

Desenvolvimento de método empregando microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME) para determinação de sulfonamidas em água superficial por HPLC-DAD

Eduardo Carasek*

Camila M. S. Vieira

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

*eduardo.carasek@ufsc.br

Recebido: 18/10/2017

Aceito: 21/11/2017

Abstract

A simple, precise and accurate method was developed and validated for the extraction of sulfonamides in surface water samples over a wide linear working range and based on the principles of green chemistry. Using the liquid phase microextraction technique supported by polypropylene hollow membrane in three phase configuration the main extraction parameters were optimized through experimental design. The optimum extraction conditions are addition of 11.2 g of ammonium sulfate in 15 mL of donor phase, 1-octanol to fill the hollow fiber pores, donor and receptor phases at pH 5 and 10, respectively, and 60 min of extraction time. The separation/detection was performed by high performance liquid chromatography and diode array detection. The main analytical parameters of merit for the proposed method were evaluated, with the limit of quantification for the five sulfonamides being higher than 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and relative standard deviation (RSD) less than 17%. Recovery studies revealed values between 61 - 119%. The proposed method is promising for routine analyzes in surface water, in view of the emerging concern of environmental contamination by sulfonamides.

Keywords: microextraction, hollow fiber, sulfonamides, aqueous sample.

Resumo

Um método simples, linear, preciso, com ampla faixa de trabalho e seguindo os princípios da química analítica verde foi desenvolvido e validado para extração de sulfonamidas em amostras de águas superficiais. Os principais parâmetros de extração da microextração em fase líquida suportada por membrana oca de polipropileno em configuração trifásica foram otimizados através de planejamentos experimentais. As condições ótimas de extração foram a adição de 11,2 g de sulfato de amônio na fase doadora de 15 mL (amostra), uso de 1-octanol para o preenchimento dos poros da fibra oca, pH 5 para a fase doadora e pH 10 para a fase receptora e 60 min de extração. A separação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e a detecção por arranjo de diodos. Os principais parâmetros analíticos do método proposto foram avaliados sendo o limite de quantificação para as cinco sulfonamidas (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio padrão relativo (RSD) menor que 17%. Os estudos de recuperação revelaram valores entre 61-119%. O método proposto apresenta-se promissor para análises de rotina em águas superficiais, tendo em vista a emergente preocupação da contaminação ambiental por sulfonamidas.

Palavras-chave: microextração, membrana oca, sulfonamidas, amostras aquosas.

1. Introdução

São raros os casos em que podemos analisar quimicamente uma amostra de forma direta sem a preocupação com a sua composição. Apesar dos avanços da tecnologia no campo instrumental, a maioria dos equipamentos ainda não pode operar diretamente com matrizes de amostras complexas¹. Devido a essa característica, a etapa do preparo da amostra é considerada a mais importante em qualquer procedimento analítico.

Para detectar níveis traço de analitos muitas técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas, entre elas as técnicas com a utilização de membranas se destacam. Além de apresentarem facilidade de utilização e bons resultados, as membranas são de simples aquisição comercial por possuírem aplicações na purificação de água potável e tratamento de águas residuais². Além disso, quando utilizadas para separações em fase líquida, membranas formam sistemas miniaturizados, diminuindo a utilização de solventes orgânicos e apresentando vantagens tanto para uma metodologia mais verde, quanto para a saúde do analista. A técnica de microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME, do inglês hollow-fiber liquid phase microextraction) foi desenvolvida em 1999³ e nas últimas décadas tem sido utilizada para os mais diferentes poluentes e contaminantes emergentes⁴.

Os fármacos pela sua tradição não são vistos como potenciais poluentes ambientais. Porém, com a recente presença deles em meios aquáticos, levantou uma grande questão devido a possíveis impactos. Estes compostos emergentes são citados como sendo agentes de diagnóstico, surfactantes, fragrâncias, aditivos industriais, ativos farmacêuticos, produtos de cuidado pessoal, esteroides entre outros⁵. A presença desses ativos em recursos naturais gera uma problemática de alimentos contaminados por fármacos de uso humano e veterinário⁶. Estudos tem se intensificado para detecção de antibióticos nos alimentos de origem animal, de leite, mel, de peixe, bem como de amostras ambientais.

De acordo com avaliações realizadas nos últimos anos, sulfonamidas (SAs) e fluoroquinolonas estão entre os antibióticos veterinários mais comumente usados⁷.

A alta eficiência de SAs e seu custo relativamente baixo têm estimulado o seu uso em práticas veterinárias. Além de estarem em formulações puras e combinações com outros antibióticos, as SAs são utilizadas como aditivos em rações para animais. Como resultado de má conduta na profilaxia e no tratamento de animais, cada ser humano torna-se um consumidor passivo desses fármacos podendo ter efeitos adversos como reações alérgicas, supressão de atividade da enzima, alteração da microflora intestinal e promoção de formas sustentáveis de patógenos⁸.

O Ministério da Saúde juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceram na Resolução RDC n° 53 de 2 de outubro de 2012⁹ o Regulamento Técnico do Mercosul para Limites Máximos de Resíduos (LMR) para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. O Limite é apresentado em 100 µg L⁻¹ para matrizes de fígado, rim, músculo e leite em alimentos de origem bovina, suína e aves.

Para resíduos em água não há resolução, porém, publicações recentes da U.S. Environmental Protection Agency (EPA) apresentam as SAs como contaminantes emergentes que causam preocupação. Isso por estarem em quantidades significativas em amostras ambientais, tais como águas residuais farmacêuticas e agrícolas, águas superficiais e subterrâneas, e solos.

Como a tendência atual é o estabelecimento de limites máximos de SAs em matrizes aquosas nos próximos anos, o propósito geral deste estudo foi o desenvolvimento de um método analítico utilizando HF-LPME no modo trifásico (Figura 1) para a determinação de SAs em águas superficiais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

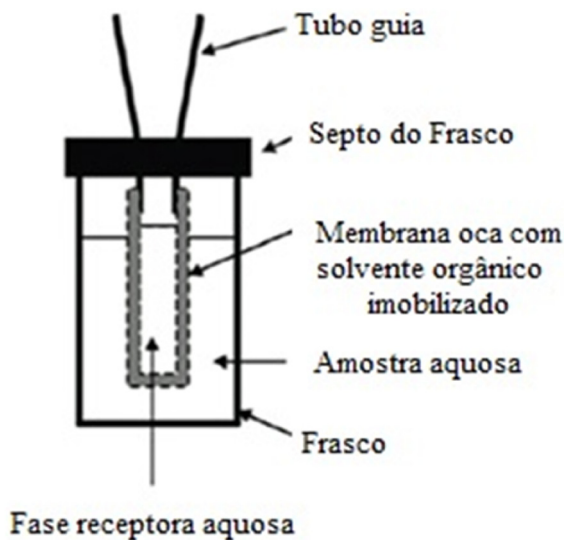


Figura 1. Esquema do modo de extração da HF-LPME no modo de três fases. (Fonte: Adaptado de Merib e Carasek, 2013)

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Para as análises foram utilizados padrões de sulfadizina (SDZ), sulfametaxazol (SMX), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR) e sulfametoxipiridazina (SMP), além dos solventes octanol, pentanol e tolueno obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de amônio e cloreto de sódio foram obtidos da Vetec, Brasil. Fosfato de potássio monobásico anidro foi obtido da Sigma-Aldrich. Frascos com tampas em volumes de 20 mL foram adquiridos da Supelco, EUA. Fibras de polipropileno PP 300/120 Accurel® com 1,2 mm de diâmetro interno, 300 µm de espessura e 0,2 µm de tamanho de poro foram obtidas da Wuppertal, Alemanha. Água superficial de açude localizado em Gaspar – Santa Catarina (26°49'18.1"S 49°01'32.0"W) foram coletadas em frascos esterilizados e mantidos em refrigeração até a realização dos ensaios.

2.2 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido modelo LC 20AT (Shimadzu,

Japão) equipado com detector DAD modelo SPD-M20A, injetor manual, modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, EUA) e loop de injeção de 20 µL. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna C18 (Phenomenex Kinetex de 250 mm x 4,6 mm d.i. e 5 µm de espessura de filme obtido da Torrance, EUA). Entre o injetor e a coluna foi utilizada uma coluna de guarda C18 (Phenomenex Kinetex, 2 mm x 4,6 mm d.i. e 2 µm de espessura de filme da Torrance, EUA). Também foram empregados volume de injeção de 20 µL e vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹. O modo escolhido foi a eluição por gradiente e a fase móvel utilizada foi metanol e água acidificada (0,1% ácido acético) em pH ≈ 3,5. O gradiente do solvente iniciou a 20:80 mantendo-se por 3 min seguido de uma rampa de 3 a 5 min até a proporção de 50:50 das fases; de 5 a 7 min uma segunda rampa até 70:30 foi estabelecida mantendo até 10 min de corrida; a partir disso, até 12 min, a razão voltou a inicial (20:80) sendo reestabelecida e equilibrada até 20 min. Os comprimentos de onda máximo escolhidos foram 267, 289, 267, 265, 269 nm para SDZ, STZ, SMR, SMP e SMX, respectivamente.

2.3 Planejamento experimental para otimização

A otimização dos parâmetros que afetam a extração das sulfonamidas por HF-LPME foi realizada por experimentos multivariados em uma concentração de 50 µg L⁻¹ dos analitos em água ultra-pura. Para a otimização da adição de sal, foram utilizados sulfato de amônio, cloreto de sódio e fosfato de potássio monobásico em quantidades próximas a sua saturação em água. A quantidade de sulfato de amônio e o tempo de extração foram avaliados utilizando o planejamento Doehlert – consistindo em 9 experimentos variando o tempo de extração (30-120 min) e a quantidade de sal (0-11,2 g).

Superfície de resposta triangular foi utilizada para a escolha do solvente orgânico de recobrimento da fibra – formação da camada líquida suportada – utilizando 1-octanol, tolueno e 1-pentanol. A adição de solvente extrator na fase doadora também foi avaliada, variando em 0, 30, 60 e 100 µL de octanol:pentanol

(55:45). Os resultados experimentais foram processados com auxílio do STATISTICA 7 e Excel considerando as médias geométricas das áreas cromatográficas dos cinco analitos.

2.4 Preparo das fibras de polipropileno

Para os experimentos, hastes de 4 cm de comprimento de fibras de polipropileno (PP) foram cortadas e seladas em uma das extremidades para possibilitar o preenchimento com a fase receptora no momento da extração. As fibras, depois de preparadas, foram armazenadas em um frasco contendo acetona até sua utilização.

2.5 Validação

Nessa etapa foi empregado o procedimento de preparo de amostra previamente otimizado. Com base nas curvas analíticas foram calculados as faixas lineares, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) e os coeficientes de correlação lineares de cada analito para o método proposto. O LOQ foi definido como o primeiro ponto da curva analítica como definido pelo INMETRO¹⁰ e o LOD como três vezes menor do que o LOQ.

A precisão e a exatidão foram avaliadas através da fortificação de amostras de água superficial de açude. A precisão avaliada pela repetitividade intraday ($n=3$) em dois níveis de concentração (5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e calculada como desvio padrão relativo (RSD), considerando valores precisos àqueles inferiores a 20%. A recuperação foi avaliada em três níveis de fortificação (2, 5 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata sendo apresentada em termos de porcentagem de recuperação considerando valores bons entre 60 e 130% para analitos a nível traço.

3. Resultados e discussão

Alguns parâmetros iniciais foram fixados de acordo com estudos anteriores de nosso grupo de

pesquisa¹⁴. A fibra de polipropileno foi utilizada em configuração de haste com 4 cm de comprimento; fase doadora (amostra) tampão pH 5 (acetato 0,05 mol L⁻¹) e fase receptora tampão pH 10 (carbonato 0,05 mol L⁻¹); 15 mL de amostra com aditivo de 30 μL de 1-octanol:1-pentanol (55:45); e 10 g de sulfato de amônio para alterar a força iônica.

3.1 Fase doadora, fase receptora e a influência do pH

É conhecido que o pH da amostra exerce influência sobre a eficiência de extração dos analitos devido a possibilidade de ionização. Na metodologia proposta por HF-LPME os analitos devem necessariamente estar na forma molecular. Isso porque, nessa forma, ocorre a interação com o solvente orgânico e, conseqüentemente, a extração. Por isso é necessário trabalhar com amostras tamponadas na fase doadora sempre abaixo do pKa dos analitos em aproximadamente duas unidades - em meios mais ácidos que isso pode ocorrer a protonação do grupo amino, reduzindo a interação com o solvente orgânico^{11,12}. Dessa forma na fase doadora o tampão acetato (0,05 mol L⁻¹) foi utilizado garantindo assim o pH 5.

O sistema de três fases utilizado em HF-LPME está sob influência dos equilíbrios entre o analito na fase doadora-solvente e o analito no solvente-fase receptora. Neste caso para aumentar a eficiência da extração é necessário aumentar o equilíbrio para a fase receptora, uma vez que esta armazena o analito. Para isso é necessária uma fase receptora com pH duas unidades acima do pKa dos analitos estudados de modo a promover a ionização do analito na interface solvente-fase receptora e garantir a permanência do mesmo nessa fase devido à falta de interação com o solvente orgânico^{13,14}. Utilizando uma fase receptora em pH 10 (tampão carbonato 0,05 mol L⁻¹) é garantida a ionização dos analitos.

3.2 Solvente orgânico como membrana líquida suportada

Testes foram realizados para confirmar a importância da presença do solvente orgânico nos poros da fibra. Para o método proposto é importante que o solvente tenha polaridade similar as SAs, de modo a obter um elevado coeficiente de partição. Os resultados obtidos pelo planejamento de superfície triangular são apresentados na Figura 2, sendo avaliados 1-octanol, 1-pentanol e tolueno, individualmente, em misturas binárias com 33% e 66 % (v/v) de cada solvente e uma mistura ternária contendo 33% (v/v) cada.

A superfície resposta triangular apresentou melhores resultados com os solventes orgânicos puros, naqueles com maior similaridade de polaridade com os analitos. As melhores respostas foram obtidas nas misturas contendo maiores quantidades de 1-octanol. A utilização de 25 % de tolueno em 1-octanol também seria possível porem não foi utilizada ao considerar os efeitos toxicológicos do tolueno ($LD\ 50_{\text{tolueno}} > LD\ 50_{\text{octanol}}$). Dessa forma o solvente escolhido como recobrimento da membrana foi o 1-octanol.

3.3 Força iônica e tempo de extração

Para verificar o efeito da adição de sal na solução

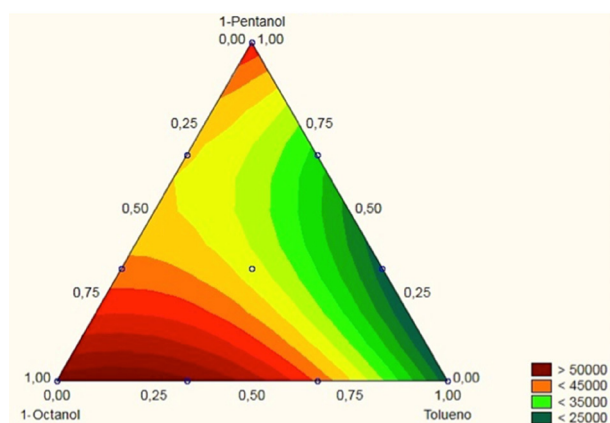


Figura 2. Superfície resposta triangular obtida a partir da extração com os solventes: tolueno, 1-octanol e 1-pentanol. Condições: volume de amostra de 15 mL tamponada em pH 5,0 com tampão acetato, 10 g sulfato de amônio, 30 μ L de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), tempo de extração 60 minutos e 50 μ g/L-1 de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.

mista de padrões em água foi realizado um estudo inicial. O efeito “salting out” faz com que as moléculas de água solvatem preferencialmente os íons provenientes de sal, liberando dessa forma os analitos para que estes sejam extraídos pelo solvente orgânico. Os sais de sulfato de amônio, cloreto de sódio e fosfato de potássio monobásico anidro foram testados, sendo adicionados à amostra em quantidades um pouco abaixo da saturação da solução. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

O gráfico de barras, em porcentagem (%) normalizada, apresenta a média das respostas em triplicata para os sais sulfato de amônio e fosfato de potássio monobásico. As extrações utilizando cloreto de sódio não foram eficientes, portanto não utilizadas na comparação. Sulfato de amônio apresentou o efeito mais significativo na extração devido a sua alta solubilidade em água que leva a uma maior força iônica na solução.

Para a otimização da quantidade de sal adicionada (0 a 11,2 g – considerando de 0 a 97,5 % de saturação) e o tempo de extração (30 a 120 min) foram obtidas superfícies de respostas individuais e, através da média geométrica, uma superfície compromisso para todos os analitos da extração. Com a superfície resposta de compromisso, Figura 4, podemos observar resultados ótimos com a utilização de 11,2 g de sulfato de amônio e 60 min de extração.

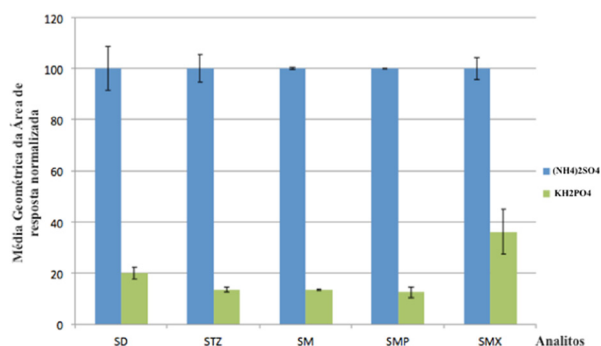


Figura 3. Estudo do ajuste da força iônica utilizando 3 g de KH_2PO_4 , 10 g de $(NH_4)_2SO_4$. Condições: volume de amostra de 15 mL com tampão acetato, 30 μ L de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), tempo de extração 60 minutos e 50 μ g/L-1 de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.

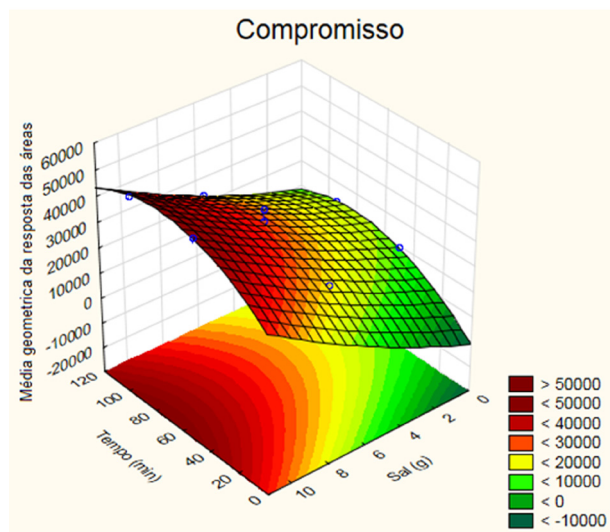


Figura 4. Superfície de resposta compromisso para os analitos na otimização da força iônica e do tempo de extração. Condições fixas: volume de amostra de 15 mL com tampão acetato, 30 μL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55) e 50 ppb solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.

3.4 Solvente orgânico Coextrator

É conhecido que solventes extratores adicionados na amostra (fase doadora) melhoram a eficiência da extração¹⁵. Porém, quando utilizado a fibra de polipropileno como suporte para a membrana líquida, esta adição de solvente orgânico pode não influenciar na extração. Com os resultados experimentais foi possível a elaboração de um gráfico de barras (Figura 5) comparando a adição de diferentes volumes do

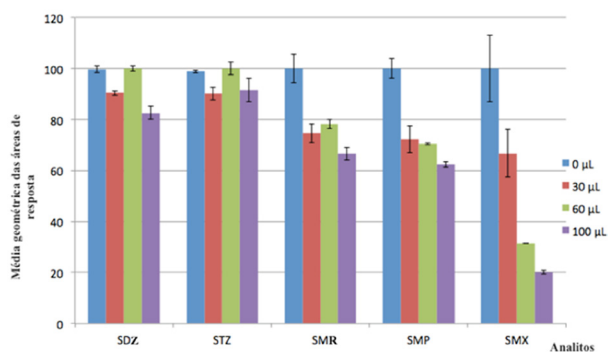


Figura 5. Comparação entre a adição de diferentes volumes do solvente extrator 1-octanol: 1-pentanol (55:45) para a extração de sulfonamidas, utilizando HF-LPME.

solvente extrator. Para os analitos SDZ e STZ a adição não apresentou alteração na extração, enquanto para SMR, SMP e SMX a eficiência diminuiu. Uma vez que esses analitos são mais polares e interagiram mais com o solvente orgânico coextrator, a extração foi prejudicada não sendo interessante utilizar o solvente adicionado.

3.5 Condição final otimizada

Após as otimizações foi definido como condição ótima de extração o uso de 15 mL de amostra adicionada de tampão acetato (0,05 mol L⁻¹ pH 5) como fase doadora, tampão carbonato (0,05 mol L⁻¹ pH 10) como fase receptora, 11,2 g de sulfato de amônio para o aumento da força iônica na amostra, 60 min de extração e 1-octanol como solvente orgânico para preenchimento dos poros da fibra de polipropileno.

3.6 Parametros de validação

Após a otimização dos parâmetros para extração das SAs o método foi avaliado através das principais figuras de mérito. Testes de seletividade foram realizados e uma curva na matriz foi requerida. A tabela 1 apresenta os valores determinados para a linearidade (coeficiente de correlação), faixa linear, limite de quantificação e detecção, e a precisão do método. Os ensaios de repetitividade (intra-day) apresentaram desvio padrão relativo (RSD) entre 0,5 e 16,2% para os níveis 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3), confirmando a boa precisão do método.

Estudos de recuperação (tabela 2) foram realizados em triplicata utilizando níveis concentração 2, 3 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentando resultados entre 61,4 e 118,7%.

4. Conclusões

A utilização da técnica de HF-LPME trifásica, utilizando membrana líquida suportada de 1-octanol apresentou bons resultados para extração de sulfonamidas em águas superficiais. O método desenvolvido e validado mostrou-se adequado por ser preciso, linear, exato, com

Tabela 1. Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto com HF-LPME para determinar sulfonamidas em água superficial através de uma curva na matriz.

Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva Analítica	r	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
SD	1,6	5	5-100	$y = 554,69x - 40,252$	0,998	1,2	0,8
STZ	1,6	5	5-100	$y = 492,69x + 1155,6$	0,997	8,0	0,5
SM	1,6	5	5-100	$y = 910,99x + 89,223$	0,999	0,8	3,7
SMP	1,6	5	5-100	$y = 768,47x + 133,15$	0,998	2,8	5,8
SMX	1,6	5	5-100	$y = 1109,8x - 314,7$	0,998	12,5	16,2

Tabela 2. Resultados de recuperação para água superficial de açude, realizada em três níveis de fortificação.

Analito	Nível Fortificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	REC (%)
SD	2	95,7
	5	112,4
	35	85,7
STZ	2	118,7
	5	88,1
	35	65,1
SM	2	117,3
	5	73,2
	35	63,6
SMP	2	90,0
	5	69,1
	35	71,5
SMX	2	61,4
	5	77,6
	35	68,8

recuperações dentro dos limites aceitáveis e ter uma ampla faixa linear.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

Referências

- [1] REZAEI, M. et al. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
- [2] FENG, C. Y., KHULBE, K. C., MATSUURA, T., ISMAIL, A. F. Recent progresses in polymeric hollow fiber membrane preparation, characterization and applications. *Separation and Purification Technology*, v. 111, p. 43-71, 2013.
- [3] PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for samples preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v.71(14), p. 2650-2655, 1999.
- [4] MERIB, J., CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica*, v.5, p. 249-262, 2013.
- [5] MOZAZ, R. S., LOPEZ, A. M. L., BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry Technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J. Chromatogr. A*, v.1-2, p.97-115, 2007.
- [6] SARMAH, A. K., MEYER, M. T., BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, v. 65 (5), p. 725-759, 2006.
- [7] CHÁFER-PERICÁS, C., MAQUIEIRA, Á., PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29 (9), p. 1038-1049, 2010.
- [8] DMITRIENKO, S. G., APYARI, K. V. V., TOLMACHEVA, V. T., ZOLOTOV, Y. A. Recent advances in samples preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 850, p. 6-25, 2014.
- [9] Resolução RDC N° 53, de outubro de 2012. Ministério da Saúde, Agência nacional de Vigilância Sanitária.
- [10] Doq-cgcre-008 – INMETRO
- [11] OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Quim. Nova*. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.
- [12] DIONÍSIO, A. G. G.; BASTITÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. *Scientia Chromatographica*. v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.
- [13] KOKOSA, J. M.; PRZUJAZNY, A.; JEANNOT, M.A. *Solvent Microextraction – Theory and Practice*. New Jersey: Wiley ed. 2009.
- [14] BEDENDO, G. C., JARDIM, I. C. S. F., CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6449-6454, 2010.
- [15] CARLETTO, J. S.; LUCIANO, R. M.; BADENDO, G. C.; CARASEK, E. Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 638, p. 45, 2009.