

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRA BIOLÓGICA TRATADA COM HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMÔNIO EM ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

RESUMO

Relata-se um estudo comparativo de diferentes formas de introdução da amostra em espectrometria de absorção atômica para a determinação de Cd, Cu e Zn em amostras biológicas após serem tratadas com hidróxido de tetrametilamônio. A nebulização pneumática convencional foi usada nas três formas. A solução da amostra foi introduzida por aspiração através do tubo capilar do nebulizador, por microinjeção manual e por microinjeção através de um sistema de injeção em fluxo. Todas as três formas levaram à boa exatidão e precisão. As melhores sensibilidades e limites de detecção foram obtidos usando-se o sistema FI. Simplicidade, baixo custo e baixo consumo de amostra e reagentes são qualidades da microinjeção manual.

Palavras-chave: amostra biológica, introdução da amostra, espectrometria de absorção atômica com chama, hidróxido de tetrametilamônio, nebulizador pneumático, cádmio, cobre e zinco

SUMMARY

A comparative study of the performances of different ways of sample introduction in flame atomic absorption spectrometry (FAAS) for the determination of Cd, Cu and Zn in biological samples after treatment with tetramethylammonium hydroxide is reported. The conventional system of pneumatic nebulization was employed for the three systems. The sample solution was introduced by aspiration through the capillary tube of the nebulizer, by manual microinjection, and by microinjection with a flow injection (FI) system. All three systems had presented good accuracy and precision. The best sensitivities and detection limits were reached using the FI system. Simplicity, low cost and low sample and reagents consumptions are qualities of the manual microinjection.

Keywords: biological sample, sample introduction, flame atomic absorption spectrometry, tetramethylammonium hydroxide, pneumatic nebulization, cadmium, copper, zinc

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o meio ambiente tem recebido uma grande carga de compostos tóxicos, oriunda não apenas de causas naturais, mas principalmente de atividades antropogênicas. Além de afetarem imediatamente a qualidade de vida, colocam em risco de morte diversos orga-

nismos, comprometendo a sobrevivência das gerações futuras. Dentre tantos poluentes estão os metais que fazem parte da história do homem há milênios, sendo utilizados como matéria-prima em várias aplicações nos dias atuais. Metais como cádmio, cobre e zinco são extensamente

*Mirela Ghisi,
Anderson Schwingel Ribeiro*,
Mariana Antunes Vieira e
Adilson José Curtius*

Departamento de Química,
Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Trindade

*Autor para correspondência:
CEP: 88040-900
Florianópolis, SC
Fone: (48) 3721-6841
Fax: (48) 3721-6850
E-mail: andersonsch@hotmail.com

usados nas indústrias que disponibilizam produtos como fios elétricos, tubulações, baterias para equipamentos eletrônicos, entre tantas outras aplicações que fazem parte do nosso cotidiano. Esses produtos manufaturados, após a sua utilização deveriam ser reciclados e, quando isto não é possível, um destino correto é o mínimo que deveria ser feito. No entanto, é sabido que a alta geração de resíduo tem levado ao despejo indiscriminado de metais no meio ambiente, que mais cedo ou mais tarde contaminam o seu maior responsável, o próprio homem, seja através do seu ciclo alimentar ou por outra fonte de contaminação, tornando a vida na terra cada vez mais perigosa (1).

Estes fatos levam à necessidade de realizar um monitoramento contínuo destes metais nos alimentos a serem consumidos pelas populações, principalmente de animais utilizados nas dietas dos seres humanos como, por exemplo, peixes e aves. Além disso, se torna necessário o monitoramento do próprio ambiente que está sujeito a estas contaminações, auxiliando desta forma na prevenção de possíveis problemas ambientais.

Atualmente são várias as alternativas experimentais disponíveis para uma análise segura. Os instrumentos disponíveis permitem uma detecção monoelementar e/ou multielementar simultânea, que podem atingir níveis muito baixos de concentrações (ppt), com uma manipulação mínima da amostra como, por exemplo, na análise direta de sólidos. Por outro lado, toda esta tecnologia disponível tem um custo elevado, tanto na aquisição dos equipamentos quanto na sua manutenção, que muitas vezes os laboratórios não querem ou não podem arcar com estas despesas, principalmente em países pobres e/ou em desenvolvimento, onde muitas vezes há falta de mão de obra especializada nas técnicas mais refinadas. Por outro lado, a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) alia a simplicidade com baixo custo, sendo estes dois os principais fatores responsáveis pela popularização desta técnica, amplamente utilizada na área acadêmica, na indústria e em laboratórios prestadores de serviços.

A F AAS foi proposta há mais de 50 anos por Alan Walsh (2), mas ao contrário de se tornar uma técnica obsoleta e ultrapassada ao longo dos anos, é uma técnica que vem se modernizando e absorvendo novas tecnologias, resultando em novos equipamentos extremamente competitivos com o mercado atual como, por exemplo, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em chama (HR-CS F AAS), que foi recentemente lançada comercialmente (3).

Vários grupos de pesquisa vêm recentemente desenvolvendo novas alternativas para melhorar a performance da F AAS. Flores *et al.* (4,5) realizaram com sucesso aplicações de um dispositivo desenvolvido por eles, o qual permitiu a análise direta de sólidos na chama. Gáspár e Berndt (6,7) desenvol-

veram um outro dispositivo com aspectos que se assemelham ao forno de grafite em AAS, conhecido como *flame furnace* (FF), o qual consiste em um tubo de níquel que é inserido na chama do F AAS, permitindo um aumento no tempo de residência do analito no feixe óptico e também a introdução de quantidade discreta da amostra, propiciando um ganho na sensibilidade para vários analitos.

Atualmente, esta alternativa está se popularizando e muitos outros grupos estão desenvolvendo metodologias para o uso do FF AAS (8-10). Recentemente, Ribeiro e colaboradores (11) realizaram o estudo do acoplamento do nebulizador ultrassônico para o F AAS, diretamente na câmara de nebulização ou para o sistema FF AAS, resultando numa melhora significativa de sensibilidade para alguns elementos e também em um menor consumo da amostra.

Diversas alternativas podem ser utilizadas para o preparo das amostras biológicas para determinações por F AAS com a nebulização pneumática convencional, sendo que as mineralizações com ácidos sob aquecimento em sistema aberto ou fechado são as mais populares. No entanto, estes procedimentos apresentam alguns inconvenientes como o elevado tempo de preparo, requer laboratório adequado com grande quantidade de vidrarias e reagentes e aumentam o risco de contaminação da amostra e perda dos analitos. Entretanto, quando os procedimentos são bem conduzidos, esses inconvenientes são minimizados ou mesmo eliminados. Uma revisão sobre este assunto foi realizada por Oliveira *et al.* (12). Amostras biológicas em geral podem ser facilmente solubilizadas com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em temperatura ambiente, sem a necessidade de aplicação de energias para o aquecimento, como as microondas ou ultra-sônicas. O TMAH é uma base orgânica forte, solúvel em água ou álcoois resultando em soluções incolores com odor de amina, sendo capaz de complexar e estabilizar elementos voláteis. As amostras biológicas tratadas com TMAH fornecem uma solução com características de uma suspensão, apresentando um baixo fator de diluição e permanecendo estável durante meses, mesmo quando estocada em temperatura ambiente. Como inconvenientes, podemos citar o odor e a alta viscosidade da solução resultante do preparo da amostra, assim os procedimentos de análise precisam estar bem otimizados para evitar possíveis interferências não-espectrais. Devido à grande simplicidade do preparo das amostras biológicas com TMAH muitos estudos podem ser encontrados na literatura (13-18) e uma revisão recente da solubilização alcalina foi publicada por Nóbrega *et al.* (19).

Dentro do contexto de buscar o desenvolvimento de novas metodologias que utilizam a introdução discreta da amostra, o presente trabalho tem por objetivo realizar

um estudo de diferentes formas de introdução da amostra no F AAS empregando a nebulização pneumática convencional, utilizando a aspiração contínua e a introdução discreta de pequenos volumes, com o auxílio de um pequeno funil para injeção manual ou com um sistema por injeção em fluxo (FI). A aplicabilidade deste estudo será avaliada pela determinação de Cd, Cu e Zn em amostras biológicas tratadas com TMAH, levando-se em conta parâmetros como exatidão, precisão, sensibilidade, limite de detecção, consumo da amostra e frequência analítica.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Todas as medidas foram obtidas em um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), operado com atomização em chama e equipado com corretor de fundo de lâmpada de arco de deutério. Lâmpadas de cátodo oco (PerkinElmer) foram utilizadas como fontes de radiação, e os parâmetros instrumentais empregados foram: comprimento de onda de 228,8; 324,4 e 213,9 nm, correntes de 4, 15 e 15 mA para Cd, Cu e Zn, respectivamente, com fenda espectral de 0,7 nm para todos os estudos. Os gases utilizados na chama foram ar comprimido e acetileno, com vazões de 8,0 e 3,0 L min⁻¹, respectivamente. O acetileno foi fornecido pela White Martins (São Paulo, SP, Brasil) com pureza de 99,6%. O equipamento é gerenciado por microcomputador com programa AA Winlab em ambiente Windows. Altura e área de pico, corrigidas do sinal de fundo, foram usadas para monitorar os sinais analíticos para a nebulização contínua ou com injeção de volumes discreto da amostra, respectivamente. As microinjeções manuais de 300 µL foram realizadas com o auxílio de uma micropipeta variável de 100 a 1000 µL em um microfunil imobilizado em um suporte universal. O microfunil foi confeccionado em Teflon® (20), apresentando 2 cm de diâmetro e concavidade com ângulo de 45°, sendo que o seu orifício foi conectado ao nebulizador pneumático através de um tubo capilar de PTFE. Já o sistema de injeção em fluxo (FI) foi configurado para realizar a introdução também de 300 µL, através de uma alça de amostragem em um injetor comutador confeccionado em acrílico (21) e uma bomba peristáltica de quatro canais MS-Reglo (Ismatec, Glattbrugg, Suíça), linhas de transmissão e tubos de Tygon com 1,85 mm de diâmetro interno foram utilizados para o bombeamento da amostra e solução carreadora. Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica AG 204 (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e tubos de polietileno de 15 mL (Sarstedt, Newton, NC, USA).

Reagentes, materiais e amostras

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água utilizada no preparo das soluções foi destilada e posteriormente desionizada a uma resistividade de 18,2 MΩ cm em um sistema Milli-Q Millipore (Bedford, MA, USA). O ácido clorídrico da Merck (Darmstadt, Germany, N° K27703017) foi destilado abaixo do seu ponto de ebulição, em um destilado de quartzo da Kürner Analysentechnik (Rosenheim, Germany). Uma solução de TMAH 25% m/v em metanol (Sigma, N° 40K1265, St. Louis, MO, USA) foi utilizada para a solubilização das amostras biológicas. As soluções estoques monoelementares contendo 1000 mg L⁻¹ de Cd, Cu e Zn foram preparadas dissolvendo os sais de alta pureza com ácidos apropriados, conforme as informações do fabricante (Spex, Eddison, NJ, USA). As diluições necessárias para obtenção das curvas de calibração foram feitas em meio de HCl 1% v/v ou em meio de TMAH, com concentração similar da amostra a ser analisada, para uma das amostras.

Os seguintes materiais de referência certificados foram analisados: TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta) e DORM-2 (músculo de peixe) procedentes do National Research Council Canada, NIST 8414 (músculo bovino) do National Institute of Standards and Technology e NBS 1566a (tecido de ostra) do National Bureau of Standards. Os materiais utilizados (vidrarias, frascos de polietileno, ponteiras, espátulas, etc.) foram previamente lavados com água de torneira e deixados em contato com uma solução de Extran® diluído a 1,0% v/v por pelo menos 24 h, removendo assim os resíduos orgânicos destes materiais. Posteriormente, os mesmos materiais foram enxaguados com água destilada e então deixados em contato por no mínimo 48 h em uma solução de HNO₃ 10,0% v/v e em seguida, foram enxaguados com água desionizada por cinco vezes consecutivas e levados à capela de fluxo laminar para secagem.

Preparo das amostras

As amostras foram preparadas diretamente em frascos de polietileno de 15 mL, pela mistura de aproximadamente 250 mg da amostra biológica certificada em pó com 2,5 mL de água desionizada. Após aproximadamente 30 min, uma solução de 25% m/v de TMAH foi adicionada, usando a proporção de 5 µL de TMAH para cada 1 mg de amostra. Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por um tempo mínimo de 2 h com eventual agitação manual. Após a completa solubilização do material, o volume foi completado com água desionizada. As soluções resultantes apresentaram o aspecto de uma suspensão, com cores turbidas, que dependendo da amostra, apresentaram tons amarelos à marrom escuro. A concentração final de TMAH foi de 2,1% m/v.

- . FT-IR
- . FT-NEAR
- . Raman
- . Microscopia IR
- . Analisador de Gases

- . Validações
- . Cursos e Treinamentos
- . Assistência Técnica



Nicolet 380 + Centaurus



Nicolet 6700 + Continuum

Liderança em Espectrometria Infravermelha FT-IR

Rua Turiassú, 390 - CJ. 43 - São Paulo - SP
Tel.: (11) 3875-5787 - Fax.: (11) 3875-0903
www.charistech.com.br



QUIMIS® 30 anos de inovação tecnológica.



Q216F20M
Capela de Fluxo
Laminar Vertical Mini



Q400A
pH Metro de Bancada
Microprocessado



Q842-210
Sistema de Osmose
Reversa 10 litros/hora



Sistema Etna Spencer BA 450F
• Iluminação incidente e transmitida;
• Fluorescência;
• Cinco objetivas de ótica infinita.



Q250M
Agitador Mecânico de Alto
Torque Microprocessado



Produtos especiais para utilização em laboratórios com alta tecnologia e precisão.

Consulte nosso site ou departamento de vendas e conheça toda linha de produtos disponíveis.

Matriz: Diadema - SP - Vendas: 11 4055-9999 / PABX: 11 4055-9900 / FAX: 11 4055-9988 - e-mail: vendas@quimis.com.br

Filial: Campinas - SP - PABX: 19 3279-0292 / FAX: 19 3279-1407 - e-mail: quimiscampinas@quimis.com.br

SAQ • Serviço de Atendimento **QUIMIS**. Para críticas e sugestões: saq@quimis.com



www.quimis.com.br

Procedimento

A determinação de Cd, Cu e Zn nas amostras biológicas foi primeiramente realizada nos três sistemas estudados empregando a calibração externa com padrões aquosos em meio de HCl 1% v/v, sendo que as amostras estavam em meio de TMAH. No entanto, o sistema de nebulização pneumática convencional e com a microinjeção manual não apresentou limites de detecção (LD) adequados para a determinação de Cd na amostra de tecido de ostra (NBS 1566a). Com a finalidade de melhorar a sensibilidade do método, a amostra foi novamente preparada em uma concentração maior através do uso de aproximadamente 500 mg (ao invés de 250 mg) com um volume final de 10 mL ao invés de 15 mL. Neste caso, a calibração teve que ser realizada com padrões aquosos contendo a mesma concentração de TMAH presente na solução da amostra, no caso 12,5% m/v.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de realizar os estudos, as condições do F AAS foram checadas e ajustadas diariamente com uma solução padrão de 5 mg L⁻¹ de Cu em meio de 1,0% v/v de HCl para se obter a melhor performance do equipamento, avaliando parâmetros como a posição da chama, nebulização e vazão dos gases. Posteriormente, cada sistema foi montado para avaliar a sua performance através do procedimento de calibração e aplicação na determinação de Cd, Cu e Zn nas amostras biológicas certificadas. O volume escolhido de 300 µL para a microinjeção manual se mostrou adequado para o propósito dos estudos, fornecendo um sinal mensurável com boa reprodutibilidade entre as injeções, com um consumo reduzido da amostra. Este mesmo volume também foi adotado para os estudos com o sistema FIA.

Na Tabela I estão apresentados os parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Cd, Cu e Zn em cada sistema estudado no F AAS. Como pode ser observado, a sensibilidade obtida com uso dos sistemas de microinjeção em funil e sistema FI foi de aproximadamente 3 e 3,5 vezes maior em relação ao obtido com o uso da aspiração convencional, respectivamente. Essa diferença de sensibilidade se deve à forma de avaliação do sinal analítico, pois para a nebulização convencional, o sinal contínuo foi avaliado com uso da medida da altura do pico, enquanto que para as microinjeções o sinal transiente foi avaliado pela área do pico, resultando no ganho de sensibilidade supracitado. A microinjeção manual forneceu um pico irregular, ao contrário do sistema FIA que apresentou um pico bem definido, porém essa diferença não apresenta maiores implicações quando a medida da área é utilizada. Os sinais obtidos em cada sistema são apresentados na Figura I.

Entretanto, quando se comparam os coeficientes angulares entre as microinjeções, pode-se observar pela Tabela I que o sistema FI levou a um ganho de sensibilidade em comparação com a injeção manual de até 57% (Zn). Este resultado pode ter sido ocasionado pela diferença nas condições dentro da câmara de nebulização nos dois casos, pois na injeção manual a amostra é nebulizada em um ambiente seco, o que facilita a sua decantação e adsorção nas paredes da câmara, diminuindo a eficiência de transporte do aerossol formado para dentro da chama. Por outro lado, o sistema FIA utiliza a água como carreador e no momento em que a solução é nebulizada, esta encontra um ambiente úmido que é propício para o transporte do aerossol para dentro da chama, resultando em uma maior sensibilidade. Pode ser observado ainda pela Tabela I que todas as curvas de calibração apresentaram razoáveis coeficientes de correlação linear,

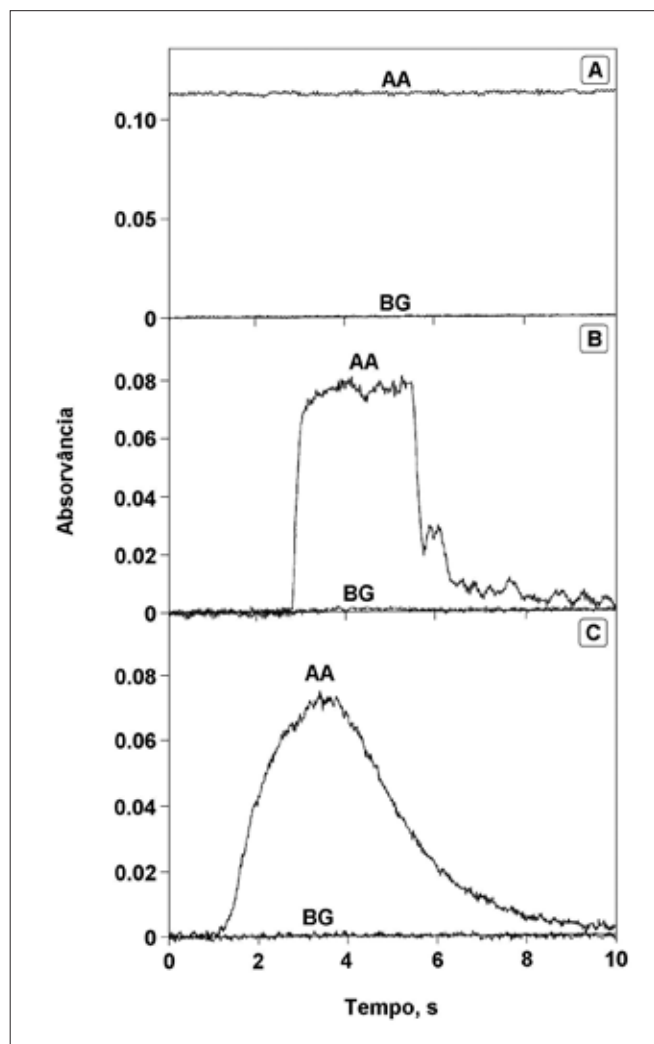


Figura I. Típicos sinais obtidos para Cd usando a amostra TORT-2 por F AAS. (A) nebulização pneumática convencional, (B) microinjeção manual com funil e (C) microinjeção com sistema FIA. Os sinais analíticos para (B) e (C) são integrados, ou seja, Absorbância, s

com $R \geq 0,993$. Os limites de detecção foram melhores para o sistema FI, o que propiciou a determinação de Cd, Cu e Zn na amostra com um maior fator de diluição, possibilitando a calibração com padrões aquosos em meio de HCl 1% v/v, pois não foi observada a presença de interferência não-espectral com este sistema.

O sistema de aspiração convencional e de microinjeção manual forneceram sensibilidades adequadas para determinação de Cu e Zn nas amostras biológicas estudadas, livres de interferência não-espectral, enquanto que para o Cd, devido

à baixa concentração deste analito na amostra de tecido de ostra (NBS 1566a), se fez necessário à análise utilizando uma maior massa dessa amostra diluída para um menor volume final (500 mg para 10 mL) para que esses sistemas possibilitassem a quantificação, resultando em limites de detecção dos métodos semelhantes ao obtido com o sistema FI. Por outro lado, houve um aumento na viscosidade da solução da amostra, requerendo-se uma calibração com soluções aquosas em meio semelhante ao da solução da amostra, no caso 12,5% m/v de TMAH.

Elemento	Sistema	Faixa de calibração (mg L ⁻¹)	Coefficiente angular *(L mg ⁻¹) ou ***(L mg ⁻¹) s	R	LD (µg L ⁻¹)	LD (µg g ⁻¹)
Cd	(A)	0,1 – 2,5	0,17*	0,9996	18	0,4
	(B)	0,1 – 2,5	0,50**	0,9994	30	0,6
	(C)	0,1 – 1,0	0,62**	0,9997	10	0,6
Cu	(A)	0,1 – 5,0	0,068*	0,9996	44	2,6
	(B)	0,1 – 5,0	0,18**	0,9997	17	1,0
	(C)	0,1 – 5,0	0,24**	0,9999	13	0,8
Zn	(A)	0,1 – 5,0	0,24*	0,9939	25	1,5
	(B)	0,25 – 1,5	0,65**	0,9982	19	1,1
	(C)	0,25 – 1,5	1,01**	0,9999	15	0,9

Tabela 1. Parâmetros de mérito obtidos para a determinação de Cd, Cu e Zn em amostras biológicas certificadas tratadas com TMAH por F AAS. (A) aspiração convencional, (B) microinjeção manual com funil e (C) microinjeção com sistema FI (n = 3)

Elemento	Amostras	Valor certificado	Valor encontrado		
			(A)	(B)	(C)
Cd	1566a	4,15 ± 0,38	4,38 ± 0,23	4,20 ± 0,61	4,29 ± 0,70
	TORT-2	26,7 ± 0,6	27,8 ± 0,1	29,2 ± 0,1	28,2 ± 0,3
Cu	1566a	66,3 ± 4,3	63,4 ± 0,4	69,5 ± 1,3	69,0 ± 0,9
	TORT-2	106 ± 10	106 ± 1	118 ± 1	106 ± 1
	DORM-2	2,34 ± 0,16	1,79 ± 0,35	1,99 ± 0,45	2,19 ± 0,43
	NIST 8414	2,84 ± 0,45	2,59 ± 0,21	3,49 ± 0,32	3,19 ± 0,45
Zn	1566a	830 ± 57	836 ± 3	827 ± 4	788 ± 9
	TORT-2	180 ± 6	181 ± 2	192 ± 2	174 ± 1
	DORM-2	25,6 ± 2,3	23,9 ± 0,2	22,1 ± 1,2	26,4 ± 1,7
	NIST 8414	142 ± 14	138 ± 2	126 ± 3	142 ± 6

Tabela 2. Valores certificados e encontrados, em µg g⁻¹, por F AAS (n = 3) para Cd, Cu e Zn em amostras biológicas tratadas com TMAH. (A) aspiração convencional, (B) microinjeção manual com funil e (C) microinjeção com sistema FIA

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises dos materiais biológicos certificados empregando as formas de introdução de amostra estudadas, após o tratamento alcalino com o TMAH. A aplicação do teste-t de Student mostrou para um nível de 95% de confiança, que os resultados encontrados não apresentam diferenças significativas em relação aos valores de concentração certificados, com exceção da concentração de Cd encontrada para amostra TORT-2 utilizando o sistema de microinjeção manual, que apresentou um nível de confiança de 99%. De um modo geral os desvios padrões relativos (RSD, %) foram considerados adequados para o nível de concentração, apresentando valores médios de 4%; 6% e 7% para a nebulização convencional, microinjeção manual e com FIA, respectivamente. As concentrações certificadas de Cd nas amostras DORM-2 e NIST 8414 são $0,043 \pm 0,008$ e $0,013 \pm 0,011 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Estas concentrações estão abaixo dos limites de detecção para todas as três formas de introdução de amostra estudadas, não permitindo, portanto, a determinação deste analito nestas amostras.

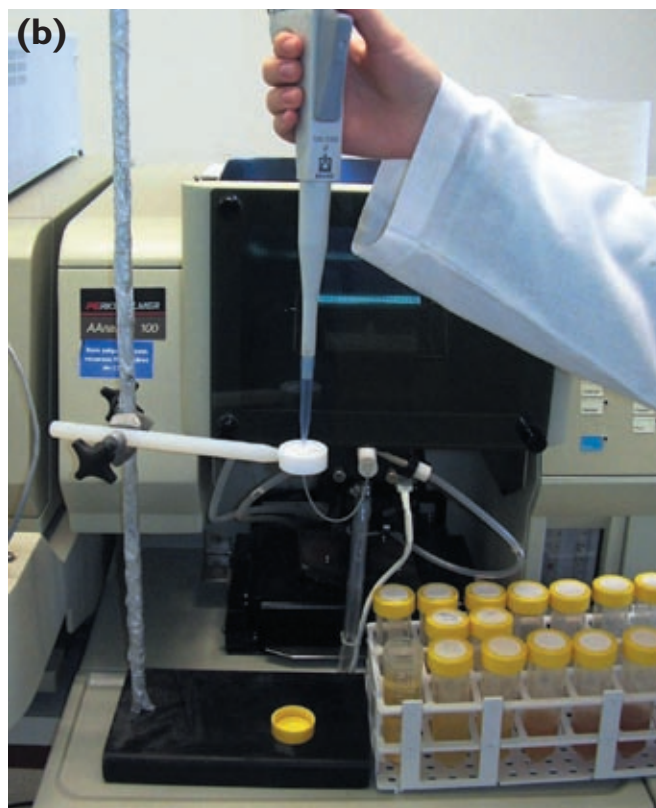


Figura 2. Sistemas de introdução de amostra utilizados para determinação de Cd nas amostras biológicas. (a) nebulização pneumática convencional, (b) microinjeção manual com funil e (c) microinjeção com sistema FIA.

CONCLUSÕES

Foi possível realizar com sucesso a determinação de Cd, Cu e Zn nas amostras biológicas tratadas com TMAH utilizando as três formas de introdução de amostra investigadas. As duas técnicas de microinjeção (funil e FI) podem ser empregadas para análise rotineira de amostras biológicas, já que apresentaram adequada exatidão, apresentando como vantagem o baixo consumo de amostra e reagentes. A microinjeção manual é extremamente simples de ser implementada apresentando um baixo custo, pois necessita apenas de um pequeno funil e uma micropipeta, entretanto o analista precisa adquirir um pouco de habilidade operacional para obter uma boa precisão. Por

outro lado, o uso do sistema FI facilitou a reprodutibilidade e proporcionou um aumento de sensibilidade, o qual permitiu a análise de soluções de amostras mais diluídas, que não apresentaram interferências. Certamente, todos os elementos frequentemente determinados por F AAS com nebulização pneumática convencional, poderão ser determinados com sucesso utilizando a microinjeção manual ou o uso do sistema FI.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas.

Referências

1. AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metals: Gerenciamento da Toxicidade**, first ed., Atheneu, São Paulo, 2003.
2. WALSH, A. *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*, **Spectrochim. Acta** 1955, 7, 108; erratum, *ibid*, p. 252.
3. WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-Resolution Continuum Source AAS**, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
4. FLORES, E.M.M.; COSTA, A.B.; BARIN, J.S.; DRESSLER, V.L.; PANIZ, J.N. G.; MARTINS, A.F. *Direct flame solid sampling for atomic absorption spectrometry: determination of copper in bovine liver*, **Spectrochim. Acta Part B** 2001, 56, 1875.
5. FLORES, E.M.M.; PANIZ, J.N.G.; COSTA, A.B.; MULLER, E.I.; MARTINS, A.F.; DRESSLER, V.L. *Cadmium determination in biological samples by direct solid sampling flame atomic absorption spectrometry*, **Spectrochim. Acta Part B** 2002, 57, 2187.
6. GÁSPÁR, A.; BERNDT, H. *Beam Injection Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A New Flame Method*, **Anal. Chem.** 2000, 72, 240.
7. GÁSPÁR, A.; BERNDT, H. *Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) — a simple method for trace element determination with microsamples in the µg/l concentration range*, **Spectrochim. Acta Part B** 2000, 55, 587.
8. PEREIRA-FILHO, E.R.; BERNDT, H.; ARRUDA, M.A.Z. *Simultaneous sample digestion and determination of Cd, Cu and Pb in biological samples using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) with slurry sample introduction*, **J. Anal. At. Spectrom.** 2002, 17, 1308.
9. NASCENTES, C.C.; FERNANDES, K.G.; KAMOGAWA, M.Y.; NOGUEIRA, A. R.A.; NÓBREGA, J.A. *Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*, **Spectrochim. Acta Part B** 2005, 60, 749.
10. ALEIXO, P.C.; SANTOS-JÚNIOR, D.; TOMAZELLI, A.C.; RUFINI, I.A.; BERNDT, H.; KRUG, F.J. *Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultra sound-assisted sample preparation*, **Anal. Chim. Acta** 2004, 512, 329.
11. RIBEIRO, A.S.; BORGES, D.L.G.; VIEIRA, M.A.; CURTIUS, A.J. *Coupling of ultrasonic nebulization to flame furnace atomic absorption spectrometry - new possibilities for trace element determination*, **Microchem. J.** 2006, doi:10.1016/j.microc.2006.08.002.
12. OLIVEIRA, E. *Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends*, **J. Brazil Chem. Soc.** 2003, 14, 174.
13. MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. *Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization*, **Microchem. J.**, 2004, 76, 23.
14. RIBEIRO, A.S.; MORETTO A.L.; ARRUDA M.A.Z.; CADORE S. *Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide*, **Microchim. Acta**, 2003, 141, 149.
15. MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V.L.; KEMIECIKI, G.A. *Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation*, **Anal.Chim. Acta**, 2002, 470, 195.
16. RIBEIRO, A.S.; CURTIUS, A.J.; POZEBON, D. *Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide*, **Microchem. J.**, 2000, 64, 105.
17. SILVA, R.G.L.; WILLIE, S.N.; STURGEON, R.E.; SANTELLI, R.E.; SELLA, S.M. *Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry*, **Analyst**, 1999, 124, 1843.
18. TORRES, D.P.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S.; CURTIUS, A.J. *Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell*, **J. Anal. At. Spectrom.**, 2005, 20, 289.
19. NÓBREGA, J.A.; SANTOS, M.C.; DE SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. *Sample preparation in alkaline media*, **Spectrochim. Acta Part B**, 2006, 61, 465.
20. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 2º Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1985.
21. BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; REIS, B.F. *Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption*, **Anal. Chim. Acta**, 1978, 101, 17.