores mais populares são pneumáticos concêntricos, entre eles: nebulizador de alta eficiência; Micromist; nebulizador microconcêntrico (MCN) e o nebulizador de consumo total. Estes micronebulizadores são usados para gerar um aerossol a uma vazão geralmente entre 100 a 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Além disso, apresentam elevado desempenho (aerossol de partículas pequenas, alta sensibilidade e baixos

limites de detecção) quando comparados aos nebulizadores convencionais, se operassem nas mesmas vazões [1,77].

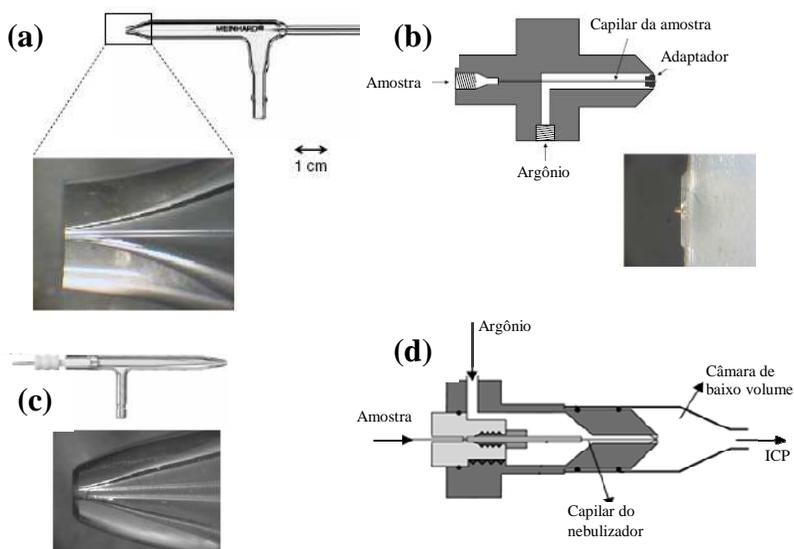
**Tabela 1:** Quantidade usualmente disponível de diferentes tipos de amostra e os elementos determinados nas mesmas.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Quantidade disponível</b>	<b>Análitos</b>
Células	20 $\mu\text{L}$	Na, Mg, K, Fe, Cu, Zn, Cd, Se.
Nanopartículas em suspensão	100 $\mu\text{L}$	Fe
Tecido cerebral	1 mg	Fe, Ca, K.
Metaloproteínas	50 $\mu\text{L}$	Fe, Cu e Zn.
Poeira	5 mg	B, Mg, Si, Mn, Sr, Zn.
Eluente da eletroforese capilar	1 – 100 $\text{nL min}^{-1}$	As, Se, Fe, Cr.

Em termos gerais, os micronebulizadores concêntricos têm um capilar com diâmetro interno pequeno, em torno de 30  $\mu\text{m}$ , e também têm a área da seção transversal (por onde o gás sai) diminuída em relação aos nebulizadores concêntricos. Estas mudanças nas dimensões têm importantes implicações, entre elas: 1) saída do gás com elevada energia cinética; 2) a área de contato entre líquido e gás é menor; 3) o contato entre o líquido e o gás é mais eficiente na formação do aerossol; 4) o aerossol formado tem partículas mais finas; 5) os problemas com entupimento são mais freqüentes e 6) o efeito de memória é menor. Dependendo do modelo do micronebulizador, da vazão da amostra e da câmara de nebulização utilizada, a eficiência de transporte da amostra até o plasma pode chegar a 100%, principalmente se a câmara de nebulização for aquecida, ou se forem utilizadas as câmaras de pequeno volume interno. Alguns micronebulizadores são desenhados de maneira que possam nebulizar soluções com elevado teor de sólidos dissolvidos, até 20%, sem causar qualquer problema de entupimento [77]. Na Figura 3, são mostrados os micronebulizadores mais utilizados atualmente.

O MCN, desenvolvido pela CETAC Technologies, tornou-se disponível comercialmente a um preço similar ao de um nebulizador pneumático convencional. O MCN é constituído de um capilar de poliamida adaptado a um corpo de plástico e a área da seção transversal da saída de gás é reduzida até a saída do nebulizador por meio de um adaptador de safira (Figura 3 b), podendo ser facilmente conectado às câmaras de nebulização [78]. Em ICP OES, o MCN permite obter

limites de detecção similares aos obtidos com nebulizadores pneumáticos convencionais, sendo que a sensibilidade com o MCN é aproximadamente 3 vezes superior, quando ambos operam nas mesmas vazões ( $50 \mu\text{L min}^{-1}$ ). Sua operação é mais estável e precisa, possuindo boa tolerância a sólidos dissolvidos. Assim, problemas relacionados ao entupimento pela cristalização de sais na ponta do capilar não são observados, exceto na presença de sólidos em suspensão. O MCN também se mostrou altamente tolerante ao HF, além disso, variações elevadas da concentração de ácidos não provocam variações significativas do sinal do analito. Porém, este nebulizador apresentou-se mais sensível às variações de concentração de sais, além da precisão e desempenho, variarem para cada MCN, individualmente [77].



**Figura 3:** Micronebulizadores pneumáticos. **a)** de alta eficiência; **b)** MCN; **c)** Micromist e **d)** nebulizador de consumo total.

Atualmente, diversas aplicações dos micronebulizadores estão ligadas a métodos de separação da matriz e detecção do analito por ICP-MS em análises de especiação, pois o volume final, após o processo de separação é muito pequeno [79-81]. Esses nebulizadores também têm sido utilizados para a análise de rotina de amostras simples como águas,

líquidos celulares, amostras biológicas e geológicas digeridas [82-85]. Entretanto, uma de suas aplicações mais importantes é a análise de amostras complexas por ICP-MS, especificamente amostras orgânicas, como petróleo [86-88], solventes orgânicos [89,90] e álcool combustível [91].

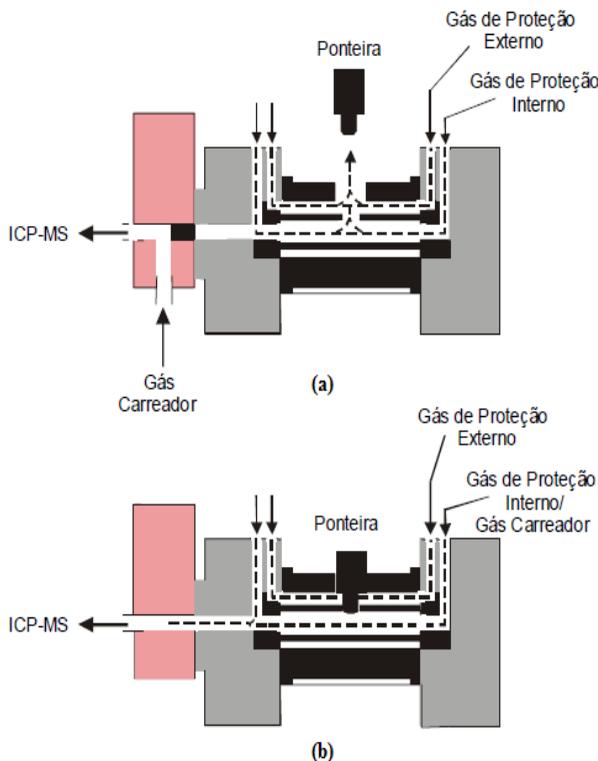
### 2.2.3.3 Vaporização eletrotérmica

A vaporização eletrotérmica (ETV) possui múltiplas vantagens como método de introdução de amostras no ICP, como a baixa quantidade de amostra requerida para a análise e a elevada eficiência de transporte, permitindo a determinação de elementos em concentrações muito baixas. O primeiro trabalho empregando ETV para introdução de amostra no plasma foi publicado em 1978. Esse sistema fazia o uso de uma haste de carbono que continha uma cavidade em seu centro, sobre a qual um volume de 5  $\mu\text{L}$  da solução da amostra era depositado. Esta barra de carbono era inserida em uma câmara de vidro com volume de 1 L que era aquecida [9]. Baseado neste modelo foi desenhado o ETV para ser acoplado ao ICP-MS (que é usado até nos dias atuais) como mostrado na Figura 4.

O sistema mostrado na Figura 4 é constituído de um tubo de grafite fixo por contatos elétricos, sendo que, um gás carreador flui através do tubo de grafite durante a etapa de pirólise, conduzindo os gases para fora pelo pequeno orifício de introdução de amostra. Tipicamente entre 5 e 40  $\mu\text{L}$  da amostra são inseridos no tubo de grafite no interior do vaporizador, com auxílio de uma micropipeta ou de um amostrador automático. A seguir, a amostra é submetida a um programa de temperatura, da mesma forma que em ET AAS. Durante as etapas de secagem e pirólise (a) a ponteira permanece aberta e o argônio que entra pelas extremidades do tubo purga os vapores gerados para fora do tubo de grafite pelo seu orifício amostrador. Na etapa de vaporização (b), a ponteira é fechada e o de gás interno se soma ao de gás carreador para levar o vapor do analito para o plasma, através de um tubo. Após esta etapa, a ponteira sai do orifício e uma etapa de limpeza é aplicada para eliminar qualquer resíduo da amostra. Depois de resfriado, o vaporizador eletrotérmico está pronto para receber mais uma alíquota da amostra [1,12].

Um programa de temperatura permite a realização de etapas de secagem e de pirólise, nas quais o solvente e a matriz da amostra são eliminados, podendo ser analisadas amostras orgânicas e/ou com elevado teor de sólidos dissolvidos. A eliminação do solvente e matriz

em etapas do processo térmico é vantajosa por evitar perturbações no plasma, diminuir significativamente a formação de íons poliatômicos, principalmente os formados com oxigênio e cloro, que interferem diretamente na determinação de diversos elementos [9,12].



**Figura 4:** Esquema do vaporizador eletrotérmico usado em conjunto com ICP-MS, em: (a) etapas de pré-tratamento e (b) etapa de vaporização.

Enquanto em ET AAS é necessário gerar o vapor atômico do analito, em ETV-ICP-MS, além de vaporizar a amostra, é necessário o transporte eficiente do aerossol seco contendo os analitos ao plasma. Desta maneira, o ETV atua como um sistema de introdução de amostra independente do restante do instrumento [12,92]. Desde os primeiros estudos, foi verificado que a eficiência de transporte dos analitos não era quantitativa, e que parte do analito vaporizado permanecia no sistema de vaporização ou no tubo de transporte. Também foi verificada a não

linearidade das curvas de calibração quando os analitos eram vaporizados na ausência da matriz, além do que, a intensidade do sinal do analito aumentava, quando era adicionada uma quantidade de um sal. A partir destes estudos, ficou evidenciado que uma espécie covaporizada funcionava como carreador do analito. Assim, tal como em ET AAS, é necessário adicionar modificadores para a separação mais eficiente da matriz e estabilização do analito, mas também de carreadores para promover um transporte mais eficiente do analito, desde o forno de grafite até o plasma [93,94]. Estudos demonstraram que o vapor dos analitos e componentes da matriz no forno formam “clusters”, servindo como núcleos de condensação, constituídos de pequenas partículas responsáveis pelo transporte do analito. Se a quantidade do analito for pequena, a nucleação ocorre mais lentamente e o analito na fase de vapor pode condensar nas partes mais frias do sistema, antes de ser transportado ao plasma. O transporte do analito ao plasma pode ocorrer com a ajuda de substâncias presentes na matriz, mas podem ser adicionadas substâncias carreadoras, entre elas  $Mg(NO_3)_2$ ,  $Pd(NO_3)_2$  e outros sais [92,93].

Todas as vantagens da ET AAS são transferidas para o ETV. O ETV permite a análise de microvolumes e microamostras, análise direta de suspensões e sólidos, retenção e análise de vapores gerados quimicamente e uso de modificadores químicos. Um dos maiores benefícios do uso de ETV juntamente com ICP-MS é a possibilidade de separar parcialmente o analito da matriz, permitindo a análise de amostras complexas, diminuindo as interferências espectrais e não espectrais [9]. O ETV acoplado ao ICP-MS é frequentemente utilizado para a análise direta de sólidos [95,96], de extratos orgânicos resultantes de processos de extração [97,98], combustíveis [99-101] e amostras sólidas na forma de suspensões [102], vinhos [103], entre outras. Em geral, estas amostras não podem ser analisadas mediante sistemas convencionais de introdução de amostra no ICP, sem um prévio tratamento para a eliminação da matriz. O uso do ETV também se estendeu para a análise de micro-volumes, especialmente em conjunto com técnicas de separação/pré-concentração, tais como micro-extração em fase líquida, micro-extração em fase sólida e eletroforese capilar [104]. Entretanto as principais aplicações ainda são a análise direta de sólidos, suspensões e matrizes orgânicas [105].

## 2.2.4 A análise de amostras orgânicas por ICP-MS

A introdução direta de amostras contendo elevado teor de compostos orgânicos, pela nebulização pneumática convencional, pode produzir uma série de inconvenientes numa análise por ICP-MS. Alguns íons poliatômicos de carbono são formados, principalmente os que têm  $m/z$  abaixo de 80, entre eles  $C_2^+$ ,  $CO_2^+$  e  $ArC^+$  que interferem diretamente nos isótopos  $^{24}Mg$ ,  $^{44}Ca$  e  $^{52}Cr$ , respectivamente [106]. Além disso, podem causar outros efeitos indesejáveis no plasma, tais como a combustão incompleta da matéria orgânica e resfriamento do canal central do plasma. Outro efeito é a extinção ou instabilidade do plasma, que pode acontecer mesmo com vazões muito baixas da amostra, sendo mais pronunciada para solventes orgânicos com maior pressão de vapor. Quando a extinção do plasma não ocorre, é observado o resfriamento do canal central do mesmo e, conseqüentemente, uma diminuição da sensibilidade. Para aumentar a estabilidade e a sensibilidade quando são introduzidas amostras orgânicas no plasma, é necessário aumentar a potência de RF, geralmente de 1100 W para 1500 a 2000 W [107,108] dependendo do equipamento utilizado. Estudos mostraram que a estabilidade do plasma, na presença de solventes orgânicos, depende dos fenômenos de transporte, gradiente de temperatura no plasma e da eficiência de nebulização. Sendo assim, é possível prever as condições operacionais para cada tipo de solvente através de suas propriedades físico-químicas [109].

A introdução de amostras orgânicas no plasma diminui a temperatura de excitação e a densidade de elétrons, efeitos atribuídos ao aumento de energia requerida para dissociar espécies moleculares contendo carbono. Esses efeitos podem causar interferências severas quando estas amostras são analisadas, exigindo a diluição das mesmas ou ajuste de matriz [110,111]. Também foi observado que em presença de carbono no plasma há um aumento significativo da sensibilidade, especificamente para elementos com energia de ionização alta (mas não para todos eles), que se deve as reações de transferência de carga. Para os demais elementos, com menor energia de ionização, este efeito é bem menos intenso. Neste contexto, foi especulada a utilização de solventes orgânicos para aumentar a eficiência de ionização dos elementos com maior energia de ionização [106,108,112,113]. Entretanto, foi comprovado que esse aumento de sensibilidade devido à presença de compostos orgânicos no plasma não depende apenas das

reações de transferência de carga, mas também da distribuição dos íons no plasma e do estado de oxidação do analito [114,115].

Além dos efeitos indesejáveis no plasma e das variações na eficiência de nebulização e transporte, o carbono resultante das reações no plasma pode depositar-se nos cones da interface, obstruindo o orifício de cada cone, ou ainda penetrar no espectrômetro de massa através da interface sob vácuo, depositando-se na(s) lente(s) iônica(s) [116]. Os depósitos de carbono nas superfícies dos cones causam variações do sinal analítico, principalmente a sua supressão, devido à diminuição do orifício dos cones, que podem até entupir, dependendo da amostra. Na maioria dos casos, o sinal diminui até que haja um equilíbrio entre a quantidade de material depositada e a quantidade que é arrancada da superfície do cone. A partir deste estágio, as variações não ocorrem mais, entretanto a sensibilidade pode ficar comprometida, quanto este equilíbrio é alcançado. Já na(s) lente(s) iônica(s), o carbono depositado pode causar a perda de eficiência na colimação e extração de íons, já que a otimização dos parâmetros instrumentais é conduzida com soluções aquosas, sem compostos orgânicos. Além disso, deve ser considerada a necessidade de limpar o instrumento, cuja limpeza é uma tarefa difícil e exige certa habilidade do analista [9].

A introdução deste tipo de amostra no ICP não é uma tarefa trivial, portanto exige utilização de sistemas apropriados, de maneira a minimizar as interferências. Diversos trabalhos têm relatado o uso da ETV, pois a amostra é submetida a um programa de temperatura, pelo qual a matriz pode ser parcialmente ou totalmente eliminada na etapa de pirólise, conforme já mencionado. Este método, para a introdução de amostra no ICP permite elevada sensibilidade e baixos limites de detecção dos elementos de interesse, apesar do tempo de análise ser mais longo e do limitado número de elementos que podem ser determinados ao mesmo tempo [94-102].

Outros sistemas para a introdução de amostra no ICP, que podem ser utilizados, são os nebulizadores pneumáticos e ultrassônicos acoplados a sistemas dessolvatores, nos quais o aerossol passa por etapas de aquecimento acima de 100 °C e resfriamento abaixo de 0 °C ou próxima desta temperatura, ou por membranas semi-permeáveis. Acopladas aos nebulizadores, também tem sido utilizadas câmaras de nebulização refrigeradas. Embora estes sistemas reduzam a carga de solvente que alcança o plasma, essa carga ainda é grande e, na maioria dos casos, exige a utilização de gases auxiliares, principalmente oxigênio, para aumentar a eficiência da decomposição da matriz da amostra no plasma [1].

Vários autores têm relatado o uso de gases auxiliares, principalmente gases moleculares, que provocam mudanças especiais no plasma. Em muitos destes trabalhos foram investigadas as reduções de interferências espectrais por íons poliatômicos contendo átomos de argônio. Foi verificado que o carbono proveniente do propanol e do metano pode provocar um aumento da temperatura do canal central do plasma e melhorar a eficiência de decomposição de íons poliatômicos, além de que o  $N_2$  e  $O_2$ , quando usados, podem competir com outros átomos na formação de íons poliatômicos [112,117]. Em outros trabalhos, foi verificado que a presença de  $H_2$  e  $N_2$ , quando usados como gases auxiliares, aumentam a ionização do analito, característica atribuída à elevada condutividade térmica destes gases, que permitem uma transferência de energia mais eficiente no plasma [9].

Com muita frequência é adicionado  $O_2$  ao gás do nebulizador, que no plasma contribui para a oxidação do carbono da matriz da amostra, evitando sua deposição na interface, na lente iônica e em outras partes do instrumento, o que poderia causar uma diminuição da sensibilidade [117]. Além disso, a adição de  $O_2$  pode contribuir para a diminuição de interferências por íons poliatômicos de carbono. A quantidade deste gás deve ser criteriosamente regulada, podendo ser acompanhada pela diminuição da emissão do carbono no plasma [9]. Embora o uso de oxigênio favoreça a pirólise do carbono, foi observado que para ICP OES a sensibilidade é maior na ausência deste gás [118,119]. Apesar dos gases auxiliares diminuírem as interferências espectrais, favorecer a transferência de energia e auxiliarem a eliminação do carbono, deve-se tomar cuidado para não serem adicionados em excesso, pois podem causar o rápido desgaste dos cones da interface e a formação de outros íons poliatômicos [9].



## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo geral a determinação de elementos traço por ICP-MS em amostras biológicas solubilizadas com ácido fórmico usando-se dois sistemas para a introdução das amostras no ICP: nebulizador microconcêntrico e vaporizador eletrotérmico.

### **3.2 Objetivo específico**

#### **a) Solubilização de amostras biológicas usando ácido fórmico**

- Avaliar quais as melhores condições para a solubilização de amostras biológicas com ácido fórmico e quais suas limitações.

#### **b) Uso do nebulizador microconcêntrico para introduzir amostra no ICP**

- Avaliar a influência do ácido fórmico sobre o sinal analítico;
- Avaliar a influência do ácido fórmico sobre o sinal das principais interferências em ICP-MS;
- Avaliar a estabilidade do plasma e possível deposição de carbono sobre o cones e interface;
- Avaliar a estabilidade do sinal analítico;
- Avaliar as condições instrumentais para menor intensidade de interferentes e maior sensibilidade com respeito ao sinal do analito;
- Testar a calibração externa em diferentes meios;
- Quantificar elementos traço em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico;
- Comparar os parâmetros de mérito do método proposto com aqueles relativos ao método convencional de tratamento de amostras.

**c) Uso do ETV para introduzir amostra no ICP**

- Avaliar a temperatura de pirólise e vaporização analisando-se a amostra tratada com ácido fórmico e padrão aquoso;
- Avaliar a vazão de gás interno no ETV;
- Avaliar as condições instrumentais do ICP-MS, gás carreador e potências de RF;
- Avaliar o uso de paládio como modificador/carreador;
- Avaliar a influência do ácido fórmico sobre o sinal analítico;
- Avaliar a influência do ácido fórmico sobre o sinal das principais interferências em ICP-MS;
- Testar a calibração externa em diferentes meios;
- Quantificar elementos traço nas amostras biológicas tratadas com ácido fórmico.

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Instrumentação

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, modelo Elan 6000, *Perkin Elmer – Sciex* (Thornhill, Canadá) foi usado. Gás argônio, com pureza mínima de 99,996% foi usado como gás principal, gás auxiliar, gás de nebulização no caso do uso do micronebulizador, gás carreador (ETV) e gás interno (ETV) fornecido por *White Martins* (São Paulo, Brasil). Foram usados cone amostrador e skimmer de platina. Antes de conectar no ICP-MS qualquer sistema alternativo de introdução de amostra (micronebulizador ou ETV), o desempenho do mesmo foi avaliado mediante a sensibilidade, nível de óxidos e de íons de dupla carga (conforme recomendado pelo fabricante do espectrômetro de ICP-MS). Este procedimento padrão foi realizado usando-se o nebulizador de fluxo cruzado ajustado a uma câmara de nebulização de dupla passagem (sistema convencional para a introdução de amostra no plasma, em ICP-MS).

#### **Introdução da amostra no ICP com o micronebulizador**

Um nebulizador microconcêntrico, modelo MCN-100 de *Cetac Technologies* (Omaha, EUA) foi ajustado a uma câmara de nebulização ciclônica e então conectados ao espectrômetro de ICP-MS. A vazão da amostra foi controlada usando-se uma bomba peristáltica da *Ismatec* (Glattbrugg, Suíça). A vazão das soluções foi  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ . A vazão do gás nebulizador e da potência de RF foram  $0,7 \text{ L min}^{-1}$  e 800 W, respectivamente, escolhidas pós avaliação prévia. Foi usado tubo de Tygon (laranja/vermelho) de 0,19 mm de diâmetro interno e 40 cm de comprimento para a propulsão da amostra através da bomba peristáltica. As condições instrumentais foram: “auto lens” modo “on”, modo de leitura “peak hopping”, “dwell time” de 15 ms, 40 varreduras por leitura, 1 leitura por replicata e 3 replicatas.

#### **Introdução da amostra no ICP com o vaporizador eletrotérmico**

Um vaporizador eletrotérmico modelo HGA-600 MS equipado com um amostrador automático modelo AS-60, ambos *Perkin Elmer* foi conectado ao espectrômetro de ICP-MS. Tubos recobertos com grafite

pirolítico (lote BO 091509) adquiridos da *Perkin Elmer* foram usados para realizar este trabalho. As condições experimentais são mostradas na Tabela 2. Quando a solução do modificador foi utilizada, ela foi pipetada primeiro, seguida da solução da amostra ou solução de calibração, ambas mediante o amostrador automático.

**Tabela 2:** (A) Parâmetros operacionais e de aquisição de dados nas determinações por ICP-MS

Potência de RF (W)	1300
Vazão de gás carreador (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Dwell time (ms)	25
Modo de leitura	Peak-hopping
Varreduras por leitura	1
Leituras por replicata	60
Replicatas	3
Modo de avaliação do sinal	Integração
Tempo de integração (s)	16,8

(B) Programa de temperatura do ETV, para 20 µL do modificador e 20 µL da amostra ou solução de calibração.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de gás interno (mL min <sup>-1</sup> )
Limpeza	2700	1	5	300
Resfriamento	20	1	5	300
Secagem	90	5	10	300
Secagem	120	5	15	300
Pirólise	1000	10	15	300
Resfriamento	20	1	3	150
Vaporização	2400	1	15	150
Resfriamento	20	1	5	300

### Introdução da amostra digerida no ICP com o nebulizador convencional

Um nebulizador de fluxo cruzado e uma câmara de nebulização de dupla passagem foram usados. A amostra foi bombeada ao nebulizador a uma vazão de 1,4 mL min<sup>-1</sup> por meio de uma bomba peristáltica. A vazão do gás do nebulizador e a potência de RF utilizada foi 1,05 L min<sup>-1</sup> e 1100 W, respectivamente. As condições instrumentais foram: “auto lens” modo “on”, modo de leitura “peak hopping”, “dwell time” de 15 ms, 40 varreduras por leitura, 1 leitura por replicata e 3 replicatas.

## 4.2 Reagentes e amostras

No preparo de todas as soluções e amostras foi utilizada água destilada e deionizada com resistividade de 18 M $\Omega$  cm, purificado em um sistema Milli-Qplus da *Millipore* (Beadford, EUA). Todos os reagentes utilizados possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Ácido nítrico 65% (m/m), ácido clorídrico 37% (m/m) ambos da *Merck* (Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico 85% (m/m) da *Vetec* (Rio de Janeiro, Brasil) foram bi-distilados abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo *Kürner Analysentechnik* (Rosenheim, Alemanha). Peróxido de hidrogênio 40% (m/m) da *Vetec* (Rio de Janeiro, Brasil) também foi utilizado.

Foi utilizada uma solução padrão multielementar “Standard solution 3” (contendo 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Ce, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V e Zn), adquirida da *Perkin Elmer* (Norwalk, EUA), além de soluções monoelementares de Rh, Y e Ir (*Perkin Elmer*), ambas contendo 1,0 mg mL<sup>-1</sup> do analito e soluções de Fe (2,0 mg mL<sup>-1</sup>) e Se (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) adquiridas da *Merck* (Darmstadt, Alemanha). Soluções monoelementares de Ba e Ce foram preparadas a partir de Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O e BaCO<sub>3</sub> adquiridos da *SPEX* (Medison, EUA). Uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 10,0 mg mL<sup>-1</sup> foi utilizada como modificador/carreador após diluição para concentração final de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v). Foram analisados quatro materiais de referência certificados: Bovine Liver 1577b (fígado bovino) e Oyster Tissue 1566a (tecido de ostra) ambos do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), (Gaithersburg, EUA); TORT 2 (Hepatopancreas de lagosta) e DOLT 3 (fígado de “Dogfish”) do *National Research Council Canada* (NRCC), (Ottawa, Canadá).

## 4.3 Preparo das amostras

Em uma balança analítica AG204, adquirida da *Mettler Toledo* (Giessen, Alemanha), foram pesadas aproximadamente 75 mg de cada amostra em frascos de polipropileno de 15 mL, sendo adicionados a cada frasco 5 mL de ácido fórmico purificado. A mistura foi vigorosamente agitada (manualmente) para evitar que parte da amostra ficasse aderida na superfície do frasco. Na sequência, os frascos foram aquecidos a 90 °C em banho-maria, durante uma hora. Após o processo

de aquecimento, o volume foi completado para 10 mL com água e foi adicionado ácido nítrico para uma concentração final de 1% (v/v).

A digestão assistida por microondas das amostras foi realizada para avaliar a concentração de elementos não certificados nas mesmas. Para o procedimento de digestão, aproximadamente 150 mg de cada amostra foram pesados em um frasco de PFA (específico do microondas) e adicionados 5 mL de HNO<sub>3</sub>, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2 mL de água. Os frascos foram fechados e a mistura submetida à digestão conforme o programa de temperatura a seguir descrito. Após a digestão, a solução resultante foi retirada do frasco de PFA, transferida para um frasco de polipropileno de 50 mL e o volume da solução foi aferida para 30 mL com água. A digestão foi realizada em forno microondas, modelo Ethos Plus da *Milestone* (Sorisole, Itália), sendo que o programa de temperatura usado para a digestão incluiu 4 etapas: 1) 2 min e 30 s até 90 °C; 2) 5 min até 135 °C; 3) 3 min e 30 s até 190 °C e 4) 10 min a 190 °C.

#### 4.4 Escolha dos isótopos

Foram escolhidos isótopos que apresentam maior abundância e menor possibilidade de interferência. O *software* do instrumento automaticamente sugere um dos isótopos de cada elemento, mas também permite que sejam escolhidos outros, além de indicar as abundâncias relativas de cada um e as principais interferências espectrais. Na Tabela 3 são mostrados os isótopos escolhidos para monitorar no presente trabalho, suas abundâncias e as principais interferências espectrais.

Para os isótopos <sup>82</sup>Se, <sup>98</sup>Mo e <sup>138</sup>Ba são usadas equações elementares que o *software* do instrumento indica para corrigir a interferência de <sup>82</sup>Kr, <sup>98</sup>Ru, <sup>138</sup>Ce e <sup>138</sup>La. Para o <sup>75</sup>As foi adicionada uma equação para a correção do íon poliatômico <sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>, que é mostrada no manual do instrumento. Para o restante dos isótopos não foi usada qualquer equação elementar para corrigir interferências.

#### 4.5 Procedimentos

##### 4.5.1 Introdução da amostra no ICP com o micronebulizador

Foram preparadas soluções contendo variáveis concentrações de ácido fórmico (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% v/v) em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) e enriquecidas com os analitos (As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe,

**Tabela 3:** Isótopos monitorados, suas abundâncias e principais interferências espectrais (a massa de cada isótopo é dada por unidades de massa atômica, u).

Isótopo	Abundância (%)	Principais interferentes
<sup>51</sup> V	99,8	<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O, <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O, <sup>1</sup> H <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O, <sup>2</sup> H <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O, <sup>1</sup> H <sup>32</sup> S <sup>18</sup> O e <sup>2</sup> H <sup>32</sup> S <sup>17</sup> O
<sup>55</sup> Mn	100	<sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N, <sup>2</sup> H <sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O, <sup>2</sup> H <sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O e <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O
<sup>57</sup> Fe	2,1	<sup>40</sup> Ca <sup>17</sup> O e <sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O
<sup>59</sup> Co	100	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O e <sup>42</sup> Ca <sup>17</sup> O
<sup>60</sup> Ni	26,2	<sup>42</sup> Ca <sup>18</sup> O, <sup>44</sup> Ca <sup>16</sup> O e <sup>43</sup> Ca <sup>17</sup> O
<sup>63</sup> Cu	69,2	<sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O, <sup>46</sup> Ti <sup>17</sup> O e <sup>47</sup> Ti <sup>16</sup> O
<sup>66</sup> Zn	27,9	<sup>48</sup> Ti <sup>18</sup> O, <sup>49</sup> Ti <sup>17</sup> O, <sup>50</sup> Ti <sup>16</sup> O, <sup>50</sup> V <sup>16</sup> O, <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O e <sup>132</sup> Ba <sup>++</sup>
<sup>69</sup> Ga	60,2	<sup>38</sup> Ar <sup>31</sup> P, <sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O, <sup>51</sup> V <sup>18</sup> O, <sup>138</sup> La <sup>++</sup> e <sup>138</sup> Ba <sup>++</sup>
<sup>75</sup> As	100	<sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl, <sup>150</sup> Sm <sup>++</sup> , <sup>150</sup> Nd <sup>++</sup> e <sup>150</sup> Eu <sup>++</sup>
<sup>82</sup> Se	8,7	<sup>82</sup> Kr, <sup>81</sup> Br <sup>1</sup> H, <sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>2</sup> H, <sup>164</sup> Ho <sup>++</sup> , <sup>164</sup> Dy <sup>++</sup> e <sup>164</sup> Er <sup>++</sup>
<sup>85</sup> Rb	72,2	<sup>170</sup> Yb <sup>++</sup> e <sup>170</sup> Er <sup>++</sup>
<sup>88</sup> Sr	82,6	<sup>176</sup> Yb <sup>++</sup> , <sup>176</sup> Lu <sup>++</sup> e <sup>176</sup> Hf <sup>++</sup>
<sup>89</sup> Y	100	
<sup>98</sup> Mo	24,1	<sup>98</sup> Ru e <sup>81</sup> Br <sup>18</sup> O
<sup>103</sup> Rh	100	<sup>87</sup> Sr <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>111</sup> Cd	12,8	<sup>95</sup> Mo <sup>16</sup> O e <sup>94</sup> Mo <sup>17</sup> O
<sup>138</sup> Ba	71,7	<sup>138</sup> Ce e <sup>138</sup> La
<sup>140</sup> Ce	88,5	
<sup>193</sup> Ir	62,7	<sup>177</sup> Hf <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>205</sup> Tl	70,3	
<sup>208</sup> Pb	52,4	
<sup>238</sup> U	100	

Ga, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Rh, Se, Sr, Tl, U e Y) até a concentração final de 30 µg L<sup>-1</sup>, exceto para Se e Fe que foram enriquecidas para concentração final de 300 µg L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram utilizadas para investigar a variação da intensidade do sinal analítico para diferentes concentrações de ácido fórmico e para definir a potência de RF e vazão do gás nebulizador. Um branco de cada solução foi medido e levado em consideração. Para a investigação das interferências por íons

poliatômicos, soluções com concentrações crescentes de ácido fórmico (como acima citado) em HCl 0,1% (v/v) e HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) foram medidas. As interferências por íons de dupla carga e óxidos foram investigadas usando-se soluções contendo 10 µg L<sup>-1</sup> de bário e de cério e aumentando-se as concentrações de ácido fórmico (como acima citado).

A quantificação foi realizada por meio da calibração externa, usando-se dois tipos de solução; a calibração externa com padrões aquosos foi realizada usando-se soluções preparadas em ácido nítrico 1% (v/v), enquanto que a calibração em meio orgânico foi realizada usando-se soluções padrão preparadas em ácido fórmico 50% (v/v) e ácido nítrico 1% (v/v). As concentrações dos analitos nas soluções de calibração foram de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µg L<sup>-1</sup>, exceto para Fe cujas concentrações foram 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg L<sup>-1</sup>. Como padrão interno, Rh, Ir e Y foram adicionados em todas as soluções (amostras e padrões), a uma concentração final de 5 µg L<sup>-1</sup>. A análise foi realizada usando-se as condições experimentais avaliadas e escolhidas. As amostras foram analisadas pela introdução das soluções no ICP realizado como descrito anteriormente.

#### **4.5.2 Introdução da amostra no ICP com o vaporizador eletrotérmico**

Todas as avaliações foram realizadas para duas soluções distintas, para o padrão inorgânico aquoso (solução de calibração) contendo os analitos (As, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e V), concentrações de 10 µg L<sup>-1</sup> dos mesmos em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) e para a amostra TORT 2 solubilizada com ácido fórmico (5% v/v de ácido fórmico, ou seja, após diluir 10 vezes com água a solução obtida conforme descrito no item 4.3) e enriquecida com 5 µg L<sup>-1</sup> de Se. Inicialmente, foram realizadas curvas de pirólise usando-se vaporização constante em 2500 °C e na sequência foram realizadas curvas de vaporização usando-se pirólise constante em 600 °C. Essas otimizações foram realizadas sem e com paládio como modificador/carreador (3 µg). Também foi avaliada massa de paládio como modificador/carreador usando-se soluções com variadas concentrações de paládio, de maneira que para 20 µL dispensados no tudo de grafite a massa de paládio correspondente fosse 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0 µg (foram usadas as temperaturas de pirólise e vaporização previamente escolhidas, 1000 e 2400 °C, respectivamente).

A otimização da potência de RF foi realizada usando uma vazão de gás carreador constante em 1,025 L min<sup>-1</sup>, enquanto que a otimização

da vazão de gás carreador foi realizada usando-se potência fixa em 1100 W. Ambas foram realizadas usando-se as condições previamente otimizadas (2 µg de paládio, pirólise e vaporização em 1000 e 2400 °C, respectivamente). A otimização da vazão do gás interno também foi realizada usando-se as condições previamente otimizadas, potência de RF de 1300 W e vazão de gás carreador de 1,0 L min<sup>-1</sup>. Para o ETV estes parâmetros foram avaliados usando-se a solução de amostra tratada com ácido fórmico.

O estudo do efeito do ácido fórmico sobre a intensidade do sinal analítico foi realizado usando-se soluções contendo variáveis concentrações de ácido fórmico (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% v/v) em HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) e enriquecidas com os analitos para concentração final de 10 µg L<sup>-1</sup> dos mesmos. Um branco de cada solução foi preparado, medido e o sinal do analito na amostra corrigido com o sinal do branco. Para a investigação das interferências por íons poliatômicos, soluções com concentrações crescentes de ácido fórmico (como acima citado) e com HCl 0,1% (v/v) e HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) foram medidas usando as condições previamente estabelecidas (2 µg de paládio; pirólise e vaporização em 1000 e 2400 °C, respectivamente; potência de RF de 1300 W; vazão de gás carreador de 1,0 L min<sup>-1</sup> e vazão de gás interno de 150 mL min<sup>-1</sup>).

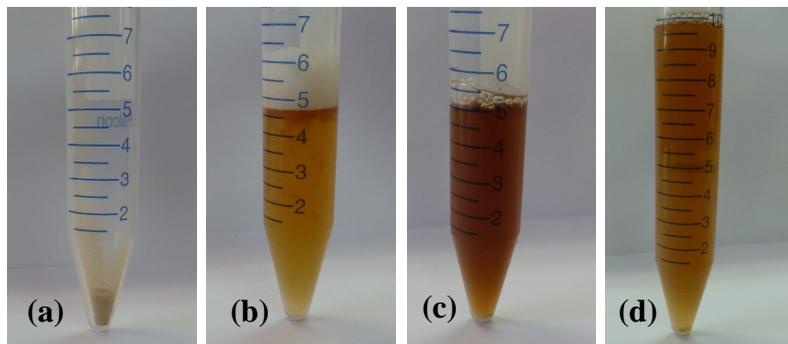
A quantificação dos analitos foi realizada por meio da calibração externa, usando-se dois tipos de soluções para a curva de calibração: calibração externa com padrões aquosos, usando soluções preparadas em ácido nítrico 1% (v/v) e em meio orgânico, usando soluções padrão preparadas em ácido fórmico 5% (v/v) e ácido nítrico 1% (v/v). As concentrações dos analitos nas soluções de calibração foram de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0, 25,0 e 50,0 µg L<sup>-1</sup>. As soluções das amostras preparadas com ácido fórmico, conforme anteriormente descritas, foram diluídas 10 vezes com água antes de introduzidas no ETV.



## 5 Resultados e discussões

### 5.1 Solubilização de amostras biológicas com ácido fórmico

O tratamento de amostras com ácido fórmico foi realizado com aquecimento da mistura, com a finalidade de acelerar a solubilização, caso contrário seria lenta. Nos trabalhos já citados na literatura, a solubilização das amostras biológicas é realizada pela incubação a 50 °C durante 2 a 4 horas em banho ultrassônico [7,8], ou entre 50 - 85 °C durante 4 a 8 horas [47]. Entretanto, neste trabalho observou-se que o tempo gasto para a solubilização das amostras analisadas pode ser diminuído para uma hora, se a temperatura for aumentada para 90 °C, sem a necessidade de sonicação, sem restar partículas em suspensão. Outra diferença é que após o procedimento de solubilização, é adicionado ácido nítrico até a concentração final de 1% (v/v), para a estabilização dos analitos em solução. Quando a solubilização é realizada em temperaturas menores que 80 °C, além da solubilização demorar diversas horas, a solução final permanece viscosa. Além disso, a solubilização pode ser incompleta, dependendo da amostra, restando partículas em suspensão, que podem causar o entupimento de nebulizadores. Tecidos de amostras botânicas, que contêm celulose e lignina não são completamente solubilizados com ácido fórmico, mesmo a 90 °C. Por essa razão, amostras botânicas não foram incluídas neste trabalho, uma vez que facilmente causariam o entupimento de nebulizadores, embora pudessem ser injetadas no forno de grafite do vaporizador eletrotérmico. Após o tratamento, as soluções apresentaram coloração escura e com forte odor de ácido fórmico, entretanto, após diluição, o odor ficou menos intenso e a coloração ficou marrom, mais ou menos intensa dependendo do tipo do tecido (fígado, rim, músculo ou frutos do mar). Na Figura 5 são mostradas as etapas de solubilização e mudança de cor da amostra TORT 2 até o final do processo: a) 75 mg de amostra dentro do tubo; b) amostra e 5 mL de ácido fórmico homogeneizados manualmente; c) amostra solubilizada com ácido fórmico; d) amostra solubilizada com ácido fórmico, diluída até 10 mL com água e ácido nítrico até a concentração final de 1% (v/v).



**Figura 5:** Etapas do processo de solubilização da amostra Tort 2: a) 75 mg de amostra dentro do tubo; b) amostra e 5 mL de ácido homogeneizados; c) amostra solubilizada; d) amostra solubilizada, diluída até 10 mL com água e ácido nítrico até a concentração final de 1% (v/v).

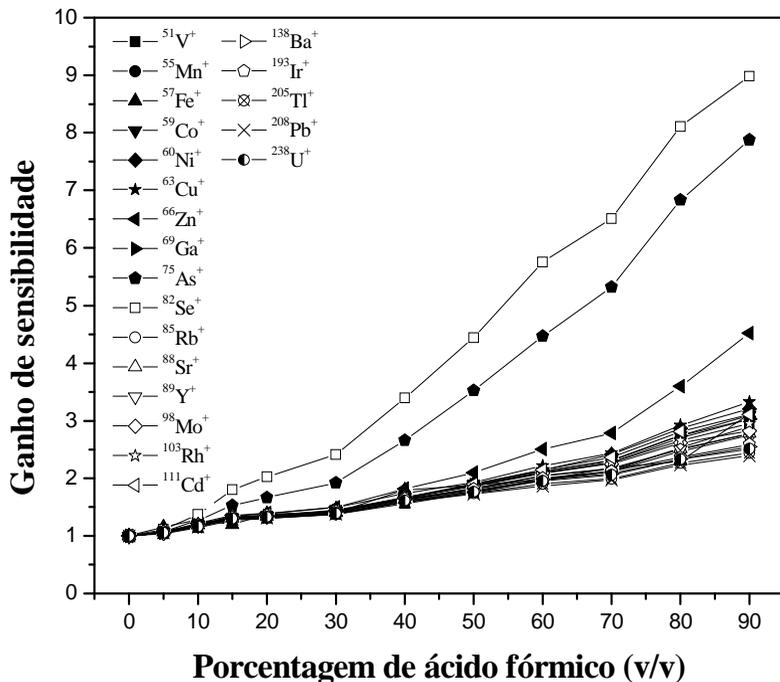
A quantidade de ácido fórmico é um fator importante que deve ser observado. Se volumes menores do que 2,5 mL forem usados para a solubilização de 75 mg de amostra seca, partículas podem permanecer em suspensão sem solubilizar, além da solução ficar viscosa, apresentando dificuldade para ser pipetada ou aspirada. Se o ácido fórmico for diluído em água, de modo que sua concentração fique menor do que 85% v/v, sua eficiência na solubilização diminui consideravelmente. Por isso, as amostras a serem solubilizadas devem estar secas. Assim, usando-se ácido fórmico 99% (v/v) ao invés de 85% (v/v), por exemplo, o processo de solubilização é melhorado, entretanto o analista deve ter mais cuidado ao manusear o ácido fórmico 99% (v/v), pois é uma substância tóxica com elevada pressão de vapor. Além disso, o analista deve ter muita atenção ao adicionar ácido nítrico à solução da amostra solubilizada com ácido fórmico após o processo de solubilização. Se o ácido nítrico for adicionado diretamente à solução ainda quente observa-se a ocorrência de uma reação exotérmica, que libera gás carbônico, resultante da decomposição do excesso de ácido fórmico [44]. A liberação do gás provoca a formação de uma quantidade significativa de espuma, de maneira que parte da amostra pode ser perdida. Assim, é recomendado esperar a temperatura da solução diminuir e adicionar um pouco de água (2 – 4 mL) antes de adicionar o ácido nítrico, inibindo a reação.

## 5.2 Introdução da amostra no ICP com o micronebulizador

### 5.2.1 Efeito do ácido fórmico sobre a sensibilidade

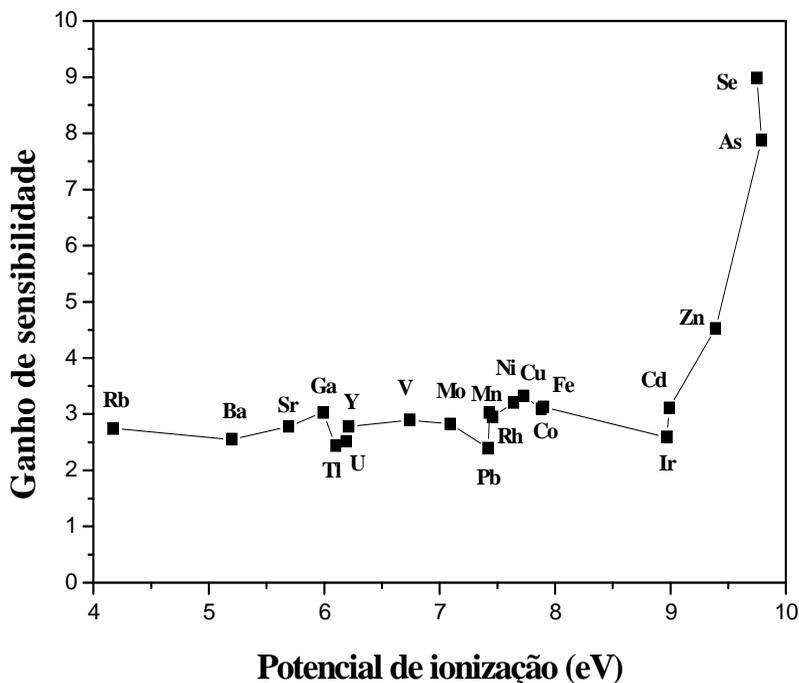
Quando introduzidas no plasma soluções contendo elevado conteúdo de carbono, é importante verificar o efeito do carbono sobre a sensibilidade, com a finalidade de se usar uma estratégia de calibração adequada, visando-se obter dados exatos. Diversos autores observaram que pequenas quantidades de compostos orgânicos no plasma podem aumentar a eficiência de nebulização e a eficiência de transporte do aerossol, conseqüentemente, aumentando o sinal analítico em relação a soluções aquosas. De acordo com a literatura, compostos orgânicos também podem melhorar a eficiência de ionização (aqueles elementos com energia de ionização maior) devido à reação de transferência de carga entre uma espécie de carbono carregada positivamente e o átomo do analito. Entretanto, esse aumento de sensibilidade pode ser devido a diferente distribuição dos íons no plasma, conforme já comentado. Por outro lado, um elevado conteúdo de carbono nas soluções poderá causar a instabilidade ou a extinção do plasma e a deposição de carbono nos cones e na interface [91,108,113-116].

O ganho de sensibilidade para diferentes elementos em relação ao conteúdo de ácido fórmico, para a mesma concentração dos elementos, é mostrada na Figura 6. A Figura mostra que o ganho de sensibilidade aumenta com o aumento da porcentagem de ácido fórmico nas soluções, sendo que esse aumento ocorre até a concentração de 90% (v/v) de ácido fórmico, limite máximo de concentração investigado. Ou seja, para todas as concentrações de ácido fórmico, a intensidade do sinal analítico neste meio é sempre maior do que aquela obtida para o analito em água sem ácido fórmico. Provavelmente, uma maior eficiência de nebulização ou melhor eficiência no transporte do aerossol pode ser a causa deste efeito de aumento de sensibilidade, pois o ácido fórmico tem menor tensão superficial do que a água, favorecendo a formação de um aerossol de gotas menores e maior eficiência de nebulização. A tensão superficial da água pura é  $71,13 \text{ mN m}^{-1}$ , enquanto que a do ácido fórmico concentrado é  $37,13 \text{ mN m}^{-1}$ , ambas a  $25^\circ\text{C}$  [120]. O ganho máximo de sensibilidade, em relação à solução aquosa sem qualquer constituinte orgânico ficou entre 2,4 e 3,3 vezes. Entretanto, para  $^{75}\text{As}^+$ ,  $^{82}\text{Se}^+$  e  $^{66}\text{Zn}^+$ , o aumento foi de aproximadamente 4,5; 7,8 e 9 vezes respectivamente.



**Figura 6:** Efeito da concentração de ácido fórmico sobre a sensibilidade relativa dos analitos. O sinal é relativo ao valor obtido para uma solução sem ácido fórmico. Concentração dos analitos:  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  para os demais. Potência de RF: 1100 W, vazão do gás do nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$ , vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Fazendo um gráfico do aumento máximo de sensibilidade para cada elemento “versus” a primeira energia de ionização tem-se a Figura 7. Como se pode observar, o aumento de sensibilidade foi maior para os elementos com potencial de ionização superior a 9 eV. Esse aumento de sensibilidade diferenciado para os elementos com maior energia de ionização deve-se ao aumento do grau de ionização no argônio do ICP, pela presença de carbono, devido às reações de transferência de carga entre espécies de carbono e os analitos [108,113].



**Figura 7:** Aumento de sensibilidade versus potencial de ionização (eV) para elementos em solução contendo ácido fórmico 90% (v/v). O aumento de sensibilidade refere-se ao sinal do analito em água e ácido nítrico 1% (v/v).

Para elementos com baixo potencial de ionização, o aumento da sensibilidade, em torno de 2,5 vezes, deve ter causas semelhantes, independente do potencial de ionização, por causa dos efeitos do ácido fórmico sobre a nebulização e o transporte do aerossol até o plasma, como discutido anteriormente. Esses efeitos têm serias implicações na análise de amostras orgânicas, pois esse aumento de sensibilidade representa interferências quando padrões aquosos são utilizados para a curva de calibração. As interferências causadas pela mudança nas propriedades físico-químicas das soluções afetam todos os elementos de maneira igual, portanto, podem ser mais facilmente corrigidas pelo uso de um padrão interno adequado. Entretanto, as interferências causadas pelo aumento da eficiência de ionização ocorrem de maneira diferenciada para cada elemento, dependendo da primeira energia de ionização, sendo assim, é quase impossível corrigir essa interferência

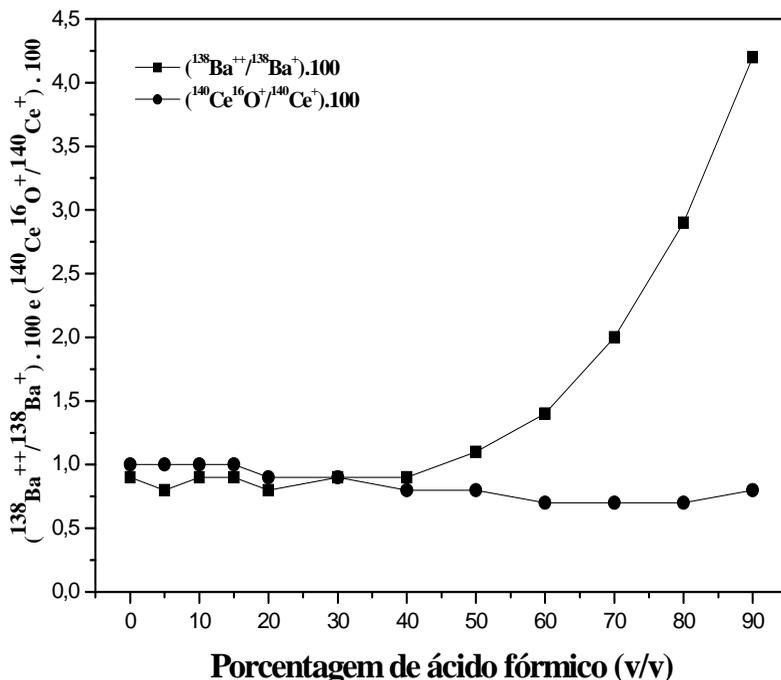
pelo uso de um padrão interno. Essa teoria é parcialmente contestada, pois esse aumento diferenciado de sensibilidade pode ocorrer devido a diferente distribuição dos íons no plasma e devido aos diferentes estados de oxidação do analito, como discutido acima [114,115]. Entretanto, se for usada a mesma quantidade de ácido fórmico nos padrões e amostra, os efeitos sobre a nebulização, transporte do aerossol e ionização serão os mesmos para padrões e amostras, pensando as interferências.

### 5.2.2 Efeito do ácido fórmico sobre as interferências

Entre as principais interferências espectrais encontradas em ICP-MS, destacam-se as provocadas pelos óxidos e pelos íons de dupla carga. Os óxidos são monitorados em função do valor da razão entre os íons  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$  e  $^{140}\text{Ce}^+$ , pois o cério é um elemento que forma uma ligação estável com o oxigênio, ou seja, é um elemento que forma óxidos com facilidade no plasma. Já os íons de dupla carga são monitorados em função da razão entre os íons  $^{138}\text{Ba}^{++}$  e  $^{138}\text{Ba}^+$ , pois o bário é um dos elementos cuja menor segunda energia de ionização é baixa, sendo facilmente duplamente ionizado no ICP de argônio. Tanto a formação de íons de dupla carga quanto de óxidos não é desejável em ICP-MS, pois além de reduzir a sensibilidade do isótopo em questão, interfere na determinação do isótopo com m/z igual a m/z do íon de carga dupla ou do óxido interferente. Usualmente é requerido que a razão  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$  seja limitada a 3%. Óxidos e íons de dupla carga de outros elementos estariam em concentrações abaixo desse valor.

Na Figura 8 é mostrada a variação das razões ( $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ ).100 e ( $^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$ ).100 em função da porcentagem de ácido fórmico. Observa-se que na ausência e em presença de até 80% (v/v) de ácido fórmico, ambas as razões são menores do que 3%. Para concentrações de ácido fórmico entre 40 e 90% (v/v), a razão  $^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$  aumenta consideravelmente, provavelmente devido às reações de transferência de carga entre espécies de carbono carregadas e os íons  $^{138}\text{Ba}^+$ , já que a possibilidade de existir um íon poliatômico com essa massa é pouco provável. Entretanto a relação permanece abaixo do limite recomendado, em presença de ácido fórmico de até 80% (v/v). Por outro lado, a presença de ácido fórmico não teve efeito significativo sobre a razão  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ , que permaneceu entre 0,75 e 1% para todas as concentrações de ácido fórmico investigadas. Deve ser lembrado que a posição do capilar da amostra em relação ao adaptador de safira do nebulizador é um fator crítico. Um pequeno

deslocamento do capilar pode mudar consideravelmente o desempenho do nebulizador em relação a sensibilidade e ao sinal de óxidos e íons de dupla carga.



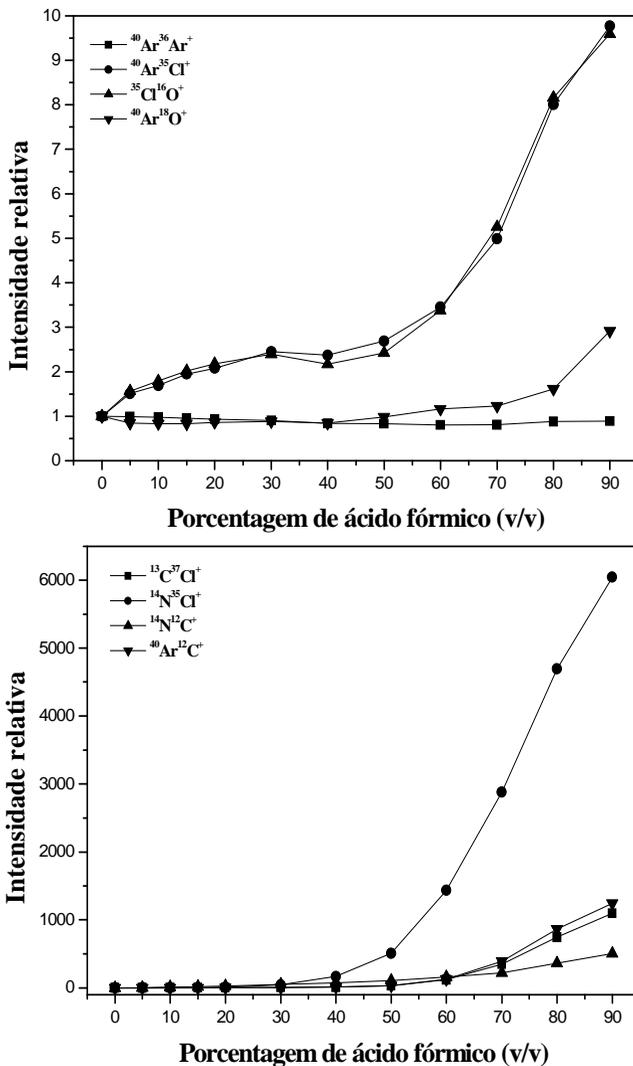
**Figura 8:** Efeito do ácido fórmico sobre as razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/^{140}\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$ . Potência de RF: 1100 W, vazão de gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$ , vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ . Uma solução contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce foi utilizada.

Além dos óxidos e dos íons de dupla carga, outros interferentes podem ser formados, dependendo do solvente e do ácido utilizados e da matriz da amostra. Por isso, alguns íons poliatômicos formados a partir de argônio, oxigênio, cloro e nitrogênio também foram monitorados, pela introdução de soluções contendo diferentes concentrações de ácido fórmico, HCl 0,1% (v/v) e HNO<sub>3</sub> 1% (v/v). Como mostrado nas Figuras 9a e 9b, as intensidades dos sinais de  $^{14}\text{N}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ,  $^{13}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  e de  $^{36}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$  aumentam, em comparação com as intensidades obtidas para solução aquosa sem ácido fórmico

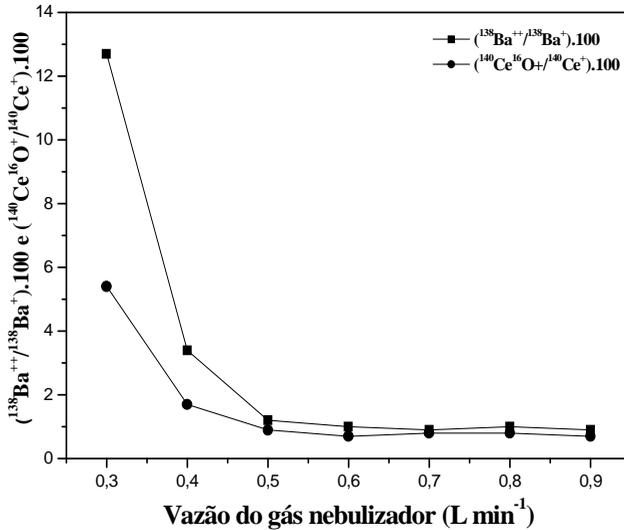
(intensidades de 128, 229, 8634, 66, 745, 9468, 32421 e 314 contagens por segundo, respectivamente). Para concentrações de ácido fórmico até 50% v/v, o aumento é menor, o aumento do sinal dos interferentes torna-se expressivo quando a concentração do ácido é maior do que 50% (v/v), sendo 10 vezes para  $^{36}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$  e  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ , 450 vezes para  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ , 1200 vezes para  $^{14}\text{N}^{35}\text{Cl}^+$  e  $^{13}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$  e 6000 vezes para  $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^+$  em ácido fórmico 90% (v/v), em comparação com os sinais obtidos para solução aquosa sem ácido fórmico. Possivelmente, esse aumento se deve às reações de transferência de carga do carbono a espécies não carregadas. Já o efeito do ácido fórmico sobre o íon  $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$  foi menos intenso, e sobre  $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$  foi negligenciável, o que pode ser atribuído a uma competição, pela qual a formação de íons poliatômicos de carbono seriam mais fácil no plasma do que a dos íons  $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$  ou  $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ . De qualquer maneira, adotando-se uma concentração de ácido fórmico de 50% v/v, os íons poliatômicos mais críticos têm uma baixa população no ICP, similar àquela obtida para soluções aquosas sem ácido fórmico. Isto é, as interferências espectrais são negligenciáveis na presença de ácido fórmico 50% v/v.

O estudo referente aos resultados mostrados na Figura 9 foi realizado usando-se 1100 W de potência e a vazão de gás nebulizador a  $0,9 \text{ L min}^{-1}$ . Como o sinal dos interferentes depende das condições do plasma e da região onde os íons são coletados no plasma, é muito importante a avaliação da potência de RF e da vazão do gás do nebulizador. Na Figura 10 é mostrado o efeito da vazão do gás nebulizador sobre a razão  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$ , considerando-se a introdução de uma solução contendo ácido fórmico 50% (v/v). Foi observado que para vazões do gás nebulizador entre  $0,6$  e  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  as razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  são constantes e menores do que 1%. Para baixas vazões do gás do nebulizador, estas razões aumentam quando a vazão do gás decresce.

A baixas vazões do gás do nebulizador o aerossol é formado predominantemente por gotas grandes, que se condensam na câmara de nebulização, conseqüentemente não alcançam o plasma, assim o sinal medido se deve ao sinal de fundo (ruído eletrônico e algum interferente sobre a massa medida), por isso as razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  têm valores elevados. Quando a vazão do gás aumenta, um aerossol com gotas menores é formado, conseqüentemente, maior quantidade do analito alcança o plasma e a relação  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  é melhorada. Segundo: embora o sistema ICP-MS permita uma vazão de gás nebulizador de até  $1,5 \text{ L min}^{-1}$ , devido às pequenas dimensões do



**Figura 9:** Efeito do ácido fórmico sobre os sinais dos íons poliatômicos. Os sinais são relativos aos valores obtidos para uma solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1100 W, vazão do gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ .

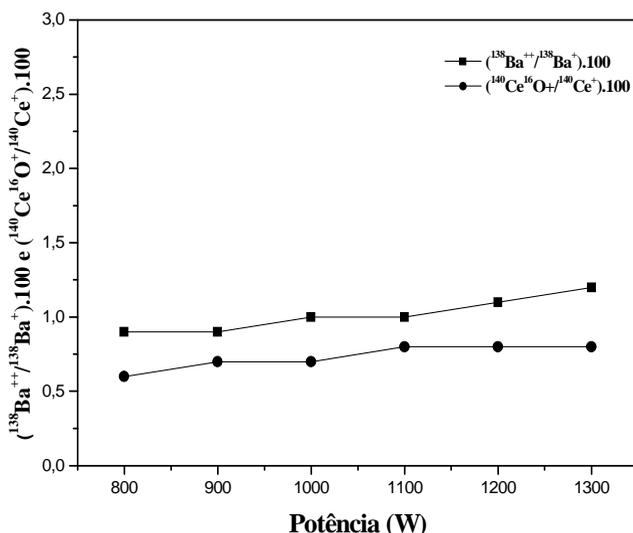


**Figura 10:** Efeito da vazão do gás do nebulizador nas razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  para uma solução aquosa  $10\ \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce contendo ácido fórmico 50% (v/v) e  $\text{HNO}_3$  1% (v/v). Potência de RF: 1100 W e vazão da amostra:  $30\ \mu\text{L min}^{-1}$ .

nebulizador microconcêntrico, a vazão nunca passa de  $0,64\ \text{L min}^{-1}$ . No espectrômetro de ICP-MS há um sistema que limita a pressão exercida pelo gás nebulizador, ou seja, mesmo quando selecionada vazão de  $0,9\ \text{L min}^{-1}$ , a vazão real não passa de  $0,64\ \text{L min}^{-1}$ , por isso o sinal dos interferentes é aproximadamente constante em vazões entre  $0,6$  e  $0,9\ \text{L min}^{-1}$ . Vazões maiores do que  $0,64\ \text{L min}^{-1}$  seriam possíveis somente se o nebulizador fosse conectado diretamente ao cilindro de argônio, entretanto seria necessário o uso de um fluxômetro para controlar a vazão e poderia haver o risco de dano ao nebulizador se pressões muito altas fossem aplicadas sobre o mesmo. Outro fator muito importante é que pequenos deslocamentos do capilar da amostra em relação ao adaptador de safira do nebulizador fazem com que o gás do nebulizador tenha maior ou menor facilidade em fluir, portanto, a comparação de um trabalho com outro em relação à vazão do gás nebulizador, deve ser feita com cautela.

Com relação à potência de RF, a Figura 11 mostra que com o aumento da potência, de 800 W para 1300 W, é observado um pequeno aumento das razões de  $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$  e  $\text{Ba}^{++}/\text{Ba}^+$ , porém sempre

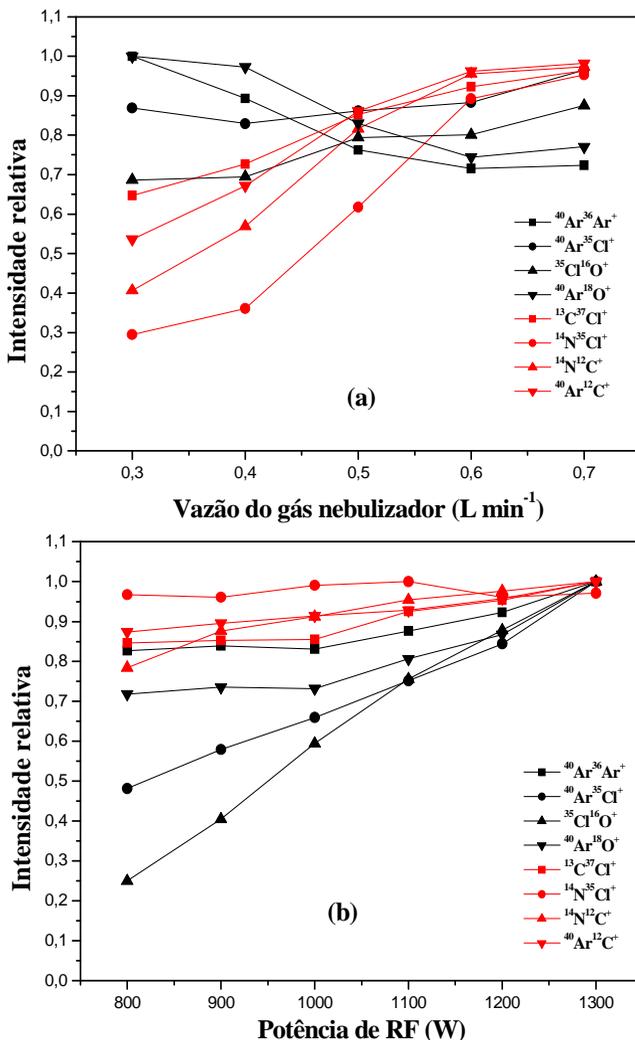
permanecendo abaixo de 1%, o que é aceitável, uma vez que o limite é 3%, conforme já mencionado.



**Figura 11:** Efeito da potência de RF nas razões  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$  para uma solução aquosa com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba e Ce contendo ácido fórmico 50% (v/v) e  $\text{HNO}_3$  1% (v/v). Vazão do gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  e Vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Na Figura 12a é observado um aumento da intensidade de íons poliatômicos contendo cloro e carbono, com o aumento da vazão de gás do nebulizador, especialmente até  $0,6 \text{ L min}^{-1}$ . Para  $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$  e  $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ , a intensidade do sinal decresce em até 30% para vazão de até  $0,6 \text{ L min}^{-1}$ . Esse decréscimo pode ser devido à competição pelo carbono por Ar e O, formando assim os respectivos íons poliatômicos e/ou ao resfriamento do canal central do plasma em vazões mais altas do gás do nebulizador. Para altas vazões do gás nebulizador, até  $0,9 \text{ L min}^{-1}$ , a população dos íons permanece constante, exceto para o íon  $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$  que tem um leve aumento; salienta-se que a vazão real do gás do nebulizador nunca passa de  $0,64 \text{ L min}^{-1}$ . Como mostrado na Figura 12b, o sinal de todos os íons poliatômicos estudados aumenta com o aumento da potência de RF, indicando que os íons poliatômicos são mais facilmente ionizados no plasma em elevadas potências, porque o plasma tem maior energia. Com relação à eliminação ou diminuição de

interferências por íons poliatômicos, as melhores condições são baixa potência de RF e vazão do gás do nebulizador mais alta possível.

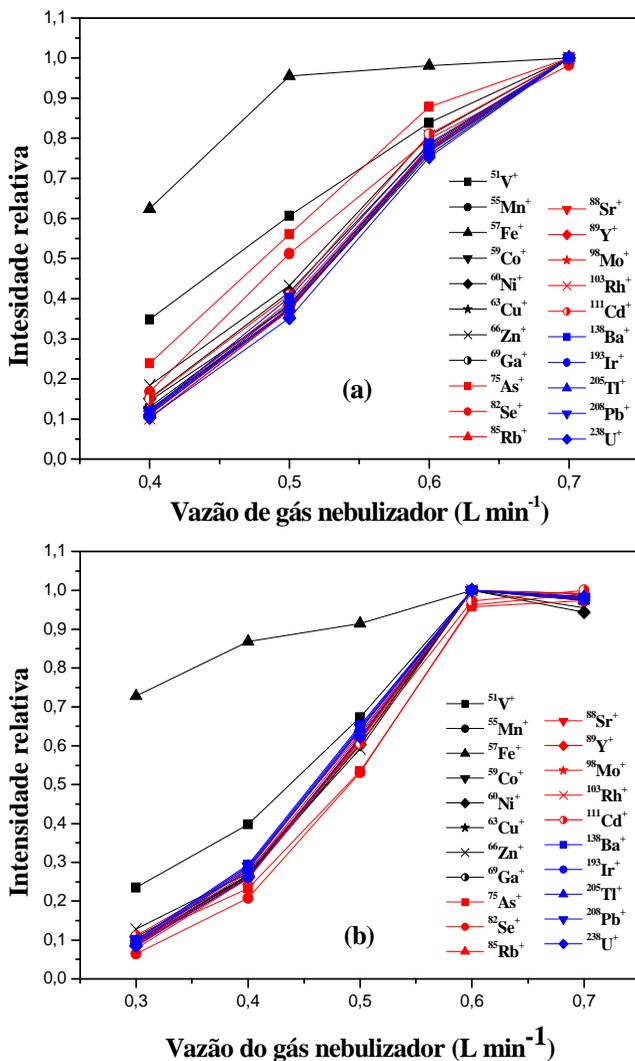


**Figura 12:** Efeito da vazão do gás nebulizador (a) e da potência de RF (b) na formação de íons poliatômicos para uma solução aquosa contendo ácido fórmico 50% (v/v), HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) e HCl 0,1% (v/v). O sinal é relativo ao valor máximo obtido para cada íon. Vazão do gás do nebulizador: 0,9 L min<sup>-1</sup> para a otimização da potência de RF, potência de RF: 1100 W para a otimização vazão do gás nebulizador e vazão da amostra: 30 μL min<sup>-1</sup>.

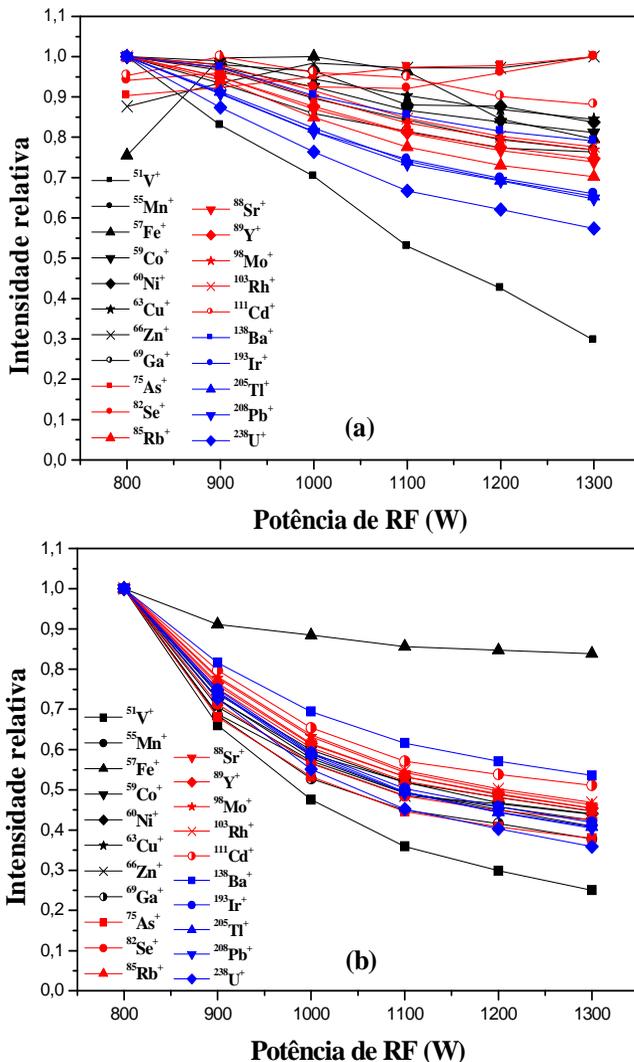
### 5.2.3 Avaliação da potência radiofrequência e vazão do gás do nebulizador

Além de verificar o comportamento dos interferentes e as melhores condições para obter o menor efeito deles, também é importante monitorar o comportamento do sinal dos analitos, visando a melhor sensibilidade. A Figura 13 mostra a sensibilidade relativa em função da vazão do gás do nebulizador para o analito em soluções aquosas sem ácido fórmico (Figura 13a) e em ácido fórmico 50% (v/v) (Figura 13b), respectivamente. Os resultados foram obtidos subtraindo-se o sinal do branco (obtido nas mesmas condições e com uma solução de mesma composição, mas sem os analitos) do sinal total obtido. Observa-se um aumento da intensidade do sinal dos analitos para ambas as soluções com o aumento da vazão do gás do nebulizador (Figura 13a e 13b) até  $0,7 \text{ L min}^{-1}$  (sem ácido fórmico) ou até  $0,6 \text{ L min}^{-1}$  (com ácido fórmico), permanecendo constante para vazões mais altas do gás nebulizador, devido a vazão real não ultrapassar  $0,64 \text{ L min}^{-1}$ , como mencionado anteriormente. As diferentes propriedades físico-químicas das soluções podem ser a razão pela qual é necessária menor vazão de gás nebulizador para alcançar a máxima sensibilidade para a solução contendo ácido fórmico, que apresenta a maior eficiência de nebulização e, conseqüentemente, maior eficiência de transporte das soluções dos analitos ao plasma, como já explicado.

As Figuras 14a e 15b mostram como varia a sensibilidade relativa com o aumento da potência de RF para soluções aquosas contendo os analitos, sem ácido fórmico e em ácido fórmico 50% (v/v), respectivamente. Fica claro que, para a maioria dos analitos, a melhor sensibilidade é obtida em 800 W de potência, para ambas as soluções (sem e com ácido fórmico). Por causa das condições impostas pelo nebulizador utilizado, isto é, baixa vazão da amostra e baixa vazão do gás do nebulizador, pode ter ocorrido o deslocamento da região de amostragem do plasma para a região com maior densidade de íons, quando se usa potências menores. O decréscimo do sinal dos analitos para potências superiores a 800 W é geralmente mais intenso para as soluções que contém ácido fórmico, possivelmente devido ao maior



**Figura 13:** Efeito da vazão do gás do nebulizador na intensidade do sinal dos analitos para uma solução aquosa sem ácido fórmico (a) e com ácido fórmico 50% (v/v) (b). O sinal é relativo ao maior valor obtido para cada íon em cada caso. Concentração dos analitos: 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais, potência de RF: 1100 W e vazão da amostra: 30  $\mu\text{L min}^{-1}$ .



**Figura 14:** Efeito da potência de RF na intensidade do sinal dos analitos para uma solução aquosa sem ácido fórmico (a) e com ácido fórmico 50% (v/v) (b). O sinal é relativo ao maior valor obtido para cada íon em cada caso. Concentração dos analitos:  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  (Se e Fe) e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  para os demais, vazão de gás nebulizador:  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ .

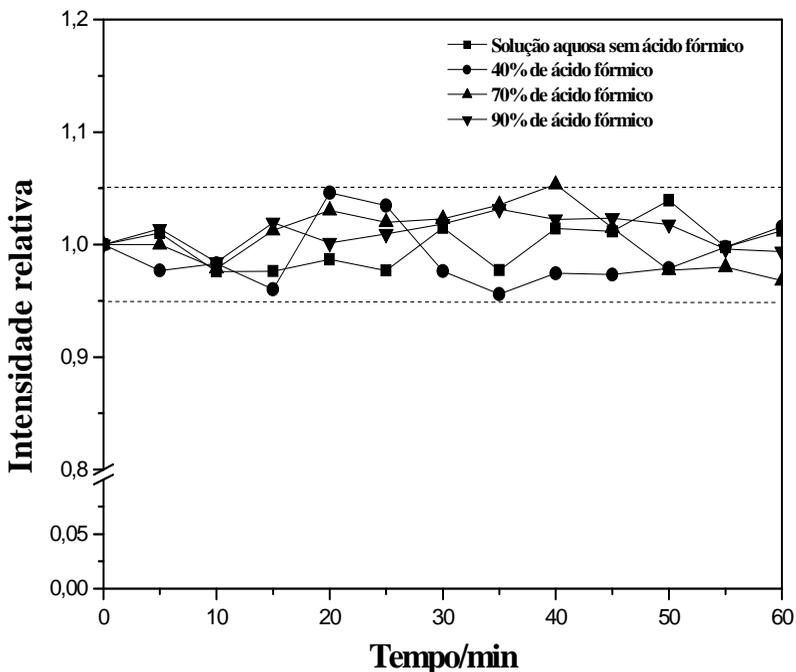
consumo de energia requerido para a pirólise das moléculas orgânicas em comparação com dissociação das moléculas de água. O aumento da dupla ionização com a potência RF pode ser a explicação da perda de sensibilidade para altas potências, especialmente para elementos cuja segunda energia de ionização é menor. Entretanto, essa perda ocorreu para todos os analitos, inclusive aqueles que têm segunda energia de ionização relativamente alta, assim, deve haver outro efeito que seja a causa dessa perda de sensibilidade.

É importante notar (Figura 14b), que para os elementos com energia de ionização mais alta, tais como, As, Cd, Se e Zn, existe um pequeno aumento da sensibilidade com o aumento da potência de RF, apenas para soluções sem ácido fórmico. Efeito este que ocorre devido à maior temperatura do plasma em potências mais altas, aumentando a ionização. O efeito não é observado para a solução contendo ácido fórmico, pois o efeito do carbono na ionização é muito maior do que o efeito do aumento da temperatura do plasma por causa do aumento da potência de RF.

A intensidade do sinal  $^{57}\text{Fe}^+$  tem um comportamento singular, sendo mais alta para baixas vazões do gás do nebulizador (Figura 13a e 13b) e potências RF mais alta (Figura 14a e 14b), quando comparada com a de outros analitos. No entanto, esse efeito pode ser o resultado de interferências espectrais, uma vez que existem muitos íons poliatômicos com massa nominal 57, além de que o isótopo do ferro é pouco abundante (2,2%). Assim, qualquer variação na intensidade do sinal de íons poliatômicos interferentes pode causar uma variação significativa do sinal do  $^{57}\text{Fe}^+$ . De qualquer maneira, foi mostrado na literatura que as condições de plasma frio melhoram a determinação de Fe por ICP-MS, pois nestas condições o ferro já é eficientemente ionizado e o nível de interferências é menor do que se fossem usadas potências mais altas [121].

A sensibilidade é apenas um dos parâmetros que devem ser levados em conta no desenvolvimento de uma nova metodologia de análise por ICP-MS e é muito importante que o plasma e todo o sistema envolvido permaneçam estável durante um longo período. A Figura 12 mostra o comportamento do sinal do  $^{103}\text{Rh}^+$  para soluções com diferentes concentrações de ácido fórmico (40, 70 e 90% v/v), introduzindo-se cada uma das soluções no ICP durante uma hora. Observa-se na Figura 15 que o sinal para o  $^{103}\text{Rh}^+$  é muito estável em todos os meios estudados, sendo que as variações não foram superiores a  $\pm 5\%$  em relação ao sinal obtido na primeira medida (tempo zero). Esses resultados mostram que para o micronebulizador operando em

baixas vazões é possível a introdução no plasma de soluções de ácido fórmico com concentração tão alta quanto 90% (v/v), sem causar qualquer perturbação do mesmo e sem a deposição de carbono na interface ou na lente iônica do instrumento utilizado.



**Figura 15:** Efeito do ácido fórmico na estabilidade do sinal de  $^{103}\text{Rh}^+$  em função do tempo. O sinal é relativo à medida realizada em tempo zero. Concentração de Rh:  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , vazão do gás nebulizador:  $0,7 \text{ L min}^{-1}$ , potência de RF:  $800 \text{ W}$  e vazão da amostra:  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ .

As condições estabelecidas neste trabalho, especialmente a potência RF, são muito diferentes daquelas recomendadas em outros trabalhos, que utilizaram sistemas convencionais para a introdução de constituintes orgânicos no ICP [108,113,116]. O uso de um micronebulizador permitiu a introdução de pequenas quantidades de amostra no plasma, com baixa potência RF, evitando efeitos indesejáveis (interferências). Como a quantidade de amostra e solvente que alcança o plasma é pequena, este tem energia suficiente para

decompor o ácido fórmico e a matriz da amostra, permanecendo estável. Além disso, o ácido fórmico tem uma quantidade relativamente grande de oxigênio em sua estrutura em relação ao carbono, 2 mols de oxigênio para um mol de carbono. Assim, durante a decomposição do ácido fórmico no plasma, o oxigênio pode reagir com o carbono, evitando a formação de carbono amorfo, que ficaria depositado nos cones e lente iônica, formando óxidos de carbono que permaneceriam no estado gasoso. Não foi observado depósito de carbono sobre os cones na interface mesmo após 8 horas de trabalho, utilizando-se soluções de ácido fórmico 50% v/v.

#### 5.2.4 Aplicação do método

A quantificação de elementos traço nas amostras foi realizada utilizando-se as condições selecionadas, baseadas na maior intensidade do sinal do analito e menor sinal dos interferentes; potência de RF em 800 W e vazão do gás nebulizador em  $0,7 \text{ L min}^{-1}$ . Na Tabela 3 são mostrados os parâmetros de mérito do método desenvolvido. Para o método proposto foi usada a calibração externa, com os analitos em soluções 50% (v/v) de ácido fórmico, usando-se  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno. Para a análise das amostras digeridas, a mesma calibração foi utilizada, entretanto, sem ácido fórmico. Neste caso a análise foi realizada nas condições instrumentais padrão, quando esse sistema de nebulização pneumática de introdução de amostras no ICP é usado; potência de RF em 1100 W e vazão de gás nebulizador em  $1,05 \text{ L min}^{-1}$ , conforme já mencionado. O limite de detecção do método (LOD) foi definido como 3 vezes o desvio padrão de dez medidas consecutivas da concentração do branco (ácido fórmico 50% v/v para o método proposto, ou branco da digestão das amostras para o procedimento convencional), multiplicado pelo fator de diluição (133 vezes para o método proposto e 1000 vezes para o método convencional).

Os limites de detecção obtidos mostram que o método proposto leva uma capacidade de detecção apropriada para a determinação de elementos traço, o maior valor foi de  $220 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o Fe e o menor foi de  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o Tl. O elevado valor para o Fe pode ser atribuído à baixa abundância do isótopo medido (2,2%) a ao elevado valor do fundo devido às interferências espectrais por íons poliatômicos. Os valores de LOD obtidos para o método convencional (amostras digeridas e introduzidas no ICP usando-se um nebulizador de fluxo cruzado) foram muito similares com aqueles obtidos pelo método

proposto. Os LODs obtidos para a amostra digerida e analisada usando-se o nebulizador microconcêntrico também são mostrados na Tabela 4, eles são relativamente maiores devido ao maior fator de diluição envolvido quando comparado com os LOD obtidos mediante o método proposto. Os LODs obtidos perante análise da amostra digerida, introduzida no plasma usando nebulizador microconcêntrico, também são maiores, quando comparados com aqueles obtidos usando-se o sistema convencional de introdução da amostra no ICP, principalmente devido a menor taxa de aspiração da amostra, entre outras razões. Os limites de quantificação (LOQ), definidos como 3,3 vezes o LOD, podem ser facilmente obtidos dos a partir dos LODs mostrados na Tabela 4.

O desvio padrão relativo (RSD),  $n = 3$ , da concentração dos analitos na solução da amostra “Oyster Tissue” foi usado para estimar a precisão do método, que foi menor do que 3,5% para todos os analitos incluindo aqueles que geralmente sofrem interferências por íons poliatômicos, como As, Fe, Ni e Se. Esses valores mostrados na Tabela 4 foram similares ou melhores do que aqueles obtidos pela análise da amostra digerida, usando-se o sistema convencional para a introdução da amostra no ICP. A precisão obtida é boa, uma vez que estes valores de RSD, provavelmente, não seriam alcançados introduzindo-se soluções com alto conteúdo de carbono no plasma, usando-se um sistema convencional para a introdução de amostra. Além disso, deve ser mencionado que  $^{103}\text{Rh}^+$  foi usado como padrão interno, que certamente contribuiu para a boa precisão. As figuras de mérito obtidas usando-se a calibração com padrões aquosos sem ácido fórmico foram muito similares, não sendo mostradas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Figuras de mérito do método proposto para a determinação de elementos traço por ICP-MS em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, usando-se nebulizador microconcêntrico como sistema de introdução da amostra no ICP (método proposto) ou amostras digeridas usando-se um nebulizador convencional (método convencional). n = 10 (LOD) e n = 3 (RSD).

Analito	Isótopo (u)	Método proposto (tratamento com ácido fórmico)		Método convencional (amostras digeridas)		Nebulizador microconcêntrico (amostras digeridas)	
		LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)
V	51	3,0	0,5	4,5	1,0	1000	8,1
Mn	55	4,0	0,2	20	0,3	100	1,0
Fe	57	220	1,5	710	0,7	4000	3,1
Co	59	1,0	1,4	3,0	2,1	30	8,3
Ni	60	10	1,0	8,0	1,3	200	8,3
Cu	63	5,0	0,5	10	1,0	80	0,7
Zn	66	30	0,2	25	1,3	300	1,0
Ga	69	1,5	3,5	1,5	2,7	50	150
As	75	1,5	0,3	9,0	1,7	750	3,2
Se	82	20	0,7	100	4,2	3500	4,6
Rb	85	1,0	0,8	1,5	1,0	20	2,1
Sr	88	2,5	0,2	2,0	1,1	15	0,9
Mo	98	10	1,1	5,0	1,1	200	11,0
Cd	111	3,0	0,5	3,5	1,9	100	3,3
Ba	138	1,5	1,0	2,5	1,0	20	1,6
Tl	205	0,5	2,9	0,5	1,7	7,5	43,5
Pb	208	1,5	0,7	10	1,1	30	2,8
U	238	1,0	0,5	0,5	1,1	10	4,1

Os limites de detecção (LOD) são definidos como 3 vezes o desvio padrão (n = 10) da concentração do branco multiplicado pelo fator de diluição.

Foram analisados 4 materiais de referência de natureza biológicas, como mostrado nas Tabelas 5 e 6. Para os elementos não certificados, suas concentrações foram obtidas pela análise das amostras digeridas, usando-se o sistema convencional de introdução de amostra no plasma; elas são expressas pela média ( $n = 3$ )  $\pm$  limite de confiança de 95%, obtido mediante o teste t e são diferenciadas nas tabelas por um asterisco. Comparando-se os resultados obtidos com os valores certificados, usando-se o teste t a um limite de confiança de 95%, a calibração com padrões aquosos (sem ácido fórmico) pode ser utilizada para a determinação de diversos analitos, principalmente aqueles com baixo potencial de ionização, ou seja, as concentrações determinadas são concordantes com os valores de referência. Isso nos mostra que possíveis interferências não espectrais, tais como efeitos na nebulização e no transporte do aerossol, são compensadas pelo uso do padrão interno. Na ausência do padrão interno, os valores determinados mediante a calibração com padrões aquosos são consideravelmente maiores do que os valores de referência, como já era previsto, uma vez que o ácido fórmico causa o aumento de sensibilidade, como já mencionado e discutido. Já os resultados obtidos sem padrão interno, mas usando-se a calibração externa e ácido fórmico, foram satisfatórios para a maioria dos elementos, mesmo para aqueles com elevada energia de ionização. Entretanto, devido à baixa vazão da amostra e à pulsação da bomba peristáltica, é recomendável utilizar padrão interno, uma vez que esta prática é fácil, de baixo custo e muito eficiente para a correção de interferências não espectrais e apontar eventuais erros de diluição após a adição do padrão interno.

Também foram testados o  $^{89}\text{Y}^+$  e o  $^{193}\text{Ir}^+$  como padrão interno, sendo obtidos resultados semelhantes àqueles obtidos usando-se o  $^{103}\text{Rh}^+$ . Como previsto e mostrado nas Figuras 6 e 7, esses três elementos tem comportamento muito semelhante em ácido fórmico, portanto têm o mesmo desempenho como padrão interno. O  $^{103}\text{Rh}^+$  foi adotado como padrão interno por possuir massa intermediária em relação aos outros isótopos. As concentrações obtidas usando-se o  $^{89}\text{Y}^+$  e o  $^{193}\text{Ir}^+$  não são mostradas, por proporcionarem resultados semelhantes aos obtidos usando-se o  $^{103}\text{Rh}^+$ .

**Tabela 5:** Concentrações obtidas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de referência TORT 2 e “Bovine Liver” tratadas com ácido fórmico, usando-se calibração com padrões aquosos sem ácido fórmico e ácido fórmico 50% (v/v).  $n = 3$ .

	TORT 2			“Bovine Liver” (1577b)		
	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico
<b>V</b>	1,64 ± 0,19	1,77 ± 0,06	1,56 ± 0,03	0,123	0,122 ± 0,043	0,099 ± 0,019
<b>Mn</b>	13,6 ± 1,2	13,8 ± 2,4	11,9 ± 0,9	10,5 ± 1,7	11,1 ± 0,4	9,89 ± 0,92
<b>Fe</b>	105 ± 13	64,5 ± 5,4	93,3 ± 21,6	184 ± 15	127,9 ± 31,8	157,5 ± 28,9
<b>Co</b>	0,50 ± 0,09	0,500 ± 0,060	0,451 ± 0,040	0,250	0,230 ± 0,003	0,224 ± 0,021
<b>Ni</b>	2,50 ± 0,20	2,61 ± 0,40	2,15 ± 0,19	0,271 ± 0,032 *	0,268 ± 0,032	0,288 ± 0,067
<b>Cu</b>	106 ± 10	108 ± 17	91,2 ± 7,5	160 ± 8	172 ± 6,2	149 ± 13
<b>Zn</b>	180 ± 6	253 ± 44	163 ± 2	127 ± 16	174 ± 6	114 ± 4
<b>Ga</b>	0,030 ± 0,006 *	0,036 ± 0,006	0,034 ± 0,004	< LOD *	< LOD	< LOD
<b>As</b>	21,6 ± 1,8	58,6 ± 10,1	19,1 ± 0,3	0,050	0,251 ± 0,093	0,054 ± 0,006
<b>Se</b>	5,63 ± 0,67	21,5 ± 2,4	4,79 ± 0,14	0,730 ± 0,060	3,14 ± 0,72	0,742 ± 0,111
<b>Rb</b>	2,48 ± 0,05 *	2,28 ± 0,38	2,31 ± 0,19	13,7 ± 1,1	11,6 ± 0,3	11,9 ± 1,1
<b>Sr</b>	45,2 ± 1,9	36,7 ± 6,0	37,2 ± 0,8	0,136 ± 0,001	0,126 ± 0,008	0,129 ± 0,009
<b>Mo</b>	0,95 ± 0,11	0,942 ± 0,059	0,826 ± 0,062	3,5 ± 0,3	3,23 ± 0,02	3,26 ± 0,31
<b>Cd</b>	26,7 ± 0,6	27,8 ± 4,9	24,35 ± 1,64	0,5 ± 0,1	0,521 ± 0,037	0,477 ± 0,120
<b>Ba</b>	1,68 ± 0,04 *	1,34 ± 0,18	1,46 ± 0,13	0,044 ± 0,007 *	0,043 ± 0,009	0,047 ± 0,008
<b>Tl</b>	0,012 ± 0,001 *	0,0130 ± 0,0053	0,0140 ± 0,0031	0,0034 ± 0,0003 *	0,0042 ± 0,0019	0,0050 ± 0,0008
<b>Pb</b>	0,350 ± 0,130	0,298 ± 0,013	0,313 ± 0,054	0,129 ± 0,004	0,104 ± 0,049	0,118 ± 0,015
<b>U</b>	0,029 ± 0,001 *	0,035 ± 0,002	0,031 ± 0,005	< LOD *	< LOD	< LOD

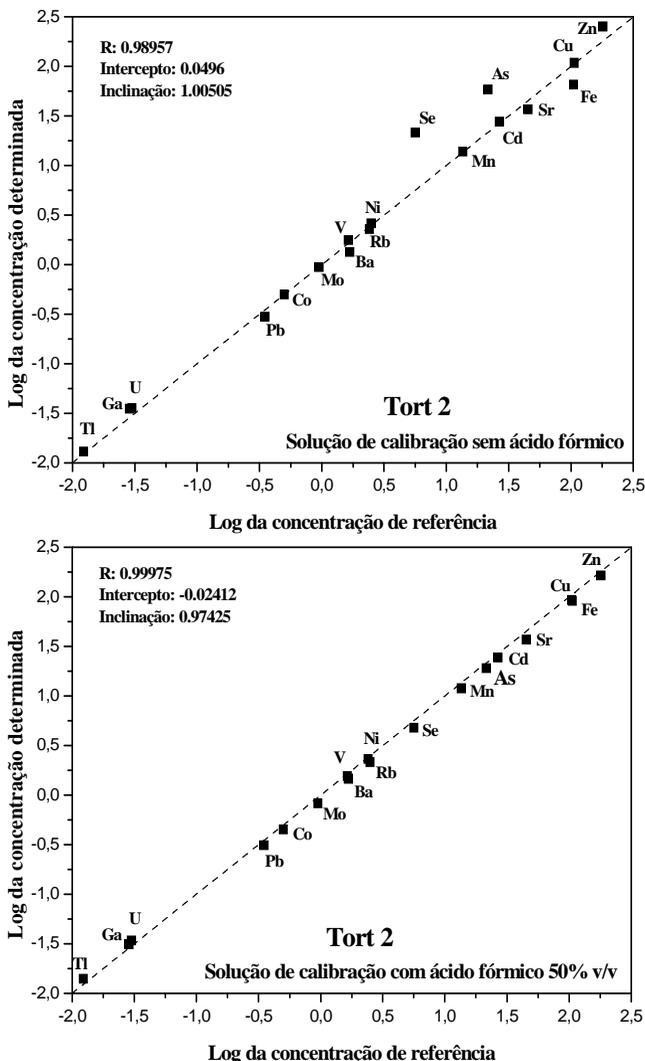
\* Valores não certificados obtidos após a digestão assistida por microondas e determinadas por ICP-MS usando o sistema convencional de introdução da amostra no ICP.

**Tabela 6:** Concentrações obtidas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de referência “Oyster Tissue” e DOLT 3 tratadas com ácido fórmico, usando-se calibração com padrões aquosos sem ácido fórmico e ácido fórmico 50% (v/v). n = 3.

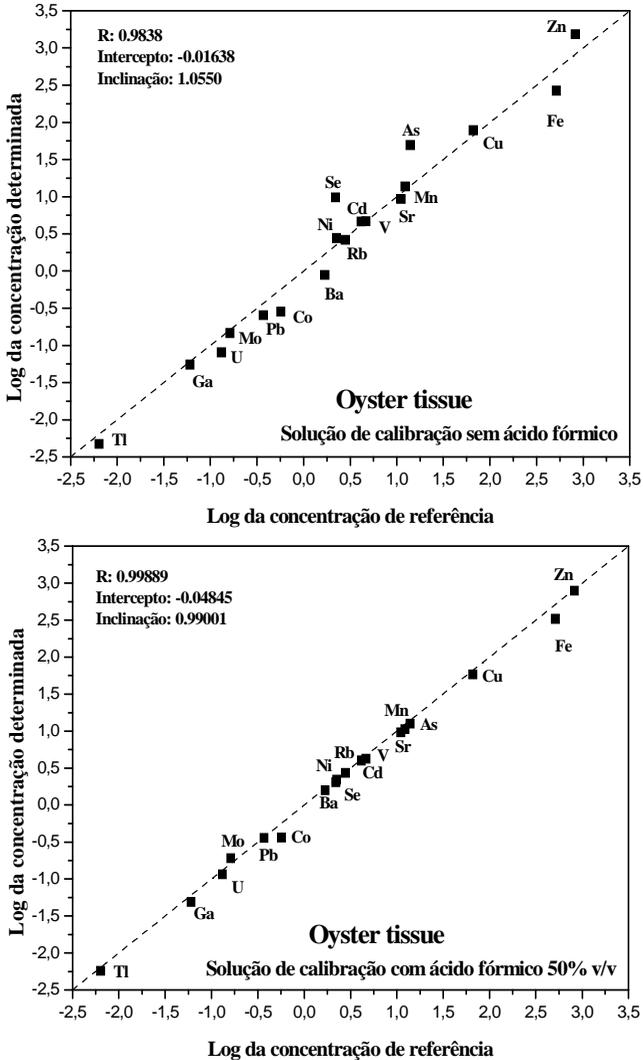
	“Oyster tissue” (1566a)			DOLT 3		
	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico
<b>V</b>	4,68 ± 0,15	4,66 ± 0,12	4,22 ± 0,03	0,67 ± 0,03 *	0,444 ± 0,130	0,691 ± 0,375
<b>Mn</b>	12,3 ± 1,5	13,7 ± 0,3	10,6 ± 0,1	10,1 ± 2,1 *	10,4 ± 0,3	9,37 ± 0,61
<b>Fe</b>	539 ± 15	265,9 ± 3,9	329,1 ± 12,0	1484 ± 57	1275,2 ± 43,3	1490,5 ± 34,4
<b>Co</b>	0,570 ± 0,110	0,282 ± 0,047	0,363 ± 0,073	0,293 ± 0,035 *	0,317 ± 0,012	0,258 ± 0,015
<b>Ni</b>	2,25 ± 0,44	2,76 ± 0,83	2,19 ± 0,58	2,72 ± 0,35	2,33 ± 0,12	2,32 ± 0,27
<b>Cu</b>	66,3 ± 4,3	77,9 ± 0,4	58,0 ± 1,7	31,2 ± 1,0	34,4 ± 1,3	30,3 ± 1,2
<b>Zn</b>	830 ± 57	1536 ± 143	789 ± 43	86,6 ± 2,4	12,9 ± 3,2	85,3 ± 3,6
<b>Ga</b>	0,060 ± 0,014, *	0,055 ± 0,008	0,049 ± 0,005	0,007 ± 0,001 *	0,016 ± 0,007	0,008 ± 0,005
<b>As</b>	14,0 ± 1,2	49,2 ± 0,5	12,6 ± 0,4	10,2 ± 0,5	26,7 ± 0,9	8,60 ± 0,16
<b>Se</b>	2,21 ± 0,24	9,71 ± 0,32	2,03 ± 0,13	7,06 ± 0,48	27,5 ± 2,03	6,38 ± 0,10
<b>Rb</b>	2,80 ± 0,03 *	2,63 ± 0,01	2,70 ± 0,04	3,09 ± 0,07 *	2,99 ± 0,04	3,07 ± 0,10
<b>Sr</b>	11,1 ± 1,0	9,31 ± 0,09	9,61 ± 0,04	3,75 ± 0,08 *	3,51 ± 0,10	3,57 ± 0,02
<b>Mo</b>	0,162 ± 0,014 *	0,146 ± 0,030	0,190 ± 0,028	3,04 ± 0,15 *	2,80 ± 0,11	2,79 ± 0,61
<b>Cd</b>	4,15 ± 0,38	4,61 ± 0,17	3,99 ± 0,14	19,4 ± 0,6	20,3 ± 0,4	18,08 ± 0,44
<b>Ba</b>	1,7 ± 0,3 *	0,885 ± 0,304	1,58 ± 0,19	0,153 ± 0,039 *	0,122 ± 0,043	0,127 ± 0,031
<b>Tl</b>	0,0064 ± 0,0013 *	0,0047 ± 0,0012	0,0057 ± 0,0006	0,0119 ± 0,0006 *	0,0112 ± 0,0038	0,0110 ± 0,0032
<b>Pb</b>	0,371 ± 0,014	0,253 ± 0,012	0,357 ± 0,015	0,320 ± 0,050	0,267 ± 0,047	0,315 ± 0,064
<b>U</b>	0,132 ± 0,012	0,080 ± 0,001	0,116 ± 0,013	0,022 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,020 ± 0,006

\* Valores não certificados obtidos após a digestão assistida por microondas e determinadas por ICP-MS usando o sistema convencional de introdução da amostra no ICP.

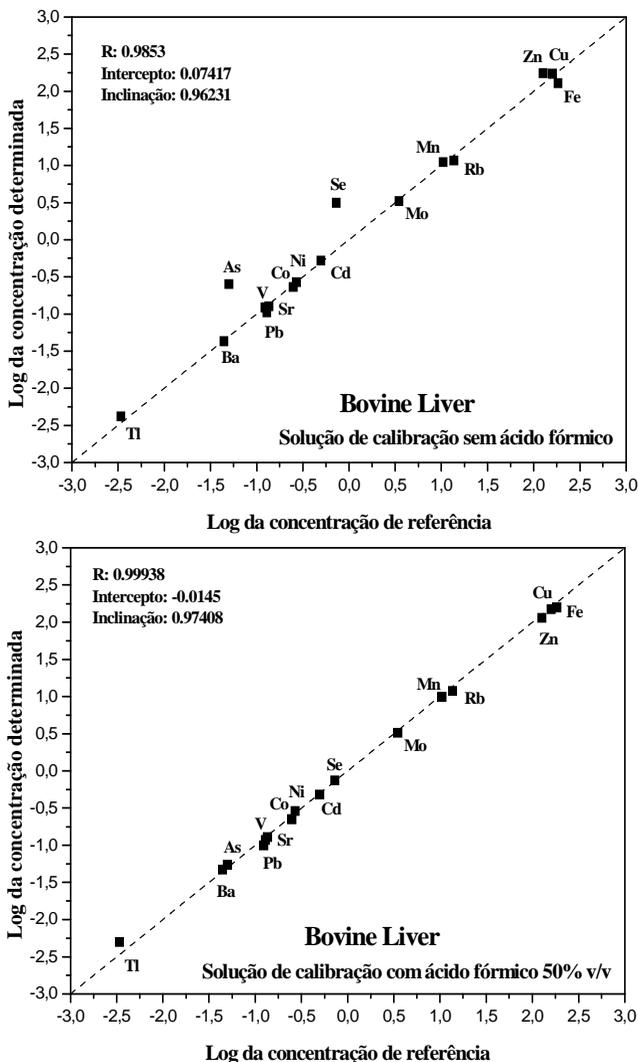
Segundo as Tabelas 6 e 7 foram obtidos resultados exatos para a maioria dos analitos, usando-se a calibração externa com padrões aquosos e  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno. No entanto isso não é verdadeiro para As, Se e Zn, o que pode ser mais bem visualizado nas Figuras 16, 17, 18 e 19, nas quais são plotados os valores do logaritmo da concentração obtida “versus” o logaritmo da concentração de referência dos analitos determinados. Devido à alta energia de ionização do As, Se e de Zn quando comparadas a do Rh, a ionização por transferência de carga é mais efetiva para As, Se e Zn do que para o Rh nas soluções contendo ácido fórmico, ou seja, eles têm um ganho de sensibilidade devido ao aumento na porcentagem de ionização, enquanto que o Rh não, por ter uma energia de ionização relativamente baixa e ser completamente ionizado, mesmo quando introduzido no plasma a partir de soluções aquosas. Mas, se for utilizada a calibração externa com solução preparadas com ácido fórmico, na mesma proporção da amostra, o efeito da ionização por transferência de carga ocorre de maneira similar (mesma intensidade) para as amostras e padrões, explicando a concordância dos valores obtidos pelo método proposto com os valores de referência. Além disso, o coeficiente de correlação (R) é mais próximo de um, se as soluções contem ácido fórmico, indicando que esta estratégia de calibração é a que leva a resultados mais exatos e pode ser recomendada. Outra vantagem da utilização do ácido fórmico para a solubilização de amostras biológicas é que na calibração não são necessárias soluções padrão orgânicas, que são mais instáveis e pouco disponíveis.



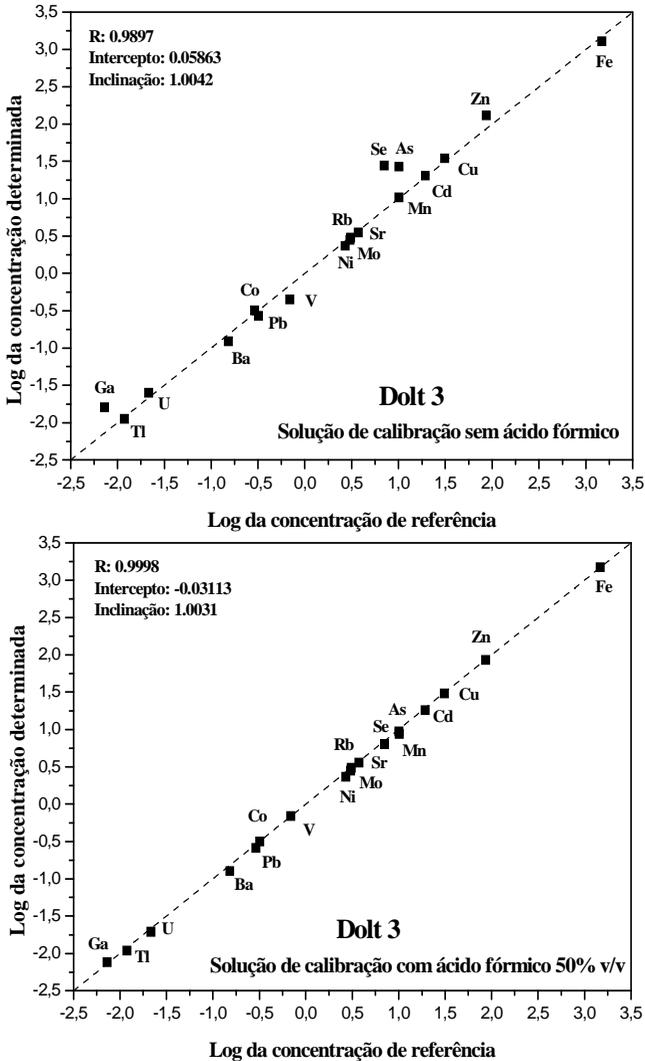
**Figura 16:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra TORT 2. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1.



**Figura 17:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Oyster Tissue”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1.



**Figura 18:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Bovine Liver”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1.



**Figura 19:** Logaritmo da concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtida pelo método proposto “versus” logaritmo da concentração de referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a amostra “Dolt 3”. Resultados obtidos usando-se a calibração externa com padrões aquosos sem ácido fórmico e com ácido fórmico 50% v/v. Foi usado  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno,  $n = 3$ . A linha pontilhada representa coeficiente de correlação linear igual a 1.

### 5.2.5 Conclusões relacionadas com o uso do nebulizador

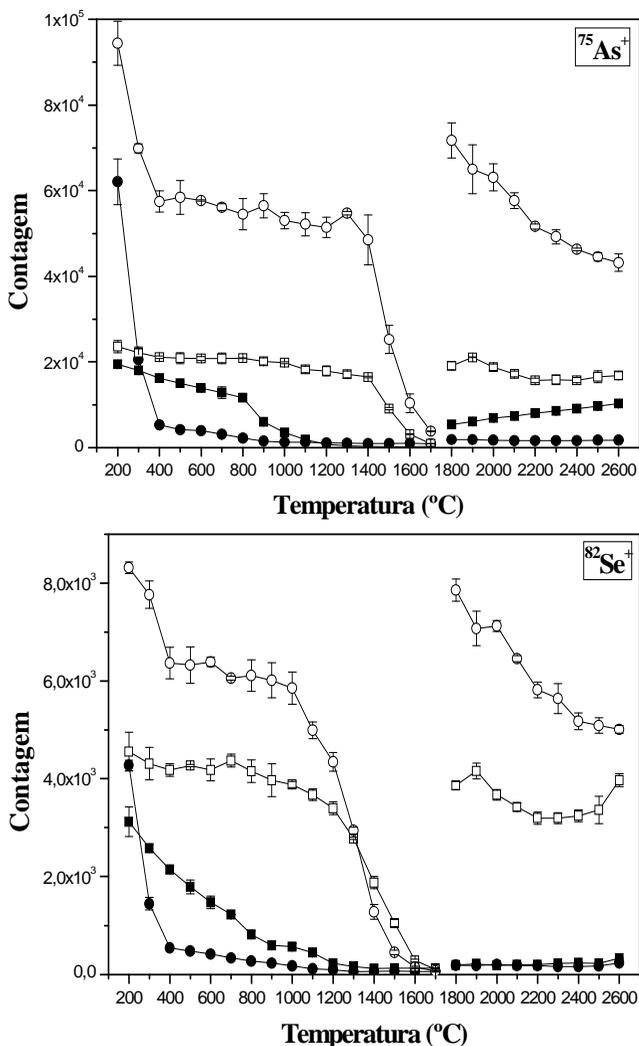
Usando-se um nebulizador microconcêntrico, operando em baixas vazões, é possível introduzir-se no plasma soluções com elevado teor de ácido fórmico e de sólidos dissolvidos. Ao se introduzir soluções com ácido fórmico, a sensibilidade instrumental é aumentada em relação à solução aquosa sem ácido fórmico, sendo este efeito causado pela maior eficiência de nebulização e de transporte do aerossol e efeitos do carbono no plasma. As condições ótimas de operação são: vazão do gás do nebulizador e potência menores do que aquelas utilizadas quando sistemas convencionais de introdução de amostra no ICP são usados na determinação por ICP-MS. Quando soluções com concentrações maiores do que 50% v/v de ácido fórmico são introduzidas no plasma, interferências por íons poliatômicos são significativas. O sinal analítico permanece estável, mesmo introduzindo-se no plasma solução de ácido fórmico 90% (v/v) durante uma hora, sem causar efeitos indesejáveis no plasma, como a deposição de carbono nos cones da interface e a instabilidade do plasma. A quantificação mediante calibração externa com padrões aquosos pode ser utilizada para elementos com baixa energia de ionização, caso contrário, o ajuste de matriz com ácido fórmico é necessário. Em geral, a calibração com padrões aquosos contendo 50% v/v de ácido fórmico permitiu obter resultados mais exatos, embora os limites de detecção e os desvios padrão relativos tivessem valores comparáveis com aqueles obtidos mediante a calibração com soluções sem ácido fórmico. Estes são bons considerando-se a baixa vazão de amostra em que o nebulizador foi operado,  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ , enquanto que num sistema convencional a vazão do mesmo é de aproximadamente  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ . O método proposto é preciso, exato e permite alta velocidade analítica.

## 5.3 Introdução da amostra no ICP com o vaporizador eletrotérmico

### 5.3.1 Otimização de curvas de pirólise e vaporização

Devido às grandes diferenças nas propriedades térmicas dos elementos estudados, a avaliação das temperaturas de pirólise e de vaporização foi realizada para todos os elementos. As curvas de temperatura de pirólise e vaporização para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$  são mostradas na Figura 20 e as dos demais isótopos estudados são mostrados posteriormente. Na ausência de paládio os sinais desses dois elementos decrescem com o aumento da temperatura. Em geral, o decréscimo é mais pronunciado em temperatura mais baixa, de 200 até 400 - 500 °C. Para temperaturas de pirólise intermediárias, a intensidade do sinal analítico decresce, mas menos intensamente e, finalmente, decresce rapidamente em temperaturas maiores do que a temperatura ótima de pirólise, como esperado, devido à instabilidade térmica do arsênio e do selênio. As curvas de temperatura obtidas para  $^{82}\text{Se}^+$  e  $^{75}\text{As}^+$  são similares. Para o  $^{75}\text{As}^+$  e o  $^{82}\text{Se}^+$  a intensidade do sinal decresce rapidamente em baixas temperaturas. A quantidade de matriz da amostra contendo carbono que é introduzida no plasma decresce e, conseqüentemente, o efeito do carbono como carreador e facilitador da ionização também decresce, diminuindo a quantidade do analito que alcança o plasma e a sua ionização, como discutido abaixo.

Na presença de paládio, a estabilização térmica dos analitos, tanto na solução de calibração quanto na amostra tratada é notável, sendo que o sinal de  $^{75}\text{As}^+$  é estável até 1300 °C e o do  $^{82}\text{Se}^+$  até 1000 °C. Na ausência deste modificador, o  $^{82}\text{Se}^+$  e o  $^{75}\text{As}^+$  são perdidos por volatilização a partir de 200 e 800 °C, respectivamente. É sabido que a presença de carbono no plasma pode aumentar a ionização dos elementos, especialmente daqueles com potencial de ionização mais altos, como o  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ , devido à reação de transferência de carga do carbono para o elemento [91,122] conforme já mencionado, além de também poder atuar como carreador do aerossol seco produzido no ETV. A quantidade de carbono introduzida no plasma varia com a temperatura de pirólise e de vaporização, como mostrado para o  $^{13}\text{C}^+$  na Figura 21. Quando a temperatura de pirólise aumenta, o sinal do  $^{13}\text{C}^+$  decresce até temperaturas de pirólise em torno de 650 °C. Conseqüentemente, a eficiência de ionização de elementos como As e Se, também decresce. Além disso, o efeito carreador do carbono para



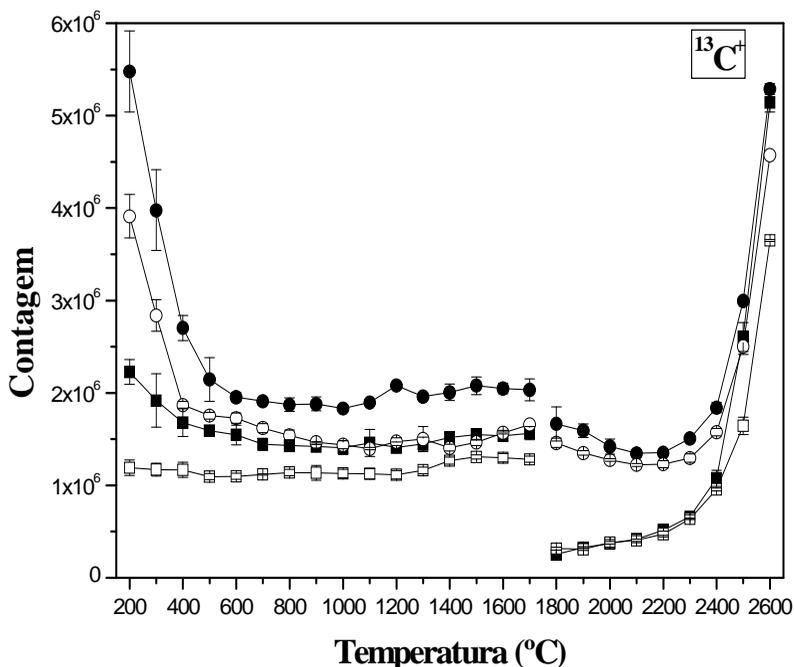
**Figura 20:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600 °C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W.

todos os analitos também diminui nessa faixa de temperatura. Para temperaturas de pirólise superiores a 650 °C a intensidade do sinal do  $^{13}\text{C}^+$  é estável, por ser, principalmente, devido à volatilização do carbono do tubo de grafite a uma temperatura de vaporização constante, considerando a total eliminação do carbono da amostra na etapa de pirólise.

A intensidade do sinal de  $^{13}\text{C}^+$  aumenta com a temperatura de vaporização, como mostrado na Figura 16, indicando que o efeito do carbono como carreador e potencializador da ionização, para alguns elementos, também aumenta. Entretanto esse efeito foi observado somente para as curvas de temperatura obtidas sem a presença de paládio no tubo de grafite (Figura 20). Quando o paládio estava presente, aumentando-se a temperatura de vaporização, a intensidade do sinal dos analitos diminuía possivelmente as perdas por difusão e condensação. É interessante notar que a presença de Pd diminui o sinal de  $^{13}\text{C}^+$ , para a solução de calibração sem ácido fórmico quanto para a amostra tratada com ácido fórmico. Este efeito se deve a interação entre o carbono do tubo de grafite com o modificador, tal como sugerido por Ortner et. al. [123] para explicar a ação do paládio em ET AAS, como modificador químico. De acordo com as curvas de vaporização mostradas na Figura 21, observa-se que a intensidade do sinal de  $^{13}\text{C}^+$  obtida para a amostra na ausência ou presença de paládio em temperaturas de vaporização inferiores a 2500 °C é muito maior do que aquela obtida para o padrão aquoso. Essa diferença indica que parte do carbono proveniente da amostra não é volatilizado, permanecendo dentro do tubo sob a forma de carbono amorfo, mesmo que a temperatura de pirólise seja relativamente elevada, mas que na etapa de vaporização é vaporizado e conduzido ao plasma.

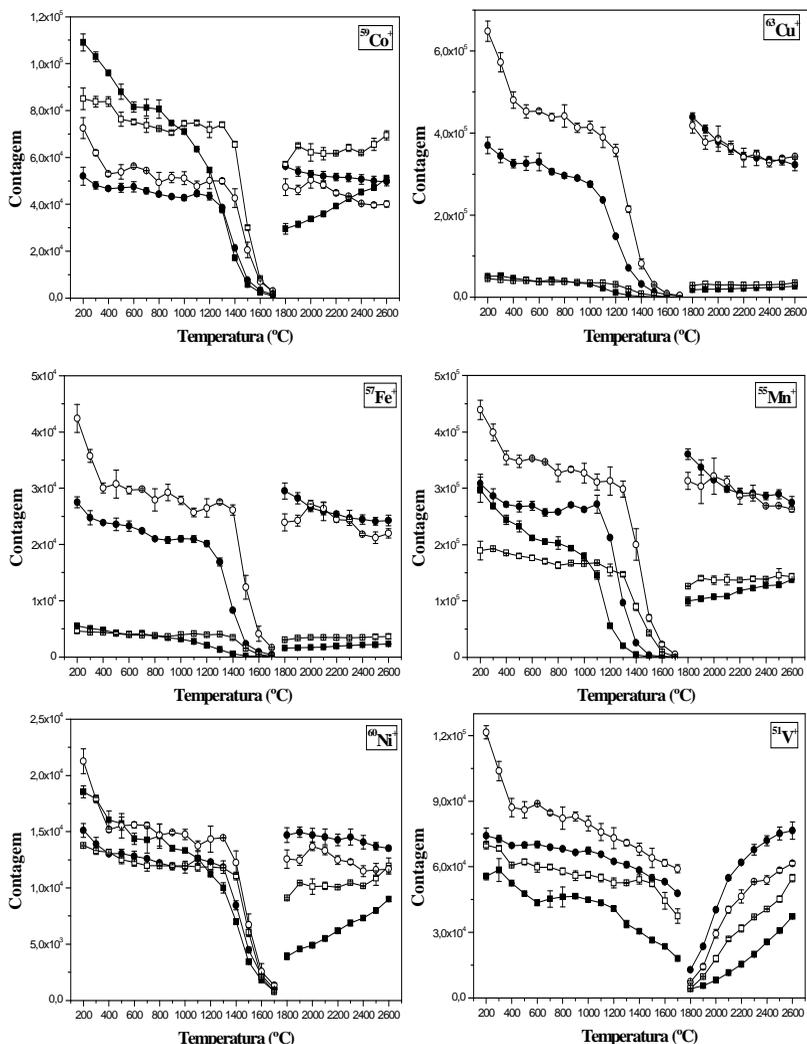
De acordo com a Figura 21, o sinal do  $^{13}\text{C}^+$ , correspondente ao carbono proveniente do tubo de grafite varia entre 1,2 e  $1,7 \times 10^6$  contagens (independente da temperatura de pirólise), enquanto que para a amostra varia entre  $3,8 - 4,1 \times 10^6$  contagens (para pirólise de 200 °C) considerando-se a vaporização a 2500 °C. Aplicando-se uma temperatura de pirólise acima de 600 °C e vaporização a 2500 °C, a população de íons  $^{13}\text{C}^+$  no plasma é aproximadamente 2 ordens de grandeza maior do que a população de íons  $^{75}\text{As}^+$  e 3 ordens de grandeza maior do que a de  $^{82}\text{Se}^+$ . Já que o  $^{12}\text{C}$  representa 98,9% do total de isótopos de carbono (aproximadamente 2 ordem de grandeza maior do que a quantidade de  $^{13}\text{C}$ ), concluímos que o total de  $^{12}\text{C}^+$  no plasma é, aproximadamente, 4 a 5 ordens de grandeza maior do que a quantidade de íons  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ , respectivamente, indicando o quanto importante

são as reações de transferência de carga entre o analito e uma espécie carregada de carbono. Comparando-se as curvas de temperatura de pirólise mostrados na Figura 20, para a amostra analisada na ausência de modificador, com a Figura 21, é notável o efeito do carbono como potencializador de ionização. Adotando-se uma temperatura de pirólise de 1000 °C, os efeitos observados em baixas temperaturas não afetam a análise das amostras, uma vez que toda a matriz da amostra é eliminada e a quantidade de carbono introduzida no plasma permanece constante ao longo da análise.



**Figura 21:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{13}\text{C}^+$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; Amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600°C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W.

Na Figura 22 são mostradas as curvas de temperatura de pirólise e vaporização para  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$  e  $^{51}\text{V}^+$ . O efeito do modificador na estabilização térmica desses elementos foi menos pronunciado, como esperado, por serem mais estáveis termicamente. O aumento da ionização, devido às reações de transferência de carga, pode ser negligenciado, porque os potenciais de ionização desses elementos são relativamente baixos e a eficiência de ionização dos mesmos ser próxima a 100% nas condições utilizadas. Entretanto, o carbono pode atuar como carreador do analito, como já mencionado. Observa-se que com o aumento da temperatura de vaporização, a intensidade do sinal dos analitos diminui ou permanece constante devido ao aumento das perdas por difusão e condensação. A única exceção o  $^{51}\text{V}^+$ , que é o elemento mais estável entre os estudados e é vaporizado em temperaturas mais altas. Além disso, as curvas de temperatura para o padrão aquoso, sem modificador, também mostram que houve aumento do sinal com o aumento da temperatura de vaporização, provavelmente por haver mais carbono na fase vapor no interior do tubo de grafite, atuando como carreador. Outro fato a ser notado é que em todas as curvas de temperatura de pirólise para a amostra, com paládio, Figuras 20 e 22, o sinal decresce mais até a temperatura de 400 °C, sendo que esse efeito, provavelmente, decorre da volatilização dos componentes mais voláteis da matriz da amostra, que não são totalmente eliminados na etapa de secagem e de pirólise. Aumentando-se a temperatura de pirólise, esses componentes são mais eficientemente eliminados, diminuindo o efeito da matriz como carreador. As condições de compromisso adotadas para a determinação de todos os elementos investigados foram de 1000 °C para a pirólise e 2400 °C para a vaporização.

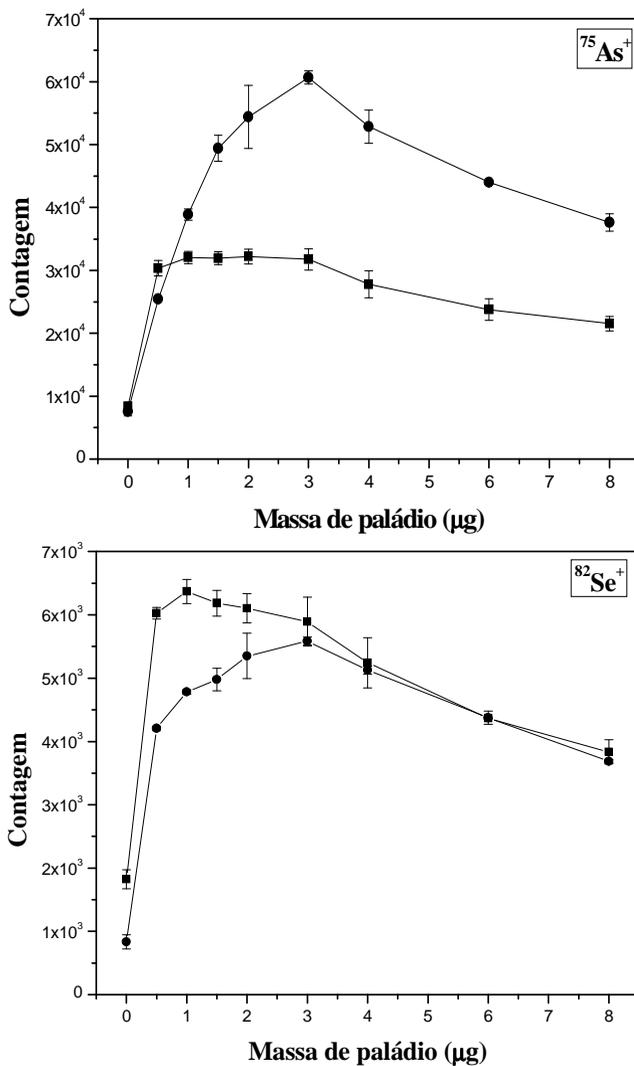


**Figura 22:** Curvas de temperatura de pirólise e de vaporização para  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{60}\text{Ni}$  e  $^{51}\text{V}$ . Padrão aquoso: com (—□—) e sem (—■—) paládio; Amostra tratada com ácido fórmico: com (—○—) e sem (—●—) paládio. Vaporização constante em 2500 °C para avaliar a temperatura de pirólise; pirólise constante em 600°C para avaliar a temperatura de vaporização. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>, vazão do gás carreador: 1,025 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1100 W.

### 5.3.2 Efeito da massa de carreador

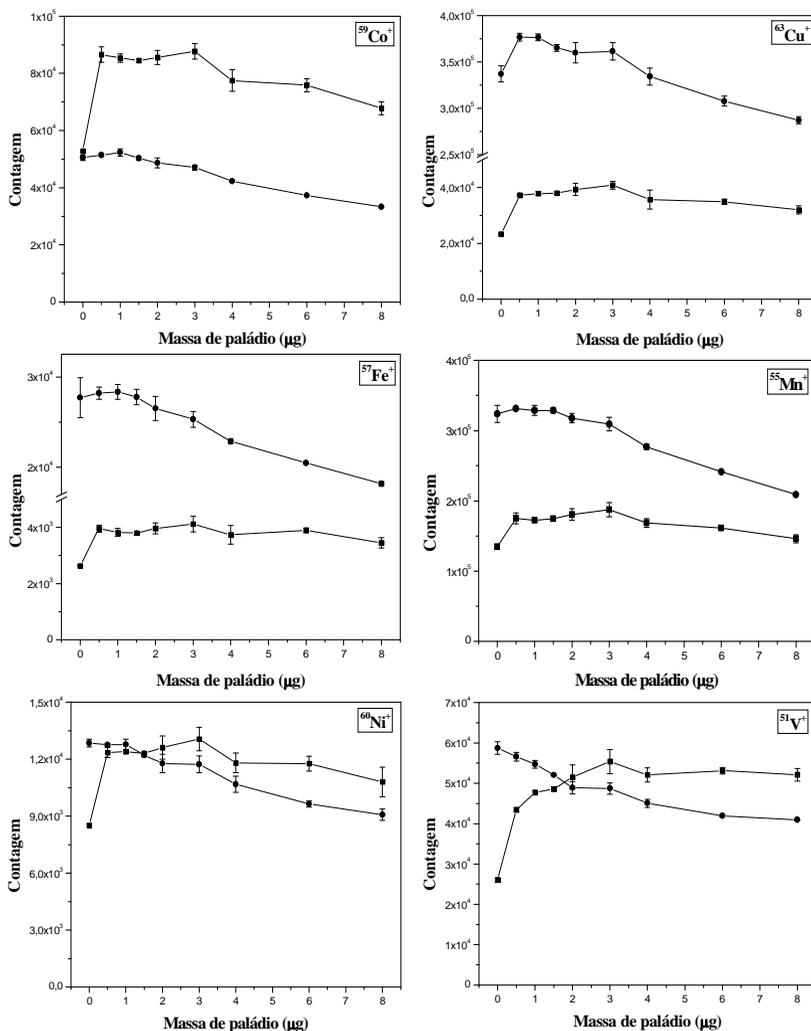
Quando se utiliza o sistema de vaporização eletrotérmica mostrado na Figura 4 para a introdução de amostra no plasma, na espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, existe uma tendência de condensação dos vapores dos analitos nas superfícies frias do sistema. Para minimizar este efeito e melhorar a eficiência de transporte dos analitos para o plasma é comum o uso de elementos e substâncias, tais como o Pd, NaCl ou até mesmo a água do mar, que possam atuar como carreadores físicos, ou seja, materiais capazes de formar núcleos de condensação, que facilitam o transporte do vapor dos analitos para o plasma [92,93,124]. Estudos mostraram que na ausência de um carreador, a eficiência de transporte é de, aproximadamente, 10%, sendo que 70% dos analitos vaporizados são perdidos na válvula de abertura do ETV, 19% no tubo que transfere os analitos ao plasma e 1% é perdido na tocha [92]. No entanto, tudo isso não impede que o ETV seja utilizado para fins quantitativos, desde que sempre haja a mesma eficiência de transporte dos analitos ao plasma, para a amostra e as soluções de calibração. O efeito do paládio como carreador/modificador foi avaliado para todos os elementos investigados, como mostrado nas Figuras 23 e 24. A avaliação foi realizada para solução aquosa e para a amostra tratada com ácido fórmico.

Para a solução de calibração aquosa, devido à ausência de matriz que possa atuar como carreador e devido à estabilização térmica, o uso de paládio provocou um aumento da intensidade do sinal para todos os elementos, especialmente para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ , que são elementos mais voláteis. Isto está de acordo com os estudos de Kantor et. al. e Barth et. al., os quais comprovaram que a eficiência de transporte dos analitos é maior, quanto menor forem as perdas por condensação, sendo que, quanto mais volátil for o elemento ou seus óxidos, maiores são as perdas por condensação [93,125]. Entretanto, para a amostra tratada com ácido fórmico, o efeito do paládio como carreador é menos evidenciado, exceto para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ , devido à matriz da amostra e o ácido fórmico atuarem como carreadores dos analitos. Para  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$  o efeito do paládio é significativo, pois estes elementos são relativamente voláteis e necessitam de um modificador químico para aumentarem a sua estabilidade térmica, principalmente quando a temperatura de pirólise for 1000 °C (ver Figura 20), além de que as suas perdas por condensação são maiores, por serem elementos mais voláteis, como explicado acima.



**Figura 23:** Influência da massa de paládio ( $\mu\text{g}$ ) nos sinais de  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ : solução aquosa (—■—) e amostra tratada com ácido fórmico (—●—). Volume da solução de paládio:  $20\ \mu\text{L}$ , volume de amostra:  $20\ \mu\text{L}$ . Pirólise em  $1000^\circ\text{C}$  e vaporização em  $2400^\circ\text{C}$ . Vazão do gás interno:  $150\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ , vazão do gás carreador:  $1,025\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$  e potência de RF:  $1100\ \text{W}$ .

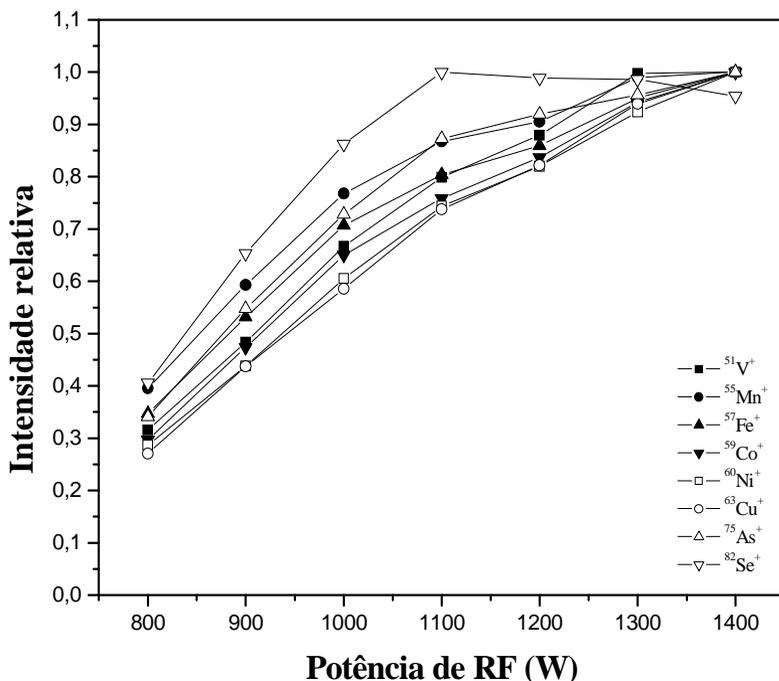
O uso de uma massa de até 2  $\mu\text{g}$  de paládio é suficiente para aumentar em até 4 vezes a eficiência de transporte de  $^{75}\text{As}$  e  $^{82}\text{Se}$ . Para os elementos menos voláteis, o aumento na eficiência de transporte ocasionado pelo paládio é menos importante, especialmente para a solução da amostra tratada com ácido fórmico, como mencionado acima. Em geral, quando são utilizadas massas de paládio superiores a 2 – 3  $\mu\text{g}$  o sinal do analito tende a decrescer, tanto para a solução de calibração, quanto para a solução da amostra tratada com ácido fórmico. O sinal do analito chega a diminuir até 40%, possivelmente devido ao efeito espaço carga [9]. Nesse caso, os íons de paládio são os responsáveis pelo efeito espaço carga por estarem presentes em maior quantidade em relação aos analitos e por ter isótopos de massa maior do que os analitos ( $^{102}\text{Pd}^+$ ,  $^{104}\text{Pd}^+$ ,  $^{105}\text{Pd}^+$ ,  $^{106}\text{Pd}^+$ ,  $^{108}\text{Pd}^+$  e  $^{110}\text{Pd}^+$ ). Observou-se que para a amostra tratada com ácido fórmico, os sinais de  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$  e  $^{51}\text{V}^+$  são maiores na ausência de paládio, porque esses elementos são termicamente estáveis a 1000  $^{\circ}\text{C}$ , mesmo na ausência de paládio e os componentes da matriz da amostra atuam de maneira eficiente no transporte dos analitos do forno até o plasma. Diante dessas observações, foi selecionada uma massa de 2  $\mu\text{g}$  de paládio, para atuar como carreador/modificador.



**Figura 24:** Influência da massa de paládio ( $\mu\text{g}$ ) nos sinais de  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$  e  $^{51}\text{V}^+$ : solução aquosa (—■—) e amostra tratada com ácido fórmico (—●—). Volume da solução de paládio: 20  $\mu\text{L}$ , volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$ . Pirólise em 1000°C e vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150  $\text{mL min}^{-1}$ , vazão do gás carreador: 1,025  $\text{L min}^{-1}$  e potência de RF: 1100 W.

### 5.3.3 Influência da potência de radiofrequência e vazão dos gases

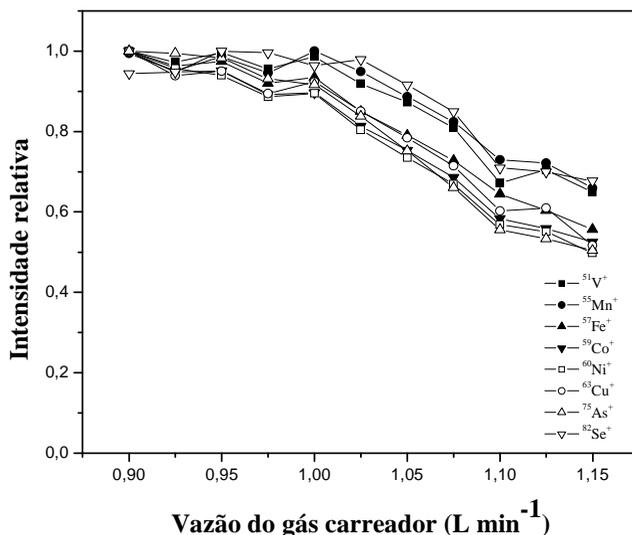
O efeito da potência de RF sobre as intensidades dos sinais dos analitos é mostrada na Figura 25. Esse estudo foi realizado somente para a amostra solubilizada com ácido fórmico, uma vez que a maior parte da matriz da amostra é eliminada no tubo de grafite. Desta maneira, apenas um aerossol seco alcança o plasma, independentemente, de ter sido injetado no forno de grafite amostra ou solução aquosa. Observou-se que, aumentando a potência de RF, de 800 W até 1400 W, a intensidade do sinal aumenta até 3 vezes, dependendo do analito. Para potências acima de 1300 W, o aumento é menos intenso ou o sinal permanece constante.



**Figura 25:** Avaliação da potência de RF no sinal dos analitos, para a amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido para cada analito. Foram usados 2  $\mu\text{g}$  de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20  $\mu\text{L}$ . Pirólise em 1000°C; vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150  $\text{mL min}^{-1}$  e vazão do gás carreador: 1,025  $\text{L min}^{-1}$ .

Quando o espectrômetro de ICP-MS é operado, usando-se o sistema convencional de introdução de amostra no ICP, geralmente, são aplicadas potências de RF menores do que 1300 W (1100 ou 1200 W). Isso não significa que mediante o uso de ETV não seja necessária mais energia para ionizar os analitos, pelo contrário, mas dependendo das condições instrumentais, a região do plasma na qual existe maior população de íons pode se deslocar, ficando mais ou menos próxima da região, onde o plasma é coletado. Sendo assim, a potência de 1300 W foi adotada, como condição de compromisso.

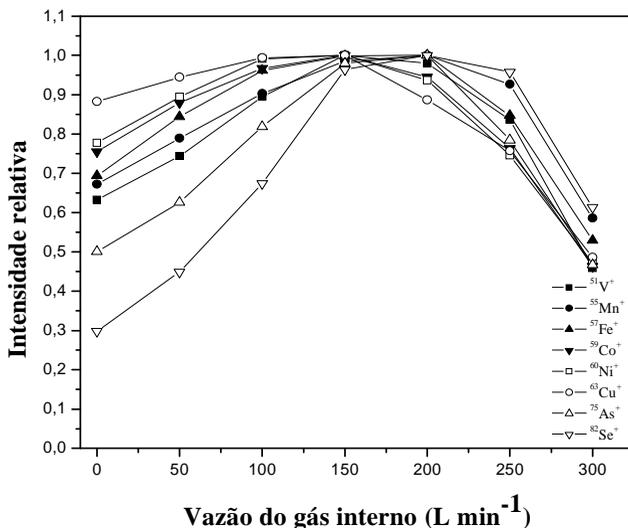
O efeito da vazão do gás carreador (argônio) sobre o sinal dos analitos também foi avaliado, como mostrado na Figura 26. Aumentando-se a vazão do gás carreador, de 0,9 até 1,0 L min<sup>-1</sup>, a intensidade do sinal dos analitos é aproximadamente constante, mas decresce em vazões maiores do que 1,0 L min<sup>-1</sup>, que pode ser consequência de diversos fatores, entre eles o menor tempo de residência dos analitos no plasma, podendo resultar na ionização incompleta dos mesmos, ou o plasma ser coletado na geração de óxidos rica em óxidos. A vazão de 1,0 L min<sup>-1</sup> foi adotada como compromisso.



**Figura 26:** Influência da vazão do gás carreador para o sinal dos analitos na amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido para cada analito. Foram usados 2 µg de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20 µL. Pirólise em 1000°C;

vaporização em 2400 °C. Vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1300 W.

Para seu funcionamento, o ETV requer uma vazão adicional de gás, chamado de gás interno, que passa por dentro do forno na etapa de vaporização, e que se soma ao gás carreador (que não passa por dentro do forno). Essa vazão de gás é responsável pela condução dos vapores do analito através do tubo que conecta o ETV ao plasma. A influência da vazão do gás interno é mostrada na Figura 27. Aumentando-se a vazão de 0 até 150 mL min<sup>-1</sup> os sinais dos analitos também aumentam, indicando um aumento na eficiência de transporte. Em vazões acima de 150 mL min<sup>-1</sup>, o sinal decresce, provavelmente, devido à condensação do analito sobre a superfície do tubo de grafite ou da válvula do ETV que é resfriada pelo gás, ou ainda, devido ao menor tempo de residência dos analitos no plasma. Além disso, foi comprovado que para altas vazões do gás interno, uma perda adicional do analito pode ocorrer na cela do ETV, por causa da turbulência causada pelo gás [102]. Sendo assim, a vazão do gás interno foi fixada em 150 mL min<sup>-1</sup>.

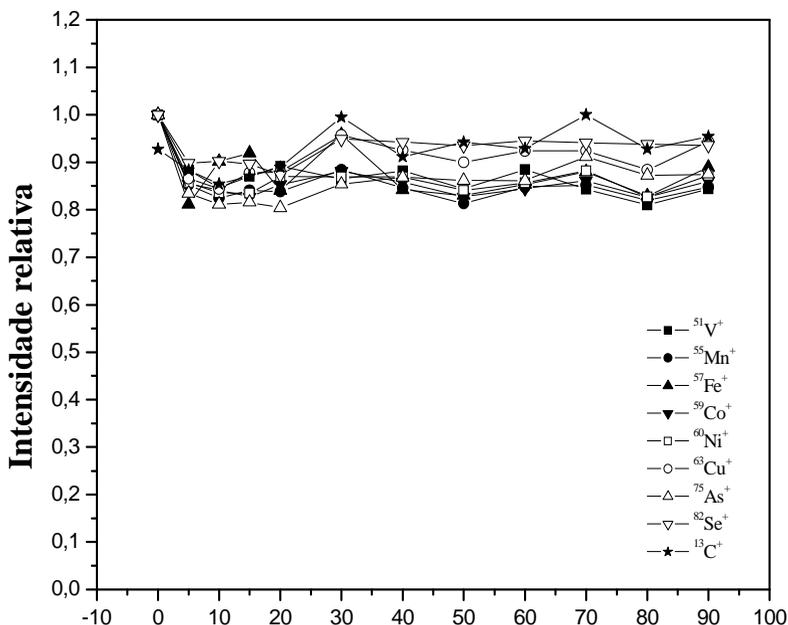


**Figura 27:** Influência da vazão de gás interno no sinal dos analitos na amostra TORT 2 tratada com ácido fórmico. O sinal foi normalizado em função do maior valor obtido em cada curva. Foram usados 2 µg de paládio como modificador/carreador; volume de amostra: 20 µL. Pirólise em 1000°C; vaporização em 2400 °C. Vazão do gás carreador: 1,0 L min<sup>-1</sup> e potência de RF: 1300 W.

### 5.3.4 Efeito da concentração de ácido fórmico

Além de se avaliar as condições instrumentais, foi necessário avaliar também a influência do ácido fórmico sobre o sinal do analito na ausência da matriz da amostra. A ETV, através de um programa de temperatura e tempo, deve ser capaz de eliminar o ácido fórmico e diminuir as interferências causadas pelo mesmo, que são observadas quando a solução é introduzida no plasma por meio de nebulizadores. As intensidades dos sinais de diferentes analitos em função do conteúdo de ácido fórmico são mostradas na Figura 28. O maior sinal é obtido para uma solução sem ácido fórmico. Quando presente em pequena proporção, em torno de 0,5% (v/v), o ácido fórmico provoca um decréscimo (pouco significativo) da intensidade do sinal. O sinal oscila entre o valor máximo e 80% desse valor, para diferentes concentrações de ácido fórmico. Essa diminuição da intensidade do sinal, provavelmente, se deve ao melhor contato entre os analitos e o grafite, devido à diminuição da tensão superficial e da viscosidade das soluções pela presença do ácido fórmico. As intensidades reais dos sinais (em contagens) obtidas para a solução sem a presença de ácido fórmico foram 34942 ( $^{75}\text{As}^+$ ), 80357 ( $^{59}\text{Co}^+$ ), 35088 ( $^{63}\text{Cu}^+$ ), 4427 ( $^{57}\text{Fe}^+$ ), 169573 ( $^{55}\text{Mn}^+$ ), 11185 ( $^{60}\text{Ni}^+$ ), 6528 ( $^{82}\text{Se}^+$ ), 41413 ( $^{51}\text{V}^+$ ) e 2203608 ( $^{13}\text{C}^+$ ).

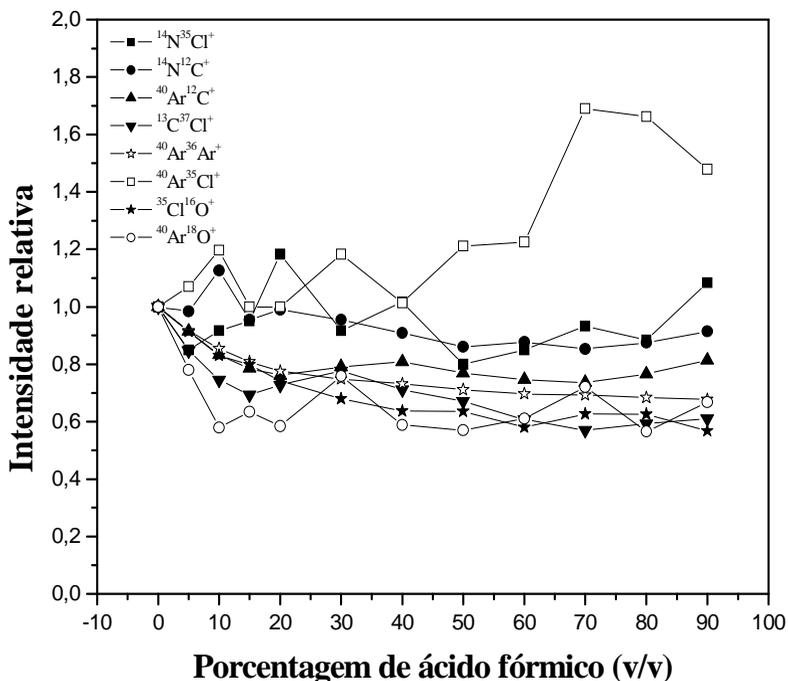
Considerando a introdução de amostras no plasma por meio da nebulização, a introdução de ácido fórmico [122] ou outros compostos orgânicos, como acetona, metanol [113] e etanol [91], em relação às soluções aquosas, sem conter qualquer composto orgânico, resulta num aumento de sensibilidade devido a maior eficiência de nebulização e transporte do aerossol e às reações de transferência de carga pelo carbono no plasma para alguns dos elementos com maior energia de ionização, como  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{82}\text{Se}^+$ . Entretanto, usando-se ETV para introduzir a amostra no ICP, não há nebulização, e conseqüentemente, as propriedades físicas da solução são menos importantes, embora a molhabilidade da superfície do tubo de grafite dependa dessas propriedades. Além disso, a água e o ácido fórmico são eliminados nas etapas de secagem e pirólise do programa de temperatura do ETV, diminuindo a importância das reações de transferência de carga pelo carbono.



### Porcentagem de ácido fórmico (v/v)

**Figura 28:** Influência da quantidade de ácido fórmico na intensidade do sinal dos analitos. Concentração dos analitos:  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . A intensidade do sinal foi normalizada em relação ao valor obtido para o analito em solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1300 W, vazão do gás carreador:  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ , vazão do gás interno:  $150 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura de pirólise:  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura de vaporização:  $2400 \text{ }^\circ\text{C}$ ; volume de amostra:  $20 \mu\text{L}$  e massa de paládio (como modificador/carreador):  $2 \mu\text{g}$ .

O monitoramento do sinal do  $^{13}\text{C}^+$ , cuja intensidade permanece aproximadamente constante, demonstra a eliminação do solvente e da matriz orgânica, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de carbono introduzida no plasma e, sendo assim, a ionização por transferência de carga de espécies do carbono no plasma não é significativa. O carbono vaporizado no tubo de grafite também pode induzir à ionização de alguns elementos com energia de ionização maior, como já mencionado, entretanto, esse efeito é praticamente constante para uma mesma temperatura de vaporização e não pode ser considerado como uma interferência.



**Figura 29:** Efeito da quantidade de ácido fórmico sobre a intensidade dos íons poliatômicos. A intensidade do sinal foi normalizada em relação ao valor obtido para o analito em solução sem ácido fórmico. Potência de RF: 1300 W, vazão do gás carreador: 1,0 L min<sup>-1</sup>, vazão do gás interno: 150 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de pirólise: 1000 °C; temperatura de vaporização: 2400 °C; volume de amostra: 20 µL e massa de paládio (como modificador/carreador): 2 µg.

Os sinais de alguns íons poliatômicos importantes que podem causar interferências espectrais sobre alguns isótopos (não necessariamente sobre os isótopos dos analitos estudados neste trabalho) são mostrados na Figura 29. As intensidades dos sinais dos íons monitorados permanecem praticamente constantes ou diminuem em relação à solução sem ácido fórmico, exceto para o íon  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  cujo sinal aumenta, mas o aumento é pequeno em comparação ao sinal observado quando soluções orgânicas são introduzidas no plasma por meio da nebulização pneumática [120]. As intensidades reais (em contagens) obtidas para a solução aquosa sem ácido fórmico foram: 60 ( $^{14}\text{N}^{35}\text{Cl}^+$ ), 4486 ( $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^+$ ), 138752 ( $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ), 349 ( $^{13}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$ ), 3846

( $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ ), 71 ( $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ), 857 ( $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ ) e 544 ( $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ ). Embora as soluções das amostras possam conter grande quantidade de compostos orgânicos e sais, o aquecimento no tubo de grafite promove a eliminação total da água e do ácido fórmico, como foi mostrado na Figura 28. Certamente, também promove a eliminação da maior parte da matriz, reduzindo a possibilidade de interferências espectrais, conforme será demonstrado adiante, permitindo, assim, a calibração com soluções aquosas dos analitos. Essa possibilidade é uma importante vantagem do ETV em relação a outros sistemas de introdução de amostras no ICP, tornando a ETV-ICP-MS adequada para a análise de amostras com matrizes orgânicas mais complexas.

### 5.3.5 Aplicação do método

A análise das amostras tratadas com ácido fórmico foi conduzida usando-se curvas de calibração preparadas com soluções de calibração aquosas, sem e com ácido fórmico 5% (v/v) (a mesma quantidade de ácido fórmico presente nas soluções das amostras após a diluição 1:10 em água). As condições instrumentais foram as previamente selecionadas: potência de RF de 1300 W, a vazão do gás carreador em  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ , a vazão do gás interno em  $150 \text{ mL min}^{-1}$ , a pirólise em  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ , a vaporização em  $2400 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2 \text{ } \mu\text{g}$  de paládio, usado como modificador/carreador ( $20 \text{ } \mu\text{L}$  de uma solução de paládio contendo  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  do elemento) conforme já mencionado. Na tabela 7 são mostradas as figuras de mérito obtidas. O RSD, que é uma medida da precisão do método foi obtida pela análise da amostra Oyster Tissue considerando-se 3 replicatas. Para a maioria dos elementos, o RSD foi menor do que 2%, que demonstra a precisão. No entanto, valores de RSD maiores foram obtidos para o  $^{62}\text{Ni}$  e para o  $^{82}\text{Se}$  (10 e 8,4% respectivamente), o que já era esperado, porque esses isótopos sofrem interferências por íons poliatômicos e porque a abundância dos isótopos  $^{62}\text{Ni}$  e para o  $^{82}\text{Se}$  é baixa (26,2% para  $^{62}\text{Ni}$  e 8,7% para  $^{82}\text{Se}$ ). Para calibrações (na ausência e presença de ácido fórmico), os limites de detecção são baixos e assim é possível quantificar os analitos nas amostras analisadas. O limite de detecção do método (LOD), já definido como 3 vezes o desvio padrão de dez medidas consecutivas do branco expresso em relação à massa média de amostra seca (fator de diluição de 1330 vezes). Os valores variaram de 0,01 a  $850 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  para Co e Fe respectivamente, essas diferenças ocorrem devido às diferenças na abundância isotópica de cada isótopo, às possíveis interferências, às

eficiências de transporte do analito e de ionização, ao efeito espaço carga e ao sinal do branco. Comparando-se as figuras de mérito com aquelas obtidas usando-se o nebulizador microconcêntrico como sistema de introdução de amostra no ICP, os valores são muito parecidos, embora o fator de diluição nesta aplicação seja 10 vezes maior, para medir-se todos os analitos, incluindo o Fe e o Cu, na mesma alíquota da amostra. A elevada capacidade de detecção do ETV-ICP-MS certamente é outra vantagem. Se a amostra não fosse diluída a determinação de Fe ou de Cu seria mais difícil. Entretanto, a determinação de outros elementos minoritários poderia ser facilmente realizada, mesmo sem a diluição. Os limites de quantificação (LOQ), conforme já definido como 3,3 vezes o LOD, podem ser facilmente obtidos a partir dos valores de LOD mostrados na Tabela 7.

Como mostrado na Figura 28, mesmo quanto introduzidas no ETV quantidades consideráveis de ácido fórmico, o sinal do analito permanece constante, indicando que a temperatura de pirólise (1000 °C) é elevada o suficiente para eliminar os solventes e/ou a matriz da amostra. Entretanto, diluições menores não foram investigadas.

**Tabela 7:** Figuras de mérito do método desenvolvido para a determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, usando-se ETV como sistema de introdução da amostra no ICP. n = 10 (LOD) ou n = 3 (RSD).

Analito	Isótopo (u)	Calibração com solução aquosa sem ácido fórmico		Calibração com solução aquosa contendo ácido fórmico 5% v/v	
		LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)
V	51	10	1,5	5,0	1,6
Mn	55	5	0,1	0,5	1,8
Fe	57	100	1,8	850	1,6
Co	59	0,010	1,1	1,0	1,9
Ni	60	15	10	25	4,8
Cu	63	25	1,6	5,0	1,5
As	75	10	0,3	0,5	1,0
Se	82	100	0,8	10	8,4

\* O limite de detecção (LOD) é definido como 3 vezes o desvio padrão de dez medidas da concentração do branco multiplicado pelo fator de diluição (1330 vezes).

Na quantificação dos analitos, a calibração externa com soluções do analito em ácido fórmico 5% (v/v) ou na ausência deste foi testada para 4 materiais de referência certificados. Os resultados, expressos como uma média ( $n = 3$ )  $\pm$  intervalo de confiança a 95% (calculado pelo teste t), são mostrados nas Tabelas 8 e 9. As concentrações dos elementos não certificados foram obtidas pela análise das amostras digeridas em forno de microondas, usando-se o sistema convencional (nebulização pneumática) de introdução de amostra no ICP. A exatidão foi o principal critério para a escolha da melhor condição de análise das amostras. Comparando-se os resultados obtidos com os valores de referência ou com os valores obtidos pela análise das amostras digeridas, observa-se que ambas as formas de calibração podem ser usadas. Entretanto, se as soluções de calibração contêm com ácido fórmico 5% (v/v), a exatidão é melhor. Neste caso, os valores de concentração obtidos foram um pouco maiores do que aqueles obtidos mediante a calibração com soluções aquosas do analito na ausência de ácido fórmico. Elementos com potenciais de ionização maiores como As e Se, também foram determinados, obtendo-se valores concordantes com os de referência, independente da calibração, demonstrando que as reações de transferência de carga do carbono não são significativas, uma vez que a maior parte do solvente e da matriz da amostra é eliminada no tubo de grafite, antes da condução do aerossol seco até o plasma.

**Tabela 8:** Concentrações obtidas, em  $\text{mg kg}^{-1}$  dos elementos, nas amostras biológicas (média  $\pm$  intervalo de confiança de 95%). As amostras foram tratadas com ácido fórmico e analisadas por ETV-ICP-MS, usando-se a calibração externa, com soluções de calibração aquosas, sem e com ácido fórmico 5% (v/v). n = 3.

	<b>TORT 2</b>			<b>Bovine Liver 1577b</b>		
	<b>Certificado</b>	<b>Sem ácido fórmico</b>	<b>Com ácido fórmico</b>	<b>Certificado</b>	<b>Sem ácido fórmico</b>	<b>Com ácido fórmico</b>
<b>V</b>	1,64 $\pm$ 0,19	1,73 $\pm$ 0,28	1,70 $\pm$ 0,04	0,123	0,11 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,04
<b>Mn</b>	13,6 $\pm$ 1,2	12,6 $\pm$ 3,6	16,1 $\pm$ 2,3	10,5 $\pm$ 1,7	9,01 $\pm$ 1,82	12,30 $\pm$ 1,10
<b>Fe</b>	105 $\pm$ 13	85 $\pm$ 12	110 $\pm$ 20	184 $\pm$ 15	150 $\pm$ 15	210 $\pm$ 20
<b>Co</b>	0,50 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,07	0,606 $\pm$ 0,080	0,250	0,192 $\pm$ 0,031	0,271 $\pm$ 0,024
<b>Ni</b>	2,50 $\pm$ 0,20	1,97 $\pm$ 0,22	2,50 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,03*	0,29 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,05
<b>Cu</b>	106 $\pm$ 10	98,2 $\pm$ 15,2	110 $\pm$ 25	160 $\pm$ 8	128 $\pm$ 3	170 $\pm$ 6
<b>As</b>	21,6 $\pm$ 1,8	24,5 $\pm$ 3,7	22,3 $\pm$ 4,8	0,050	0,042 $\pm$ 0,016	0,040 $\pm$ 0,016
<b>Se</b>	5,63 $\pm$ 0,67	5,0 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,1	0,730 $\pm$ 0,060	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1

\* Valor obtido após a digestão assistida por microondas das amostras e determinação por ICP-MS, usando a nebulização pneumática convencional.

**Tabela 9:** Concentrações obtidas, em  $\text{mg kg}^{-1}$  dos elementos, nas amostras biológicas (média  $\pm$  intervalo de confiança de 95%). As amostras foram tratadas com ácido fórmico e analisadas por ETV-ICP-MS, usando-se a calibração externa com soluções de calibração aquosas, sem e com ácido fórmico 5% (v/v).  $n = 3$ .

	Oyster tissue 1566a			DOLT 3		
	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico	Certificado	Sem ácido fórmico	Com ácido fórmico
<b>V</b>	4,70 $\pm$ 0,20	4,71 $\pm$ 0,36	4,80 $\pm$ 0,60	0,67 $\pm$ 0,03*	0,57 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,11
<b>Mn</b>	12,3 $\pm$ 1,5	9,31 $\pm$ 0,65	12,50 $\pm$ 0,60	10,1 $\pm$ 2,1*	8,70 $\pm$ 1,05	11,2 $\pm$ 1,6
<b>Fe</b>	540 $\pm$ 15	320 $\pm$ 27	430 $\pm$ 40	1.480 $\pm$ 60	1.190 $\pm$ 10	1.600 $\pm$ 10
<b>Co</b>	0,570 $\pm$ 0,110	0,216 $\pm$ 0,035	0,261 $\pm$ 0,018	0,290 $\pm$ 0,040*	0,222 $\pm$ 0,023	0,296 $\pm$ 0,030
<b>Ni</b>	2,25 $\pm$ 0,45	2,10 $\pm$ 0,45	1,90 $\pm$ 0,20	2,72 $\pm$ 0,35	2,14 $\pm$ 0,12	2,34 $\pm$ 0,24
<b>Cu</b>	66,3 $\pm$ 4,3	50,6 $\pm$ 2,2	63,3 $\pm$ 3,5	31,2 $\pm$ 1,0	28,3 $\pm$ 3,3	33,3 $\pm$ 4,6
<b>As</b>	14,0 $\pm$ 1,2	12,7 $\pm$ 3,1	12,6 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 2,2	11,4 $\pm$ 2,4
<b>Se</b>	2,20 $\pm$ 0,25	1,7 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	7,06 $\pm$ 0,48	5,5 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 1,1

\* Valor obtido após a digestão assistida por microondas das amostras e determinação por ICP-MS, usando a nebulização pneumática convencional.

### **5.3.6 Conclusões relacionadas com o uso do vaporizador eletrotérmico**

Usando-se o ETV é possível analisar soluções com apreciável quantidade de ácido fórmico, a fim de determinar diversos elementos traço em amostras biológicas tratadas com este ácido. O Uso de paládio como modificador/carreador exerce efeitos significativos na estabilidade térmica dos analitos e na sensibilidade, principalmente dos elementos mais voláteis (As e Se). O efeito do ácido fórmico na sensibilidade, possivelmente na ionização pela transferência de carga, foi observada somente quando baixas temperaturas de pirólise foram aplicadas. Entretanto, nas condições estabelecidas é possível a introdução de amostras com até 90% de ácido fórmico no ICP sem causar interferências, pois a matriz da amostra e os solventes são eliminados ainda no tubo de grafite. O uso de paládio como modificador/carreador é recomendado, principalmente, para equalizar o transporte dos analitos, sa solução de calibração e amostras, do forno de grafite ao plasma. O método proposto permitiu a determinação multielementar de 8 elementos em materiais de referência, com boa exatidão, independentemente de se adicionar ácido fórmico (5% v/v) nas soluções de calibração. Baixos limites de detecção e elevada precisão foram obtidos. Não se observou instabilidade do plasma, depósitos de carbono sobre os cones na interface e não foi necessária a digestão ácida das amostras. Os dados obtidos demonstram, mais uma vez, a robustez do ETV para a introdução de amostra no plasma, pois o solvente e os concomitantes em sua maioria podem ser eliminados durante o aquecimento no tubo de grafite.



## 6 Conclusões finais

Este trabalho, além de propor um método alternativo de preparo de amostras biológicas mostrou que o uso de ETV ou de nebulizador microconcêntrico permite a introdução de matriz complexa (contendo elevado teor de compostos orgânicos) no ICP, sem causar instabilidade do plasma, ou a deposição de carbono na interface do instrumento de ICP-MS.

O procedimento de preparo de amostras biológicas proposto, usando ácido fórmico, é fácil e rápido quando a mistura é aquecida a 90 °C, além de ser de baixo custo e gerar menos resíduos quando comparado à digestão ácida, por exemplo. O preparo de amostras não exige nenhum equipamento extra, além de um sistema para o aquecimento das amostras, permitindo elevada frequência analítica dependendo apenas do tamanho do sistema de aquecimento. O procedimento proposto resulta em menor consumo de reagente, que pode ser obtido em elevado grau de pureza, diminuindo-se as possibilidades de contaminação da amostra.

Embora a solução obtida da amostra tratada com ácido fórmico contenha apreciável quantidade de compostos orgânicos, a análise dessa solução pode ser facilmente realizada por ICP-MS, usando sistemas adequados para a introdução da mesma no ICP, como, por exemplo, o nebulizador microconcêntrico ou o ETV, desde que os parâmetros relacionados a cada um deles sejam adequadamente avaliados. Usando-se o micronebulizador é possível a determinação multielementar de pelo menos 18 elementos em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, mediante a calibração externa, com soluções do analito em ácido fórmico 50% (v/v) e  $^{103}\text{Rh}^+$  como padrão interno, obtendo-se limites de detecção similares aos obtidos usando-se o sistema convencional de introdução de amostra no plasma. Usando o ETV como sistema de introdução de amostras no plasma, a quantidade de elementos que podem ser quantificados fica limitada, devido à incapacidade do instrumento utilizado medir muitos sinais transientes num curto espaço de tempo e às propriedades térmicas dos elementos. Usando-se ETV-ICP-MS, foram quantificados 8 elementos, com resultados satisfatórios, usando-se soluções de calibração aquosas do analito na presença ou ausência de ácido fórmico 5% (v/v).

Os parâmetros de mérito do método de análise de amostras biológicas tratadas com ácido fórmico, usando-se os dois sistemas de

introdução de amostra no ICP são da mesma ordem de grandeza. Entretanto, o uso do nebulizador microconcêntrico permite a determinação seqüencial de uma quantidade maior de elementos, comparado ao ETV, além de ser um sistema mais prático, de menor custo de capital e exigir material de consumo. A frequência, analítica usando-se o nebulizador microconcêntrico, é aproximadamente 6 vezes maior em comparação com o ETV. Sendo assim, características o nebulizador microconcêntrico é o sistema indicado para a análise de rotina de amostras biológicas tratadas com ácido fórmico.

## 7 Referências bibliográficas

- [1] Nelms S. M. **Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook**. Blackwell Publishing, Oxford, 2005.
- [2] Date A. R., Gray A. L.; **Development progress in plasma source mass spectrometry**. *The Analyst*, 108, 159-165, 1983.
- [3] Gray A. L., Date A. R.; **Inductively coupled plasma source mass spectrometry using continuum flow ion extraction**. *The Analyst*, 108, 1033-1050, 1983.
- [4] Date A. R., Gray A. L.; **Progress in plasma source mass spectrometry**. *Spectrochimica Acta Part B*, 38 (1-2), 29-37, 1993.
- [5] Krug F. J.; **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1º edição, Piracicaba, 2008.
- [6] Nobrega J. A., Santos M. C., de Sousa R. A., Cadore S., Barnes R. M.; Tatro M.; **Sample preparation in alkaline media**. *Spectrochimica Acta Part B*, 61 (5), 465-495, 2006.
- [7] Scriver C., Kan M., Willie S., Soo C., Birnboim H.; **Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP-OES**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (7), 1460-1466, 2005.
- [8] Kan M., Willie S. N., Scriver C., Sturgeon R. E.; **Determination of total mercury in biological samples using flow injection CVAAS following tissue solubilization in formic acid**. *Talanta*, 68 (4), 1259-1263, 2006.
- [9] Jarvis K. E., Gray A. L., Houk R. S.; **Handbook Of inductively coupled mass spectrometry**, Chapman and Hall, New York, 1992.
- [10] Lenardão E. J., Freitag R. A., Dabdoub M. J., Batista A. C. F., Silveira C. C.; **“Green Chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa**. *Química Nova*, 26 (1) 123-129, 2003.
- [11] Todoli J. L., Mermet J. M.; **Sample introduction system for analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS**. *Spectrochimica Acta Part B*, 61 (3), 239-283, 2006.
- [12] Gregoire D. C.; **Electrothermal vaporization sample introduction for inductively coupled plasma mass spectrometry**. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 43, 347-444, 2000.
- [13] Anderson R.; **Sample pretreatment and separation**. John Wiley, Chichester, 1991.

- [14] Bock R.; **A handbook of decomposition methods in analytical chemistry**. International Textbook Company Limited, Glasgow, 1979.
- [15] Hoenig M., Baeten H., Vanhentenrijk S., Vassileva E., Quevauviller P. H.; **Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods**. *Analytica Chimica Acta Part B*, 358 (1), 85 – 94, 1998.
- [16] Williams E. V.; **Low-temperature oxygen – fluorine radiofrequency ashing of biological materials in poly(tetrafluoroethylene) dishes prior to the determination of tin, iron, lead and chromium by atomic absorption spectroscopy**. *Analyst*, 107 (1278), 1006 – 1013, 1982.
- [17] McDonald A. M. G; **The oxygen flask method: A review**. *Analyst*, 86 (1018), 3 -12, 1961.
- [18] Flores E. M. M., Barin J. S., Mesko M. F., Knapp G.; **Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications**. *Spectrochimica Acta Part B*, 62 (9), 1051–1064, 2007.
- [19] Fung Y. S., Dao K. L.; **Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development**. *Analytica Chimica Acta*, 315 (3), 347–355, 1995.
- [20] Fung Y. S., Dao K. L.; **Elemental analysis of chemical wastes by oxygen bomb combustion ion chromatography**. *Analytica Chimica Acta*, 334 (1-2), 51-56, 1996.
- [21] Nadkarni R. A., Pond D. M.; **Applications of ion chromatography for determination of selected elements in a coal and oil-shale**. *Analytica Chimica Acta*, 146, 261-266, 1983.
- [22] Flores E. M. M, Barin, J. S., Paniz J. N. G., Medeiros J. A., Knapp G.; **Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination**. *Analytical Chemistry*, 76 (13), 3525 – 3529, 2004.
- [23] Mesko M. F., de Moraes D. P., Barin J. S., Dressler V. D., Knapp G., Flores E. M. M.; **Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique**. *Microchemical Journal*, 82 (2), 183-188, 2006.
- [24] Kingston H. M., Jassie L. B.; **Introduction to microwave sample preparation: Theory and Practice**. American Chemistry Society, Washington, 1998.
- [25] Silva J. B. B., Donnici C. L., Ferreira K., Ferreira W., Carvalho L. A., Ramos J. M. M.; Estudo de um novo reagente para a solubilização

de amostras de origem vegetal Parte 1. XVI Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.

[26] Silva J. B. B., Donnici C. L., Ferreira K., Ferreira W., Carvalho L. A., Ramos J. M. M.; Estudo de um novo reagente para a solubilização de amostras de origem animal Parte 2. XVI Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.

[27] Donnici C. L., Ferreira K., Ferreira W., Carvalho L. A., Ramos J. M. M., Silva J. B. B.; Emprego de um novo reagente no preparo de suspensões para a determinação de cobre em sangue por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. XVI Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.

[28] Bowman W. C., Rand M. J.; **Textbook of Pharmacology**. 2<sup>o</sup> edição, Blackwell Scientific, Oxford, 1998.

[29] Lin C. C., Yang C. C., Ger J., Deng J. F., Hung D. Z.; **Tetramethylammonium hydroxide poisoning**. *Clinical Toxicology*, 48 (3), 213-217, 2010.

[30] Challinor J. M.; **A pyrolysis-derivatisation-gas-chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers**. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 16 (4), 323-333, 1989.

[31] McKinney D. E., Carson D. M., Clifford D. J., Minard R. D., Hatcher P. G.; **Off-line thermochemolysis versus flash pyrolysis for the in situ methylation of lignin: Is pyrolysis necessary?**. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 34 (1), 41-46, 1995.

[32] Lehtonen T., Peuravuori J., Pihlaja K.; **Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium atmospheres**. *Analytica Chimica Acta*, 511 (2), 349-356, 2004.

[33] Lehtonen T., Peuravuori J., Pihlaja K.; **Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry**. *Analytica Chimica Acta*, 424 (1), 91-103, 2000.

[34] Nakagawa-Izumia A., Kuroda K., Ozawa T.; **Thermochemolytic behavior of  $\beta$ - $\beta$ lignin structures in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH)**. *Organic Geochemistry*, 35 (6), 763-774, 2004.

[35] Hardell H. L., Nilvebrant N. O.; **A rapid method to discriminate between free and esterified fatty acids by pyrolytic methylation**

using **tetramethylammonium acetate or hydroxide**. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 52 (1), 1–14, 1999.

[36] Martín-Hernández M. C., Alonso L., Juárez M., Fontecha J.; **Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese**. Chromatographia, 25 (2), 87–90, 1988.

[37] Juárez M., de la Fuente M. A., Fontecha J.; **Improved gas chromatographic method for the determination of the individual free fatty acids in cheese using a capillary column and a PTV injector**. Chromatographia, 33 (7-8), 351–355, 1992.

[38] Ceulemans M., Witte C., Lobinski R., Adams F. C.; **Simplified sample preparation for GC speciation analysis of organotin in marine biomaterials**. Applied organometallic Chemistry, 8 (5), 451–461, 1994.

[39] Willie S. N., Grégoire D. C., Sturgeon R. E.; **Determination of inorganic and total mercury in biological tissues by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry**. Analyst, 122 (8), 751–754, 1997.

[40] Yang L., Sturgeon R. E., McSheehy S., Mester Z.; **Comparison of extraction methods for quantification of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, 1055 (1-2), 177–184, 2004.

[41] Tseng C. M., de Diego A., Martin F. M., Amouroux D., Donard O. F. X.; **Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12 (7), 743–750, 1997.

[42] Fecher P. A., Nagengast A.; **Trace analysis in high matrix aqueous solutions using helium microwave induced plasma mass spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 9 (9), 1021–1027, 1994.

[43] Armour M.A; **Hazardous laboratory chemicals disposal guide**. CRC Press, Boca Raton, 1996.

[44] Monson R. S; **Advanced organic synthesis: Methods and techniques**. Rhadon, New York, 1971.

[45] McMurry, J.; *Química Orgânica*. Vol. 2, 4ª edição: Editora LTC, Rio de Janeiro 1997.

[46] Wahlen R., McSheehy S., Scriver C., Mester Z.; **Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance**

**liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (7), 876-882, 2004.

[47] Narukawa T., Willie S.; **Dried deposits of biological tissues solubilized using formic acid for LA ICP-TOF-MS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25, 1145-1148, 2010.

[48] Schrijver I., Aramendía M., Resano M., Dumoulin A., Vanhaecke F.; **Novel strategies for rapid trace element analysis of polyamide by graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. Dissolution in an organic solvent versus direct solid sampling approaches.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 500-507, 2008.

[49] Vieira M. A., Ribeiro A. S., Curtius A. J., Sturgeon R. E.; **Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (4), 837-847, 2007.

[50] Golimowski J., Golimowska K.; **UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples.** *Analytica Chimica Acta*, 325 (3), 111-133, 1996.

[51] Zheng C., Li Y., He Y., Ma Q., Hou X.; **Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (8), 746-750, 2005.

[52] Zheng C. B., Wu L., Ma Q., Lv Y., Hou X. D.; **Temperature and nano-TiO<sub>2</sub> controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (4), 514-520, 2008.

[53] Guo X. M., Sturgeon R. E., Mester Z., Gardner G. J.; **UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 75 (9), 2092-2099, 2003.

[54] Zheng C. B., Ma Q., Wu L., Hou X. D., Sturgeon R. E.; **UV photochemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements.** *Microchemical Journal*, 95 (1), 32-37, 1010.

[55] Zheng C. B., Li Y., He Y. H., Ma Q., Hou X. D.; **Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive**

**atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 20 (8), 746-750, 2005.

[56] Alonso-Rodríguez E., Moreda-Pineiro J., Lopez-Mahia P., Prada-Rodríguez D., Fernandez-Fernandez E., Muniategui-Lorenzo S., Moreda-Pineiro A., Bermejo-Barrera A., Bermejo-Barrera P.; **Pressurized liquid extraction of organometals and its feasibility for total metal extraction.** Trends in Analytical Chemistry, 25 (5), 511-519, 2006.

[57] Kanaki K., Pergantis S. A.; **Development of Mass Spectrometric Methods for Detecting Arsenic-Glutathione Complexes.** Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 19 (10), 1559-1567, 2008.

[58] Bluemlein K., Raab A., Meharg A. A., Charnock J.M., Feldmann J.; **Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390 (7), 1739-1751, 2008.

[59] Gélinas Y., Iyengar G.V., Barnes R.M.; **Total iodine in nutritional and biological reference materials using neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry.** Fresenius' Journal of Analytical chemistry, 362 (5), 483-488, 1998.

[60] <http://www.dow.com/amines/prod/ethyl-teta.htm>, acessado em 31 de janeiro de 2012.

[61] Nobrega J., Gélinas Y., Krushevska A., Barnes R.M.; **Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12 (10), 1243-1246, 1997.

[62] Krushevska A., Kotrebai M., Lasztity A., Barnes, R. M.; Amarasiriwardena D.; **Application of tertiary amines for arsenic and selenium signal enhancement and polyatomic interference reduction in ICP-MS analysis of biological samples.** Fresenius' Journal of Analytical chemistry, 355 (7-8), 793-800, 1996.

[63] Pereira J. S. F., Antes F. G., Diehl L. O., Knorr C. L., Mortari S. R., Dressler V. L., Flores E. M. M.; **Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogen determination.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25 (8), 1268-1274, 2010.

[64] Dressler V. L.; **Emprego do dietilditiofosfato de amônio para separação da matriz e pré-concentração do analito em sistema FI-ICP-MS.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 1999.

- [65] Evans E. H, Giglio J.J., Castellano T. M., Caruso J. A.; **Inductively coupled and microwave induced plasma sources for mass spectrometry**, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.
- [66] Becker J. S.; **Inorganic mass spectrometry: Principles and applications**. John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- [67] Guide Software – Elan 6000 Inductively Coupled Plasma Spectrometer.
- [68] Evans E. H., Giglio J. J.; **Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 8 (1), 1-18, 1993.
- [69] Welz B., Sperling M.; **Atomic Absorption Spectrometry**, 3<sup>o</sup> edição, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [70] Montaser A., Golightly D. W.; **Inductively Coupled plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**, 2<sup>o</sup> edição, VHC publishers, New York, 1992.
- [71] Winge R. K., Crain J. S., Houk R. S.; **High speed photographic study of plasma fluctuations and intact aerosol particles or droplets in inductively coupled plasma mass spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 6 (8), 601-604, 1991.
- [72] Olesik J. W., Smith L. J., Williamsen E.J.; **Signal fluctuations due individual droplets in coupled plasma atomic emission – spectrometry**. Journal of Analytical Chemistry, 61 (18), 2002-2008, 1989.
- [73] Mora J., Maestre S., Hernandis V., Todolí J. L.; **Liquid simple introduction in plasma spectrometry**. Trends in Analytical Chemistry, 22 (3), 123-132, 2003.
- [74] McLean J. A., Minnich M. G., Iacone L. A., Liu H., Montaser A.; **Nebulizer diagnostics: fundamental parameters, challenges, and techniques on the horizon**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13 (9), 829-842, 1998.
- [75] Mora J., Todolí J. L., Canals A., Hernandis V.; **Comparative study of several nebulizers in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: low-pressure versus high-pressure nebulization**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12 (4), 445-451, 1997.
- [76] Cano J. M., Todolí J. L., Hernandis V., Mora J.; **The role of the nebulizer interferent effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 17 (1), 57-63, 2002.

- [77] Todoli J. L., Mermet J. M.; **Sample introduction system for analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS.** *Spectrochimica Acta Part B*, 61 (3), 240-283, 2006.
- [78] <http://www.cetac.com.2007>. acessado em 31 de janeiro de 2012.
- [79] Koellensperger G., Nurmi J., Hann S., Stingeder G., Fitz W. J., Wenzel W. W.; **CE-ICP-SFMS and HPLC-ICP-SFMS for arsenic speciation in soil solution and soil water extracts.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (9), 1042-1047, 2002.
- [80] Zheng J., Hiltmann H.; **Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (1), 191-195, 2004.
- [81] Gammegaard B., Bemdahl L., Sidenius U., Jons O.; **Selenium speciation in urine by ion-pairing chromatography with perfluorinated carboxylic acids and ICP-MS detection.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (6), 570-575, 2002.
- [82] Nam S. H., Lim J. S., Montaser A.; **High-efficiency nebulizer for argon inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (12), 1357-1362, 1994.
- [83] Field M. P., Cullen J. T., Sherrell R. M.; **Direct determination of 10 trace metals in 50  $\mu$ L samples of coastal seawater using desolvating micronebulization sector field ICP-MS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (9), 1425-1431, 1999.
- [84] Westphal C. S., McLean J. A., Acon B. W., Allen L. A., Montaser A.; **Axial inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry using direct liquid sample introduction.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (7), 669-675, 2002.
- [85] Liu H., Montaser A., Dolan S. P., Schwartz R. S.; **Evaluation of a low sample consumption high-efficiency nebulizer for elemental analysis of biological samples using inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11 (4), 307-311, 1996.
- [86] Kahen K., Strubinger A., Chirinos J. R., Montaser A.; **Direct injection high efficiency nebulizer-inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of petroleum samples.** *Spectrochimica Acta Part B*, 58 (3), 397-413, 2003.
- [87] Caumettea G., Lienemann C. P., Merdrigna I., Paucot H., Bouyssiarea B., Lobinski R.; **Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow**

**nebulizer and heated spray chamber sample introduction.** *Talanta*, 80 (2), 1039–1043, 2009.

[88] Lienemann C. P., Dreyfus S., Pecheyran C., Donard O. F. X.; **Trace Metal Analysis in Petroleum Products: Sample Introduction Evaluation in ICP-OES and Comparison with an ICP-MS Approach.** *Oil & Gas Science and Technology*, 62 (1), 69-77, 2007.

[89] Kovacevic M., Goessler W.; **Direct introduction of volatile carbon compounds into the spray chamber of an inductively coupled plasma mass spectrometer: Sensitivity enhancement for selenium.** *Spectrochimica Acta Part B*, 60 (9-10), 1357-1362, 2005.

[90] Bouyssiere B., Ordóñez Y. N., Lienemann C. P., Schaumlöffel D., Lobinski R.; **Determination of mercury in organic solvents and gas condensates by  $\mu$ flow-injection - inductively coupled plasma mass spectrometry using a modified total consumption micronebulizer fitted with single pass spray chamber.** *Spectrochimica Acta Part B*, 61 (9), 1063–1068, 2006.

[91] Tormen L., Chaves E.S., Saint'Pierre T. D., Frescura V. L. A., Curtius A. J.; **Determination of trace elements in fuel ethanol by ICP-MS using direct sample introduction by a microconcentric nebulizer.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (9), 1300-1304, 2008.

[92] Gregoire D. C., Sturgeon R. E.; **Analyte transport efficiency with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B*, 54 (5), 773-786, 1999.

[93] Kántor T., **Interpreting some analytical characteristics of thermal dispersion methods used for sample introduction in atomic spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B*, 43 (9-11), 1299 – 1320, 1988.

[94] Esteban A. M, Slowikowski B.; **Electrothermal vaporization - Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ETV-ICP-MS): A valuable tool for direct multielement determination in solid samples.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33 (1), 43-55, 2003.

[95] Resano M., Garcia-Ruiz E., Vanhaecke F., Crespo C., Belarra M. A.; **Evaluation of solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry and solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of Cr in various materials using solution-based calibration approaches.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (8), 958-965, 2004.

- [96] Vanhaecke F., Resano M., Verstraete M., Moens L., Dams R.; **Multielement analysis of polyethylene using solid sampling electrothermal vaporization ICP mass spectrometry.** Analytical Chemistry, 72 (18), 4310 - 4316, 2000.
- [97] Chen B. B., Hu B., He M.; **Cloud point extraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of inorganic selenium in environmental water samples.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20 (19), 2894-2900, 2006.
- [98] da Silva M. A. M., Frescura V. L. A., Curtius A. J.; **Determination of noble metals in biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, following cloud point extraction.** Spectrochimica Acta Part B, 56 (10), 1941-1949, 2001.
- [99] Saint'Pierre T. D., Frescura V. L. A., Curtius A. J.; **The development of a method for the determination of trace elements in fuel alcohol by ETV-ICP-MS using isotope dilution calibration.** Talanta, 68 (3), 957-962, 2006.
- [100] Saint'Pierre T. D., Dias L. F., Pozebon D., Aucelio R. Q., Curtius A. J., Welz B.; **Determination of Cu, Mn, Ni and Sn in gasoline by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, and emulsion sample introduction.** Spectrochimica Acta Part B, 57 (12), 1991-2001, 2002.
- [101] Chaves E. S., Lepri F. G., Silva J. S. A., de Quadros D. P. C., Saint'Pierre T. D., Curtius A. J.; **Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS.** Journal of Environmental Monitoring, 10 (10), 1211-1216, 2008.
- [102] Dias L. F., Miranda G. R., Saint'Pierre T. D., Maia S. M., Frescura V. L. A., Curtius A. J.; **Method development for the determination of cadmium, copper, lead, selenium and thallium in sediments by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and isotopic dilution calibration.** Spectrochimica Acta Part B, 60 (1), 117-124, 2005.
- [103] Grindlay G., Mora J., Gras L., de Loos-Vollebregt M. T. C.; **Ultratrace determination of Pb, Se and As in wine samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta, 652 (1-2) 154-160, 2009.
- [104] Hu B., Li S., Xiang G., He M., Jiang Z.; **Recent progress in electrothermal vaporization - inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry.** Applied Spectroscopy Reviews, 42, 203-234, 2007.

- [105] Resano M., Vanhaecke F., de Loos-Vollebregt M. T. C.; **Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry - a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (11), 2450-2475, 2008.
- [106] Dressler V. L., Pozebon D., Curtius A. J.; **Introduction of alcohols in inductively coupled plasma mass spectrometry by a flow injection system.** *Analytica Chimica Acta*, 379 (1-2), 175-183, 1999.
- [107] Duyck C. B. **Determinação de elementos traço em petróleo bruto e frações por USNIP-MN de soluções orgânicas visando aplicações geoquímicas.** Tese (Doutorado em química) PUC-Rio, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 2001.
- [108] Boorn A. W., Browner R. F.; **Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 54 (8), 1402-1410, 1982.
- [109] Molinero A. L., Castillo J. R., Chamorro P., Moniozguren J. M.; **Multivariate statistical characterization of the tolerance of argon inductively coupled plasmas to organic solvents.** *Spectrochimica Acta Part B*, 52 (1), 103-112, 1997.
- [110] Blades M. W., Caughlin B. L.; **Excitation temperature and electron density in the inductively coupled plasma - aqueous vs organic solvent introduction.** *Spectrochimica Acta Part B*, 40 (4), 579-591, 1985.
- [111] Kreuning G., Maessen F. J. M. J.; **Effects of the solvent plasma load of various solvents on the excitation conditions in medium power inductively coupled plasmas.** *Spectrochimica Acta Part B*, 44 (4), 567-584, 1989.
- [112] Evans E. H., Ebdon L.; **Effect Of organic solvents and molecular gas on polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 5 (6), 425-430, 1990.
- [113] Hu Z., Hu S., Gao S., Liu Y., Lin S.; **Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone.** *Spectrochimica Acta Part B*, 59 (9), 1463-1470, 2004.
- [114] Larsen E. H., Sturup S.; **Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (10), 1099-1105, 1994.

- [115] Pettine M., Casentini B., Mastroianni D., Capri S.; **Dissolved inorganic carbon effect in the determination of arsenic and chromium in mineral waters by inductively coupled plasma-mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta*, 599, 191–198, 2007.
- [116] Hausler D.; **Trace element analysis of organic solutions using inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B*, 42 (1-2), 63-73, 1987.
- [117] Hill S. J., Ford M. J., Ebdon L.; **Investigations into the application of methane addition to the nebulizer gas in inductively coupled plasma mass spectrometry for the removal of polyatomic interferences.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7, 1157-1165, 1992.
- [118] Botto R. I.; **Applications of ultrasonic nebulization in the analysis of petroleum and petrochemicals by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8, 51-57, 1993.
- [119] Brenner I. B., Dorfman E.; **Application of conventional and low-flow torches for the analysis of xylene- and tetralin-based petroliferous materials by argon and oxygen-argon ICP-AES.** *Microchemical Journal*, 52, 81-95, 1995.
- [120] Lide D. R.; **Handbook of Chemistry and Physics**, 84<sup>o</sup> edition, CRC Press, 2003-2004.
- [121] Huang L. S.; Lin K. C.; **Detection of iron species using inductively coupled plasma mass spectrometry under cold plasma temperature conditions.** *Spectrochimica Acta Part B*, 56, 123–128, 2001.
- [122] Tormen L., Gil R. A., Frescura V. L. A., Martinez L. D., Curtius A. J.; **Determination of trace elements in biological samples treated with formic acid by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer.** *Spectrochimica Acta Part B*, 65 (11), 959-966, 1010.
- [123] Bulska E., Thybusch B., Ortner H. M.; **Surface and subsurface examination of graphite tubes after electrodeposition of noble metals for electrothermal atomic absorption spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B*, 56 (4) 363-373, 2001.
- [124] Kántor T., Maestre S., de Loos-Vollebregt M. T. C.; **Studies on transport phenomena in electrothermal vaporization sample introduction applied to inductively coupled plasma for optical emission and mass spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B*, 60, (9-10), 1323-1333, 2005.

[125] Barth P., Hauptkorn S., Krivan V.; **Improved slurry sampling electrothermal vaporization system using a tungsten coil for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12, 1351-1358, 1997.



## 8 Anexos

### Artigos publicados relacionados com a tese:

Tormen L., Gil R. A., Frescura V. L. A., Martinez L. D., Curtius A. J.; **Determination of trace elements in biological samples treated with formic acid by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer.** Spectrochimica Acta Part B, 65 (11), 959-966, 1010.

Tormen L., Gil R. A., Frescura V. L. A., Martinez L. D., Curtius A. J.; **The use of electrothermal vaporizer coupled to the inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic, selenium and transition metals in biological samples treated with formic acid.** Analytica Chimica Acta, 717 (2), 21-27, 2012.