



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 IODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
MOLECULAR - UM COMPARATIVO ENTRE MOLÉCULAS PROMISSORAS

Mauana Schneider da Silva

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Carasek

Prof. Dr. Bernhard Welz (*in memoriam*)

Florianópolis - SC, Brasil

2020

DETERMINAÇÃO DE IODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
MOLECULAR UM COMPARATIVO ENTRE MOLÉCULAS PROMISSORAS

Por

Mauana Schneider da Silva

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química,
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do grau de doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek
Prof. Dr. Bernhard Welz (*in memoriam*)

Florianópolis, SC, Brasil

2020

MAUANA SCHNEIDER DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE IODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
MOLECULAR UM COMPARATIVO ENTRE MOLÉCULAS PROMISSORAS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros

Prof. Fábio Grandis Lepri, Dr.
Universidade Federal Fluminense

William Boschetti, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Tatiane de Andrade Maranhão, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Sidinei Chaves, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Química.

Prof. Marcus Mandolesi Sá, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Eduardo Carasek, Dr.
Orientador

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

da Silva, Mauana Schneider
DETERMINAÇÃO DE IODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
MOLECULAR UM COMPARATIVO ENTRE MOLÉCULAS PROMISSORAS /
Mauana Schneider da Silva ; orientador, Eduardo Carasek,
coorientador, Bernhard Welz, 2020.
179 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Espectrometria de absorção molecular de
alta resolução. 3. Determinação de iodo. 4. Validação de
métodos analíticos. I. Carasek, Eduardo. II. Welz,
Bernhard. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Dedico este trabalho em memória ao Professor Bernhard Welz.

Obrigada por me mostrar como a ciência é apaixonante.

Eu sei que você estaria orgulhoso de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os cidadãos brasileiros, que graças aos seus esforços, me possibilitaram estudar em uma universidade pública, gratuita e de qualidade. Tenho noção do privilégio que foi estudar em uma universidade federal durante todos estes anos, e lutarei para que este privilégio esteja disponível para todo cidadão brasileiro que desejar o ingresso a um curso superior ou pós-graduação. Todo poder emana do povo, espero um dia poder devolver integralmente à sociedade o investimento que em mim depositaram.

Agradeço também a Universidade Federal de Santa Catarina, que foi meu lar durante os últimos dez anos, me fornecendo todas as ferramentas necessárias para que eu pudesse seguir nesta maravilhosa jornada acadêmica. Vivemos tempos sombrios em que novamente a universidade vem sendo atacada por mentes pequenas que não valorizam o pesquisador brasileiro, não valorizam os Professores e não valorizam os alunos que se dedicam a tornar este país definitivamente soberano. Não nos cabe mais a posição de colônia, e dependemos fortemente das universidades para formarmos cidadãos com senso crítico e não apenas marionetes do imperialismo.

Das maravilhosas vivências que este período junto à universidade me proporcionou, destaco aqui a oportunidade de ter convivido com excelentes profissionais. Professores que deram o melhor de si a fim de nos oferecer um ensino de excelência. Dentre estes destaco meus orientadores Professor Eduardo Carasek, Professor Jörg Feldmann e Professor Bernhard Welz, que dedicaram tanto tempo e esforço para minha formação profissional e pessoal. Também agradeço de coração aos que passaram de Professores a amigos de caminhada e a oportunidade de ver colegas de laboratório se tornando grandes profissionais, inspirando seus alunos e sendo uma ferramenta de transformação social. Um dia quero ser como vocês!

Infelizmente a vida nem sempre é exatamente como nós planejamos, e durante esta jornada, perdemos nosso mais querido companheiro. Professor Welz,

você sempre foi meu modelo, minha inspiração, meu *pop star*. Sinto falta da sua energia boa, sempre com histórias fantásticas para nos contar, sobre sua longa e frutífera vida acadêmica, sobre suas viagens e sobre a vida. As terças-feiras eram muito mais emocionantes com você por perto, para as nossas reuniões de grupo, pois sabíamos que teríamos você lá, para nos agradecer com suas histórias cheias de conhecimento e para nos orientar. O senhor se dedicou a nós até seu último momento, e eu espero ter conseguido retribuir, ao menos, uma pequena parcela de toda essa dedicação. Este trabalho é para o senhor, Professor.

Agradeço em especial meus amigos do laboratório CroMaas, que me ajudaram a passar pelos momentos mais difíceis da minha vida, sempre com bom humor, com uma palavra de conforto ou com um puxão de orelha quando necessário. Amo cada um de vocês e espero que contem comigo sempre. Em especial agradeço minha grande amiga e colaboradora Heloisa Cadorim, minha parceira da espectrometria de absorção atômica e da vida. Tenho muito orgulho e um carinho enorme por todos vocês.

Durante o meu doutorado tive a oportunidade de conhecer realidades bem diferentes da vida acadêmica no Brasil. Agradeço imensamente ao Professor Jörg Feldmann e a Professora Eva Krupp da University of Aberdeen – Escócia, por terem me recebido com tanto carinho e dedicação no laboratório TESLA, assim como agradeço pelo acolhimento que recebi de meus colegas de grupo. Também agradeço imensamente aos pesquisadores do ISAS – Berlim, que colaboraram com parte dos experimentos essenciais para minha tese, em especial ao Professor Helmut Becker-Ross e ao Dr. Carlos Abad.

Mas nada disso seria possível sem o apoio incondicional da minha família, em especial, ao melhor ex-marido do universo. Xande, seu apoio foi e sempre será um dos pilares que me suportam. Minha filha Natalie, por quem eu acordo todos os dias de manhã. Meus avós maravilhosos que sempre estiveram comigo durante essa jornada, meus tios e meus pais. Ao meu querido Daniel, que não me deixa desistir. Não sei o que seria de mim sem você.

RESUMO

Esta tese relata o uso de espectrômetros de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua para a determinação de iodo através da espectrometria de absorção molecular. O presente trabalho conta com a revisão bibliográfica sobre técnicas clássicas e atuais para a determinação de iodo, a identificação das bandas de absorção de moléculas diatômicas de iodo realizada utilizando um espectrógrafo Echelle simultâneo molecular e também o estudo das melhores regiões espectrais para o monitoramento dessas moléculas utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, com suas condições otimizadas para as moléculas Cal, Srl, Bal e InI. Dentre estas condições está o uso de irídio como modificador permanente para as moléculas Cal e Srl, o uso de platina para a molécula Bal e o uso de tungstênio para molécula InI. Para os modificadores selecionados, as temperaturas de pirólise/vaporização foram, respectivamente, de 1100 °C / 2400 °C para Cal, 1200 °C / 2200 °C para Srl, 1300 °C / 2200 °C para Bal e 300 °C / 1300 °C para InI. Os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de fármacos e suplementos, sendo que os limites de detecção absolutos para os métodos variaram entre 20 ng para a molécula Srl a 60 ng para a molécula Bal. Os métodos descritos foram validados, com base na RDC 166/2017 da ANVISA para validação de métodos para fármacos e medicamentos.

ABSTRACT

This thesis reports the use of high-resolution continuum source atomic absorption spectrometers for the determination of iodine *via* molecular absorption spectrometry. The present work includes a bibliographic review on classic and current techniques for the determination of iodine, the identification of the bands of absorption of diatomic molecules of iodine performed by molecular simultaneous Echelle spectrograph and also the study of the best spectral regions for the monitoring of these molecules using a high-resolution continuum source atomic spectrometer, with its conditions optimized for CaI, SrI, BaI and InI molecules. Among these conditions, is the use of iridium as a permanent modifier for the CaI and SrI molecules, the use of platinum for the BaI molecule and the use of tungsten for the InI molecule. For the selected permanent modifiers, the pyrolysis temperatures were, respectively, 1100 °C / 2400 °C for CaI, 1200 °C / 2200 °C for SrI, 1300 °C / 2200 °C for BaI and 300 °C / 1300 °C for InI. The developed methods were applied to drug and supplement samples, and the absolute limits of detection for the methods ranged from 20 ng to 60 ng. The described methods were validated, based on RDC 166/2017 of ANIVSA legislation for method validation applied to drugs and medicines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Tabela periódica dos elementos e os respectivos espectros na região visível resumidos de emissão. Adaptado de tabelaperiódica.org³²..... 26
- Figura 2** Esquema do sistema adaptado utilizando um espectrógrafo MOSES: (1) Fonte de radiação, (2 e 4) espelhos elípticos, (3) atomizador, (5) fenda de entrada, (6) espelho ampliador (7) espelho parabólico fora do eixo (8) sistema de prismas Littrow, (9a e 9b) rede Echelle, (10) detector CCD. Adaptado de Geisler *et al.*³² 29
- Figura 3** Echelograma gerado utilizando um espectrógrafo MOSES para um padrão multielementar, antes do tratamento matemático *via* software..... 31
- Figura 4** Espectro na região visível, panorâmico obtido através do espectrógrafo MOSES utilizando 100 µg de iodo para: (a) molécula de CaI entre 534,46 nm e 715,76 nm (b) molécula de SrI entre 534,46 nm e 715,76 nm (c) molécula de BaI entre 534,46 nm e 715,76 nm (d) molécula de InI entre 383,44 nm e 414,11 nm. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 10 µg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente. 44
- Figura 5** Espectro na região visível, panorâmico ampliado obtido através do espectrógrafo MOSES utilizando 100 µg de iodo para: (a) molécula de CaI entre 637,12 nm e 642,10 nm (b) molécula de SrI entre 670,00 nm e 686,01 nm com 10 µg (c) molécula de BaI entre 534,46 nm e 539,01 nm (d) molécula de InI entre 397,99 nm e 406,01 nm. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 10 µg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente..... 45
- Figura 6** Espectro das moléculas diatômicas de iodo: (a) CaI - pixel central em 638,892 nm, gerado por 1,0 µg de iodo (em destaque as interferências presentes após correção por LSBC). T_{pyr} : 400 °C e T_{vap} : 2400 °C; (b) SrI - pixel central em 677,696 nm, gerado por 0,5 µg de iodo. T_{pyr} : 1100 °C e T_{vap} : 2100 °C; (c) BaI - pixel central em 538,304 nm, gerado por 0,5 µg de iodo. T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2200 °C; (d) InI - pixel central em 400,496 nm, gerado por 2 µg de iodo. T_{pyr} : 300 °C e T_{vap} : 2300

°C. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 100 µg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente..... 47

Figura 7 Estudo de interferências na região espectral das bandas de absorção de Cal. (a) espectro de Cal em 626,761 nm, gerado por 2 µg de iodo (b) Cal - pixel central em 638,892 nm, gerado por 0,5 µg de iodo (c) 100 µg de cálcio em 638,892 nm (d) Cal - pixel central em 638,892 nm, gerado por 0,5 µg de iodo em tubo de grafite revestido com irídio. Todos os espectros foram gerados utilizando 100 µg de cálcio como reagente formador. 48

Figura 8 Perfil do espectro da molécula CaH entre os comprimentos de onda de 638,5 nm a 639,3 nm a partir de 10 µg de cálcio em um tubo de grafite sem modificador permanente..... 50

Figura 9 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização para a molécula Cal, utilizando 2 µg de iodo e 100 µg de cálcio; para um tubo sem modificador (○), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2400 °C; para um tubo revestido com platina (▲), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2400 °C. Para um tubo revestido com irídio (Δ), T_{pyr} : 900 °C e T_{vap} : 2400 °C; para um tubo revestido em tungstênio (■), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2000 °C; e para um tubo revestido de zircônio (●), T_{pyr} : 1000 °C e T_{vap} : 2000 °C..... 51

Figura 10 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 µg de iodo para a formação de Cal, utilizando 400 µg de irídio como modificador permanente e pixel central em 638,892 nm..... 53

Figura 11 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização para a molécula Srl, usando 2 µg de iodo e 100 µg de estrôncio. Para um tubo sem modificador (○), T_{pyr} : 700 °C e T_{vap} : 2100 °C. Para um tubo revestido com platina (▲), T_{pyr} : 1000 °C e T_{vap} : 2100 °C. Para um tubo revestido com irídio (Δ), T_{pyr} : 1100 °C e T_{vap} : 2100 °C. Para um tubo revestido em tungstênio (■), T_{pyr} : 1200 °C e T_{vap} : 2100 °C. Para um tubo revestido com zircônio (●), T_{pyr} : 1200 °C e T_{vap} : 2100 °C. 55

Figura 12 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 µg de iodo para a formação de Srl, utilizando 400 µg de irídio como modificador permanente e pixel central em 677,696 nm.....	56
Figura 13 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para a molécula Bal, utilizando 10 µg de iodo e 100 µg de bário. Para um tubo sem modificador permanente (○), T _{pyr} : 1400 °C e T _{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido com platina (▲), T _{pyr} : 1400 °C e T _{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido de irídio (Δ), T _{pyr} : 1400 °C e T _{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido em tungstênio (■), T _{pyr} : 1400 °C e T _{vap} : 2100 °C; e para um tubo revestido de zircônio (●), T _{pyr} : 1400 °C e T _{vap} : 2200 °C.....	58
Figura 14 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 µg de iodo para a formação de Bal com pixel central em 538,304 nm.	60
Figura 15 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para a molécula InI, utilizando 2 µg de iodo e 100 µg de índio. Para um tubo sem modificador permanente (○), T _{pyr} : 300 °C e T _{vap} : 2200 °C. Para um tubo revestido com platina (▲), T _{pyr} : 500 °C e T _{vap} : 1800 °C. Para um tubo revestido com irídio (Δ), T _{pyr} : 300 °C e T _{vap} : 2200 °C. Para um tubo revestido em tungstênio (■), T _{pyr} : 300 °C e T _{vap} : 1400 °C. Para um tubo revestido com zircônio (●), T _{pyr} : 300 °C e T _{vap} : 1600 °C.....	62
Figura 16 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 µg de iodo para a formação de InI com center pixel em 400,472 nm.....	63
Figura 17 Estudo da influência da massa de cloro (a partir do sal KCl) para a formação da molécula diatômica de Cal (○), Srl (■), Bal (▲) e InI (●) com 100 µg de reagente formador de moléculas e 1 µg de iodo.	65
Figura 18 Gráfico de resíduos para as curvas de calibração externa com padrões aquosos de iodo e do respectivo reagente formador para a determinação de iodo <i>via</i> a) Cal; b) Srl; c) Bal e d) InI.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Programa de temperatura para o recobrimento da plataforma de grafite com irídio, platina, zircônio ou tungstênio. Vazão de gás em modo máximo (2 L min ⁻¹) durante todo o programa de temperatura.	41
Tabela 2	Condições otimizadas para a determinação de iodo via Cal, Srl, Bal e Inl por HR-GF-MAS.	42
Tabela 3	Programa de temperatura para a obtenção do espectro geral das moléculas Cal, Srl, Bal e Inl. Vazão de gás em modo máximo (2 L min ⁻¹) exceto na etapa de vaporização quando a vazão de gás foi interrompida.	43
Tabela 4	Energias de dissociação (em kJ mol ⁻¹) de moléculas diatômicas, a 298 K ⁹	68
Tabela 5	Dados analíticos do mérito para a determinação de iodo via Bal, Cal, Inl e Srl em amostras de suplementos de iodo e levotiroxina usando HR-GF-MAS.	74
Tabela 6	Valores de t calculado obtidos à partir do coeficiente linear das curvas de calibração externas aquosas para iodo <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal e Inl.	76
Tabela 7	Limites de detecção calculados a partir de 10 leituras do branco da amostra utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl. Valores calculados para 0,3 g de amostra.	77
Tabela 8	Faixa de trabalho (massa de iodo absoluta, em nanogramas) para as curvas de calibração externas aquosas para iodo utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.	78
Tabela 9	Desvio padrão relativo calculado para as replicatas das amostras de iodo utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.	80

Tabela 10	Desvio padrão relativo calculado para as replicatas de padrão aquoso de iodo utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl, obtidos por diferentes analistas em dias distintos.	81
Tabela 11	Porcentagem de recuperação das concentrações fortificadas de iodo em amostra de levotiroxina e de suplemento de iodo, utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.	83
Tabela 12	P-valor (p) para o teste de hipóteses para a verificação do paralelismo entre as curvas de calibração para padrão aquosos de iodo (m) e em amostra fortificada de levotiroxina ou de suplemento de iodo (n), utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.	87
Tabela 13	Teste de robustez para os métodos desenvolvidos utilizando HR-GF MAS <i>via</i> moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl. Os parâmetros foram avaliados em um nível abaixo do otimizado (-1), um nível acima (+) e comparado com os resultados obtidos para o parâmetro otimizado. Resultados normalizados em relação ao obtido com os métodos propostos.	88
Tabela 14	Determinação de iodo <i>via</i> Cal, Srl, Bal e Inl em amostras de suplementos de iodo e levotiroxina usando HR-GF-MAS e análise de amostra direta com calibração contra padrões aquosos. Os valores representam a média de cinco medidas \pm SD, n = 5.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Dispositivo de carga acoplada (*charge coupled device*)

HR-CS AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (*high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*)

HR-MAS: Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (*high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry*)

HR- GF MAS: Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (*high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry*)

ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP OES: Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optic emission spectrometry*)

IFA: Insumo farmacêutico ativo

ISAS: Instituto de Espectroquímica e Espectroscopia aplicada (*Institute for Spectrochemistry and Applied Spectroscopy*)

LOD: Limite de detecção (*limit of detection*)

LOQ: Limite de quantificação (*limit of quantification*)

LS AAS: Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (*line source atomic absorption spectrometry*)

LSBC: Correção de fundo por algarismos de mínimos quadrados (*least square background correction*)

MOSES: Espectrógrafo Echelle simultâneo molecular (molecular simultaneous Echelle spectrograph)

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

T_{pir}: Temperatura de pirólise

T_{vap}: Temperatura de vaporização

UV-VIS: Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	Métodos para a determinação de iodo	21
2.2	Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua.....	25
2.3	Espectrógrafo modular simultâneo Echelle (MOSES) acoplado a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua	28
2.4	Dificuldades encontradas no desenvolvimento de métodos para a determinação de halogênios por HR-MAS.....	32
2.5	Mecanismo de ação dos modificadores químicos permanentes para átomos e moléculas.....	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivos específicos	38
4	EXPERIMENTAL.....	39
4.1	Instrumentação.....	39
4.2	Materiais e reagentes.....	40
4.3	Recobrimento da plataforma de grafite	40
4.4	Preparo da amostra.....	41
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.6	Seleção dos comprimentos de onda	43

4.7	Programa de temperatura e modificadores químicos permanentes	47
4.7.1	Molécula Cal.....	48
4.7.2	Molécula de Srl.....	54
4.7.3	Molécula de Bal	57
4.7.4	Molécula de Inl	61
4.8	Estudo de interferências.....	64
4.9	Discusões sobre a energia de dissociação das moléculas	67
4.10	Validação do Método	71
4.10.1	Linearidade.....	71
4.10.2	Limites de quantificação e detecção.....	76
4.10.3	Faixa de trabalho.....	78
4.10.4	Precisão	79
4.10.5	Exatidão	81
4.10.6	Efeito Matriz	84
4.10.7	Robustez	85
4.11	Aplicação do método.....	86
5	CONCLUSÕES	92
6	REFERÊNCIAS.....	94
7	ANEXO I.....	104
8	ANEXO II.....	105

9	ANEXO III.....	106
10	ANEXO IV	114
11	ANEXO XI	115

1 JUSTIFICATIVA

A determinação direta de halogênios por espectrometria de absorção atômica convencional não é possível, pois as linhas de ressonância destes elementos encontram-se abaixo de 190 nm, na região do ultravioleta de vácuo. Uma vez que o oxigênio atmosférico tem bandas de absorção nesta mesma região, torna a análise suscetível a limitações instrumentais, sendo necessário um instrumento com sistema de purga, indisponível comercialmente¹. Como alternativa para as linhas de ressonância, é possível fazer a determinação indireta por meio do monitoramento das bandas de absorção de moléculas diatômicas formadas pelo halogênio a ser estudado e um reagente formador, geralmente um elemento metálico, adicionado em excesso. A molécula diatômica, formada na fase gasosa, tem a capacidade de absorver radiação na região ultravioleta e visível do espectro eletromagnético e, assim como a absorvância de átomos, está diretamente relacionada à concentração da mesma, obedecendo a lei de Lambert-Beer².

Entre os anos de 1980 e 1990, alguns pesquisadores propuseram o uso de instrumentos para espectrometria de absorção atômica equipados com fonte de linha (LS-AAS), utilizando comprimentos de onda coincidentes às bandas de absorção de moléculas diatômicas para a determinação de não metais como enxofre, fósforo e halogênios³. Contudo, este método estava sujeito a interferências, uma vez que a vizinhança espectral era desconhecida e os sistemas de correção de fundo não se mostravam adequados. Além disto, o sistema de monocromador de baixa resolução (com resolução espectral em torno de 0,1 nm) dos instrumentos LS-AAS não eram capazes de separar corretamente a estrutura fina das bandas de absorção molecular.

Com o advento dos espectrômetros de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), a determinação de halogênios via moléculas diatômicas se tornou possível devido ao sistema de duplo monocromador (resolução maior que 2 pm/píxel) capaz de promover uma melhor separação das linhas de absorção; uma

lâmpada de arco curto de xenônio capaz de emitir um contínuo espectral de alta intensidade entre 190 nm a 890 nm; e um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) que permite a visualização da vizinhança espectral através de um espectro tridimensional em função do tempo, da absorvância e do comprimento de onda ⁴.

Essas características instrumentais tornaram a determinação dos halogênios possível, atingindo baixos valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) quando comparados com técnicas eletroquímicas ou métodos clássicos ^{5,6}. Atualmente, vários artigos descrevem métodos para a determinação indireta via espectrometria molecular de flúor, cloro e bromo utilizando diferentes metais como reagentes formadores capazes de formar moléculas diatômicas com o halogênio em altas temperaturas, fornecidas por um atomizador eletrotérmico (HR-GF MAS) ou de chama³.

Embora sejam reportados diversos métodos para a determinação de flúor, cloro e bromo por HR-GF MAS ³, não há um número expressivo de publicações sobre a determinação de iodo utilizando esta técnica. A razão da dificuldade encontra-se na baixa energia de dissociação das moléculas diatômicas formadas por este halogênio, menores que 500 kJ mol⁻¹, o que torna a molécula instável em temperaturas altas em termos de pirólise/vaporização comparadas com os programas de temperaturas aplicados para outros halogênios por HR-GF MAS. A presença de outros halogênios leva a competição pelo reagente formador e acarreta em uma redução relevante da sensibilidade, dificultando a calibração externa ou, em casos em que a presença de outros halogênios é mais acentuada, impedindo a própria geração da molécula ^{7,8}.

Algumas moléculas, apesar da baixa energia de dissociação, apresentam certa estabilidade térmica ⁹. Huang *et al.* ¹⁰ publicaram um trabalho no qual descrevem a determinação de iodo *via* Bal por HR-GF MAS em medicamentos. Além do estudo de diversos comprimentos de onda para o monitoramento desta molécula e estudos sobre o uso de modificadores permanentes. Uma outra publicação de Zannata *et al.*⁷ descreve o uso das moléculas Srl e Cal para a

determinação de iodo em medicamentos, utilizando a mistura de paládio e magnésio como modificador químico em solução. Até o presente momento, estes são os dois únicos trabalhos utilizando HR-GF MAS para a determinação de iodo.

A tese apresentada neste documento descreve os estudos realizados sobre as moléculas diatômicas Cal, Srl, Bal e Inl, suas principais regiões de absorção, seu comportamento térmico na presença de modificadores permanentes e as melhores condições de temperaturas e concentração do reagente formador. Também são descritos um estudo da influência de outros halogênios como interferentes, os parâmetros de mérito obtidos para cada molécula e a determinação de iodo em suplemento e fármaco, utilizando apenas a diluição em 1-propanol *via* Cal, Srl, Bal e Inl.

Como parte deste documento, encontra-se em anexo os artigos publicados em periódicos científicos durante o período compreendido entre 2016 e 2020 (Anexos I a IX), os títulos dos projetos em andamento (Anexo X), além do relatório final do doutorado sanduíche, que trata sobre cinco projetos executados na University of Aberdeen durante período de junho de 2018 a dezembro de 2018 (Anexo XI). Estes projetos descrevem a utilização de diferentes técnicas analíticas, combinadas ou não, para a determinação de metais, halogênios e organohalogenados em diferentes amostras ambientais. “Resultados obtidos no período do estágio probatório foram anexados à tese na forma do relatório final apresentado ao CNPq. Todos os trabalhos desenvolvidos no “período sanduíche” foram obtidos em colaboração com outros pesquisadores, estes resultados foram associados e usados por outros autores e não foram considerados como resultados diretos desta tese de doutorado mas sim como trabalhos científicos que corroboraram com a experiência adquirida no doutoramento desta proponente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos para a determinação de iodo

O iodo é um elemento de baixa abundância no meio ambiente, sendo apenas 0,000061% da composição da crosta terrestre¹, além de ser distribuído de forma muito heterogênea, uma vez que a maior parte de sua massa se encontra no oceano. O ciclo do iodo inicia-se quando o iodeto ao oxidar forma iodo elementar, espécie volátil que evapora para a atmosfera e volta ao solo quando há precipitação, finalizando o ciclo ¹¹. Porém, em áreas não litorâneas, esse ciclo não é suficiente para suprir as necessidades nutricionais dos seres humanos, sendo necessária a suplementação.

Das formas mais comuns de se suplementar iodo, está o sal iodado e os óleos iodados ¹². Além destes alimentos enriquecidos, pães, ovos, peixes, leites e derivados também são excelentes formas de ingestão desse mineral essencial ¹³. A suplementação por forma de comprimidos e tabletes também é eficiente e popular, com diversas marcas disponíveis no mercado brasileiro e também no exterior, que vão desde complexos multivitamínicos contendo o mineral até a cápsulas com iodeto de potássio em óleo vegetal.

Para garantir que boa parte da população brasileira consiga suprir os 150 µg de iodo por dia, indicado para adultos ¹⁴, no Brasil, o sal é o alimento escolhido para receber a iodação (operação de enriquecimento com iodato de potássio), pois é um alimento barato, de fácil acesso e uma vez enriquecido, provém quantidades de consumo compatíveis com as necessidades diárias de iodo. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece a obrigatoriedade da iodação do sal comercializado para consumo humano entre 15 mg kg⁻¹ a 45 mg kg⁻¹ a fim de se evitar os malefícios de uma ingestão de quantidades diárias insuficientes deste mineral. A iodação do sal é de extrema importância, pois a população brasileira é distribuída não apenas no litoral, mas em toda sua porção continental, embora com menor densidade demográfica ¹⁵.

O déficit de iodo no organismo pode causar problemas hormonais ligados a tireoide como hipotireoidismo e bócio ¹¹, em gestantes pode ocasionar nascimentos prematuros, abortos e má formação fetal ¹². A falta deste mineral também pode causar perda de memória, descamação na pele, alteração no gosto e odor da saliva ¹⁶. A falta de iodo no organismo normalmente não é identificada em indivíduos, já que não há uma forma de medir, diretamente, se a quantidade no organismo é suficiente ¹⁴. A estratégia adotada por órgãos governamentais ligados à saúde pública é analisar uma população, observando e medindo os níveis de iodo na urina, associado à concentração de creatinina ¹⁷. Para seres humanos saudáveis, este valor deve estar acima de 100 µg L⁻¹ ou 150 µg L⁻¹ para gestantes ¹⁴.

Em geral, dos métodos analíticos clássicos para a determinação de iodo, o mais simples envolve a titulação colorimétrica ¹⁸, apresentando faixas de trabalho entre 2 mg L⁻¹ a 20 mg L⁻¹. Métodos catalíticos associados a fotometria, uma vez que o iodo forma complexos coloridos ^{19,20} também foram amplamente empregados em laboratórios de rotina. Por muitos anos estes métodos catalíticos foram considerados o “estado-da-arte”, por conseguir detectar e quantificar concentrações relativamente baixas de iodo quando comparados aos de titulação colorimétrica. Porém, estes métodos exigem diversos reagentes, alguns bastante tóxicos, o que torna a análise laboriosa, perigosa e passível de contaminação. Com a evolução das técnicas de análise instrumental, outros métodos foram sendo desenvolvidos para a determinação de iodo, como a utilização de eletrodo seletivo ²¹ e a análise por ativação de nêutrons ²². Estes métodos embora alcancem limites de detecção considerados baixos, são altamente suscetíveis a interferências.

Clinicamente, os métodos para a determinação de iodo na urina são a digestão ácida seguida de titulação colorimétrica. A reação de Sandell-Koltoff que utiliza uma digestão ácida branda seguida de uma redução catalítica de sulfato de amônio e cério na presença de ácido arsênico, embora utilize reagentes de alta toxicidade, apresenta alta sensibilidade para um método colorimétrico, e foi amplamente utilizada em diversos estudos sobre a concentração de iodo na urina.

Hoje, laboratórios mais modernos utilizam a técnica de ICP-MS para o estudo de grandes populações ¹⁷.

As técnicas de cromatografia iônica e ICP-MS são atualmente o estado-da-arte no que diz respeito à determinação de iodo. Bichsel *et al.*²³ empregaram a cromatografia iônica com reação em pós-coluna e detecção por UV-VIS para a determinação de iodeto e iodato em água mineral, alcançando um limite de detecção de 0,1 µg L⁻¹. Já para ICP-MS, Todorov *et al.* ²⁴ alcançaram limites de quantificação de 36 ng g⁻¹ na determinação de iodo em alimentos e Mesko *et al.*²⁵ conseguiram alcançar limites de detecção de 2 ng g⁻¹ utilizando como técnica de preparo de amostra a combustão induzida por micro-ondas. Embora os limites de detecção e quantificação alcançados por cromatografia iônica sejam baixos quando comparada a outras técnicas clássicas e instrumentais, assim como os baixos custos de operação e aquisição deste instrumento, quando comparados aos instrumentos de ICP-MS, esta técnica geralmente exigem um preparo de amostra laborioso e baixa robustez²³.

Os limites de detecção e quantificação dos métodos desenvolvidos para a determinação de iodo por ICP-MS são considerados baixos quando comparados com outras técnicas para a determinação deste elemento. Porém, a técnica apresenta algumas limitações. O principal preparo de amostras utilizado em conjunto com ICP-MS, a digestão assistida por micro-ondas, não pode ser utilizada para a determinação de halogênios, uma vez que em meio ácido e em altas temperaturas, há a formação de HX (X = F, Cl, Br, I) , volátil, ocorrendo a perda do analito. Outra desvantagem encontra-se no preço operacional e de aquisição dos instrumentos de ICP-MS. Uma alternativa a instrumentação de ICP-MS é o uso de espectrômetros de absorção atômica para o monitoramento indireto de halogênios, pela técnica de HR-MAS.

Comparando os resultados obtidos através destas duas técnicas, podemos citar os trabalhos de Jamari *et al.*²⁶ e Ozbek *et al.*²⁷. Jamari *et al.* utilizaram a molécula de BaF para a determinação indireta de flúor, uma vez que a alta energia

de ionização deste elemento não permite seu monitoramento utilizando uma razão massa/carga positiva. Já a molécula BaF gerada no plasma é ionizada de forma mais eficaz. Porém, a população destas moléculas é baixa, de forma que o limite de detecção e quantificação alcançados são altos quando comparado aos resultados obtidos para outros elementos em ICP-MS; aproximadamente $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Ozbek *et al.*²⁷ usaram as bandas de absorção molecular de CaF para quantificar flúor em leite por HR-GF MAS, com LOD absoluto de $26 \mu\text{g L}^{-1}$.

Gois *et al.*²⁸ compararam as técnicas HR-GF MAS e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e ablação a laser (LA-ICP-MS) para a determinação de bromo, por meio da análise direta de sólidos em amostras de polímeros. Os LODs alcançados por HR-GF MAS foram 10 vezes menores dos que os obtidos por LA-ICP-MS.

Pereira *et al.*²⁹ desenvolveram um método simples para a determinação de cloro em amostras de óleo de peixe via SrCl, obtendo LOD de $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto Antes *et al.*³⁰ utilizaram a vaporização eletrotérmica acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado para a análise direta de coque de petróleo, alcançando limites de detecção de $3,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Embora sejam amostras diferentes, ambas podem ser comparadas pois possuem matriz viscosa e de difícil eliminação.

A comparação entre as técnicas de HR-MAS e ICP-MS é interessante pelo fato que estas instrumentações são normalmente são apontadas como “concorrentes”, uma vez que estas são atualmente duas das principais técnicas para a determinação de metais e metaloides. O desenvolvimento de métodos para a determinação de halogênios fez parte do caminho destas técnicas no meio científico, na busca de uma instrumentação capaz de ser aplicada em uma maior extensão da tabela periódica. Porém a técnica de ICP-MS com plasma de argônio apresenta dificuldade quanto a determinação de halogênios (principalmente flúor), pois o plasma não possui energia o suficiente para produzir íons positivos destes elementos em abundância³¹.

2.2 Espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua

Espectrômetros de absorção atômica são instrumentos comercialmente disponível desde a década de 50, com centenas de publicações acerca de métodos para a maioria dos metais e metaloides¹. Desde o princípio da técnica, os espectrômetros contam com uma fonte de radiação; um atomizador, que produzirá a nuvem atômica; um sistema de monocromador, que irá separar o comprimento de onda a ser monitorado dos demais; e um sistema de detecção. A razão entre a radiação transmitida e a radiação incidida sob a amostra é chamada de transmitância, cuja relação logarítmica (absorvância) é a medida associada à concentração do analito na amostra, de acordo com a lei de Lambert-Beer.

O fundamento teórico da técnica vem do princípio de que átomos no estado fundamental, em sua forma gasosa, absorvem radiação em comprimentos de onda discretos, referentes à natureza do elemento e da transição eletrônica referente a esta absorção. O espectro de emissão/absorção de um elemento está intrinsecamente ligado à sua estrutura eletrônica, podendo ter transições permitidas e espectros que abrangem vários pontos da região do UV-VIS (Figura 1). Dentre as transições permitidas, as que relacionam o estado fundamental ao próximo estado de mais baixa energia, são chamadas de “linhas de ressonância”, sendo comumente as de maior intensidade, uma vez que é a transição que ocorre mais facilmente devido a grande população de átomos no estado fundamental e a baixa energia necessária para que a transição aconteça.

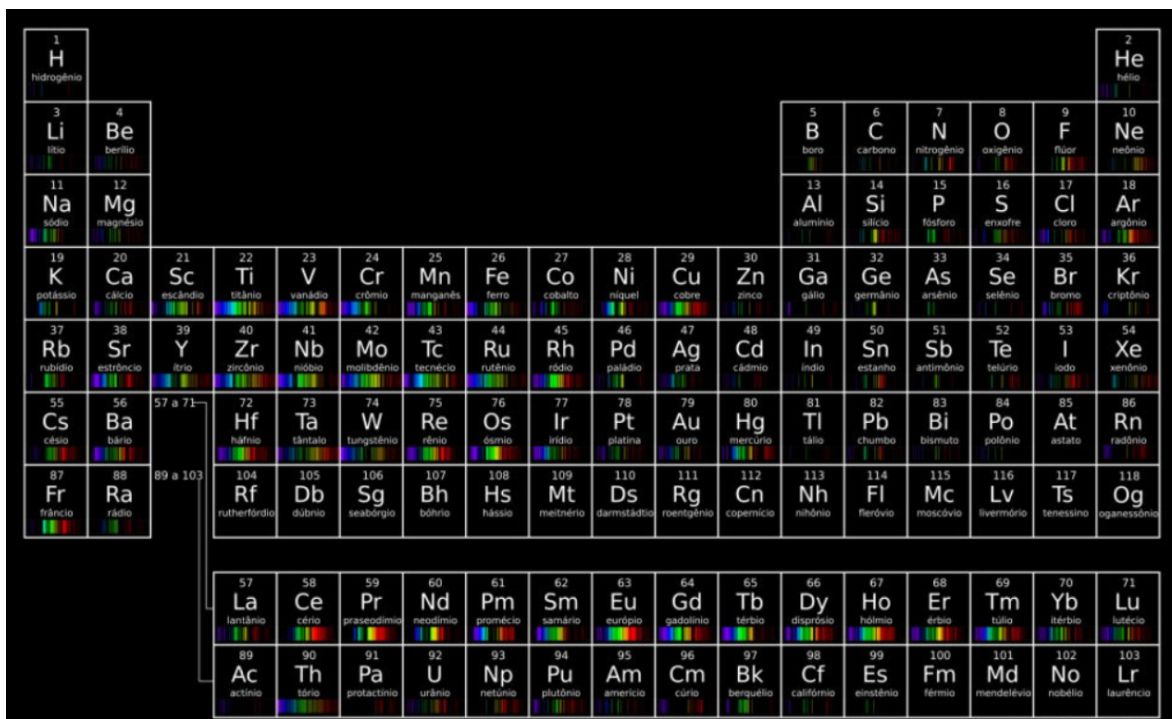


Figura 1 Tabela periódica dos elementos e os respectivos espectros na região visível resumidos de emissão. Adaptado de tabelaperiódica.org³².

A maioria dos metais e metaloides possuem suas linhas de ressonância na região do UV-VIS. Porém, alguns elementos possuem limitações quanto a disponibilidade de linhas de ressonância na região do UV-VIS, como os halogênios, que têm suas linhas de ressonância na região do UV de vácuo. Como discutido anteriormente, essas linhas sofrem forte influência das moléculas de oxigênio, que absorvem radiação nesta região, impedindo a determinação direta devido a limitações instrumentais, uma vez que não é possível purgar estas moléculas ou corrigir esta absorção concomitante. As demais linhas de absorção dos halogênios, na região do UV-VIS possuem baixa intensidade, impossibilitando o monitoramento de uma linha secundária.

A utilização das bandas referentes a transições rotacionais de moléculas diatômicas tomou possível para a determinação indireta de elementos como enxofre, fósforo e halogênios utilizando espectrômetros de absorção atômica. Os primeiros trabalhos surgiram na década de 80, com os trabalhos de Dittrich *et al.*³³

apresentando o uso de equipamentos LS-AAS para a quantificação indireta de halogênios pelo monitoramento de moléculas diatômicas através de algumas poucas linhas de emissão de elementos metálicos que coincidem com as bandas de absorção das moléculas estudadas ^{4,34}. Embora de caráter bastante inovador, o fato de usar linhas de emissão coincidentes, e não as de maior intensidade, ou mesmo as regiões com menor risco de interferências, tornava a técnica de difícil execução ⁴.

O uso dos espectrômetros de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, no começo dos anos 2000 possibilitou a real aplicabilidade da espectrometria de absorção molecular (HR-MAS) ³, uma vez que estes instrumentos possuem uma fonte de radiação que emite um contínuo espectral de 190 nm a 890 nm, um sistema de duplo monocromador capaz de fornecer uma alta resolução (> 2 pm) e um detector CCD capaz de fornecer uma visão tridimensional da vizinhança espectral ⁴, é possível através da adição de um reagente formador, gerar uma molécula diatômica com o analito ². Das vantagens da técnica, destaca-se o baixo custo operacional e de aquisição de instrumentos de HR-CS AAS, quando comparados a instrumentos de ICP-MS e ICP OES; a robustez instrumental; a capacidade de análise com o mínimo de preparo da amostra; e a alta frequência analítica, principalmente quando comparado a métodos cromatográficos. Os limites de detecção e quantificação para a maioria dos analitos determinados por HR-MAS são comparáveis com os alcançados em ICP OES ^{4,35,36}.

Os instrumentos de HR-CS AAS apresentam algumas possibilidades interessantes, como a determinação da maioria dos metais e metaloides; a combinação com a técnica de geração química de vapor; a determinação simultânea e/ou sequencial de alguns grupos de elementos específicos; determinação indireta de halogênios e não-metals por meio do monitoramento de moléculas diatômicas; além de modernos sistemas de correção de fundo, como a correção automática de eventos contínuos, a correção resolvida por tempo e a correção utilizando um algoritmo dos mínimos quadrados.

2.3 Espectrógrafo modular simultâneo Echelle (MOSES) acoplado a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

Embora os instrumentos modernos de HR-CS AAS ofereçam uma alta resolução para o monitoramento da absorção de átomos e moléculas, a janela espectral oferecida por estes sistemas abrange de 0,2 – 1,00 nm do espectro, dependendo da região observada. Isto se deve ao limitado número de pixels dedicados a fins analíticos (200 pixels dos 588 pixels disponíveis nos instrumentos comerciais), fazendo com que a varredura de uma determinada região do espectro UV-VIS ou mesmo a determinação simultânea de elementos seja bastante difícil. A determinação simultânea utilizando instrumentos de HR-CS AAS está restrita a algumas combinações de 2, 3 ou 4 elementos, que coincidentemente possuem linhas de absorção em um pequeno intervalo espectral. Contudo, dentro dessa janela, os resultados obtidos são confiáveis uma vez que o espectro é bem resolvido ($\lambda/\Delta\lambda \approx 55000$)³⁷.

A limitação da janela espectral em instrumentos de HR-CS AAS dificulta não apenas a determinação multielementar, mas também qualquer tipo de varredura do espectro UV-VIS. Uma visão panorâmica é necessária toda vez que se vai desenvolver um método para HR-MAS que utilize um comprimento de onda ainda não reportado na literatura. Para átomos, isto não é um problema uma vez que suas principais linhas estão bem documentadas, inclusive em bibliotecas de domínio público. Esta limitação vem à tona durante o desenvolvimento de métodos envolvendo a determinação indireta pelo monitoramento de moléculas, uma vez que não há a mesma abundância de informações sobre as bandas de absorção da miríade de moléculas que podem vir a ser estudadas. Mesmo que alguns livros indiquem as regiões onde as bandas de absorção das moléculas de interesse sejam mais intensas, estes valores são teóricos e/ou a baixas temperaturas, apresentando desvios dos valores de comprimento de onda estimados em relação aos comprimentos de onda encontrados experimentalmente³⁸.

Uma varredura, mesmo que em um curto espaço do espectro eletromagnético, utilizando uma janela espectral de 0,2 nm – 1,0 nm oferecida pelos instrumentos de HR-CS AAS, demanda tempo e esforço do analista. A solução para este entrave é a utilização de um sistema que promova uma maior visão espectral sem a perda da resolução.

A associação de um espectrógrafo Echelle com um instrumento de HR-CS AAS foi descrito por Geisler et al.³⁹ O equipamento inicialmente foi construído utilizando um protótipo baseado em um espectrômetro convencional alterando sua fonte de radiação para uma lâmpada de xenônio ativada por laser e o caminho óptico alterado para transmitir a radiação a um espectrógrafo modular simultâneo Echelle (MOSES).

O MOSES consiste em um espectrógrafo Echelle e um sistema de monocromador que opera com o menor número de componentes ópticos e partes móveis possíveis, contendo apenas uma fenda de entrada, um único detector e um poucos espelhos³⁹, conforme a Figura 2.

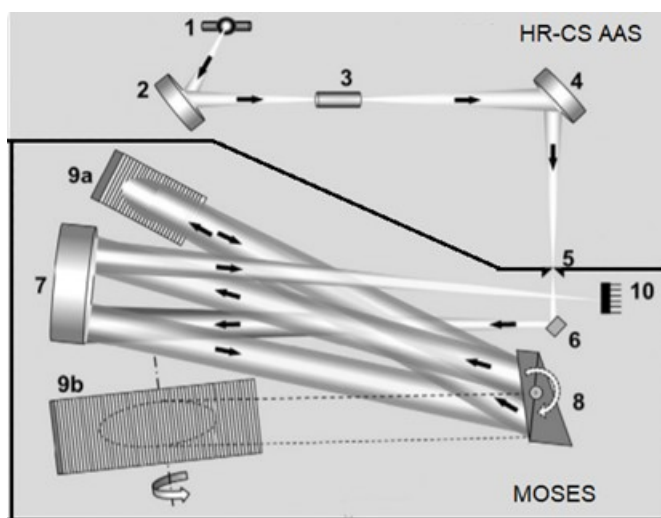


Figura 2 Esquema do sistema adaptado utilizando um espectrógrafo MOSES: (1) Fonte de radiação, (2 e 4) espelhos elípticos, (3) atomizador, (5) fenda de entrada, (6) espelho amplificador (7) espelho parabólico fora do eixo (8) sistema de

prismas Littrow, (9a e 9b) rede Echelle, (10) detector CCD. Adaptado de Geisler *et al.*³²

O principal componente é o sistema de prismas, montado com dois prismas Litrow, que primariamente funciona de forma similar ao prisma Littrow encontrado nos sistemas de duplo monocromadores (DEMON). Contudo, o segundo prisma, fabricado de um material diferente do primeiro, permite alternar de uma visualização em modo panorâmico para modo zoom, direcionando a radiação não apenas a rede Echelle primária (zoom), mas também a secundária (panorama). Essa configuração promove alta resolução de amplo alcance espectral. Em um primeiro momento, o instrumento foi montado utilizando um detector comercial com 2048 x 512 pixels, conforme descrito no artigo publicado em 2015³⁹, cobrindo uma área do espectro de 190 nm a 393 nm, dividido em quatro segmentos, com uma resolução $\lambda/\Delta\lambda \approx 55000$. Durante os anos subsequentes, este sistema passou por aprimoramentos e atualmente utiliza um espectrômetro de HR-CS AAS com o caminho óptico alterado por um espelho vazado, na qual metade da radiação é encaminhada ao sistema DEMON do HR-CS AAS e outra metade enviada ao espectrógrafo MOSES.

No artigo mais recente do grupo, Huang *et al.*⁴⁰ utilizou uma rede Echelle adicional para cobrir o espectro de 380 nm – 735 nm, além dos 190 nm – 393 nm cobertos pelo arranjo anterior. Novos estudos com um novo detector estão sendo realizados, e toda a região entre 195 nm a 922 nm poderá ser monitorada, em quatro segmentos. Os resultados deste novo aprimoramento podem ser vistos neste documento e no artigo derivado desta tese de doutorado⁸. Porém, até a atual data, não há nenhum artigo descrevendo especificamente este arranjo.

Embora este sistema seja de grande interesse científico, não há previsão de quando sairá da condição de protótipo e será produzido comercialmente. Além de problemas envolvendo instabilidade do sistema, ainda não foi desenvolvido nenhum software de interpretação dos resultados para que possa ser operado por um usuário comum. Na Figura 3 é possível observar o echelograma gerado por um padrão multielementar, onde cada uma das falhas nas linhas avermelhadas é

referente a uma linha de absorção dos átomos presentes na amostra. Transformar esta imagem em dados passíveis de serem interpretados pelo analista demanda uma alta capacidade de processamento, tornando a tarefa difícil de ser executada em um computador convencional.

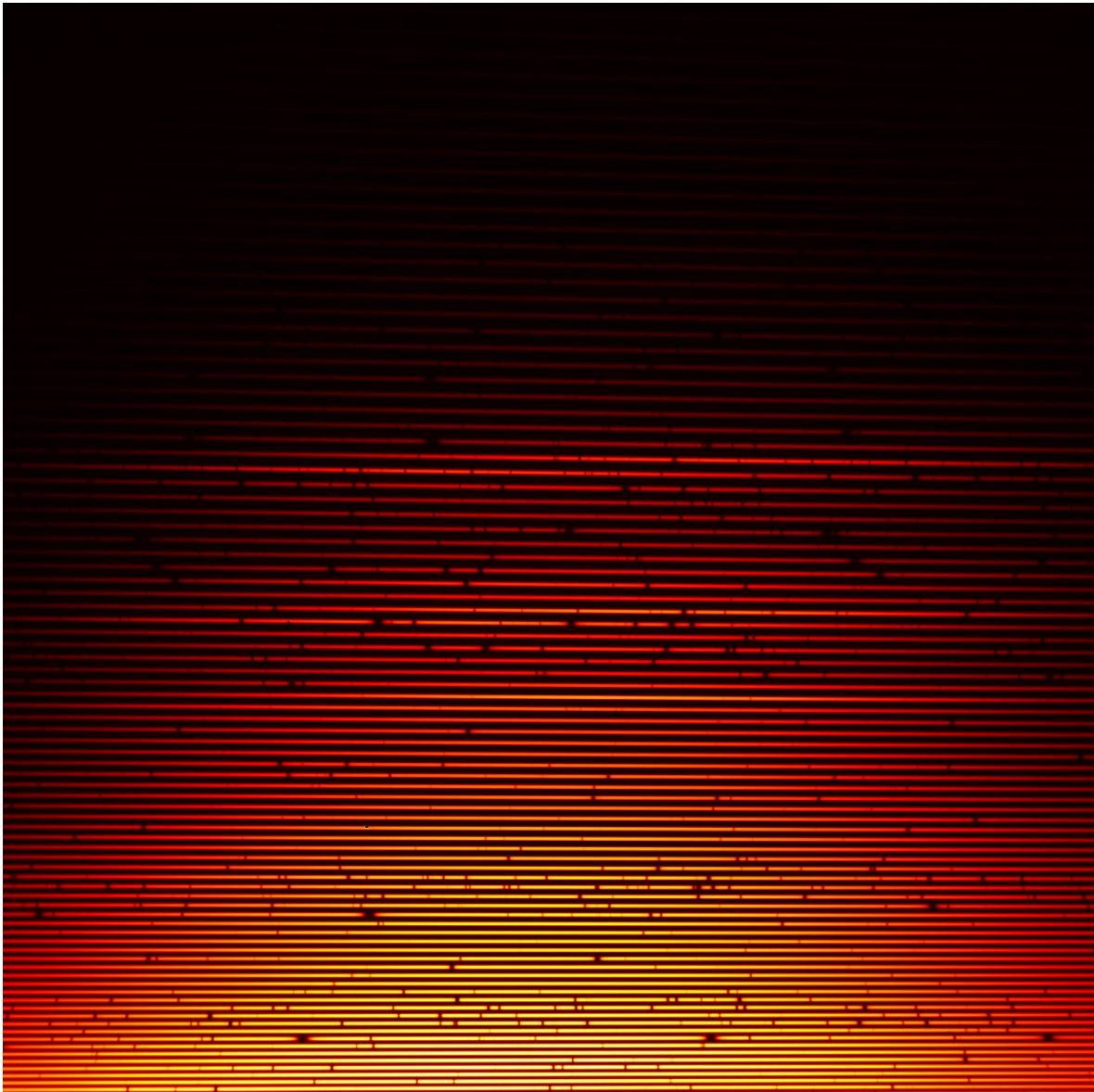


Figura 3 Echelograma gerado utilizando um espectrógrafo MOSES para um padrão multielementar, antes do tratamento matemático *via* software.

2.4 Dificuldades encontradas no desenvolvimento de métodos para a determinação de halogênios por HR-MAS

Além da limitação referente a localização das linhas primárias de absorção/emissão atômica dos halogênios, a presença de elementos que competem ou mesmo inibem a formação da molécula a ser monitorada pode trazer não apenas uma redução na intensidade do sinal analítico, mas também a perda da exatidão do método desenvolvido. Nakadi *et al.* ⁴¹ utilizaram calibração por diluição isotópica na determinação de bromo *via* CaBr a fim de evitar uma perda na exatidão, ao utilizar calibração aquosa, uma vez que a presença de cloro na amostra causava uma redução significativa na sensibilidade. Cadorim *et al.* ⁴² utilizaram calibração por semelhança de matriz para a determinação de flúor em concentrado de cobre *via* molécula de CaF por HR-GF MAS.

A exatidão de um método em HR-MAS está diretamente relacionada com a capacidade do mesmo em eliminar concomitantes capazes de interagir com o reagente formador e diminuir a eficácia na formação da molécula diatômica do analito, ou mesmo utilizar mecanismos para contornar este problema. Uma forma seria a limpeza da amostra ou mesmo, a extração e pré-concentração do analito, utilizando métodos de preparo de amostra. Esta abordagem não é a mais usual em espectrometria de absorção atômica e molecular uma vez que, na grande maioria dos casos, a etapa de pirólise é suficiente para eliminar a maioria dos concomitantes. Já as interferências espectrais causadas por concomitantes que não são passíveis de serem eliminados através da otimização do programa de temperaturas podem ser contornadas pela utilização de linhas secundárias ou mesmo por meio da correção de fundo por algoritmo de mínimos quadrados.⁴

O preparo da amostra tem como finalidade a adequação da amostra ao equipamento a ser utilizado, remoção de interferentes e, quando necessário, a pré-concentração do analito. Para o uso de espectrometria de massas e métodos cromatográficos, o preparo da amostra é essencial, uma vez que estes instrumentos são pouco tolerantes a excesso de concomitantes, sólidos dissolvidos e matrizes

incompatíveis, causando não apenas redução da exatidão do método, mas também a redução da vida útil de algumas partes do equipamento, demandando uma maior frequência de manutenção. Por outro lado, a etapa de preparo de amostras costuma ser a etapa crítica de uma análise química, uma vez que é a etapa que requer maior tempo do analista⁴³.

Em HR-CS AAS e HR-MAS, é possível aplicar a análise direta para quase todo tipo de material, evitando, em muitas vezes, um preparo de amostra mais laborioso. Porém, a análise direta exige equipamento apropriado (microbalanças, pinças ou amostradores automáticos e instrumentos adaptados para esse tipo de acessório). Além das exigências instrumentais, a amostra deve ser finamente moída de forma a produzir uma massa com alta homogeneidade. Amostras heterogêneas resultam em uma baixa repetibilidade, uma vez que cada parte da amostra inserida no forno não é representativa de um todo ⁴⁴.

Das abordagens mais comuns para o preparo de amostra para análise elementar, estão a digestão assistida por micro-ondas, a digestão em bloco e a utilização de banhos de ultrassom⁴⁵. Para a determinação de halogênios, não é possível utilizar a digestão ácida, uma vez que neste meio, sob altas temperaturas, ocorre a formação de vapor do ácido do analito na forma de HX, causando a perda do mesmo. Por isto, a abordagem mais comum quanto ao preparo de amostras para a determinação de halogênios é a combustão induzida por micro-ondas⁴⁶ e diluições, de forma a adequar amostras viscosas ao amostrador automático^{29,47}. Porém, quando há interferência na formação da molécula diatômica do analito, os métodos de preparo de amostra mencionados não são capazes de eliminar ou mesmo diminuir a influência dos demais halogênios sob a formação da molécula diatômica do analito. Neste caso, um preparo de amostra capaz de isolar o halogênio de interesse ou mesmo remover os demais halogênios da matriz se faz necessário.

Separar o iodo dos demais halogênios pode ser uma tarefa complicada. Poucos métodos para isolar este elemento foram descritos. Yeh *et al.*⁴⁸ utilizaram

uma série de procedimentos para a extração do iodo de amostras de alga marinha, que envolvem a calcinação da amostra, complexação e extração do iodo para uma fase orgânica. Segundo o artigo, o método utilizado é capaz de complexar e extrair apenas o iodeto e o brometo presentes na amostra, desta forma, reduziria a interferência causada pelos halogênios mais abundantes: flúor e cloro. A associação da geração fotoquímica de vapor com a HR-MAS também não foi explorada até o presente momento. O artigo de Grinberg *et al.*⁴⁹ descreve a determinação de iodo por geração fotoquímica associada a técnica de ICP-MS e neste estudo, foi observado que diferentes ácidos e frequências de radiação produzem vapores de halogênios de forma seletiva, separando o iodo dos demais halogênios presentes na matriz. Alguns produtos comerciais prometem a extração seletiva de halogênios, como a resina de troca aniônica *Clean ION-exchange*⁵⁰, que, segundo o fornecedor, é capaz de remover apenas os íons cloreto e íons potássio da amostra, fazendo a limpeza da mesma e reduzindo a interferência causada pela competição entre os cloreto e iodeto pelo reagente formador em HR-MAS.

Dentre as alternativas para a redução de interferências, quando se trata de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a estratégia mais utilizada e amplamente aceita é a combinação do uso de modificadores químicos permanentes ou em solução com um programa de temperaturas otimizado. Esta combinação permite, em muitos casos, uma remoção eficiente de concomitantes com a estabilização térmica do analito, permitindo o emprego de temperaturas mais altas na etapa de pirólise. Para elementos que apresentam picos deformados ou efeitos de memória, a utilização de modificadores químicos permanentes também pode alterar a cinética de atomização, resultando em um aumento na precisão analítica⁵¹.

2.5 Mecanismo de ação dos modificadores químicos permanentes para átomos e moléculas

Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dos modificadores permanentes sobre as moléculas diatômicas formadas em altas temperaturas. Poucos artigos

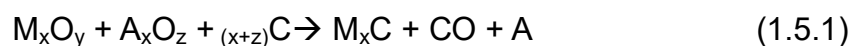
discutem o mecanismo de ação dos modificadores químicos permanentes durante a pirólise e a atomização de elementos⁵²⁻⁵⁴ e, até o presente momento, apenas um artigo propõe um mecanismo de ação destes na formação das moléculas diatômicas, e neste caso em específico, para a molécula CaF e modificador permanente zircônio⁵⁵.

Os modificadores químicos permanentes para análises utilizando forno de grafite são atualmente divididos em duas classes: os dos elementos do grupo da platina e dos elementos formadores de carbetos. Ambos têm a função primária de reduzir interferências e aumentar a eficiência da etapa de atomização. Além disto, em muitos casos agem não somente para a estabilização térmica do analito, mas como catalisadores para a quebra de ligações analito-matriz⁵⁶, além de prolongar a vida útil do tubo de grafite⁵¹. Para ambas as classes, a forma mais comum de modificação da superfície do tubo de grafite se dá através do recobrimento térmico, ou seja, o modificador é adicionado sobre a plataforma e em seguida submetido a um programa de temperaturas, que fará a impregnação do metal na superfície a ser modificada⁵¹.

Os dois grupos distinguem na forma como atuam em relação à superfície de grafite e ao analito. De acordo com Ortner *et al.*⁵⁴, os modificadores do grupo da platina como platina, paládio, irídio, rutênio e ródio, modificam a estrutura do grafite, formando compostos intercalados de grafite e metal nobre, que durante a etapa de pirólise formam ligações covalentes com o analito. Essas ligações costumam ser fortes o suficiente para reduzir a perda do mesmo durante esta etapa, permitindo assim uma queima mais eficiente da matriz e conseqüentemente a redução de interferentes. As ligações são então quebradas durante a etapa de atomização, com a liberação do analito para formar a nuvem atômica. Os estudos de Pedro *et al.*⁵⁷ mostram que os modificadores do grupo da platina formam “aglomerados” na superfície do grafite, sendo distribuídos de forma bastante heterogênea quando utilizado o recobrimento por meio de tratamento térmico. Fato que inclusive, pode

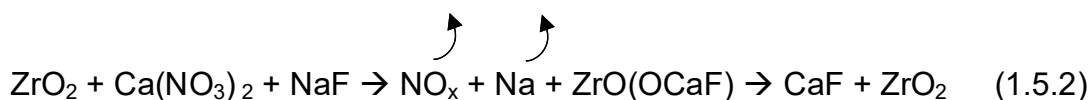
vir a afetar o formato dos picos analíticos por influenciar diretamente a cinética de atomização.

De acordo com Ortner *et al.*⁵⁴, o mecanismo de ação dos elementos formadores de carbetos (entre eles zircônio, molibdênio, tungstênio, tântalo e nióbio) formam uma cobertura de carbetos refratários sobre a superfície da plataforma, que sob alta temperatura, resultam em uma mistura de óxidos do analito e do metal refratário, com alta estabilidade térmica. Froes *et al.*⁵¹ sintetizou a proposta mecanística de Ortner *et al.*⁵⁴ em um esquema conforme descrito na equação 1.5.1:



Sendo M_xO_y o óxido do metal refratário e A_xO_z o óxido do analito; $(x+z)C$ a representação do sítio de carbono ativo, M_xC do carbetos do metal refratário e A do analito livre.

Até agora pouco se especulou sobre o mecanismo de interação das moléculas diatômicas com os modificadores químicos permanentes. Abad *et al.*⁵⁵ publicaram recentemente um artigo sobre o mecanismo de ação do zircônio em relação a molécula CaF. Neste estudo, foi possível isolar um estado intermediário $ZrO(OCaF)$ e propor um mecanismo baseado em uma catálise heterogênea promovida pela molécula ZrO_2 , presente na superfície do tubo de grafite. No mecanismo proposto, o zircônio ligado à superfície de grafite, durante a etapa de pirólise, se ligaria ao flúor e cálcio metálico, formando uma ponte e favorecendo a formação da ligação entre cálcio e flúor. Na etapa de vaporização esta molécula é então liberada, uma equação pode ser descrita a partir da proposta mecanística de Abad *et al.*⁵⁶ (Equação 1.5.2):



Ao contrário do que já foi proposto em termos de mecanismo de ação do zircônio em tubo de grafite, nenhum carbetos refratário foi encontrado nos

experimentos descritos por Abad *et al.*⁵⁵ Também foi estudado os efeitos de superfície, uma vez que o mecanismo de ação aponta para uma catálise heterogênea. Foram estudadas três formas de apresentação do zircônio: deposição térmica a partir da solução padrão de zircônio, a utilização de nanopartículas de zircônio e xerogel de zircônio. Das três apresentações, a utilização de nanopartículas aumentou a eficiência na etapa de vaporização, quando comparado as outras duas apresentações, o que já era esperado para uma catálise heterogênea, uma vez que há um aumento significativo na área superficial com o uso de nanopartículas.

No presente trabalho foram selecionados quatro modificadores para o estudo do comportamento térmico das moléculas Cal, Srl, Bal e Inl: Ir, Pt, Zr e W. Estes elementos foram escolhidos não de forma aleatória, mas de forma que pudesse ser estudado modificadores do grupo da platina (Ir e Pt) e também do grupo dos formadores de carbeto (Zr e W), para que se pudesse avaliar não apenas os efeitos individuais de cada modificador químico permanente, mas também buscar por similaridades entre os elementos do mesmo grupo.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de métodos para a determinação de iodo *via* Cal, Srl, Bal e Inl por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, através da comparação entre as diferentes moléculas estudadas e aplicação em amostras de suplemento de iodo e medicamento.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliação do espectro geral das moléculas Cal, Srl, Bal e Inl utilizando o protótipo MOSES.
- Seleção dos comprimentos de onda mais adequados para o monitoramento das moléculas de Cal, Srl, Bal e Inl.
- Estudo dos modificadores permanentes Ir, Pt, W e Zr e otimização dos programas de temperatura para as moléculas de Cal, Srl, Bal e Inl.
- Estudo das concentrações dos reagentes formadores para cada uma das moléculas estudadas.
- Investigação de cloro como interferente na formação das moléculas de Cal, Srl, Bal e Inl.
- Estudo dos parâmetros de validação dos métodos desenvolvidos para as moléculas de Cal, Srl, Bal e Inl, tendo como base a RDC 166/2017 da ANVISA.
- Aplicação dos métodos desenvolvidos em amostras de fármacos e suplementos de iodo.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 600 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) foi utilizado para todas as determinações do método descrito neste documento. O espectrômetro é equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio, de potência nominal de 300 W operando em modo “hot-spot” e emitindo um contínuo espectral entre 190 nm a 890 nm; e um detector de dispositivo de carga acoplada com 588 pixels, sendo 200 destes utilizados para fins analíticos. Um sistema de monocromador duplo formado por um prisma Littrow pré-dispersor e uma rede Echelle confere a alta resolução do equipamento. As medidas foram feitas utilizando a região espectral da molécula CaI em 638,892 nm, SrI em 677,696 nm, BaI em 538,304 nm e InI em 400,472 nm usando a soma da absorvância integrada de três pixels⁵⁸. O instrumento também conta com um amostrador automático MPE 60 (Analytik Jena).

Um espectro mais amplo, na região do visível, das bandas de absorvância das moléculas de CaI, SrI, BaI e InI foram obtidos através do protótipo do sistema MOSES (Modular Simultaneous Echelle Spectrograph) conforme descrito por Huang *et al.*⁴⁰. A configuração deste sistema baseia-se na composição de um ContrAA 600 equipado com uma lâmpada de xenônio ativada por laser (LDLS 1500, Energetiq Technology Inc., Woburn, MA, USA) que emite um contínuo espectral de 190 nm a 890 nm. O caminho óptico foi alterado de forma que 50% da radiação seja encaminhada ao sistema de duplo monocromador composto por um prisma Littrow e uma rede Echelle, como nos modelos comerciais do ContrAA 600 e os outros 50% da radiação seja encaminhada para o sistema MOSES, conferindo ao sistema um panorama de alta resolução, de janela espectral de aproximadamente 200 nm.

Tubos de grafite com recobrimento pirolítico, orifício superior para inserção da amostra e plataforma PIN integrada (Analytik Jena, Part No. 407-A81.025) foram utilizados em todas as medidas, tanto para as análises utilizando ContrAA 600

quanto utilizando MOSES. Argônio industrial (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás de purga em todas as etapas do programa de temperatura, exceto durante a vaporização. Um moinho de bolas foi utilizado para moer os comprimidos de levotiroxina (Frisch Pulverisette, Idar-Oberstein, Alemanha).

4.2 Materiais e reagentes

Água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ cm foi obtida através do sistema de purificação Mega ROUP (Equisul, Pelotas, Brasil) e utilizada para todas as diluições e preparações de padrões. Os sais CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , $\text{Sr}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{In}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foram utilizados no preparo das soluções de reagente formador. O sal NH_4I (Sigma-Aldrich) foi utilizado para preparar as soluções padrão em frascos de polipropileno do tipo falcon, utilizadas para a otimização e curva de calibração. 1-propanol (Sigma-Aldrich) foi utilizado no preparo das amostras, preparo este realizado diretamente nos copos amostradores, fabricados em polipropileno. Para o estudo do comportamento térmico das moléculas, soluções-padrão de 1,00 g L⁻¹ irídio, zircônio, tungstênio (Fluka, St. Louis, Estados Unidos), e platina (Sigma-Aldrich) foram utilizadas como modificadores permanentes. O estudo da interferência de cloro sob a formação das moléculas foi realizado utilizando uma solução de cloro preparada a partir do sal KCl (Sigma-Aldrich).

4.3 Recobrimento da plataforma de grafite

Os modificadores do grupo da platina formam compostos intercalados com o grafite⁵⁴ estabilizando o analito através da interação com o modificador ali depositado⁵⁹, enquanto os elementos formadores de carbetos isolam o grafite, evitando a interação deste com o analito⁵⁴. Os mecanismos de interação dos modificadores permanentes com moléculas diatômicas em altas temperatura ainda é desconhecido, e por esta razão, dois elementos de cada grupo (irídio e platina dos elementos do grupo da platina, e tungstênio e zircônio do grupo dos elementos formadores de carbetos) foram escolhidos para este estudo. Foram utilizados para o

recobrimento 400 µg de modificador químico por tubo de grafite, a partir de dez aplicações de 40 µL de uma solução estoque contendo 1,00 g L⁻¹ do modificador a ser estudado. O programa de temperatura utilizado para o recobrimento está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Programa de temperatura para o recobrimento da plataforma de grafite com irídio, platina, zircônio ou tungstênio. Vazão de gás em modo máximo (2 L min⁻¹) durante todo o programa de temperatura.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)
1	90	5	40
2	110	1	40
3	130	1	40
4	1200	300	25
5	2100	500	10
6	2100	0	5

4.4 Preparo da amostra

As otimizações foram realizadas com padrões aquosos de iodo a partir do sal de iodeto de amônio. Uma solução estoque de 1,00 g L⁻¹ de iodo foi preparada e para as otimizações, foram utilizadas soluções aquosas contendo 100 mg L⁻¹ de iodo. Para as curvas de calibração, foram preparadas soluções aquosas com concentrações entre 14,0 mg L⁻¹ de iodo a 400 mg L⁻¹ de iodo.

Os comprimidos de levotiroxina foram comprados em farmácias no Brasil, com concentração informada de 200 µg de levotiroxina sódica por comprimido. Para a determinação de iodo nos comprimidos, dez destes foram levados a um moinho de bolas por 15 minutos a uma frequência de 15 Hz. Após a moagem, cerca de 300 mg do pó foi diretamente pesado no copo de amostra e preenchido até 1,30 mL com 1-propanol, para posterior injeção, junto à solução de reagente formador, no forno de grafite e submetido ao programa de temperatura.

Os suplementos de iodo foram comprados em farmácias no Brasil, sendo compostos por uma mistura de iodeto de potássio em meio de óleo de soja de forma que cada cápsula contenha 200 µg de iodo. Aproximadamente 300 mg do suplemento foi diretamente pesado no copo de amostra e preenchido até 1,30 mL com 1-propanol. A mistura foi diretamente injetada, junto à solução de reagente formador, no forno de grafite recoberto por modificador permanente e submetida ao programa de temperatura, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 Condições otimizadas para a determinação de iodo via Cal, Srl, Bal e InI por HR-GF-MAS.

Molécula	Comprimento de onda / nm	Modificador permanente	Reagente formador / µg	Temperatura pirólise / °C	Temperatura vaporização / °C
Cal	638,892	Ir	200	1100	2400
Srl	677,696	Ir	150	1200	2200
Bal	538,304	Pt	200	1300	2200
InI	400,472	W	200	300	1300

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.6 Seleção dos comprimentos de onda

Um espectro amplo para cada uma das quatro moléculas estudadas foi obtido usando o espectrógrafo protótipo MOSES acoplado a um espectrômetro de absorção atômica modelo ContrAA 600. Volumes de 10 μL de uma solução aquosa contendo 1,00 g L^{-1} de Ca, Sr, Ba ou In foram utilizados como reagentes formadores junto de 10 μL de uma solução de iodo a 1,00% (m/v). Um tubo recoberto de zircônio foi utilizado para todas as moléculas que foram submetidas ao programa de temperatura descrito na Tabela 3.

Tabela 3 Programa de temperatura para a obtenção do espectro geral das moléculas CaI, Srl, Bal e InI. Vazão de gás em modo máximo (2 L min^{-1}) exceto na etapa de vaporização quando a vazão de gás foi interrompida.

Etapa	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Rampa / $^{\circ}\text{C s}^{-1}$	Tempo / s
Secagem 1	110	5	10
Secagem 2	120	2	10
Pirólise	500a / 350b	200	20
Vaporização	2400 ^a / 1800 ^b	2000	6
Limpeza	2500	1000	3

^a CaI, Srl, Bal

^b InI

Foram encontradas bandas de absorção de alta intensidade entre 534,458 nm a 715,762 nm para a molécula de CaI; entre 534,459 nm a 715,763 nm para a molécula de Srl; entre 534,459 nm a 715,763 nm para a molécula de Bal; e 383,442 nm a 414,112 nm para a molécula de InI. Uma visão panorâmica dos espectros

obtidos para as moléculas estudadas pode ser vista na Figura 4 e, encontrando uma região de maior intensidade, foi produzida uma visão ampliada dos espectros panorâmicos a fim de se facilitar o encontro da melhor janela espectral para o monitoramento das moléculas diatômicas por HR-MAS. O espectro panorâmico ampliado é exibido na Figura 5.

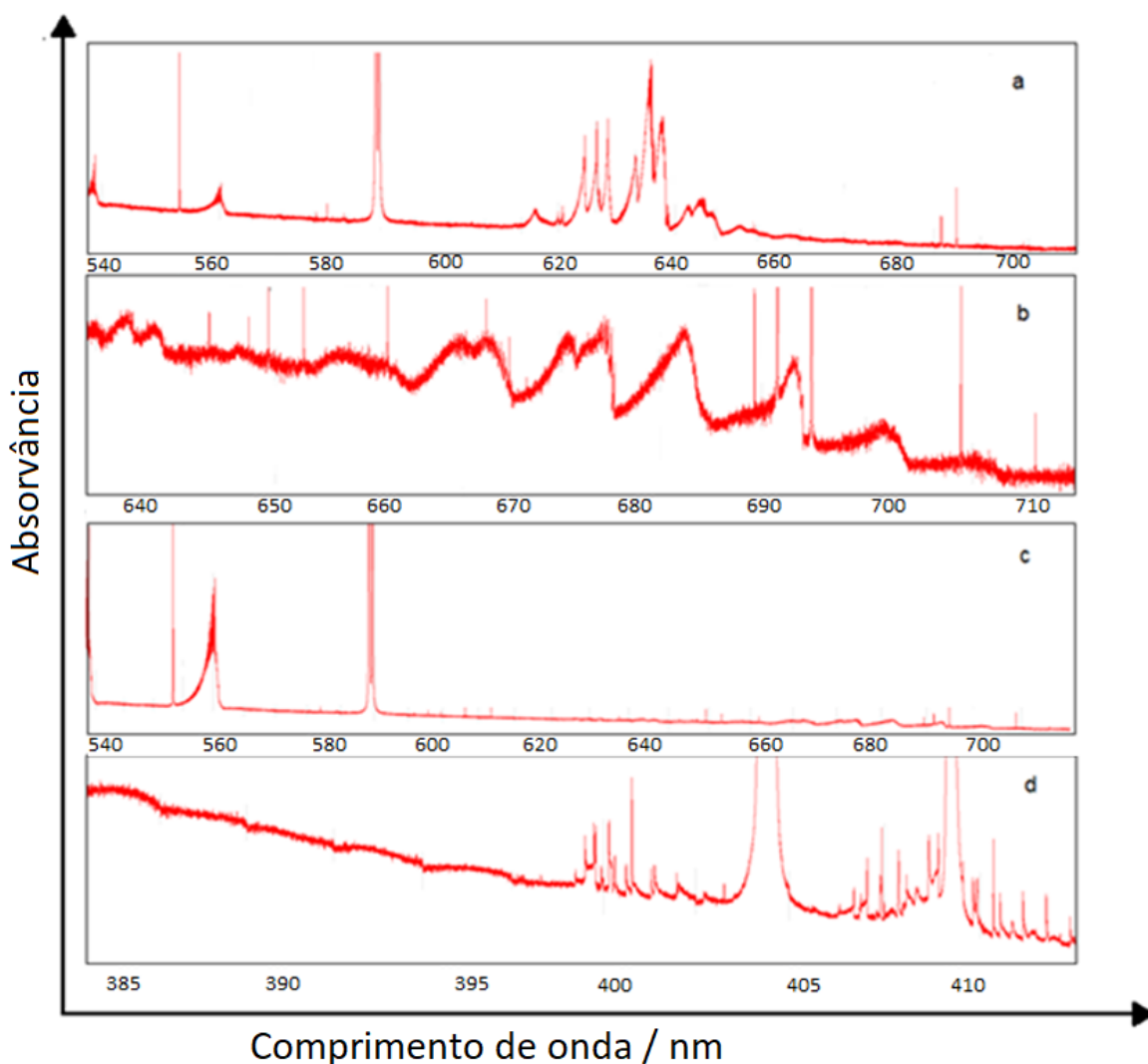


Figura 4 Espectro na região visível, panorâmico obtido através do espectrógrafo MOSES utilizando 100 µg de iodo para: (a) molécula de Cal entre 534,46 nm e 715,76 nm (b) molécula de Srl entre 534,46 nm e 715,76 nm (c) molécula de Bal entre 534,46 nm e 715,76 nm (d) molécula de InI entre 383,44 nm

e 414,11 nm. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 10 µg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente.

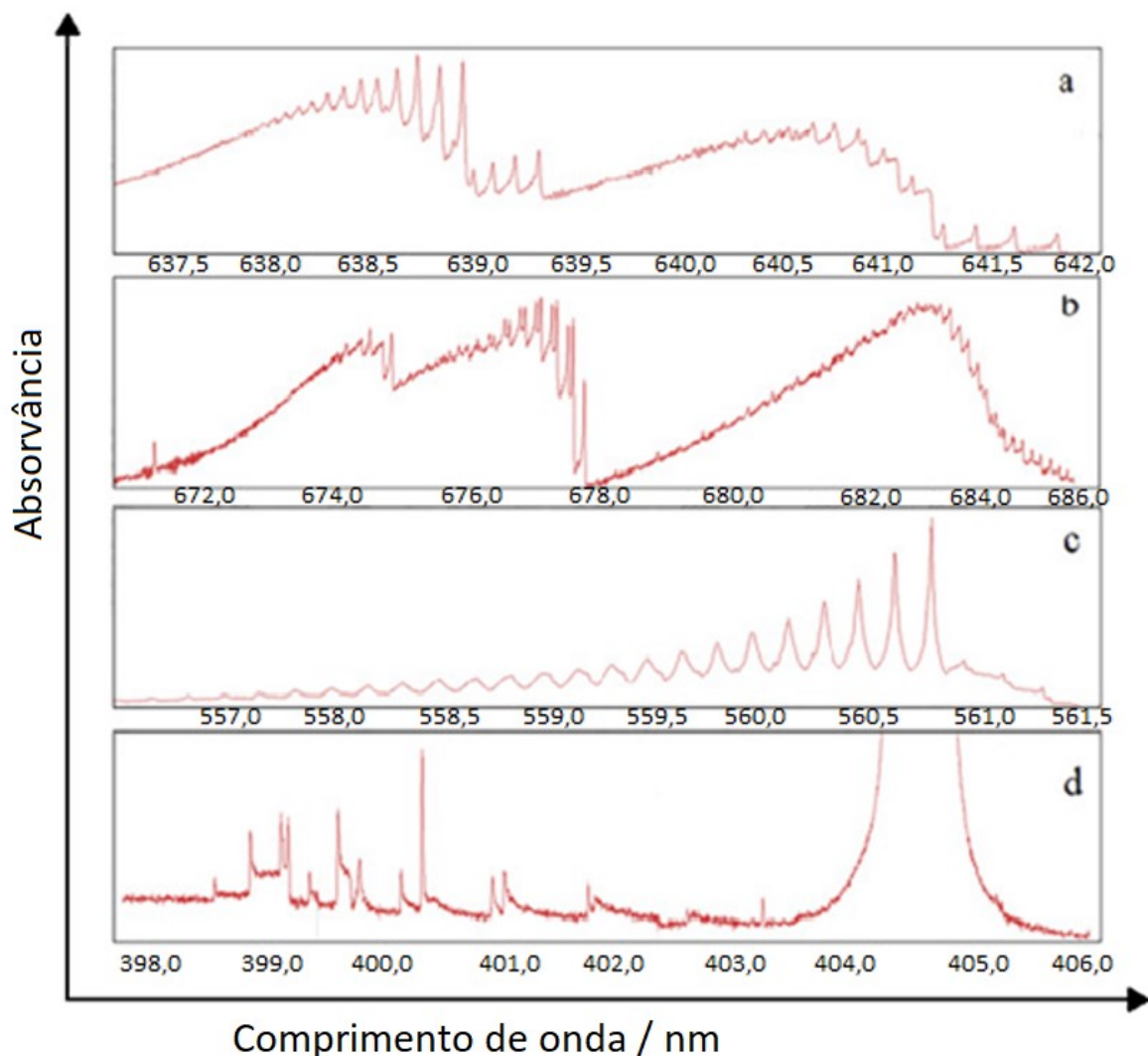


Figura 5 Espectro na região visível, panorâmico ampliado obtido através do espectrógrafo MOSES utilizando 100 µg de iodo para: (a) molécula de Cal entre 637,12 nm e 642,10 nm (b) molécula de Srl entre 670,00 nm e 686,01 nm com 10 µg (c) molécula de Bal entre 534,46 nm e 539,01 nm (d) molécula de Inl entre 397,99 nm e 406,01 nm. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 10 µg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente.

Para a seleção do comprimento de onda a ser monitorado por HR-MAS, não apenas a intensidade do sinal analítico foi considerada, mas também a ausência de interferências na região espectral selecionada, causada pela absorção de átomos ou moléculas. Para a molécula de Cal a região de maior intensidade foi a de 638,892 nm. Porém, quando utilizado um tubo com plataforma sem recobrimento, uma interferência causada pelo reagente formador pode ser observada, e a correção por algoritmo de mínimos quadrados (LSBC) teve de ser utilizada (Fig 6-a). Embora o LSBC seja um método confiável para a correção de fundo na maioria dos casos, segundo o próprio manual do instrumento o algoritmo não é indicado para a correção de moléculas sobre espectros moleculares, o que pode vir a causar uma supercorreção e a perda da exatidão do método. Inclusive, é possível observar no destaque da Figura 6-a que a correção não foi eficiente, já que pequenas bandas não pertencentes a molécula continuam visíveis. Outras regiões do espectro da molécula Cal de menor resposta analítica apresentaram menor ou nenhuma interferência. A região de 626,761 nm (Fig. 7-a) foi selecionada já que não apresentava nenhuma interferência, embora apresente cerca de 100% da intensidade da região anteriormente mencionada.

Para a molécula de Bal (Fig 6-b), a maior intensidade de sinal foi encontrada na região de 538,304 nm, já para a molécula de Srl (Fig 6-c), a maior resposta analítica foi encontrada na região de 677,696 nm, para a molécula de Inl (Fig 6-d), a maior resposta instrumental na região de 400,496 nm. Nenhuma interferência foi observada nas regiões de maior intensidade de sinal analítico dessas três moléculas.

4.7 Programa de temperatura e modificadores químicos permanentes

A estabilidade térmica de Cal, Srl, Bal e Inl foi estudada na presença de quatro modificadores permanentes - dois modificadores do grupo da platina (Ir e Pt) e dois elementos formadores de carboneto (Zr e W). Com exceção das etapas de pirólise e vaporização, o programa de temperatura utilizado para todas as otimizações é o mesmo, exibido na Tabela 2.

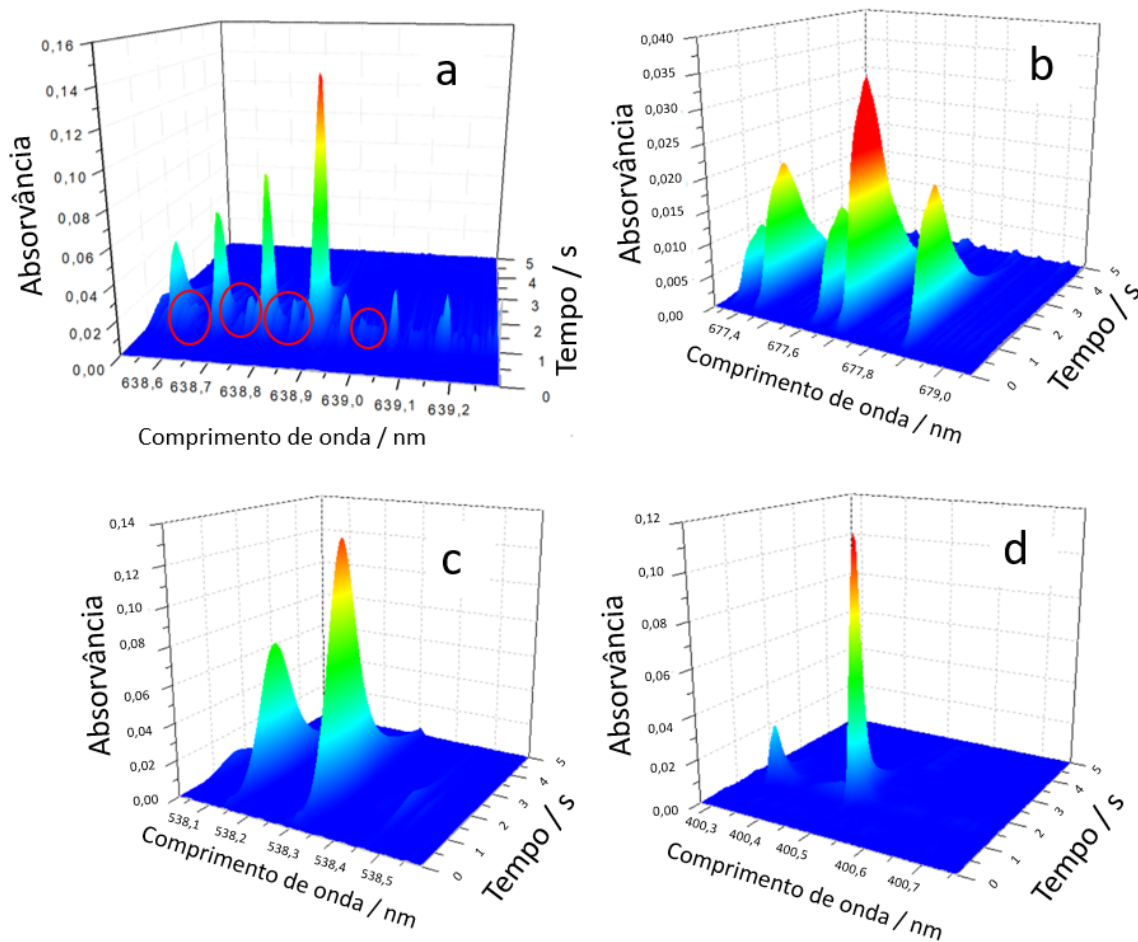


Figura 6 Espectro das moléculas diatômicas de iodo: (a) Cal - pixel central em 638,892 nm, gerado por 1,0 μg de iodo (em destaque as interferências presentes após correção por LSBC). T_{pyr} : 400 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2400 $^{\circ}\text{C}$; (b) Srl - pixel central em 677,696 nm, gerado por 0,5 μg de iodo. T_{pyr} : 1100 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$; (c) Bal - pixel 47

central em 538,304 nm, gerado por 0,5 μg de iodo. T_{pyr} : 1400 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2200 $^{\circ}\text{C}$; (d) InI - pixel central em 400,496 nm, gerado por 2 μg de iodo. T_{pyr} : 300 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2300 $^{\circ}\text{C}$. Todas as moléculas foram geradas utilizando como reagente formador 100 μg de cálcio, estrôncio, bário e índio, respectivamente.

4.7.1 Molécula Cal

Para estudar a estabilidade térmica da molécula Cal foram utilizados 20 μL de uma solução aquosa de 100 mg L^{-1} iodo e 10 μL de uma solução aquosa de 1,00% (m/v) de cálcio. O comprimento de onda selecionado (626,761 nm) para o monitoramento da molécula de Cal não mostrou interferência significativa utilizando uma solução de cálcio 1% (m/v) como reagente formador e temperaturas de pirólise entre 200 $^{\circ}\text{C}$ e 1400 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7-a).

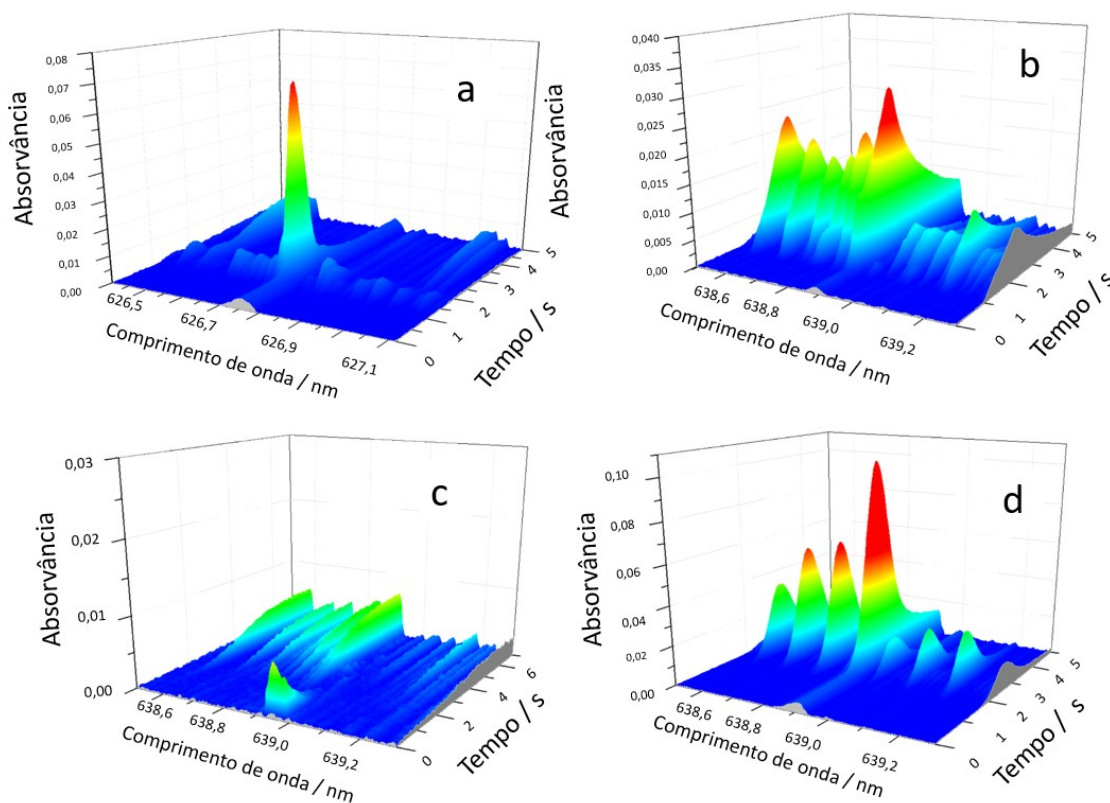


Figura 7 Estudo de interferências na região espectral das bandas de absorção de Cal. (a) espectro de Cal em 626,761 nm, gerado por 2 μg de iodo (b) Cal - pixel

central em 638,892 nm, gerado por 0,5 µg de iodo (c) 100 µg de cálcio em 638,892 nm (d) CaI - pixel central em 638,892 nm, gerado por 0,5 µg de iodo em tubo de grafite revestido com irídio. Todos os espectros foram gerados utilizando 100 µg de cálcio como reagente formador.

Quando o comprimento de onda mais sensível foi selecionado (638,892 nm), observou-se uma interferência causada pelo reagente formador de moléculas (Fig. 7-b). Vários reagentes formadores de moléculas foram testados (nitrato, cloreto e carbonato de cálcio). Todos apresentaram a mesma banda, que possivelmente é referente a transição $B^2\Sigma \rightarrow ^2\Sigma$, do sistema B da molécula CaH, que tem origem em 634,6 nm e a cabeça da banda se encontra em 638,9 nm³⁸ (Fig. 7-c).

Um perfil do espectro de absorvância da molécula de CaH pode ser visto na Figura 8, que foi gerada utilizando um tubo de grafite sem modificadores químicos, apenas o reagente formador proveniente do sal CaCO₃.

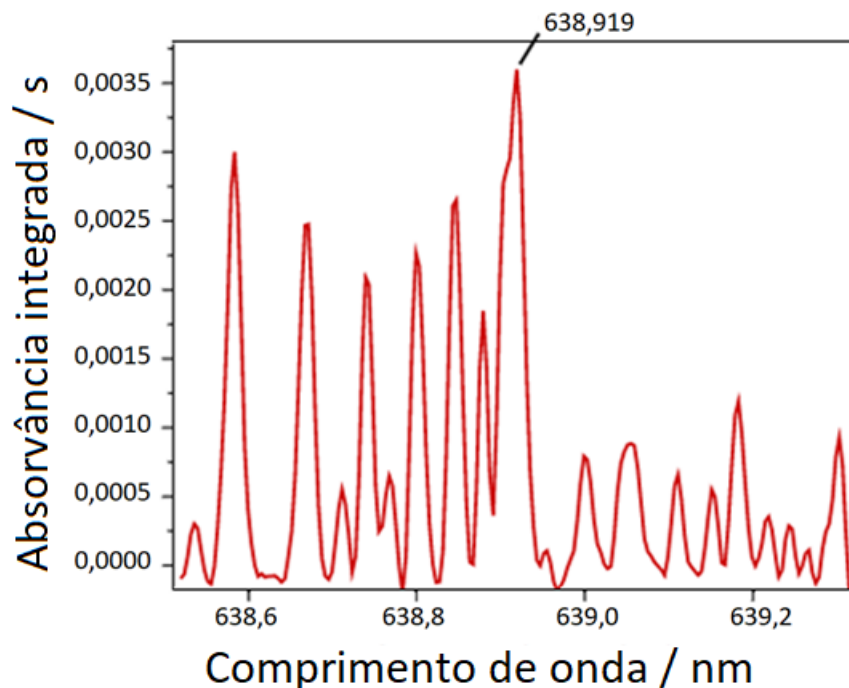


Figura 8 Perfil do espectro da molécula CaH entre os comprimentos de onda de 638,5 nm a 639,3 nm a partir de 10 μg de cálcio em um tubo de grafite sem modificador permanente.

As curvas de pirólise e vaporização com os quatro modificadores permanentes e sem modificador para a determinação de iodo via CaI foram realizadas monitorando o comprimento de onda de 626,761 nm, uma vez que nesta região não foi observada interferências. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 9. Após encontrar as melhores condições para cada modificador químico, estes foram novamente testados utilizando o comprimento de onda de 638,892 nm, a fim de se verificar se a interferência da molécula CaH continuava significativa.

Para o estudo do comportamento térmico em um tubo sem recobrimento, molécula apresentou boa estabilidade térmica até 1300 $^{\circ}\text{C}$, onde após isto apresentou uma diminuição da resposta instrumental. O tubo sem modificadores permanentes apresentou sinal analítico mais intenso, quando comparado com os resultados obtidos com o uso de modificadores permanentes. O sinal de maior

intensidade foi alcançado quando se selecionou uma temperatura de pirólise de 1300 °C e uma temperatura de vaporização de 2400 °C.

Dos modificadores do grupo dos formadores de carvão, é possível observar um acréscimo considerável no sinal analítico entre as temperaturas de pirólise de 200 °C a 400 °C, se mantendo estável até 1000 °C utilizando zircônio como e 1400 °C utilizando tungstênio como modificador permanente. A etapa de vaporização apresentou melhores resultados quando a temperatura de 2200°C foi empregada, para ambos os modificadores. Contudo, o uso destes modificadores não reduziu as interferências encontradas quando se monitora o comprimento de onda de 638,892 nm.

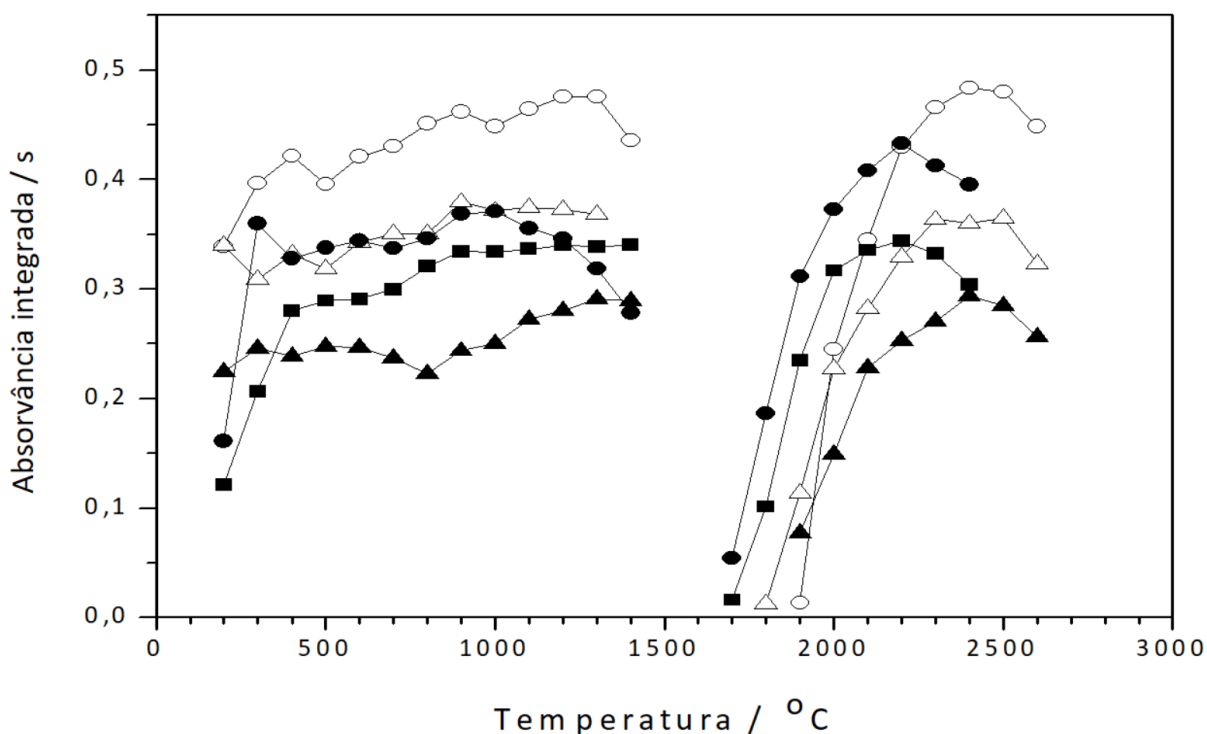


Figura 9 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização para a molécula Cal, utilizando 2 µg de iodo e 100 µg de cálcio; para um tubo sem modificador (○), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2400 °C; para um tubo revestido com platina (▲), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2400 °C. Para um tubo revestido com irídio (Δ), T_{pyr} : 900 °C e T_{vap} : 2400 °C;

para um tubo revestido em tungstênio (■), T_{pyr} : 1300 °C e T_{vap} : 2000 °C; e para um tubo revestido de zircônio (●), T_{pyr} : 1000 °C e T_{vap} : 2000 °C.

Dos elementos do grupo da platina, nenhum dos modificadores selecionados apresentou aumento no sinal analítico, quando comparados com o estudo realizado em um tubo de grafite sem modificadores permanentes. Os resultados obtidos utilizando platina ou irídio demonstraram alta estabilidade térmica em todo o intervalo de temperaturas estudado na etapa de pirólise. Já a estabilidade térmica apresentada por ambos os modificadores foi similar aos resultados obtidos utilizando um tubo de grafite sem modificação. Porém, com o uso das condições ótimas para irídio como modificador permanente, (1100 °C de pirólise e 2400 °C de vaporização), foi possível mitigar a interferência no comprimento de onda que apresentou maior resposta analítica (Figura 7-d). Por esta razão, essas condições foram aceitas como ótimas e usadas nas otimizações e aplicações subsequentes, utilizando o comprimento de onda de 638,892 nm.

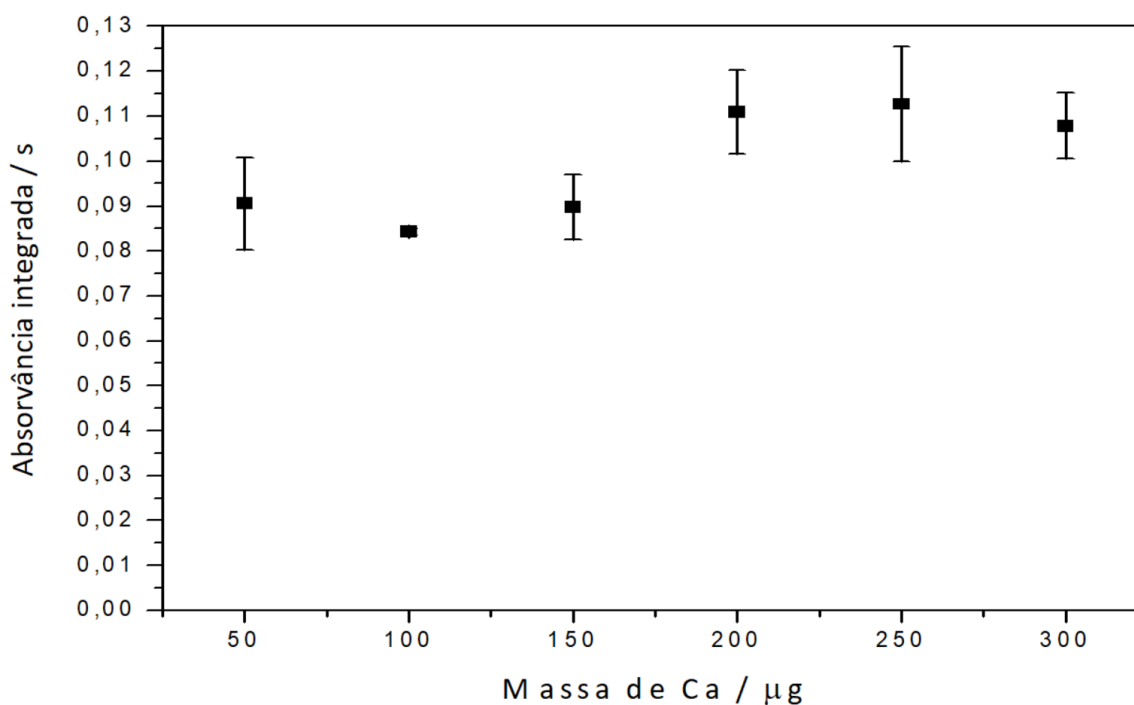


Figura 10 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 µg de iodo para a formação de Cal, utilizando 400 µg de irídio como modificador permanente e pixel central em 638,892 nm.

A influência da massa de reagente formador também foi otimizada (Figura 10). Foram utilizados 5 µL de uma solução aquosa 100 mg L⁻¹ de iodo e uma solução aquosa de 1,00% de cálcio, adicionados ao instrumento em diferentes volumes, de forma a se obter um intervalo de massa absoluta de 100 µg a 300 µg de cálcio no tubo de grafite. A resposta analítica referente a formação da molécula Cal apresenta um aumento pouco significativo no intervalo de concentrações escolhido para o estudo. Optou-se pela massa absoluta de 200 µg de cálcio, a fim de se garantir um excesso do reagente formador, dentro de toda a faixa trabalhada nesse estudo.

Zanatta *et al.*⁷ publicaram no ano de 2018 um trabalho sobre o estudo de duas moléculas diatômicas de iodo: Cal e Srl. Embora este trabalho e o presente trabalho não tenham a mesma abordagem, algumas comparações podem ser feitas. Primeiramente, a escolha dos modificadores permanentes foi diferente. Enquanto o presente trabalho focou em categorias diferentes de modificadores permanentes, o trabalho de Zanatta *et al.* focou nas diferentes formas de utilização de paládio. Segundo os autores, melhores resultados foram obtidos utilizando a mistura de paládio e magnésio na proporção de 5/0,5 µg como modificador químico em solução. Os estudos preliminares com este modificador, nas condições estudadas neste presente trabalho, mostraram uma redução significativa da intensidade de absorvância quando utilizado nas condições 10/0,1 µg de paládio e magnésio, respectivamente, o que converge com os resultados obtidos por Zanatta *et al.* que também observaram um decréscimo na intensidade do sinal analítico utilizando estas concentrações do modificador químico em solução.

Sobre a massa de reagente formador, observou-se que os melhores resultados, de acordo com a Figura 10, foram obtidos à partir de 200 µg de Ca para 0,5 µg de iodo. Zanatta *et al.*⁷ estudaram uma faixa de 0 µg a 100 µg de Ca, no qual o melhor resultado foi obtido na última concentração estudada. Como pode ser

observado na Figura 10, os resultados pouco variaram em termos de intensidade do sinal analítico, e pode-se considerar que os resultados obtidos nos dois trabalhos são concordantes.

4.7.2 Molécula de Srl

Para este estudo, foram utilizados 10 μL de uma solução aquosa de 100 mg L^{-1} de iodo e 10 μL de uma solução aquosa de 1,00% (m/v) de estrôncio. A região espectral escolhida para a investigação da estabilidade térmica de Srl (677,696 nm) não mostrou interferências. A molécula diatômica Srl apresentou uma alta estabilidade térmica, apresentando resultados sem perda de intensidade em temperaturas de pirólise de até 1300 °C (Figura 11).

Dentre os modificadores do grupo dos formadores de carbetos, observou-se alta estabilidade térmica, sendo que os resultados foram muito similares em todo o intervalo estudado, com exceção de temperaturas acima de 1300 °C quando tungstênio foi utilizado como modificador permanente. O uso de zircônio resultou em sinais mais intensos, quando comparado com os resultados obtidos em toda a faixa estudada para tungstênio. Quando comparado com os resultados obtidos em um tubo de grafite sem modificador permanente, os resultados também foram mais intensos, com exceção do intervalo entre 500 °C a 700 °C da etapa de pirólise. Já na etapa de vaporização, os resultados mais intensos foram obtidos quando a temperatura de 2300 °C foi empregada, para tubos recobertos com ambos os elementos formadores de carbeto, e também para o tubo de grafite sem modificador permanente.

Já os estudos com modificadores do grupo da platina apresentaram majoritariamente um incremento no sinal analítico, tanto para quando a platina como para quando irídio, quando utilizados como modificadores permanentes. Para um tubo recoberto com platina, os resultados à partir de 400 °C de pirólise foram superiores quando comparados aos resultados obtidos em um tubo sem modificador permanente, e se mantiveram estáveis até 1300 °C. Utilizando um tubo

recoberto com uma plataforma revestida com 400 μg de irídio, obteve-se não apenas resultados mais intensos, mas também com grande estabilidade térmica, apresentando os maiores valores de intensidade de sinal analítico em toda a faixa de temperatura estudada para a etapa de pirólise, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando a temperatura de pirólise de 1200 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização de 2200 $^{\circ}\text{C}$ foram empregadas.

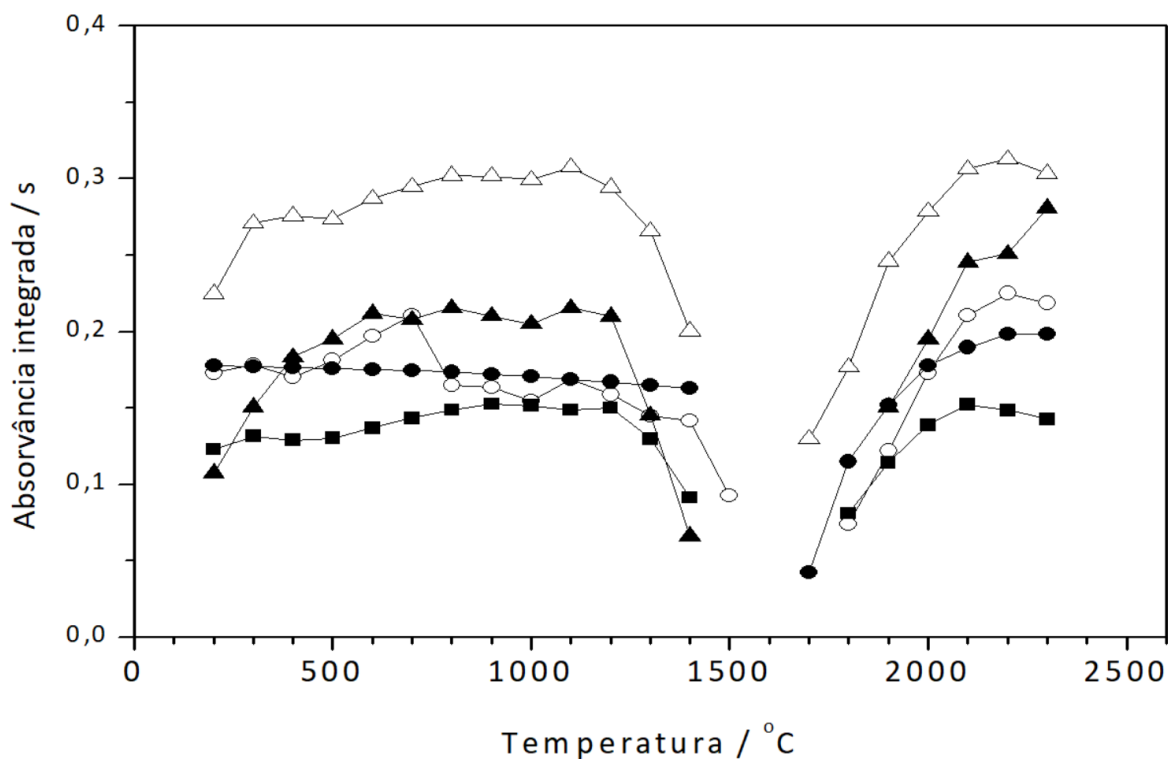


Figura 11 Otimização da temperatura de pirólise e vaporização para a molécula Srl, usando 2 μg de iodo e 100 μg de estrôncio. Para um tubo sem modificador (\circ), T_{pyr} : 700 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com platina (\blacktriangle), T_{pyr} : 1000 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com irídio (\triangle), T_{pyr} : 1100 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido em tungstênio (\blacksquare), T_{pyr} : 1200 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com zircônio (\bullet), T_{pyr} : 1200 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2100 $^{\circ}\text{C}$.

A formação de moléculas diatômicas é dependente da concentração de reagente formador e por isso, sua otimização é importante para se alcançar as melhores condições para o método. O estudo foi realizado utilizando 5 μL de uma

solução de iodo a 100 mg L^{-1} e inserido no instrumento junto a um intervalo de massas absolutas de $50 \text{ }\mu\text{g}$ a $300 \text{ }\mu\text{g}$ de estrôncio, a partir de diferentes volumes de uma solução contendo 1,00% (m/v) do reagente formador. Observou-se um aumento na intensidade do sinal analítico até $150 \text{ }\mu\text{g}$, conforme a Figura 12. Uma vez que maiores concentrações não produziram um aumento da resposta instrumental, a massa de estrôncio foi fixada em $150 \text{ }\mu\text{g}$.

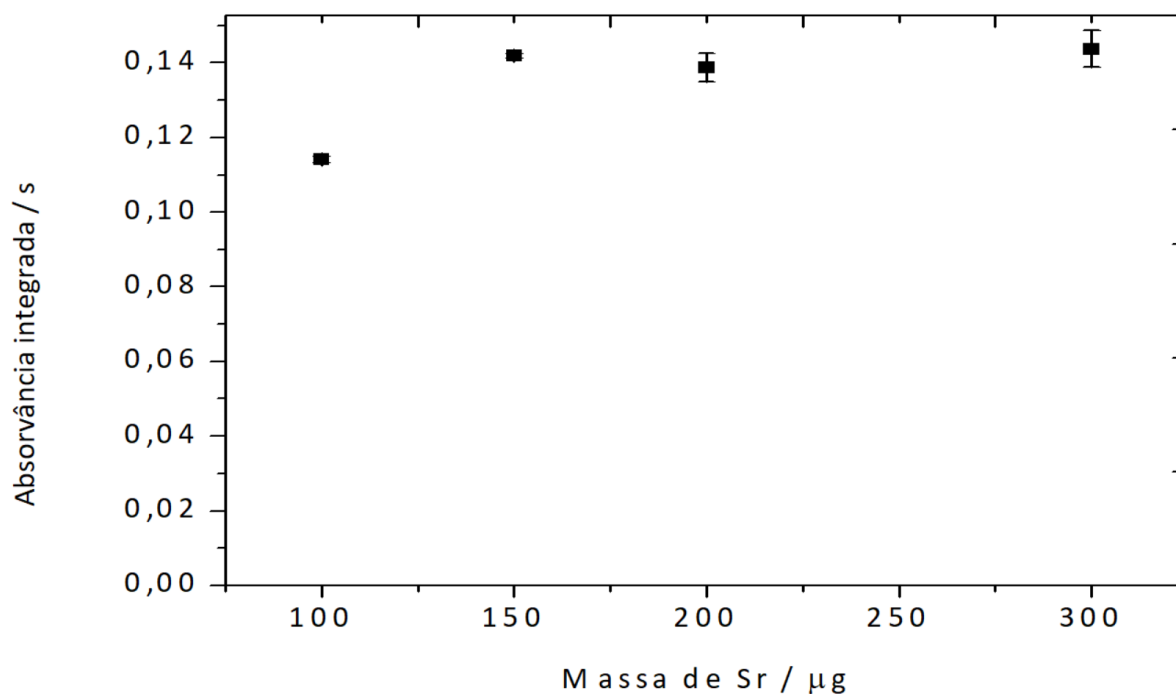


Figura 12 Estudo da massa de reagente formador com $0,5 \text{ }\mu\text{g}$ de iodo para a formação de Srl, utilizando $400 \text{ }\mu\text{g}$ de irídio como modificador permanente e pixel central em $677,696 \text{ nm}$.

O trabalho publicado por Zanatta et al.⁷ também apresenta otimizações para a molécula de Srl. Os autores também utilizaram a região de $677,69 \text{ nm}$ para o estudo das melhores condições e determinação de iodo. Assim como neste presente trabalho, nenhuma interferência foi relatada dentro das condições estudadas. As condições ótimas encontradas por Zanatta et al.⁷ foram temperaturas

de 800 °C na etapa de pirólise e 2400 °C na etapa de vaporização, utilizando a mistura de paládio e magnésio como modificador químico em solução. Não houve perdas significativas de intensidade do sinal analítico até 1400 °C, o que vem ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho. Segundo os autores, a utilização do modificador químico em solução paládio/magnésio apenas influenciou na intensidade do sinal analítico, e não na estabilidade térmica, e obtiveram o mesmo perfil de curva que o presente trabalho. Sobre a melhor concentração de reagente formador, Zanatta et al.⁷ apontou como ótima uma concentração de 150 µg de cálcio quando utilizado 0,4 µg de iodo, muito similar com os resultados obtidos e apresentados na Figura 12.

4.7.3 Molécula de Bal

Neste estudo, 10 µL de uma solução aquosa de iodo a 100 mg L⁻¹ e 10 µL de uma solução de bário a 1,00% (m/v) foram utilizados. Na região espectral escolhida (538,304 nm) não foram observadas interferências de átomos ou moléculas, nas condições estudadas. O resultado da investigação do efeito de modificadores na estabilidade térmica da molécula Bal pode ser visto na Figura 13.

Os elementos formadores de carbeto apresentaram maior estabilidade térmica. Estes modificadores apresentaram sinais de maior intensidade (quando comparados ao tubo sem modificação) nos intervalos entre 700 °C a 900 °C para tungstênio e 500 °C a 1000 °C para zircônio, na etapa de pirólise. A partir de 1000 °C, nenhum dos modificadores deste grupo apresentou sinais analíticos mais intensos que os obtidos por um tubo sem modificador permanente. Na etapa de vaporização, a maior resposta analítica foi obtida a uma temperatura de 2100 °C para ambos os elementos do grupo dos formadores de carbeto, e também quando utilizado um tubo sem modificadores permanentes.

Dentre os modificadores do grupo da platina que foram estudados, o uso de platina como modificador permanente resultou em um aumento significativo na intensidade do sinal analítico (cerca de 100% quando comparado ao tubo sem

recobrimento). A molécula permaneceu estável em temperaturas de pirólise entre 800 °C e 1600 °C. Sendo que as melhores condições foram encontradas quando foram utilizadas as temperaturas de 1400 °C na etapa de pirólise e 2100 °C na etapa de vaporização. Uma vez que o uso da platina como modificador permanente resultou em um aumento significativo da intensidade do sinal analítico, foi-se aceito ótimo e utilizado nos estudos posteriores.

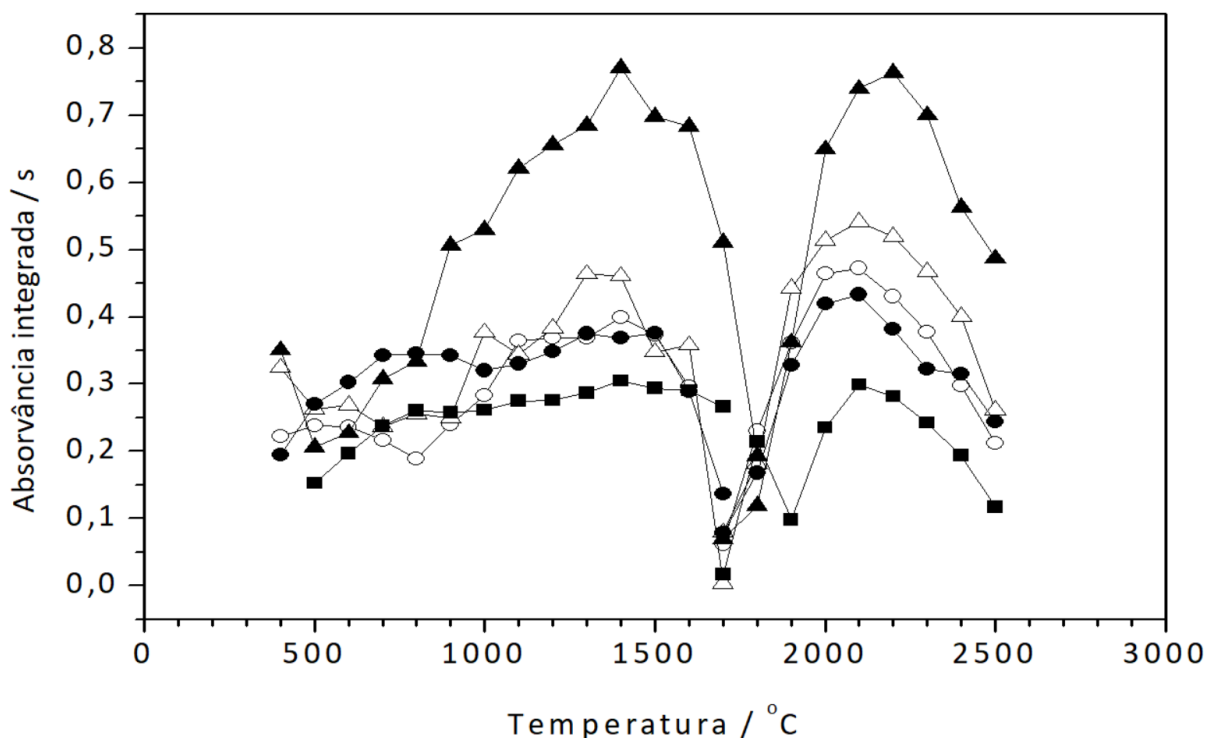


Figura 13 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para a molécula BaI, utilizando 10 µg de iodo e 100 µg de bário. Para um tubo sem modificador permanente (○), T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido com platina (▲), T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido de irídio (Δ), T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2200 °C; para um tubo revestido em tungstênio (■), T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2100 °C; e para um tubo revestido de zircônio (●), T_{pyr} : 1400 °C e T_{vap} : 2200 °C.

Os modificadores do grupo da platina escolhidos apresentaram melhores resultados como modificadores permanentes para a estabilização térmica da

molécula de Bal. Já os modificadores do grupo formador de carbetos escolhidos não aumentaram a resposta analítica da molécula. Somente o tungstênio como modificador permanente foi capaz de aumentar a estabilidade térmica. Um trabalho publicado por Huang *et al.*⁸ no ano de 2009 apresentou o estudo de alguns modificadores do grupo da platina e, segundo os autores, estes modificadores não foram capazes de aumentar o sinal analítico para a molécula Bal.

No trabalho mencionado acima, Huang *et al.* encontraram como melhores condições as temperaturas de 600 °C na etapa de pirólise e 2000 °C na etapa de vaporização, utilizando um tubo sem recobrimento com modificador permanente, condições estas bem divergentes das encontradas neste presente estudo. Contudo, a faixa de temperaturas otimizadas, assim como os critérios de avaliação para a escolha das melhores condições não foram descritas neste trabalho. Os modificadores utilizados naquele estudo, embora pertencentes ao grupo da platina, não são os mesmos que foram utilizados neste trabalho.

O fato de diferentes modificadores permanentes, mas classificados com a mesma função (como os modificadores do grupo da platina ou formadores de carbetos) apresentarem resultados significativamente diferentes, pode ser uma evidência de que o mecanismo de ação dos modificadores permanentes nas moléculas é diferente do mecanismo de ação dos modificadores permanentes na estabilização de átomos. Evidência esta que corrobora com os resultados obtidos por Abad *et al.*⁵⁵ em que um mecanismo completamente diferente do que se aceitava para os modificadores químicos permanentes do grupo dos elementos formadores de carbetos é proposto para a interação entre modificadores permanentes e moléculas, quando comparado com os mecanismos propostos para átomos.

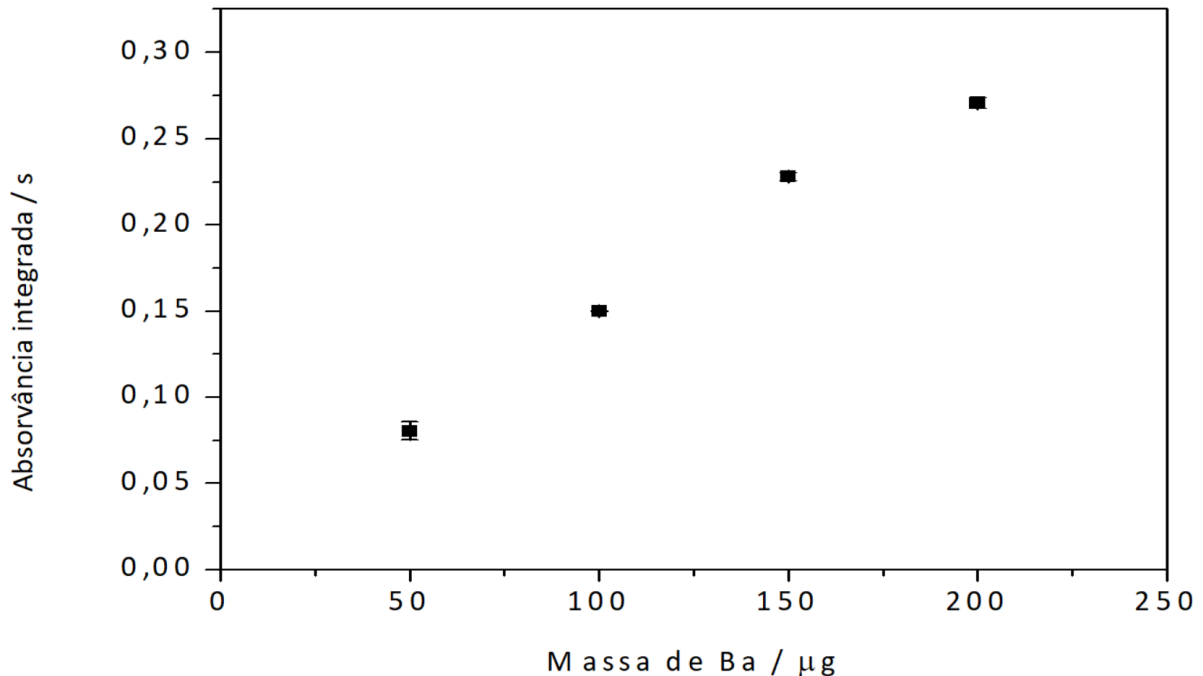


Figura 14 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 μg de iodo para a formação de BaI com pixel central em 538,304 nm.

A massa de reagente formador para a molécula de BaI também foi otimizada. Como pode ser observado na Figura 14, a intensidade do sinal analítico aumentou significativamente com o aumento da massa de reagente formador, no intervalo estudado de 50 μg a 200 μg . O estudo não foi estendido para uma maior massa de bário devido a limitação da solubilidade do sal e o volume limite a ser injetado no tubo de grafite. Uma pré-injeção seguida por uma etapa de secagem (enriquecimento) poderia ser utilizada para aumentar a concentração do reagente formador no tubo. Porém, a diferença de intensidade entre os dois últimos pontos estudados não se mostrou significativa o suficiente para justificar toda a otimização de uma etapa de enriquecimento. Além disso, mais tempo seria dispendido para esta etapa no programa de temperatura, o que acarretaria em uma diminuição da frequência analítica. Por esta razão, a massa de reagente formador aceita como ótima foi de 200 μg e será utilizada em todos os estudos posteriores.

4.7.4 Molécula de InI

Para o estudo da estabilidade térmica da molécula de InI, 20 μL de uma solução aquosa de iodo a 100 mg L^{-1} e uma solução aquosa de índio a 1,00% (m/v) foram utilizadas. A molécula foi monitorada na região espectral de 400,496 nm, onde não foi observada nenhuma interferência em nenhuma das condições aplicadas nos intervalos de temperaturas de pirólise e vaporização estudadas.

Os elementos do grupo da platina apresentaram perfil bastante semelhante, com uma redução significativa do sinal analítico no intervalo de 200 °C a 300 °C, seguido por sinais de intensidade bastante similar até 800 °C. As temperaturas de vaporização também foram bem baixas, quando comparadas as aplicadas no estudo das outras moléculas, onde as maiores respostas instrumentais foram encontradas em 1300 °C e 1600 °C para irídio e platina, respectivamente. Comparando com os resultados obtidos sem a utilização de modificadores permanentes, apenas o irídio apresentou resultados mais intensos em temperaturas de pirólise acima de 300 °C.

Para os modificadores do grupo dos elementos formadores de carbetos, quando zircônio foi utilizado, foi possível observar apenas uma pequena variação de intensidade dentro do intervalo de temperaturas estudados na etapa de pirólise. Porém, não houve aumento na intensidade do sinal quando comparado com os resultados obtidos usando um tubo sem recobrimento. Para os resultados obtidos com tungstênio como modificador permanente, houve um aumento significativo da resposta analítica, quando comparados aos outros resultados obtidos para a molécula InI. Houve redução significativa do sinal analítico conforme o aumento da temperatura de pirólise, contudo, mesmo com a redução do sinal, os resultados obtidos utilizando tungstênio foram mais intensos que os demais obtidos para esta molécula dentro do intervalo estudado (200 °C a 600 °C). A temperatura de 300 °C foi aceita como ótima para garantir uma queima mais eficiente de componentes da matriz, e a temperatura de vaporização foi fixada em 1300 °C, junto da utilização de

tungstênio como modificador permanente, nos demais estudos utilizando a molécula InI.

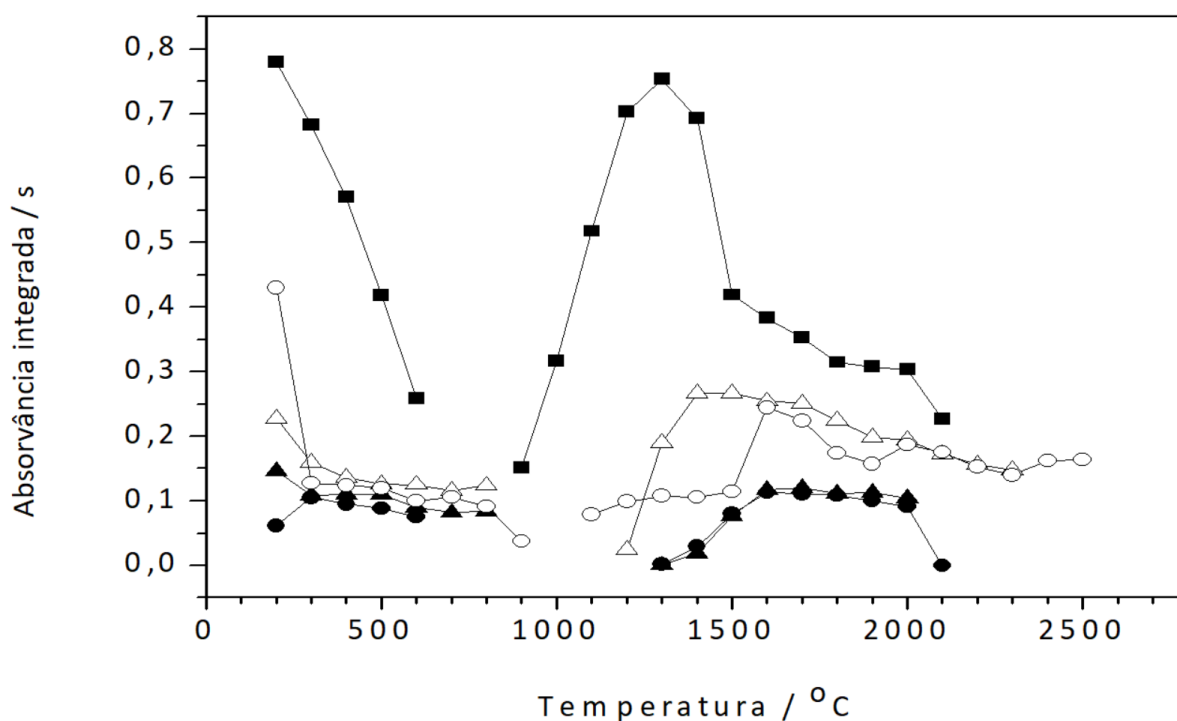


Figura 15 Otimização das temperaturas de pirólise e vaporização para a molécula InI, utilizando 2 μg de iodo e 100 μg de índio. Para um tubo sem modificador permanente (\circ), T_{pyr} : 300 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2200 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com platina (\blacktriangle), T_{pyr} : 500 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 1800 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com irídio (Δ), T_{pyr} : 300 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 2200 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido em tungstênio (\blacksquare), T_{pyr} : 300 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 1400 $^{\circ}\text{C}$. Para um tubo revestido com zircônio (\bullet), T_{pyr} : 300 $^{\circ}\text{C}$ e T_{vap} : 1600 $^{\circ}\text{C}$.

A influência da massa de reagente formador para a molécula de InI também foi otimizada, conforme pode ser visto na Figura 16. Foram utilizados 5 μL de uma solução aquosa de iodo a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e diferentes volumes de uma solução aquosa de índio a 1,0 g L^{-1} . Do intervalo de 50 μg a 300 μg de índio, a intensidade do sinal analítico aumenta significativamente até 200 μg . Após essa concentração, o

aumento é pouco significativo, e por esta razão, a massa de 200 μg de índio foi adotada como ótima e utilizada nos experimentos posteriores.

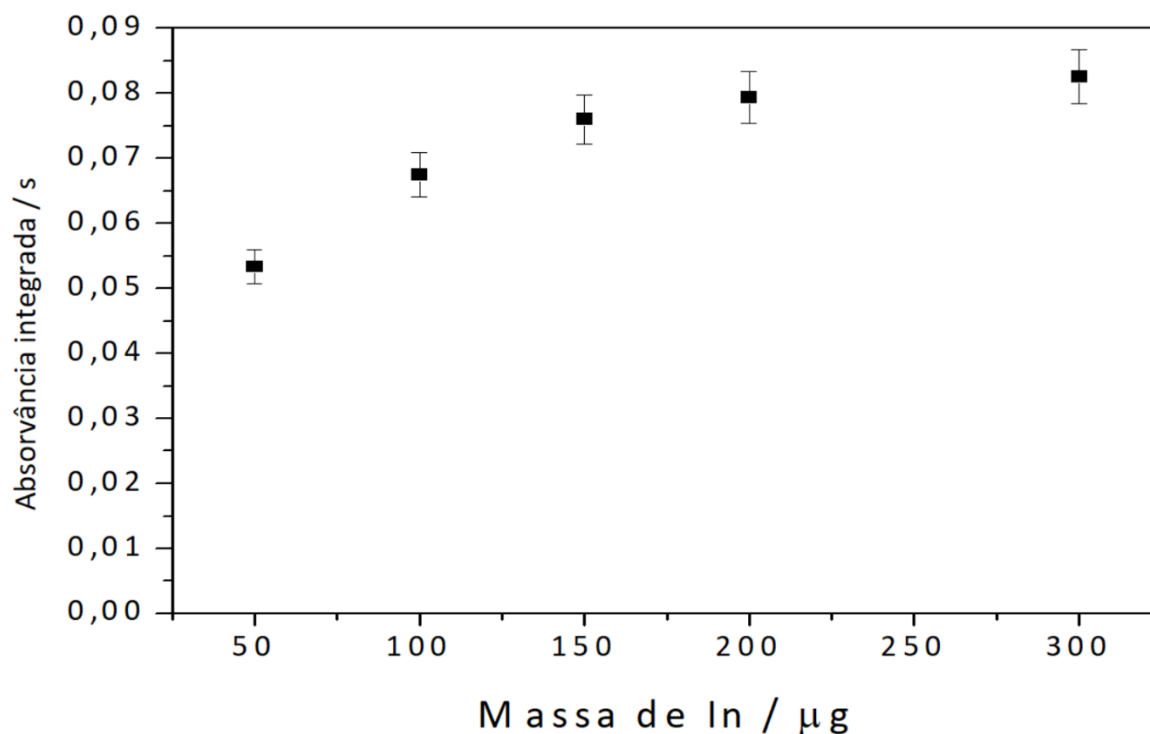


Figura 16 Estudo da massa de reagente formador com 0,5 μg de iodo para a formação de InI com center pixel em 400,472 nm.

Até o momento não há publicações utilizando a molécula de InI para a determinação de iodo, ou mesmo estudos mostrando o comportamento térmico desta molécula. Por isso, não é possível traçar um comparativo entre trabalhos já divulgados. Em comparação com as outras moléculas estudadas neste trabalho, a molécula de InI apresentou baixa estabilidade térmica, o que significa que sua aplicação se torna limitada a amostras com matrizes facilmente eliminadas com uma etapa de pirólise de baixa temperatura. Sua baixa estabilidade térmica impede a utilização de altas temperaturas na etapa de pirólise para a remoção satisfatória de interferentes. Em amostras com matriz volátil, esta característica do método não deve ser uma limitação, contudo, amostras com matrizes mais térmicamente resistentes, podem vir a necessitar de um tratamento prévio, como um preparo de

amostra que isole o analito ou que pelo menos remova algum dos concomitantes mais resistentes a altas temperaturas.

4.8 Estudo de interferências

As moléculas diatômicas de iodo estudadas têm uma energia de dissociação menor que a energia de dissociação das moléculas análogas de outros halogênios⁹. Essa característica das moléculas pode facilitar a competição pelo reagente formador entre o iodo e os demais halogênios presentes na amostra, o que acarreta na diminuição da intensidade do sinal analítico. Por esta razão, a presença de flúor, cloro e bromo nas amostras pode resultar em interferência, sendo necessária uma investigação para elucidar a magnitude deste efeito. Uma vez que o cloro é um dos halogênios mais abundante no planeta, e comumente encontrado como contaminante, inclusive em soluções de branco, foi escolhido como o interferente para este estudo. Diferentes volumes de uma solução de cloro a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ foram adicionados no tubo de grafite junto de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de reagente formador a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão aquoso de iodo a 100 mg L^{-1} .

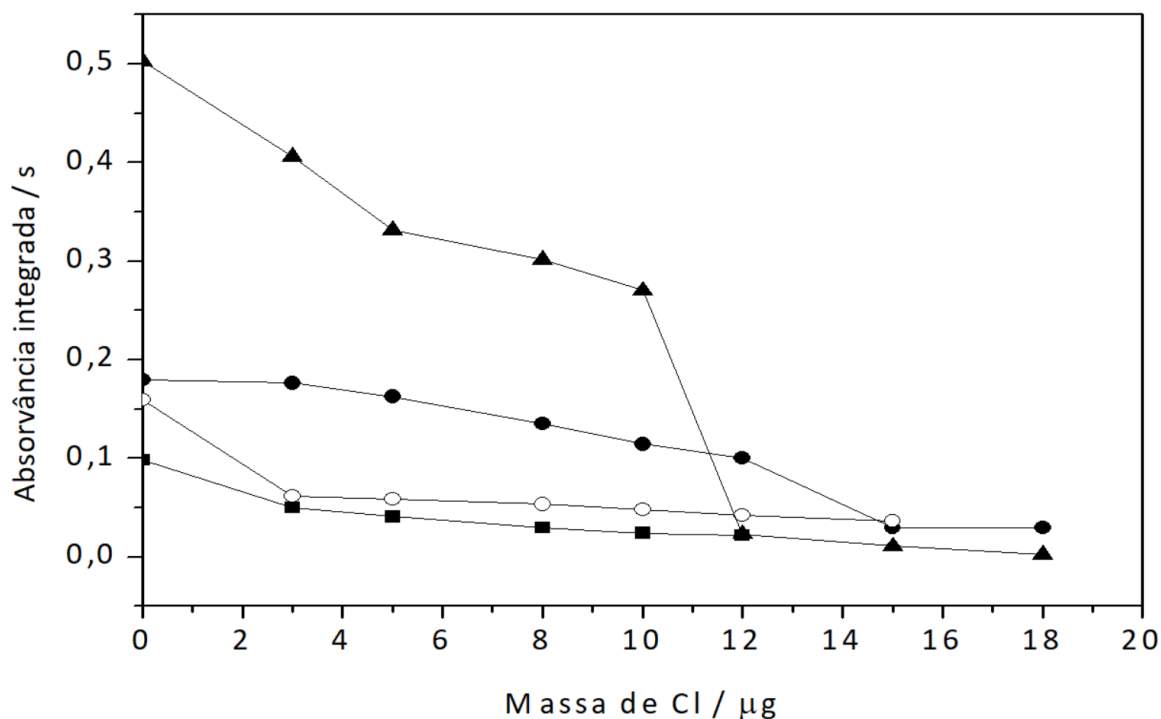


Figura 17 Estudo da influência da massa de cloro (a partir do sal KCl) para a formação da molécula diatômica de Cal (○), Srl (■), Bal (▲) e InI (●) com 100 µg de reagente formador de moléculas e 1 µg de iodo.

Como observado na Figura 17, mesmo uma pequena quantidade de cloro foi capaz de diminuir a intensidade do sinal das moléculas estudadas. A molécula de InI foi a menos influenciada pelas concentrações de cloro, sendo necessário cerca de 8 µg do interferente para causar uma redução de 20% no sinal analítico. Já a molécula de Cal foi a que apresentou a menor tolerância a presença de cloro, sendo que apenas 3 µg do halogênio causaram uma redução no sinal de 50%.

Huang *et al.*¹⁰ estudaram alguns interferentes como alguns halogênios e reagentes oxidantes (H₂O₂ e H₂SO₄) para a molécula Bal. Assim como no presente trabalho, foi possível observar que a presença de cloro causou a redução da formação da molécula mesmo em baixas concentrações. Segundo os autores, a

presença de outros halogênios reduz a intensidade do sinal analítico devido a competição destes pelo reagente formador, corroborando com ideias expressas no presente trabalho.

A presença de oxidantes reduz o sinal analítico devido a formação de I_2 , que é volátil, sendo perdido na etapa de pirólise. Sobre a presença de cátions, Huang *et al.*¹⁰ avaliaram os mais comuns, sendo que os efeitos mais significativos foram encontrados quando houve a presença de ferro, sódio e potássio. Embora nenhum estudo formal tenha sido realizado com cátions no presente trabalho, uma das amostras estudadas foi o suplemento de iodo, que consiste em uma solução de KI em meio de óleo de soja. Nenhuma interferência, como supressão de sinal, foi observada, mesmo utilizando calibração externa com padrões aquosos.

Zanatta *et al.*⁷ estudaram o efeito das concentrações de cloro como interferente na formação das moléculas de Cal e Srl. Assim como no presente trabalho, os autores concluíram que uma pequena concentração de cloro reduz drasticamente a intensidade do sinal das moléculas estudadas, devido a competição pelo reagente formador, uma vez que o cloro forma moléculas com os reagentes formadores mais estáveis do que o iodo. Os autores também mostraram que a molécula de Cal tem sua formação menos influenciada pela presença de cloro que a molécula de Srl, sendo que para a molécula de Cal, uma proporção de 1:1,2 (em mol, em relação ao I) causa uma redução de 50% da intensidade do sinal analítico. Enquanto para a molécula de Srl, a mesma redução é causada por uma proporção de 1:4. Os resultados apresentados por Zanatta *et al.* são concordantes com os apresentados e discutidos previamente nesta sessão.

Durante os estudos foi possível observar maior repetibilidade do método para a molécula de InI quando comparada as outras moléculas, conforme será exibido na sessão 4.6. Acredita-se que essa menor variação *inter-dia* é devido ao fato da molécula de InI sofrer menor influência (quando comparada as outras moléculas estudadas) em sua formação, quando há presença de halogênios, o pode reduzir efeitos causados por contaminação. Uma análise dos valores da solução branco (1-

propanol) para cloro utilizando o método publicado por Pereira *et. al*²⁹ revelou uma concentração aproximada de 0,6 mg L⁻¹ do halogênio. Embora a concentração seja relativamente baixa quando comparada as concentrações utilizadas no estudo de interferentes, somada com a possível contaminação por manipulação dos comprimidos, contaminação do ar atmosférico e mesmo do instrumento, e também uma vez que estas contaminações não são constantes, esse valor pode vir a ser significativo para a variação da formação da molécula. Corroborando com este raciocínio, nos estudos envolvendo a molécula de Cal observou-se uma maior variação *inter-dia*. Contudo, faz-se necessário um estudo da precisão dos métodos desenvolvidos para as quatro moléculas estudadas neste trabalho.

4.9 Discussões sobre a energia de dissociação das moléculas

Para entender melhor sobre o comportamento das moléculas perante interferentes e também um pouco sobre seu comportamento térmico, deve-se observar não apenas sua energia de dissociação, mas também a energia de dissociação das moléculas geradas pelo interferente e da molécula diatômica do reagente formador. As energias de dissociação utilizadas para as comparações estão exibidas na Tabela 4.

Tabela 4 Energias de dissociação (em kJ mol^{-1}) de moléculas diatômicas, a 298 K⁹.

Molécula	Energia de dissociação / kJ mol^{-1}
Ca-I	284,7
Ca-Ca	$16,52 \pm 0,11$
Ca-Cl	$409 \pm 8,7$
Sr-I	301
Sr-Sr	$16,64 \pm 1,12$
Sr-Cl	409
Ba-I	$322 \pm 6,3$
Ba-Cl	443
In-I	$306,9 \pm 1,1$
In-In	$82,0 \pm 5,7$
In-Cl	436 ± 8

A molécula CaI foi a que apresentou a maior supressão de sinal perante uma pequena concentração de cloro. Ao observar as energias de dissociação do reagente formador com o analito e com o interferente, nota-se uma grande disparidade entre essas: $284,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹ para a molécula CaI contra $409 \pm 8,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹ para a molécula CaCl. Esta diferença faz com que as moléculas formadas com o halogênio sejam mais estáveis do que as formadas com o analito. Esta influência significativa do halogênio sob a formação da molécula CaI também faz com que a precisão do método seja reduzida, uma vez que a concentração de um contaminante é bastante difícil de se controlar.

Além da competição pelo reagente formador com o interferente, a molécula CaI também sofre competição pela molécula diatômica formada pelo próprio reagente formador, no caso Ca-Ca. Contudo, a energia de dissociação desta é baixa: $16,52 \pm 0,11 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹.

A molécula Srl apresentou estabilidade térmica superior a molécula análoga de cálcio e inferior a molécula análoga de bário. O resultado pode ser novamente explicado pela energia de dissociação desta molécula: 301 kJ mol^{-1} ⁹, valor intermediário quando comparado aos valores de dissociação das moléculas supramencionadas. Esta molécula apresentou também menor influência à presença de cloro no ambiente do forno de grafite, fato explicado pela energia de dissociação da molécula SrCl – em torno de 409 kJ mol^{-1} ⁹, similar a molécula de CaCl. Porém, a energia de dissociação da molécula análoga de estrôncio é muito superior a análoga de cálcio, tornando a competição menos influente. A energia de dissociação da molécula diatômica formada pelo reagente formador, assim como para o cálcio, também é baixa: $16,64 \pm 1,12 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹.

A molécula Bal é a molécula que apresenta maior energia de dissociação: $322 \pm 6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹, sendo também a molécula que se mostrou mais termicamente estável dentre as estudadas. Contudo, a molécula BaCl também possui alta energia de dissociação, 443 kJ mol^{-1} ⁹, o que vai ao encontro dos resultados obtidos no estudo de interferentes: uma grande influência na supressão do sinal mesmo perante a pequenas concentrações adicionadas de cloro.

Já a molécula InI apresentou a mais baixa estabilidade térmica dentre as moléculas estudadas na condição estudada. Contudo, esta molécula apresenta energia de dissociação superior as moléculas de Cal e Srl: $306,9 \pm 1,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹. Mais uma vez, tem-se o indicativo de que os modificadores estudados podem não ser os apropriados para esta molécula, cabendo novos estudos.

Quanto a interferência causada pela presença do cloro, a molécula InI mostrou-se a menos suscetível entre as moléculas estudadas, embora a energia de dissociação da molécula InCl seja relativamente alta: $436 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹. Uma possível explicação para este fato é que o próprio reagente formador já é um competidor considerável – a energia de dissociação da molécula In-In é de $82,0 \pm 5,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ⁹, tornando o reagente formador menos disponível para a competição com cloro. Outra possível explicação para a baixa influência da presença de cloro

quanto à formação da molécula de InI pode ser a relação com a teoria de ácidos e bases de Pearson⁶⁰. Enquanto o iodo é uma base de Pearson macia, o cloro é considerado uma base de Pearson dura. Uma vez que o índio é um ácido de Pearson macio, há uma tendência maior de formação da molécula InI.

Outros elementos, além do próprio reagente formador e de outros halogênios, podem vir a interferir na formação das moléculas diatômicas com iodo, já que estas apresentam baixa energia de dissociação. Como foi mencionado anteriormente no estudo da molécula CaI, no qual foi observado experimentalmente a molécula CaH, estes elementos podem ser capazes de formar moléculas que irão competir com o reagente formador, ou mesmo formar moléculas com o próprio analito. A molécula de CaH, exibida anteriormente na Figura 8, apresenta uma energia de dissociação de 223 kJ mol^{-1} ⁹, significativamente alta, quando comparamos com a energia de dissociação da molécula CaI ($284,7 \pm 8,4 \text{ kJ mol}^{-1}$)⁹, sendo esta mais uma razão para se preferir reduzir a formação deste interferente do que simplesmente aplicar o método de correção pelo algoritmo de mínimos quadrados. Pode vir a ser disputado por estes interferentes: A molécula I-H tem energia de dissociação ainda mais alta que a molécula de CaI, cerca de 295 kJ mol^{-1} ⁹.

Outros elementos presentes no ambiente do forno de grafite podem vir a afetar a formação das moléculas estudadas. Dentre estes, podemos mencionar o hidrogênio e o oxigênio provenientes da água utilizada como solvente, o carbono constituinte do tubo de grafite, o nitrogênio atmosférico que não foi completamente purgado, além de outros constituintes da matriz. Por isso, cabe salientar a importância das otimizações de pirólise, vaporização e também do reagente formador, a fim de se evitar ao máximo a formação de outras moléculas causando a competição pelo reagente formador e pelo analito, que acabam por prejudicar a formação da molécula a ser monitorada⁶¹.

4.10 Validação do Método

Uma vez que o presente trabalho visa traçar um comparativo entre as moléculas diatômicas estudadas, os parâmetros referentes a validação de um método analítico podem servir como ferramentas para esta comparação. Um artigo publicado no ano de 2004 por Ribani *et al.*⁶² tem sido amplamente utilizado como base para validação de métodos, principalmente no meio acadêmico. Porém, os parâmetros são voltados principalmente para métodos cromatográficos e eletroforéticos. Dentro da legislação brasileira, a resolução da diretoria colegiada (RDC) 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA trás diversos parâmetros a serem seguidos para a validação de métodos analíticos voltados à indústria farmacêutica⁶³.

Embora os parâmetros estipulados sejam voltados principalmente para análises cromatográficas e espectrofotométricas, o documento permite o analista decidir alguns dos critérios a serem avaliados baseando-se na técnica na qual o método está sendo desenvolvido, desde que se tenha uma justificativa para tal. Para critérios acadêmicos e de publicação, normalmente aceitam-se as Figuras de Mérito – uma série de parâmetros que medem a performance do método desenvolvido. Dentre os parâmetros presentes se encontram alguns comumente observados em validações, como coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e faixa linear. Uma vez que até o presente momento, nenhum trabalho utilizando HR-MAS apresentou a validação do método, foram utilizadas como base a RDC 166/2017, já que os métodos desenvolvidos neste presente trabalho foram aplicados em amostras de fármacos e suplementos, e algumas validações publicadas utilizando AAS^{64,65}.

4.10.1 Linearidade

A linearidade é a propriedade que permite uma função matemática ser representada por uma reta:

$$y = f(x) \quad (4.5.1.1)$$

De acordo com a RDC 166/2017, a curva de calibração deve ser constituída por, no mínimo, cinco pontos de diferentes concentrações, estes preparados em triplicata. A linearidade de um método deve ser demonstrada pela sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, por toda a faixa de concentrações estudada e pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) (4.5.1.2)⁶³. Este coeficiente leva em consideração a medida da variância compartilhada entre duas variáveis, além de se assumir que um aumento ou diminuição em x causa um aumento ou diminuição em y , linearmente proporcional.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4.5.1.2)$$

O domínio da equação do coeficiente de Pearson varia de -1 a 1, no qual -1 significa uma correlação negativamente perfeita (com o aumento de x há uma diminuição de y em uma proporção perfeitamente linear) e 1 significa uma correlação positivamente perfeita (com o aumento de x há um aumento de y em uma proporção perfeitamente linear), sendo que $r=0$ representa uma situação em que não há qualquer correlação entre x e y . Segundo a RDC 166/2017 e as demais documentações que sustentam esta resolução, a linearidade deve ser avaliada pelo coeficiente de correlação linear, sendo que este deve ser maior que 0,99 para que a curva de calibração seja considerada linear.

Outro parâmetro exigido pela RDC 166/2017 é o coeficiente de determinação (r^2)⁶³, que mede o quão ajustados os dados estão em relação ao modelo estatístico utilizado, no presente caso, a regressão linear. O domínio da equação de r^2 apresenta valores entre 0 e 1, e estes valores representam, em porcentagem, o quanto o modelo estatístico consegue explicar os resultados experimentais.

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4.5.1.3)$$

Ainda segundo a RDC 166/2017, o documento admite que o valor mínimo para r^2 seja de 0,98, ou seja, o modelo estatístico consegue explicar 98% dos resultados experimentais ⁶³. Como pode ser observado na Tabela 4, os valores obtidos tanto o coeficiente de Pearson quanto o coeficiente de determinação foram muito acima do estipulado pela ANVISA, para todas as quatro moléculas estudadas neste presente trabalho. A molécula InI apresentou o menor valor para r e r^2 : 0,998 e 0,997. Ainda assim, os valores são considerados excelentes, não apenas quando comparados aos valores estipulados pela RDC 166/2017, mas também quando levado em consideração a técnica instrumental utilizada. A equação da reta, os valores para r e r^2 podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 Dados analíticos do mérito para a determinação de iodo via Bal, Cal, Inl e Srl em amostras de suplementos de iodo e levotiroxina usando HR-GF-MAS.

Parâmetro	Cal	Srl	Bal	Inl
Equação de regressão	$A_{\text{int}} = 0,0010 + 0,002x$	$A_{\text{int}} = 0,026 + 0,023x$	$A_{\text{int}} = 0,020 + 0,003x$	$A_{\text{int}} = 0,04 + 0,003x$
R	0,999	0,999	0,999	0,998
R ²	0,999	0,998	0,999	0,997

x: concentração em mg L⁻¹

Dentre o critério de linearidade, também é avaliada a homocedasticidade dos dados, parâmetro que avalia a variância dos erros experimentais. A observação de erros sistemáticos evita interpretações errôneas sobre o ajuste do modelo estatístico aos dados que ele explica. A análise qualitativa pode ser feita através de um gráfico de resíduos. Quando não é observada uma tendência ou comportamento, isto é, os pontos estão aleatoriamente distribuídos em torno do zero no gráfico de resíduos, têm-se o indício de que a variância dos resíduos é homoscedástica.

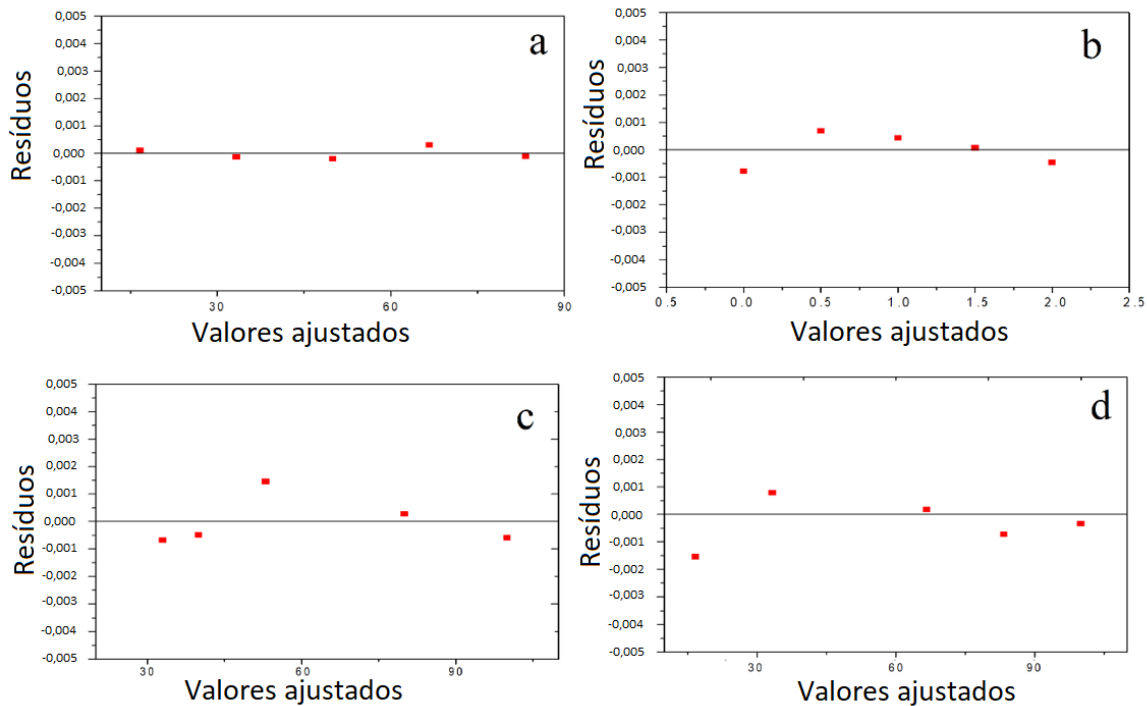


Figura 18 Gráfico de resíduos para as curvas de calibração externa com padrões aquosos de iodo e do respectivo reagente formador para a determinação de iodo *via* a) Cal; b) Srl; c) Bal e d) Inl.

Como é possível observar na Figura 18, as curvas de calibração externa com padrões aquosos para Cal (Figura 18-a), Srl (Figura 18-b), Bal (Figura 18-c) e Inl (Figura 18-d) não apresentaram comportamento ou tendência significativos, uma vez que os valores dos resíduos se mostraram bastante homogêneos.

Ainda sobre os critérios de avaliação da linearidade, deve-se observar a significância do coeficiente angular. A significância garante que a relação entre a variável dependente e independente não seja mera coincidência. É possível testar a significância do coeficiente angular comparando os valores de t calculado com os valores de t crítico. O valor de t calculado é baseado no p-valor encontrado e levando em consideração os n-2 graus de liberdade do experimento, no qual n é o número de pontos que formam a curva a ser avaliada. O parâmetro B é desconhecido, então é simplificado como $B = 0$ e o parâmetro b é a inclinação da

curva de calibração. Aceita-se como hipótese nula que as variáveis x e y não são relacionadas, ($H_0: b = 0$ e $H_1: b \neq 0$).

$$p - \text{valor} = \frac{a-B}{sb} \quad (4.5.1.4)$$

Se t calculado > t crítico: rejeita H_0 e b é válido $\neq 0$.

Se t calculado < t crítico: aceita H_0 e b não é válido = 0.

Para as curvas de calibração para as moléculas estudadas, todas apresentam 3 graus de liberdade ($n=5$). Considerando $p = 0,05$, $t(3) = 3,18245$. Os resultados obtidos para cada curva de calibração estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 Valores de t calculado obtidos à partir do coeficiente linear das curvas de calibração externas aquosas para iodo *via* moléculas Cal, Srl, Bal e Inl.

	Cal	Srl	Bal	Inl
t calculado	18,98090	29,13125	55,54503	28,83571

Como esperado, os valores de t calculado foram superiores ao valor de t crítico, o que confirma a hipótese H_1 , em que o coeficiente angular é significativo, e que existe uma relação linear entre x e y, e não apenas dados coincidentes.

4.10.2 Limites de quantificação e detecção

Há diversas formas de se calcular os limites de detecção e quantificação para um determinado método. Uma das formas tradicionais de se calcular é através de múltiplos da altura do ruído. Para o limite de detecção (LOD) é estipulada uma altura superior a três vezes a altura do sinal ruído, enquanto o limite de quantificação (LOQ) seria o múltiplo de 10 dessa altura. A RDC 166/2017 estipula que o LOD e o LOQ podem ser calculados utilizando as fórmulas (4.5.5.1) e (4.5.5.2).

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{a} \quad (4.5.5.1) \quad \text{e} \quad LOQ = \frac{10\sigma}{a} \quad (4.5.5.2)$$

Sendo α coeficiente angular da curva de calibração e σ podendo ser calculado de três diferentes formas: (i) a partir do desvio padrão residual da linha de regressão; (ii) a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração, contendo pontos de concentração próxima ao suposto LOD; ou (iii) a partir do desvio padrão de um número apropriado de leituras do branco. A IUPAC recomenda no mínimo seis leituras do branco⁶⁶, sendo comumente utilizado o desvio padrão de dez leituras do branco. Uma vez que esta última é a abordagem mais comumente utilizada no meio acadêmico, foi escolhida para o cálculo do LOD e LOQ dos métodos propostos. Os resultados obtidos estão expressos em termos absolutos e em termos de concentração (calculados para 0,3 g de amostra), conforme exibido na Tabela 7.

Tabela 7 Limites de detecção calculados a partir de 10 leituras do branco da amostra utilizando HR-GF MAS *via* moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl. Valores calculados para 0,3 g de amostra.

	Cal		Srl		Bal		Inl	
	ng	$\mu\text{g g}^{-1}$	ng	$\mu\text{g g}^{-1}$	ng	$\mu\text{g g}^{-1}$	ng	$\mu\text{g g}^{-1}$
LOD	54	180	20	66	60	200	36	120
LOQ	180	600	66	220	200	666	120	400

Os valores de LOD obtidos para as moléculas de Cal, Srl e Bal podem ser comparadas com valores já apresentados na literatura^{7,10}. Huang et al.¹⁰ apresentaram LOD de 600 pg, valores cem vezes mais baixos que os obtidos no presente trabalho. Esta diferença dá-se pelo fato do trabalho apresentado por Huang *et al.*¹⁰ utilizar análise direta de sólidos, no qual não há fator de diluição. Já Zanatta *et al.*⁷ apresentaram valores de LOD de 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 21 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cal e Srl respectivamente. Estes valores foram aproximadamente 4 e 3 vezes menores que

os obtidos pelo presente método para Cal e Srl, respectivamente. A diferença entre os valores encontrados pelos métodos propostos neste trabalho e os apresentados por Zanatta *et al.*⁷ não são exorbitantemente discrepantes, podendo estar associados com a condição instrumental, como baixa intensidade da lâmpada, o que acarretaria em um aumento do ruído e conseqüentemente dos valores de LOD.

4.10.3 Faixa de trabalho

A RDC 166/2017 estipula diversos critérios para a construção da faixa de trabalho. Estes critérios se baseiam na aplicabilidade do método (para medida de teor, uniformidade de conteúdo, dissolução e impurezas) e estão baseadas no teor de analito em determinado fármaco, ou no perfil de dissolução. Além disso, a curva deve ser linear em todo o intervalo selecionado, de acordo com os parâmetros já apresentados na seção 4.5.1⁶³. Os intervalos de concentração, expressos em termos de massa absoluta de iodo, estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 Faixa de trabalho (massa de iodo absoluta, em nanogramas) para as curvas de calibração externas aquosas para iodo utilizando HR-GF MAS *via* moléculas Cal, Srl, Bal, e InI.

	Cal	Srl	Bal	InI
Faixa de trabalho /ng	180 – 2000	70 – 2000	200 – 2000	120 – 2000

Uma vez que foi apenas realizada a medida da concentração de iodo em comprimidos de levotiroxina e em suplementos de iodo à base de KI, foi utilizado como critério para a seleção da faixa de trabalho concentrações desde o limite de quantificação a um ponto alto o suficiente que permitisse que diversos preparos da mesma amostra estivessem no intervalo selecionado como faixa de trabalho. Uma vez que diferentes concentrações do analito/diferentes diluições da amostra fizeram parte do estudo do método, e por isso, a necessidade de uma longa faixa de trabalho.

4.10.4 Precisão

Segundo a RDC 166/2017, precisão é o critério que avalia a proximidade dos resultados obtidos para amostras preparadas da mesma forma, utilizando o mesmo método analítico. Este parâmetro deve ser expresso em termos da repetibilidade, precisão intermediária ou da reprodutibilidade ⁶³.

Ainda com base na RDC 166/20017, precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados (desvio padrão relativo) obtidos a partir de uma série de medições específicas e então calculado o desvio padrão relativo para o grupo de resultados. Os resultados devem ser obtidos a partir de medições de nove amostras preparadas de forma independente: três de concentração do analito acima da concentração esperada para o insumo farmacêutico ativo (IFA) ou produto acabado a ser analisado pelo método, três na concentração esperada e três abaixo. Também podem ser obtidos a partir de seis replicadas independentes da concentração esperada do analito ⁶³.

Para caráter de validação de método junto à ANVISA, utiliza-se para o preparo das amostras a matriz (que se resume a tudo que é acrescido ao produto acabado, com exceção do próprio ativo) fortificado com uma substância química de referência (padrão do analito), no caso da validação de um método para a análise de produto acabado. Para a análise de um IFA, utiliza-se a substância química de referência acrescida das impurezas conhecidas. Uma vez que não é o objetivo do presente trabalho validar os métodos desenvolvidos junto aos órgãos de fiscalização, foi utilizada a mesma amostra de suplemento utilizada na aplicação do método.

Os critérios de aceitação devem ser justificados levando em consideração a variabilidade intrínseca do método proposto, a concentração do analito e o objetivo do método proposto. Para critérios de publicação no meio acadêmico, embora não se tenha uma regra específica, e sim uma convenção entre usuários da técnica, métodos utilizando GF-AAS e amostras em líquidas, consideram-se aceitáveis

desvios padrões relativos de até 10% enquanto para a análise direta de sólido, consideram-se aceitáveis valores de até 20%⁶⁷.

Para o estudo da repetibilidade dos métodos propostos para as quatro moléculas diatômicas de iodo, foram preparadas três amostras em triplicata contendo 0,1 g, 0,3 g e 0,5 g em 1,3 mL de 1-propanol para as amostras de levotiroxina (concentração de iodo aproximada de 61,5 mg L⁻¹, 185 mg L⁻¹ e 308 mg L⁻¹, respectivamente) e de suplemento de iodo (concentração de iodo aproximada de 100 mg L⁻¹, 300 mg L⁻¹ e 500 mg L⁻¹, respectivamente). Os desvios padrão relativos encontrados para cada molécula estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 Desvio padrão relativo calculado para as replicatas das amostras de iodo utilizando HR-GF MAS *via* moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.

	Cal / %	Srl / %	Bal / %	Inl / %
Levotiroxina	6,4	5,1	6,2	4,3
Suplemento de iodo	7,7	4,3	5,7	3,5

A RDC 166/2017 sugere o estudo da reprodutibilidade apenas em casos em que há estudos colaborativos entre diferentes laboratórios. Já a precisão intermediária (*inter-dia*) deve ser executada no mínimo em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes, utilizando a mesma instrumentação e condições. Além disto, devem seguir os mesmos critérios utilizados no estudo da repetibilidade ⁶³. Os resultados obtidos para a precisão intermediária dos métodos propostos estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 Desvio padrão relativo calculado para as replicatas de padrão aquoso de iodo utilizando HR-GF MAS *via* moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl, obtidos por diferentes analistas em dias distintos.

	Cal / %	Srl / %	Bal / %	Inl / %
Levotiroxina	9,3	8,1	8,8	7,7
Suplemento de iodo	8,7	7,3	7,7	6,8

Como é possível observar pelos dados apresentados na Tabela 8 e na Tabela 9, o método desenvolvido para a molécula Cal apresentou o maior RSD dentre as moléculas estudadas, dentro do ensaio de precisão, embora dentro do aceitável para a técnica. Uma possível explicação pode ter sido a contaminação por cloro durante a manipulação das amostras e o preparo das soluções, uma vez que a formação desta molécula é prejudicada mesmo com a presença de pequenas quantidades do halogênio, sendo este um contaminante comum devido sua presença no suor humano, ar atmosférico e na água. Tal suposição é reforçada pelo fato de a molécula Inl ter apresentado a menor variação dentre as moléculas estudadas e também ser a que apresentou maior tolerância à interferência causada por cloro.

Os resultados para o ensaio de precisão intermediária estão dentro do tolerado para a técnica. Os resultados também mostram que a precisão é pouco afetada pelas diferentes proporções de amostra diluída, ou seja, a concentração da matriz pouco afeta o desempenho do método.

4.10.5 Exatidão

Exatidão é o parâmetro que demonstra o quão próximo os valores obtidos experimentalmente estão de um valor aceito como real. De acordo com a RDC 166/2017, a exatidão deve ser medida em nove amostras, em três níveis de concentrações diferentes. A forma como a verificação da exatidão deve ser

executada depende do propósito do método (análise de impurezas, IFA ou produto acabado)⁶³.

Uma vez que os métodos desenvolvidos no presente trabalho serão aplicados em produto acabado, os procedimentos de validação serão os específicos para esse tipo de amostra. A legislação define três formas para a verificação da exatidão: adição de quantidades conhecidas de padrão na amostra de produto acabado; comparação dos resultados obtidos com o método proposto e um método já validado ou; aplicação do método proposto em uma amostra produzida à partir da matriz (sem o ativo) fortificada com substância química de referência, sendo esta última, amplamente utilizada nos laboratórios farmacêuticos, tanto na validação de métodos para IFA quanto para produto acabado.

Como não é possível ter acesso as concentrações exatas de todos os componentes que são adicionados a matriz do medicamento, e como o mérito deste trabalho é principalmente avaliar a performance das moléculas diatômicas com iodo como forma de determinação indireta, fugiria do escopo do trabalho uma comparação com outra técnica analítica para a determinação de iodo apenas. A maneira mais viável de se verificar a exatidão neste caso, é através da adição de quantidades conhecidas de padrão a amostra a ser analisada. Na Tabela 10 estão dispostos os resultados obtidos para a recuperação dos valores adicionados na amostra de levotiroxina e suplemento de iodo. As amostras para este ensaio foram preparadas adicionando 0,3 g de levotiroxina ou suplemento de iodo a 1,3 mL de soluções de iodo em 1-propanol nas concentrações de 5 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 150 mg L⁻¹ de iodo, de forma que as amostras tivessem concentrações finais de iodo de aproximadamente 190 mg L⁻¹, 235 mg L⁻¹ e 335 mg L⁻¹ para levotiroxina, e 305 mg L⁻¹, 350 mg L⁻¹ e 450 mg L⁻¹, para suplemento de iodo, respectivamente.

Tabela 11 Porcentagem de recuperação das concentrações fortificadas de iodo em amostra de levotiroxina e de suplemento de iodo, utilizando HR-GF MAS *via* moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.

Concentração adicionada	Levotiroxina / %				Suplemento de iodo / %			
	Cal	Srl	Bal	Inl	Cal	Srl	Bal	Inl
5 mg L ⁻¹	68	89	82	106	88	105	80	92
50 mg L ⁻¹	77	99	100	102	72	90	80	82
150 mg L ⁻¹	82	112	80	98	104	92	103	88

Uma vez que não havia nenhuma amostra com concentrações do analito baixas o suficiente para se fazer o estudo de recuperação nas concentrações próximo do limite de quantificação, no meio da curva de calibração e no final da faixa de trabalho, foram escolhidas três concentrações, de forma que abrangesse o meio da curva de calibração e o final da faixa de trabalho, além de um valor intermediário.

Os resultados obtidos demonstraram um bom nível de recuperação para todas as moléculas. Novamente, a molécula Cal foi a que apresentou resultados mais divergentes quando comparados as outras moléculas. O nível de recuperação variou de 68 a 82 para a amostra de levotiroxina e de 72 a 104 para a amostra de suplemento de iodo. Já as moléculas Srl e Inl apresentaram as menores variações. Srl apresentou valores de 89 a 112 para a levotiroxina e de 90 a 105 para o suplemento de iodo, enquanto Inl apresentou valores de 98 a 106 para a levotiroxina e 88 a 92 para o suplemento de iodo. A amostra de levotiroxina apresentou resultados mais variados, tanto no estudo de precisão quanto de exatidão. A razão

para isto é que enquanto a amostra de suplemento de iodo forma uma mistura homogênea com 1-propanol, a amostra de levotiroxina está na forma de suspensão.

A ANVISA não estipula qual o intervalo aceitável de recuperação, sendo que os critérios de aceitação devem ser justificados em termos da proposta do método. Para fins acadêmicos, leva-se em consideração a complexidade da matriz, o comportamento do analito e a técnica utilizada. Não é incomum de ver artigos na área de espectrometria de absorção atômica e espectrometria de absorção molecular de alta resolução apresentando e considerando aceitáveis valores entre 80 a 120 de recuperação^{68,69}. O único ensaio de recuperação que apresentou resultados abaixo do esperado foi a amostra de levotiroxina, quando a molécula Cal foi utilizada.

4.10.6 Efeito Matriz

O efeito matriz deve ser avaliado a fim de se garantir a compatibilidade entre a resposta analítica fornecida pela amostra e pelo padrão utilizado para a calibração, no caso de uma calibração externa utilizando padrões. Segundo a RDC 166/2017, deve-se construir duas curvas de calibração sendo uma utilizando a substância química de referência em um solvente e outra com a amostra fortificada com a substância química de referência. Ambas devem conter cinco pontos dentro da linearidade e o coeficiente angular da curva de calibração externa e da curva de calibração obtida pela adição gradual de analito na amostra devem ser estatisticamente iguais, considerando significância de 5 no teste de hipóteses⁶³. Para isto, foi realizado o teste t-student e calculado o p-valor (probabilidade de significância, p) conforme a fórmula (4.5.1.4). Os resultados podem ser observados na Tabela 12.

Uma vez que todos os valores de p foram superiores a 0,05, a diferença entre os coeficientes angulares das curvas construídas com o padrão aquoso e com as amostras fortificadas não são significantes. Este resultado já era esperado, uma

vez que o ensaio de exatidão (seção 4.5.4) apresentou valores dentro do aceitável para todas as moléculas testadas com ambas as amostras.

4.10.7 Robustez

Robustez é a capacidade de um método de resistir a pequenas e deliberadas variações em seus parâmetros analíticos⁶². Estatisticamente, a significância destas variações pode ser avaliada utilizando o Teste de Youden, que consiste em uma matriz experimental, em que os resultados são avaliados e então é verificado não apenas se a alteração casou variação significativa no resultado, mas também ponderar o quão significativa foi essa alteração. Porém a ANVISA não exige a aplicação do Teste de Youden, mas sim que seja avaliada as variações dos resultados por meio de um teste-t usando os mesmos critérios utilizados na exatidão do método a ser validado (os experimentos devem ser feitos em triplicata em três níveis de concentração). A seção IX da RDC 166/2017 também traz dois importantes adendos: testes adicionais podem ser executados caso existam mais parâmetros que possam afetar a robustez e que não estão descritos no Anexo III deste documento, assim como os testes descritos podem não ser executados, desde que haja justificativa para isto ⁶³.

Como não há nenhum teste para a espectrometria de absorção atômica ou molecular descrito no Anexo III, foram selecionados alguns parâmetros a serem avaliados: temperatura de vaporização (de 2300 °C e 2500 °C para Cal, Srl e Bal, de 1700 °C e 1900 °C para InI), tempo na temperatura máxima da etapa de pirólise (de 15 s a 25 s) e volume injetado de amostra (de 4 µL a 6 µL e os resultados calculados normalizados em relação a massa absoluta de iodo). Os testes foram realizados em triplicata, utilizando amostras contendo as concentrações aproximadas de iodo de 190 mg L⁻¹, 235 mg L⁻¹ e 335 mg L⁻¹ para levotiroxina, e 305 mg L⁻¹, 350 mg L⁻¹ e 450 mg L⁻¹, para suplemento de iodo, respectivamente. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos pelos métodos propostos. Os resultados obtidos estão exibidos na Tabela 13.

Os resultados obtidos para os níveis acima e abaixo do otimizado foram considerados aceitáveis, levando em consideração a incerteza intrínseca dos métodos desenvolvido. A única ressalva fica por conta do teste envolvendo a temperatura de vaporização, em que a molécula de I₂ apresentou uma variação significativa nos níveis estudados. Isto já era esperado, uma vez que a molécula se mostrou pouco estável termicamente no estudo de temperaturas de pirólise e vaporização.

4.11 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado em duas amostras de medicamentos com iodo na composição, ambos adquiridos em farmácias no Brasil. O suplemento de iodo é apresentado na forma de cápsulas de KI em meio de óleo de soja, enquanto a levotiroxina é apresentada na forma de comprimidos de levotiroxina sódica, amido de milho, esterato de magnésio, lactose e croscamelose sódica. Os valores informados pelo fabricante e os valores encontrados com cada uma das moléculas está apresentado na Tabela 14.

As quatro moléculas diatômicas apresentaram valores de concentração satisfatórios quando comparados com os valores informados. Uma vez que o iodo nestes dois fármacos se apresenta de formas diferentes (iodo inorgânico no suplemento de iodo e iodo orgânico no suplemento de levotiroxina) o método desenvolvido pode ser aplicado tanto em formas químicas orgânicas e inorgânicas do analito, sendo necessária apenas a observação das concentrações de halogênios, e uma vez que essas concentrações são conhecidas (como previamente mencionado, existem diversos métodos para determinação de flúor, cloro e bromo por HR-MAS²), é possível uma calibração por semelhança de matriz.

Tabela 12 P-valor (p) para o teste de hipóteses para a verificação do paralelismo entre as curvas de calibração para padrão aquosos de iodo (m) e em amostra fortificada de levotiroxina ou de suplemento de iodo (n), utilizando HR-GF MAS via moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl.

	Cal			Srl			Bal			Inl		
	m	n	p	M	n	p	M	n	p	m	n	p
Levotiroxina	0,0021	0,0019	0,37	0,023	0,023	0,74	0,0033	0,0032	0,74	0,0032	0,0033	0,42
Suplemento	0,0021	0,0020	0,56	0,023	0,022	0,87	0,0033	0,0032	0,39	0,0032	0,0031	0,69

Tabela 13 Teste de robustez para os métodos desenvolvidos utilizando HR-GF MAS via moléculas Cal, Srl, Bal, e Inl. Os parâmetros foram avaliados em um nível abaixo do otimizado (-1), um nível acima (+) e comparado com os resultados obtidos para o parâmetro otimizado. Resultados normalizados em relação ao obtido com os métodos propostos.

	Cal / %		Srl / %		Bal / %		Inl / %	
	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
Temperatura de vaporização	8	3	3	3	6	6	10	12
Tempo da etapa de pirólise	7	6	6	6	5	7	5	7
Volume da amostra	8	7	5	5	5	6	4	3

Tabela 14 Determinação de iodo via Cal, Srl, Bal e Inl em amostras de suplementos de iodo e levotiroxina usando HR-GF-MAS e análise de amostra direta com calibração contra padrões aquosos. Os valores representam a média de cinco medidas \pm SD, n = 5.

Amostra	Cal/ mg g ⁻¹	Srl/ mg g ⁻¹	Bal/ mg g ⁻¹	Inl / mg g ⁻¹	Informado* / mg g ⁻¹
Suplemento de iodo	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,8
Levotiroxina	1,7 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,3

*Valores conforme indicado pelo fabricante

Os métodos desenvolvidos se mostraram estáveis e passíveis de aplicação em amostras de fármacos, medicamentos ou outras matrizes que contenham concentrações baixas de outros halogênios, uma vez que a eficiência de geração da molécula de interesse é afetada pela presença destes interferentes.

Ainda sobre a ação de outros halogênios sobre as moléculas, este pode ser um parâmetro importante na hora de escolher o método a ser utilizado. A molécula de InI seria a mais indicada para ser utilizada em amostras com um maior teor de halogênios e matrizes voláteis. Esta molécula apresentou a maior sensibilidade entre todas, além de um dos mais baixos limites de detecção entre as moléculas estudadas. Contudo, não é indicada se esta amostra apresentar uma matriz dificilmente eliminada em baixas temperaturas, pois a molécula InI apresenta baixa estabilidade térmica.

O método desenvolvido para a molécula Cal seria o menos indicado para amostras contendo halogênios, uma vez que apresentou baixíssima tolerância a estes interferentes. Esta molécula apresenta boa estabilidade térmica e sinais analíticos intensos, mas apresentou baixa sensibilidade e pode levar a supressão de sinal se as concentrações de interferentes forem altas ou desconhecidas.

Já a molécula Srl apresentou boa estabilidade térmica e uma tolerância relativamente alta à presença de halogênios. Esta molécula também apresentou baixos limites de detecção e quantificação e a segunda maior sensibilidade entre os métodos desenvolvidos. Embora possa sofrer interferências com altas concentrações de halogênios, em um geral o método desenvolvido para a molécula Srl apresentou resultados que indicam ser um método de maior aplicabilidade, quando comparado com os outros métodos desenvolvidos.

A molécula Bal apresentou alta estabilidade térmica e sensibilidade comparável a da molécula Srl, porém se mostrou suscetível a interferências, mesmo com baixas concentrações dos halogênios. O método desenvolvido para esta molécula também

apresentou os limites de detecção e quantificação mais altos entre todos os métodos desenvolvidos neste presente trabalho.

5 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos quatro métodos para a determinação de iodo por HR-MAS utilizando as moléculas Cal, Srl, Bal e Inl. Cada método conta com suas próprias particularidades, podendo limitar o uso do método para amostras com quantidades maiores ou menores de interferentes ou mesmo em termos de concentração de analito.

A molécula Cal apresentou interferência em seu principal comprimento de onda. Porém, pode ser contornada com a utilização de irídio como modificador permanente. Embora a presença da molécula CaH não tenha sido observada em nenhuma das amostras, quando utilizado o método otimizado, cabe salientar que a região espectral utilizada no método proposto é passível de interferência causada pelo próprio reagente formador e em casos no qual a sensibilidade não é um fator determinante, pode-se utilizar comprimentos de onda secundários. Também foi a molécula mais suscetível a interferência por cloro, podendo ser um limitante para a utilização deste método.

As moléculas Bal e Srl não apresentaram interferências e mostraram boa estabilidade térmica. Os resultados obtidos durante a validação foram considerados aceitáveis, sendo boas opções para a determinação de iodo em amostras de fármaco. A molécula Srl apresentou sensibilidade aproximadamente dez vezes superior a molécula Bal, podendo este ser o critério de escolha entre os métodos. A molécula Bal também se mostrou mais suscetível à presença de cloro, sendo esta menos indicada em amostras que contenham o halogênio.

A molécula Inl apresentou resultados similares as molécula Cal e Bal em termos de sensibilidade. No entanto, a baixa estabilidade térmica da molécula limita a aplicação do método a amostras que não sejam compostas por uma matriz complexa, já que a baixa temperatura de pirólise tolerada pelo método sem perdas significativas da resposta analítica pode não ser suficiente para a eliminação de

concomitantes. Contudo, a molécula apresentou a maior tolerância a presença de cloro.

Os métodos apresentados foram validados baseando-se no documento RDC 166/2017 da ANVISA. Todas as moléculas apresentaram resultados satisfatórios, principalmente quando considerada as particularidades de cada método. A molécula de InI apresentou a maior precisão, tanto no ensaio de precisão intermediária quanto no ensaio de repetibilidade. A molécula Cal apresentou resultados não tão precisos, mas a presença de cloro no ar atmosférico pode ser a causa do problema, uma vez que este método é afetado mesmo por pequenas concentrações do halogênio.

A exatidão dos métodos propostos também foi verificada conforme os parâmetros estabelecidos pela RDC 166/2017 e a aplicação do método foi realizada em amostras de levotiroxina e de suplemento de iodo, sendo que os resultados obtidos pelos métodos propostos foram comparados com os valores fornecidos pelos fabricantes. Todas as moléculas alcançaram resultados considerados aceitáveis levando em consideração a incerteza intrínseca dos métodos propostos. Quando comparados aos valores fornecidos pelo fabricante, todas as moléculas obtiveram resultados estatisticamente aceitáveis a um nível de confiança de 95.

Das possibilidades futuras para os métodos desenvolvidos, está a utilização de diferentes preparos de amostras, ou a combinação de técnicas como a geração fotoquímica de vapor, a fim de se obter o isolamento do iodo, evitando interferências causadas por halogênios ou outros componentes da matriz, permitindo assim a utilização de baixas temperaturas de pirólise.

6 REFERÊNCIAS

1. Welz, B. & Sperling, M. *Atomic absorption spectrometry*. (Wiley-VCH, 1999). doi:10.1002/9783527611690.
2. Welz, B., Lepri, F. G., Araujo, R. G. O., Ferreira, S. L.C., Huang, M. D., Okruss, M. & Becker-Ross, H. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces-A review. *Anal. Chim. Acta* **647**, 137–148 (2009).
3. Butcher, D. J. Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review. *Anal. Chim. Acta* **804**, 1–15 (2013).
4. Bernhard Welz, Helmut Becker-Ross, Stefan Florek & Uwe Heitmann. *High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry*. (Wiley-VCH, 2005). doi:10.1002/3527606513.
5. Pena-Pereira, F., Lavilla, I. & Bendicho, C. Headspace single-drop microextraction coupled to microvolume UV-vis spectrophotometry for iodine determination. *Anal. Chim. Acta* **631**, 223–228 (2009).
6. Rao, R. R. & Chatt, A. Microwave Acid Digestion and Preconcentration Neutron Activation Analysis of Biological and Diet Samples for Iodine. *Anal. Chem.* **63**, 1298–1303 (1991).
7. Zanatta, M. B. T., Nakadi, F. V. & da Veiga, M. A. M. S. Cal and Srl molecules for iodine determination by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry: Greener molecules for practical application. *Talanta* **179**, 563–568 (2018).
8. Schneider, M., Welz, B., Huang, M. D., Becker-Ross, H, Okruss, M. & Carasek, E. Iodine determination by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry – A comparison between potential molecules. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **153**, 42–49 (2019).

9. Linde, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*. vol. 130 (CRC PRESS, 2008).
10. Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Okruss, M., Welz B & Morés, S. Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **64**, 697–701 (2009).
11. Hetzel, B. S. Iodine deficiency disorders (IDD) and their eradication. *Lancet* **322**, 1126 – 1129 (1983).
12. Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., & Pandav, C. S. Iodine-deficiency disorders. *The Lancet*, **372**(9645), 1251–1262. (2008).
13. Haldimann, M., Alt, A., Blanc, A. & Blondeau, K. Iodine content of food groups. *J. Food Compos. Anal.* **18**, 461–471 (2005).
14. American Thyroid Association. Iodine Deficiency. <https://www.thyroid.org/iodine-deficiency/>.
15. *Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA*.
16. Instituto Fiocruz. Problemas Causados pela deficiência de sais minerais. <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/saisminerais.htm>.
17. Soldin, O. P. *Controversies in urinary iodine determinations*. (2002).
18. United States Environmental Protection Agency. *Methods for chemical analysis of waters and waste*. EPA 600/4-79/020 (1979).
19. Sandell, E. B., & Kolthoff, I. M. (1934). CHROMOMETRIC CATALYTIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF MICRO QUANTITIES OF IODINE. *Journal of the American Chemical Society*, **56**(6), 1426–1426. (1934).
20. Jopke, P., Bahadir, M., Fleckenstein, J., & Schnug, E. (1996). Iodine

determination in plant materials. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **27**(3–4), 741–751. (1996).

21. Altinata, A., Pekin, B., & Ülgü, S. Determination of iodine using a kinetic method with an iodide ion-selective electrode. *The Analyst*, **102**(1220), 876. (1977).
22. András, E., Kučera, J., Bélavári, C., & Mizera, J. Determination of iodine in human brain by epithermal and radiochemical neutron activation analysis. *Microchemical Journal*, **85**(1), 157–163. (2007).
23. Bichsel, Y., & von Gunten, U. Determination of Iodide and Iodate by Ion Chromatography with Postcolumn Reaction and UV/Visible Detection. *Analytical Chemistry*, **71**(1), 34–38 (1999).
24. Todorov, T. I., & Gray, P. J. Analysis of iodine in food samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–9 (2016).
25. Mesko, M. F., Mello, P. A., Bizzi, C. A., Dressler, V. L., Knapp, G., & Flores, É. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**(2), 1125–1131 (2010).
26. Jamari, N. L. A., Dohmann, J. F., Raab, A., Krupp, E. M. & Feldmann, J. Novel non-target analysis of fluorine compounds using ICPMS/MS and HPLC-ICPMS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **32**, 942–950 (2017).
27. Ozbek, N. & Akman, S. Determination of fluorine in milk samples via calcium-monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry. *Food Chem.* **138**, 650–654 (2013).
28. de Gois, J. S., Van Malderen, S. J. M., Cadorn, H. R., Welz, B. & Vanhaecke, F. A comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass

spectrometry and high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry for the direct determination of bromine in polymers. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **132**, 50–55 (2017).

29. Pereira, E. R., Merib, J., Cadornim, H. R., Schneider, M., Carvalho, G. S., Duarte, F. A. Welz, B., Menoyo, J. del C. & Feldmann, J. Development of a fast screening method for the direct determination of chlorinated persistent organic pollutants in fish oil by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Food Control* **78**, 456–462 (2017).
30. Antes, F. G., Dullius, E. da C., Ben, A. M, Rolf ,F., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M. & Dressler, V. L. Development of a vaporization system for direct determination of chlorine in petroleum coke by ICP-MS. *Microchem. J.* **109**, 117–121 (2013).
31. Profrock, D. & Prange, A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. *Appl. Spectrosc.* **66**, 843–868 (2012).
32. Tabela periódica com espectro de emissão dos elementos. <https://www.tabelaperiodica.org/tabela-periodica-com-espectros-de-emissao-atomica-dos-elementos/>.
33. Dittrich, K., Hanisch, B. & Stärk, H. J. Molecule formation in electrothermal atomizers: Interferences and analytical possibilities by absorption, emission and fluorescence processes. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **324**, 497–506 (1986).
34. Dittrich, K., Hanisch, B. & Stärk, H. J. Molecule formation in electrothermal atomizers: Interferences and analytical possibilities by absorption, emission and fluorescence processes. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **324**, 497–506 (1986).
35. Naozuka, J., da Veiga, M. A. M. S., Oliveira, P. V. & de Oliveira, E.

- Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES. *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 917–921 (2003).
36. Pereira, J.S.F., Mello, P.A., Moraes, D.P., Duarte, F.A., Dressler, V.L., Knap, G. & Flores, É. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **64**, 554–558 (2009).
 37. Welz, B., Mores, S., Carasek, E., Vale, M. G., Okruss, M. & Becker-Ross, H. *High-Resolution Continuum Source Atomic and Molecular Absorption Spectrometry --- A Review. Applied Spectroscopy Reviews - APPL SPECTROSC REV* vol. 45 (2010).
 38. Pearse, R. W. & Gaydon, A. G. *The Identification of Molecular Spectra.* (Chapman & Hall, 1963).
 39. Geisler, S., Okruss, M., Becker-Ross, H., Huang, M. D., Esser, N. & Florek, S. Spectrometer system using a modular echelle spectrograph and a laser-driven continuum source for simultaneous multi-element determination by graphite furnace absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **107**, 11–16 (2015).
 40. Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Abad, C. & Okruss, M. Investigation of high-resolution absorption spectra of diatomic sulfides of group 14 elements in graphite furnace and the comparison of their performance for sulfur determination. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **135**, 15–21 (2017).
 41. Nakadi, F. V., da Veiga, M. A. M. S., Aramendía, M., García-Ruiz, E., & Resano, M. Br isotope determination via the monitoring of CaBr transitions using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. Potential for direct determination of Br in solid samples using isotope dilution. *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 1381–1390 (2016).

42. Cadornim, H., Gois, J. de, Borges, A. & Vale, M.G. Determination of fluorine in copper concentrate via high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis—comparison. *Talanta* **176**, 178–186 (2017).
43. Schneider, M., Cadornim, H. R., Welz, B., Carasek, E. & Feldmann, J. Determination of arsenic in agricultural soil samples using High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Talanta* **188**, (2018).
44. Nomura, C. S., Da Silva, C. S. & Oliveira, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: Uma revisão. *Quimica Nova* vol. 31 104–113 (2008).
45. Oliveira, E. de. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 174–182 (2003).
46. Pereira, R. M., Costa, V. C., Hartwig, C. A., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., Duarte, F. A., & Mesko, M. F. Feasibility of halogen determination in noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion. *Talanta*, **147**, 76–81 (2016).
47. Enders, M. S. P., Gomes, A. O., Oliveira, R. F., Guimarães, R. C. L., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., & Müller, E. I. Determination of Chlorine in Crude Oil by High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry Using AlCl, InCl, and SrCl Molecules. *Energy & Fuels* **30**, 3637–3643 (2015).
48. Cadornim, H. R., Pereira, É. R., Carasek, E., Welz, B. & De Andrade, J. B. Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace. *Talanta* **146**, 203–208 (2016).

49. Yeh, T. S., Hung, N. H. & Lin, T. C. Analysis of iodine content in seaweed by GC-ECD and estimation of iodine intake. *J. Food Drug Anal.* **22**, 189–196 (2014).
50. Grinberg, P., & Sturgeon, R. E. Photochemical vapor generation of iodine for detection by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 508–514 (2009).
51. Jaguaribe, D., Lopes, F., Espínola, J., Barreto, M. Clean ION-Exchange for Selective Removal of Chloride and Potassium Using IXISS Effect. <http://imisrise.tappi.org/TAPPI/Products/FAL/FAL03174.aspx> (2003).
52. Froes, R. E. S., Windmüller, C. C. & Silva, J. B. B. Emprego da Modificação Química Permanente para a Determinação de Metais em Matrizes Diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. *Rev. Anal.* 32–43 (2006).
53. Volynsky, A. B. Mechanisms of action of platinum group modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **55**(2), 103–150 (2000)..
54. Tsalev, D. L., Slaveykova, V. I., Lampugnani, L., D’Ulivo, A. & Georgieva, R. Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry - advances, anticipations and reality. *Spectrochim. acta, Part B At. Spectrosc.* **55**(5), 473–490 (2000) .
55. Ortner, H. ., Bulska, E., Rohr, U., Schlemmer, G., Weinbruch, S., & Welz, B.. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry — mechanisms of action (A tutorial review). *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **57**(12), 1835–1853 (2002).
56. Abad, C., Florek, S., Becker-Ross, H., Huang, M.-D., Buzanich, A. G., Radtke, M., Lippitz, A., Hodoroaba, V.-D., Schmid, T., Heinrich, H.-J., Recknagel, S., Jakubowski, N., & Panne, U.). Zirconium permanent modifiers for graphite furnaces used in absorption spectrometry: understanding their structure and

mechanism of action. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **33**(12), 2034–2042. (2018).

57. Schneider, M., Pereira, É. R., de Quadros, D. P. C., Welz, B., Carasek, E., de Andrade, J. B., Menoyo, J. del C., Feldmann, J. Investigation of chemical modifiers for the determination of cadmium and chromium in fish oil and lipid matrices using HR-CS GF AAS and a simple “dilute-and-shoot” approach. *Microchemical Journal*, **133**, 175–181. (2017).
58. Pedro, J., Stripekis, J., Bonivardi, A., & Tudino, M Surface studies on graphite furnace platforms covered with Pd, Rh and Ir as modifiers in graphite furnace atomic absorption spectrometry of tellurium. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **107**, 152–158 (2015).
59. Heitmann, U., Welz, B., Borges, D. L. G. & Lepri, F. G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **62**, 1222–1230 (2007).
60. Madelung, O. *Landolt-Börnstein Zahlenwerte Und Funktionen Aus Naturwissenschaften Und Technik: Neue Serie*. (Springer, 1987).
61. Pearson, R. G. *PHYSICAL AND INORGANIC CHEMISTRY Hard and Soft Acids and Bases*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1963).
62. Ozbek, N. & Akman, S. Formation of calcium monofluoride in graphite furnace molecular absorption spectrometry, part I: Interference mechanisms of competitive metals Ga, Al, Ba, and Sr. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 111–117 (2018).
63. Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S. & Costa Melo, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*. **27** 771–780 (2004).

64. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº 23, DE 24 DE ABRIL DE 2013 (Publicada no DOU nº 23, de 25 de abril de 2013).
65. García-Alegría, A. M., Gómez-Álvarez, A., García-Rico, L., & Serna-Félix, M.. Validation of an analytical method to quantify serum electrolytes by atomic absorption spectroscopy. *Acta Universitaria*, **25**(3), 3–12. (2015).
66. Guillhen, S. N. Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Mercúrio Total em Amostras de Urina Por Espectrometria de Absorção Atômica com geração de vapor a frio (CV-AAS). (Universidade de São Paulo, 2009).
67. Favre, H. A., Hellwinkel, D., Powell, W. H., Smith, H. A. & Tsay, S. S. C. Phane nomenclature. Part II. Modification of the degree of hydrogenation and substitution derivatives of phane parent hydrides (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.* **74**, 809–834 (2002).
68. Schneider, M., de Quadros, D. P. C., Welz, B., Carasek, E. de Oliveira Bastos, D., Rurig, R. E. A novel extraction-based procedure for the determination of cadmium in marine macro-algae using HR-CS GF AAS. *Anal. Methods* **9**, (2017).
69. Akhdhar, A. Schneider, M. Orner, A., Schultes, L., Raab, A., Krupp, M. E., Benskin, J. P., Welz, B., Feldmann, J. The use of high resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR -MAS) for total fluorine determination in extractable organofluorines (EOF). *Talanta* **209**, 120466 (2020).
70. Resano, M., Aramendía, M. & Belarra, M. A. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **29** 2229–2250 (2014).

7 ANEXO I

Artigo "Iodine determination by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry - A comparison between potential molecules". Referente ao projeto da Tese de Doutorado. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.01.006>

Spectrochimica Acta Part B 153 (2019) 42–49



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab



Iodine determination by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry – A comparison between potential molecules



Mauana Schneider^{a,*}, Bernhard Welz^{a,b,1}, Mao-Dong Huang^c, Helmut Becker-Ross^c, Michael Okrusch^d, Eduardo Carasek^a

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do CNPq – INCT de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – IAS – e.V., Department Berlin, Schwarzschildstr. 8, 12489 Berlin, Germany

^d Analytik Jena AG, Konrad-Zuse-Str. 1, 07745 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Iodine
High-resolution molecular absorption spectrometry
Barium moniodide
Strontium moniodide
Calcium moniodide
Indium moniodide

ABSTRACT

This work presents an overview of four diatomic iodine molecules for iodine quantification by high-resolution molecular absorption spectrometry, a comparison between the optimal conditions for CaI, SrI, BaI, and InI, the consequences of these parameters for the method development and the quantification of iodine in supplements using the diatomic molecules and a simple dilute-and-shoot sample preparation. The thermal behavior of I using Ir, Pt, Zr and W as permanent modifier were studied and compared for each molecule. The concentrations of the forming reagent and the influence of Cl as an interferent were also investigated. The absolute LOD and LOQ values found for iodine using the CaI, SrI, BaI, and InI molecules were between 20 ng – 60 ng and 60 ng – 200 ng respectively. The concentrations of iodine were in agreement with the producer's stated values, and since there was no significant interference in these samples for this diatomic molecule, an external calibration with aqueous solutions was possible.

1. Introduction

The direct determination of halogens by conventional atomic absorption spectrometry is not possible since their resonance lines are below 190 nm in the vacuum-UV - a region that is not accessible by this technique. An alternative for the atomic lines is the indirect determination via diatomic molecules, composed by the halogen and a molecule-forming reagent (commonly the salt of a metallic element) added in excess. The diatomic molecule, formed in the gaseous phase, can absorb radiation in the ultraviolet or visible wavelength range and, like the absorbance of atoms, that of diatomic molecules also obeys Lambert-Beer's law [1].

In the 1980s and 1990s, some works proposed the use of line-source atomic absorption spectrometers for the determination of halogens, using wavelengths emitted by a continuum source or a line source that accidentally coincided with a molecular absorption band [2]; However, this practice was susceptible to interferences since the spectral vicinity was unknown and the available background correction systems failed. Thus, the low-resolution monochromator (with spectral resolution around 0.1 nm) of line-source atomic absorption spectrometers cannot

separate correctly the fine structure of the molecular bands. With the advent of high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, the determination of halogens via diatomic molecular spectra became possible due to the high-resolution monochromator system (better than 2 pm/pixel at 200 nm), providing a much better wavelength resolution, a high intensity xenon short-arc lamp emitting a continuum between 190 nm and 900 nm, and a CCD array detector, which permits a three-dimensional view of the spectra and the spectral vicinity [3].

These features made the determination of halogens possible with low limits of detection compared with electrochemical or classic methods [4,5]. Several papers have been published describing the determination of fluorine, chlorine and bromine using a series of metals as reagents to form diatomic molecules with the halogens at high temperatures provided by the electrothermal vaporization. For example, Gois et al. [6] determined bromine in polymer samples by HR-CS SS-GF MAS and compared the results with those obtained by LA-ICP-MS. The limit of detection (LOD) achieved with MAS was 10 times lower than that obtained by mass spectrometry. Morés et al. [7] used the molecular bands of CaF to quantify fluorine in tea leaves and infusions with an

* Corresponding author.

E-mail address: mauana.schneider@gmail.com (M. Schneider).

¹ Prof. Bernhard Welz passed away on June 3rd, 2018 in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.01.006>

Received 30 September 2018; Received in revised form 11 January 2019; Accepted 23 January 2019

Available online 24 January 2019

0584-8547/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

8 ANEXO II

Artigo “The use of high resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-MAS) for total fluorine determination in extractable organofluorines (EOF)”. Referente a um dos projetos desenvolvidos durante o doutorado sanduíche na University of Aberdeen, de junho a dezembro de 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120466>



Talanta

Available online 18 October 2019, 120466

In Press, Corrected Proof



The use of high resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR -MAS) for total fluorine determination in extractable organofluorines (EOF)

Abdullah Akhdhar ^{a, b}, Mauana Schneider ^{a, c}, Alice Orme ^a, Lara Schultes ^d, Andrea Raab ^a, Eva M. Krupp ^a, Jonathan P. Benskin ^d, Bernhard Welz ^{c, 1}, Jörg Feldmann ^{a, 2}

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120466>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Response optimisation for individual PFAS.
- Same response for ionic extractable organofluorines using HR-GF-MAS.
- Low response for volatile neutral PFAS.
- Validation for total fluorine determination of PFCAs in water samples.

9 ANEXO III

Outros artigos publicados durante o período do doutorado (2016 - 2020).



Ecological Indicators
Volume 73, February 2017, Pages 698-707



Urbanization effects on different biological organization levels of an estuarine polychaete tolerant to pollution

Wilson Antonio Weis ^a  , Carlos Henrique Lemes Soares ^b , Daiane Paula Cunha de Quadros ^c , Mauana Schneider ^c , Paulo Roberto Pagliosa ^{a, d} 

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.029>

[Get rights and content](#)

Highlights

- *Laeonereis acuta* is a tolerant bioindicator of estuarine environmental pollution.
- **Diffuse pollution** affects *L. acuta* at different levels of biological organization.
- **Micronuclei** frequency is a preemptive **biomarker** of environmental pollution.

Investigation of chemical modifiers for the determination of cadmium and chromium in fish oil and lipid matrices using HR-CS GF AAS and a simple ‘dilute-and-shoot’ approach

Mauana Schneider ^a, Éderson R. Pereira ^a, Daiane P.C. de Quadros ^a, Bernhard Welz ^{a, b} , Eduardo Carasek ^a, Jailson B. de Andrade ^b, Javier del Campo Menoyo ^c, Joerg Feldmann ^d

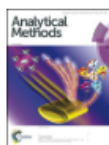
 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.038>

[Get rights and content](#)

Highlights

- A simple method was developed for Cd and Cr determination in fish oil.
- The “dilute-and-shoot” procedure involves just the dilution of the sample in 1-propanol.
- Cd and Cr can be determined using aqueous standard solutions for calibration.
- Low limits of quantification can be achieved due the low volume of solvent compared to digestion.



From the journal:
Analytical Methods

A novel extraction-based procedure for the determination of cadmium in marine macro-algae using HR-CS GF AAS



[Mauana Schneider,^a](#) [Daiane P. C. de Quadros,^a](#) [Bernhard Welz,^{id} ^{+ab}](#) [Eduardo Carasek,^a](#) [Duardo de Oliveira Bastos^c](#) and [Leonardo Rubi Rorig^d](#)

[⊕ Author affiliations](#)

Abstract

This work proposes a simple method for the determination of Cd in macro-algae by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. An acid digestion procedure in a thermostatic bath has been developed using only small volumes of HNO₃ and H₂O₂. The acid and oxidant concentrations as well as the bath time have been optimized using multivariate analysis, aiming at a total extraction of the analyte without spending much time with sample preparation. It has been employed as the permanent chemical modifier for improving performance and sensitivity. The accuracy of the proposed method has been evaluated by comparison with inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-assisted acid digestion, showing results without statistical difference (based on a *t*-test with a confidence interval of 95%). The results were also compared with a certified reference material, BCR 679 (white cabbage), and the value obtained with the proposed method did not show any statistical difference with the certified one. The limit of detection of the method was 7.5 ng g⁻¹ Cd. The proposed procedure can be described as safe, reliable, fast, accurate and low-cost, mainly when compared with microwave-assisted digestion, which demands a relatively large volume of acids, specific instrumentation and significantly more time.

Development of a fast screening method for the direct determination of chlorinated persistent organic pollutants in fish oil by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry

Éderson R. Pereira ^a, Josias Merib ^a, Heloisa R. Cadorim ^a, Mauana Schneider ^a, Gabriel S. Carvalho ^b, Fabio A. Duarte ^b, Bernhard Welz ^{a, c, d, e}, Javier del Campo Menoyo ^d, Joerg Feldmann ^e

[Show more](#)


<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.015>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Chlorine can be considered a proxy for persistent organic pollutants (POPs).
- High-resolution molecular absorption spectrometry was used for Cl determination.
- Chlorine has been determined in fish oil for the production of Omega-3.
- A method has been developed that needs only dilution as sample preparation.
- A detection limit of $0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ in diluted fish oil has been obtained.

Determination of arsenic in agricultural soil samples using High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis

Mauana Schneider ^a, Heloisa R. Cadorim ^a, Bernhard Welz ^{a, b, 1}, Eduardo Carasek ^a  , Jörg Feldmann ^c

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.052>

[Get rights and content](#)

Highlights

- A simple method was developed for arsenic determination.
- The method uses direct analysis with no extra sample preparation steps.
- No interferences are found when the correct temperature program, permanent modifier and number of evaluation pixels are set.
- Arsenic levels can be determined with standard aqueous calibration.
- Low limits of quantification can be achieved when compared with microwave-assisted digestion, since the sample is not diluted.



Effective and High-Throughput Analytical Methodology for the Determination of Lead and Cadmium in Water Samples by Disposable Pipette Extraction Coupled with High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS GF AAS)

Heloisa R. Cadorim, Mauana Schneider, Júlia Hinz, Fabiana Luvizon, Adriana N. Dias, Eduardo Carasek & Bernhard Welz

To cite this article: Heloisa R. Cadorim, Mauana Schneider, Júlia Hinz, Fabiana Luvizon, Adriana N. Dias, Eduardo Carasek & Bernhard Welz (2019): Effective and High-Throughput Analytical Methodology for the Determination of Lead and Cadmium in Water Samples by Disposable Pipette Extraction Coupled with High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS GF AAS), *Analytical Letters*, DOI: [10.1080/00032719.2019.1596117](https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1596117)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1596117>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 05 Apr 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 13



View Crossmark data [↗](#)



Phytoremediation potential of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): Influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium

Eduardo Bastos ^a  , Mauana Schneider ^b, Daiane Paula Cunha de Quadros ^{b, c}, Bernhard Welz ^{b, d}, Manuela Bernardes Batista ^e, Paulo Antunes Horta ^f, Leonardo Rubi Rörig ^f, José Bonomi Barufi ^f

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.130>

[Get rights and content](#)

Highlights

- *Ulva ohnoi* removes 81.3% of the Cd added.
- Dose-dependent accumulation was observed in all factors and combinations used.
- Positive GRs were observed at the lowest concentrations of Cd used.
- Changes in parameters analyzed were observed at all concentrations of Cd used.



What influences Amazon basin upland soil chemistry? Major, minor and trace elements in the upper rhizosphere

Jörg Matschullat ^{a, 1} , Gilvan Coimbra Martins ^b, JacintaENZweiler ^c, Sophie F. von Fromm ^{a, 1}, Johannes van Leeuwen ^d, Roberval Monteiro Bezerra de Lima ^b, Mauana Schneider ^e, Kamal Zurba ^a

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.106433>

[Get rights and content](#)

Highlights

- High-quality dataset for Brazilian Amazon basin upland (terra firme, oxisol) soil chemistry (65 elements)
- Fully quantified major, minor and most (ultra)trace elements (no PGE's)
- Emerging pedogeochemical deforestation effects
- Significant deviation from average world soil values (major, minor and trace elements)

10 ANEXO IV

Manuscritos de projetos iniciados durante o período de doutorado (2016 – 2020).

DA ROCHA, L. M., **SCHNEIDER, M.**, CARASEK, E., VALE, M. G., WELZ, B. Determination of aluminum in bovine liver samples by HR-CS GF AAS (revisão).

CADORIM, H. R., **SCHNEIDER, M.**, CARASEK, E., WELZ, B. Determination of sulfur in airborne particulate matter using direct solid sampling and high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (manuscrito).

LOPES, D., SILVA, M., **SCHNEIDER, M.**, WELZ, B., CARASEK, E. Determination of hormones in urine by HF-MMLLE Associated with 96-WELL plate system and HPLC-FLD detection (manuscrito).

AKHDHAR, A., HELLMANN, S., **SCHNEIDER, M.**, ORME, A., KRUPPP, E., RAAB, A., CARASEK, E., FELDMANN J. Determination of fluorine in tea samples *via* CaF molecule by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (manuscrito).

SCHNEIDER, M.; CADORIM, H. R.; LUVIZON, F., ROCHA, L. M.; WELZ, B.; CARASEK, E.; FELDMANN, J. Sequential determination of cadmium and mercury in soil samples using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. (manuscrito).

11 ANEXO XI

Relatório final entregue ao final do projeto SWE – Doutorado Sanduíche, referente aos trabalhos realizados na University of Aberdeen no período compreendido entre junho a dezembro de 2018.



Relatório Técnico Final SWE

Instituição no exterior: University of Aberdeen - Escócia
Coordenador no exterior: Prof. Dr. Joerg Feldmann
Bolsista: Mauana Schneider da Silva

Processo nº: 206318/2017-0
Vigência: 01/06/2018 a 30/11/2018
Modalidade: Doutorado sanduíche - SWE
Período de referência do relatório técnico: 11/06/2018 a 08/12/2018.

1. RESUMO DO PROJETO

Análise não-alvo de compostos perfluorados (PFCs) para a separação, quantificação e identificação destes poluentes orgânicos persistentes (POPs) em efluentes domésticos por meio de técnicas associadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP MS/MS) e caracterização espectrometria de massas por orbitrap e ionização por eletrospray (ESI-Orbitrap MS) além da quantificação total dos compostos perfluorados por espectrometria de absorção molecular de alta resolução (HR-MAS) no laboratório TESLA da University of Aberdeen, Escócia, sob a supervisão do Prof. Dr. Joerg Feldmann.

A análise de compostos não-alvo de PFCs oferece a possibilidade de quantificação de compostos desconhecidos ou não identificados, como metabólitos ou produtos de degradação, subprodutos de reações químicas industriais ou mesmo proveniente da utilização dos PFCs em materiais anti-chama e anti-sujeira. Para isto, instrumentos com a capacidade de separação e identificação dos compostos são necessários, como o HPLC-ICP MS/MS. A cromatografia líquida fornece a separação dos compostos perfluorados e enquanto a espectrometria de massas fornece a detecção para a quantificação das espécies perfluoradas. Estes resultados, associados à ESI-Orbitrap MS serão capazes de fornecer uma caracterização dos PFCs presentes na matriz, e uma vez que apenas uma pequena parcela destes compostos tenha sua estrutura conhecida, a caracterização destes compostos é de suma importância para entender o comportamento destes POP no meio-ambiente e os riscos que estes podem trazer aos seres vivos.

2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Análise não-alvo de compostos perfluorinados por HPLC-ICP-MS-MS e HPLC-Orbitrap-MS

Neste projeto foram estudados diversos métodos de preparo de amostra, a fim de se encontrar uma forma de pré-concentrar esta classe de compostos, tornando possível a identificação e quantificação simultânea, utilizando espectrometria de massas por orbitrap (Orbitrap-MS) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS-MS), após separação via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Dentre os métodos de preparo de amostra, a utilização de extração em fase sólida (SPE) foi a que apresentou melhores resultados, apresentando boa separação e remoção de interferentes, uma vez que se tratavam de matrizes bastante complexas como água do mar, água de rio e efluentes. Foi realizado o teste de adição e recuperação para estas matrizes como forma de verificação da exatidão do método proposto. Os resultados estão sendo sintetizados para a confecção de um artigo, uma vez que a utilização da técnica de ICP-MS para a especiação de flúor é ainda pouco explorada.

2.2 Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS

Este projeto foi desenvolvido como ferramenta para o balanço de massas (flúor total) para a especiação de compostos perfluorinados (PFCs). Uma vez que há uma diferença na resposta analítica para o flúor inorgânico e flúor de origem orgânica (e também diferença entre as diferentes espécies com diferentes grupos funcionais), um longo estudo de modificadores químico a fim de se obter sensibilidade similar a todos os compostos estudados se fez necessário. Foram estudados o comportamento térmico de 6 diferentes espécies de PFCs e uma condição compromisso, em que estes compostos apresentassem uma sensibilidade semelhante foi encontrada. O método desenvolvido foi aplicado em diversos ;

extratos obtidos por SPE para a quantificação de flúor total por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com forno de grafite (HR-GF MAS). Os resultados foram sintetizados e um artigo científico foi confeccionado, estando já nas correções finais e logo deve ser enviado para publicação na revista Talanta.

2.3 Determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES

Uma parceria do laboratório TESLA com a estação de tratamento de esgotos de Aberdeen foi estabelecida para o desenvolvimento de um método rápido para a determinação de lítio em amostras de esgoto. Cerca de 110 amostras foram analisadas a fim de se determinar a eficiência dos digestores da usina. O objetivo acadêmico deste projeto foi a familiarização com a técnica de espectrometria de emissão atômica de plasma de micro-ondas (MP-AES), cujo a bolsista nunca teve nenhum tipo de contato. Os resultados obtidos serão apresentados na forma de pôster em um congresso de escopo pertinente.

2.4 Determinação de flúor em amostras de chá via molécula CaF por MP-AES

Até o presente momento, nenhum artigo descreve a utilização da técnica de MP-AES para a determinação de flúor, uma vez que as linhas de emissão deste elemento se encontram na região do UV de vácuo. Baseando-se em métodos já disponíveis para a HR-MAS no qual uma molécula diatômica é formada e suas bandas de absorção são monitoradas, foi utilizado cálcio como reagente formador para a geração em plasma da molécula de CaF, e suas bandas de emissão foram então utilizadas para a quantificação de flúor. Um método analítico foi otimizado e aplicado para diversas amostras de chá. Os resultados obtidos por MP-AES foram comparados com os obtidos por HR-GF MAS e se mostraram concordantes. Os resultados obtidos estão sendo sintetizados para a confecção de uma nota técnica a ser publicada em um jornal científico.

2.5 Especificação de mercúrio em gás condensado por HPLC-ICP-MS/MS utilizando extração por SPE.

Um conhecido problema em indústrias de gás e petróleo é a contaminação por mercúrio. Como as diferentes espécies deste elemento apresentam não apenas diferentes características físico-químicas, mas também diferentes níveis de toxicidade, um estudo detalhado das espécies presentes em gás condensado se faz necessário. Para isto, está sendo desenvolvido um método de preparo de amostras capaz de concentrar os compostos de interesse e tornar a amostra compatível com o HPLC. Dois métodos estão sendo comparados, a utilização de coluna compacta de sílica e a utilização de cartuchos de SPE. Paralelamente está sendo desenvolvido um método para a determinação de mercúrio total nos extratos por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite (HR-CS GF AAS) para que se possa ter o balanço de massas. Este projeto ainda se encontra em fase de desenvolvimento, para então os resultados serem sintetizados e publicados na forma de artigo em jornal científico.

3 METODOLOGIA

3.1 Análise não-alvo de compostos perfluorinados por HPLC-ICP-MS-MS e HPLC-Orbitrap-MS

Para este projeto foram utilizados três instrumentos de modo simultâneo. Um cromatógrafo líquido de alta eficiência 1290 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) hifenado simultaneamente a um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado 8800 ICPMS (Agilent Technologies) e um espectrômetro de massas por orbitrap LTQ orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Estado Unidos) operando em modo positivo. Água ultrapura com resistividade maior que 18,2 MΩ (Smart2 Pure, Thermo Fisher Scientific, UK) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Os padrões inorgânicos de flúor foram preparados a do sal KF (Fisher Scientific, Loughborough, UK). As soluções de bário foram preparadas à partir do sal $Ba(NO_3)_2$ (VWR chemicals, Leicestershire, England). Os padrões de PFCs foram preparados à partir dos compostos de grau de pureza analítica 1H,1H,2H,2H – Perfluorohexanol (4:2 FTOH), 1H,1H,2H,2H – Perfluoro-1 decanol (8:2 FTOH) e 1H,1H,2H,2H-Perfluorododecanol, (Flurochem Ltd, Hadfield, Uk), ácido perfluorooctanóico (PFOA), (Sigma Aldrich St Louis Mo, USA), ácido perfluorohexanesulfônico e ácido heptadecafluorooctanosulfônico (PFOS), (Sigma Aldrich St Louis Mo, USA). As soluções estoque foram preparadas em metanol (MeOH) (Merck, Darmstadt, Germany) e diluídas conforme estudo. Argônio com pureza 99.998% proveniente da BOC (Dublin, Ireland). Para o preparo das amostras, ácido fórmico 98% foi utilizado (Fishers Scientific, Loughborough, UK), metil tert-butil éter (MTBE) (Merck), hidróxido de amônio (Merck) e metanol (Merck). Foram utilizados cartuchos de SPE WAX OASIS (Waters, Milford, Estados Unidos), o sistema de vácuo Restek-12 (Thermo-Fischer, Pittsburgh, Estados Unidos) e a centrífuga VWR Megastar 600 (Avantor, New Jersey, Estados Unidos). Para a fase móvel foi utilizado acetonitrila (Merck) e água ultrapura com tampão ácido fórmico-acetato de

amônio (Sigma Aldrich). As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas pela bolsista e colaboradores na região de Aberdeen. A água do mar foi coletada na região litorânea da cidade. A água de rio é proveniente do River of Don, próximo a University of Aberdeen (altura do Seaton Park) e Rive of Dee. Já as amostras de efluente, lodo de esgoto e esgoto foram obtidas na Nigg wastewater treatment Works. Os parâmetros instrumentais para as análises via HPLC-ICP-MS/MS estão descritos na Tabela 3.1.1

Tabela 3.1.1. Parâmetros instrumentais para a análise dos extratos obtidos das amostras água de rio, água do mar, esgoto e lodo de esgoto.

Agilent 1290 HPLC			
Coluna	Ace Excel 3 C-18 Amide (3 mm x 100 mm, 5 µm)		
Eluente A	Acetonitrila 10% em água + tampão ácido fórmico / acetato de amônia		
Eluente B	Acetonitrila 90% em água + tampão ácido fórmico / acetato de amônia		
Gradiente	Tempo (min)	A (%)	B (%)
	0.0	75	25
	0.5	75	25
	5.0	50	50
	10	30	70
	25	30	70
	30	75	25

Vazão 0,5 mL / Min

Volume injetado 100 µL

Agilent 8800 ICPMS

Modo Orgânico

Potência de RF 1600 W

Posição do amostrador 7,8 mm

Gás nebulizador (Ar) 0,77 L min⁻¹

Gás auxiliar (Ar/O₂) 0,3 L min⁻¹

Gás de reação (O₂) 1 mL min⁻¹

Lente iônica S-lens

Isótopos monitorados ³²S, ¹⁵⁷BaF

LTQ Orbitrap

Modo negativo

Massas analisadas m/z 100 - 1000

3.2.1 Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS

Para este projeto foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Foi utilizada atomização em forno de grafite, com tubos de grafite com recobrimento pirolítico e plataforma PIN integrada. Água ultrapura com resistividade maior que 18.2 MΩ (Smart2 Pure, Thermo Fisher Scientific, UK) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Os padrões inorgânicos de flúor foram preparados a do sal KF (Fisher Scientific, Loughborough, UK). As soluções de cálcio foram preparadas à partir do sal $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (VWR chemicals, Leicestershire, England). Os padrões de PFCs foram preparados à partir dos compostos de grau de pureza analítica 1H,1H,2H,2H – Perfluorohexanol (4:2 FTOH), 1H,1H,2H,2H – Perfluoro-1 decanol (8:2 FTOH) e 1H,1H,2H,2H-Perfluorododecanol, (Flurochem), ácido perfluorooctanóico (PFOA), (Sigma), ácido perfluorohexanesulfônico e ácido heptadecafluorooctanosulfônico (PFOS), (Sigma Aldrich). As soluções estoque foram preparadas em metanol (MeOH) (Merck) e diluídas conforme estudo. Argônio com pureza 99.998% proveniente da BOC . Para o preparo das amostras, ácido fórmico 98% foi utilizado (Fishers Scientific), metil tert-butil éter (MTBE) (Merck), hidróxido de amônio (Merck) e metanol (Merck). Foram utilizados cartuchos de SPE WAX OASIS (Waters), o sistema de vácuo Restek-12 (Thermo-Fischer) e a centrífuga VWR Megastar 600 (Avantor). Para o estudo de modificadores permanentes foram utilizados Pd, Pt, W (Merck) e Zr (VWR Chemicals). $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Merck) foi usado na mistura com paládio como modificador químico em solução. As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas pela bolsista e colaboradores na região de Aberdeen. A água do mar foi coletada na região litorânea da cidade. A água de rio é proveniente do River of Don, próximo a University of Aberdeen (altura do Seaton Park). Já as amostras de efluente e esgoto foram obtidas na Nigg wastewater treatment Works. O programa de temperatura utilizado para a determinação de F total está descrito na Tabela 3.2.1.

Tabela 3.2.1 Programa de temperatura para a determinação de F. Vazão de gás máxima em todas as etapas, exceto a etapa de vaporização.

Etapa	T / °C	Rampa / °C s ⁻¹	Tempo / s
Secagem 1	70	6	15
Secagem 2	70	6	3
Pirólise	700	300	10
Vaporização	1900	3000	5
Limpeza	2100	1000	5

3.3 Determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES

Para este projeto foi utilizado um espectrômetro de emissão atômica de plasma de micro-ondas MP-AES 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Água ultrapura com resistividade maior que 18,2 MΩ Smart2 Pure (Thermo Fisher Scientific) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. As soluções de lítio foram preparadas a partir do sal de LiNO₃ (Sigma Aldrich). As amostras foram preparadas utilizando ácido nítrico 65% (Sigma Aldrich) e peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich) e centrifugadas utilizando centrífuga Megastar 600 (VWR). As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas por pela companhia de tratamento de esgoto (Nigg wastewater treatment Works).

3.4 Determinação de flúor em amostras de chá via molécula CaF por MP-AES

Para este projeto foi utilizado um espectrômetro de emissão atômica de plasma de micro-ondas MP-AES 4200 (Agilent Technologies). Água ultrapura com resistividade maior que 18,2 MΩ obtida pelo sistema Smart2 Pure (Thermo Fisher) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Os padrões de flúor foram preparados a do sal KF (Fishers Scientific). As soluções de cálcio foram preparadas à partir do sal Ca(NO₃)₂.4H₂O (VWR chemicals). Para a comparação

do método por HR-GF MAS, foi utilizada a mesma instrumentação do ítem 3.2 e além de soluções de flúor inorgânico obtidas a partir do sal de KF (Fischer Scientific). Amostras de chás foram adquiridas no mercado local de Aberdeen – Escócia.

3.5 Especificação de mercúrio em gás condensado por HPLC-ICP-MS/MS utilizando extração por SPE e por coluna empacotada de sílica.

Para este projeto foi utilizado o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado 7900 ICPMS (Agilent Technologies) hifenado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência 1100 HPLC (Agilent Technologies). Água ultrapura com resistividade maior que 18,2 M Ω (Smart2 Pure, Thermo Fisher) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Para as extrações em SPE foram utilizados cartuchos de sílica, C18, DSC-NH₂ e SCX (Waters, Milford, Estados Unidos), o sistema de vácuo Restek-12 (Thermo-Fischer). Para as colunas empacotadas foi utilizado sílica para cromatografia Silica Gel 60 (Merck). Soluções metanólicas de metilmercúrio, etil mercúrio e cloreto de mercúrio foram preparadas e adicionadas as amostras (Sigma Aldrich). Argônio com pureza 99.998% proveniente da BOC (Dublin, Ireland). Para a análise qualitativa inicial de mercúrio nos extratos metanólicos, foi utilizado um instrumento um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, ContrAA 700 (Analytik Jena). Foi utilizado tubo de grafite com revestimento pirolítico e plataforma PIN integrada. Como modificador químico permanente, foi utilizada uma solução 1 g L⁻¹ de Pd (VWR). Os parâmetros instrumentais para a especificação de Hg estão descritos na tabela 3.5.1.

Tabela 3.5.1. Parâmetros instrumentais para a análise dos extratos obtidos por SPE e coluna de vidro empacotada de sílica e amostras de gás condensado.

Agilent 1100 HPLC	
Coluna	Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)
Eluente A	Ácido fórmico 0,1,00% em água
Eluente B	Ácido fórmico 0,25% em MeOH
Gradiente	100% A → 40% B eb 20 min
Vazão	1 mL / Min
Volume injetado	30 µL
Agilent 7900 ICPMS	
Modo	Orgânico
Gás nebulizador (Ar)	0,95 L / min
Gás auxiliar (O ₂)	5%
Isótopos monitorados	²⁰² Hg, ²⁰⁵ Tl (padrão interno)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise não-alvo de compostos perfluorinados por HPLC-ICP-MS-MS e HPLC-Orbitrap-MS

O principal projeto referente a bolsa de doutorado sanduíche foi o estudo de um método para a identificação de compostos perfluorinados em efluentes. Este projeto envolveu o uso de instrumentos de ICP-MS para a especificação de F. Uma vez que a energia de ionização do F é muito alta, não é possível gerar, em quantidade significativa, a espécie F^+ no plasma de argônio. Para isto, faz-se necessário o monitoramento indireto do F, através da molécula de BaF. Este método foi desenvolvido no laboratório TESLA e até então não havia sido aplicado em amostras de maior complexidade, apenas em soluções padrão.

O objetivo principal deste projeto foi encontrar um método de preparo de amostra capaz de remover interferentes e concentrar os compostos perfluorinados, compatível com os instrumentos de HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-Orbitrap MS. Este método foi aplicado em amostras de rio, efluentes, esgoto, lodo de esgoto e água do mar. Os extratos então foram analisados simultaneamente por HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-Orbitrap MS a fim de se confirmar a identidade das espécies de F. O projeto está em fase de conclusão, sendo que alguns experimentos ainda estão sendo executados na University of Aberdeen. Ao final de todos os experimentos, os resultados obtidos serão sintetizados e um artigo científico será confeccionado.

Todos os experimentos aqui apresentados, demandaram todo o tempo do intercâmbio (6 meses), sendo que a maior dificuldade para a execução do mesmo foi o uso dos instrumentos, que era também utilizado por muitos pesquisadores. Uma vez que era uma instrumentação bastante complexa, cara e delicada, todos os experimentos feitos pela bolsista foram necessariamente acompanhados por um pesquisador mais experiente, o que dependia da disponibilidade de outros pesquisadores além da disponibilidade do instrumento. Durante o período da bolsa

os instrumentos ficaram desativados por cerca de um mês, por diversas razões, o que acabou atrasando a conclusão do projeto.

4.1.1 Preparo da amostra utilizando solventes orgânicos e ENVI-CARB

Em um primeiro momento, amostras de lodo de esgoto foram utilizadas. Para isto, cerca de 0,5 g de amostra foram pesadas em tubos falcon de 15 mL. Um mix de padrões de PFCs foi adicionado a fim de se enriquecer as amostras de forma que se obtivesse concentrações finais de 2,5 mg L⁻¹ a 7,5 mg L⁻¹. As amostras foram deixadas por cerca de 1 h sob temperatura ambiente para equilíbrio entre matriz e analitos. Após isto, foram adicionados 5 mL de MeOH e 1 mL de uma solução de NaOH a 0,2 mol L⁻¹. As amostras foram agitadas por vortex por cerca de 1 minuto e centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM. O supernadante foi separado e cerca de 0,15 g de ENVI-CARB foi adicionado a fim de se remover quaisquer compostos que pudessem danificar a coluna cromatográfica. A amostra foi novamente submetida a centrifugação e o supernadante foi mantido em frascos de vidro sob refrigeração.

As amostras foram analisadas via HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-Orbitrap MS, mas nenhuma das amostras preparadas forneceu qualquer sinal analítico. Sendo assim, esta forma de preparo de amostra foi descartada.

4.1.2 Preparo das amostras de água de rio, mar e efluente utilizando SPE

As amostras de água de rio, água do mar, as curvas de calibração e efluentes foram preparadas baseando-se na publicação de ZACS & BARTKEVICS (2016) Foi utilizado. Cerca de 200 g de água foram pesadas em balões volumétricos. As amostras foram enriquecidas com um mix de padrões de PFCs (PFHxA (C6), PFHpA (C7), PFOA (C8), PFDA (C10), PFOS e PFHxS) de forma que se obtivesse as concentrações finais de 0, 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. Então, 100 µL de ácido fórmico foram adicionados a cada amostra. Estas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM, e o supernadante foi adicionado a cartuchos OASIS WAX de SPE, conforme descrito na sessão 4.1.4.

4.1.3 Preparo das amostras de esgoto e de lodo de esgoto utilizando SPE

Para as amostras de esgoto e lodo de esgoto, cerca de 10 g de amostra foram preparadas baseando-se na publicação de ZACS & BARTKEVICS (2016) As amostras foram homogeneizadas e pesadas em frascos falcon de 50 mL. As amostras foram enriquecidas com um mix de padrões de PFCs (PFHxA (C6), PFHpA (C7), PFOA (C8), PFDA (C10), PFOS e PFHxS) de forma que se obtivesse as concentrações finais entre 0,5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. Foram adicionados 5 mL de MeOH e foi deixado a matriz entrar em equilíbrio com os analitos adicionados por cerca de 1h a temperatura ambiente. Após equilíbrio, as amostras foram agitadas por vortex por 1 minuto, e submetidas a um banho de ultrassom por 30 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM e o sobrenadante adicionado aos cartuchos OASIS WAX de SPE conforme descrito na sessão 4.1.4.

4.1.4 Condicionamento dos cartuchos e pré-concentração da amostra por SPE.

Para o condicionamento dos cartuchos, 3 mL de uma solução 1,00% de NH₄OH em MeOH/MTBE (90:10 v/v), 3 mL de MeOH e 3 mL de água ultrapura foram adicionados a uma vazão de aproximadamente 5 mL min⁻¹. Após o condicionamento, as amostras foram adicionadas aos cartuchos, na mesma vazão, e em seguida os cartuchos foram lavados com 1 mL de uma solução 2% de ácido fórmico e 2 mL de MeOH. Os cartuchos foram deixados sob vácuo para secar por 30 minutos e após isto, eluídos com 7 mL de MTBE. O eluato foi então deixado secar sob fluxo de nitrogênio a 35 °C, e após a secagem completa, as amostras foram reconstituídas em 200 µL de MeOH.

4.1.5 Preparo de amostras por extração Sólido-líquido e Líquido-líquido

Para as amostras de esgoto e lodo de esgoto, cerca de 200 mg foram pesados em tubos falcon e adicionados 500 µL de MeOH, 1 mL de MTBE e 1 mL de uma solução 0,5 mol L⁻¹ de TEAH e 0,25 mol L⁻¹ de Na₂CO₃ (pH 10). As amostras

foram enriquecidas com um mix de padrões de PFCs a fim de se obter uma concentração final de 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ e deixado repousar por 3h a fim de se obter o equilíbrio entre a matriz e os analitos adicionados. Após isto as amostras foram agitadas em vortex e em seguida centrifugadas. A parte orgânica foi removida, deixada secar em fluxo de nitrogênio e reconstituída em 200 µL de MeOH.

Para a amostra de rio, foram adicionados a 200 mL de amostra, 4 mL de uma solução 0,5 mol L⁻¹ de TEAH e 0,25 mol L⁻¹ de Na₂CO₃ (pH 10) e 4 mL de MTBE. As amostras foram enriquecidas com um mix de padrões de PFCs a fim de se obter uma concentração final de 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ e deixado repousar por 3h a fim de se obter o equilíbrio entre a matriz e os analitos adicionados. Após isto as amostras foram agitadas em vortex e em seguida centrifugadas. A parte orgânica foi removida, deixada secar em fluxo de nitrogênio e reconstituída em 200 µL de MeOH.

As amostras foram analisadas via HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-Orbitrap MS, mas o fator de recuperação foi baixíssimo, apresentando sinal diferente do ruído apenas para as espécies PFDA (C10) e PFOS. Sendo assim, esta forma de preparo de amostra foi descartada.

4.1.6 Análise de amostras de rio por HPLC-ICP MS e Orbitrap-MS

Após o método de preparo de amostra descrito na sessão 4.1.1 não se mostrar eficiente na extração dos PFCs, um outro método de preparo de amostras, baseado no descrito por Zacs et al. foi adotado. Para os testes iniciais, foram utilizadas apenas amostras de rio, que foram enriquecidas com um mix de padrões de PFCs e preparadas conforme a sessão 4.1.2. Uma curva de calibração, preparadas em água ultrapura, também foi construída, a fim de se comparar o fator de recuperação das amostras de rio. Ressaltando que a concentração referente a curva de calibração obtida por SPE não está considerando o fator de pré-concentração (200 mL de amostra concentrados em 200 µL, um fator de 1000). Os cromatogramas da curva de calibração podem ser vistos na Figura 4.4.1.

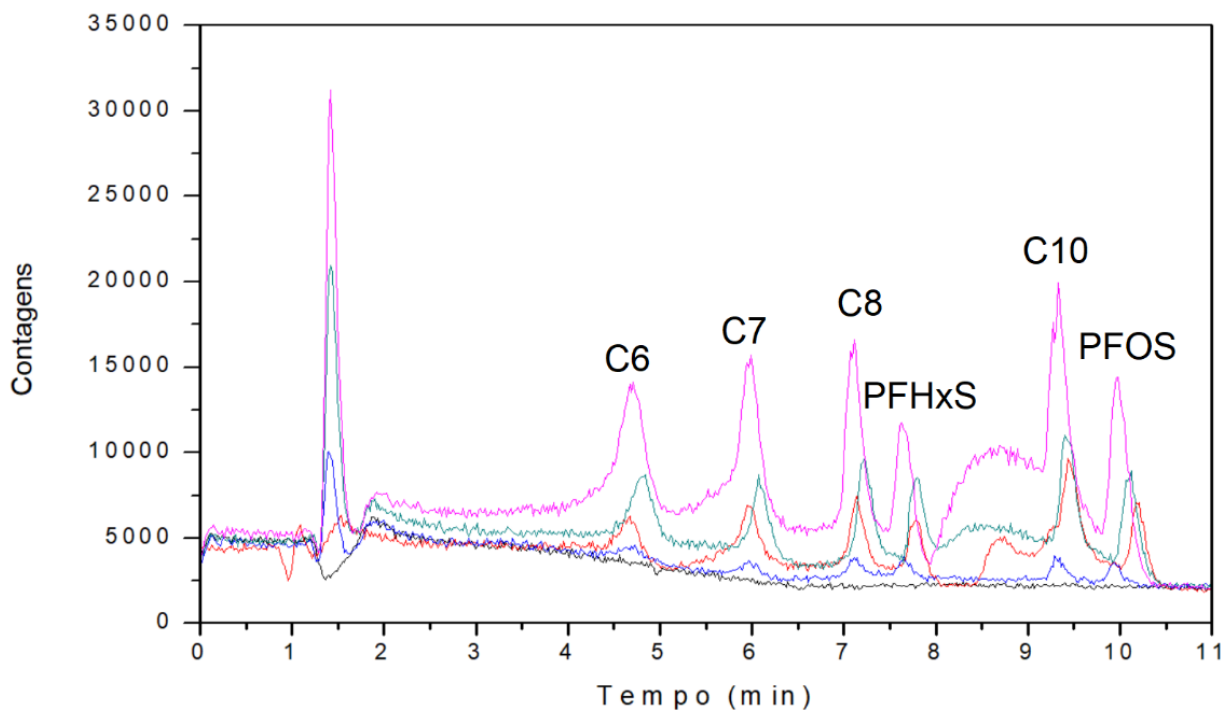


Figura 4.1.1. Cromatograma da curva de calibração em água ultrapura obtidas por HPLC-ICP-MS. (●) branco, (●) 1 mg L⁻¹, (●) 3 mg L⁻¹, (●) 5 mg L⁻¹ e (●) 10 mg L⁻¹.

A identificação de cada um dos compostos foi feita utilizando a comparação dos tempos de retenção obtidos por HPLC-ICP-MS/MS com os fragmentos de massas detectados simultaneamente por HPLC-Orbitrap-MS. Com a utilização simultânea de ambos os instrumentos de massa é possível identificar e quantificar as espécies de F. Com isto, foi possível determinar uma pequena quantidade de PFOA (C8) na amostra coletada no *River of Dee* (Figura 4.1.2 (a)). A equação da reta e o coeficiente de determinação para cada um dos compostos estudados podem ser observados na Tabela 4.1.1.

Tabela 4.1.1. Parâmetros das curvas de calibração obtida por SPE em padrão aquoso.

Composto	Equação da reta*	R ²
PFHxA (C6)	$y = 224.1x - 147.56$	0,954
PFHpA (C7)	$y = 243.2x - 107.32$	0,933
PFOA (C8)	$y = 218.84x - 10.194$	0,970
PFHxS	$y = 128.57x + 78.198$	0,986
PFDA (C10)	$y = 217.73x + 41.874$	0,980
PFOS	$y = 217.28x + 10.603$	0,975

*: x em mg L⁻¹

A identificação destes analitos também pode ser feita monitorando o sinal de enxofre. Uma vez que os ácidos carboxílicos vão aparecer conforme o tamanho da cadeia carbônica, só se faz necessária a identificação dos compostos com grupos sulfônicos (Figura 4.1.2 (b)).

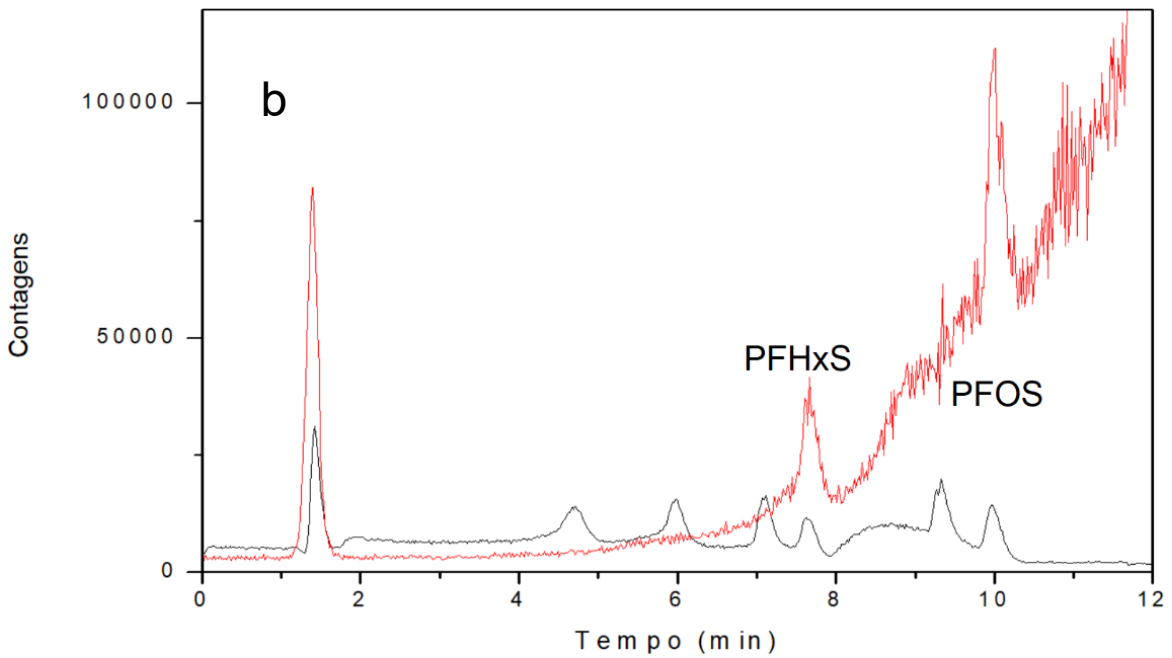
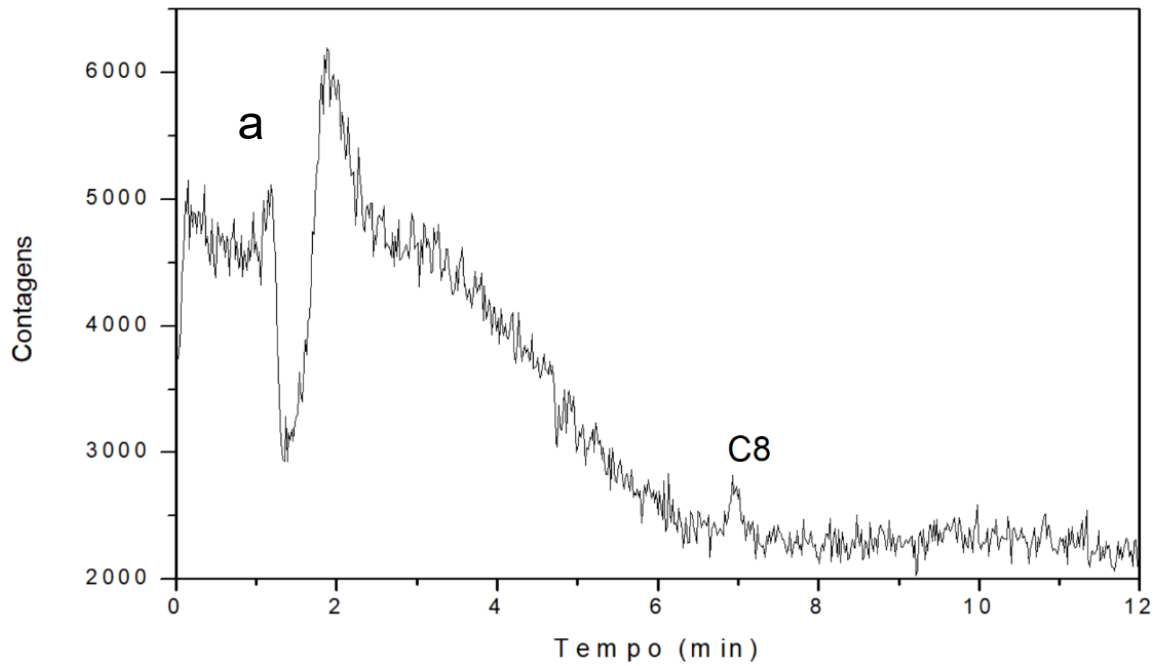


Figura 4.1.2. Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS/MSa) para extração à partir de amostra do rio *River of Don*. b) para extração à partir de um padrão aquoso de mix de 10 mg L⁻¹ de PFCs.

A partir da curva de calibração obtida pelo extrato dos padrões aquosos, foi calculado o fator de recuperação para cada um dos PFCs. Os resultados estão exibidos na Tabela 4.1.2

Tabela 4.1.2: Fator de recuperação para os PFCs em água de rio (*River of Don*)

Composto	0 ppm	1 ppm	5 ppm
PFHxA (C6)	<LOQ	184%	116%
PFHpA (C7)	<LOQ	160%	106%
PFOA (C8)	0,99 ng g ⁻¹	120%	103%
PFHxS	<LOQ	107%	121%
PFDA (C10)	<LOQ	98%	100%
PFOS	<LOQ	124%	143%

Para os dois primeiros compostos, o valor de recuperação foi acima do aceitável, a possível razão é a baixa intensidade de sinal analítico produzido por estes compostos, o que torna a integração manual bastante complicada. Porém todos os outros analitos apresentaram excelentes valores de recuperação. Uma vez que o método de preparo de amostras se mostrou eficiente, com boa separação

entre os picos, e com bom fator de recuperação, foi então aplicado para as demais amostras de rio, água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto.

4.1.7 Análise de amostras de rio, água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto por HPLC-ICP MS e Orbitrap-MS.

Para este estudo, foram utilizadas amostras de água de rio, água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto. As amostras foram preparadas conforme as sessões 4.1.2 e 4.1.3. As amostras foram enriquecidas de forma a se obter as concentrações finais de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 10 mg L^{-1} . Uma curva de calibração de 1 mg L^{-1} a 10 mg L^{-1} foi construída utilizando o mix de padrões de PFCs em água ultrapura (Figura 4.1.3 (a)), e extraída conforme descrito na sessão 4.1.2. Uma curva de calibração a partir da injeção direta dos padrões de PFCs também foi construída a fim de comparação (Figura 4.1.3 (b)).

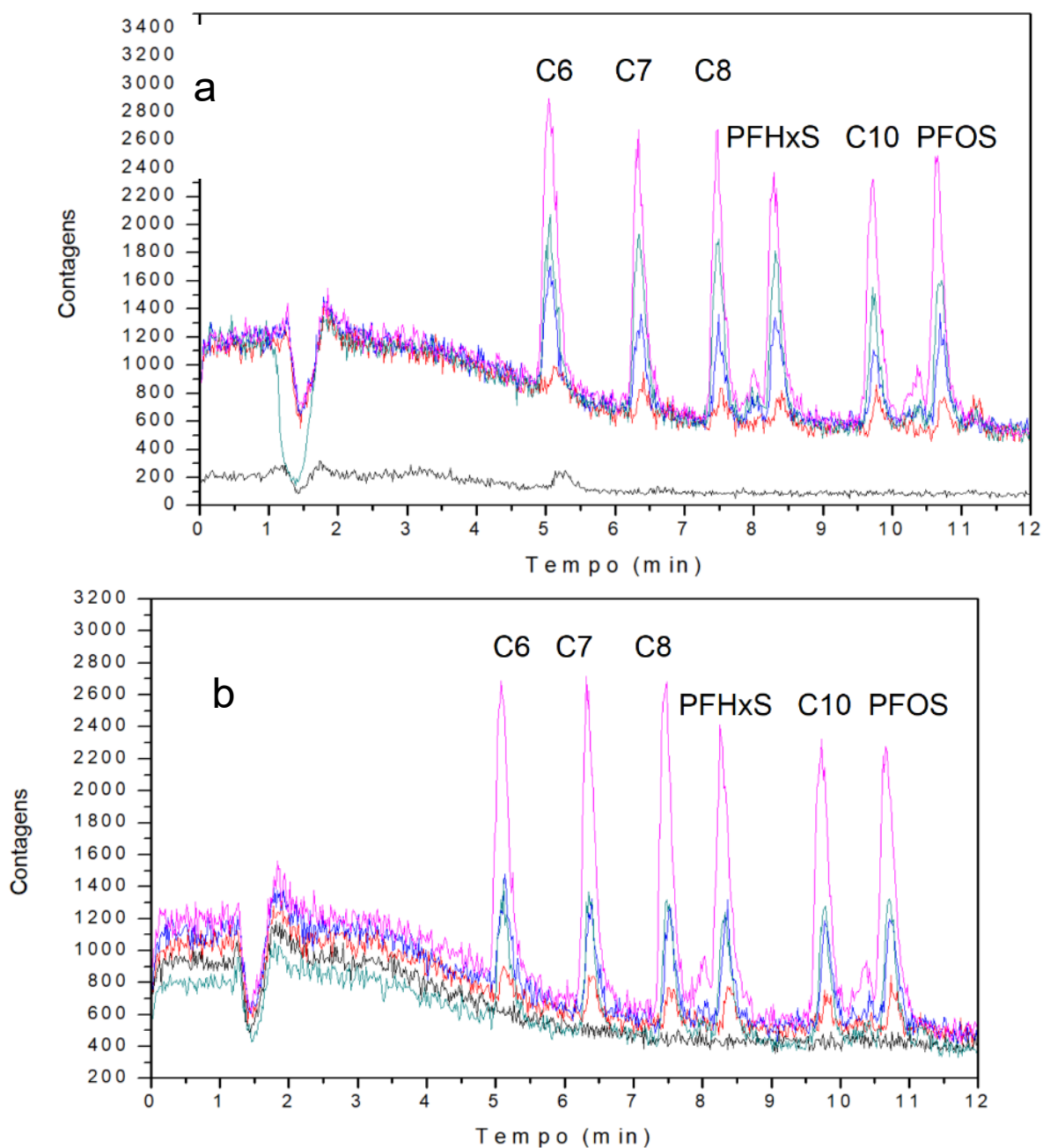


Figura 4.1.3. Curvas de calibração obtidas por HPLC-ICP-MS/MSa partir de a) extração em água ultrapura por SPE sendo (●) branco, (●) 1 mg L⁻¹, (●) 3 mg L⁻¹, (●) 5 mg L⁻¹ e (●) 10 mg L⁻¹. e b) injeção direta de padrão metanólico sendo (●) branco, (●) 1 mg L⁻¹, (●) 3 mg L⁻¹, (●) 5 mg L⁻¹ e (●) 10 mg L⁻¹.

As equações da reta e os coeficientes de terminação para cada um dos analitos obtidas com a calibração por injeção direta e por SPE estão dispostos na Tabela 4.1.3.

Tabela 4.1.3. Parâmetros das curvas de calibração obtidas por SPE de padrões aquosos e por injeção direta (ID) de padrões metanólicos.

Analito	Equação da reta ID*	R ² ID	Equação da reta SPE*	R ² SPE
PFHxA	38,221x - 13	0,999	y = 37,045x + 40,742	0,991
PFHpA	34,607x + 5,9803	0,991	y = 43,665x + -5,974	0,999
PFOA	40,73x - 10,335	0,995	y = 40,557x + 8,6627	0,999
PFHxS	36,035x - 4,5531	0,978	y = 42,463x + 4,281	0,999
PFDA	37,613x - 6,8492	0,994	y = 31,258x + 11,147	0,987
PFOS	42,442x - 13,424	0,990	y = 37,481x + 3,403	0,996

*: x em mg L⁻¹

A fim de comparação com a curva de injeção direta, a concentração referente a curva de calibração obtida por SPE não está considerando o fator de pré-concentração (200 mL de amostra concentrados em 200 µL, um fator de 1000). Os coeficientes angulares se mostraram bastante semelhante para ambas as curvas, o que indica que a fase sólida utilizada para a extração dos analitos é adequada. A partir das curvas de calibração obtidas por SPE, foi calculado o coeficiente de recuperação para cada uma das amostras estudadas: Água de rio (*River of Dee*), água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto. As amostras foram enriquecidas de

forma a se obter as concentrações finais de 0, 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 4.1.4

Tabela 4.1.4 fator de recuperação para as amostras de água de rio, água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto.

Amostra	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFHXS	PFDA	PFOS
Água de rio 5 mg L ⁻¹	205%	134%	96%	160%	124%	87%
Água de rio 10 mg L ⁻¹	54%	78%	93%	140%	135%	93%
Efluente 5 mg L ⁻¹	54%	67%	65%	95%	93%	93%
Efluente 10 mg L ⁻¹	167%	143%	147%	147%	188%	165%
Esgoto 5 mg L ⁻¹	143%	127%	ND	208%	ND	ND
Esgoto 10 mg L ⁻¹	132%	70%	27%	87%	11%	16%
Água do mar 5 mg L ⁻¹	118%	115%	126%	75%	138%	66%
Água do mar 10 mg L ⁻¹	23%	43%	50%	78%	77%	75%
Lodo de esgoto 5 mg L ⁻¹	23%	29%	24%	43%	45%	76%
Lodo de esgoto 10 mg L ⁻¹	30%	28%	22%	53%	12%	28%

ND: Não detectado

Em geral os fatores de recuperação foram dentro do aceitável, quando considerada a complexidade das amostras. A amostra de lodo de esgoto foi a que

apresentou a menor taxa de recuperação, o que condiz com o comportamento do analito, que é facilmente adsorvido, uma vez que o lodo de esgoto é uma amostra sólida. A amostra de efluente enriquecida com 10 mg L⁻¹ apresentou valores significativamente maiores que o adicionado, embora o branco desta amostra não tivesse apresentado sinal apenas para PFHxA (C6). As concentrações de cada PFC encontradas nas amostras de água de rio, água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto podem ser observados na Tabela 4.1.5

Tabela 4.1.5. Concentrações de PFCs em amostras de água de rio (*River of Dee*), água do mar, efluente, esgoto e lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS

Amostra	PFHxA (ng g ⁻¹)	PFHpA (ng g ⁻¹)	PFOA (ng g ⁻¹)	PFHxS (ng g ⁻¹)	PFDA (ng g ⁻¹)	PFOS (ng g ⁻¹)
Água de rio	5,75	0,87	ND	1,76	ND	ND
Água do mar	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Efluente	0,21	ND	ND	ND	ND	ND
Esgoto	ND	ND	32,8	33,7	ND	ND
Lodo de esgoto	41,2	13,0	ND	51,1	ND	ND

ND: Não detectado

Não foi calculado o desvio das medidas pois cada análise foi feita apenas uma vez devido ao tempo e a quantidade disponível de amostra. Um estudo de repetibilidade e reprodutibilidade está sendo concluído na University of Aberdeen, assim como o cálculo dos parâmetros de mérito para o método desenvolvido.

4.1.8 Referências

Zacs, D.; Bartkevics, D. TRACE DETERMINATION OF PERFLUOROOCTANE SULFONATE AND PERFLUOROOCTANOIC ACID IN ENVIRONMENTAL SAMPLES (SURFACE WATER, WASTEWATER, BIOTA, SEDIMENTS AND SEWAGE SLUDGE) USING LIQUID CHROMATOGRAPHY – ORBITRAP MASS SPECTROMETRY. **Journal of Chromatography A.** 1473 (2016) 109-121.

4.2 Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS

Neste projeto, seis compostos foram selecionados para o estudo de estabilidade térmica: os telômeros 10:2 FTOH, 8:2 FTOH e 4:2 FTOH além do ácido carboxílico PFOA e os ácidos sulfônicos PFHxS e PFOS. Estes compostos foram selecionados para representar diferentes classes de compostos perfluorinados, uma vez que seria impossível estudar todos os compostos conhecidos.

Este projeto tinha a previsão inicial de ser executado no Brasil, antes do início da vigência da bolsa de doutorado sanduíche, fazendo parte do projeto principal da bolsa de doutorado sanduíche no exterior. Porém devido ao alto custo de aquisição dos padrões necessários, teve de ser totalmente executado na University of Aberdeen, que possuía instrumentação e reagentes necessários. Foram dedicados 6 meses para o desenvolvimento e execução desse projeto, que ocorreu em paralelo com o projeto principal da bolsa de doutorado sanduíche. O seguinte projeto encontra-se finalizado, com manuscrito produzido em fase de correção pelo orientador no exterior.

4.2.1 Otimização do programa de temperatura

Devido à alta volatilidade dos telômeros, um estudo da temperatura de secagem se fez necessário. Para isto, as etapas de secagem foram otimizadas de forma multivariada para as três espécies de telômeros estudadas. A Figura 4.2.1 mostra os resultados obtidos através de um planejamento Doehlert, no qual o tempo de secagem e a temperatura foram estudadas simultaneamente para as duas etapas de secagem.

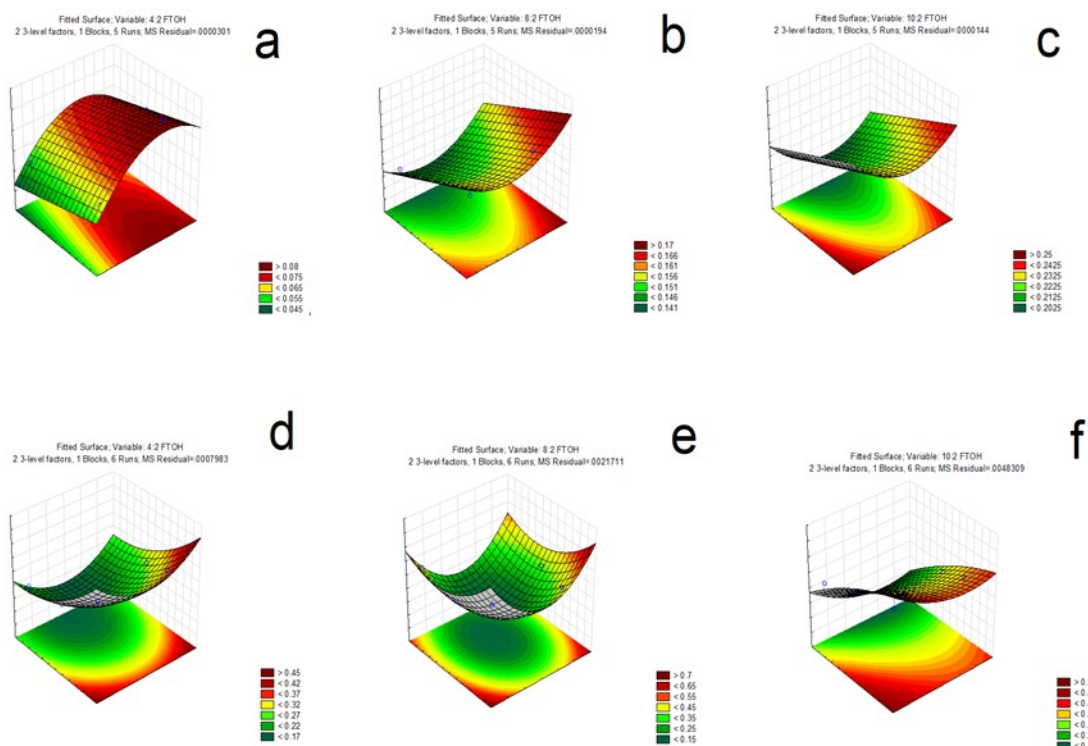


Figure 4.2.1. Superfície de resposta obtidas para um planejamento Doehlert. Para a etapa de secagem 1: a) 4:2 FTOH b) 8:2 FTOH c) 10:2 FTOH. Para a etapa de secagem 2: d) 4:2 FTOH e) 8:2 FTOH f) 10:2 FTOH. Todos os experimentos foram executados utilizando 25 ng de F, T_{pyr} : 900 °C, T_{vap} : 2000 °C em um tubo de grafite utilizando W como modificador permanente.

Para a etapa de de secagem 1, a temperatura teve menor influência sobre as espécies mais voláteis, 4: 2 FTOH, sendo mais crítica para 8: 2 e 10: 2 FTOH, o que mostra um aumento na resposta analítica em temperaturas mais baixas. O fato de este parâmetro não ser significativo para 4: 2 FTOH pode ser interpretado como sendo o intervalo de temperatura escolhido para este estudo não ser o ideal para este composto, porém temperaturas mais baixas não foram capazes de secar satisfatoriamente o solvente. O tempo de espera mostrou maior influência na resposta analítica, em que um maior tempo de espera produziu um sinal mais intenso. O mesmo pode ser observado em todos os analitos estudados, e por essa razão, a temperatura de secagem 1 foi fixada em 70 °C e mantida por 15 segundos.

Já para a temperatura de secagem 2, foi obtido sinais com máxima intensidade quando a temperatura e o tempo de secagem foi mínimo, para todos os analitos. Por esta razão, a temperatura de secagem 2 foi fixada em 70 °C e mantida por 5 segundos.

Para as etapas de pirólise e vaporização foram otimizadas de forma univariada para todos os compostos estudados. Foram utilizados neste experimento, 5µL de uma solução de F 5 mg L⁻¹ de cada composto e 5 µL de uma solução aquosa a 1,00% (m/v) de Ca. Os comportamentos térmicos de F⁻, PFOA, PFOS, PFHxS, 10: 2 FTOH, 8:2 FTOH e 4: 2 FTOH foram investigados usando dois modificadores permanentes diferentes: Pd e Zr; com e sem o modificador químico, Pd/Mg, em solução, e sem qualquer modificador, os resultados são mostrados na Figura 4.2.2

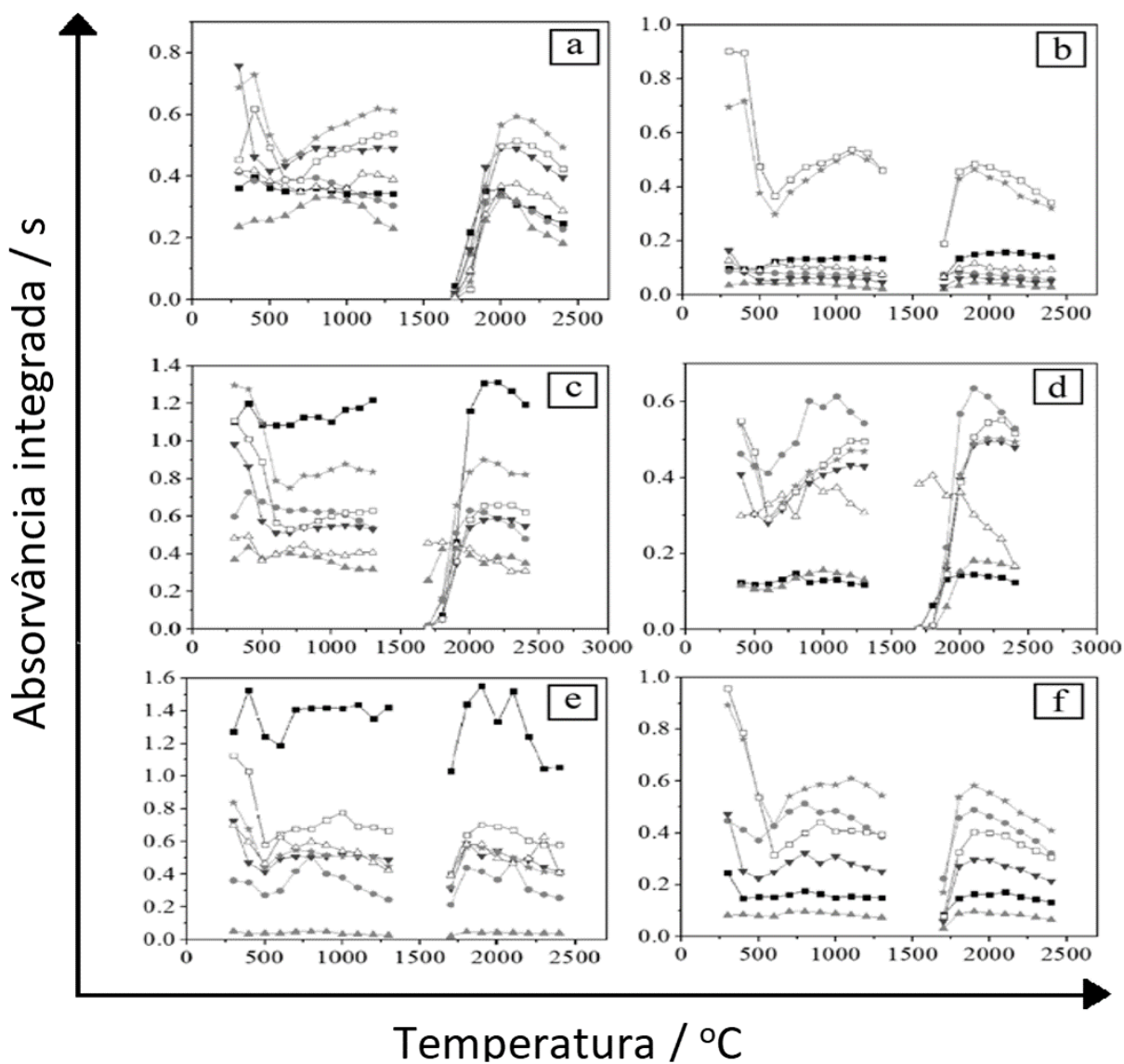


Figura 4.2.2 Otimização do programa de temperature para os padrões aquosos de (■) F⁻; (△)10:2 FTOH; (●) 8:2 FTOH; (▲) 4:2 FTOH; (▼) PFOA; (□) PFHxS e (★) PFOS. Todos os experimentos utilizaram 25 ng of F e a) 400 µg de Zr como modificador permanente; b) 7,5 ng/ 5 µg da mistura dos nitratos de Pd/Mg em solução; c) 400 µg de W como modificador permanente; d) sem modificador; e) 400 µg de Pt como modificador permanente e f) 400 µg de Pd como modificador permanente. Todos os estudos de temperatura de pirólise tiveram a temperatura de

atomização fixa T_{vap} : 2000 °C e para otimização da temperatura de atomização, temperatura de pirólise fixa T_{pyr} : 900 °C.

De acordo com os resultados obtidos, os compostos apresentaram intensidades diferentes para a maioria dos modificadores químicos, apresentando uma condição relativamente similar apenas para W e Zr em temperaturas específicas. Os telômeros 4:2 FTOH e 8:2 FTOH apresentaram baixíssima intensidade do sinal analítico quando comparados aos demais compostos perfluorinados e por esta razão foram descartados dos demais estudos, sendo o método desenvolvido não apropriado para esta classe de compostos.

A fim de se evitar uma supressão de sinal devido a uma possível quantidade insuficiente de reagente formador, foi estudada a razão Ca/F para os compostos PFOA, PFOS, PFHxS e 10:2 FTOH. Uma vez que o grupo funcional poderia vir a competir pelo reagente formador, cada composto foi analisado individualmente. Razões entre 0 – 14000 Ca/F (m/m) foram estudadas utilizando um tubo de grafite recoberto com W, nas temperaturas de 600 °C e 1900 °C nas etapas de pirólise e vaporização respectivamente. Observou-se necessária uma grande concentração em excesso do reagente formador, uma vez que este excesso desloca o equilíbrio químico para o lado da formação das moléculas. Um aumento expressivo é observado até 4000 Ca/F e o aumento da intensidade analítica é observado de forma sutil até 12000 Ca/F, onde então se torna constante até 14000 Ca/F. Uma vez que não foi observado nenhum decréscimo e para garantir um excesso de reagente formador nas diferentes concentrações possíveis em amostras, a razão de 12000 Ca/F foi adotada como ótima.

4.2.2 Estudo da sensibilidade em padrões aquosos

Uma vez que não foi possível encontrar uma temperatura única para todos os máximos de intensidade, foi necessário adotar uma condição compromisso, no qual todos os compostos respondessem analiticamente com a mesma intensidade, desta forma evitando diferença de sensibilidade entre os compostos o que pode vir a levar a calibrações errôneas. Por este motivo, duas condições foram escolhidas para o estudo de sensibilidade: W como modificador permanente e temperaturas de 700 °C na etapa de pirólise e 1900 °C na etapa de vaporização e Zr como modificador permanente nas temperaturas de 600 °C na etapa de pirólise e 1900 °C na etapa de vaporização. Todas as curvas de calibração foram produzidas no intervalo de 1.5 ng – 5 ng e 50 µg de Ca como reagente formador. As temperaturas de pirólise e atomização de acordo com o método proposto. Os resultados foram comparados com um método já descrito na literatura por MORES (2011). Os resultados podem ser vistos na figura 4.2.3.

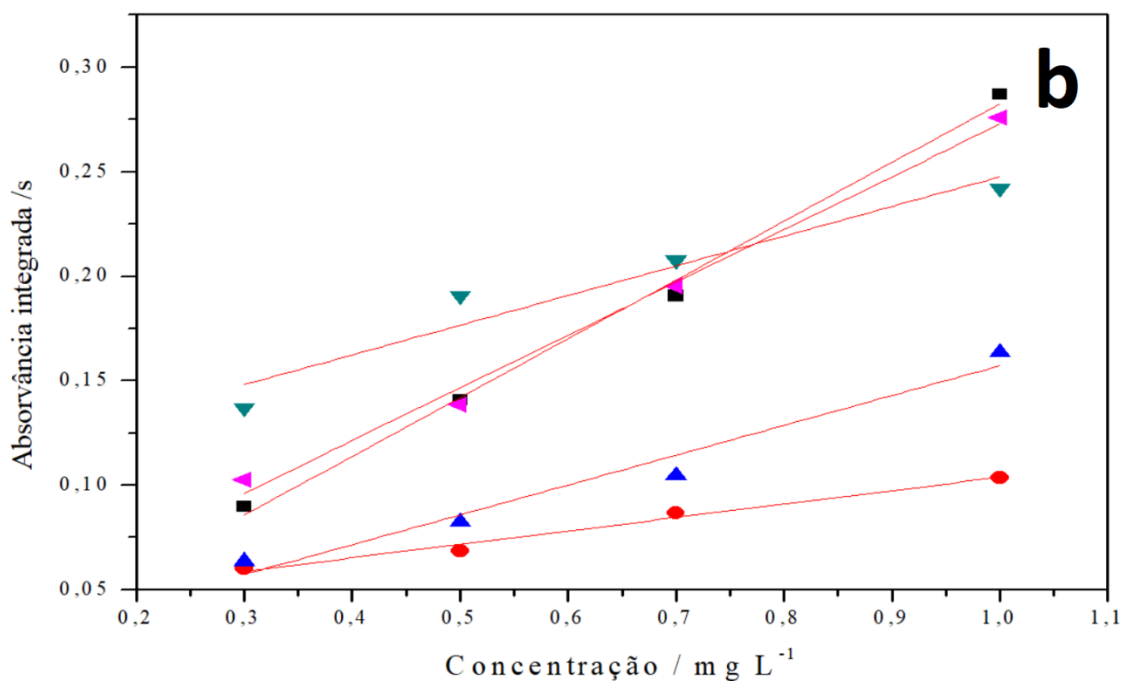
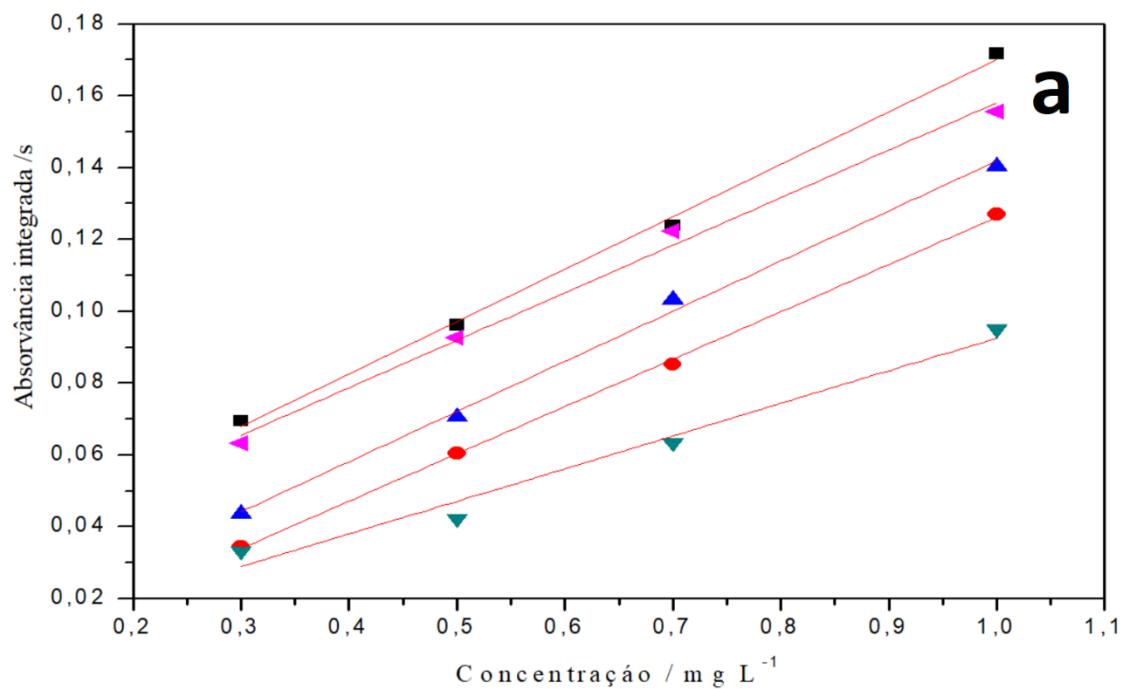


Figura 4.2.3. Curva de calibração externa com padrões aquosos (■) F⁻; (△)10:2 FTOH; (▼) PFOA; (●) PFHxS e (★) PFOS em a) 400 µg de W como modificador permanente e temperaturas otimizadas (T_{pyr}: 700 °C/ T_{vap}: 1900 °C) e b) sem 147

modificador permanente, de acordo com MORES (2011) (T_{pyr} : 725 °C/ T_{vap} : 2250 °C).

Como observado, não é possível calcular F total proveniente de diferentes espécies orgânicas sem o desenvolvimento de um método apropriado. Comparando os coeficientes angulares das curvas obtidas com o método desenvolvido (Tabela 4.2.1) utilizando W ou Zr, é possível observar maior semelhança entre as sensibilidades quando W é utilizado como modificador permanente. Também é possível observar, que mesmo para o telômero mais termicamente estável, não é possível utilizar uma calibração única em um mix de compostos contendo esta classe de compostos. Por esta razão, afirma-se mais uma vez que o método desenvolvido não é apropriado para a determinação de F total em amostras contendo telômeros.

Tabela 4.2.1. Coeficientes angulares de curvas de calibração externa com padrões aquosos obtidas utilizando tubos de grafite revestidos com Z e revestidos com Zr nas condições otimizadas e os coeficientes angulares das curvas de calibração externa com padrões aquosos obtidas pelo método descrito por MORES (2011).

Composto	W	Zr	MORES (2011)
F ⁻	0,146	0,229	0,251
PFOA	0,140	0,104	0,113
PFOS	0,132	0,136	0,209
PFHxS	0,132	0,179	0,184
10:2 FTOH	0,105	0,080	0,080

Comparando os coeficientes lineares obtidos quando W foi utilizado como modificador permanente, o padrão de F inorgânico, PFOA apresentou a menor variação – 4%, enquanto o telômero 10:2 FTOH apresentou a maior variação, aproximadamente 30%. PFOS e PFHxS apresentaram a mesma sensibilidade, o que pode indicar que o grupo funcional tem grande influência no comportamento térmico, maior que questões envolvendo a massa molar (500,13 e 400,11 respectivamente) ou mesmo o ponto de fusão (145 °C e 245 °C respectivamente). Este tipo de observação é de alta importância para o desenvolvimento da técnica de espectrometria de absorção molecular, uma vez que pouco se sabe sobre os mecanismos que ocorrem dentro do tubo de grafite em altas temperaturas.

4.2.3 Estudo da sensibilidade em padrões metanólicos

Uma vez que este método foi desenvolvido como ferramenta para o balanço de massas em especiação de compostos perfluorinados, se faz necessário o estudo das sensibilidades também em padrões metanólicos, uma vez que a maioria dos métodos de extração para esta classe de compostos tem por solução final um extrato alcoólico, compatível com instrumentos de HPLC. Para este estudo foram produzidas curvas de calibrações externas em meio metanólico, de 1,5 ng – 5 ng e 50 µg de reagente formador Ca, utilizando as condições otimizadas para cada modificador permanente. Para este estudo, outros compostos foram adicionados, uma vez que este método será utilizado como ferramenta para o balanço de massa em especiações de F que tem estes como analitos. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.2.2.

Tabela 4.2.2. Comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração externa alcóolica produzidas nas condições otimizadas para cada modificador.

Composto	W	Zr
PFOA	0,089	0,127
PFOS	0,094	0,119
PFHxS	0,099	0,018
PFHxA	0,097	0,125
PFHpA	0,076	0,086
PFDA	0,079	0,105

Os resultados obtidos para as curvas preparadas em metanol não serão comparados com o padrão de F^- uma vez que sua concentração é negligenciável num preparo de amostras para compostos orgânicos devido sua alta polaridade. Os demais coeficientes angulares foram comparados com o obtido com a solução padrão de PFOA. Todos os compostos estudados apresentaram variação menor que 15% quando W foi utilizado como modificador químico permanente. Já para os coeficientes angulares obtidos com Zr, foi observado uma grande variação no coeficiente angular, principalmente para os compostos PFHxS e PFHpA, tornando o modificador inapropriado para a determinação de F total em matrizes que contenham estes analitos. Desta forma, W mostrou-se mais indicado para a determinação de F total em compostos orgânicos.

4.2.4 Parâmetros de mérito e determinação de F total utilizando extratos orgânicos obtidos por SPE.

As amostras foram preparadas de acordo com o preparo de amostra descrito na sessão 4.1.2 ,no qual foram adicionados 200 mL de amostra com cerca de 5 ng e 10 ng de F, a partir de uma mistura de compostos perfluorados (PFOA, PFOS, PFHxS, PFHxA, PFHpA e PFDA) em cartuxos de SPE (OASIS WAX), que foram eluidos e pré-concentrados a 200 µL em metanol. Estas amostras foram diluídas cerca de 100 vezes com MeOH para se ajustarem ao intervalo de trabalho. Uma curva de calibração metanólica externa foi realizada com eluatos metanólicos de SPE em uma faixa de trabalho de 0,5 ng - 10 ng F, a partir de padrões aquosos de PFOA. Para o método desenvolvido, utilizando pré-concentração com cartuchos de SPE, o limite de detecção foi de 0,3 ng g⁻¹ e o limite de quantificação foi de 1 ng g⁻¹. Os valores de recuperação são mostrados na Tabela 4.2.3

Tabela 4.2.3 Ensaio de recuperação para F total em diferentes amostras preparadas por SPE.

Amostra	Não-enriquecida	Recuperação 5 ng	Recuperação 10 ng
Água do mar	ND	103%	80%
Água de rio	14,5 ± 0,1 ng g ⁻¹	112%	101%
Efluente	ND	136%	85%
Esgoto	ND	68%	75%

A taxa de recuperação das amostras selecionadas foi satisfatória, principalmente quando se considera a complexidade das matrizes. As amostras de esgoto tiveram a menor taxa de recuperação - em torno de 70%. No entanto, essa matriz complexa apresentou um alto nível de sólidos dissolvidos. É bem conhecido que os compostos perfluorados são facilmente adsorvidos, o que poderia explicar a baixa taxa de recuperação, uma vez que apenas o flúor presente no sobrenadante é quantificado.

4.2.5 Referências

Mores, S.; Monteiro, G.C.; Santos, F. Da S.; Carasek, E.; Welz, B. DETERMINATION OF FLUORINE IN TEA USING HIGH-RESOLUTION MOLECULAR ABSORPTION SPECTROMETRY WITH ELECTROTHERMAL VAPORIZATION OF THE CALCIUM MONO-FLUORIDE CAF. **Talanta**. 85 (2011) 2681-2685.

4.3 Determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES

Este projeto foi uma parceria da University of Aberdeen com a Nigg Wastewater treatment, com o objetivo de verificar a eficácia de um de seus digestores. A bolsista foi inserida como responsável pela execução do projeto a fim de se familiarizar com a técnica a ser empregada MP-AES. Dos desafios deste projeto foi o curto espaço de tempo disponível para o desenvolvimento e aplicação do método, uma vez que a companhia de tratamento de esgoto tinha urgência nos dados e as amostras ocupavam um grande volume na sala-fria, sendo de extrema importância o rápido descarte das amostras, que não poderiam ficar fora de refrigeração. O tempo de planejamento, execução e tratamento de dados para este projeto foi de duas semanas de dedicação exclusiva.

4.3.1 Preparo de amostra

Uma vez que o volume de amostras era consideravelmente alto (110 amostras) e os digestores de micro-ondas disponíveis no laboratório estavam sendo utilizados pelos demais pesquisadores, foi necessário o desenvolvimento de um método rápido, seguro e que não dependesse de muita instrumentação. Para isto, uma digestão em aberto foi sumariamente otimizada. Foram utilizadas diferentes concentrações de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (1:1, 2:1 e 1:2 em volumes de 1 mL e 2 mL), que foram adicionadas diretamente na amostra e submetidas a um banho térmico a 80 °C por 30 minutos. De forma qualitativa, observando quais volumes e razões dissolveram melhor a matéria orgânica presente na amostra, foi adotado 2 mL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de ácido nítrico para 3 mL de amostra, além de 50 µL de anti-espumante. Após o banho térmico, as amostras foram deixadas esfriar em temperatura ambiente e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi então retirado e diluído para 50 mL.

4.3.2 Determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES.

O sobrenadante diluído foi analisado diretamente por MP-AES, sendo monitorada as três principais linhas de emissão do lítio (670.784 nm, 610.365 nm e 460.289 nm). A faixa de concentração das curvas de calibração foram de 5 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹. A equação da curva e seu respectivo coeficiente de determinação e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão de 10 leituras do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração) para cada comprimento de onda estão descritos na tabela 4.3.1

Tabela 4.3.1 Parâmetros de mérito para a determinação de lítio por MP-AES

Comprimento de onda	Equação da reta*	R ²	LOD/LOQ (mg L ⁻¹)
460,289 nm	460,64x +92,783	0,993	23 / 77
610,365 nm	8141,9x – 3112,9	0,999	0,03 / 0,10
670,784 nm	13308x - 6491,8	0,993	0,003 / 0,010

*: x em mg L⁻¹

Uma vez que a linha de emissão 460,289 nm apresentou baixa sensibilidade, com limites de LOD e LOQ incompatíveis com a faixa de trabalho, a linha 670,784 nm apresentou um coeficiente de correlação um pouco mais baixo que a linha 610,365 nm, que apresentou melhores R² e LOD e LOQ compatíveis com a faixa de trabalho, e que por essas razões foi selecionada para a quantificação das amostras. Para garantir a exatidão do método desenvolvido, um teste de adição e recuperação foi realizado, apresentando taxas de recuperação entre 62% a 88%. Os resultados deste ensaio são exibidos na tabela 4.3.2.

Tabela 4.3.2 Ensaio de adição e recuperação para a determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES.

Concentração adicionada	Concentração recuperada	% de recuperação
18,93	11,82	62%
26,51	20,75	78%
33,73	29,67	88%

Os resultados obtidos para as 110 amostras foram apresentados à companhia de tratamento de esgoto. Segundo os responsáveis por parte da companhia, foram considerados satisfatórios para a elucidação do desempenho dos digestores.

4.4 Determinação de flúor em amostras de chá via molécula CaF por MP-AES

Este estudo foi executado em parceria com outro bolsista do programa ERASMUS, sendo parte de seu projeto de intercâmbio. Porém, devido ao curto tempo deste (5 meses) acabou ficando inconcluso, sendo atribuído a bolsista a responsabilidade de finalizar o projeto. Para a finalização deste projeto, foi necessário cerca de um mês de trabalho, paralelamente aos dois projetos principais (descritos nos itens 4.1 e 4.2). Dos principais desafios de trabalho foi a adaptação do instrumento para operar com duas entradas para soluções (uma para o reagente formador e um para a amostra) de forma que a vazão utilizada não sobrecarregasse a junção T (Figura 4.4.1) ou o nebulizador. E uma vez que o instrumento era utilizado por vários alunos, a cada experimento era necessário trocar tubos e ajustar a vazão novamente.

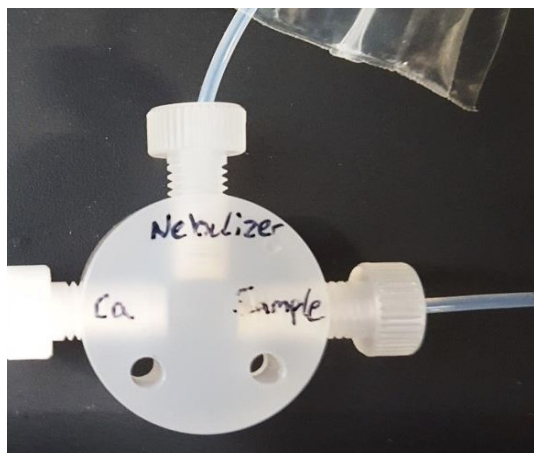


Figura 4.4.1. Junção T.

4.4.1 Preparo de amostra

Amostras de chá adquiridas nos mercados locais de Aberdeen foram analisadas e o teor de F obtido com as infusões determinado. Para isso, 2 g de chá foram adicionados a um beaker, e adicionado 200 mL de água ultrapura à 90 °C. As amostras foram deixadas esfriar à temperatura ambiente e então centrifugadas e seu supernadante analisado via MP-AES e HR-GF MAS.

4.4.2. Seleção do comprimento de onda

Uma vez que até o presente momento nenhum trabalho envolvendo esta instrumentação para a determinação de F *via* CaF, foi necessário avaliar qual o melhor comprimento de onda a ser monitorado, levando em consideração não apenas a sensibilidade, mas também a presença de interferentes. Foram estudados os comprimentos de ondas 330,9 nm, 529,9 nm, 606,5 nm, 685.6 nm, 703,7 nm e 720,2 nm. Embora alguns dos comprimentos de onda apresentassem maior intensidade quando comparado ao comprimento de onda 529.9 nm, este foi o que apresentou menor número de interferências espectrais (Figura 4.4.2), e por esta razão, foi fixado para os demais estudos. Uma vez que o havia pouco tempo para demais estudos e investigações, não foi aprofundado ou feito um estudo de interferências mais complexo.

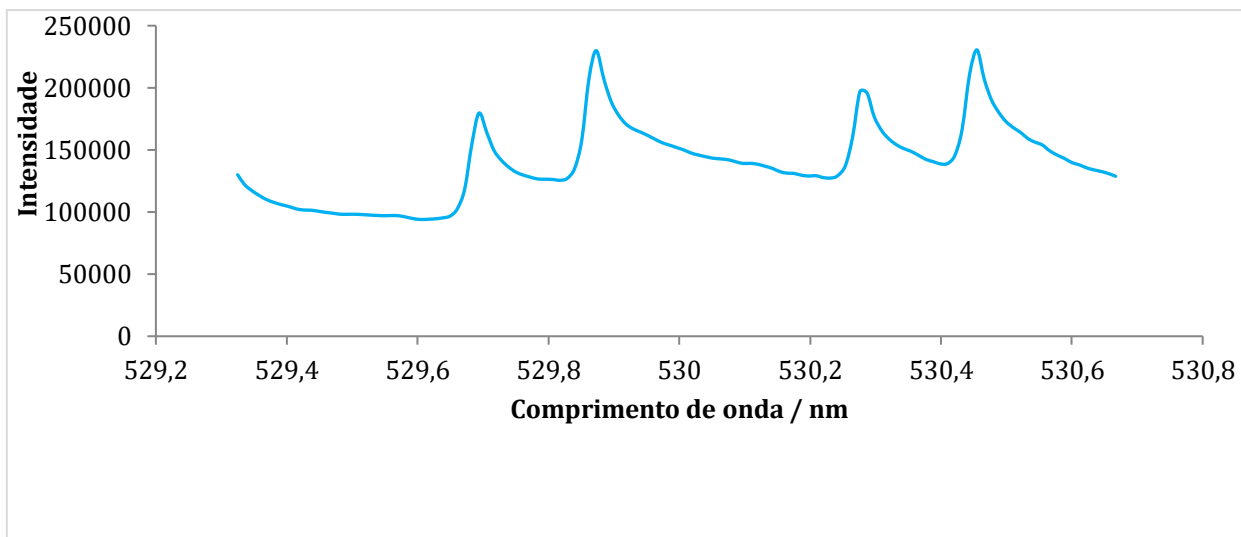


Figura 4.4.2. Perfil do espectro de emissão da molécula de CaF no intervalo de 529,3 nm a 530,7 nm. O perfil foi obtido utilizando uma solução 1000 mg L^{-1} de F e 20 mg L^{-1} de Ca.

4.4.3. Otimização da concentração de reagente formador

O fundamento da utilização do MP-AES para a determinação de F via CaF é o mesmo para a utilização dos instrumentos de HR-CS AAS. Para que o F consiga ser detectado por esse tipo de instrumentação, é necessário fazer de maneira indireta, pelo monitoramento de moléculas diatômicas formadas por F. Por esta razão, é necessária a adição de um reagente formador, neste caso Ca. As concentrações de Ca foram otimizadas de $0 - 30 \text{ g L}^{-1}$. De 0 a 20 g L^{-1} (Figura 4.4.2), houve um acréscimo significativo no sinal analítico, quanto de 20 g L^{-1} a 30 g L^{-1} houve apenas um pequeno aumento. Para não comprometer o funcionamento da tocha do plasma e do nebulizador, uma vez que o Ca precipita nestes componentes em caso de soluções muito concentradas, foi adotada a concentração de reagente formador de 20 g L^{-1} como ótima.

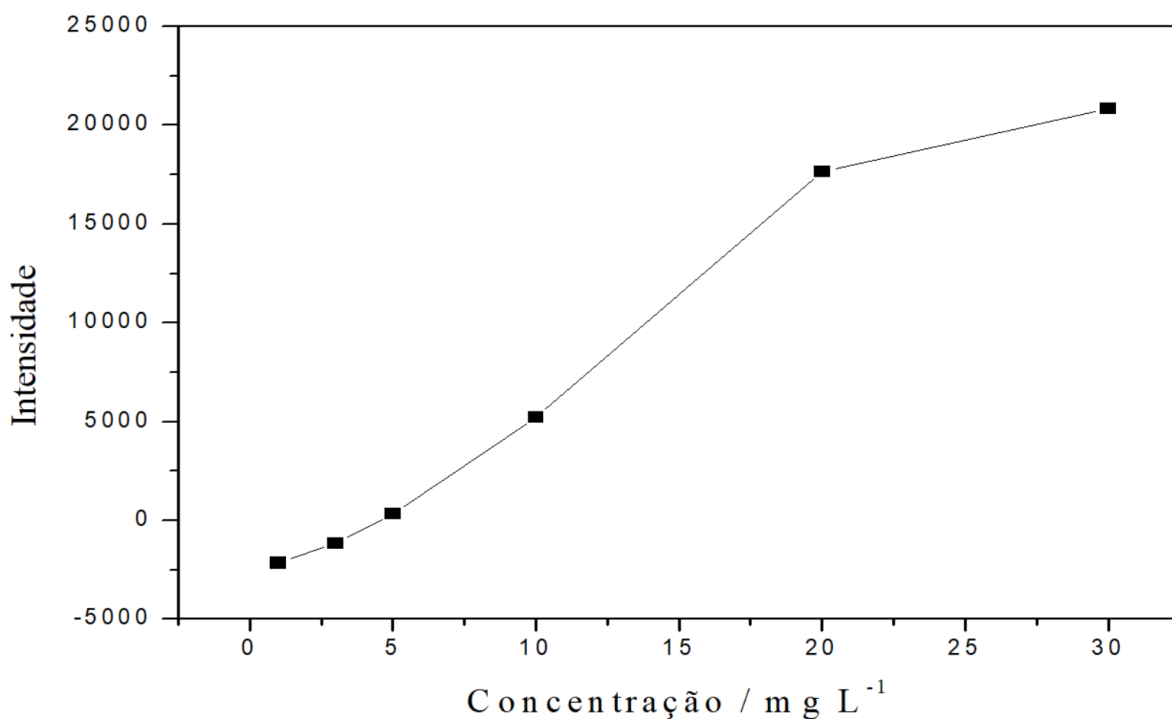


Figura 4.4.2. Estudo da concentração de reagente formador Ca para a molécula de CaF. O estudo foi realizado utilizando 50 mg L⁻¹ de F e monitorando as bandas de emissão em 529,9 nm.

4.4.4 Parâmetros de mérito e aplicação do método.

Os parâmetros de mérito para o método desenvolvido foram estudados, monitorando a molécula de CaF no comprimento de onda de 529.9 nm. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão de 10 medidas do branco, divididos pelo coeficiente angular da curva de calibração. As figuras de mérito estão exibidas na Tabela 4.4.1.

Tabela 4.4.1 Parâmetros de mérito para a determinação de F via CaF por MP-AES

Faixa de trabalho	Equação da reta*	R ²	LOD/LOQ (mg L ⁻¹)
30 mg L ⁻¹ – 1000 mg L ⁻¹	1,2439x + 29,581	0,999	2,5 / 8,3

* : x em mg L⁻¹

O método desenvolvido foi aplicado em diversas amostras de chá adquiridas em supermercados de Aberdeen – Escócia. Os resultados obtidos por MP-AES foram comparados com os obtidos através de HR-GF MAS, utilizando o método descrito por MORES (2011). Conforme exibido na tabela 4.4.2.

Tabela 4.4.2. Determinação de F total em amostras de chá via CaF por MP-AES e HR-GF MAS.

Amostra	MP-AES / mg · L⁻¹	HR-GF MAS / mg · L⁻¹
Chá preto 1	22,2±0,4	26,4±1,6
Chá preto 2	23,4±0,2	26,6±1,6
Chá preto 3	16,6±0,4	19,5±0,8
Chá preto 4	22,2±0,4	26,4±1,6
Chá preto 5	23,4±0,2	26,6±1,6

Um teste-t para comparação das médias foi realizado, e dentro de um intervalo de 95% de confiança, todos os resultados se mostraram significativamente diferentes, porém a diferença entre os valores obtidos foi muito pequena, em torno de 15%.

Uma vez que os resultados obtidos não foram completamente satisfatórios, este último experimento deve ser repetido. Uma possível razão para a discrepância nos valores pode ser o fato do instrumento de HR-CS AAS estar contaminado, uma vez que outras análises envolvendo matrizes ricas em flúor haviam sido executadas dias antes.

4.4.5 Referências

Mores, S.; Monteiro, G.C.; Santos, F. Da S.; Carasek, E.; Welz, B. DETERMINATION OF FLUORINE IN TEA USING HIGH-RESOLUTION MOLECULAR ABSORPTION SPECTROMETRY WITH ELECTROTHERMAL VAPORIZATION OF THE CALCIUM MONO-FLUORIDE CAF. **Talanta**. 85 (2011) 2681-2685.

4.5 Especificação de mercúrio em gás condensado por HPLC-ICP-MS/MS utilizando extração por SPE.

Este projeto está sendo realizado em parceria com um dos estudantes do grupo TESLA, que tem como tese de doutorado a elucidação das espécies de Hg presentes em amostras de gás condensado. Uma vez que as indústrias de gás e óleo são muito afetadas pela contaminação de Hg, faz-se necessário não somente a quantificação de mercúrio total nestas amostras, mas também a especificação, de forma a conseguir lidar com este problema.

Para isto, um método de preparo de amostras capaz de separar e concentrar as espécies de Hg precisa ser desenvolvido. Uma vez que não é possível aplicar as amostras de gás condensado diretamente nos instrumentos de HPLC sem comprometer a coluna. Este projeto foi iniciado no último mês da vigência da bolsa, de forma que o projeto continua sendo executado na University of Aberdeen, contando com o auxílio da bolsista por meio de instruções e discussões de resultado em conjunto com os demais pesquisadores envolvidos.

4.5.1 Escolha do método de extração.

Em um primeiro momento, três colunas de SPE foram investigadas: C18 funcionalizado por ditizona, DSC-NH₂ (fase de aminopropil polimericamente ligada, um trocador de ânion fraco) e SCX (um trocador de cátion forte).

O cartucho C18 foi pré-condicionado seguindo um procedimento descrito por YIN (2011). Cada cartucho foi lavado com 5 mL de metanol, 5 mL de 0,5 mol L⁻¹ de formiato de sódio-ácido fórmico (pH 4,0) e 4 mL de solução de ditizona 0,05%. A ditizona foi totalmente retida na fase extratora para se obter uma SPE funcionalizada por ditizona. Em seguida, o cartucho de SPE foi lavado com 3 mL de tampão formiato de sódio formol 0,5 mol L⁻¹ (pH 4,0) e 3 mL 0,05 mol L⁻¹ de tampão formiato de sódio (pH 4,0) para manter o pH adequado. Contudo, quando a amostra foi aplicada nos catuchos, houve a sangria da fase extratora, uma vez

que o gás condensado tem baixa polaridade, solubilizando o mesmo. Desta forma, não foi possível continuar os estudos com a coluna de C18.

Já os cartuchos de DSC-NH₂ e SCX foram condicionados com 5 mL de hexano seguido por 5 mL de metanol. Amostras de gás condensado (sem enriquecimento e enriquecidas com Hg⁺² e MeHg) foram aplicadas aos cartuchos e eluída com 3 mL de acetonitrila e 3 mL de MTBE. Após eluição, as amostras foram evaporadas em atmosfera de nitrogênio e reconstituídas com 1.5 mL de MeOH.

Também foi feita uma outra abordagem, utilizando uma coluna empacotada com sílica, de acordo com esquema mostrado na Figura 4.5.1 (a). 10 mL da amostra de gás condensado foi adicionada a sílica gel, e eluída em etapas de 250 mL de diferente solventes (Figura 4.5.1 (b)). Cada uma das frações de diferentes solventes foi separada, evaporada e reconstituída em 3 mL de MeOH e todas foram analisadas individualmente.

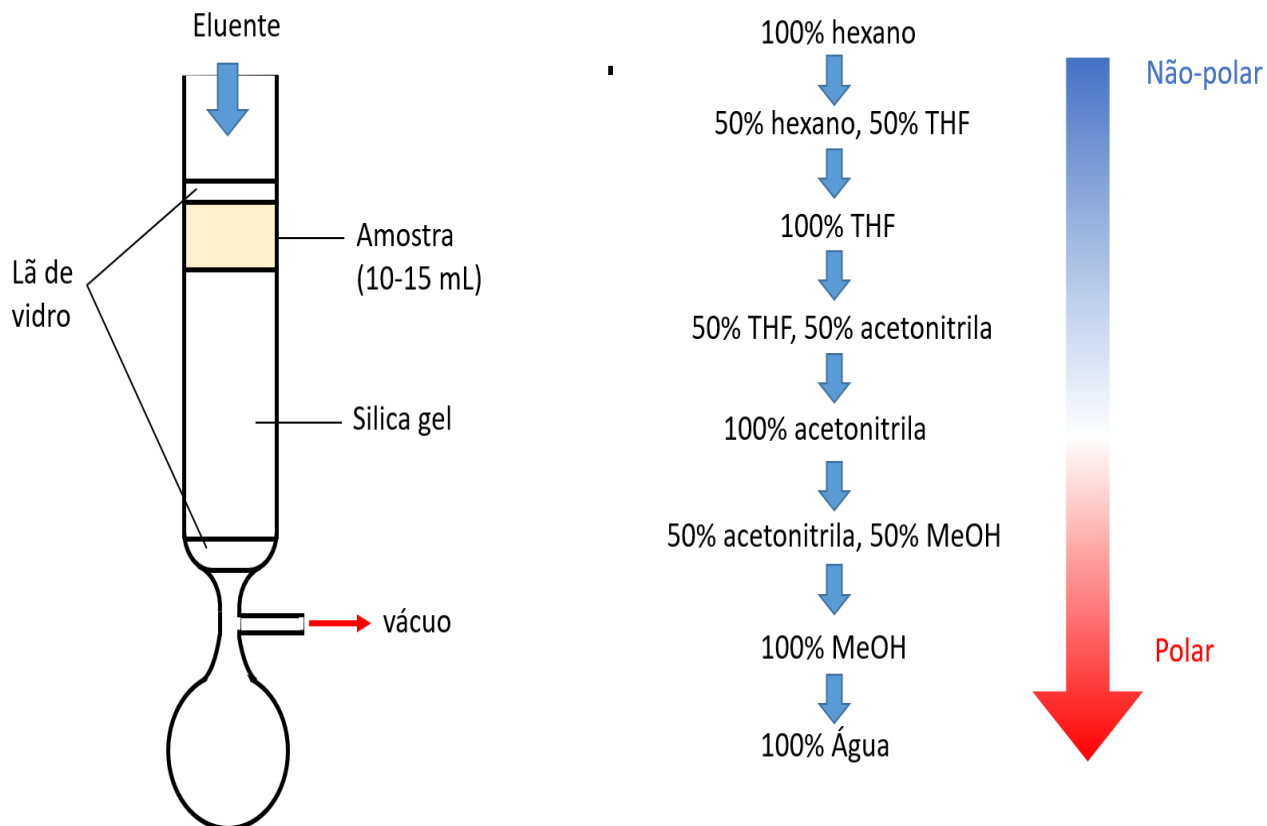


Figura 4.5.1. Esquema da extração por coluna empacotada. A) ilustração da montagem da coluna de vidro. B) Ordem dos solventes utilizados na eluição.

4.5.2 Análise das extrações utilizando SPE por HR-CS GF AAS e HPLC-ICP-MS.

A fim de se estimar a eficiência de extração dos dois cartuchos SPE, as amostras condensadas eluídas foram analisadas de forma qualitativa para Hg total usando HR-CS GF-AAS conforme exibido na Figura 4.5.2.

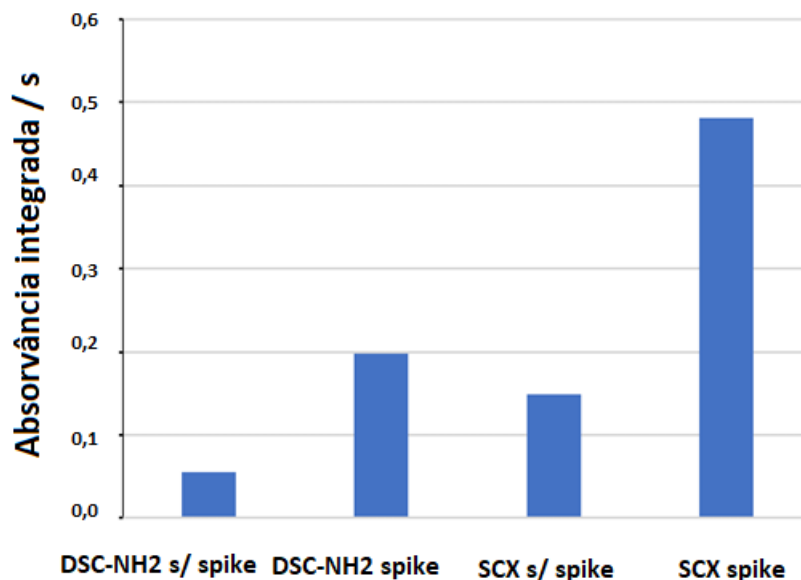


Figura 4.5.2. Análise qualitativa dos extratos obtidos por SPE.

O cartucho de SCX apresentou o melhor desempenho nas extrações. Embora estes resultados não sejam qualitativos, foi um *screening* inicial para saber se os cartuchos seriam capazes de extrair e concentrar as espécies de Hg e evitar a perda de um dia de trabalho nos instrumentos de HPLC-ICP-MS.

Uma vez que os cartuchos se mostraram eficientes para a extração de Hg, estas foram analisadas por HPLC-ICP MS. O método utilizado para a realização das análises foi baseado em um trabalho reportado por KRUPP (2008). e os cromatogramas obtidos com os diferentes cartuchos são exibidos na Figura 4.5.3.

Uma vez que não houve nenhuma derivatização das espécies de Hg, houve a coeluição do Hg^{+2} e MeHg. Um novo estudo, utilizando APDC (pirrolidinaditiocarbamato de amônio) está sendo desenvolvido, a fim de se resolver o problema.

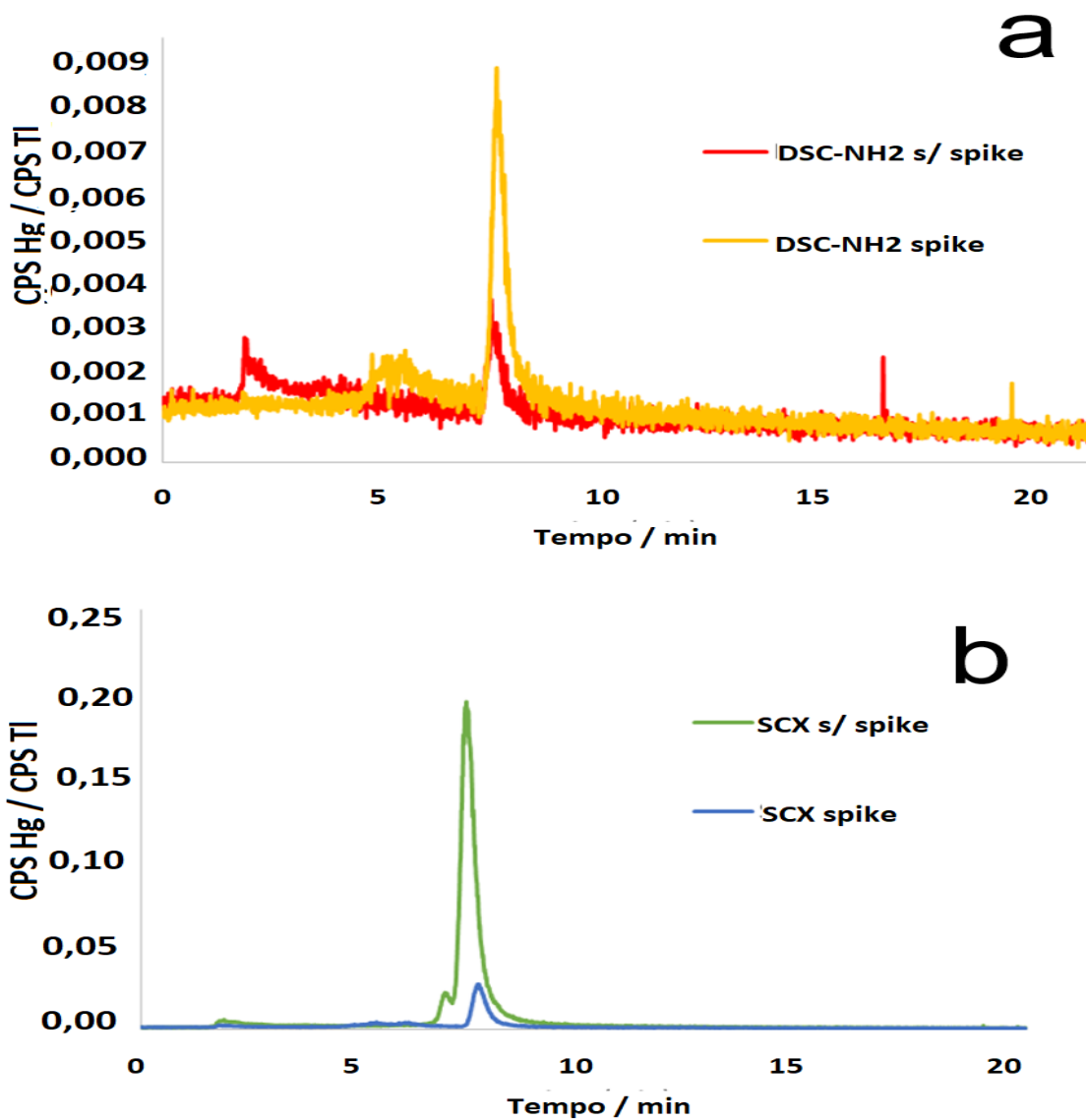


Figura 4.5.4. Cromatogramas referentes as extrações usando SPE a) Utilizando o cartucho DSC-NH₂ b) Utilizando o cartucho SCX.

4.5.3 Análise das frações obtidas por Coluna empacotada por HPLC-ICP-MS

10 mL da amostra de gás condensado foi misturado com cerca de 20 g de sílica-gel e colocado sobre a coluna, que foi coberta com lã de vidro para evitar perturbar a mistura durante a adição dos eluentes. Em seguida, a coluna foi eluída com oito diferentes frações de 250 mL em crescente ordem de polaridade (lista de

solventes mostrados na Figura 4.5.1 (b)). Para cada fração, o solvente foi evaporado usando um Rotavap. De modo a proteger a integridade da coluna de RP-HPLC, apenas as frações de 5-8 foram reconstituídas em 3 mL de metanol e analisadas. As frações menos polares podem conter compostos que podem vir a danificar uma coluna C18, devido a alta afinidade. Algumas frações reconstituídas apresentaram partículas, por essa razão foram centrifugadas (3 min a 10 000 rpm) e o sobrenadante analisado por HPLC-ICP-MS. Os resultados obtidos para cada uma das frações analisadas pode ser observado na Figura 4.5.5.

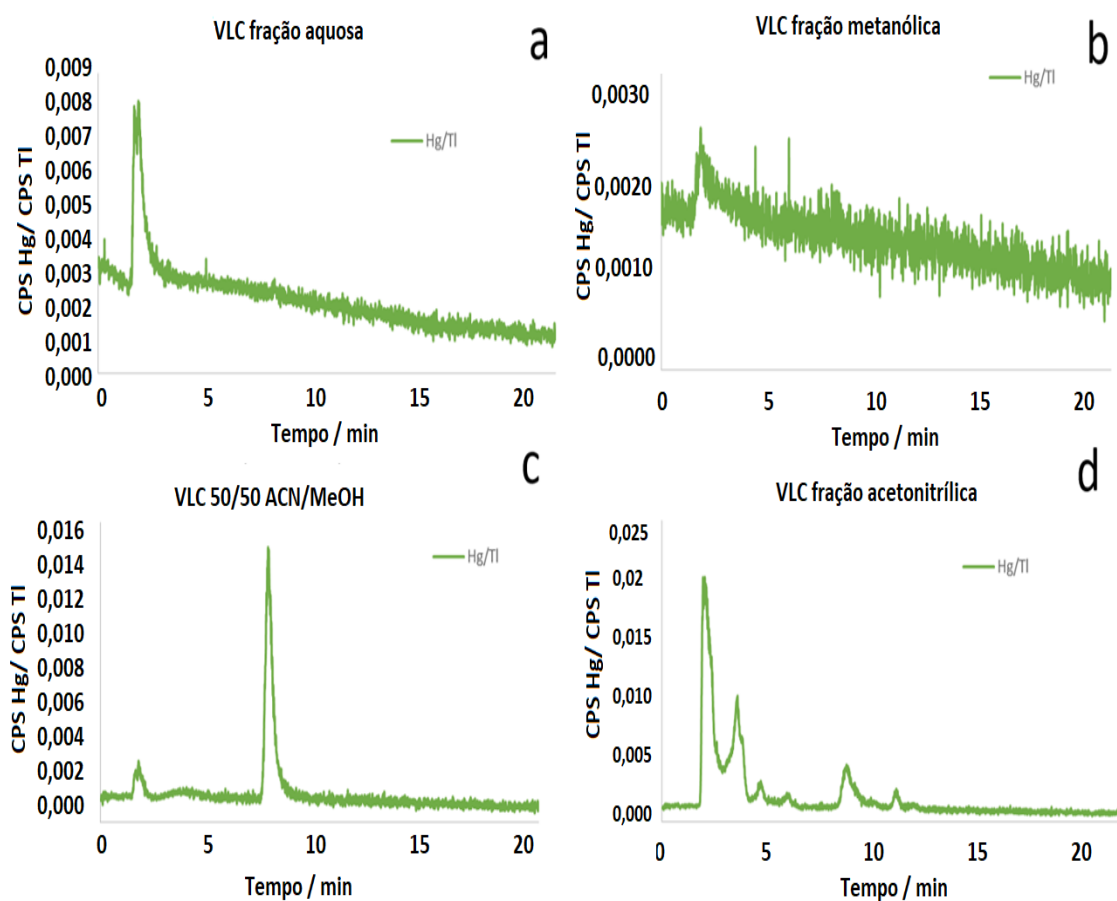


Figura 4.5.5. Cromatogramas obtidos para a amostra de gás condensado em diferentes frações eluídas de uma coluna empacotada de sílica. A) fração 100% água. B) 100% MeOH. C) 50% MeOH e 50% acetonitrila. D) 100% acetonitrila.

É possível observar que a quantidade de espécies de Hg diminui à medida que a polaridade da fração aumenta, o que significa que a maioria das espécies é mais solúvel nos solventes menos polares. As frações de água e MeOH contêm apenas espécies que eluem no *void peak*, necessitando um melhor controle do gradiente de fase móvel ou mesmo uma derivatização após a extração, para a melhor resolução dos picos. Se compararmos o espectro obtido para a fração de MeOH/acetonitrila com os espectros obtidos para a injeção direta dos padrões de Hg^{+2} e MeHg (Figura 4.5.6), observamos que ambos coeluem no mesmo ponto do cromatograma, em torno de 8 minutos.

Considerando que apenas estas duas espécies estão coelindo, acredita-se que o pico que aparece na fração de MeOH/acetonitrila, além do *void peak*, contém a maior parte do Hg^{+2} ou MeHg. Já a fração de acetonitrila é mais complexa, com pelo menos 6 picos, incluindo o pico vazio. É possível observar o pico em aproximadamente 8 minutos, que pode ser uma pequena porção de Hg^{+2} ou acetonitrila presente na amostra. Contudo os outros picos seguem sem identificação, fazendo-se necessário um estudo da composição destes. Está sendo desenvolvido um estudo destas frações utilizando HPLC-Orbitrap-MS, a fim de se observar a possível fórmula molecular destes compostos.

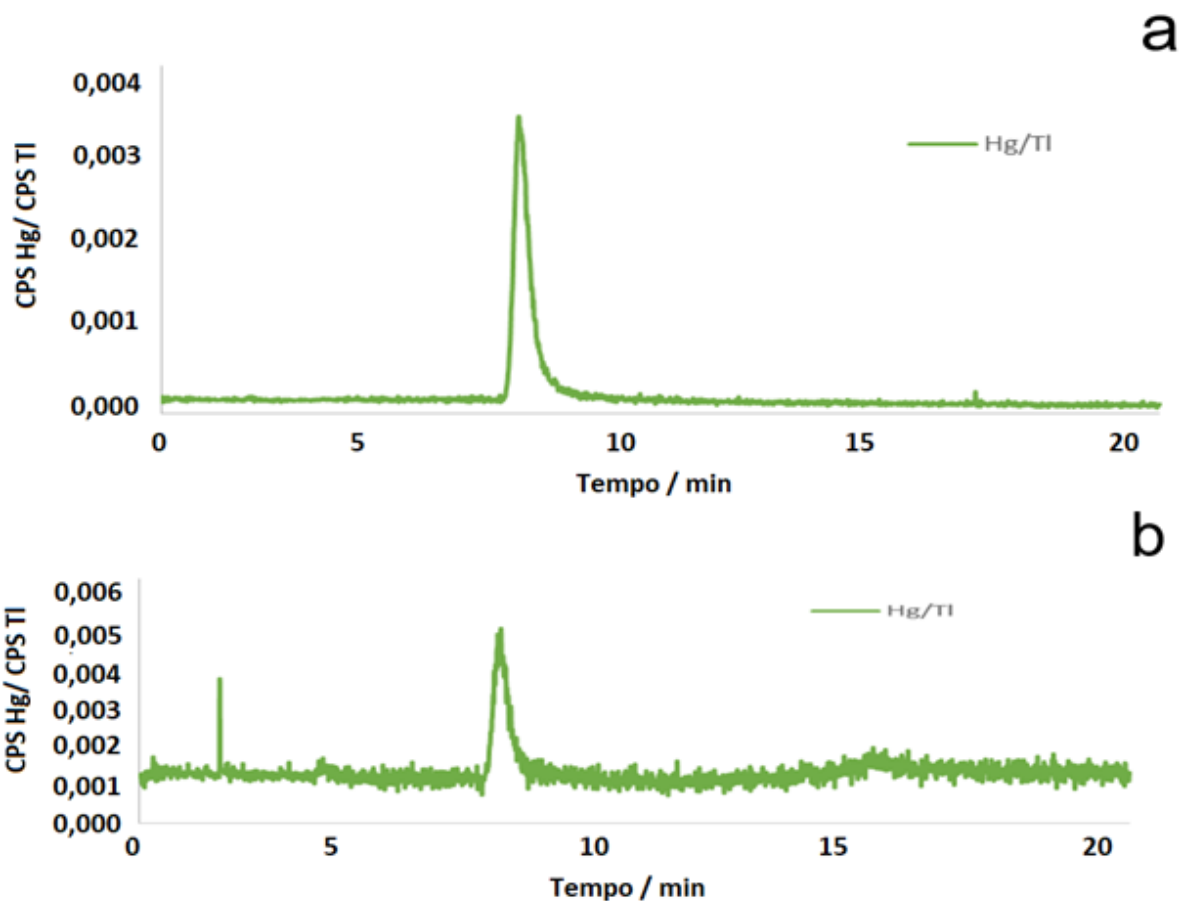


Figura 4.5.6. Cromatogramas obtidos para a injeção direta de padrões metanólicos de a) Hg^{+2} b) MeHg.

Dentre os próximos passos para este projeto, está a comparação da extração por coluna compactada de sílica com o cartucho de SPE de sílica, utilizando as mesmas frações de solventes. A importância desta comparação se dá no fato de os cartuchos de SPE exigirem um volume muito menor de solvente, além da possibilidade de se fazer várias extrações simultaneamente, utilizando aparato de vácuo para múltiplos cartuchos. Caso a eficácia seja a mesma, será otimizado um método de preparo de amostras baseado nesta forma de extração.

A identificação dos picos encontrados na fração de acetonitrila também é necessária. Será feito um estudo desta fração por HPLC-Orbitrap-MS a fim de se tentar identificar estes picos. Porém acredita-se que será difícil a ionização destes

compostos. Outra possibilidade é recolher as frações separadas pelo HPLC e utilizar ressonância magnética nuclear para Hg. Esta análise não pode ser feita na University of Aberdeen, porém há grupos colaboradores com o grupo de pesquisa TESLA capazes de realizar esta análise.

As amostras menos polares serão analisadas para se quantificar as concentrações de Hg total. Caso se encontre altos teores de Hg, serão analisadas via HPLC em fase normal. Porém, a utilização de HPLC em fase normal demanda uma grande alteração nos instrumentos, uma vez que todos equipamentos disponíveis operam em fase reversa. Sendo esta análise realizada apenas em caso de valores significativos de organo-Hg.

5.5.4 Referências

Yin, Y.-G., Chen, M., Peng, J.-F., Liu, J.-F. & Jiang, G.-B. DITHIZONE-FUNCTIONALIZED SOLID PHASE EXTRACTION-DISPLACEMENT ELUTION-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY FOR MERCURY SPECIATION IN WATER SAMPLES. **Talanta** 81 (2010) 1788–1792.

Krupp, E. M., Milne, B. F., Mestrot, A., Meharg, A. A. & Feldmann, J. INVESTIGATION INTO MERCURY BOUND TO BIOTHIOLS: STRUCTURAL IDENTIFICATION USING ESI-ION-TRAP MS AND INTRODUCTION OF A METHOD FOR THEIR HPLC SEPARATION WITH SIMULTANEOUS DETECTION BY ICP-MS AND ESI-MS. **Anal. Bioanal. Chem.** 390 (2008) 1753–1764.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 *Análise não-alvo de compostos perfluorinados por HPLC-ICP-MS-MS e HPLC-Orbitrap-MS*

Este projeto se mostrou de grande importância, pois até então não se tinha nenhuma aplicação real da técnica de ICP-MS para a determinação de F, ou mesmo, especiação de F em diferentes amostras (um artigo do grupo TESLA com a especiação de F em água de rio foi recentemente publicado).

As matrizes estudadas são de alta complexidade, com diferentes teores de sólido dissolvidos, diferentes características físico-químicas e diferentes concomitantes. Conseguir resultados satisfatórios para todas essas matrizes com apenas um método de preparo de amostra é realmente impressionante e torna o método desenvolvido de alta aplicabilidade. Mais estudos, incluindo o estudo de reprodutibilidade, parâmetros de mérito e o balanço de massas utilizando o método desenvolvido para HR-MAS deverão ser feitos na Aberdeen University, em parceria com outros pesquisadores.

Uma vez que a extensão desse projeto foi realmente muito grande, abrangendo várias amostras, sendo estudado diversos métodos de preparo de amostras, muito poderia ter sido feito, porém, o tempo mostrou-se curto, principalmente devido a baixa disponibilidade dos instrumentos, já que boa parte dos pesquisadores utilizavam um ou mais instrumentos necessários para o projeto (que precisava do ICP-MS, do HPLC e do Orbitrap-MS simultaneamente). No último mês do projeto o instrumento de HPLC e de Orbitrap-MS ficaram fora de operação por cerca de duas semanas, o que impossibilitou a conclusão adequada do projeto.

Mesmo com as limitações de tempo e acesso, foram obtidos muitos resultados e estes foram bastante esclarecedores. Um artigo será confeccionado assim que todos os dados necessários forem obtidos.

5.2 *Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS*

A análise do comportamento térmico de diferentes espécies de analito em forno de grafite é algo não é algo muito explorado na literatura de absorção atômica, uma vez que a grande maioria das análises é feita para analitos, em sua grande maioria, na forma inorgânica, seja por ser a forma majoritária na matriz, seja pela forma do preparo de amostra que mineraliza os analitos (como a digestão assistida em micro-ondas).

O estudo de espécies de F é inédito e levanta novamente a questão de que os mecanismos de ação dos analitos em altas temperaturas no forno de grafite continuam não esclarecidos. Pouco se sabe sobre as interações dos analitos comumente determinado por absorção atômica. Sabe-se ainda menos sobre os analitos determinados por absorção molecular. O fato de o mesmo analito se comportar de formas tão distintas dependendo da forma como está inicialmente ligado pode nos indicar que o processo de interação com os modificadores químicos se dá desde a inserção do analito, não apenas quando este está na forma elementar, ou mesmo em fase gasosa.

O método desenvolvido também se mostrou uma excelente ferramenta para a determinação de F total em extratos orgânicos analisados por métodos cromatográficos, sendo essencial para se obter o balanço de massa. A aplicação da técnica com esta finalidade também é pouco explorada, podendo servir como referência para futuros trabalhos.

5.3 *Determinação de lítio em amostras de esgoto por MP-AES*

Embora o método tenha sido desenvolvido com poucas otimizações e em um curto espaço de tempo, se mostrou adequado para as análises requeridas. O método não só apenas poupou tempo de preparo, uma vez que não utiliza digestores de micro-ondas (que além do tempo do programa, necessita de tempo para resfriamento e limpeza) mas também resultou em economia de reagentes, pois apenas um pequeno volume de peróxido de hidrogênio e ácido nítrico foi utilizado.

O instrumento de MP-AES, cujo a bolsista nunca teve nenhum contato (nem mesmo teórico), se mostrou extremamente fácil de ser operado, sendo uma excelente alternativa para os espectrômetros de chama, uma vez que oferece limites de detecção parecidos, com a vantagem de ser multielementar (sequencial), não necessitar de gases caros (trabalha com plasma de nitrogênio, que é obtido por um gerador acoplado ao instrumento) e de alta frequência analítica, possuindo a mesma limitação dos espectrômetros de chama, que é a inserção de amostra somente líquidas, evitando-se soluções com sólidos dispersos.

5.4 Determinação de flúor em amostras de chá via molécula CaF por MP-AES

A utilização de instrumentos de MP-AES para a determinação de F ainda não foi descrita na literatura, o que trás uma característica de inovação ao projeto realizado. Contudo, neste primeiro estudo, os limites de quantificação ficaram aquém dos obtidos por instrumentos de HR-CS AAS. Como este trabalho trata-se de ciência de base, acredita-se que em futuros estudos se consiga atingir limites de quantificação menores e com isto tornar a técnica aplicável em laboratórios de rotina. O desenvolvimento deste método também é relevante para especiações de F, uma vez que é possível hifenar instrumentos de HPLC aos instrumentos de MP-AES.

5.5 Especiação de mercúrio em gás condensado por HPLC-ICP-MS/MSutilizando extração por SPE.

Este projeto ainda está em fase de desenvolvimento na University of Aberdeen, e serão necessários cerca de 6 meses para finalizá-lo. Uma vez que o Hg é um analito bastante difícil de se trabalhar, devido suas características físico-químicas, diversos estudos de reprodutibilidade são necessários, além de se encontrar maneiras para a redução de efeitos de memória. Como estudos posteriores, está a comparação entre os resultados obtidos por coluna empacotada de sílica e cartuchos de SPE de sílica, com isso, a otimização dos solventes utilizados para a extração, assim como a otimização dos parâmetros instrumentais. Com o método

completamente otimizado, várias amostras de gás condensado serão analisadas a fim de se obter a especificação de mercúrio.

6. CONHECIMENTOS ADQUIRIDOS:

6.1. Aplicabilidade e incorporação de novas técnicas

Os métodos desenvolvidos durante o doutorado sanduíche poderão ser utilizados para análises ambientais, uma vez a análise de PFCs ainda é pouco explorada no Brasil e no mundo. A utilização dos instrumentos de HR-CS AAS para a determinação de F total em extratos orgânicos abre um novo leque de oportunidades de trabalhos em conjunto com grupos de cromatografia e outros métodos de separação, que fazem a especificação de compostos organoclorados e organofluorados. Uma vez que estas análises costumam ser análises alvo, a utilização de métodos para a determinação dos teores totais de F traz a oportunidade de se avaliar o quanto desta classe de compostos é realmente conhecida e quantificada.

Já a utilização de HPLC hifenados com ICP-MS ainda é pouco explorada no Brasil, quando comparado com outras técnicas de análise, sendo necessário profissionais que saibam trabalhar com esse tipo de instrumentação. A especificação não apenas de F, mas também de outros elementos é de extrema importância, uma vez que interações com organismos e meio-ambiente é diretamente dependente, tendo diferentes toxicidades, mobilidades e biodisponibilidades.

A possibilidade de HPLC e MP-AES trabalharem hifenados também pode ser uma nova forma, ainda não muito explorada, de se obter análises de especificação com um baixo custo de aquisição e operacional, já que instrumentos de MP-AES são muito mais baratos que instrumentos de ICP-MS. Embora não apresentem limites de quantificação tão baixos quanto os instrumentos de ICP-MS, para análises a nível de ppm, pode ser uma alternativa viável.

6.2. Geração de produtos e processos

Os estudos envolvendo a utilização dos instrumentos de ICP-MS para a determinação de F levantaram uma questão a muito discutida – A limitação destes instrumentos para a determinação de halogênios. Uma vez que estes elementos têm alta energia de ionização, o plasma de argônio não é capaz de formar espécies X^+ em quantidade adequada para se obter baixos limites de detecção, quando comparados aos outros elementos determinados por esta técnica. É possível utilizar plasma de hélio, mais quente, que forneceria energia suficiente. Porém o alto consumo de gás e a necessidade de tochas especiais para suportar o calor tornam a técnica proibitiva no ponto de vista econômico.

Após vários estudos, foi-se levantada a questão de se produzir um ICP-MS que operasse no modo negativo, o que permitiria a detecção dos halogênios com limites de detecção mais baixos. Uma companhia se mostrou interessada pela ideia e o primeiro protótipo de um ICP-MS que opere no modo negativo está sendo desenvolvido.

6.3. Contribuição da participação no projeto para sua formação

O projeto me deu oportunidade para desenvolver diversas habilidades ao mesmo tempo. Enquanto em um projeto eu era a responsável por instruir dois estudantes (uma aluna do projeto de verão e um estudante de doutorado) devido minha experiência em HR-CS AAS e HR-MAS, em outros projetos tive de aprender tudo basicamente do zero (como no caso do MP-AES) ou quase do zero, como no caso do projeto principal envolvendo HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-Orbitrap MS. No final da vigência da bolsa fui convidada a participar de um quinto projeto, que está sendo bastante desafiador, pois como já estou de volta ao Brasil, estou ajudando de forma remota, o que tem cobrado de mim um tipo de organização e compromisso que normalmente não são cobrados no dia-a-dia de um laboratório.

Embora eu tenha alguma experiência com preparo de amostras para compostos orgânicos, minha formação principal é com análise elementar. Isto

também tem sido não apenas desafiador como muito interessante, já que é uma área que me desperta muito a curiosidade. Ter que aprender técnicas novas para poder ajudar meus colegas da University of Aberdeen foi, e tem sido uma experiência maravilhosa.

Com tudo isso, meus conhecimentos com preparo de amostra, com a utilização de instrumentos hifenados para a especiação, instrumentos para caracterização como o ESI-Orbitrap-MS, sobre como utilizar a Química Analítica como ferramenta para a Química Ambiental, Arqueologia, Produção Química, Alimentos, etc, e também o domínio da língua inglesa aumentaram exponencialmente após o sanduíche. Com certeza todo esse conhecimento adquirido irá auxiliar em minhas pesquisas no Brasil, e este conhecimento também será passado para meus colegas de trabalho.

7. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS TÉCNICO-CIENTÍFICO E SIMILARES¹

Até o momento nenhum dos trabalhos desenvolvidos durante a vigência da bolsa foi levado a um congresso. Porém o projeto sobre determinação de lítio por MP-AES será levado para a reunião nacional da SBQ este ano.

8. GERAÇÃO DE PUBLICAÇÕES ESTRITAMENTE RELACIONADAS A BOLSA/VIGÊNCIA ²

Até o momento nenhum dos projetos foi publicado. Porém três artigos e uma nota técnica serão confeccionados com os dados obtidos no projeto. Dentre eles, o

¹ O projeto "Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS" foi apresentado no XV Rio Symposium - Mendoza, Argentina, em outubro de 2019

² O projeto "Estudo de modificadores químicos para a determinação de flúor total em compostos perfluorinados por HR-GF MAS" foi publicado e está exibido no Anexo II.

primeiro mencionado abaixo já está em fase de correção pelo orientado e será submetido a Talanta nas próximas semanas.

Schneider, M.; Akdhar, A.; Orme, A.; Schultes, L.; Raab, A.; Krupp, E.M.; Benskin, J.P.; Carasek, E.; Feldmann, J. EFFECT OF DIFFERENT MODIFIERS ON THE MEASUREMENT OF ORGANOFLUORINE COMPOUNDS USING HIGH-RESOLUTION GRAPHITE FURNACE MOLECULAR ABSORPTION SPECTROMETRY. Manuscript (2019).

Ruhland, D.; Schneider, M.; Raab, A.; Carasek, E.; Feldmann, J.; Krupp, E.M. SPECIATION OF MERCURY IN GAS CONDENSATE SAMPLES BY RP-HPLC-ICP-MS/MS. A COMPARISON OF SOLID PHASE EXTRACTIOS. Manuscript (2020).

Schneider, M.; Nxumalo, T.N.; Raab, A.; Krupp, E.M., Feldmann, J. THE USE OF RP-HPLC-ICP-MS/MS FOR FLUORINE SPECIATION IN ENVIRONMENTAL SAMPLES USING SOLID PHASE EXTRACTION. Manuscript (2019).

Hellmann, S.; Schneider, M.; Akdhar, A.; Raab, A.; Krupp, E.M.; Feldmann, J. A NOVEL METHOD FOR FLUORINE DETERMINATION IN TEA SAMPLES BY MP-AES *via* CaF MOLECULE. Manuscript (2019).